

# SPOLNE I DOBNE RAZLIKE U EKSPRESIJI GLIKOPROTEINA P (P-gp) U BUBREZIMA, JETRI I PROBAVNOM TRAKTU ŠTAKORA

---

Ivković, Jana

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:431026>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Jana Ivković

**SPOLNE I DOBNE RAZLIKE U  
EKSPRESIJI GLIKOPROTEINA P (P-gp)  
U BUBREZIMA, JETRI I PROBAVNOM  
TRAKTU ŠTAKORA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr.sc. Ivan Sabolić

Komentor: Prof.dr.sc. Roberto Antolović

Rijeka, 2015.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Jana Ivković

**SEX AND AGE DIFFERENCES IN THE  
EXPRESSION OF P-GLYCOPROTEIN  
(P-gp) IN RAT KIDNEYS, LIVER AND  
GASTROINTESTINAL TRACT**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2015.

Mentor rada: Dr.sc. Ivan Sabolić

Komentor: Prof.dr.sc. Roberto Antolović

Doktorski rad obranjen je dana 2.11.2015. na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Krešimir Pavelić, Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
2. Prof.dr.sc. Zlatko Trobonjača, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
3. Doc.dr.sc. Mirela Sedić, Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
4. Dr.sc. Ivan Sabolić, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb
5. Prof.dr.sc. Roberto Antolović, Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

## *Hvala*

*mentoru dr.sc. Ivanu Saboliću što mi je pružio priliku da izradim ovaj doktorski rad u Jedinici za molekulska toksikologiju te na nesebično podijeljenom znanju i iskustvu tijekom izrade ovog rada.*

*komentoru prof.dr.sc.Robertu Antoloviću na pomoći i korisnim savjetima tijekom dokorskog studija i pisanja dokorskog rada.*

*dr.sc. Mariji Ljubojević na pomoći u planiranju i provedbi eksperimenata.*

*gđi Evi Heršak, dr.sc. Davorki Breljak, dr.sc. Ivani Vrhovac i Deanu Karaici na pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom zajedničkog rada.*

*mojim roditeljima na podršci tijekom cjelokupnog obrazovanja.*

*Alanu što je uvijek tu za mene ♡*

## SAŽETAK

Glikoprotein P (P-gp) je o ATP-u ovisan membranski prijenosnik lijekova i drugih tvari (MDR1 eng. *Multi Drug Resistant protein 1*) izražen u kanalikularnoj membrani jetrenih stanica, četkastoj membrani bubrežnih proksimalnih kanalića (PK), epitelnim stanicama crijeva, krvno-moždanoj, materno-fetalnoj barijeri te u hematopoetskim stanicama. Spolni hormoni utječu na ekspresiju P-gp u jetri štakora (mužjaci (M) > ženki (Ž)), ali hormon/i odgovorni za te razlike, kao i moguće spolne razlike u drugim organima nisu detaljno istraženi. U ovom radu istraženi su: ekspresija, spolne razlike te učinci gonadektomije i obrade spolnim hormonima gonadektomiranih životinja na ekspresiju P-gp u jetri, bubrezima i probavnom traktu muških i ženskih štakora soja Wistar metodama imunocitokemije i Western analize. Dodatno, istražene su dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima novorođenih (1 dan starosti), predpubertetskih (3 tjedna starosti), odraslih (3 mjeseca starosti) i ostarjelih (2 godine starosti) životinja. Ovim radom potvrdili smo spolne razlike u ekspresiji P-gp (M < Ž) u jetri i pokazali da kastracija ima stimulacijski učinak, dok tretman kastrata estradiolom nije imao značajan utjecaj na ekspresiju P-gp, što ukazuje na androgene kao glavne regulatore (inhibitore) jetrene ekspresije P-gp. U bubrezima, spolne razlike nađene su u kori (S1/S2 segmenti PK; M > Ž) i vanjskom tračku (S3 segmenti PK; M < Ž). U bubrezima ženskih štakora, gonadektomija je smanjila, dok u muških štakora nije imala učinka na ekspresiju P-gp. Tretman kastrata estradiolom smanjio je ekspresiju P-gp u kori i povećao u vanjskom tračku, ukazujući na estrogene kao glavne regulatore ekspresije P-gp u bubrezima. U crijevima, utvrđena je ekspresija P-gp po obrascu:

duodenum < jejunum < ileum > cekum > kolon). Spolne razlike nađene su u duodenumu, jejunumu, ileumu i kolonu (M < Ź) te u cekumu (M > Ź); ućinak gonadektomije nije uoćen zbog velike varijabilnosti rezultata. Dobne razlike u ekspresija P-gp uoćene su u jetri (novorođeni > prepubertetski > odrasli < stari) i bubrezima (novorođeni < prepubertetski < odrasli > stari). Postojanje spolnih i dobnih razlika u ekspresiji P-gp u glavnim (re)apsorpcijskim i sekrecijskim organima u Źtakora ukazuje na heterogenost njihovih zadaća, Źto moŹe bitno utjecati na procjenu obima transporta, međudjelovanja i toksićnosti razlićitih lijekova i drugih ksenobiotika, te nastanak rezistencije na lijekove u ovih pokusnih Źivotinja, vaŹnim u eksperimentalnim i pretklinećkim/translacijskim istraŹivanjima.

**Ključne rijeći:** bubrezi, dobne razlike, imunocitokemijska analiza, jetra, Mdr1, P-gp, proksimalni kanalići, probavni trakt, spolni hormoni, spolne razlike, Western analiza

## SUMMARY

P-glycoprotein (P-gp) is an ATP-dependent transmembrane multidrug efflux transporter (MDR1) constitutively expressed in the hepatocyte bile canaliculi, renal proximal tubule (PT) brush border membrane, intestinal epithelium, blood-tissue barriers, maternal-fetal barriers, and hematopoietic cells. It is known that sex steroids influence the P-gp expression in rat liver (males (M) > females (F)), but hormone(s) responsible for these differences, and possible sex differences in other P-gp expressing organs, have not been investigated in detail. In this study the expression, sex differences, effects of gonadectomy, and treatment with sex steroids on the expression of P-gp in liver, kidneys, and gastrointestinal tract of M and F Wistar rats were investigated by immunocytochemistry and Western blotting. Additionally, age-differences in P-gp expression in liver and kidneys of neonatal (age of 1 day), prepubertal (age of 3 weeks), adult (age of 3 months), and old (age of 2 years) animals were investigated. In liver, we confirmed sex differences in P-gp expression (M < F), and showed that castration stimulated, while estradiol treatment did not significantly affect the P-gp expression in castrated M. Thus indicating androgens as major regulators (inhibitors) of the liver P-gp expression. In kidneys, sex differences were found in cortex (PT S1/S2 segments; M > F) and outer stripe (PT S3 segments; M < F). Gonadectomy decreased the P-gp expression in F, without effecting the expression in M. Estradiol treatment decreased the P-gp expression in cortex and increased expression in outer stripe in castrated M, thus indicating estrogens as major regulators of the renal P-gp expression. In intestine, the following pattern of P-gp expression was identified: duodenum < jejunum <



ileum > cecum > colon). Sex differences were detected in duodenum, jejunum, ileum and colon (M < F), and in cecum (M > F); an effect of gonadectomy was not detected due to high variability of results. Age differences in P-gp expression were found in liver (neonatal > prepubertal > adult < old) and in kidneys (neonatal < prepubertal < adult > old). The presence of sex and age differences in P-gp expression in major (re)absorptive and secretory organs in rats indicates heterogeneity of their functions, which may affect evaluations of the transport, interactions and toxicity of various drugs and other xenobiotic, and development of drug resistance in these animals, important in experimental and preclinical/translational studies.

**Key words:** kidney, age differences, immunocytochemistry, liver, Mdr1, P-gp, proximal tubule, gastrointestinal tract, sex steroids, sex differences, Western blotting

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Farmakologija: znanost o međudjelovanju lijeka i organizma .....	1
1.1.1. Povijesni pregled .....	1
1.1.2. Podrijetlo lijekova .....	3
1.1.3. Nazivlje lijekova.....	5
1.2. Farmakokinetika .....	6
1.2.1. Apsorpcija lijeka .....	6
1.2.2. Raspodjela (distribucija) lijeka .....	8
1.2.3. Metabolizacija lijeka .....	8
1.2.4. Izlučivanje (eliminacija) lijeka .....	9
1.3. Prolaz lijeka kroz stanične membrane .....	10
1.4. Prijenosnici lijekova .....	12
1.5. Glikoprotein P (P-gp) .....	14
1.5.1. Struktura i zadaća .....	14
1.5.2. Tkivna raspodjela .....	16
1.5.3. Supstrati P-gp .....	18
1.5.4. Ontogeneza P-gp u štakora .....	21
1.5.5. Steroidni hormoni i regulacija P-gp .....	22
1.5.6. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima, jetri i probavnom traktu .....	23
1.5.7. Razlike među vrstama i dobne razlike .....	23
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	25
3. MATERIJALI I METODE.....	26
3.1. Puferi i otopine.....	26
3.2. Kemikalije i pribor .....	27
3.3. Pokusne životinje.....	28
3.3.1. Gonadektomija i obrada spolnim hormonima .....	28
3.4. Protutijela.....	29
3.4.1. Primarna protutijela .....	29
3.4.2. Sekundarna protutijela .....	30
3.5. Izolacija ukupnih staničnih membrana iz različitih zona bubrega, jetre i različitih odsječaka probavnog trakta.....	30

3.6.	Izolacija ukupnih staničnih membrana iz jetre i bubrega miša .....	31
3.7.	Izolacija četkastih membrana iz kore bubrega.....	31
3.8.	Određivanje koncentracije proteina .....	32
3.9.	SDS–elektroforeza u gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) i Western analiza....	32
3.10.	Denzitometrija.....	34
3.11.	Fiksiranje tkiva in vivo.....	34
3.12.	Tkivni naresci i posredna imunofluorescencija .....	34
3.12.1.	Obrada ionskim detergentom .....	35
3.12.2.	Kuhanje u citratnom puferu različitog pH i obrada neionskim detergentom .....	35
3.12.3.	Obrada organskim otapalima uz kuhanje u citratnom puferu različitog pH i obrada neionskim detergentom .....	36
3.13.	Mjerenje intenziteta fluorescencije.....	37
3.14.	Prikaz i statistička obrada podataka .....	37
4.	REZULTATI .....	38
4.1.	Određivanje optimalnih uvjeta za uporabu protutijela za P-gp/MDR u imunocitokemijskoj i Western analizi .....	38
4.2.	P-gp u jetri štakora.....	42
4.2.1.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora.....	42
4.2.2.	Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u jetri štakora.....	43
4.2.3.	Određivanje spolnih hormona odgovornih za spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora .....	45
4.2.4.	Dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora .....	46
4.3.	P-gp u bubrezima štakora.....	51
4.3.1.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora.....	51
4.3.2.	Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u bubrezima štakora.....	55
4.3.3.	Određivanje spolnih hormona odgovornih za spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora .....	58
4.3.4.	Dobne razlike u ekspresiji Oat2 u bubrezima štakora .....	60
4.3.5.	Dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora .....	62
4.4.	P-gp u probavnom traktu štakora.....	68
4.4.1.	Imunocitokemijska lokalizacija P-gp duž probavnog trakta .....	68
4.4.2.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u probavnom traktu štakora.....	70

4.4.3.	Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u probavnom traktu štakora .....	72
4.5.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima miša .....	72
5.	RASPRAVA .....	75
5.1.	Prikaz P-gp imunokemijskim metodama.....	75
5.2.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp.....	75
5.2.1.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora.....	76
5.2.2.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora.....	76
5.3.	P-gp u probavnom traktu štakora.....	77
5.3.1.	Distribucija P-gp u tankom i debelom crijevu.....	77
5.3.2.	Spolne razlike u ekspresiji P-gp u probavnom traktu štakora.....	77
5.4.	Dobne razlike u ekspresiji P-gp.....	78
5.4.1.	Dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora .....	79
5.4.2.	Dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora .....	79
5.5.	Razlike među vrstama.....	81
6.	ZAKLJUČCI .....	83
7.	LITERATURA .....	85
8.	POPIS KRATICA .....	94
9.	POPIS ILUSTRACIJA .....	96
10.	ŽIVOTOPIS.....	98

# 1. UVOD

## 1.1. Farmakologija: znanost o međudjelovanju lijeka i organizma

### 1.1.1. Povijesni pregled

Sasvim je izvjesno da su drevni iscjelitelji već u osvit čovječanstva koristili najrazličitije pripravke u svrhu liječenja bolesti i poboljšanja zdravlja. Arheološki podaci iz drevnog Egipta, Mezopotamije i Kine stari su nekoliko tisuća godina, no nedvojbeno ukazuju da su tadašnji liječnici koristili najrazličitije lijekove i terapijske postupke. Jedan od najpoznatijih primjera je drevni kineski spis pod nazivom Huangdi Neijing ili u slobodnom prijevodu Unutrašnji kanon Žutog cara (eng. *Yellow Emperor's Inner Canon*) (Unschuld 2003). Spis datira iz 220. godine prije Krista i strukturiran je u obliku dijaloga između cara i njegovih ministara, odnosno liječnika. Smatra se najstarijim dokumentom tradicionalne kineske medicine; za kineske je liječnike bio nezamjenjivo štivo u prakticiranju umijeća liječenja.

Iako su mnogi lijekovi kojima se i danas koristimo otkriveni na temelju višestoljetnog iskustva, većina tih lijekova i postupaka pokazala se nedjelotvornima ili štetnima za zdravlje bolesnika. Možda je najpoznatiji ovakav primjer puštanje krvi (lat. *missio sanguinis*), koji se stotinama godina koristio kao glavni terapijski postupak. S druge strane postoje i pozitivni primjeri upotrebe različitih pripravaka u liječenju bolesti. Jedan takav je otkriće digoksina – tvari koja pospješuje rad srca (djeluje pozitivno inotropno, kronotropno i dromotropno), a rezultat je mukotrpnog rada engleskog liječnika, kemičara i botaničara dr. Williama Witheringa, koji je živio i radio u drugoj polovici 18. stoljeća (Lee 2001). On je otkrio da je u mješavini od 20ak različitih biljnih pripravaka, korištenih za liječenje srčanog zatajenja, upravo ekstrakt biljke naprstka (lat. *digitalis purpurea*) aktivni sastojak. Njegov članak iz 1785. pod nazivom „An account of the foxglove and some of its medical uses; with practical remarks on the dropsy, and some other diseases“ (u slobodnom prijevodu: Opis naprstka i njegovog korištenja u medicini; uz praktične naputke o primjeni kod bolesnika s vodom u plućima, kao i kod nekih drugih bolesti) izvanredan je primjer znanstvenog promišljanja primjene lijeka (CSPT History of Pharmacology). Osim što je

opisao djelovanje i primjenu digoksina, dr. Withering je iskreno notirao kako je za vrijeme svog istraživanja opazio niz nuspojava kao posljedicu primjene prevelikih (toksičnih) doza.

Moderna farmakologija, kakvom je danas znamo, intenzivno se počinje razvijati relativno kasno u 19. stoljeću usporedno s ostalim eksperimentalnim medicinskim disciplinama. Ocem moderne farmakologije danas smatramo dr. Oswalda Schmiedeberga, koji je prvo u Dorpatu u Estoniji (prvi specijalizirani farmakološki laboratorij utemeljen 1846. od strane Rudolfa Bucheima), a potom i u Strassburgu, postavio temelje djelovanja inhalacijskih anestetika i muskarinskih preparata (Kochweser i Schechter 1978). Povrh toga odgojio je generacije njemačkih farmakologa koji će ovu novu disciplinu proširiti diljem Europe a potom i svijeta.

Do 1935. godine armamentarij suvremenog liječnika svodio se na primjenu morfija u liječenju boli, salicilata u snižavanju temperature, kinina za liječenje malarije, fenobarbitala za kontrolu epileptičkih napadaja te etera i kloroforma za anesteziju. Iako je antibiotski učinak penicilina opisan još 1928. godine (biti će potrebno još jedno desetljeće dok ne uspije njegova sinteza u laboratoriju), upravo je te 1935. njemački znanstvenik i liječnik dr. Gerhard Dömagk opisao antimikrobno djelovanje industrijske boje koja je sadržavala sulfonamide (Otten 1986). Ovaj prvi komercijalni antibiotik pod imenom Prontosil bio je učinkovit protiv streptokoknih infekcija, a kuriozitet je da je svojoj vlastitoj kćeri spasio ruku od amputacije liječivši je upravo ovim lijekom. 1939. godine dodijeljena mu je Nobelova nagrada iz područja medicine i fiziologije (Raju 1999).

Otkriće i primjena antibiotika označila je prvi korak tzv. terapijske revolucije, koja je rezultirala masovnom upotrebom novih lijekova. Nakon antibiotika uslijedilo je otkriće učinkovitih lijekova za liječenje srčanih oboljenja, hipertenzije i astme, a nova saznanja o biologiji novotvorina rezultirala su pronalaskom kemoterapeutika koji su se počeli uspješno upotrebljavati u liječenju zloćudnih bolesti. Upravo su razvoj i primjena lijekova u kombinaciji s uvođenjem cjepiva i poboljšanjem sanitarnih uvjeta života dovele do dramatičnog produženja očekivanog trajanja života, kao i same njegove kvalitete.

Farmakologija i klinička farmakologija u zadnjih pola stoljeća izrastaju u moderne interdisciplinarne struke čije se područje djelovanja kreće od bazičnih molekularnih i staničnih istraživanja, pa sve do translacijskih, kliničkih i epidemioloških studija. Biološki lijekovi, stanična i genska terapija, regenerativna i personalizirana medicina, genomika i sistemska biologija, samo su neki od izazova s kojima se suočava moderna farmakologija.

### 1.1.2. Podrijetlo lijekova

Iako su se od naših prapočetaka lijekovi dobivali iz prirodnih izvora, kao što su biljke, životinje i minerali, polovica modernih lijekova danas se dobiva sintetskim ili polusintetskim putem. U tom smislu najosnovnija podjela podrijetla lijekova je na one dobivene prirodnim putem i one dobivene sintetskim putem (tablica 1).

**Tablica 1. Sustavan prikaz podrijetla i zastupljenosti lijekova u suvremenoj farmakologiji.**

Podrijetlo lijeka	Vrsta	Zastupljenost u suvremenoj farmakologiji
PRIRODNI	Biljke	25%
	Mikroorganizmi	12%
	Minerali	7%
	Životinje	6%
SINTETSKI	Anorganski	50%
	Organski	

**Prirodni lijekovi.** Kao što je razvidno iz tablice 1, oko 50% svih lijekova koje danas koristimo u suvremenoj medicini dolazi iz prirodnih izvora, a dio farmakologije koji se bavi proučavanjem lijekova iz prirodnih izvora nazivamo farmakognozijom (gr. *pharmakon* – lijek, *gnosis* – znanje). Prirodni lijekovi obično se sastoje od aktivnog sastojka, koji je odgovoran za terapijski učinak lijeka, te pasivnog ili inertnog dijela koji nema očiglednog fiziološkog učinka, ali njegovo prisutstvo može promijeniti apsorpciju ili potenciju lijeka. Biljke su najčešći izvor prirodnih lijekova i u svojoj suštini su pravi biosintetski laboratoriji najrazličitijih kemijskih tvari kao što su glikozidi, alkaloidi ili steroidi. Aktivni sastojak se može nalaziti u bilo kojem dijelu biljke – listu, stabljici, korijenu, sjemenkama ili cvijetu, a danas se iz osnovnih sirovina farmakološki čisti pripravak dobiva u strogo kontroliranim laboratorijskim ili tvorničkim uvjetima. Uz već spomenuti

primjer digoksina izoliranog iz listova naprstka, valja spomenuti i korijen biljke velebilje (lat. *Atropa belladonna*), koji sadrži alkaloid atropin (antikolinergik), te osušeni sok iscijeđen iz nezrelih čahura vrtnog maka (lat. *Papaverum somniferrum*), koji sadrži alkaloid morfin (sedativ i analgetik) (tablica 2).

**Tablica 2. Sustavan pregled biljnih izvora lijekova, te njihov farmakološki učinak.**

Vrsta biljke	Uobičajeno ime	Sirovina	Aktivni sastojak	Farmakološko djelovanje	Lijek
<b>Atropa belladonna</b>	velebilje	korijen	alkaloidi: atropin, hyosciamin skopolamin	antikolinergičko, antisekretorno, midrijatičko, učinak na SŽS	atropin skopolamin
<b>Papaverum somniferrum</b>	vrtni mak	opijum – osušeni sok iscijeđen iz nezrelih čahura	alkaloidi: morfin, kodein, papaverin	centralni analgetik, antitusik, mišićni relaksans (papaverin)	morfin kodein papaverin
<b>Digitalis purpurea</b>	naprstak	listovi	srčani glikozidi	kardiotonici	digitoksin
<b>Strophanthus gratus et kombe</b>		sjemenke	srčani glikozidi	kardiotonici	strofantin G i K
<b>Adonis vernalis</b>	gorocvijet	nadzemni dio biljke	srčani glikozidi	blagi kardiotonik, sedativ	adinorm
<b>Rauwolfia serpentina</b>	reserpina	korijen	alkaloid rezerpin	hipotenziv, antipsihotik	rezerpin
<b>Valeriana officinalis</b>	odoljen	korijen i izdanak	hlapljivo ulje, valerična kiselina	sedativ	valerijana
<b>Cinchona officinalis</b>	kininovac	kora	alkaloidi: kinidin, kinin, cinchonin	antiaritmik, antimalarik, antipiretik	kinin kinidin

SŽS= središnji živčani sustav

Mikroorganizmi su slijedeći vrlo važan prirodni izvor lijekova i to se osobito odnosi na antibiotike i citostatike, koji se iz mikroorganizama dobivaju procesom fermentacije. Tako se primjerice iz soja zelene plijesni *Penicillium chrysogenum* dobiva penicilin G, klavulanska kiselina se dobiva iz gljivice *Streptomyces clavuligerus*, a gentamicin iz *Micromonospora purpurea* (Ligon 2004, Reading 1977). Konačno, neki životinjski organi, tkiva i tekućine mogu se također koristiti za dobivanje farmakološki aktivnih sastojaka.

**Sintetski i polusintetski lijekovi.** Ovi lijekovi dobivaju se kemijskom sintezom, a u slučaju polusintetskih lijekova aktivna se tvar izolira iz prirodnih izvora, ali se kemijski dodatno modificira. Primjer polusinteze je komercijalno spravljanje paklitaksela, citostatika s izrazitim mitostatskim



djelovanjem (Wani i sur. 1971). Aktivni sastojak taksol izolira se iz kore pacifičke tise (lat. *Taxus brevifolia*), a potom se industrijski modificira do čistog paklitaksela.

### 1.1.3. Nazivlje lijekova

Iako se još uvijek ponekad koriste tradicionalni povijesni nazivi starijih lijekova (npr. morfin ili ricinus), većina lijekova ima tri imena: kemijsko, generičko i zaštićeno. Najvažnije, najpreciznije i najkompleksnije je svakako kemijsko ime koje nedvojbeno opisuje kemijsku strukturu lijeka, i to sve u skladu s uputama Međunarodnog udruženja za čistu i primijenjenu kemiju ili skraćeno IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Često su ova imena vrlo kompleksna i ne praktična (primjerice vrlo često korišten antilipemik atorvastatin ima kemijsko ime koje glasi (3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-propan-2-ilpirrol-1-il]-3,5-dihidroksiheptanoična kiselina). U trenutku kada je lijek odobren za primjenu on dobiva i generičko ime, odnosno međunarodno nezaštićeno ime ili INN (eng. *International Nonproprietary Name*) (Nature Biotechnology 2013). Važno je da su generička imena relativno kratka i pamtljiva jer se njima koriste liječnici i farmaceuti u svakodnevnom radu, koriste se u znanstvenoj komunikaciji, ali i u kliničkim studijama. U pravilu prefiksi (u gramatici označavaju afiks koji dolazi ispred korijena riječi) generičkog imena lijeka nemaju farmakološko značenje i koriste se kako bi se razlikovali lijekovi unutar iste klase. S druge strane sufiks (u gramatici afiks koji dolazi nakon korijena riječi) ili sam korijen riječi označava farmakološko djelovanje i klasu lijeka. U tablici 3. pregledano su prikazani neke klase lijekova te njihovi sufiksi/korijenovi.

**Tablica 3. Korižen/sufiks lijeka definira farmakološko djelovanje i klasu lijeka.**

<b>Korižen/Sufiks</b>	<b>Klasa lijeka</b>	<b>Primjer</b>
- vir	antivirusni lijekovi	tenofovir
- mab	monoklonska protutijela	omalizumab
- vastatin	inhibitori reduktaze HMG-CoA	fluvastatin
- prazol	inhibitori crpke za vodikove ione	omeprazol
- sartan	inhibitori angiotenzinskog receptora	irbesartan, valsartan
- oksacin	kinolonski antibiotici	moksifloksacin
- barb -	barbiturati	fenobarbital
- grel	inhibitor agregacije trombocita	klopidogrel

Konačno, zaštićeno ime lijeka je naziv koji je odredila farmaceutska kompanija koja proizvodi lijek.

## **1.2. Farmakokinetika**

### **1.2.1. Apsorpcija lijeka**

Apsorpcija lijeka označava dolazak lijeka s mjesta njegovog unosa u organizam u krvotok, kao i u kojem se to opsegu događa. Bioraspoloživost je pojam koji označava onu količinu lijeka koja se nalazi u sistemskej cirkulaciji i dolazi na mjesto djelovanja, uzimajući u obzir, primjerice, metaboliziranje u jetrenim stanicama bubrežnu i bilijarnu ekskreciju. Ukoliko se lijek primjeni oralnim putem, a modifikacija lijeka djelovanjem mikroflora u crijevima i metabolizacijom u jetri je značajna, tada će bioraspoloživost lijeka biti značajno smanjena (tzv. učinak prvog prolaza ili eng. *first-pass effect*). U tom smislu važno je razumjeti kako raspoloživost lijeka izravno ovisi o anatomskom mjestu apsorpcije, kao i nizu drugih fizioloških i patoloških čimbenika, te je potrebno način primjene lijeka prilagoditi ovim čimbenicima (Avdeef 2003, Anselmo i Mitragotri 2014).

***Peroralna primjena ili unos lijeka kroz usta.*** Radi se o najčešćem i najjednostavnijem načinu uzimanja lijeka, pri čemu nakon gutanja, lijek dopijeva u želudac. Lijek potom iz želuca i crijeva u krvotok dopijeva najčešće difuzijom, a pri tome prolazi kroz epitelne stanice u kapilare, te putem portalne vene u jetru. Imajući ovo na umu, možemo zaključiti kako gastrointestinalna (GI)

apsorpcija ovisi o nizu čimbenika, kao što su površina apsorpcije, protok krvi, fizičko stanje lijeka (tekućina, suspenzija, kruta tvar), topivost u vodi, te koncentracija na mjestu apsorpcije. Tako je, primjerice, liposolubilnost (topivost lijeka u mastima) jedan od najvažnijih čimbenika koji određuje brzinu apsorpcije lijeka iz GI sustava. Vrlo važan čimbenik je i bazičnost, odnosno kiselost lijekova koje primjenjujemo. Tako je, primjerice, kiselost želučanog soka vrlo niska (pH 1 – 3) pa će se kiseli lijekovi poput preparata željeza dobro apsorbirati. S druge strane, bazični lijekovi se bolje apsorbiraju iz tankog crijeva gdje je pH značajno viši (pH 5 – 6). Kod peroralne primjene lijekova ne smijemo zaboraviti niti učinak prvog prolaska kroz crijeva koja uključuje modifikaciju lijeka putem crijevne mikroflore te dio apsorbiranog lijeka nadalje može biti kemijski modificiran djelovanjem citokromskih enzimskih sustava u jetri (CYP) što za posljedicu može imati značajno smanjenje bioraspoloživosti lijeka te konsektivno tome i smanjenje željene koncentracije samog lijeka na mjestu na kojem bi taj lijek trebao djelovati.

***Sublingvalna primjena.*** Venska krv iz područja usta ulijeva se u gornju šuplju venu, što lijek štiti od prolaska kroz jetru (Hearnden i sur. 2012). To je važno za lijekove poput nitroglicerina, koji se jako brzo metabolizira u jetri, te bi gutanjem lijeka njegova bioraspoloživost zbog značajnog učinka prvog prolaza bila zanemariva (Zhang i sur. 2002).

***Transdermalna (topikalna) primjena.*** Primjena lijeka kroz kožu prvenstveno ovisi o površini na koju je lijek primijenjen, te o liposolubilnosti samog lijeka. Sama apsorpcija lijeka može se pospješiti pripremom lijeka u uljnom sredstvu te trljanjem lijeka u kožu (N'Da 2014).

***Rektalna primjena.*** Kod ovog načina primjene lijek se obično primjenjuje u obliku čepića ili otopine koji/a se uvodi u rektum (završni dio debelog crijeva). Ovaj način unosa lijeka u organizam osobito je koristan kada je onemogućena peroralna primjena lijeka (bolesnik bez svijesti ili malo dijete koje odbija lijek). Oko 50% lijeka koji se apsorbira iz rektuma na putu prema općoj cirkulaciji zaobilazi jetru, što značajno umanjuje učinak prvog prolaza (Ibraheem i sur. 2014). Negative strane rektalne primjene su djelomična i nepredvidiva apsorpcija te otežano doziranje lijeka.

**Parenteralna primjena.** Pri ovom načinu primjene lijek već kod svog prvog ulaska u opću cirkulaciju zaobilazi jetru. Najčešće se lijek daje injekcijama i to direktno u venu (i.v. intravenski), direktno u mišićno tkivo (i.m. intramuskularno) ili pod kožu (s.c. subkutano). Kod intravenske primjene vrlo brzo se postiže visoka koncentracija u krvi, a lijek se može precizno dozirati u odnosu na odgovor pacijenta što ovaj način primjene čini jedinstvenim. Ovisno i okolnostima obično se lijekovi intravenski primjenjuju u bolus injekcijama (npr. tkivni plazminogeni aktivator) ili u infuziji kroz određeno vrijeme (npr. antibiotici). Subkutana primjena rezervirana je za lijekove koji ne iritiraju tkivo, a apsorpcija je na ovaj način konstantna ali sporija, što omogućava postizanje produženog učinka djelovanja (npr. inzulin). Ostali primjeri parenteralne primjene lijeka uključuju intramuskularnu, intratekalnu ili pulmonalnu primjenu lijeka (Santos Cavaiola i Edelman 2014).

### **1.2.2. Raspodjela (distribucija) lijeka**

Nakon apsorpcije lijeka i njegovog ulaska u krvotok, slijedi njegova raspodjela u organe i tkiva. Udarni volumen, lokalni protok krvi, kapilarna propusnost, kao i volumen organa ili tkiva određuje kolika je dinamika raspodjele lijeka. Razlikujemo organe koji imaju veliki protok krvi, poput bubrega, mozga ili jetre, srednji, poput skeletnih mišića, i slabi, poput vezivnog i masnog tkiva. Mnogi lijekovi se u krvi vežu za proteine. Tako je primjerice albumin najvažniji za vezanje kiselih lijekova, dok  $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein veže bazične lijekove. Osim vezanog dijela postoji i slobodni dio lijeka koji može odlaziti u tkiva i organe, a dio se slobodnog lijeka izlučuje npr. bubregom u mokraću. Obzirom da su slobodni i vezani dio lijeka u dinamičkoj ravnoteži, kako se slobodni dio lijeka izlučuje, tako se vezani dio oslobađa proteina pa se uspostavlja nova ravnoteža, no sada pri manjoj koncentraciji. Nakon primjene lijek može ostati u plazmi, može se raspodijeliti u međustaničnu tekućinu ili ući u staničnu tekućinu. Prisutnost lijeka u ovim tekućinama označavamo kao volumen raspodjele lijeka odnosno njegove distribucije i označavamo kao Vd (Volumen distribucije).

### **1.2.3. Metabolizacija lijeka**

Prije nego se lijek izluči iz organizma (tzv. eliminacija lijeka), u najvećem broju slučajeva lijek mora proći proces biotransformacije koji se glavninom događa u jetri. Ovo pravilo ne vrijedi za

male molekule i molekule koje su uz fiziološki pH sasvim disocirane, odnosno za one lijekove koji su srodni ili istovjetni s fiziološkim tvarima koje prolaze proces eliminacije tijekom različitih fizioloških procesa. Izvorni lijek tijekom procesa u biotransformaciji prolazi niz različitih kemijskih promjena pri kojima nastaju metaboliti tog lijeka. Iako su najčešće metaboliti farmakološki inaktivni, neki mogu biti i aktivni pa čak i toksični. Metabolizacija ili biotransformacija lijeka događaju se u dvije različite faze, nakon kojih slijedi njegovo izlučivanje. Prvu fazu nazivamo fazom funkcionalizacije, tijekom kojeg lijek prolazi procese oksidacije, redukcije, hidrolize koji značajno mogu utjecati i mijenjati aktivnost lijeka. Za vrijeme druge faze, koju nazivamo konjugacijskom, dolazi do spajanja metabolita iz prve faze s glukuronskom kiselinom, spojevima koji imaju sulfatnu skupinu, aminokiselinama ili glutationom. Prema tome, prije odstranjivanja iz tijela, svi lijekovi se pod utjecajem različitih enzima postupno razgrađuju do inaktivne tvari. Najznačajniji ovakvi enzimi nalaze se u jetri i nazivamo ih mikrosomskim enzimima (flavoprotein NADPH-citokrom P-450, hemoprotein citokrom P-450 i dr.). Konačan učinak biotransformacije je stvaranje u vodi bolje topljivih spojeva koji se lakše izlučuju iz organizma.

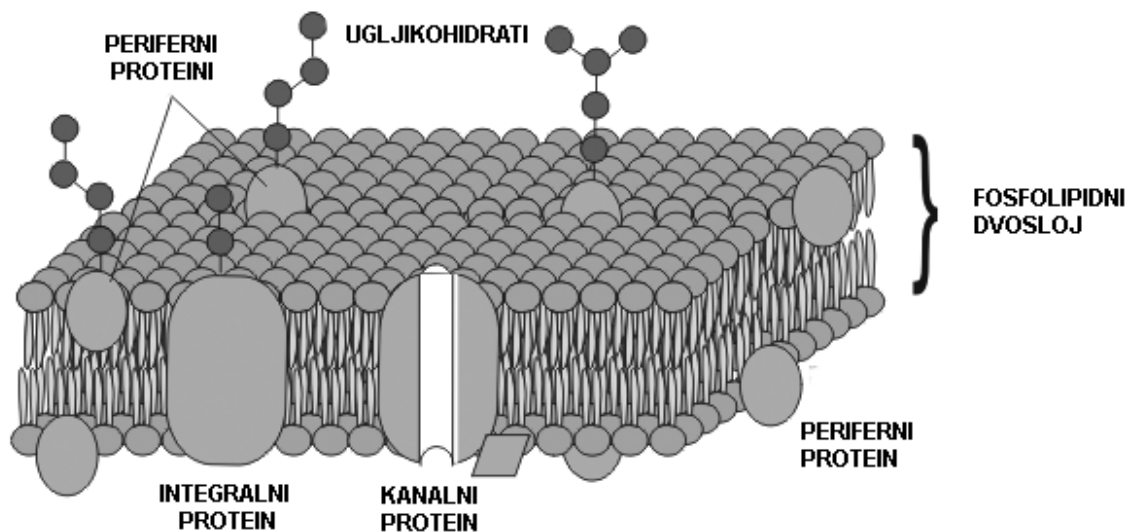
#### **1.2.4. Izlučivanje (eliminacija) lijeka**

Lijekovi se iz organizma u manjoj mjeri izlučuju nepromijenjeni, a u većoj mjeri kao metaboliti. Daleko najvažniji organi za izlučivanje lijekova su bubrezi, a manji dio lijekova može se izlučiti putem fecesa (neapsorbirani lijekovi primijenjeni peroralnim putem), majčinog mlijeka ili putem pluća (npr. plinoviti anestetici). Izlučivanje lijekova i metabolita putem bubrega odvija se trima fiziološkim procesima: glomerularna filtracija (GF) te aktivna i pasivna ekskrecija u kanalićima. Kod različitih promjena bubrežne funkcije sva tri procesa su u pravilu jednako pogođena. Relativno mali broj lijekova izlučuje se isključivo procesom GF, bez naknadne reapsorpcije i sekrecije u kanalićima. Zbog razlike između hidrostatskog i koloidnoosmotskog tlaka krvi u glomerulu, tvari poput inulina ili kreatinina pasivno se filtriraju kroz pore glomerularnih kapilara te mogu poslužiti kako mjera GF. Veliki dio lijekova se filtrira u glomerulima i djelomično reapsorbira u kanalićima. To može biti pasivan proces (pa je važna liposolubilnost lijeka te stupanj disocijacije i pH mokraće) ili aktivan proces s karakteristikama aktivnog transporta kroz biološke membrane. Konačno, mnogi lijekovi izlučuju se sekrecijom u kanalićima, što je pretežno aktivan

transport koji zahtjeva potrošak energije, a istovremeno ima i ograničen kapacitet. U ovom procesu vrlo važnu ulogu igraju i transporteri poput glikoproteina P (P-gp; MDR- eng. *Multidrug Resistance Protein*) ili MRP2 (eng. *Multidrug Resistance-associated Protein type 2*) koji se nalaze na apikalnom dijelu četkaste membrane i odgovorni su za sekreciju amfipatskih iona i konjugiranih metabolita. ABC (eng. *Adenosine triphosphate Binding Cassette*) transporteri su selektivniji za organske kationske lijekove i u pravilu se njima izlučuju bazični organski lijekovi.

### 1.3. Prolaz lijeka kroz stanične membrane

Svi procesi koji su opisani u prethodnim poglavljima, apsorpcija, raspodjela, metabolizam i izlučivanje uključuju prolazak lijeka kroz stanične membrane. Sve stanične membrane u tijelu su vrlo slične, a sastoje se od fosfolipidnog dvosloja i proteinskog dijela. Lipidni dio membrane čini dvostruki sloj amfipatskih lipida, čiji su hidrofobni lanci usmjereni prema unutra i čine hidrofobnu fazu membrane, dok su glave sa fosfatnom skupinom usmjerene prema izvanstaničnoj i unutarstaničnoj tekućini i čine hidrofilni dio membrane (slika 1).



**Slika 1. Shematski prikaz stanične membrane.** (Prilagođeno s URL: [http://www.slideshare.net/Medical\\_PPT\\_Images/integral-and-peripheral-membrane-proteins-medical-images-for-power-power-point](http://www.slideshare.net/Medical_PPT_Images/integral-and-peripheral-membrane-proteins-medical-images-for-power-power-point))

Sam lipidni dio membrane sastoji se od molekula kolesterola i fosfolipida, a dvoslojna struktura omogućava membrani prilagodljivost, pokretljivost, električnu otpornost, fluidnost kao i relativnu nepropusnost za polarne molekule.

Membranski i transmembranski proteini uklopljeni su u fosfolipidni dvosloj, a prolaze kroz jedan ili oba sloja lipida. Ovi proteini služe kao receptori, ionski kanali ili transporteri za prenošenje električnog ili kemijskog signala. Upravo su mnogi od ovih proteina cilj i biološke mete za različite lijekove.

Kod pasivnog transporta, lijekovi prolaze kroz membranu procesom difuzije ovisno o gradijentu koncentracije, veličini molekule, liposolublnosti i ioniziranosti lijeka. Nakon što se postigne ravnoteža, koncentracija slobodnog lijeka je ista u slučaju da se radi o neioniziranom lijeku. Tvari koje se ionizirane (disociraju u vodenim otopinama) topljive su u vodi i teško prolaze kroz staničnu membranu difuzijom. Obzirom da u fiziološkim uvjetima pH približno iznosi 7,4 pH jedinica, a većina lijekova dolazi u obliku slabe baze ili kiseline, u tjelesnim tekućinama biti će prisutni o obje forme, i to kao liposolubilni neionizirani oblik (koji može prolaziti kroz membranu) te kao ionski oblik (koji vrlo teško prolazi kroz staničnu membranu). Koliki će dio lijeka biti zastupljen u kojem obliku ovisi o koncentraciji vodikovih iona (pH) u vodenoj otopini i može se izračunati upotrebom Henderson-Hasselbachove jednadžbe za puferske sisteme. Liposolublnost ili topljivost lijekova u membranskim lipidima najvažniji je čimbenik koji određuje brzinu difuzije lijekova. Tako primjerice lijekovi koji sadržavaju hidrofilne  $-OH$  i  $-NH$  skupine teško prolaze kroz stanične membrane, dok su lijekovi koji sadržavaju hidrofobne skupine (npr.  $-CH_2$ ,  $-CH_3$ ) dobro topivi u mastima i brzo difundiraju kroz staničnu membranu.

Za razliku od difuzije, koja je ovisna o koncentracijskom gradijentu i tvari prelaze membranu s mjesta veće prema mjestu manje koncentracije, aktivni transport prenosi tvari uz ili protiv tog gradijenta. U tom procesu najvažniju ulogu igraju membranski proteini koji lijek vežu na jednoj strani membrane te ga prenose i otpuštaju na drugoj strani te membrane. Kako i samo ime aktivni transport implicira utrošak određenog rada, logično je da ovakav transport zahtijeva utrošak

energije koji se dobiva hidrolizom ATP-a. Aktivni transport osobito je važan kod izlučivanja nekih lijekova u mokraću i žuč, te prelasku lijekova iz mozga i likvora u krvotok.

#### 1.4. Prijenosnici lijekova

Prijenosnici lijekova imaju važnu ulogu u određivanju koncentracije brojnih lijekova u krvi i tkivima. Nalaze se u organima kao što su tanko crijevo, jetra i bubrezi, koji imaju glavnu ulogu u apsorpciji i eliminaciji lijekova. Također, nalaze se u važnim krvno-tkivnim barijerama kao što je krvno-moždana barijera. Inhibicija ili indukcija prijenosnika lijekova može promijeniti farmakokinetiku i farmakodinamiku drugog lijeka.

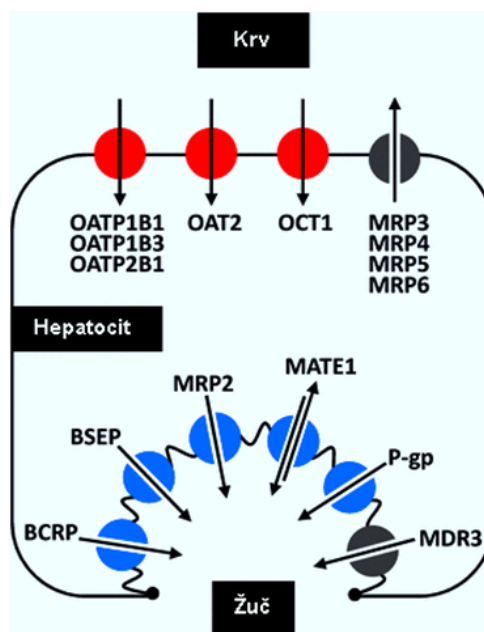
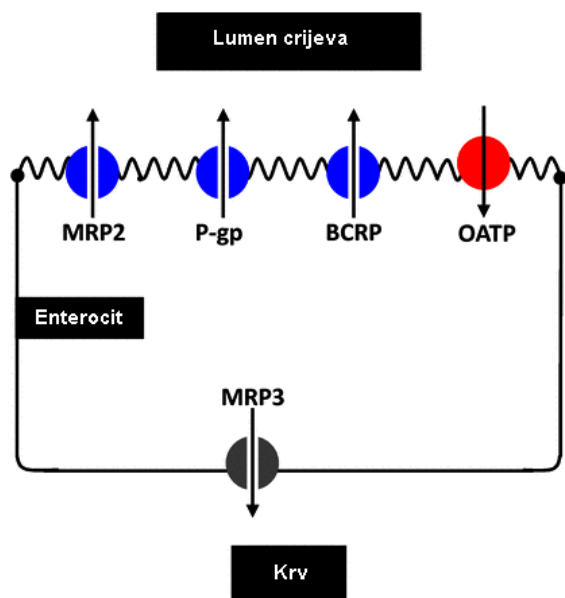
Prema svojoj zadaći, prijenosnici lijekova mogu se podijeliti u one koji posreduju u prijelazu lijekova u stanicu i u one koji posreduju u prijenosu lijekova i metabolita iz stanice prema van. Svi prijenosnici koji prenose supstrate u stanicu pripadaju superobitelji prijenosnika SLC (eng. *Solute Carriers*). Za razliku od toga, većina prijenosnika koji prenose supstrate iz stanice prema van su članovi superobitelji ABC (eng. *ATP Binding Cassette*) s izuzetkom proteina MATE (eng. *Multidrug And Toxin Extrusion*) koji su također članovi superobitelji SLC (Konig i sur. 2013, Zakeri-Milani i Valizadeh 2014, Launay-Vacher i sur. 2006). Iako se podskupine prijenosnika lijekova razlikuju ovisno o tkivu, prijelaz malih molekula između odjeljaka tkivnih tekućina zahtijeva aktivnost obje obitelji prijenosnika.

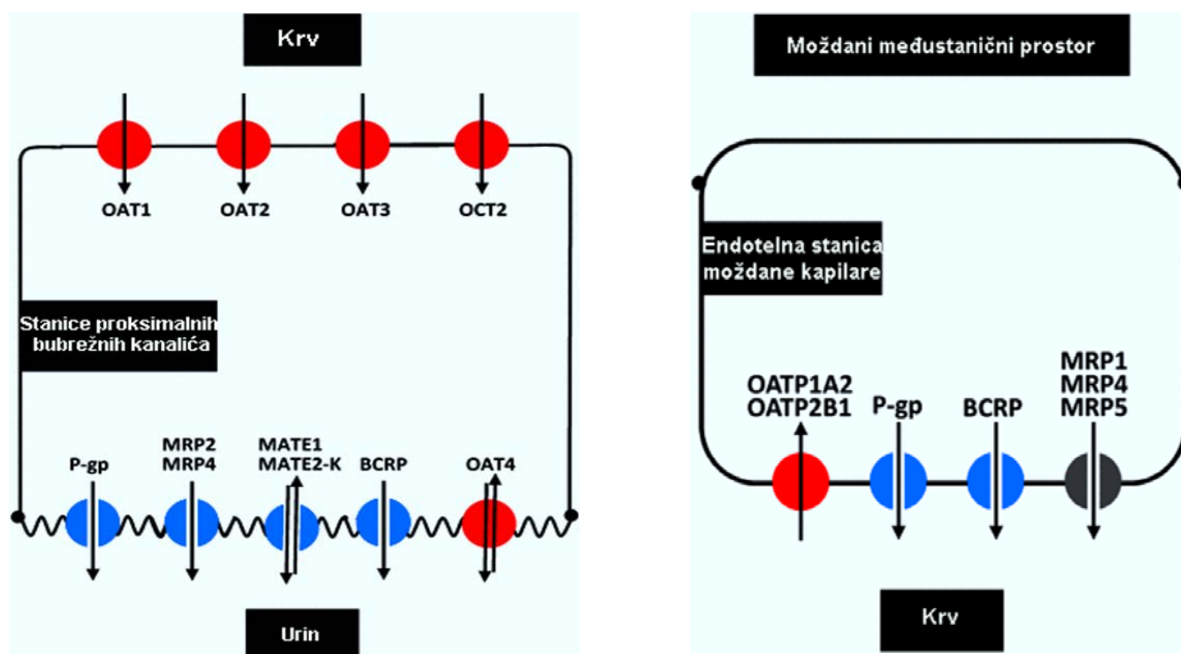
Članovi obitelji prijenosnika SLC i ABC nalaze se u raznim epitelnim stanicama kao i u drugim vrstama stanica, gdje utječu na kretanje ksenobiotika, kao što su lijekovi i toksini, i endogenih metabolita prema unutra i van iz različitih tkiva i odjeljaka različitih tekućina (slika 2).

Prijenosnici koji prenose supstrate iz stanice prema van kao što je P-gp, BCRP (eng. *Breast Cancer Resistance Protein*) i MRP2 (nalaze se na apikalnoj membrani enterocita crijevnih resica (slika 2), gdje imaju ulogu u smanjivanju bioraspoloživosti peroralno unesenih supstrata. Inhibicija ovih prijenosnika dovodi do povećanja bioraspoloživosti supstrata, dok njihova stimulacija smanjuje bioraspoloživost peroralno unesenih lijekova. Nakon apsorpcije i prolaska portalnom



venom, lijekovi dolaze do bazolateralne membrane (BLM) hepatocita. Ovdje ekspresija prijenosnika organskih aniona (npr. OATP1B1 eng. *Organic Anion-Transporting Polypeptide*) i organskih kationa (npr. OCT1 eng. *Organic Cation Transporter*) posreduju prijenos supstrata (npr. statina) u hepatocit, najvažnije mjesto za metabolizam lijekova. Prijenosnici koji prenose supstrate iz stanice prema van smješteni su na kanalikularnoj membrani hepatocita (npr. P-gp, BCRP, MATE1 eng. *Multidrug And Toxin Extrusion Protein 1*, MRP2, BSEP eng. *Bile Salt Export Pump*) gdje posreduju u prijenosu lijekova, njihovih metabolita i endogenih tvari u žuč. Također, prijenosnici lijekova imaju glavnu ulogu u izlučivanju lijekova iz stanica proksimalnih kanalića bubrega u urin. Sekrecija kationskih lijekova je posredovana ulaskom u stanicu putem OCT2 (OCT2 eng. *Organic Cation Transporter 2*), smještenim na BLM, i posljedičnim izlaskom iz stanice posredovanim MATE1 i MATE2-K (eng. *Multidrug And Toxin Extrusion Protein 2-K*), koji su smješteni u luminalnoj membrani stanica proksimalnih kanalića. Slično, prijenosnici za organske anione također su izraženi u bubregu.





**Slika 2. Prijenosnici lijekova u različitim tipovima epitelnih stanica.** (Preuzeto iz: König i sur. 2013)

BCRP, eng. *breast cancer resistance protein*; MATE, eng. *multidrug and toxin extrusion protein*; MRP, eng. *multidrug resistance associated protein*; OAT, eng. *organic anion transporter*; OATP, eng. *organic anion transporting polypeptide*; OCT, eng. *organic cation transporter*; P-gp, eng. *P-glycoprotein*; SLC, eng. *solute carrier*; BSEP, eng. *bile salt export pump*; MDR, eng. *multidrug resistance protein*

## 1.5. Glikoprotein P (P-gp)

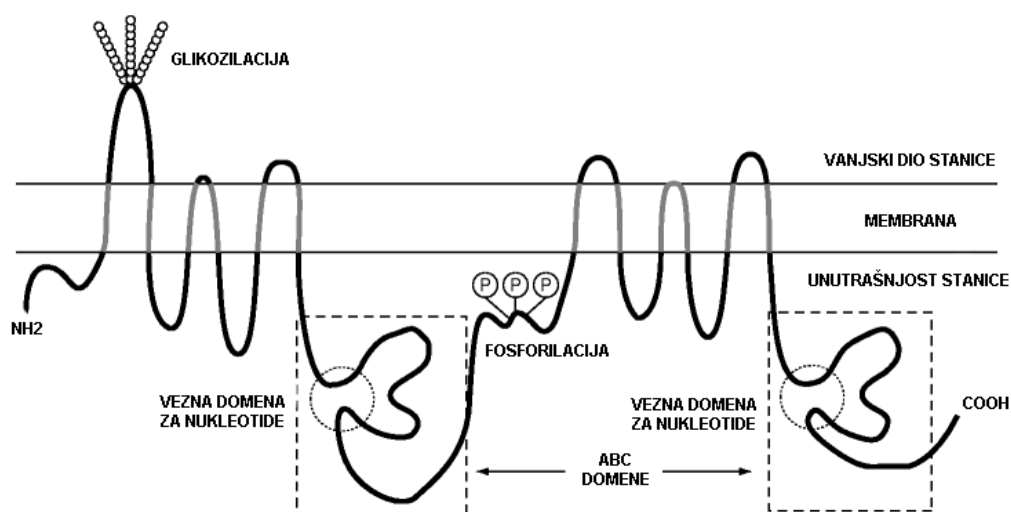
### 1.5.1. Struktura i zadaća

P-gp je član velike obitelji transportnih proteina ABC (eng. *ATP-Binding Cassette*) (Locher 2009, Zolnerciks i sur. 2011). Otkriven je 1976. g. u membrani stanica raka ovarija kineskog hrčka u kulturi, koje su bile otporne na velik broj amfilnih lijekova pa se smatra glavnim posrednikom rezistencije na različite lijekove (eng. *MDR-multidrug resistance*) (Schinkel i Jonker 2003). Kasnije je otkriveno da je P-gp normalno izražen u mnogim animalnim i humanim tkivima/organima, kao što su jetra, bubrezi, crijeva, nadbubrežne žlijezde, posteljica, testisi, limfociti, makrofazi i krvno-moždana barijera, s funkcijom izbacivanja tvari iz stanice (Thiebaut i sur. 1987, Cordon-Cardo i sur. 1990, Ceckova-Novotna i sur. 2006, Fromm 2004). Njegova fiziološka uloga jest zaštita

tkiva/organa od brojnih štetnih endogenih (metaboliti) i egzogenih (ksenobiotici) tvari (Sharom 2011). Ekspresija P-gp u crijevima, jetri i bubrezima rezultira smanjenom apsorpcijom odgovarajućih supstrata iz gastrointestinalnog trakta te pojačanom eliminacijom u žuč i urin. U ljudi, P-gp je produkt gena ABCB1 ili MDR1 (Bodor i sur. 2005). Sintetizira se kao polipeptidna preteča od 140-kDa, koji se kasnije glikozilira do konačne molekulske mase od ~170 kDa u Western analizi (Greer i Ivey 2007). Sastoji se od dviju homolognih polovica, od kojih svaka ima 6 transmembranskih alfa uzvojnica i veznu domenu za nukleotide na citoplazmatskoj strani (slika 3) (Kvackajová-Kisucká i sur. 2001, Sharom 2006). U glodavaca, dva gena su odgovorna za MDR-fenotip, *mdr1a* i *mdr1b* (Devault i Gros 1990, Croop i sur. 1989, Schinkel i sur. 1997).

Osim MDR1, MDR3 u ljudi i *mdr2* u glodavaca odgovorni su za ekspresiju i drugog P-gp, koji ima funkciju flipaze u izbacivanju fosfatidilkolina u žuč (Schinkel i Jonker 2003, Smitt i sur. 1993, Oude Elferink i Paulusma 2007). U ljudi, mutacije gena MDR3 povezane su s razvojem progresivne obiteljske kolestaze (Deleuze i sur. 1996, Jacquemin 2000).

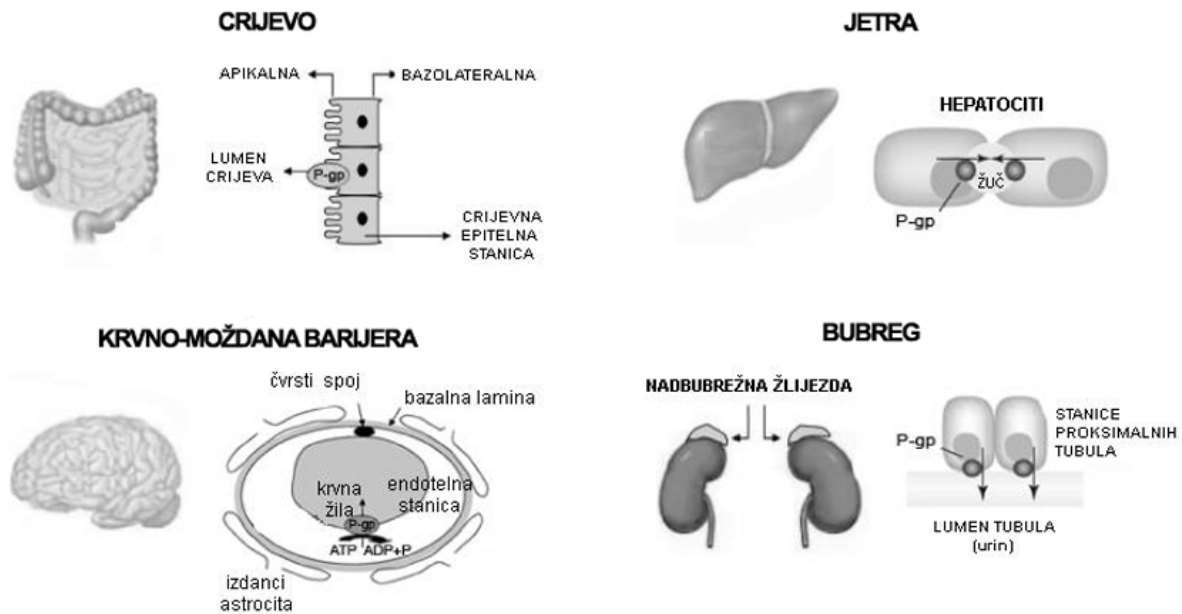
P-gp transportira veliki broj strukturno i djelatno različitih tvari. Supstrati P-gp su različiti antitumorski lijekovi, srčani glikozidi, blokatori kalcijevih kanala, antiepileptici, imunosupresivi, kortikosteroidi, inhibitori HIV-proteaza, antibiotici, antilipemici i dr. (Schinkel i Jonker 2003).



**Slika 3. Struktura glikoproteina P.** (Prilagođeno iz: Zakeri-Milani i Valizadeh 2014)

## 1.5.2. Tkivna raspodjela

P-gp se nalazi na apikalnoj strani mnogih tkiva i organa te sudjeluje u odstranjivanju ksenobiotika, uključivo lijekova, iz organizma (slika 4). Prema tome, možemo ga smatrati obrambenim mehanizmom od prodiranja ksenobiotika u tijelo odnosno u dublje odjeljke organizma. Tkiva i organi u kojima nalazimo visoku razinu ekspresije P-gp su crijeva, jetra, krvno-moždana barijera, bubreg, posteljica i limfociti (Cascorbi 2011).



**Slika 4. Najvažniji organi i lokalizacija P-gp u membranama.** (Prilagođeno iz: Fortuna i sur. 2011)

**Crijevo.** Nakon peroralne primjene lijek prvo mora proći četkastu membranu intestinalnih enterocita. Osim jasne uloge da brani organizam od ulaska ksenobiotika, P-gp u crijevima sudjeluje i u aktivnom izlučivanju samog lijeka (Zhang i Benet 2001). P-gp je izražen na membrani duž cijelog crijeva - od duodenuma do rektuma, što znači da sudjeluje u smanjenju bioraspoloživosti velikog broja strukturno različitih lijekova (Canaparo i sur. 2007). Zanimljivo je kako je P-gp u crijevima izražen zajedno s proteinom CYP3A4 koji je pripadnik obitelji P450 3A. CYP3A4 je najznačajniji oksidativni enzim u obitelji citokroma P450 prisutan u enterocitima čovjeka. Iako je sadržaj CYP3A4 u crijevu niži u odnosu na jetru, metabolizam prvog prolaza putem crijevnog CYP3A utječe na velik broj lijekova. Sinergističko djelovanje CYP3A4 i P-gp u smanjenju bioraspoloživosti peroralno uzetih lijekova je, pretpostavlja se, zbog njihove zajedničke prisutnosti u enterocitima tankog crijeva i značajnog preklapanja u specifičnosti njihovih supstrata

(Wacher i sur. 1995). Njihovi inhibitori i stimulatori/induktori se često preklapaju (Schuetz i sur. 1996, Zhang i Benet 2001). Čini se da P-gp sprječava zasićenje CYP3A4 u enterocitima limitiranjem ukupnog prijenosa lijekova kroz membranu. Ovo bi moglo dovesti do povećanog trajanja izloženosti lijekova enzimu i na taj način do veće metabolizacije lijekova. Nadalje, tako stvoreni metaboliti su supstrati P-gp, te ih on aktivno transportira van iz stanice. Na taj način nastali metaboliti se više ne natječu sa izvornim lijekom u njegovoj metabolizaciji (Zakeri-Milani i Valizadeh, 2014). Ovakva pozitivna korelacija izraženosti enzima, koji metabolizira lijekove i staničnog transportera lijekova pripisuje se koregulaciji posredovanoj jezgrenim pregnanskim receptorom X (PXR, eng. *Pregnane X Receptor*) (Tirona i sur. 2003, Chai i sur. 2013). Također je poznato kako je ekspresija P-gp regulirana različitim citokinima. Tako je primjerice kod bolesnika s ulceroznim kolitisom, u kojih su citokini IL1 $\beta$  i IL8 bili značajno povišeni, utvrđena značajno niža ekspresija P-gp (Ufer i sur. 2009).

**Jetra.** P-gp je eksprimiran u kanalikularnoj membrani hepatocita. Prema podacima iz literature, njegova je ekspresija u hepatocitima ~15% ekspresije u tankom crijevu (von Richter i sur. 2004). Također valja napomenuti da u ljudi postoji vrlo velika varijabilnost u ekspresiji P-gp među pojedincima (opisane su razlike i do 50 puta), što značajno doprinosi velikim razlikama u bioraspoloživosti širokog spektra lijekova (Schuetz i sur. 1995). I u hepatocitima P-gp je izražen zajedno s proteinom CYP3A4.

**Bubrezi.** Bubrezi imaju glavnu ulogu u eliminaciji brojnih potencijalno toksičnih ksenobiotika, uključujući lijekove i toksine, kao i brojnih endogenih metabolita. Bubrežna eliminacija lijekova uključuje glomerulsku filtraciju, tubularnu reapsorpciju i tubularnu sekreciju. Membranski transporteri igraju vrlo važnu ulogu u radu tubularnih stanica bubrega. P-gp je eksprimiran u četkastoj membrani proksimalnih kanalića te značajno doprinosi aktivnoj sekreciji lipofilnih lijekova i ostalih ksenobiotika (del Moral i sur. 1998).

**Krvno-moždana barijera.** Vrlo je važna uloga P-gp kao obrambenog mehanizma kojim se sprječava oštećenje mozga toksinima. Inhibicija P-gp verapamilom ili upala dramatično povećavaju koncentraciju digoksina u likvoru (Goralski i sur. 2003). U suprotnom slučaju, kada je prisutna

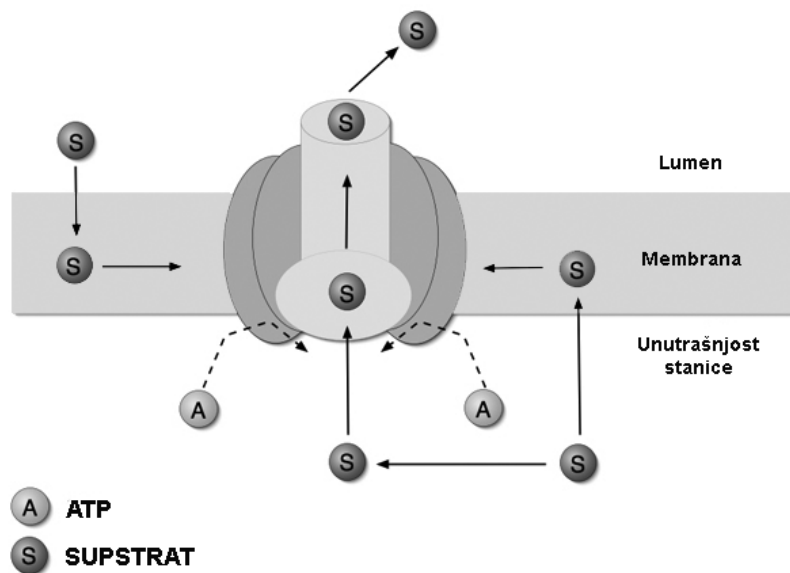
velika ekspresija P-gp, dolazi do lokalnog smanjivanja koncentracije antikonvulziva, što se smatra jednim od mogućih mehanizama rezistencije u liječenju epilepsije (Löscher 2009).

**Posteljica.** Prisutnost P-gp u posteljici smatra se vrlo važnim mehanizmom zaštite samog ploda od negativnog utjecaja toksičnih ksenobiotika i lijekova (Pavek i Smutny 2014). Literaturni podaci ukazuju da su u knockout-modelu miša (miševi u kojih je isključen gen za P-gp) koncentracije različitih lijekova bile značajno više u odnosu na divlji tip (normalni miševi), što rezultira većim potencijalom za oštećenje samog ploda (Behravan i Piquette-Miller 2007).

**Limfociti.** P-gp je izražen u limfocitima, ali što je još interesantnije, i na hematopoetskim matičnim stanicama, gdje sudjeluje u obrani ovih stanica od negativnih utjecaja toksina (Chaudhary i sur. 1992). Smatra se kako je upravo P-gp značajno odgovoran za fenomen rezistencije tijekom liječenja infekcije HIV-om i leukemije (Chandler i sur. 2007, Svirnovski i sur. 2009). Prema nekim istraživanjima, inhibitori proteaza, kao što je sakvinavir, značajno se odstranjuju iz stanica putem mehanizma aktivnog transporta posredovanog P-gp, što onemogućava postizanje optimalne terapijske koncentracije lijeka unutar stanice (Jones i sur. 2001). U tom smislu je osmišljen koncept inhibicije aktivnosti P-gp uporabom ritonavira kako bi se povećale unutarstanične koncentracije lopinavira ili sakvinavira (Janneh i sur. 2007).

### 1.5.3. Supstrati P-gp

Kao što je već spomenuto P-gp se sastoji od dviju transmembranskih domena i dviju intracelularnih domena za vezanje nukleotida. Mjesto vezivanja supstrata nalazi se na unutarstaničnoj strani proteina (slika 5). Nakon fosforilacije P-gp, molekula supstrata se uz pomoć „flip-flop“ mehanizma izbacuje iz stanice. Potom dolazi do defosforilacije i protein se vraća u početno stanje (Sharom 2014).



**Slika 5. Shematski prikaz vezivanja ATP i izbacivanja supstrata iz stanice uz pomoć transportnog mehanizma P-gp.** (Prilagođeno iz: Gohel M: Novel drug delivery approaches to bypass p-glycoprotein efflux pump)

Kao što je slučaj s citokromom P450 3A4 (CYP3A4), i P-gp je vrlo nespecifičan za širok spektar lijekova koji su upotrebljavaju u različitim indikacijama (vidi tablicu 4).

**Tablica 4. Pregled najvažnijih supstrata P-gp.** (Prilagođeno iz: Cascorbi 2011)

Uloga	Klasa lijeka	Primjer lijeka
<b>Supstrati P-gp</b>	Citostatici	dokсорubicin, paklitaksel, vinkristin
	Steroidi	deksametazon, metilprednizolon
	Imunosupresivi	ciklosporin, takrolimus, sirolimus
	inhibitori proteaze HIV	amprenavir, indinavir, ritonavir
	Antibiotici	eritromicin, levofloksacin, ofloksacin
	β blokatori	bunitrolol, celiprolol, tanilolol
	Blokatori kalcijevih kanala	diltiazem, verapamil
	Srčani lijekovi	digitoksin, digoksin, kinidin
	Inhibitori HMG-CoA	atrovastatin, lovastatin
	Antihistaminici	feksofenadin, terfenadin
	Antiemetici	ondasetron
<b>Induktori P-gp</b>	Antikonvulzivi	karbamazepin, fenitoin, fenobarbital
	Tuberkulostatici	rifampicin
	Biljni preparati	hiperforin (ekstrakt gospine trave)
<b>Inhibitori P-gp</b>	Blokatori kalcijevih kanala	verapamil
	Makrolidni antibiotici	ertiromicin, klaritromicin ( <i>ne</i> i azitromicin)
	HIV inhibitori proteza	ritonavir
	Imunosupresivi	ciklosporin
	Antiarritmici	kinidin, propafenon

HIV= virus humane imunodeficijencije; HMG-CoA= 3-hidroksi-metilglutaril-koenzim A

Usprkos heterogenosti supstrata P-gp, ipak postoje određene zajedničke karakteristike tvari koje P-gp transportira (Schinkel i Jonker 2003). Obično se radi o molekulama veličine od 200 do 1900 Da. Mnogi supstrati sadrže aromatsku grupu, ali postoje i primjeri gdje se nearomatske molekule također transportiraju. Većina supstrata koji se uspješno transportiraju pomoću P-gp su slabe baze, ali i neke kisele tvari dolaze u obzir (iako u značajno manjem opsegu). Ipak, jedini zajednički nazivnik koji je u ovom trenutku razvidan jest amfipatska priroda svih supstrata. Objašnjenje za ovo valja potražiti u mehanizmu transporta lijeka iz stanice; prije nego budu izbačeni iz stanice, supstrati se moraju vezati za unutrašnji dio receptora, a jedino amfipatske molekule imaju odgovarajuću strukturu za vezanje (Higgins i Gottesman 1992). Također postoji i značajno preklapanje u odnosu na druge transportere ABC (kao što su ABCC1, ABCC2 i ABCG2)



te u odnosu na enzim CYP3A4, što ih u suštini čini sinergičnim mehanizmima koji štite organizam od ulaska ksenobiotika. Obzirom da su oba gena regulirana od strane jezgrenog receptora PXR, istovremeno su i inducirani od strane liganada PXR/CAR (CAR, konstitutivni androstanski receptor), kao što su rifampicin ili ekstrakt gospine trave (hiperforin) (Geick i sur. 2001). Oni supstrati koji imaju veliki afinitet prema P-gp su ujedno i potentni inhibitori (tzv. blokatori P-gp). Kao najvažniji primjer treba spomenuti verapamil koji se za tu svrhu često upotrebljava u eksperimentalnim uvjetima (Elsinga i sur. 2004).

#### **1.5.4. Ontogeneza P-gp u štakora**

Iako ontogenezu (grč. *ontos* – prisutan i *genesis* – nastajanje) u užem smislu definiramo kao nastanak i razvoj organizma od oplodnje do zrelosti, neupitno je da ovaj pojam u biti obuhvaća period od začeća do smrti jedinke (Storch i sur. 2007). Također treba razlikovati i pojam ontogenije koji označava znanstvenu disciplinu koja se bavi proučavanjem ontogeneze (Gould 1977).

Vrlo je važno poznavati proces ontogeneze transportnih proteina uključenih u proces raspodjele i izlučivanja lijeka kod štakora kako bi se pravilno tumačili rezultati studija sigurnosti koji uključuju pokuse na mlađim životinjama. Obzirom da je štakor jedna od najčešćih životinja koja se koristi u pretkliničkim testiranjima važno je znati dobne razlike u ekspresiji P-gp, ali i razlike u ekspresiji između štakora i čovjeka (Eraly i sur. 2003).

Dosadašnja saznanja o ontogenezi P-gp u štakora su oprečna. Rosati i sur. (2003) pokazali su da ekspresija *mdr1a* i *mdr1b* mRNA raste od rođenja do odrasle dobi u jetri, bubrezima, plućima, mozgu i srcu štakora te doseže maksimum do 60. dana starosti. Statistički značajan porast ekspresije *mdr1a* mRNA zabilježen je 6. dana u bubregu, 20. dana u plućima i jetri, i 30. dana u srcu. Starenjem, ekspresija *mdr1a* mRNA bila je niža u osmomjesečnih životinja u jetri i srcu te u mozgu petomjesečnih životinja u odnosu na 60-dnevne životinje. Statistički značajan porast ekspresije *mdr1b* mRNA zabilježen je 6. dana u jetri, bubrezima i srcu, 12. dana u mozgu, te 20. dana u plućima. Pad ekspresije *mdr1b* mRNA zamijećen u svim ispitivanim tkivima u životinja starih 5 i 8 mjeseci u odnosu na 60-dnevne. Western analizom nije dokazana ekspresija P-gp u jetri tek rođenih životinja, dok je ekspresija uočena u 15-dnevnih štakora bila niža u odnosu

na 60-dnevne životinje. Druga grupa autora pokazala je porast ekspresije P-gp u bubrezima Sprague-Dawley štakora do 26 dana starosti i potom smanjenje do razine u odraslih životinja u 42. danu (de Zwart i sur. 2008). Hodorova i sur. 2011 pokazali su imunocitokemijskom analizom da je ekspresija P-gp u bubrezima štakora Wistar relativno konstantna od rođenja do odrasle dobi. Warrington i sur. 2004 istražili su Western analizom ekspresiju P-gp u trima dobnim skupinama (mladi: 3–4 mjeseca, srednje dobi: 13–14 mjeseci i stari: 25–26 mjeseci starosti) mužjaka štakora Fischer-344. Utvrđeno je da se ekspresija P-gp u jetri povećava u štakora srednje dobi (13–14 mjeseci) u odnosu na mlade, te je najviša u starih štakora (25–26 mjeseci starosti), dok u bubrezima raste do dobi od godine dana, a zatim se u starih (dvogodišnjih) životinja smanjuje. Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji P-gp u crijevnim mikrosomima i staničnom lizatu krvno-moždane barijere između štakora različitih dobnih skupina (Warrington i sur. 2004).

#### **1.5.5. Steroidni hormoni i regulacija P-gp**

P-gp je eksprimiran u organima u kojima se stvaraju steroidni hormoni (nadbubrežne žlijezde, testisi, ovariji). Njegovo prisustvo na endotelnim stanicama testisa i ovarija služi zaštiti zametnih stanica od potencijalno štetnih utjecaja različitih spojeva, a u nadbubrežnim žlijezdama P-gp aktivno transportira nekoliko adrenalnih steroidnih hormona, uključujući kortizol, deksametazon i aldosteron (Stewart i sur. 1996, Ueda i sur. 1992). Međutim, gonadalni steroidi također reguliraju ekspresiju i funkciju P-gp (Bebawy i Chetty 2009, Coles i sur. 2009). Gen ABCB1 osjetljiv je na hormonsku indukciju, a pokazalo se da je promotorska regija gena *mdr1b* osjetljiva na progesteron (Piekarz i sur. 1993). Nadalje, u regulacijskoj regiji gena *mdr1* pronađeni su elementi osjetljivi na estrogen (Jancis i sur. 1993). Endogeni i sintetski estrogene, uključujući estriol, estron i etinil-estradiol, supstrati su i pojačavaju ekspresiju P-gp, a sintetski progestini značajno inhibiraju P-gp-posredovan transport tvari u eksperimentalnim modelima *in vitro* i *in vivo* (Fröhlich i sur. 2004). Testosteron nije supstrat, ali je snažan inhibitor aktivnosti P-gp, dvostruko jači od progesterona (Bebawy i Chetty 2009, Fedoruk i sur. 2004, van Kalken i sur. 1993). Za razliku od testosterona, njegov biološki-aktivni metabolit, dihidrotestosteron, jest supstrat za P-gp (Fedoruk i sur. 2004, van Kalken i sur. 1993, Cummins i sur. 2002, Fujise i sur. 2002). S obzirom na važnu ulogu P-gp u izlučivanju lijekova, steroidima posredovana regulacija i potencijalne spolne

razlike u njegovoj ekspresiji i aktivnosti važan su čimbenik koji može izazvati razlike u kliničkoj učinkovitosti određene vrsti terapije u žena i muškaraca.

#### **1.5.6. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima, jetri i probavnom traktu**

Nakon što su dokazane spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri čovjeka u korist muškaraca (muškarac > žena), Salphati i Benett objavili su da je u jetri štakora sadržaj P-gp upravo obrnut te je viši u ženki štakora u odnosu na mužjake (Salphati i Benett 1998). Kasnije je u Western analizom pokazana značajno viša ekspresiju P-gp u jetri ženki štakora u odnosu na mužjake, koja se nakon sedmodnevnog tretmana testosteronom smanjila na razinu ekspresije u mužjaka uz odgovarajuće smanjenje hepatobilijarnog klirensa doksorubicina (Suzuki i sur. 2006). U ovom radu potvrđene su spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora i time je pokazano da spolni hormoni mogu utjecati na njegovu ekspresiju u organima. Lu i Klaassen 2008 proučavali su spolne razlike P-gp na razini mRNA u bubrezima, jetri i crijevima nefrektomiranih štakora; ekspresija *mdr1a* mRNA bila je visoka u jejunumu i kolonu, a niska u bubrezima i jetri kontrolnih životinja te značajno viša u mužjaka nego u ženki. Suprotno tome, ekspresija *mdr1b* mRNA bila je visoka u bubrezima i crijevima te značajno viša u ženki u bubrezima, a u mužjaka u kolonu. Maclean i sur. (2008) objavili su detaljnu analizu ekspresije P-gp mRNA i proteina u crijevima štakora; oba parametra rasla su od proksimalnih prema distalnim dijelovima crijeva, a spolne razlike nisu utvrđene.

#### **1.5.7. Razlike među vrstama i dobne razlike**

Postojanje spolnih razlika u ekspresiji P-gp u jetri čovjeka u korist muškaraca (muškarac > žena) (Schuetz i sur. 1995, Cummins i sur. 2002), te suprotan nalaz u štakora (mužjak < ženka) (Salphati i Benett 1998) ukazuje na mogućnost postojanja spolnih i vrsnih razlika i u drugim organima u kojima je izražen P-gp. Stoga se nakon ovih otkrića postavilo pitanje o mogućim spolnim razlikama u ekspresiji P-gp u crijevu. Potter i sur. (2004) objavili su da je sadržaj P-gp u enterocitima žena niži u odnosu na muškarce. Suprotno tome, Paine i sur. (2005) nisu utvrdili spolne razlike u crijevu u ljudi. Slično, Maclean i suradnici (2008) u štakora nisu utvrdili spolne razlike. Međutim, u funkcionalnim studijama u štakora razlike su pokazane (Mariana i sur. 2011). U miša je pokazana jača ekspresija *mdr1a* i *mdr1b* u jetri i bubregu ženki (Cui 2009). U čovjeka

postoje razlike u klirensu različitih lijekova u muškaraca i žena. Tako je na primjer klirens verapamila, nekih inhibitora HIV proteaze (sakvinavir, indinavir) veći u muškaraca u odnosu na žene (Krecic-Shepard i sur. 2000, 2000a, Fletcher i sur. 2004, Pai i sur. 2004, Burger i sur. 2002, Csajka i sur. 2004). Također, pokazano je da osim razlike u distribuciji u tkivima, postoje i razlike u specifičnosti supstrata i relativnoj zastupljenosti P-gp u određenom tkivu između pretkliničkih vrsta i ljudi (Chu i sur. 2013). Također, dosadašnji podaci o dobnim razlikama u ekspresiji P-gp u štakora su vrlo oprečni. S obzirom da se štakori različitih dobnih skupina koriste u toksikološkim studijama u kojima se ispituje subkronična i kronična toksičnosti potencijalnih lijekova, vrlo je važno istražiti ekspresiju P-gp u jetri, bubrezima i probavnom traktu štakora.

Ekspresija P-gp u organima štakora najvećim dijelom je opisana na razini mRNA, te detaljnije u jetri na proteinskom nivou. Dosadašnje spoznaje o spolnim i dobnim razlikama u ekspresiji P-gp u jetri, bubrezima i probavnom traktu štakora su oprečne i također su uglavnom opisane na razini mRNA. Stoga je neophodno imunocitokemijskim metodama podrobnije istražiti sadržaj i raspodjelu P-gp u bubrezima, jetri i probavnom traktu štakora, postojanje spolnih i dobnih razlika u sadržaju i raspodjeli P-gp u ovim organima, te odrediti hormone odgovorne za te razlike u svrhu boljeg razumijevanje uloge ovog transportnog proteina, važnog za prijenos kroz staničnu membranu specifičnih endogenih spojeva i ksenobiotika i za pojavnost rezistencije na neke lijekove, u spolno- i dobno- uvjetovanim razlikama u farmakokinetici i farmakodinamici brojnih lijekova, a sve u svrhu bolje translacije nalaza pretkliničkih studija u štakora na farmakokinetiku budućih terapijskih kandidata u ljudi.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

**Hipoteza.** U sisavaca postoje spolne i dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima, jetri i gastrointestinalnom traktu, koje mogu utjecati na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova.

U svrhu testiranja te hipoteze na eksperimentalnom modelu štakora postavljam sljedeće specifične ciljeve:

1) odrediti optimalne uvjete za prikaz P-gp u bubrezima, jetri i probavnom traktu metodama imunocitokemije na kriostatskim naresecima tkiva i Western analizom u izoliranim staničnim membranama,

2) istražiti spolne razlike u ekspresiji P-gp u navedenim organima spolno zrelih štakora (3-mjesečnih),

3) istražiti učinke gonadektomije i tretmana gonadektomiranih štakora spolnim hormonima (androgeni, estrogeni, progesteron) na ekspresiju P-gp u navedenim organima spolno zrelih (3-mjesečnih) štakora, te

4) Istražiti dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima novorođenih (1-dnevnih), predpubertetskih (3-tjednih), spolno zrelih (3-mjesečnih) i starih (2-godišnjih) štakora obaju spolova.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Pufferi i otopine

Fosfatni puffer (PBS): 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4.

Puffer za izolaciju ukupnih staničnih membrana (homo-puffer):

300 mM manitol, 5 mM etilen-glikol-bis(beta-aminoetileter)-N,N`-tetraoctena kiselina (EGTA), 12 mM Tris/HCl, pH 7.4.

Puffer za denaturaciju proteina (Laemmli-puffer):

0.5 M Tris/HCl pH 6.8 (22 % v/v), 30% natrij-dodecil sulfat (sodium-dodecyl sulfate, SDS) (12 % v/v), 80% glicerol (54 % v/v), zasićena otopina plavila bromfenola (brom-phenol-blue, BPB) (12 % v/v). Ako je potrebna denaturacija S-S veza (denaturacija), pufferu se neposredno prije uporabe dodaje beta-merkaptotanol ( $\beta$ -ME) u omjeru 17:3, a ako su uvjeti nativni, dodaje se  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Otopine i pufferi za SDS – poliakrilamidnu gel elektroforezu (SDS–PAGE):

- a) akrilamid/ bis-akrilamid: 30 g poliakrilamida/ 0.8 g bis-akrilamida u 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Skladišti se na 4° C do upotrebe.
- b) puffer A: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.9 (18.17 g/ 100 mL) – puffer za pripravljanje gela za odjeljivanje (eng. *separating gel*).
- c) puffer B: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (6.06 g/ 100 mL) – puffer za pripravljanje gela za sabijanje (eng. *stacking gel*).
- d) amonijev persulfat (APS): 100 mg/ 7.1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  – napravljen svježi.
- e) 10 % (m/v) SDS u  $\text{H}_2\text{O}$ .

Puffer za poliakrilamidnu gel elektroforezu (PAGE–puffer):

25 mM Tris baza, 0.2 M glicin, 1 % SDS.

Puffer za prijenos proteina na membranu (transfer–puffer):

15.6 mM Tris, 120 mM glicin, 20 % metanol.

Plavilo za bojanje proteina:

otopina Coomassie blue: 0.2 % Coomassie blue (Coomassie blue G-250) u otopini za odbojavanje.

Otopina za odbojavanje: metanol : octena kiselina : re H<sub>2</sub>O u omjeru 5: 1: 4.

Pufer za blokiranje (blotto-pufer):

5% nemasno mlijeko u prahu, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 20 mM Tris/HCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4.

Citratni pufer: 10 mM limunska kiselina/Tris, pH 3, pH 6 i pH 8.

### 3.2. Kemikalije i pribor

Od tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD) korišteni su proizvodi: BSA (albumin iz seruma goveda), PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluorid) i SigmaFast koktel inhibitora proteaza, manitol, Triton-X-100, EGTA (5 etilen-glikol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N'-tetraoctena kiselina), komplet BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat) i NBT (nitromodri tetrazolium klorid), Percoll, agarozna i TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilendiamin). Proizvodi Coomassie Brilliant Blue G-250 i SDS (Na-dodecil-sulfat) korišteni su od tvrtke Serva (Heidelberg, Njemačka). Od tvrtke Boehringer (Mannheim, Njemačka) nabavljeni su: tris, akrilamid, bisakrilamid, a od različitih tvrtki korišteni su sljedeći proizvodi: Narketan i Xylapan od Chassot (Bern, Švicarska), paraformaldehid od EMS (Los Almitos, CA, SAD), glicerol od Merck (Darmstadt, Njemačka), natrijev citrat, limunska kiselina, ksilol, izopropanol, etanol od Kemike (Zagreb, Hrvatska), testosteron enantat od RotexMedica (Trittau, Germany), estradiol dipropionat od Galenike (Zemun, Srbija), progesteron od Proleka (Beograd, Srbija), otopina za očuvanje fluorescencije (Vectashield) od Vector Labs (Burlingame, CA, SAD), uklopni medij (O.C.T. Compound 4583) od Tissue-Tek, Sakura Finetek (Torrance, CA, SAD), centrifuga s hlađenjem (Sorvall RC2B, rotor SS-34), ultracentrifuga (OTD-Combi, rotor T-

875), stakleni homogenizator s teflonskim tučkom (Omnimixer) od tvrtke Sorvall Instruments (Newtown, CT, SAD),  $\text{NaN}_3$  (natrijev azid), amonijev persulfat (APS), električni homogenizator (Powergen 125), predmetna stakalca (Superfrost/Plus Microscope slides) od tvrtke Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD), pumpa za perfuziju (Masterflex pumpa) od Cole-Parmer (Chicago, IL, SAD), spektrofotometar (CECIL 9000) od Cambridge (Engleska, UK),  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ ME), aparatura Mini Protean III Cell, MiniTrans-Blot Cell za SDS-PAGE od BioRad (Hercules, CA, SAD), hidrofobna najlonska membrana Immobilon (Polyvinylidene fluoride, PVDF) od Millipore (Bedford, MA, SAD), Fermentas, uzorak standarda molekulskih masa proteina od FisherScientific, Co, kriomikrotom (Leica CM 1580) od Leica Instruments (Nussloch, Njemačka), fluorescencijski mikroskop (OPTON III RS) od Opton Feintechnik (Oberkochen, Njemačka), te digitalna kamera (SPOT RT) od Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, SAD).

### **3.3. Pokusne životinje**

U svim pokusima koristila sam mužjake i ženke štakora soja Wistar, stare jedan dan (neonatalni), tri tjedna (predpubertetski), tri mjeseca (odrasli) i dvije godine (stari), uzgojene u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Životinje su uzgojene u kontroliranim uvjetima, s periodičnom izmjenom svjetla i tame svakih 12 sati i stalnoj temperaturi od 24°C, te su imale slobodan pristup hrani i vodi tijekom pokusa. Pokusi su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada prigodom odobravanja Znanstvenoistraživačkog projekta „Bubrežni prijenosnici u sisavaca; spolne razlike i učinci toksičnih metala“ (MZOS, projekt br. 022-0222148-2146; voditelj projekta dr. sc. Ivan Sabolić, dr. med., znanstveni savjetnik).

#### **3.3.1. Gonadektomija i obrada spolnim hormonima**

Spolno zrele (3 mjeseca stari) mužjake sam uz primjenu odgovarajuće anestezije (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p.) kastrirala kroz skrotum, dok sam ženke ovarijektomirala dorzalnim (lumbalnim) putem. Lažno gonadektomirane životinje prošle su isti operativni postupak, ali im gonade nisu odstranjene. Jedan mjesec nakon operacije životinje sam



počela obrađivati subkutano (s.c.) spolnim hormonima: testosteron enantatom, estradiol propionatom ili progesteronom (2.5 mg/kg t.m./dan, tijekom osam dana, s.c.). Hormone sam ubrizgavala pripremljene u otopini suncokretova ulja, dok sam kontrolnu skupinu štakora obrađivala jednakim volumenom suncokretova ulja (0.5 mL/kg t.m./dan, s.c.). Životinje sam žrtvovala po završetku tretmana hormonima.

### **3.4. Protutijela**

Za imunokemijske metode (Western analizu i imunocitokemiju) rabila sam sljedeća protutijela:

#### **3.4.1. Primarna protutijela**

##### *P-gp/MDR*

Komercijalno monoklonsko protutijelo za P-gp (klon C219), proizvod tvrtke Enzo Life Sciences, Švicarska. Protutijelo prepoznaje visoko konzervirani aminokiselinski slijed VQEALD i VQAALD prisutan u obje proteinske izoforme, MDR1 i MDR3. Prepoznaje proteinske pruge MDR1 P-gp molekulske mase ~170 kDa (glikozilirani oblik) i ~140 kDa (neglikozilirani oblik), ali i proteinsku prugu MDR3 P-gp molekulske mase ~140 u Western analizi dok imunocitokemijski boja četkastu membranu (ČM) proksimalnih kanalića (PK). Iskazuje specifičnu reaktivnost u čovjeka, miša, štakora, psa i majmuna.

##### *Aktin*

Za međusobnu usporedbu proteinskih pruga u Western analizi koristila sam komercijalno monoklonsko protutijelo na sve izoforme aktina (klon C4) (Chemicon Int., Temecula, CA). Protutijelo prepoznaje visoko konzervirani aminokiselinski slijed u više vrsta, te prepoznaje proteinsku prugu molekulske mase ~42 kDa u Western analizi.

## Oat2

Nekomercijalno protutijelo na štakorski organski anionski transporter 2 (Oat2) razvijeno je u kuniću. Imunizacija je provedena na C-terminalni 16 oligomerni peptidni slijed (512–528: ETKKAQLPETIQDVERK ak, Oat2; GenBank: NP\_445989.1 *Rattus norvegicus*). Upotreba u imunokemijskim studijama je opisana ranije (Ljubojević i sur. 2007). Koristila sam ga za imunocitokemijsko obojenje ČM PK .

### 3.4.2. Sekundarna protutijela

Sekundarna protutijela nabavljena su komercijalno i korištena prema uputama proizvođača. Sekundarna protutijela za imunocitokemiju bila su sljedeća:

- a) monoklonsko primarno protutijelo za P-gp obilježila sam magarećim protutijelom protiv mišjeg IgG-a (eng. *donkey anti-mouse* CY3, DAM-CY3), obilježeno fluorescirajućom molekulom CY3 (daje crvenu fluorescenciju) u razrjeđenju 1:400.
- b) poliklonsko primarno protutijelo na Oat2 obilježila sam kozjim anti-kunićim IgG protutijelom (eng. *goat anti-rabbit* CY3, GAR-CY3) koje obilježava fluorescirajućom molekulom CY3 (daje crvenu fluorescenciju) u razrjeđenju 1:800.

Sekundarno protutijelo u Western analizi za oba monoklonska primarna protutijela (P-gp/MDR i aktin) bilo je kozje protutijelo protiv mišjeg IgG-a (eng. *goat anti-mouse* AP; GAMAP), koncentracije 0.25 µg/mL, obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom u razrjeđenju 1:1000.

Navedena sekundarna protutijela proizvod su tvrtke Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD.

### 3.5. Izolacija ukupnih staničnih membrana iz različitih zona bubrega, jetre i različitih odsječaka probavnog trakta

Za izolaciju ukupnih staničnih membrana (USM) primijenila sam metodu diferencijalnog centrifugiranja. Štakore sam usmrtila prekidanjem vratne kralježnice. Izvađene bubrege oslobodila

sam kapsule i odmah stavila u hladni PBS. Iz poprečnih narezaka bubrega ručno sam razdvojila koru, vanjski tračak vanjske srži i unutarnji tračak vanjske srži zajedno sa unutarnjom srži. Jetru sam poprečno narezala i stavila u hladni PBS. Razdvojila sam različite odsječke probavnog trakta (želudac, duodenum, jejunum, ileum, cekum i kolon) te predmetnim stakalcem odvojila sluznicu. Uzorke sam stavila u hladni homo-pufer, kojem sam dodala inhibitore proteaza (SigmaFast koktel inhibitora proteaza) prema uputama proizvođača, dok sam neposredno prije homogenizacije dodala i 1 mM PMSF i potom homogenizirala električnim homogenizatorom Powergen 125 (1 min homogenizacija na najjačoj brzini – 2 min pauza – 1 min homogenizacija). Sve postupke izvela sam na niskoj temperaturi (ledena površina pri rezanju tkiva i ledeni puferi). Homogenate sam centrifugirala u centrifugi Sorvall RC2B s hlađenjem na 6,500 rpm (rotor SS34) (5,000 g), tijekom 15 min; time sam istaložila cijele stanice, jezgre i nerazgrađeni tkivni matriks. Dobiveni nadtalog centrifugirala sam 1 h u Sorvall ultracentrifugi OTD-Combi, na 45,000 rpm (rotor T875) (150,000g), pri čemu sam u talogu dobila USM. Izolirane membrane sam raspršila u homo-puferu, odredila koncentraciju proteina i zamrznula ih na  $-70^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. U ovim uzorcima određivala sam sadržaj P-gp metodom Western analize.

### **3.6. Izolacija ukupnih staničnih membrana iz jetre i bubrega miša**

Izolaciju USM iz jetre i bubrega miša radila sam prema istom postupku koji je korišten za izolaciju USM iz tkiva štakora, a koji je detaljno opisan u poglavlju 3.5.

### **3.7. Izolacija četkastih membrana iz kore bubrega**

Postupak dobivanja i razdvajanja tkiva bubrega proveden je kao u prethodno opisanoj izolaciji. Homogenati kore i vanjskog tračka bubrega korišteni su za izolaciju četkastih membrana (ČM) metodom precipitacije magnezijem u prisutnost kelatora za kalcij (eng. *Mg<sup>2+</sup>/EGTA precipitation method*) i diferencijalnim centrifugiranjem (Biber i sur. 1981). U dobivenim uzorcima

ČM odredila sam koncentraciju proteina i zamrzнула ih na  $-70^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. U ovim uzorcima određivala sam sadržaj P-gp metodom Western analize.

### **3.8. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentraciju proteina u uzorcima izoliranih membrana mjerila sam spektrofotometrijski, metodom po Bradfordu (1976). Osnovni princip ove metode temelji se u reakciji vezanja boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteine, pri čemu boja mijenja svoje ionsko stanje, te apsorbira svjetlost valne duljine od 595 nm. Standardnu krivulju koncentracije proteina izmjerila sam rabeći otopinu albumina iz seruma goveda u koncentracijskom rasponu od 0.2 – 1.2 mg/ml. Osjetljivost metode je 0.1 mg/ml. Uzorke sam razrjeđivala tako da im je optička gustoća bila u linearnom području standardne krivulje, te sam im, nakon 10 minuta stajanja u otopini boje, očitavala gustoću naspram slijepe probe (uzorak bez proteina). Navedena mjerenja izvela sam spektrofotometrom CECIL 9000. Pripadajuće koncentracije proteina očitala sam iz standardnog pravca.

### **3.9. SDS–elektroforeza u gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) i Western analiza**

Koncentraciju proteina u pripravcima USM i ČM podesila sam na 3 mg/mL. Uzorke sam priredila za SDS-PAGE miješanjem s Laemmli puferom za denaturaciju proteina. Konačna koncentracija proteina bila je 4 mg/mL u smjesi koja je, osim proteina, sadržavala i 1% SDS, 12% (v/v) glicerol, 30 mM Tris/HCl, pH 6.8, BPB u tragovima i 5%  $\beta$ ME. Uzorke sam dodatno denaturirala zagrijavanjem na različitim temperaturama radi ustanovljavanja osjetljivosti pojedinih antigena na termičku obradu kod  $37^{\circ}\text{C}$  tijekom 30 min,  $65^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 min ili  $95^{\circ}\text{C}$  tijekom 5 min.

U SDS-PAGE proteini se razdvajaju u električnom polju na osnovu mase proteinske molekule obložene negativnim nabojem detergenta SDS, tako da je prijeđeni put u gelu obrnuto proporcionalan logaritmu molekulske mase proteina. Putovanje proteina započinje u električnom polju kroz gel za sabijanje, koji je niže pH vrijednosti i koncentracije, a zatim slijedi razdvajanje u

separacijskom gelu (10%-tnom) (Laemmli, 1970). Paralelno s proteinima iz uzoraka membrana (60 ili 80 µg po jažici) razdvajala sam i uzorak standarda molekulskih masa u rasponu 10 – 200 kDa, prethodno priređen na isti način kao i uzorci proteina.

Za izvedbu SDS-PAGE koristila sam aparaturu Mini Protean III Cell uz konstantan napon od 100 V tijekom 2 sata. Dobiveni gel dalje sam podvrgla elektroforetskom prijenosu proteinskih molekula na hidrofobnu najlonsku membranu Immobilon (PVDF) u aparaturi MiniTrans-Blot Cell, uz konstantni napon 100 V tijekom 2 sata. Uspješnost prijenosa razdijeljenih proteina iz gela na membranu provjerila sam nakon kratkotrajnog bojanja membrane otopinom Coomassie blue, te ispiranja u otopini za odbojavanje. Potom sam izrezala uzorak membrane sa standardima molekulskih masa. Prema njemu sam membranu podijelila na dva dijela: gornji iznad 50 kDa sa MDR-om, a donji ispod 50 kDa s aktinom te sam membrane namakala 1 sat u blotto-puferu u svrhu blokiranja nespecifičnog vezanja protutijela. Ovako obojene i blokirane membrane dalje sam namakala u otopini s primarnim protutijelima (razrijeđenim u blotto-puferu) preko noći uz miješanje na 4°C. Razrjeđenje protutijela za P-gp bilo je 1:500, a za aktin 1:1000. Zatim sam membrane višekratno ispirala blotto-puferom bez protutijela, nakon čega je slijedila inkubacija tijekom 1 sata u sekundarnom protutijelu na sobnoj temperaturi. Sekundarno protutijelo nakon monoklonskih protutijela za P-gp i aktin bilo je GAMAP koncentracije 0.25 µg/ml. Nakon ponovnog ispiranja blotto-puferom 2x15 min i PBS 2x10 min membrane sam podvrgla reakciji konjugiranog enzima alkalne fosfataze sa supstratom BCIP/NBT u alkalnom puferu (20 mM Tris, pH 9). Razvijanje boje temelji se na oksidacijskoj reakciji nakon djelovanja fosfataze na supstrat BCIP/NBT pri čemu na mjestima vezanja sekundarnog na primarno protutijelo (koje je pak vezano za antigen) nastaje smeđe-ljubičasto obojenje. Naime, nakon odvajanja Pi od 5-bromo-4-kloro-3-indolila, oksidacijom nastaje indigo, koji reducira NBT u diformazan i time nastaje netopivi obojani smeđe-ljubičasti talog. Jačina obojenja taloga razmjerna je količini prisutnog antigena, što omogućuje denzitometrijsku procjenu sadržaja antigena u uzorcima.

### **3.10. Denzitometrija**

Denzitometrijska mjerenja procjene relativnog sadržaja antigena u dobivenim prugama nakon Western analize izvršila sam uporabom programa Image J (NIH, Bethesda, SAD). Svaki uzorak sa proteinskom prugom u Western analizi uokvirila sam na jednakoj površini, te sam izvršila mjerenje gustoće obojenja. Rezultate sam prikazala kao relativne vrijednosti naspram gustoće najjače pruge (=1) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka. Prikaze blotova obradila sam u programu Adobe Photoshop 6.0.

### **3.11. Fiksiranje tkiva in vivo**

Štakore sam uspavala odgovarajućim omjerom dvokomponentnog anestetika (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p). Krvožilni sustav sam potom perfundirala kroz srce prvo PBS (zagrijan na 37°C i aeriran s mješavinom plinova 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) tijekom 2-3 minute radi odstranjivanja krvi iz cirkulacije, a zatim fiksirajućim sredstvom (4% paraformaldehid (pFA)) tijekom narednih 4-5 min. Izvađene bubrege i jetru narezala sam poprečno u više narezaka i dodatno ih fiksirala tijekom noći u istom fiksativu na 4°C. Razdvojila sam različite odsječke probavnog trakta (želudac, duodenum, jejunum, ileum, cekum i kolon) i dodatno ih fiksirala tijekom noći u istom fiksativu na 4°C. Tkiva sam nakon toga ispirala u PBS 4x10 min i pohranila ih do daljnje uporabe na 4°C u PBS koji je sadržavao 0.02% NaN<sub>3</sub>.

### **3.12. Tkivni naresci i posredna imunofluorescencija**

Postupak pripreme tkivnih narezaka (kriosekcija) počinje namakanjem fiksiranog uzorka tijekom nekoliko sati u 30% saharozi (u PBS-u) radi zaštite staničnih struktura od razaranja kristalićima leda pri niskim temperaturama. Tkivo sam potom uklopila u polimerni uklopni medij (O.C.T. Compound 4583), smrznula ga u kriostatu pri temperaturi od -25°C, narezala rezove debljine 4 µm kriomikrotomom Leica CM 1580 i nalijepila ih na predmetna stakalca Superfrost/Plus.

Nareske tkiva bubrega, jetre i različitih odsječaka probavnog trakta na stakalcima najprije sam rehidrirala namakanjem u PBS 10 min. Za određivanje optimalnih uvjeta za imunocitokemijsko obilježavanje P-gp, koristila sam različite korake u otkrivanju antigena koje su uključivale pojedinačnu ili kombiniranu obradu ionskim ili neionskim detergentima, kuhanje u citratnom puferu različitog pH (pH 3, 6, 8), te obradu organskim otapalima (ksilol, propanol, etanol).

### **3.12.1. Obrada ionskim detergentom**

Nareske tkiva bubrega, jetre i različitih odsječaka probavnog trakta na stakalcima najprije sam rehidrirala namakanjem u PBS 10 min. Zatim sam nareske namakala tijekom 5 minuta u 1% otopini SDS-a (u PBS-u) ili samo u PBS-u (bez posebne obrade), koji sam zatim temeljito isprala u PBS-u (3x5min). Ovakva obrada tkiva detergentom može razotkriti i izložiti poneke epitope antigena i tako pojačati vezanje protutijela (Brown i sur. 1996). Zatim sam sve nareske namakala u 1%-tnoj otopini BSA (u PBS-u) tijekom 15 min radi blokiranja nespecifičnog vezanja protutijela, a potom ih inkubirala primarnim protutijelom za P-gp (razrijeđen u PBS-u) preko noći (12–14 h) pri 4°C. Preparate sam nakon toga isprala, što podrazumijeva namakanje u 2x5 min dvostruko-koncentriranim PBS (HS-PBS, 2.7 % NaCl u PBS koji uklanja nespecifično vezana protutijela), zatim još 2x5 min PBS. Potom je slijedila inkubacija odgovarajućim sekundarnim protutijelima, u trajanju od 1 sat za pojedinačno sekundarno protutijelo, pri sobnoj temperaturi, s postupcima ispiranja između i nakon inkubacije. Komercijalno sekundarna protutijela DAM-CY3 razrijedila sam prema uputama proizvođača (razrjeđenje 1:400), u PBS-u s 0.02% NaN<sub>3</sub>. S DAM-CY3 sam obilježila crvenom fluorescencijom mjesta na koje se vezalo protutijelo za P-gp. Preparate sam zatim prekrila otopinom za očuvanje fluorescencije Vectashield razrijeđenim 1:1 u alkalnom puferu (Tris pufer A za SDS-PAGE, pH 8.5) i pokrovnim stakalcem.

### **3.12.2. Kuhanje u citratnom puferu različitog pH i obrada neionskim detergentom**

Nakon rehidracije namakanjem u PBS tijekom 10 min, tkivne nareske sam kuhala u 10 mM citratnom puferu, pH 3, pH 6 ili pH 8 tijekom 20 min (četiri ciklusa od 5 min.) te sam ih zatim ostavila u istom puferu 20 min da se ohlade. Nareske sam dalje ispirala (3 x 5 min) u PBS, a zatim

namakala u 0.5% Tritonu X-100 ( u PBS) 15 min, u 2% Tritonu X-100 (u PBS) 30 min, u 1%-tnoj otopini BSA (u PBS) 30 min. Naresci su zatim prekriveni otopinom protutijela za P-gp (u PBS) i ostavljeni pri 4°C preko noći, nakon čega sam ih isprala u 0.1% Tritonu X-100 (u PBS) 2 x 10 min i inkubirala ih u otopini DAM-CY3 (razrjeđenje 1:400) u PBS-u pri sobnoj temperaturi tijekom 1 h. Nakon ponovna ispiranja u 0.1% Tritonu X-100 (u PBS) 2 x 10 min i u PBS, 10 min preparate tkivnih narezaka prekrila sam otopinom Vectashield i pokrovnim stakalcem.

### **3.12.3. Obrada organskim otapalima uz kuhanje u citratnom puferu različitog pH i obrada neionskim detergentom**

Suhe tkivne nareske namakala sam najprije u organskim otapalima: ksilol (30 min), izopropanol (5 min) i alkoholima u slijedu: 98% etanol (5 min), 75% etanol (5 min), 60% etanol (5 min), destilirana voda (5 min) i PBS (5 min), potom sam nareske kuhala u 10 mM citratnom puferu, pH 3, pH 6 ili pH 8 (četiri ciklusa od 5 min) te sam ih zatim ostavila u istom puferu 20 min da se ohlade. Nareske sam dalje ispirala (3 x 5 min) u PBS, a zatim namakala u 0.5% Tritonu X-100 ( u PBS) 15 min, u 2% Tritonu X-100 (u PBS) 30 min, u 1%-tnoj otopini BSA (u PBS) 30 min. Naresci su zatim prekriveni otopinom protutijela za P-gp (u PBS-u) pri 4°C preko noći, nakon čega sam ih isprala u 0.1% Tritonu X-100 (u PBS) 2 x 10 min i inkubirala ih u otopini DAM-CY3 (razrjeđenje 1:400) u PBS-u pri sobnoj temperaturi tijekom 1 h. Nakon ponovna ispiranja u 0.1% Tritonu X-100 (u PBS) 2 x 10 min i u PBS, 10 min, preparate tkivnih narezaka prekrila sam otopinom Vectashield i pokrovnim stakalcem.

Sve obrađene tkivne nareske sam zatim promatrala fluorescencijskim mikroskopom OPTON III RS, koristeći SPOT RT Slider digitalnu kameru i program (Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI). Za obradu slika sam koristila računalni program Adobe Photoshop 6.0. Na prikazanim slikama crvenu fluorescenciju CY3 sam pretvorila u crno-bijelu pomoću navedenog programa.



### **3.13. Mjerenje intenziteta fluorescencije**

Intenzitet fluorescencije CY3 mjerila sam u originalnim slikama koristeći program Image J (NIH, Bethesda, SAD). Jedan narezak odgovarajućeg tkiva (bubreg, jetra različiti odsječci probavnog trakta) od svake životinje (4 životinje u svakoj eksperimentalnoj grupi) slikala sam nakon obilježavanja protutijelom. Napravila sam 3-4 reprezentativne slike svakog nareška. Na svakoj slici sam prvo oduzela pozadinsku fluorescenciju te zatim označila 7 reprezentativnih područja od interesa čiji sam intenzitet fluorescencije izmjerila. Za svaku životinju izmjerila sam ukupnu srednju vrijednost intenziteta fluorescencije za navedene 3-4 slike te srednju vrijednost intenziteta fluorescencije u svakoj eksperimentalnoj grupi. Konačni rezultat sam izrazila u odnosu na najjači intenzitet fluorescencije piksela (=1 relativna jedinica fluorescencije) izmjeren u tkivnim narešcima kontrolnih životinja.

### **3.14. Prikaz i statistička obrada podataka**

Rezultati pokusa imunocitokemije i Western analize prikazani su reprezentativnim nalazom (slikom) za 3-4 neovisne životinje. Brojčani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SP), a podaci su statistički obrađeni ili Studentovim t-testom ili testom ANOVA/Duncan na razini vjerodostojnosti od 5%. Za statističku obradu i grafički prikaz korišten je računalni program Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD).

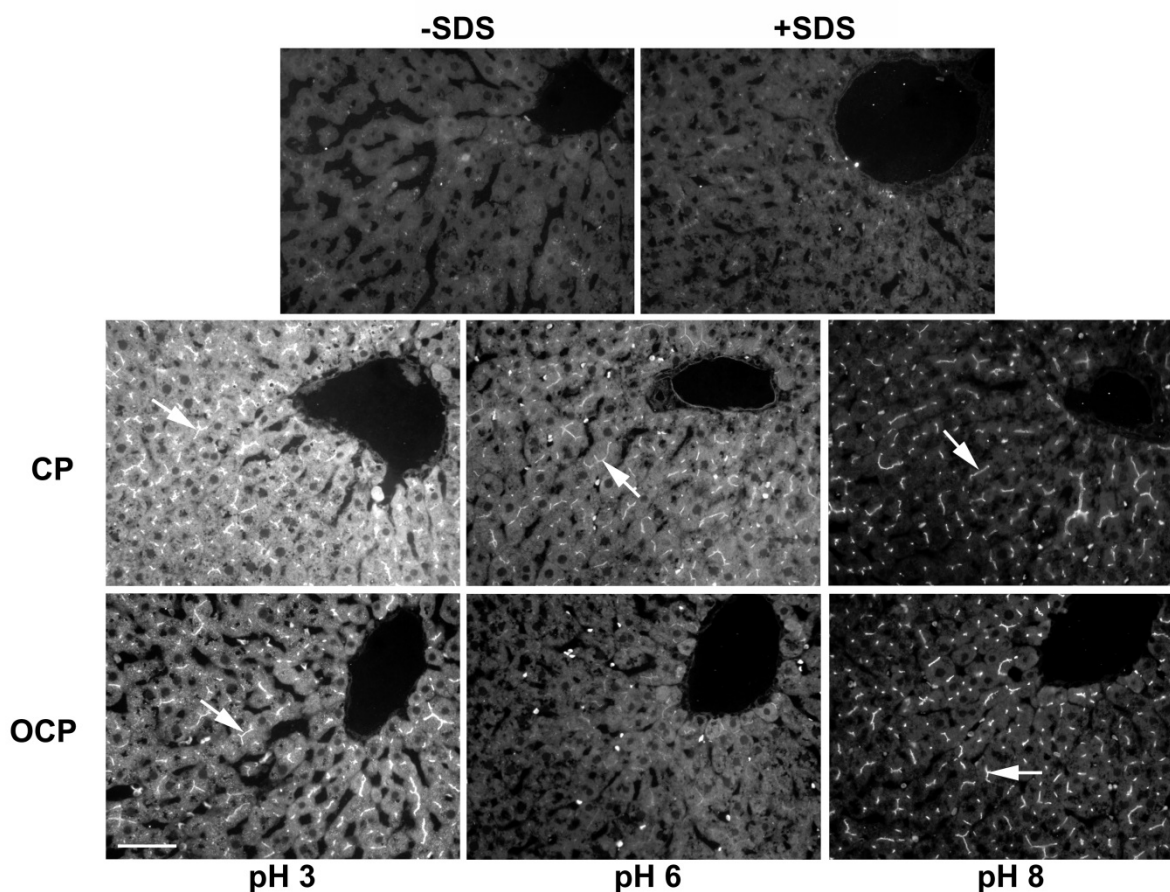
## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje optimalnih uvjeta za uporabu protutijela za P-gp/MDR u imunocitokemijskoj i Western analizi

U svrhu ispitivanja ekspresije proteina P-gp u različitim organima najprije sam, za postizanje što veće učinkovitosti i provjeru specifičnosti obilježavanja protutijela u imunocitokemijskim metodama, ispitala optimalne uvjete za imunocitokemiju i Western analizu.

Monoklonsko protutijelo za P-gp (klon C219) ispitala sam na narescima (kriosekcijama) tkiva jetre, bubrega i različitih odsječaka probavnog trakta korištenjem različitih metoda otkrivanja antigena: obrada detergentima [sa SDS-om (+SDS); bez posebne obrade (-SDS)], kuhanje u citratnom puferu (CP) različitog pH (pH 3, 6, 8), te obrada organskim otapalima (ksilol, propanol, etanol) i kuhanje u citratnom puferu različitog pH (OCP pH 3, 6, 8).

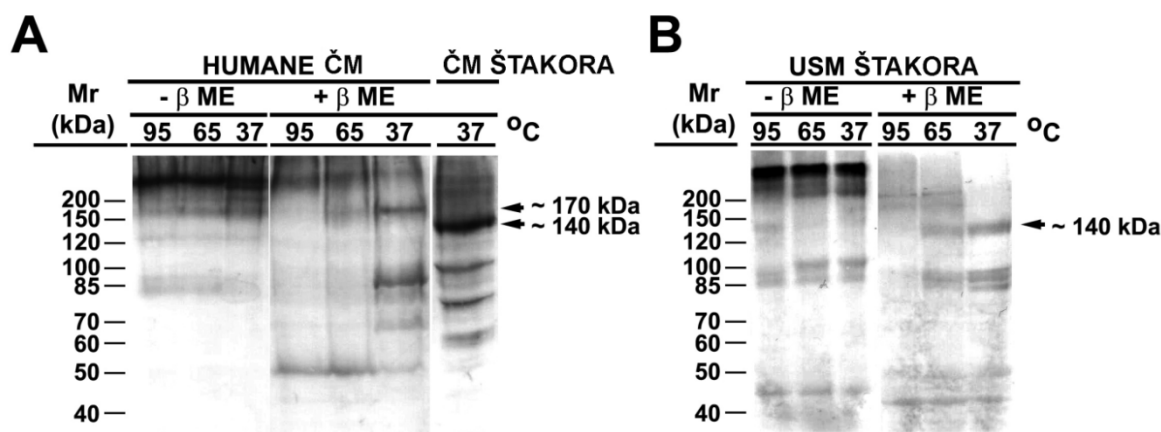
Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da optimalni uvjeti za prikaz P-gp u tkivu jetre uključuju obradu alkoholima i zagrijavanje uzoraka u citratnom puferu pH 8 (OCP pH 8) te razrjeđenje protutijela 1:100 (slika 6), te sam u daljnjim istraživanjima ekspresije P-gp u jetri koristila ovaj uvjet. Istim metodama otkrivanja antigena ispitala sam optimalne uvjete u ostalim tkivima te sam utvrdila da je za optimalno imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u bubrezima potrebna obrada organskim otapalima (ksilol, propanol, etanol) i kuhanje u citratnom puferu pH 8 (OCP pH 8) te razrjeđenje protutijela 1:5 (nije prikazano). Za imunocitokemijsko obilježavanje P-gp različitim odsječcima probavnog trakta optimalan uvjet je bio kuhanje u citratnom puferu pH 3 (CP pH 3) i razrjeđenje protutijela 1:30 (slika 8A). Navedeni optimalni uvjeti za odgovarajuće organe korišteni su u svim daljnjim pokusima.



**Slika 6. Određivanje optimalnih uvjeta za imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u jetri štakora.** Kriostatski naresci tkiva jetre obrađeni su različitim metodama otkrivanja antigena: -SDS, bez obrade detergentom SDS; +SDS, obrada detergentom SDS; CP, kuhanje u citratnom puferu različitog pH (3, 6, 8); OCP, obrada organskim otapalima (ksilol, propanol, etanol) plus kuhanje u citratnom puferu različitog pH (3, 6, 8). P-gp (strelice) prisutan je u kanalikularnoj membrani hepatocita i najbolje je vidljiv pri uvjetu OCP pH 8. Razrjeđenje primarnog protutijela u svim obrađenim uzorcima bilo je 1:100. Mjera 40  $\mu$ m.

Optimalne uvjete za Western analizu ispitala sam na ČM izoliranim iz bubrega čovjeka i štakora (slika 7A), na USM izoliranim iz bubrega štakora (slike 7B) te na USM izoliranim iz jetre i probavnog trakta štakora (nije prikazano). Uzorci su denaturirani u prisustvu (+ $\beta$ ME) i odsustvu reducirajućeg agensa  $\beta$ -merkaptioetanolu (- $\beta$ ME) pri različitim temperaturama tijekom različitog vremenskog perioda (37°C/30 min, 65°C/15 min, 95°C/5 min) te pripremljeni u Laemmli puferu kao što je detaljno opisano ranije. Rezultati su pokazali da reducirajući uvjet + $\beta$ ME pri 37 °C/30 min dao najjaču proteinsku prugu od ~170 kDa u četkastim membranama izoliranim iz bubrega

čovjeka te najjaču proteinsku prugu od ~140 kDa u ČM i USM izoliranim iz bubrega štakora (slika 7A). Svi daljnji pokusi na USM bubrega štakora rađeni su pri ovim uvjetima.



**Slika 7. Određivanje optimalnih uvjeta za Western analizu P-gp u uzorcima četkastih membrana iz bubrega čovjeka i štakora te ukupnih staničnih membrana štakora. A:** Uzorci ČM iz bubrega čovjeka pripremljeni su u reducirajućem (+βME) ili nereducirajućem (-βME) puferu za denaturaciju proteina, te dodatno termički denaturirani pri različitim temperaturama i različitom vremenu (95 °C/5min, 65 °C/15 min i 37 °C/30 min). Reducirajući uvjet +βME pri 37 °C/30 min daje najjaču proteinsku prugu od ~170 kDa u ČM izoliranim iz bubrega čovjeka, te najjaču proteinsku prugu od ~140 kDa u ČM izoliranim iz bubrega štakora. **B:** Uzorci USM iz bubrega štakora pripremljeni u reducirajućem (+βME) ili nereducirajućem (-βME) puferu za denaturaciju proteina, te dodatno termički denaturirani pri različitim temperaturama i različitim vremenu (95 °C/5min, 65 °C/15 min i 37 °C/30 min). Reducirajući uvjet +βME pri 37 °C/30 min daje najjaču proteinsku prugu od ~140 kDa u USM izoliranim iz bubrega štakora. βME= β-merkaptetoanol

Također, pri reducirajućim uvjetima (+βME pri 37 °C/30 min) radila sam usporedbu ekspresije P-gp u USM izoliranim iz različitih odsječaka probavnog trakta, jetre i bubrega, te u ČM bubrega (slika 8B). U svim odsječcima probavnog trakta (duodenum, jejunum, ileum, cekum, kolon) protutijelo za P-gp označilo je proteinsku prugu molekulske mase ~170 kDa. Nadalje, u USM iz jejunuma i ileuma protutijelo na P-gp označilo je dodatnu slabije izraženu proteinsku prugu molekulske mase ~140 kDa. Obje proteinske pruge najjače su izražene u ileumu. Opisane

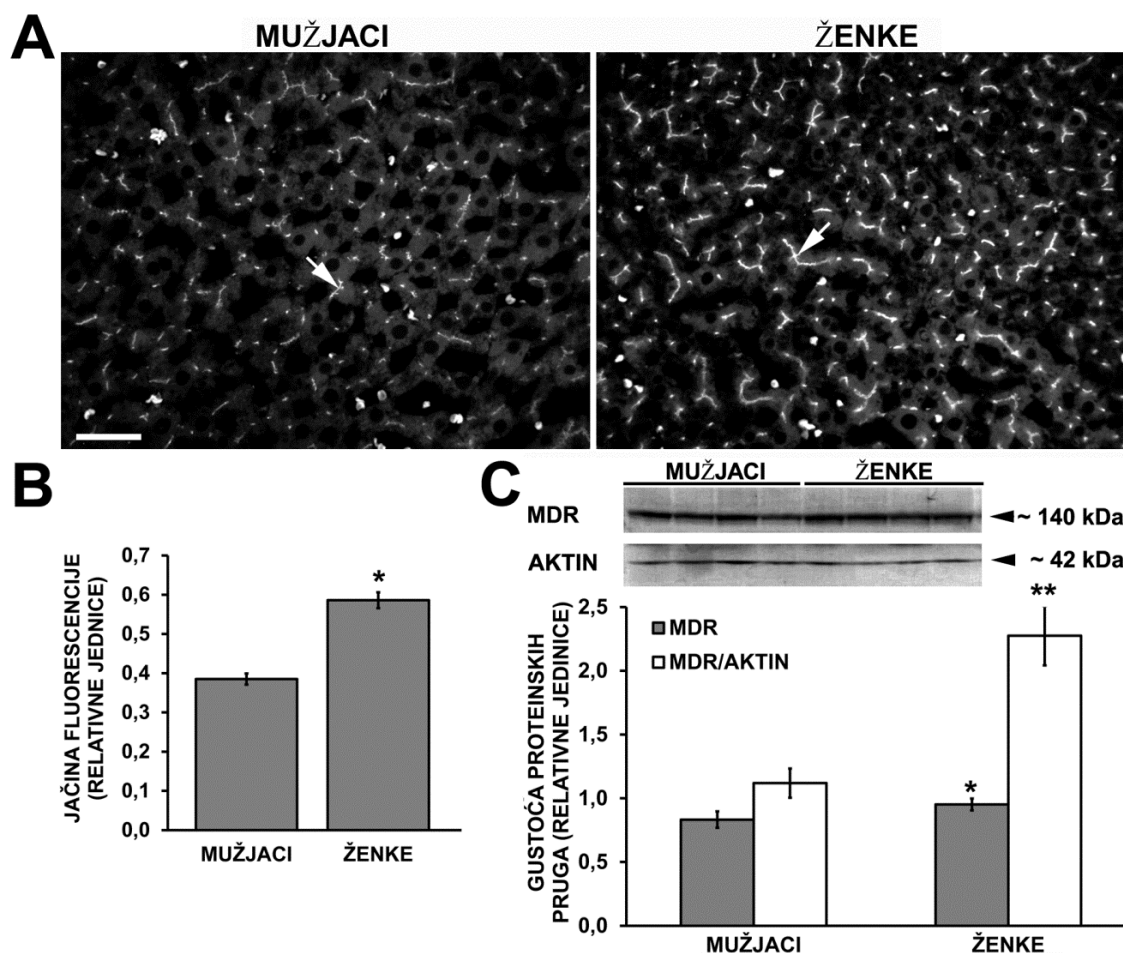


## 4.2. P-gp u jetri štakora

### 4.2.1. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora

Do sada istražene spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora najvećim su dijelom opisane na razini mRNA (Salphati i Bennett 1998, Suzuki i sur. 2006, Lu i Klaassen 2008). Stoga sam ih ovim radom željela podrobnije istražiti na razini proteina imunokemijskim metodama, t.j. imunocitokemijom i Western analizom.

U kriosekcijama štakorske jetre protutijelo za P-gp obilježilo je kanalikularne membrane hepatocita. Uočene su jasne spolne razlike u ekspresiji P-gp u korist ženki (slika 9A i B). Ovaj nalaz potvrđen je Western analizom; normaliziranjem prema aktinu, gustoća proteinske pruge od ~140 kDa u USM iz jetre ženki bila je ~100% jača nego u mužjaka (slika 9C).



Slika 9. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) i Western analiza (C). A: Imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u kanalikularnim membranama hepatocita. Obojenje P-gp (strelice) u kanalikularnim membranama je jače u ženki u odnosu na mužjake. Mjera 40  $\mu$ m. B: Mjerenje intenziteta fluorescencije u kanalikularnim

membranama hepatocita pokazuje značajno jaču fluorescenciju u ženki (~50%) u odnosu na mužjake (\* prema mužjacima,  $P < 0.05$ ). **C:** Western analiza P-gp i aktina u USM iz jetre te denzitometrijska evaluacija proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge koja odgovara P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je jača u ženki u odnosu na mužjake (\* prema mužjacima,  $P < 0.05$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Normalizacijom na aktin (MDR/AKTIN) razlika u korist ženki je ~100% veća (\*\* prema mužjacima,  $P < 0.001$ ). Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu$ g proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje.

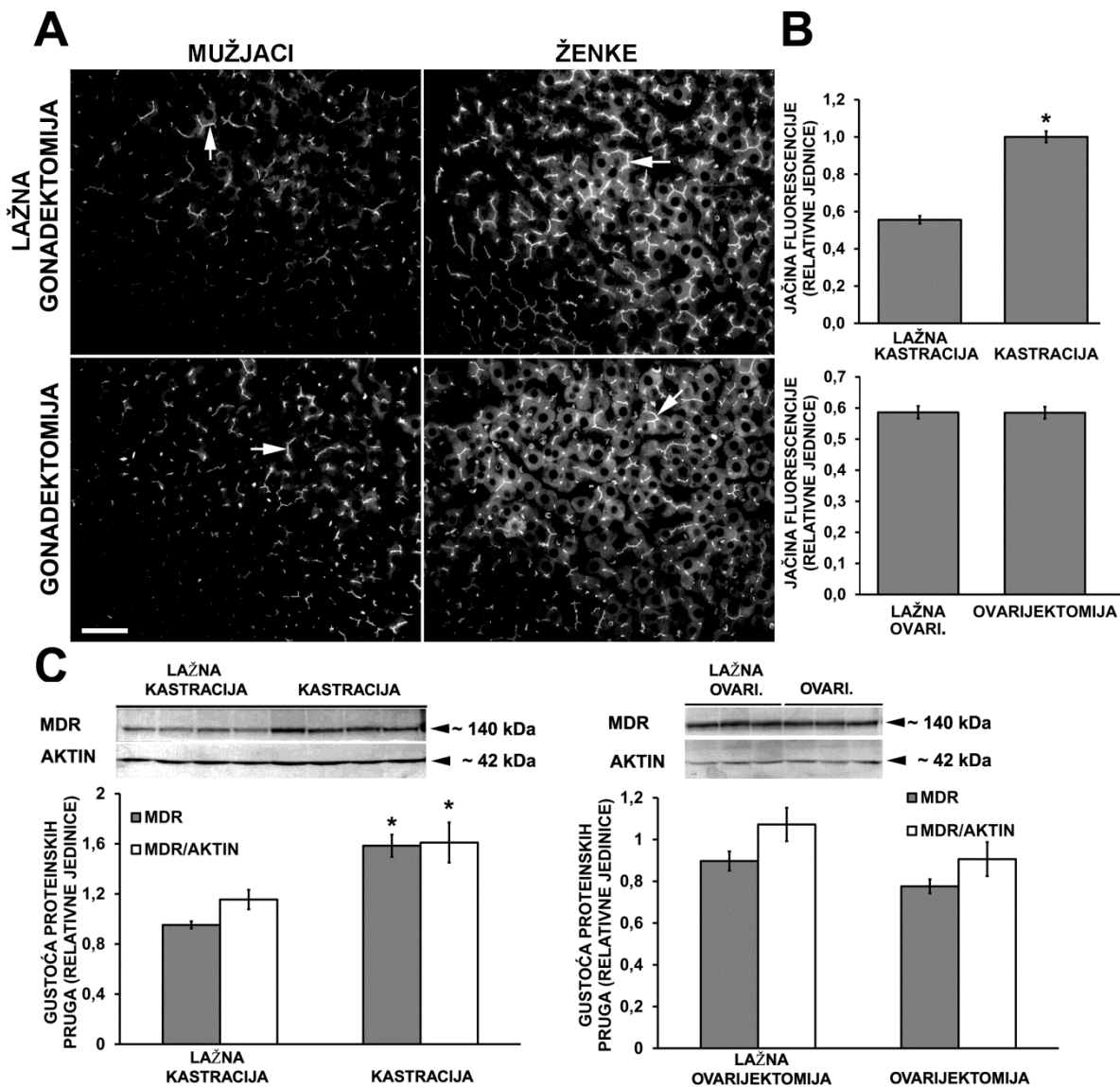
#### **4.2.2. Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u jetri štakora**

Kako bi utvrdili koji su spolni hormoni odgovorni za razlike u jetri štakora, ispitali smo ekspresiju P-gp u mužjaka i ženki nakon odstranjivanja gonada, kao što je detaljno opisano ranije.

U gonadektomiranih životinja, imunocitokemija narezaka tkiva jetre pokazala je jaču ekspresiju P-gp u kanalikularnoj membrani hepatocita kastriranih mužjaka u odnosu na kontrolnu skupinu (lažna kastracija), dok nije bilo razlike između ovarijektomiranih i lažno ovarijektomiranih ženki (slika 10A i B). Dakle, kastracija pojačava ekspresiju, dok ovarijektomija nema učinka na ekspresiju P-gp u jetri.

Ovaj nalaz potvrđen je Western analizom: proteinska pruga od ~140 kDa u USM iz jetre kastriranih mužjaka bila je jača nego u lažno kastriranih životinja. Denzitometrija proteinskih pruga pokazala je statistički značajnu razliku u korist kastrata (slika 10C). U ovarijektomiranih ženki nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji P-gp u jetri u odnosu na lažno ovarijektomirane životinje (slika 10C).

Ovaj nalaz ukazuje na inhibicijski učinak androgena, dok ženski spolni hormoni nemaju utjecaja na ekspresiju P-gp u jetri.



**Slika 10. Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u jetri odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C i D) u jetri odraslih životinja i učinak gonadektomije. A:** Imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u kanalikularnim membranama smrznutih narezaka jetre lažno gonadektomiranih i gonadektomiranih životinja. Obojenje P-gp (strelice) u kanalikularnim membranama je jače u kastriranih u odnosu na lažno kastrirane mužjake. Nema razlike u jačini i raspodjeli obojenja P-gp u jetri lažno ovarijektomiranih i ovarijektomiranih ženki. Mjera 40  $\mu$ m. **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije kanalikularnih membrana u hepatocitima pokazuje značajno jaču fluorescenciju u kastrata u odnosu na lažno kastrirane mužjake (\* prema lažnoj kastraciji,  $P < 0.05$ ), dok u ovarijektomiranih ženki nema promjene u odnosu na kontrolnu skupinu (lažna ovarijektomija). **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz jetre lažno gonadektomiranih i gonadektomiranih životinja te denzitometrijsko mjerenje proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge, koja odgovara P-gp (MDR) od ~140 kDa, značajno je jača u kastriranih mužjaka u odnosu na lažno kastrirane mužjake (\* prema

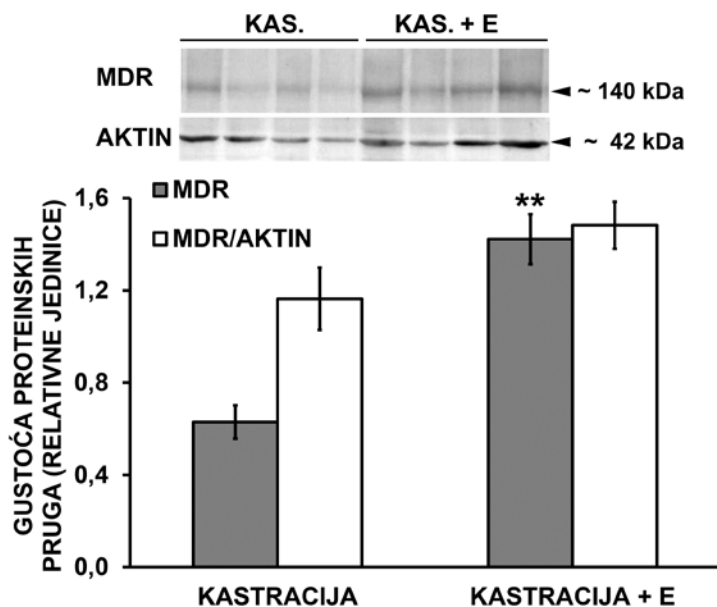


lažnoj kastraciji,  $P < 0.05$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Rezultat je sličan i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\* prema lažnoj kastraciji,  $P < 0.05$ ). Nema statistički značajne razlike u gustoći proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa između ovarijektomiranih i lažno ovarijektomiranih ženki. Rezultat je isti i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN). Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje.

#### **4.2.3. Određivanje spolnih hormona odgovornih za spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora**

Nadalje, kako bi se dodatno ispitao mogući učinak farmakoloških doza ženskih spolnih hormona na ekspresiju P-gp u jetri štakora, odrasli mužjaci su kastrirani te potom obrađeni estradiolom i progesteronom, dok je kontrolnim mužjacima ubrizgavano suncokretovo ulje, kako je detaljno opisano ranije.

Tako je u ovom pokusu utvrđen prividan stimulacijski učinak estrogena na ekspresiju P-gp u jetri, (Western analizom USM jetre pokazano je da se povećava ekspresija proteina P-gp u kastriranih životinja tretiranih estradiolom u odnosu na kontrolne životinje) nakon preračunavanja na aktin, ekspresija P-gp u estradiolom tretiranih štakora nije se razlikovala od one u kontrolnih (uljem tretiranih životinja) (slika 11). Zaključila sam da estrogeni doista nemaju značajan učinak na ekspresiju P-gp u jetri. Tretman progesteronom nije utjecao na ekspresiju P-gp u kastriranih mužjaka (rezultati nisu prikazani).



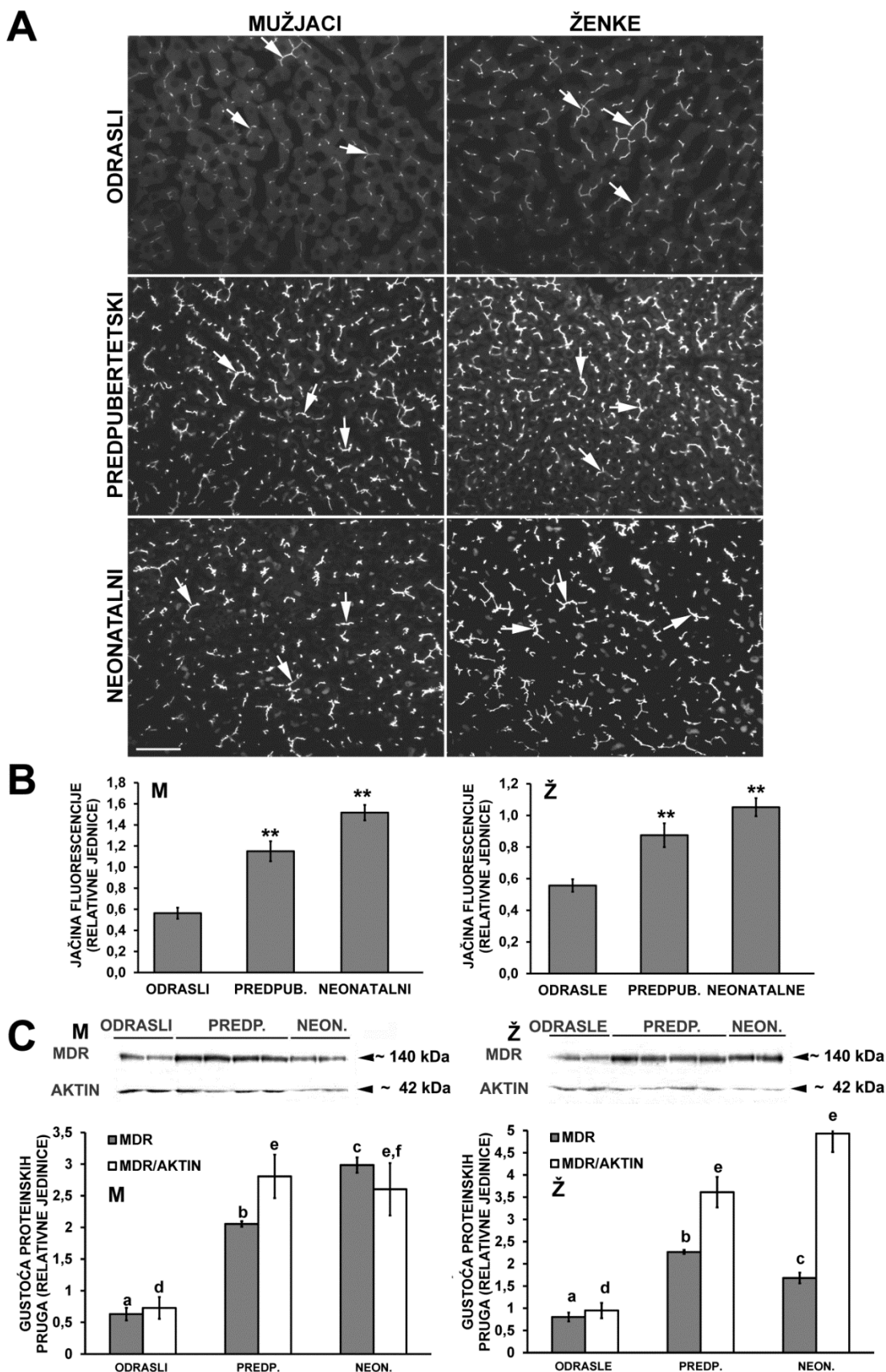
**Slika 11. Estrogenska stimulacija ekspresije P-gp u jetri odraslih štakora.** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz jetre kastriranih mužjaka (KAS), kastriranih mužjaka tretiranih estradiolom (KAS+E) i denzitometrijska evaluacija proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je jača (~120%) u kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom (KAS+E) u odnosu na kastrirane mužjake (\*\* prema kastraciji,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Prilikom normalizacije na aktin (MDR/AKTIN), nema statistički značajne razlike između tretiranih i kontrolnih životinja. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu$ g proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje.

#### 4.2.4. Dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora

S obzirom da je utvrđivanje dobnih razlika u ekspresiji P-gp u jetri važno za bolje razumijevanje rezultata studija toksičnosti u životinja različite dobi, imunokemijskim metodama sam istražila ekspresiju P-gp u neonatalnim (novorođenim, 1 dan starim), predpubertetskim (3 tjedna starim), odraslim (3 mjeseca starim) i starim (dvogodišnjim) štakorima obaju spolova.

U kriosekcijama jetre neonatalnih, predpubertetskih i odraslih mužjaka i ženki uočene su jasne dobne razlike u ekspresiji P-gp. Intenzitet fluorescencije kanalikularne membrane bio je

najjači u neonatalnih životinja i smanjivao se prema odrasloj dobi (neonatalni > predpubertetski > odrasli) (slika 12A i B). Western analizom USM jetre utvrđeno je da je gustoća proteinske pruge od ~140 kDa bila najjača u neonatalnim mužjacima i smanjivala se prema odrasloj dobi (neonatalni > predpubertetski > odrasli), dok je u ženki bila jača u predpubertetskim u odnosu na neonatalne i odrasle ženke (slika 12C). Nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) nema razlike između predpubertetskih i neonatalnih mužjaka, kao ni između predpubertetskih i neonatalnih ženki, dok je i dalje prisutna statistički značajna razlika u odnosu na odrasle mužjake i ženke (slika 12C).



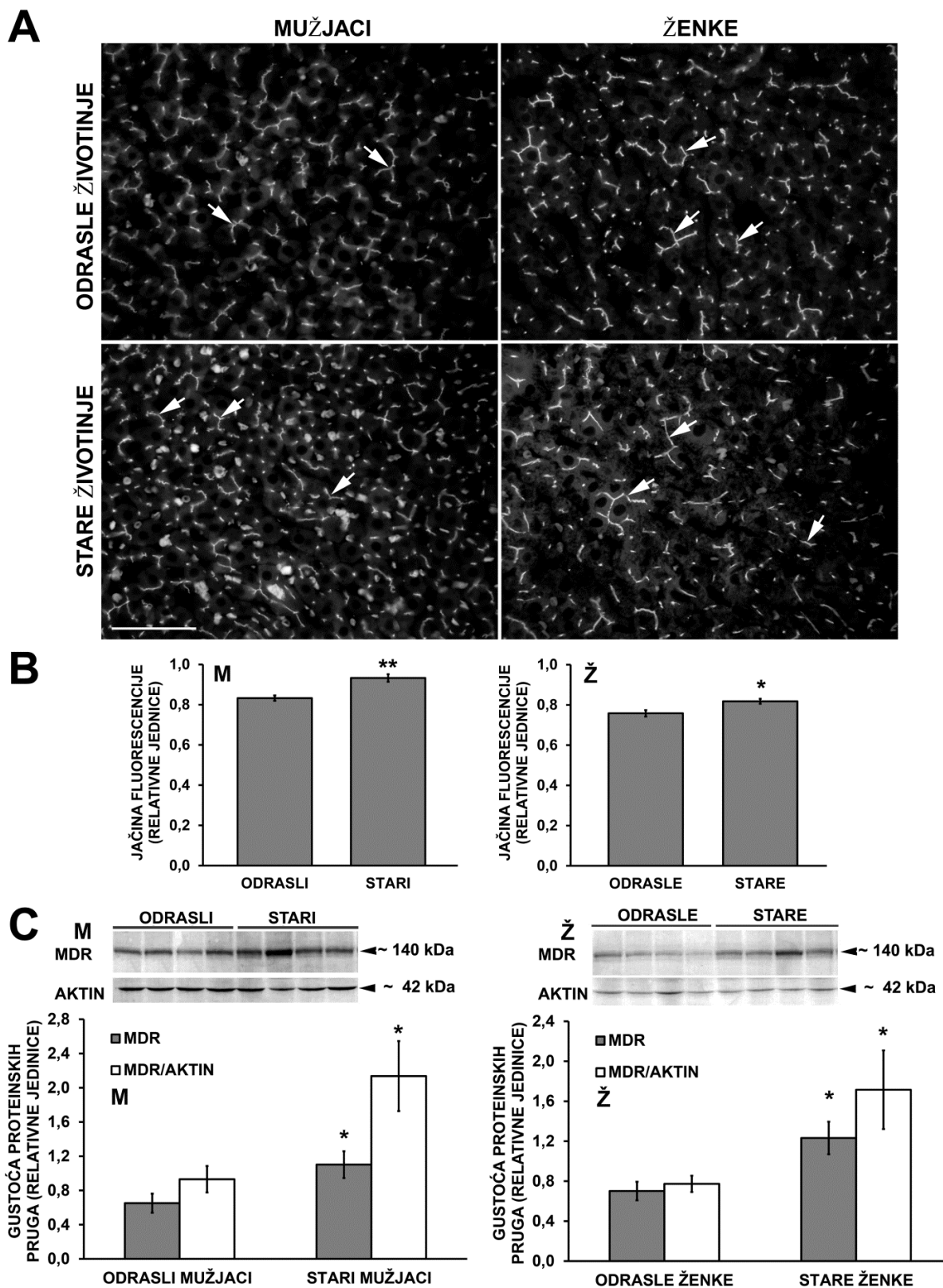
Slika 12. Dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora mužjaka (M) i ženki (Ž); Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C) u jetri neonatalnih (novorođenih, 1 dan starih), predpubertetskih (3 tjedna starih) i odraslih (3 mjeseca starih) životinja. A: U obama spolovima imunocitokemijsko bojenje P-gp u kanalikularnim membranama hepatocita (strelice) je najjače u

neonatalnih životinja te se smanjuje u starijih životinja (neonatalni > predpubertetski > odrasli). Mjera 40  $\mu\text{m}$ .

**B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije pokazuje značajno jači intenzitet fluorescencije u predpubertetskim i neonatalnim životinjama u odnosu na odrasle mužjake i ženke (\*\* prema odraslim životinjama,  $P < 0.001$ ).

**C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz jetre neonatalnih, predpubertetskih i odraslih životinja te denzitometrijsko mjerenje proteinskih pruga. U mužjaka (M), relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa najviša je u neonatalnim mužjacima, te je značajno viša u predpubertetskim i neonatalnim mužjacima u odnosu na odrasle mužjake (a:b, a:c, b:c,  $P < 0.001$ ). Nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) nema razlike između predpubertetskih i neonatalnih mužjaka (e:e,f,  $P = \text{NS}$ ), dok je prisutna statistički značajna razlika u odnosu na odrasle mužjake (d:e,  $P < 0.001$ ; d:e,f,  $P < 0.05$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. U ženki (Ž), relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa najviša je u predpubertetskim ženkama, te je i u neonatalnim i predpubertetskim životinjama značajno viša u odnosu na odrasle ženke (a:b, b:c,  $P < 0.001$ ; a:c  $P < 0.05$ ). Nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) nema razlike između predpubertetskih i neonatalnih ženki (e:e,  $P = \text{NS}$ ), dok je u obje skupine prisutna značajna razlika u odnosu na odrasle ženke (d:e,  $P < 0.001$ ). Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje.

U starih (dvogodišnjih) mužjaka i ženki imunocitokemijsko bojanje P-gp u kanalikularnoj membrani hepatocita bilo je jače u odnosu na odrasle životinje (13A i B). Ovaj nalaz potvrđen je Western analizom: proteinska pruga od ~140 kDa u USM jetre starih mužjaka i ženki bila je jača nego u odraslih životinja (slika 13C). Denzitometrija proteinskih pruga pokazala je statistički značajnu razliku u korist starih životinja (slika 13C).



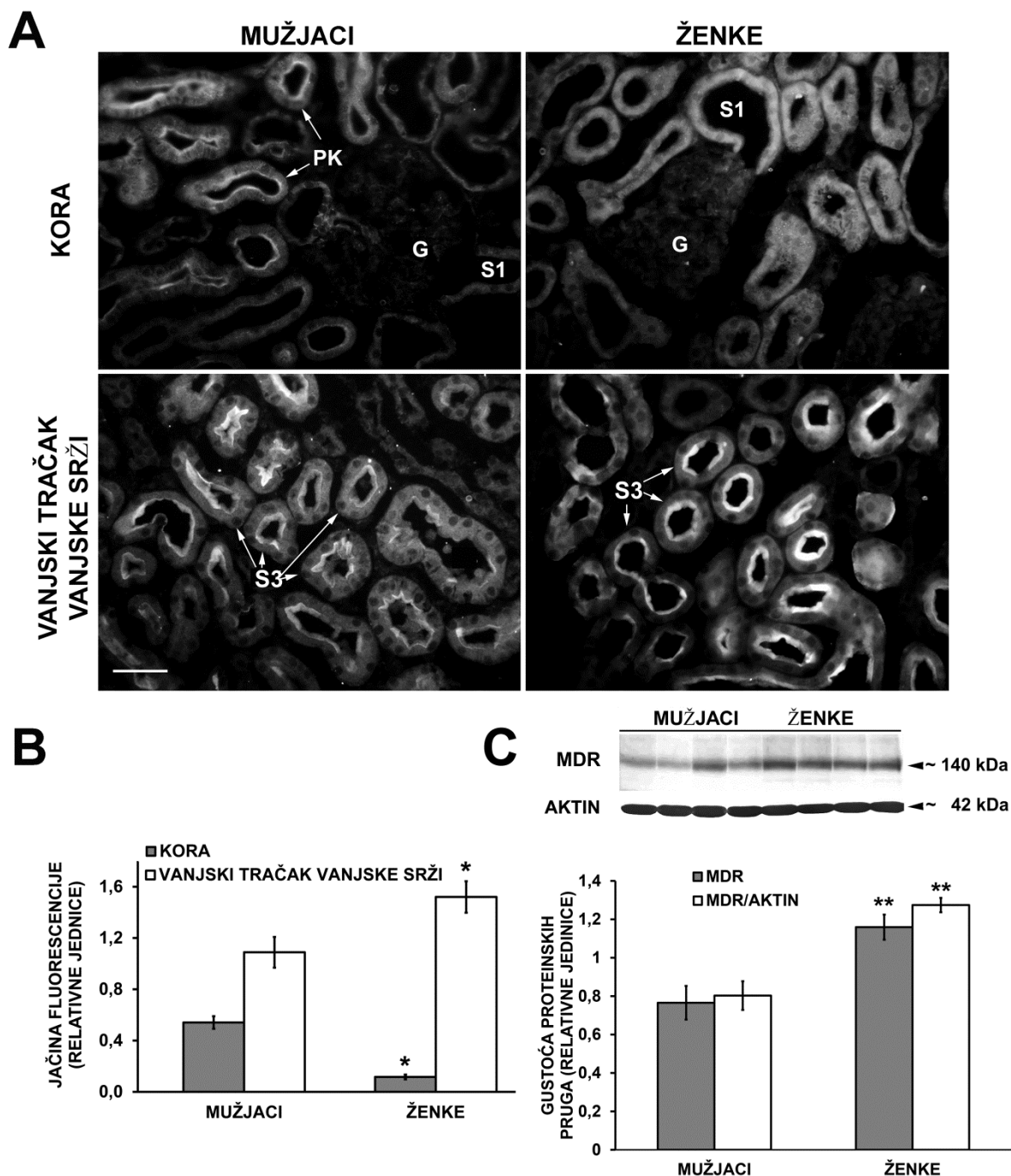
Slika 13. Razlike u ekspresiji P-gp u jetri odraslih (3 mjeseca starih) i starih (dvogodišnjih) štakora mužjaka (M) i ženki (Ž); Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C). A: Imunocitokemijska obojenost P-gp u kanalikularnim membranama hepatocita jača je u starih životinja (dvogodišnjih) u odnosu na odrasle (3 mjeseca stare) mužjake i ženke. Mjera 40  $\mu$ m. B: Imunofluorescencija u kanalikularnim membranama hepatocita pokazuje značajno veći intenzitet u starim

mužjacima (M) u odnosu na odrasle (\*\* prema odraslim mužjacima,  $P < 0.001$ ), te u starim ženka (Ž) u odnosu na odrasle (\* prema odraslim ženka,  $P < 0.05$ ). **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz jetre odraslih i starih životinja te denzitometrijsko mjerenje proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je viša u starim mužjacima (M) i ženka (Ž) u odnosu na odrasle mužjake i ženke bez (MDR) i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\* prema odraslim životinjama,  $P < 0.05$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80 µg proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje.

### **4.3. P-gp u bubrezima štakora**

#### **4.3.1. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora**

Spolne razlike sam istraživala i u bubrezima štakora te sam, osim jasnih spolnih razlika, uočila i zonske razlike u ekspresiji P-gp u kori i vanjskom tračku bubrega odraslih životinja. Dok je imunocitokemijsko obojenje P-gp u kori bilo jače u mužjaka nego u ženki, u vanjskom tračku bubrega obojenje je bilo jače u ženki (slika 14A i B). Međutim, Western analiza u USM iz spojenog uzorka tkiva kore + vanjskog tračka pokazala je izrazite spolne razlike u sadržaju P-gp (ženke > mužjaci) (slika 14C).



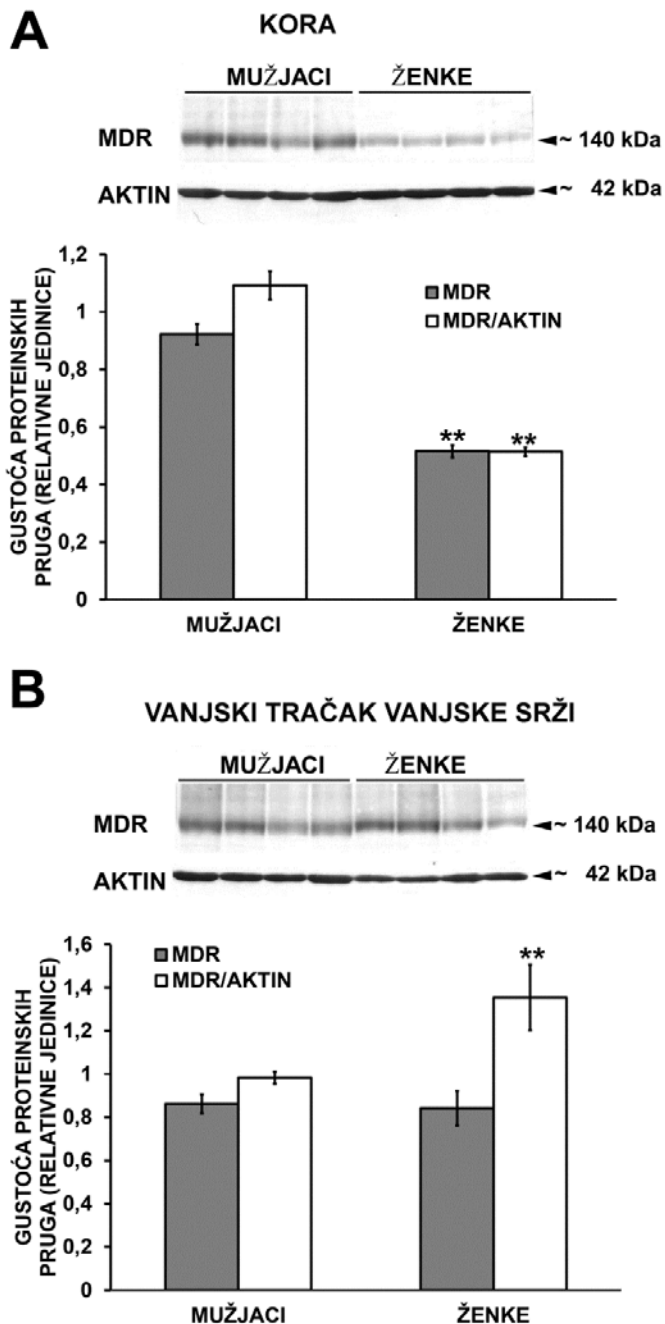
**Slika 14. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C). A:** U kori i vanjskom tračku vanjske srži P-gp je prisutan u četkastoj membrani proksimalnih kanalića bubrega (strelice). Obojenje u kori bubrega je jače u mužjaka nego u ženke, dok je u vanjskom tračku vanjske srži obojenje jače u ženke nego u mužjaka. Mjera 40  $\mu$ m. **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije u ČM proksimalnih kanalića pokazuje značajno veći intenzitet u kori mužjaka u odnosu na ženke (~600%), dok je u vanjskom tračku vanjske srži intenzitet veći u ženki u odnosu na mužjake (~ 50%) (\* prema mužjacima,  $P < 0.05$ ). **C:** Western blot P-gp u uzorcima USM izoliranih iz kore + vanjskog tračka bubrega mužjaka i ženki te denzitometrijsko mjerenje istih. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je viša u ženki u odnosu na



mužjake (~55%), bez i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* prema mužjacima,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje. G= glomerul; PK= proksimalni kanalić (S1/S2) (S1=početni dio proksimalnog kanalića); S3= ravni odsječak proksimalnog kanalića

Nakon imunocitokemijskog nalaza jasnih zonskih razlika u ekspresiji P-gp u kori i vanjskom tračku, što je prikazano na slici 14, ovaj fenomen istražila sam Western analizom u USM izoliranim posebno iz kore i vanjskog tračka bubrega.

U USM izoliranim iz kore i vanjskog tračka bubrega mužjaka i ženki relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je jača u ženki u odnosu na mužjake. Usporedbom USM izoliranih iz kore i vanjskog tračka vanjske srži bubrega, denzitometrija proteinskih pruga je pokazala statistički značajnu razliku u korist mužjaka u kori (slika 15A), dok je u vanjskom tračku vanjske srži bubrega ženki bila značajno jača u odnosu na mužjake samo kod normalizacije prema aktinu (MDR/AKTIN) (slika 15B).

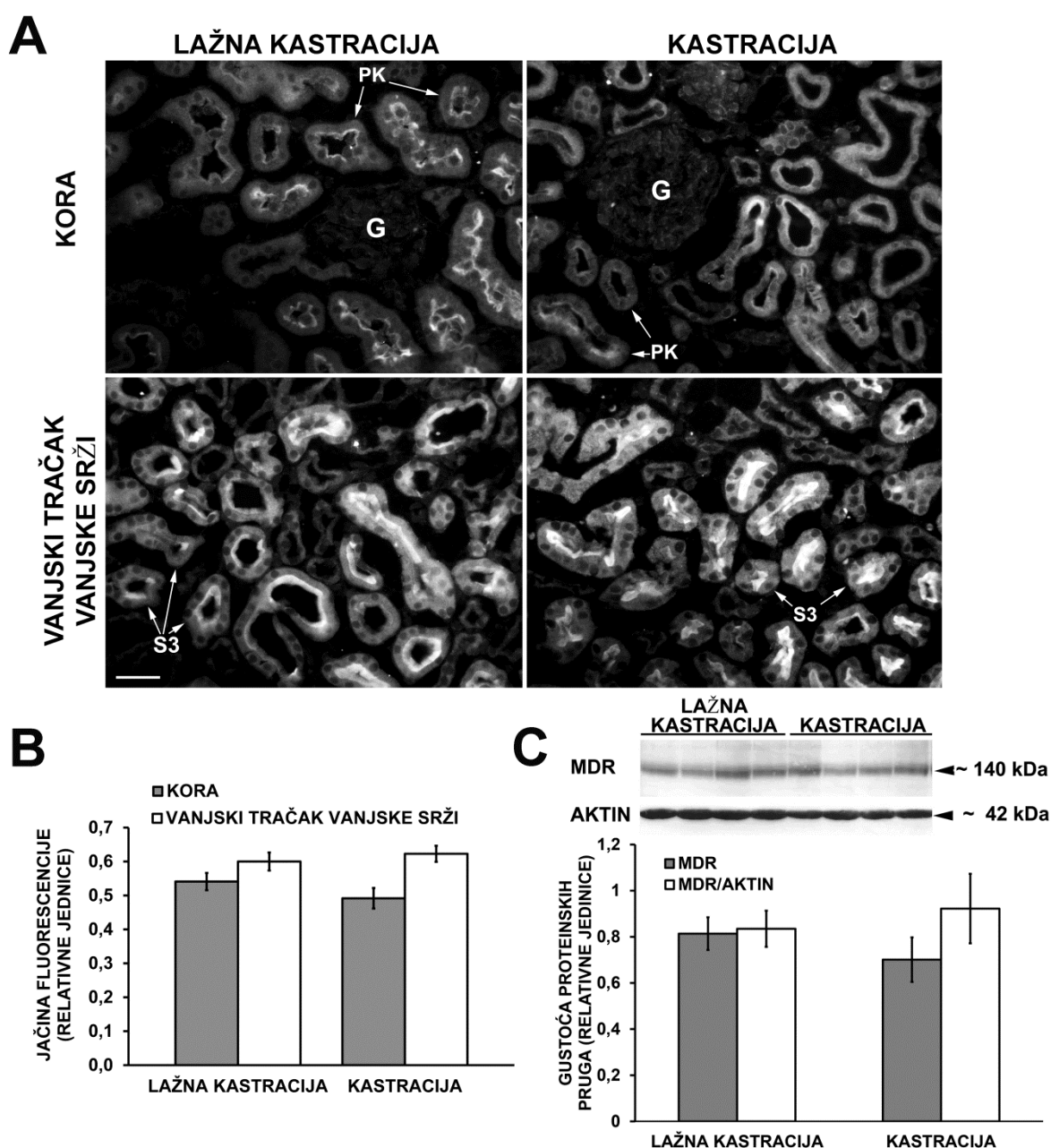


**Slika 15. Zonske i spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Western analiza P-gp u uzorcima USM izoliranih iz kore (A) i vanjskog tračka vanjske srži (B) bubrega mužjaka i ženki, te denzitometrijsko mjerenje istih proteinskih pruga. A:** U kori bubrega relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je slabija (~50%) u ženki u odnosu na mužjake, prije (MDR) i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* prema mužjacima,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. **B:** Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa viša je (~40%) u vanjskom tračku vanjske srži u bubrezima ženki u odnosu na mužjake nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* prema mužjacima,  $P < 0.001$ ). Svaka proteinska

pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom USM iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje.

### 4.3.2. Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u bubrezima štakora

Prethodno utvrđeni inhibicijski utjecaj androgena na ekspresiju P-gp u jetri nije uočen u bubrezima. Imunocitokemija smrznutih narezaka bubrega nije pokazala razlike u ekspresiji P-gp u kori i vanjskom tračku vanjske srži kastrata u odnosu na lažno kastrirane mužjake (slika 16A i B). Ovaj nalaz potvrđen je Western analizom u USM iz tkiva kore + vanjskog tračka (slika 16C).

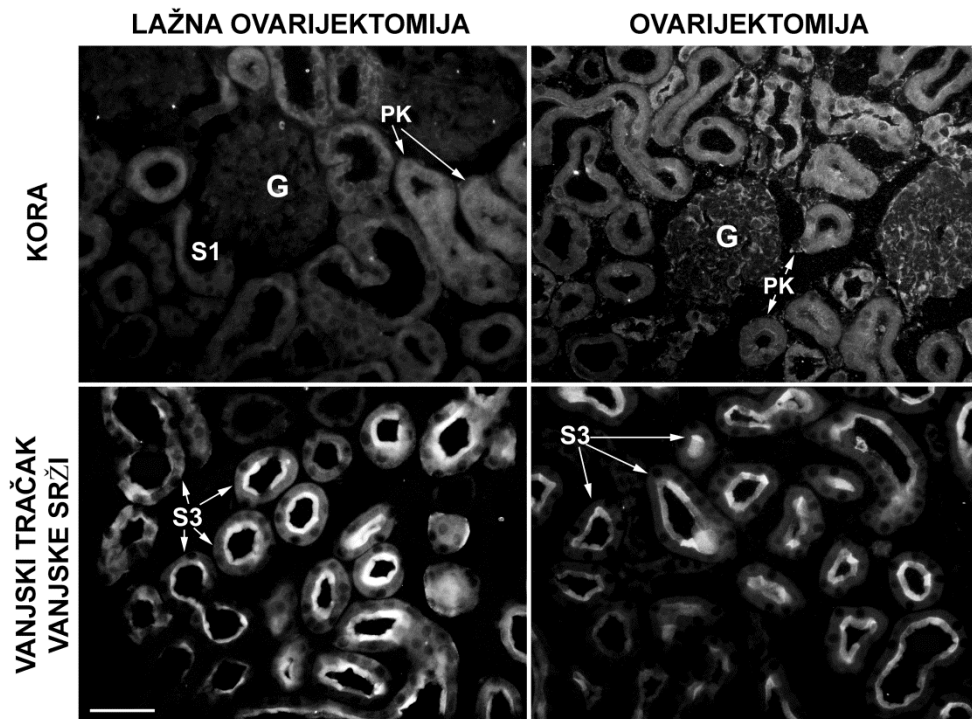
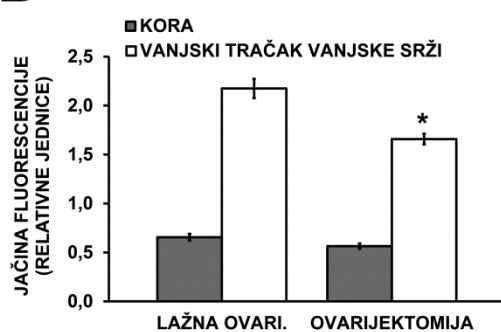
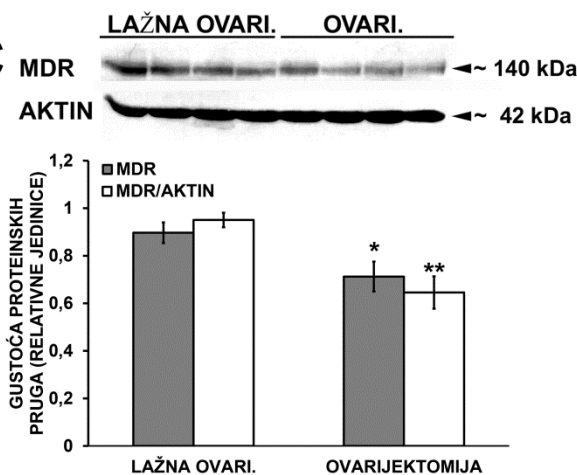


Slika 16. Učinak kastracije na ekspresiju P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) štakora mužjaka; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C). A: Imunocitokemijsko

obilježavanje P-gp u kori i vanjskom tračku vanjske srži bubrega u lažno kastriranih i kastriranih životinja. Nema statistički značajne razlike u obojenju P-gp (strelice) u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskom tračku vanjske srži lažno kastriranih i kastriranih životinja. Mjera 40  $\mu\text{m}$ . **B:** Mjerenjem intenziteta fluorescencije u četkastoj membrani proksimalnih kanalića nije utvrđena značajna razlika u intenzitetu fluorescencije u vanjskom tračku vanjske srži u odnosu na koru i u lažno kastriranih i u kastriranih životinja. **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM izoliranih iz kore + vanjskog tračka bubrega lažno kastriranih i kastriranih mužjaka, te denzitometrijsko mjerenje istih proteinskih pruga. Nema statistički značajne razlike u relativnoj gustoći proteinske pruge P-gp (MDR)  $\sim 140$  kDa između lažno kastriranih mužjaka i kastriranih mužjaka prije ni nakon normalizacije na aktin (MDR; MDR/AKTIN, P=NS). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje. G= glomerul; PK= proksimalni kanalić (S1/S2) (S1=početni dio proksimalnog kanalića); S3=ravni odsječak proksimalnog kanalića

Za razliku od toga, uočen je inhibicijski učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u bubrezima ženki. U ovarijektomiranih ženki, imunocitokemijska ekspresija P-gp je bila niža u vanjskom tračku vanjske srži u odnosu na kontrolnu skupinu (lažna ovarijektomija) (slika 17A i B). U kori nije bilo razlike u ovarijektomiranih i lažno ovarijektomiranih ženki. Western analizom USM iz tkiva kore + vanjskog tračka, denzitometrijom proteinskih pruga potvrđeno je da ovarijektomija smanjuje ekspresiju P-gp u bubrezima (slika 17C).

Ovaj nalaz govori u prilog stimulacijskom djelovanju ženskih spolnih hormona na ekspresiju P-gp u vanjskom tračku u bubrezima ženki.

**A****B****C**

**Slika 17. Učinak ovarijektomije na ekspresiju P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) ženskih štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C). A:** Imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u kori i vanjskom tračku vanjske srži u bubrezima lažno ovarijektomiranih i ovarijektomiranih ženki. Obojenje P-gp (strelice) u četkastoj membrani proksimalnih kanalića vanjskog tračka jače je u odnosu na obojenje u kori lažno ovarijektomiranih i ovarijektomiranih životinja. Ovarijektomija smanjuje obojenost P-gp u vanjskom tračku, dok se u kori ne mijenja. Mjera 40  $\mu$ m. **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije u četkastoj membrani proksimalnih kanalića pokazuje značajno manji intenzitet fluorescencije (~25%) u vanjskom tračku ovarijektomiranih u odnosu na lažno ovarijektomirane životinje (\* prema lažnoj ovarijektomiji,  $P < 0.05$ ). Nema razlike u intenzitetu fluorescencije u kori lažno ovarijektomiranih i ovarijektomiranih životinja. **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM izoliranih iz kore + vanjskog tračka bubrega lažno ovarijektomiranih i ovarijektomiranih životinja te denzitometrijsko mjerenje

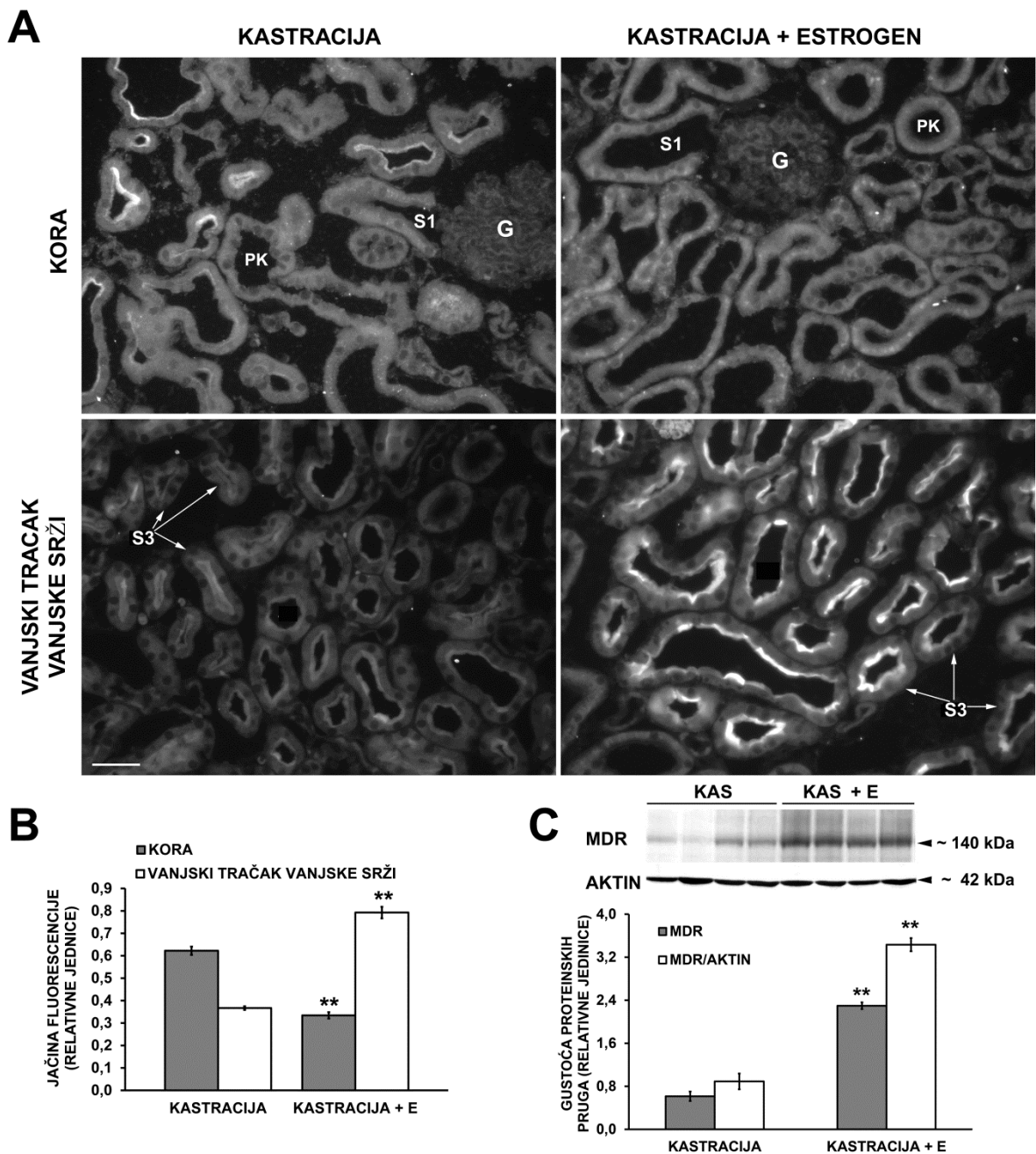
istih proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) ~140 kDa niža je (~25%) u ovarijektomiranih ženki u odnosu na lažno ovarijektomirane, prije i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* prema lažnoj ovarijektomiji,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje. G= glomerul; PK= proksimalni kanalić (S1/S2) (S1= početni dio proksimalnog kanalića); S3= ravni odsječak proksimalnog kanalića

#### **4.3.3. Određivanje spolnih hormona odgovornih za spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora**

Podrobnije ispitivanje utjecaja spolnih hormona na ekspresiju P-gp u bubrezima pokazalo je različitu regulaciju ekspresije u kori i vanjskom tračku bubrega. Utvrđeno je da estradiol smanjuje ekspresiju P-gp u proksimalnim kanalićima u kori kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom. Suprotno tome, obrada estradiolom povećava ekspresiju P-gp u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskom tračku kastriranih mužjaka obrađenih hormonom (slika 18A i B).

Western analizom USM izoliranih iz kore + vanjskog tračka bubrega utvrđeno je da je gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) ~140 kDa iz bubrega kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom značajno viša nego u kontrolnih mužjaka (slika 18C). Ovaj nalaz ukazuje da estradiol stimulira ekspresiju P-gp u vanjskom tračku a inhibira ekspresiju u kori.

U kastriranih životinja tretiranih progesteronom nije uočena razlika u odnosu na kontrolne životinje (rezultati nisu prikazani).



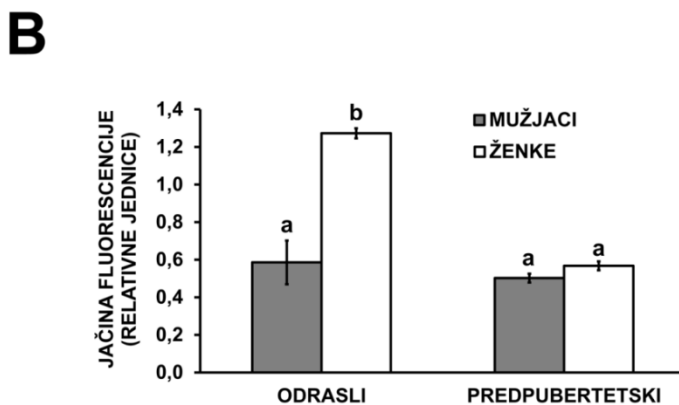
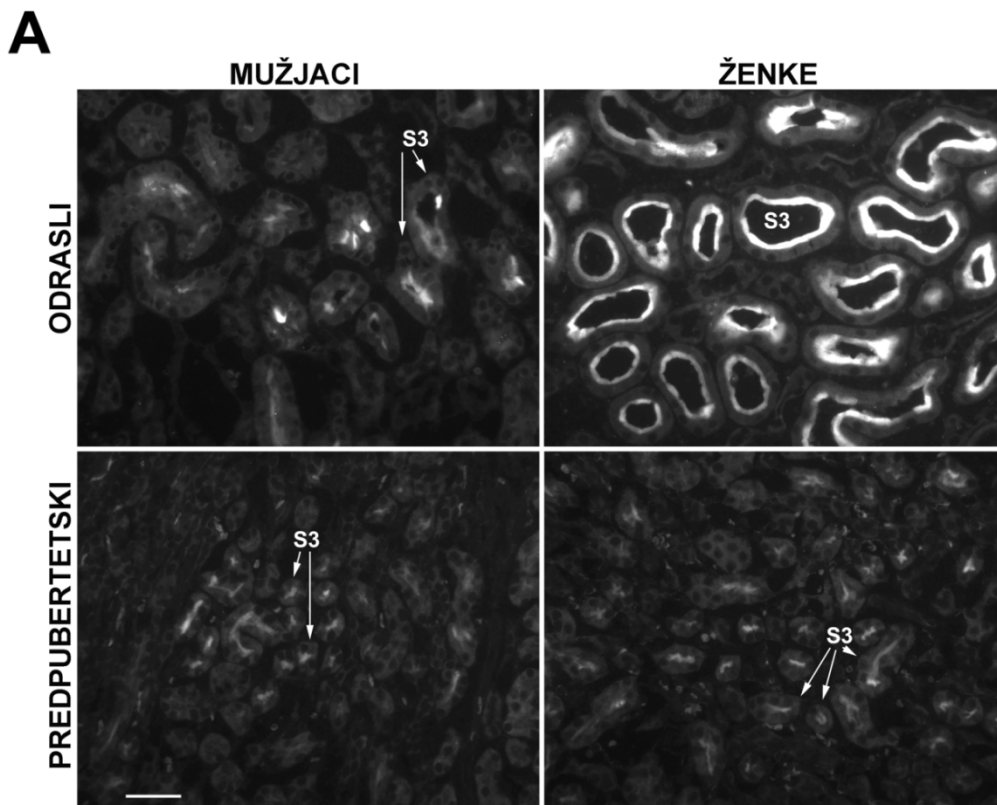
**Slika 18. Hormonska regulacija ekspresije P-gp u bubrezima; Učinak tretmana estradiolom u kastriranih mužjaka; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C). A:** Imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u kori i vanjskom tračku vanjske srži bubrega kastriranih mužjaka i kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom. Obojenje P-gp (strelice) u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskom tračku kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom jače je u odnosu na kastrirane životinje neobrađene hormonom. Za razliku od toga, obrada estradiolom smanjuje jačinu fluorescencije u kori. Mjera 40  $\mu$ m. **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije u četkastoj membrani proksimalnih kanalića pokazuje značajno slabiji intenzitet fluorescencije u kori estradiolom obrađenih životinja (~40%) u odnosu na životinje koje su samo kastrirane (\*\* prema kastraciji,  $P < 0.001$ ). Intenzitet fluorescencije u vanjskom tračku značajno je veći (~120%) u kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom u odnosu na samu kastraciju

(\*\* prema kastraciji,  $P < 0.001$ ). **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz kore + vanjskog tračka bubrega kastriranih mužjaka (KAS), i kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom (KAS+E) i denzitometrijsko mjerenje proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je jača u kastriranih mužjaka obrađenih estradiolom (KAS+E) u odnosu na kastrirane mužjake, prije (~300%) i nakon (~240%) normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* prema kastraciji,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu$ g proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje. G= glomerul; PK= proksimalni kanalić (S1/S2 S1= početni dio proksimalnog kanalića); S3= ravni odsječak proksimalnog

#### **4.3.4. Dobne razlike u ekspresiji Oat2 u bubrezima štakora**

U svrhu ispitivanja mogućih dobnih razlika u bubrezima štakora najprije smo željeli provjeriti funkcionalnost postojećeg modela. Stoga smo kao pozitivnu kontrolu na istim kriosekcijama imunocitokemijski obilježili Oat2, za koji je poznato da je podjednako slabo izražen u predpubertetskim životinjama, a u odraslih životinja pokazuje spolne razlike u korist ženki (Ljubojević i sur. 2007). Imunocitokemijsko obilježavanje Oat2 u ČM PK odraslih životinja pokazalo je jasne spolne razlike u vanjskom tračku u korist ženki, dok je obojenje P-gp u predpubertetskim životinjama obaju spolova bilo slabo i podjednakog intenziteta (slika 19), sukladno poznatim literaturnim podacima. Nakon ove potvrde funkcionalnosti našeg modela krenuli smo u ispitivanje mogućih dobnih i spolnih razlika u ekspresiji P-gp u bubrezima neonatalnih, predpubertetskih, odraslih i starih životinja.

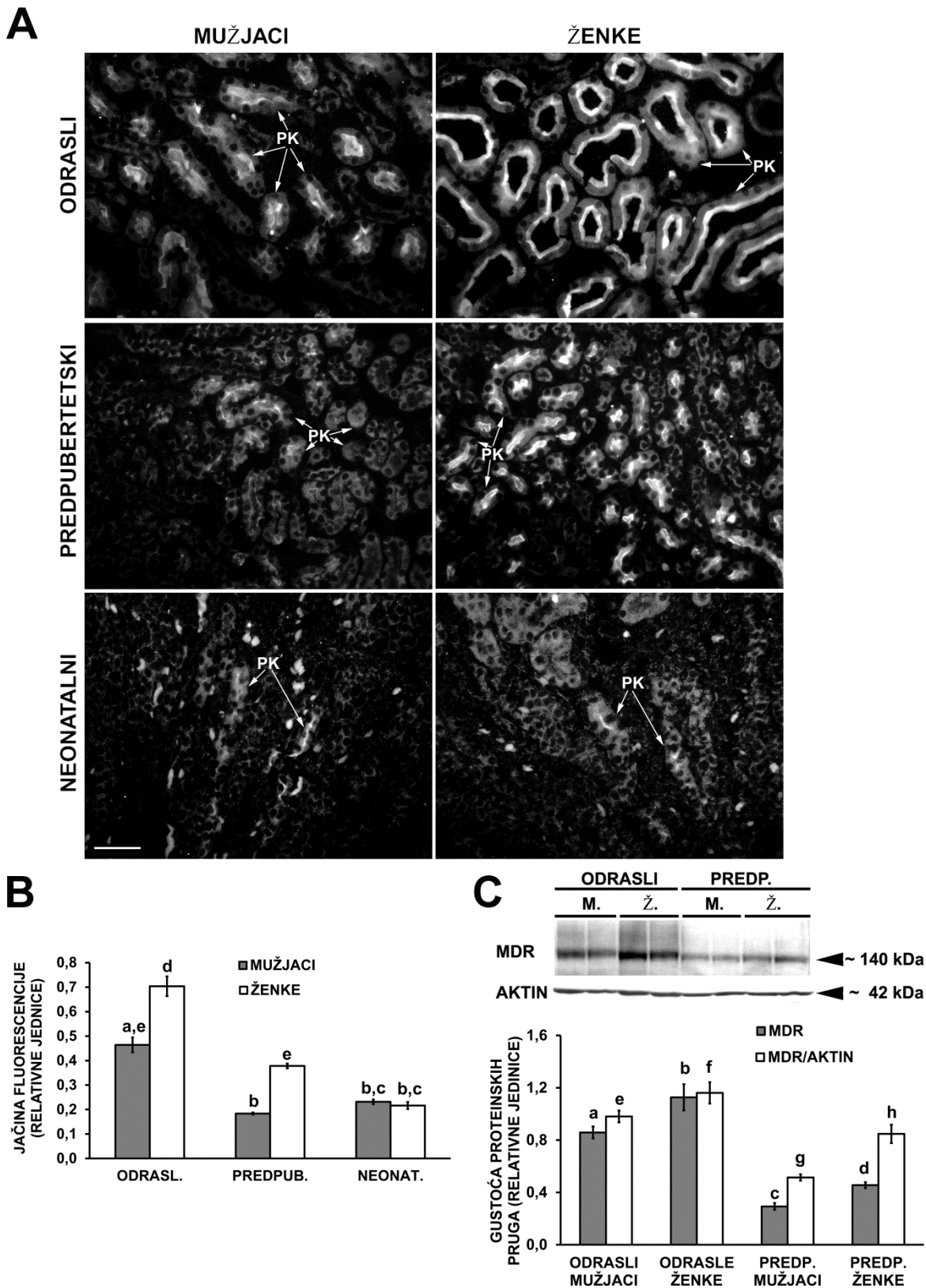




**Slika 19. Dobne razlike u ekspresiji Oat2 u bubrezima; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije Oat2 u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) i predpubertetskih (3 tjedna starih) životinja. A:** Imunocitokemijsko bojenje Oat2 u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskoj srži odraslih ženki značajno je jače nego u odraslih mužjaka. Bojenje Oat2 u predpubertetskih životinja obaju spolova je podjednako. Mjera 40  $\mu\text{m}$ . **B:** U predpubertetskim životinjama obaju spolova mjerenje intenziteta fluorescencije u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskoj srži pokazuje slab intenzitet fluorescencije (a : a, NS). Intenzitet fluorescencije značajno je jači u odraslih ženki u odnosu na odrasle mužjake (a : b,  $P < 0.001$ ). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje. S3= ravni odsječak proksimalnog kanalića

#### **4.3.5. Dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora**

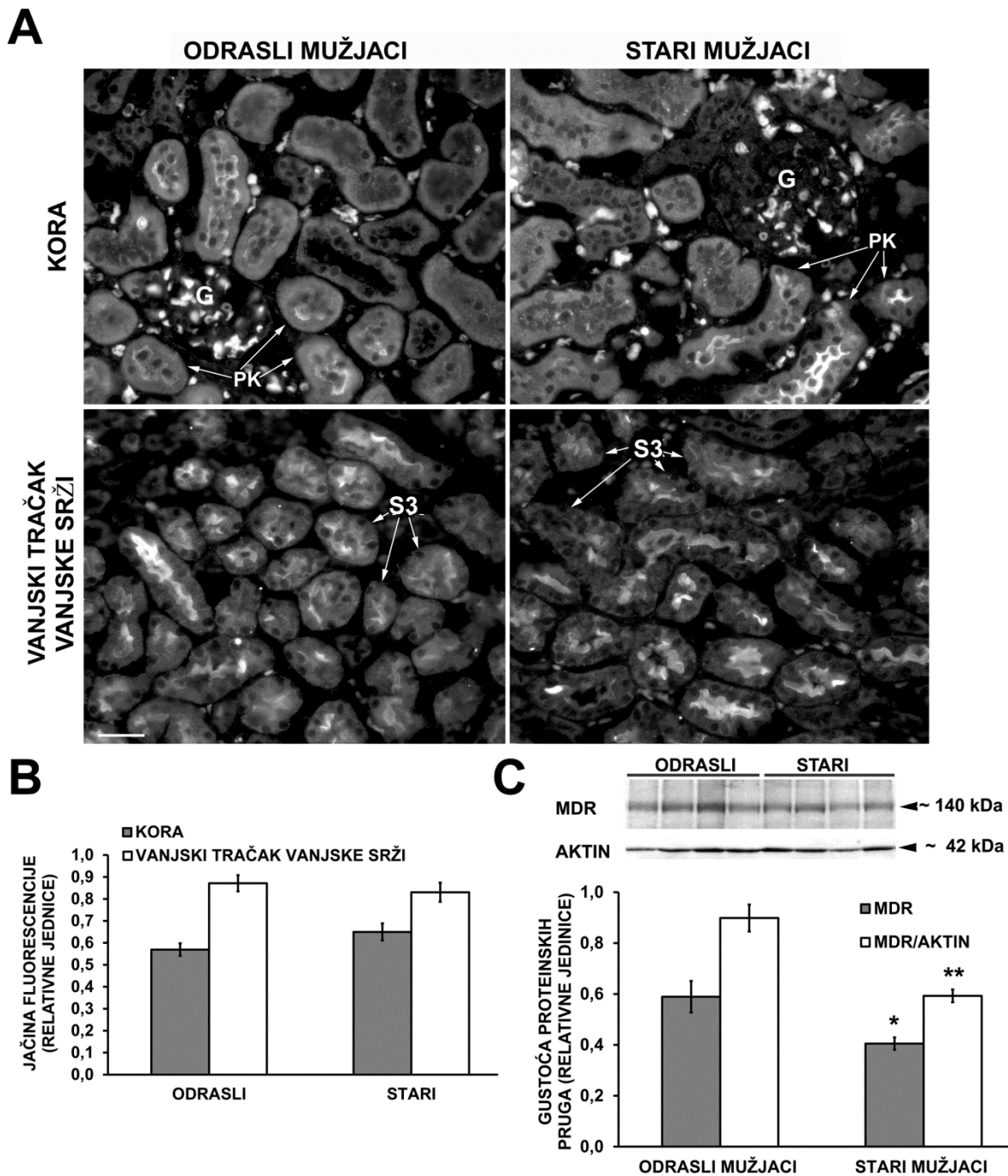
Imunocitokemijskim obilježavanjem P-gp u ČM PK bubrega utvrđeno je da je intenzitet fluorescencije jači u odraslih životinja u odnosu na predpubertetske i neonatalne. Također su uočene jasne spolne razlike u predpubertetskih i odraslih životinja u korist ženki (slika 20A). Intenzitet fluorescencije četkaste membrane proksimalnih kanalića neonatalnih životinja bio je podjednak u mužjaka i ženki (slika 20B). Western analizom USM bubrega odraslih i predpubertetskih životinja utvrđeno je da je proteinska pruga P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno viša u odraslih životinja u odnosu na predpubertetske mužjake i ženke, te da je jača i u odraslih i u predpubertetskih ženki u odnosu na mužjake (slika 20C).



Slika 20. Dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C) u bubrezima novorođenih (neonatalnih, 1 dan starih), predpubertetskih (3 tjedna starih) i odraslih (3 mjeseca starih) muških i ženskih štakora. A: Imunocitokemijsko bojanje P-gp u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskom tračku jače je u odraslih i predpubertetskih ženki u odnosu na mužjake. U neonatalnim životinjama bojenje u vanjskom

tračku je podjednako u mužjaka i ženki. Mjera 40  $\mu\text{m}$ . **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u vanjskom tračku pokazuje značajno veći intenzitet fluorescencije u odraslim mužjacima u odnosu na predpubertetske i neonatalne (a,e:b, a,e:b,c  $P < 0.001$ ; b:b,c  $P = \text{NS}$ ) dok je intenzitet fluorescencije u odraslim i predpubertetskim ženkama značajno veći u odnosu na neonatalne ženke (d:e, d:b,c,  $P < 0.001$ ; e:b,c,  $P < 0.05$ ). Postoje jasne razlike u intenzitetu fluorescencije između odraslih i predpubertetskih mužjaka i ženki (a,e:d, b:e,  $P < 0.001$ ). Nema razlike u intenzitetu fluorescencije između neonatalnih mužjaka i ženki (b,c:b,c  $P = \text{NS}$ ). **C:** Western analiza P-gp u USM iz kore + vanjskog tračka bubrega odraslih i predpubertetskih životinja te denzitometrijsko mjerenje proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je viša u odraslih životinja u odnosu na predpubertetske mužjake i ženke (a:c, b:d,  $P < 0.001$ ) prije (MDR) i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (e:g,  $P < 0.001$ ; f:h,  $P < 0.05$ ). Postoje jasne spolne razlike između odraslih mužjaka i ženki i predpubertetskih mužjaka i ženki prije (MDR) (a:b,  $P < 0.05$ ; c:d,  $P < 0.001$ ) i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (e:f,  $P < 0.05$ ; g:h,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje. PK= proksimalni kanalić

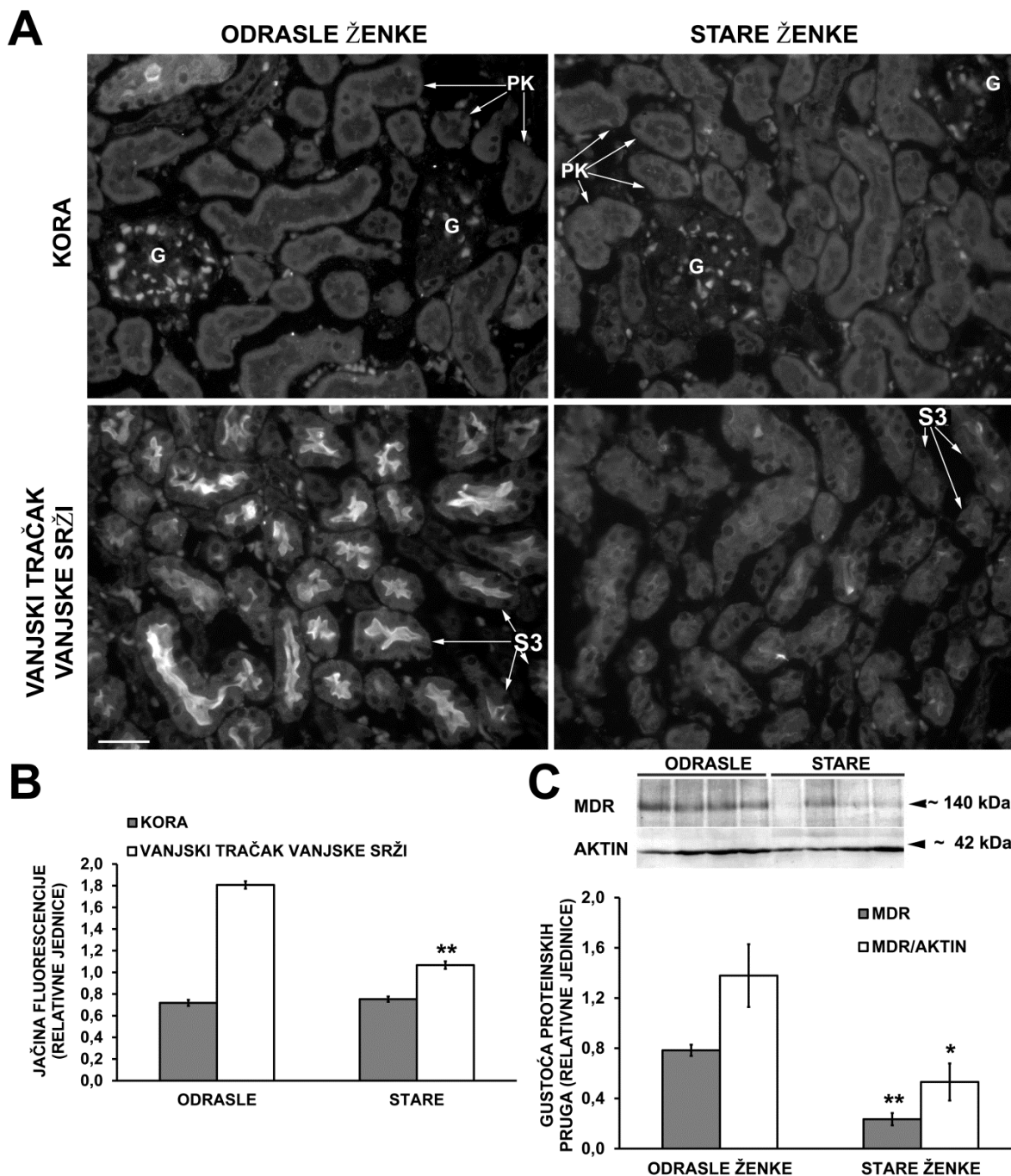
Imunocitokemijsko bojanje P-gp u ČM PK kore i vanjskog tračka podjednako je u odraslim i starim mužjacima, te nema razlike u intenzitetu fluorescencije (razlika nije statistički značajna) (slika 21A i B). Western analiza USM izoliranih iz kore + vanjskog tračka bubrega odraslih i starih mužjaka pokazala je da je gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa slabija u starim mužjacima u odnosu na odrasle mužjake. Razlika je još veća nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (slika 21C).



**Slika 21. Ekspresija P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) i starih (dvogodišnjih) mužjaka; Imunocitokemijski prikaz (A i B) u krioraescima i Western analiza u izoliranim USM (C). A:** Imunocitokemijsko bojenje P-gp u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u bubrezima podjednako je u kori i vanjskom tračku odraslih i starih mužjaka. Mjera 40  $\mu$ m. **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije četkaste membrane proksimalnih kanalića bubrega ne pokazuje razliku u intenzitetu fluorescencije u kori i vanjskom tračku između odraslih i starih mužjaka. **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz bubrega (kora + vanjski tračak) odraslih i starih mužjaka, te denzitometrijsko mjerenje istih proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge koja odgovara P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je niža u starim mužjacima u odnosu na odrasle mužjake, prije (MDR) (\* prema odraslim mužjacima,  $P < 0.05$ ) i nakon

normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* prema odraslim mužjacima,  $P < 0.001$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu\text{g}$  proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm\text{SE}$  od mjerenja u 4 životinje. G= glomerul; PK= proksimalni kanalić (S1/S2) (S1= početni dio proksimalnog kanalića); S3= ravni odsječak proksimalnog kanalića

U odraslih i starih ženki, imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u ČM PK u kori bilo je podjednako slabo. Za razliku od toga, ekspresija P-gp u vanjskom tračku starih ženki je značajno slabija u odnosu na odrasle ženke (slika 22A i B). Western analiza P-gp u uzorcima USM bubrega pokazala je da je relativna gustoća proteinske pruge koja odgovara P-gp (MDR) (~140 kDa) značajno slabija u starim ženkama u odnosu na odrasle (\*\* prema odraslim ženkama,  $P < 0.001$ ), kao i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\* prema odraslim ženkama,  $P < 0.05$ ) (slika 22C).



**Slika 22. Ekspresija P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) i starih (dvgodišnjih) ženki; Imunocitokemijski prikaz u krioraescima (A i B) i Western analiza u izoliranim USM (C). A:** Imunocitokemijsko bojenje P-gp u četkastoj membrani proksimalnih kanalića najjače je u vanjskom tračku vanjske srži odraslih ženki i smanjuje se starenjem. Bojenje u kori odraslih i starih ženki je podjednako slabo. Mjera 40  $\mu$ m. **B:** Mjerenje intenziteta fluorescencije u četkastoj membrani proksimalnih kanalića u bubrezima odraslih i starih ženki pokazuje značajno smanjenje intenziteta u vanjskom tračku starih ženki u odnosu na odrasle ženke (\*\* prema odraslim ženkama,  $P < 0.001$ ). Nema razlike u intenzitetu fluorescencije u kori odraslih i starih ženki. **C:** Western analiza P-gp u uzorcima USM iz kore + vanjskog tračka bubrega odraslih i starih ženki te denzitometrijska evaluacija proteinskih pruga. Relativna gustoća

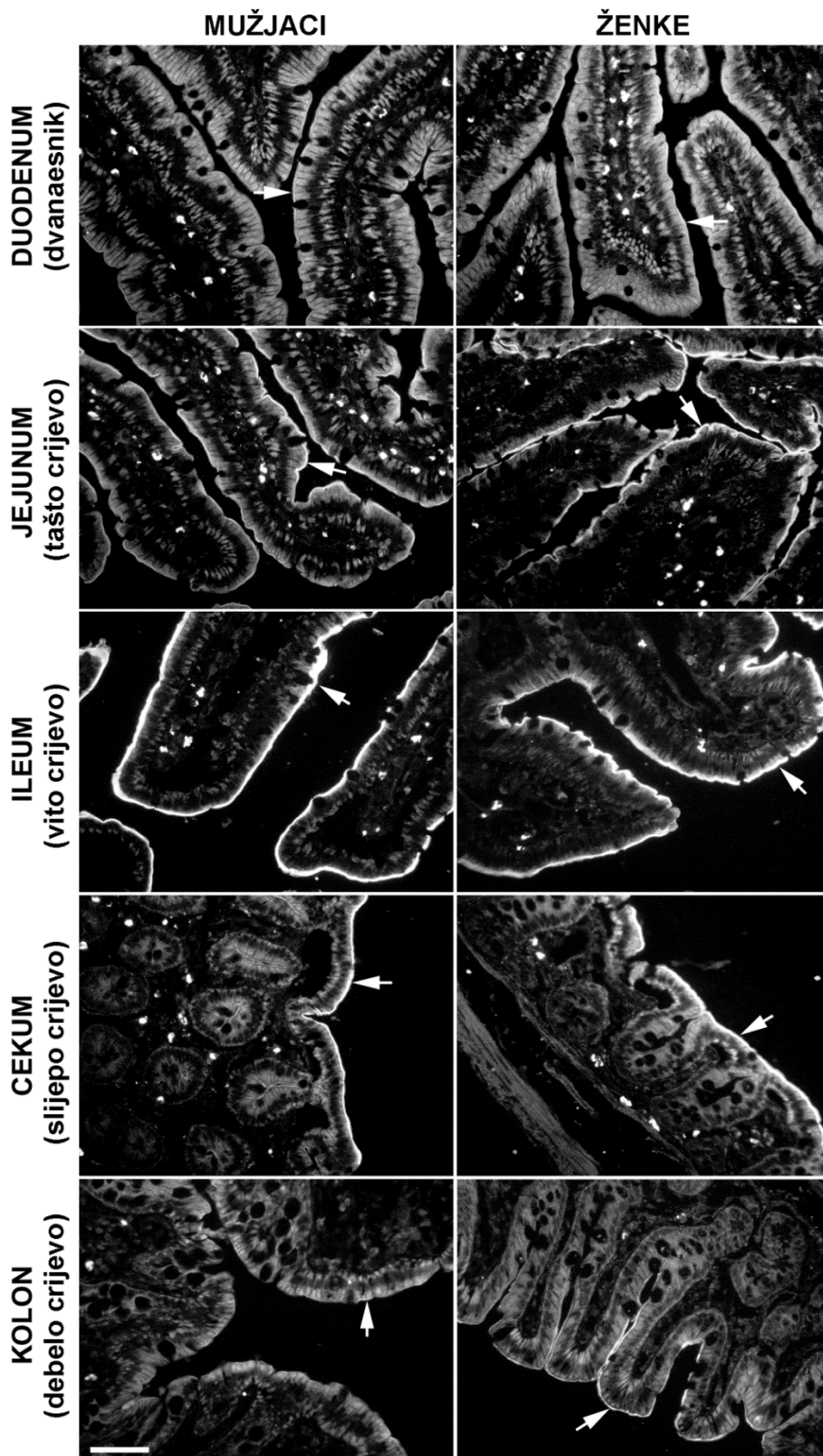
proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je niža u starim ženka u odnosu na odrasle ženke prije (\*\* prema odraslim ženka,  $P < 0.001$ ), kao i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\* prema odraslim ženka,  $P < 0.05$ ). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu$ g proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje. G= glomerul; PK= proksimalni kanalić (S1/S2) S1= početni dio proksimalnog kanalića); S3= ravni odsječak proksimalnog kanalića

#### **4.4. P-gp u probavnom traktu štakora**

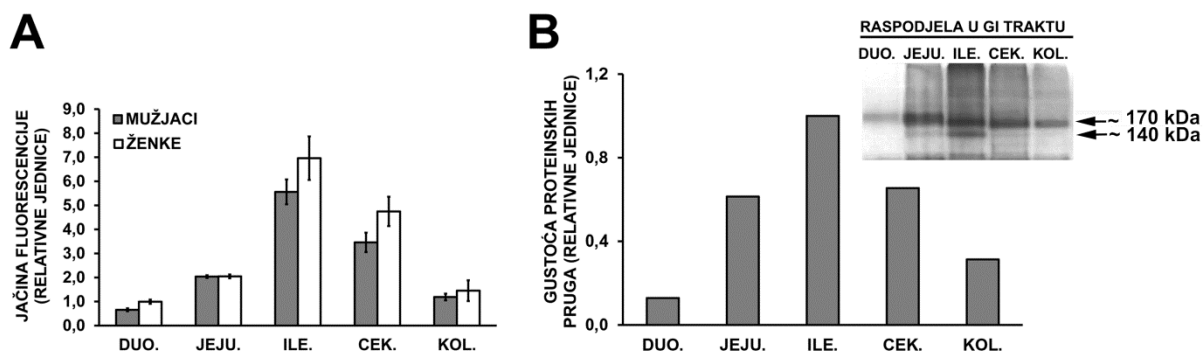
##### **4.4.1. Imunocitokemijska lokalizacija P-gp duž probavnog trakta**

U literaturi je opisano da ekspresija P-gp u crijevu raste od proksimalnih prema distalnim dijelovima u ljudi i životinja (Fojo 1987, Makhey i sur. 1998, Yumoto i sur. 1999, Stephens i sur. 2002, Ho i sur. 2003, Lin i sur. 2007, Mouly i Paine 2003, Fricker i sur. 1996). U svrhu određivanja smještaja P-gp duž probavnog trakta štakora, u ovom radu imunocitokemijom je ispitana lokalizacija u različitim odsječcima tankog i debelog crijeva. Rezultati imunofluorescencijske analize potvrdili su lokalizaciju P-gp u apikalnoj membrani enterocita tankog i debelog crijeva, te porast intenziteta bojenja od proksimalnih prema distalnim dijelovima, najviši je u ileumu, te se zatim opet smanjuje prema distalno (slika 23). Imunocitokemijom nisu utvrđene spolne razlike između mužjaka i ženki (slika 24A). Također, u Western analizi gustoća proteinske pruge koja odgovara P-gp rasla je od duodenuma prema ileumu, te se zatim opet smanjivala prema kolonu (slika 24B).





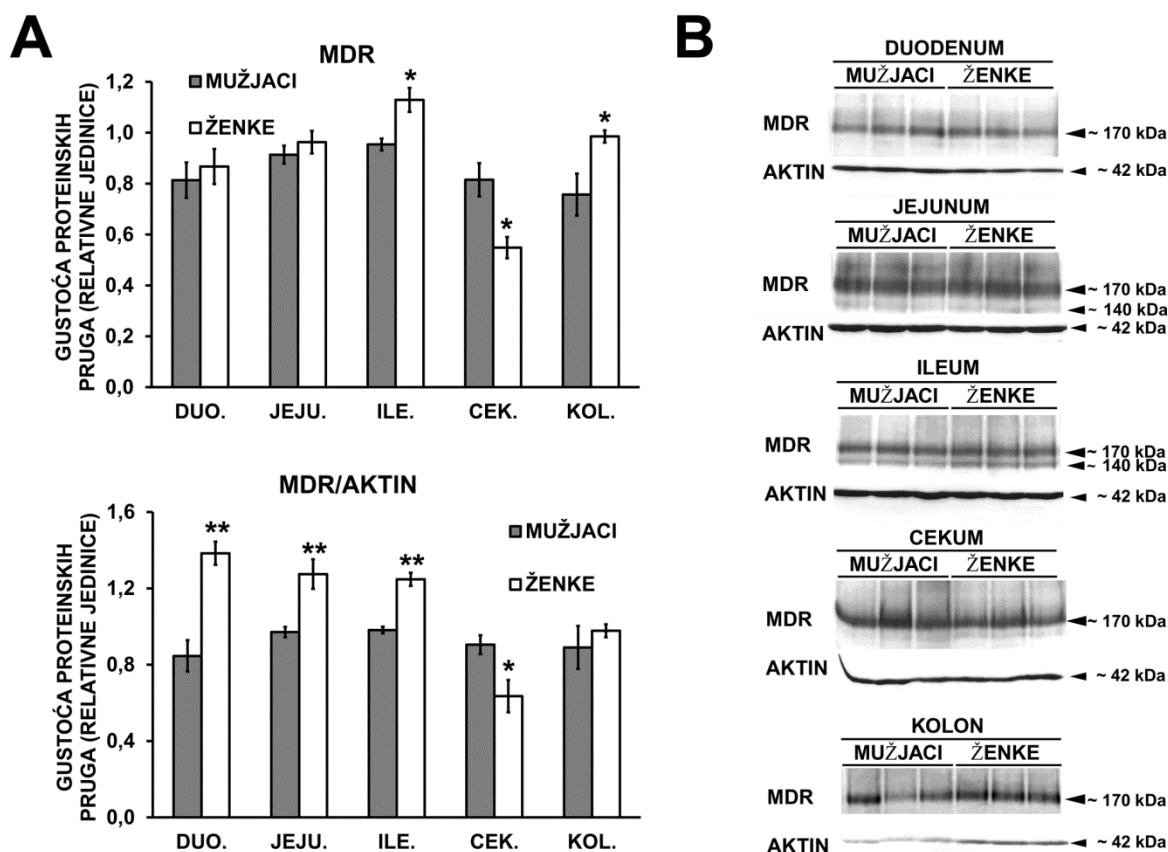
**Slika 23. Imunocitokemijska lokalizacija P-gp duž probavnog trakta.** U crijevu štakora P-gp (strelice) prisutan je u apikalnoj membrani enterocita u duodenumu, jejunumu, ileumu, cekumu i kolonu mužjaka i ženki. Intenzitet bojanja se pojačava od duodenuma prema ileumu gdje je najveći, potom slabi u cekumu i kolonu (duodenum < jejunum < ileum > cekum > kolon). Bojenje je podjednakog intenziteta u crijevu mužjaka i ženki. Mjera 40  $\mu$ m.



**Slika 24. Distribucija P-gp duž probavnog trakta; Intenzitet fluorescencije (A) P-gp i Western analiza (B) u probavnom traktu mušjaka i ženki. A:** Intenzitet fluorescencije apikalne membrane enterocita duž probavnog trakta mušjaka i ženki pokazuje najslabiji intenzitet u duodenumu te porast prema ileumu, u kojem je intenzitet fluorescencije najjači, nakon čega se opet smanjuje prema kolonu. Nema statistički značajne razlike u intenzitetu fluorescencije između mušjaka i ženki niti u jednom odsječku probavnog trakta. **B:** Western analiza P-gp u uzorcima USM izoliranih iz odsječaka probavnog trakta (duodenum, jejunum, ileum, cekum, kolon) mušjaka i denzitometrijska evaluacija proteinskih pruga. P-gp označava proteinsku prugu molekulske mase ~170 kDa u svim odsječcima, te dodatnu proteinsku prugu molekulske mase ~140 kDa u jejunumu i ileumu. Relativna gustoća proteinske pruge (mjerene su zajedno obje proteinske pruge: ~170 + ~140 kDa) raste od duodenuma prema ileumu, te se zatim opet postupno smanjuje u cekumu i kolonu. Svaka proteinska pruga sadrži 80 µg proteina.

#### 4.4.2. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u probavnom traktu štakora

Western analizom USM u različitim odsječcima probavnog trakta utvrđene su spolne razlike u ekspresiji P-gp (MDR) u korist ženki u ileumu i kolonu, te u cekumu u korist mušjaka. Prilikom normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) utvrđene su spolne razlike u korist ženki u duodenumu, jejunumu i ileumu, te u cekumu u korist mušjaka (slika 25A i B).



**Slika 25. Ekspresija P-gp u probavnom traktu mužjaka i ženki; Densitometrija (A) i Western analiza (B) u izoliranim ukupnim staničnim membranama.** **A:** Densitometrijskom evaluacijom proteinskih pruga utvrđena je statistički značajna razlika u relativnoj gustoći proteinske pruge P-gp (MDR) u ileumu i kolonu u korist ženki, te u mužjaka u cekumu (\* $P < 0.05$ ). Nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) značajno je viša u ženki u duodenumu, jejunumu i ileumu, dok je u cekumu viša u mužjaka (\*\* prema mužjacima  $P < 0.001$ ; \* prema mužjacima,  $P < 0.05$ ). Nema statistički značajne razlike u kolonu mužjaka i ženki ( $P=NS$ ). **B:** Western analiza P-gp u uzorcima USM izoliranim iz odsječaka probavnog trakta (duodenum, jejunum, ileum, cekum, kolon) mužjaka. U svim segmentima protutijelo za P-gp označava proteinsku prugu relativne mase ~170 kDa te dodatnu slabiju proteinsku prugu relativne mase ~140 kDa u jejunumu i ileumu. Gustoća proteinskih pruga jača je u ileumu i kolonu ženki, a slabija u cekumu u odnosu na mužjake. Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu$ g proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 3 životinje.

#### **4.4.3. Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u probavnom traktu štakora**

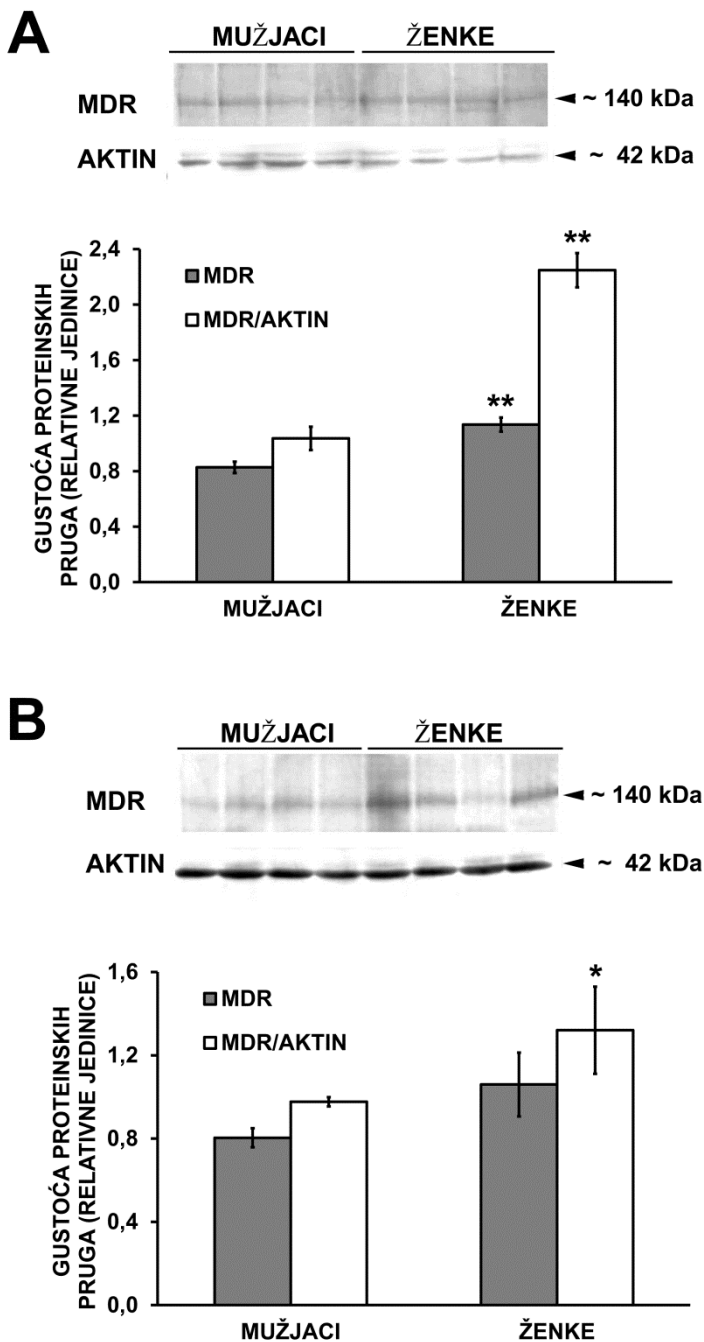
U probavnom traktu gonadektomiranih životinja rađeni su istovjetni pokusi (imunocitokemija i Western analiza) kao u jetri i bubrezima, no zbog velikog rasapa rezultata utjecaj gonadektomije na ekspresiju P-gp u pojedinim odsječcima crijeva nije utvrđen (rezultati nisu prikazani).

#### **4.5. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima miša**

Za razliku od čovjeka, dva gena su odgovorna za MDR-fenotip u miša i štakora: *mdr1a* i *mdr1b* (Devault i Gros 1990, Croop i sur. 1989, Schinkel i sur. 1997). Kao i u štakora, i u miša su spolne razlike u ekspresiji P-gp najviše istražene na razini mRNA. Tako je iz literature poznato da je ekspresija *mdr1a* i *mdr1b* u jetri i bubregu miša jača u ženki u odnosu na mužjake (Cui 2009).

U svrhu ispitivanja vrsnih razlika, odnosno sličnosti i razlika u ekspresiji P-gp između pretkliničkih vrsta, Western analizom smo ispitali ekspresiju P-gp u USM izoliranim iz jetre i bubrega miša.

Rezultati Western analize USM izoliranih iz jetre (slika 26A) mužjaka i ženki miša pokazali su da je ekspresija P-gp veća u ženki prije (MDR) i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN), dok je ekspresija u USM izoliranim iz bubrega bila jača u ženki samo nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (slika 26B).



**Slika 26. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima miša; Western analiza USM izoliranih iz jetre (A) i bubrega (B).** **A:** Western analiza P-gp u ukupnim staničnim membranama izoliranim iz jetre miša i denzitometrijska evaluacija proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je viša u jetri ženki u odnosu na mužjake prije i nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\*\* $P < 0.001$  u odnosu na mužjake). **B:** Western analiza P-gp u ukupnim staničnim membranama izoliranim iz bubrega miša i denzitometrijska evaluacija proteinskih pruga. Relativna gustoća proteinske pruge P-gp (MDR) od ~140 kDa značajno je viša u bubrezima ženki u odnosu na mužjake nakon normalizacije na aktin (MDR/AKTIN) (\* $P < 0.05$  u odnosu na mužjake). Aktinu-odgovarajuća proteinska pruga od 42 kDa služila je kao kontrola. Svaka proteinska pruga sadrži 80  $\mu$ g proteina i predstavlja uzorak dobiven izolacijom ukupnih

staničnih membrana iz zasebne životinje. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$ SE od mjerenja u 4 životinje.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Prikaz P-gp imunokemijskim metodama

U svrhu detaljnog istraživanja spolnih i dobnih razlika u ekspresiji P-gp u tkivnim narescima i u ukupnim staničnim membranama izoliranim iz jetre, iz kore i vanjskog tračka bubrega i iz crijeva intaktnih i gonadektomiranih štakora te štakora bez i nakon obrade spolnim hormonima, kao i u životinja različite starosti, u pokusima u ovom radu koristila sam komercijalno monoklonsko protutijelo za P-gp (klon C219) koje u Western analizi prepoznaje proteinske pruge molekulske mase ~170 kDa (MDR1 P-gp) i ~140 kDa (vjerojatno neglikozilirani oblik MDR1 P-gp).

Imunocitokemijskom analizom potvrdila sam lokalizaciju P-gp u kanalikularnoj membrani hepatocita, ČM proksimalnih kanalića bubrega i apikalnoj membrani enterocita tankog i debelog crijeva.

Western analizom u uzorcima ČM iz bubrega čovjeka P-gp je obilježen kao proteinska pruga od ~170 kDa. Ova relativna molekulska masa proteina odražava glikozilirani oblik P-gp. Za razliku od toga, u ispitivanjima na ČM i USM iz bubrega štakora, kao i u USM iz jetre štakora, protutijelo za P-gp obilježilo je proteinsku prugu od ~140 kDa. Ova proteinska pruga najvjerojatnije odgovara neglikoziliranoj formi P-gp. U različitim odsječcima crijeva, protutijelo za P-gp obilježilo je proteinsku prugu od ~170 kDa, te dodatnu proteinsku prugu molekulske mase ~140 kDa u jejunumu i ileumu. Prisustvo proteinskih pruga različite molekulske mase u pojedinim odsječcima crijeva i nalaz dviju proteinskih pruga u jejunumu i ileumu, govori u prilog različitoj tkivno specifičnoj glikozilaciji i prisutnosti proteina sa različitim razinama glikozilacije u jejunumu i ileumu.

### 5.2. Spolne razlike u ekspresiji P-gp

Poznato je nekoliko primjera gdje razlika u farmakokinetici i farmakodinamici lijekova ovisi o spolu. Ove razlike su relevantne za učinkovitost i sigurnosni profil brojnih lijekova u humanoj i veterinarskoj medicini (Gandhi M i sur. 2004, Schuetz i sur. 1995, Salphati i Benet 1998). P-gp, produkt MDR1 gena, jedan je od najvažnijih staničnih transportnih proteina. Ima široku tkivnu

distribuciju i veliki broj supstrata (Matheny i sur. 2004). Zbog glavne uloge ovog prijenosnika u dispoziciji lijekova, potencijalne spolne razlike u njegovoj ekspresiji i aktivnosti važna su determinanta kliničke učinkovitosti određene terapije.

### **5.2.1. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora**

Imunokemijske studije u ovom radu potvrdile su već opisane spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri u korist ženki. U daljnjim pokusima, u kojima su korišteni gonadektomirani štakori, utvrđeno je da su opisane spolne razlike posljedica inhibicijskog učinka androgena, dok ženski spolni hormoni nisu pokazali značajnije djelovanje. Nalaz inhibicijskog djelovanja testosterona u skladu je s rezultatima Suzuki i sur. (2006), koji su Western analizom pokazali značajno višu ekspresiju P-gp u jetri ženki štakora u odnosu na mužjake, koja se nakon sedmodnevnog tretmana testosteronom smanjila na razinu ekspresije u mužjaka uz odgovarajuće smanjenje hepatobilijarnog klirensa doksorubicina. Nadalje, ovi rezultati su u skladu s već opisanim djelovanjem endogenih i sintetskih estrogena na ekspresiju P-gp mRNA, međutim opisani inhibicijski učinak progesterona na P-gp-posredovan transport tvari u eksperimentalnim modelima *in vitro* i *in vivo* (Frochlich i sur. 2004) nije uočen na proteinskoj razini, Western analizom USM jetre u pokusima u ovom radu.

### **5.2.2. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora**

Za razliku od jetre, spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora do sada nisu podrobno istražene; jedini poznati nalazi odnose se na razinu ekspresije *mdr1a* i *mdr1b*. Imunokemijske studije u ovom radu jasno su pokazale spolne razlike u korist mužjaka u kori, te u korist ženki u vanjskom tračku vanjske srži bubrega, što je i pokazatelj jasnih zonskih razlika u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora. Nalaz jače ekspresije P-gp u kori mužjaka u skladu je s rezultatima microarray analize u kori štakora (Sabolić i sur. 2007). U daljnjim pokusima, u kojima su korišteni gonadektomirani štakori, utvrđeno je da su opisane spolne razlike u vanjskom tračku vanjske srži posljedica stimulacijskog učinka ženskih spolnih hormona, dok androgeni nisu imali značajniji utjecaj na ekspresiju P-gp u kori i vanjskom tračku. Utjecaj estrogena detaljno je istražen u kastriranih mužjaka obrađenih hormonom. U tretiranih mužjaka estrogen je u kori značajno smanjio ekspresiju, dok se u vanjskom tračku vanjske srži pod utjecajem estrogena ekspresija P-



gp povećala. U pokusima u ovom radu utvrđene su jasne zonske i spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubregu štakora, te različita regulacija ekspresije u kori i vanjskom tračku bubrega.

### **5.3. P-gp u probavnom traktu štakora**

#### **5.3.1. Distribucija P-gp u tankom i debelom crijevu**

Poznato je da u crijevu ekspresija P-gp raste od proksimalnih prema distalnim dijelovima u ljudi i životinja (Fojo 1987, Makhey i sur. 1998, Yumoto i sur. 1999, Stephens i sur. 2002, Ho i sur. 2003, Lin i sur. 2007, Mouly i Paine 2003, Fricker i sur. 1996). Ekspresija se također mijenja ovisno o životnom ciklusu enterocita, pa tako slabo diferencirane stanice u crijevnim kriptama imaju malu ekspresiju P-gp. Ekspresija raste kako se stanice pomiču prema gore te je ekspresija najviša u zrelih, diferenciranim stanicama na vršku resice (Thiebaut i sur. 1987, Freeman 1995).

S druge strane, pokazano je da je razina P-gp mRNA u crijevu čovjeka najviša u jejunumu, i smanjuje se prema distalnijim dijelovima (Berggren i sur. 2007). Također, aktivnost P-gp bila je najviša u distalnom jejunumu miša (Ogihara i sur. 2006).

Wada i suradnici (2013) su detaljno istražili ekspresiju i aktivnost P-gp u tankom crijevu štakora. Maksimalna vrijednost P-gp mRNA utvrđena je u proksimalnom i distalnom (terminalnom) ileumu. Što se tiče proteina P-gp, najviša ekspresija je Western analizom utvrđena u srednjem ileumu. U skladu s tim i aktivnost P-gp bila je najviša u srednjem ileumu.

U ovom radu imunocitokemijskom i Western analizom potvrđena je najslabija ekspresija P-gp u duodenumu, te porast prema ileumu u kojem je ekspresija najjača, nakon čega se opet smanjuje prema kolonu (duodenum < jejunum < ileum > cekum > kolon).

#### **5.3.2. Spolne razlike u ekspresiji P-gp u probavnom traktu štakora**

Potter i suradnici (2004) objavili su da je kod žena ekspresija P-gp u enterocitima crijeva niža nego u muškaraca, dok Paine i suradnici nisu našli razlike u ekspresiji između muškaraca i žena (Pine i sur. 2005). Slično, Maclean i suradnici pokazali su da u štakora nema spolnih razlika

u ekspresiji P-gp u različitim dijelovima crijeva (Maclean i sur. 2008). Međutim, *ex-vivo* ispitivanje spolnih razlika u aktivnom prijenosu iveramektina (supstrat za P-gp) u distalnom jejunumu i ileumu ženki i mužjaka Wistar štakora pokazalo je jače nakupljanje u crijevu ženki. Inkubacija u prisutnosti inhibitora P-gp, PSC833, povećala je nakupljanje iveramektina u životinja obaju spolova, s tim da je značajnija promjena zapažena u crijevu mužjaka (Ballent i sur. 2011). Slični rezultati dobiveni su u *in-vivo* ispitivanju dispozicije iveramektina u crijevu mužjaka i ženki Wistar štakora (Lifschitz i sur. 2006).

U ovom radu, imunocitokemijskom analizom različitih odsječaka tankog i debelog crijeva štakora spolne razlike u ekspresiji P-gp nisu utvrđene. Za razliku od toga, Western analizom USM izoliranih iz duodenuma, jejunuma, ileuma, cekuma i kolona utvrđene su spolne razlike u ileumu i kolonu u korist ženki, te u cekumu u korist mužjaka, a nakon normalizacije na aktin spolne razlike u korist ženki prisutne su i u duodenumu i jejunumu.

Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u različitim odsječcima probavnog trakta mužjaka i ženki nije utvrđen zbog velikog rasapa rezultata.

#### **5.4. Dobne razlike u ekspresiji P-gp**

Poznavanje ontogeneze sistema odgovornih za distribuciju i eliminaciju lijekova važno je za unaprjeđenje dizajna studija toksičnosti u štakora te pravilnu interpretaciju rezultata ovih studija. Novorođenčad se općenito smatra više osjetljivom na ksenobiotike od odraslih, što bi dijelom moglo biti zbog manje učinkovitog metabolizma i transporta lijekova (Cui i sur. 2009). Dodatno, djeca imaju jedinstven metabolički put u usporedbi s odraslima. Na primjer, različite izoforme enzima citokrom P450 pronađene su u djece i odraslih ljudi (Tateishi i sur. 1997). S obzirom da su dosadašnje spoznaje o ontogenezi P-gp u štakora oprečne, u ovom radu ispitivana je ontogeneza štakorskog P-gp u neonatalnih (1 dan starih), predpubertetskih (3 tjedna starih), odraslih (3 mjeseca starih), i starih (dvogodišnjih) štakora u jetri i bubrezima u svrhu boljeg razumijevanja

prijenosa lijekova u štakora različite dobi te što točnije interpretacije rezultata studija toksičnosti u mladih životinja.

#### **5.4.1. Dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora**

U kriosekcijama jetre, imunocitokemijskim obilježavanjem P-gp u neonatalnih, predpubertetskih i odraslih mužjaka i ženki utvrđene su jasne dobne razlike. Ekspresija P-gp bila je najjača u neonatalnih životinja te se smanjivala prema odrasloj dobi (neonatalni > predpubertetski > odrasli). Western analizom USM iz jetre potvrđena je statistički značajna razlika u korist predpubertetskih i neonatalnih mužjaka i ženki u odnosu na odrasle. U mužjaka je najviša ekspresija u USM uočena u neonatalnih životinja kao i u ženki nakon normalizacije na aktin. Ovi rezultati u suprotnosti su sa prije objavljenim rezultatima Rosati i sur. (2003) koji Western analizom nisu dokazali ekspresiju P-gp u jetri tek rođenih Wistar štakora, dok je ekspresija u 15-dnevnih štakora bila niža u odnosu na 60-dnevne životinje. Nadalje, imunocitokemijom i Western analizom utvrđena je jača ekspresija P-gp u jetri starih (dvogodišnjih) životinja u odnosu na odrasle (3 mjeseca stare) mužjake i ženke. Ovaj nalaz u skladu je sa rezultatima Warrington i sur. (2004) u mužjaka štakora Fischer-344, koji su pokazali Western analizom da ekspresija P-gp u jetri štakora raste od odrasle dobi i najviša je u dvogodišnjih životinja.

#### **5.4.2. Dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora**

U bubrezima, imunocitokemijom je utvrđeno da je ekspresija P-gp u ČM proksimalnih kanalića najjača u odraslih životinja, u odnosu na predpubertetske i neonatalne. Ovaj rezultat suprotan je od nalaza Hodorove i sur. (2011), koji su pokazali imunocitokemijskom analizom da je ekspresija P-gp u bubrezima štakora Wistar relativno konstantna od rođenja do odrasle dobi. Western analizom USM iz bubrega odraslih i predpubertetskih životinja utvrđeno ja da je ekspresija P-gp značajno jača u odraslih životinja u odnosu na predpubertetske mužjake i ženke. Ovaj rezultat je također suprotan do sada objavljenim rezultatima grupe autora, koja je pokazala porast ekspresije P-gp u bubrezima Sprague-Dawley štakora do 26 dana starosti i potom smanjenje do razine u odraslih životinja u 42. danu (de Zwart i sur. 2008).

Osim dobnih razlika u ekspresiji P-gp, u ovom istraživanju uočene su jasne spolne razlike u korist ženki u predpubertetskih i odraslih životinja.

Do sada je za većinu testiranih bubrežnih prijenosnika poznato da je ekspresija na proteinskoj razini i/ili njihove mRNA (Oat1, Oat2, Oat3, Oat5, Oct2, Mrp3, Mrp4) bila niska i slična u mužjaka i ženki prije puberteta, a spolne razlike utvrđene su nakon puberteta (Sabolić i sur. 2007). Kao kontrola uočenih spolnih razlika u ekspresiji P-gp u predpubertetskih životinja (ženke > mužjaci) poslužilo je imunocitokemijsko obilježavanje Oat2 u istim kriosekcijama. Poznato je da je Oat2 jednako izražen u predpubertetskim životinjama obaju spolova a u odraslih životinja pokazuje spolne razlike u korist ženki (Ljubojević i sur. 2007). Dobiveno bojanje bilo je u skladu sa poznatim literaturnim podacima.

Poznato je da serumska koncentracija testosterona u štakora pada od 8-24 dana nakon rođenja, a zatim brzo raste između 35. i 55. dana starosti (Ketelslegers i sur. 1978). Međutim, postoji vršak u serumskoj koncentraciji testosterona u mužjaka u 17., 19. i 20. danu života (Miyachi i sur. 1973), stoga bi nalaz spolnih razlika u predpubertetskih životinja, odnosno jača ekspresija P-gp u ČM proksimalnih kanalića u ženki, mogla govoriti u prilog inhibicijskom djelovanju testosterona u predpubertetskih mužjaka.

U starih mužjaka, imunocitokemijskim obilježavanjem P-gp u ČM proksimalnih kanalića nije uočena razlika u odnosu na odrasle životinje, dok je Western analiza USM iz kore i vanjskog tračka pokazala smanjenje ekspresije u starosti. Ovaj rezultat u skladu je sa istraživanjem u Fischer-344 štakora gdje je pokazano da se starenjem ekspresija P-gp u bubrezima smanjuje (Warrington i sur. 2004). U starih ženki, imunocitokemija je pokazala da se ekspresija smanjila u vanjskom tračku u odnosu na odrasle, također i u Western analizi u USM iz kore i vanjskog tračka.

Ovaj nalaz, kao i uočene zonske razlike, ukazuju da je ekspresija P-gp drugačije regulirana u mužjaka i ženki te u kori i vanjskom tračku bubrega. Moguće je da je smanjenje ekspresije u starijih ženki posljedica gubitka stimulacijskog učinka estrogena te upućuje na mogući veći rizik za razvoj nefrotoksičnosti u starijih ženki štakora u odnosu na odrasle životinje.

## 5.5. Razlike među vrstama

Osim spolnih i dobrih razlika u ekspresiji P-gp, razlike među vrstama su vrlo važne za razumijevanje i translaciju rezultata pretkliničkih studija, te predviđanje farmakokinetičkih parametara potencijalnih terapijskih kandidata u ljudi. S obzirom da su u glodavaca dva gena odgovorna za fenotip MDR, *mdr1a* i *mdr1b*, u ovom radu ispitali smo sličnosti u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima miša i štakora.

U miša su opisane spolne razlike u jetri i bubrezima u korist ženki na razini ekspresije *mdr1a* i *mdr1b* mRNA (Cui i sur. 2009). Rezultati dobiveni Western analizom u ovom radu također pokazuju višu ekspresiju P-gp u USM izoliranim iz jetre i bubrega miša ženki. Ovaj rezultat također je sukladan s nalazom u USM izoliranim iz jetre i bubrega štakora.

Općenito, vrsne razlike u ekspresiji prijenosnika lijekova su vrlo malo istražene, osobito na proteinskom nivou. Izazov je postojeća znanja iz pretkliničkih istraživanja koristiti za predviđanje djelovanja prijenosnika na apsorpciju i distribuciju lijeka, te na interakcije između lijekova. Stoga je potrebno bolje razumijevanje vrstnih razlika u ekspresiji i funkciji prijenosnika u svrhu translacije nalaza iz pretkliničkih vrsta na ljude.

U zaključku, u pokusima u ovom radu, utvrđene su spolne razlike u ekspresiji P-gp u štakora na proteinskoj razini u jetri, duodenumu, jejunumu, ileumu, kolonu i u vanjskom tračku bubrega u korist ženki, te u cekumu i kori bubrega u korist mužjaka. Općenito, uočen je inhibicijski utjecaj androgena, te stimulacijski učinak estrogena na ekspresiju P-gp u jetri i bubrezima. Nadalje, utvrđene su dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima štakora različitih dobrih skupina, te su opisane spolne razlike u predpubertetskih životinja u bubrezima. Utvrđene su i jasne zonske razlike u ekspresiji P-gp u kori i vanjskom tračku bubrega.

Rezultati ovog istraživanja mogu pomoći u razumijevanju mogućih razlika u farmakokinetici ispitivanih lijekova u štakora različitog spola i dobi. Međutim, iz svega opisanog razvidno je da spolne i dobne razlike utvrđene u jednom tkivu ne moraju odgovarati ekspresiji u drugom tkivu ili

organu, ili u drugoj vrsti. Uz to, djelovanje endogenih i egzogenih steroida na proteinsku regulaciju i funkciju, zajednička ekspresija P-gp i drugih enzima, kao i drugi čimbenici uključivo dob, istovremeno primijenjeni lijekovi i način ishrane, ukazuju na potrebu dodatnih istraživanja da bi se utvrdio značaj uočenih spolnih i dobnih razlika i mogućnosti translacije na čovjeka.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Imunocitokemijskom analizom utvrđena je lokalizacija P-gp u kanalikularnoj membrani hepatocita, u četkastoj membrani (ČM) proksimalnih kanalića u kori i vanjskom tračku bubrega te u apikalnoj membrani enterocita tankog i debelog crijeva štakora.
2. U Western analizi protutijelo za P-gp obilježilo je proteinsku prugu Mr ~140 kDa u ukupnim staničnim membranama (USM) izoliranim iz jetre i bubrega štakora i proteinsku prugu Mr ~170 kDa (glikozilirani oblik P-gp) u USM izoliranim iz različitih odsječaka crijeva (duodenum, jejunum, ileum, cekum, kolon) te proteinsku prugu Mr ~140 kDa (neglikozilirani oblik P-gp) u jejunumu i ileumu.
3. U jetri štakora utvrđene su spolne razlike u ekspresiji P-gp u korist ženki. U gonadektomiranih životinja utvrđen je inhibicijski učinak androgena, dok ženski spolni hormoni nisu imali značajan utjecaj, što ukazuje na androgene kao glavne regulatore (inhibitore) jetrene ekspresije P-gp. Progesteron nije utjecao na ekspresiju P-gp u jetri.
4. U bubrezima štakora utvrđene su zonske i spolne razlike u korist mužjaka u kori te u korist ženki u vanjskom tračku. U gonadektomiranih životinja utvrđen je stimulacijski učinak ženskih spolnih hormona na ekspresiju P-gp u vanjskom tračku, dok androgeni nisu imali utjecaja na ekspresiju P-gp u bubrezima. U kastriranih mužjaka tretiranih ženskim spolnim hormonima uočen je inhibicijski učinak estrogena u kori te stimulacijski učinak u vanjskom tračku, ukazujući na estrogene kao glavne regulatore ekspresije P-gp u bubrezima. Progesteron nije utjecao na ekspresiju P-gp u bubrezima.
5. U odsječcima probavnog trakta štakora utvrđen je slijedeći obrazac ekspresije: duodenum < jejunum < ileum > cekum > kolon. Western analizom USM utvrđene su spolne razlike u ekspresiji P-gp u duodenumu, jejunumu, ileumu i kolonu u korist ženki te u cekumu u korist mužjaka. U gonadektomiranih životinja nije uočen utjecaj spolnih hormona zbog velike varijabilnosti rezultata.

6. U jetri su utvrđene dobne razlike u ekspresiji P-gp sa slijedećim obrascem: novorođeni (1 dan) > predpubertetski (3 tjedna) > odrasli (3 mjeseca) < stari (2 godine).
7. U bubrezima su utvrđene dobne razlike u ekspresiji P-gp sa slijedećim obrascem: novorođeni < predpubertetski < odrasli > stari.
8. Postojanje spolnih i dobnih razlika u ekspresiji P-gp u glavnim (re)apsorpcijskim i sekrecijskim organima u štakora ukazuje na heterogenost njihovih funkcija, što može bitno utjecati na procjenu transporta, međudjelovanja i toksičnosti različitih lijekova i drugih ksenobiotika, na pojavu rezistencije na lijekove i druge pojave u eksperimentalnim, pretkliničkim/ translacijskim istraživanjima u kojima se ovi glodavci rabe u velikom broju.



## 7. LITERATURA

- [1] Anselmo AC, Mitragotri S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *J Control Release*. 2014 Sep 28;190:15-28.
- [2] Avdeef A. *Absorption and Drug Development*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience/J. Wiley, 2003.
- [3] Bebawy M, Chetty M. Gender differences in p-glycoprotein expression and function: effects on drug disposition and outcome. *Curr Drug Metab*. 2009 May;10(4):322-8.
- [4] Behravan J, Piquette-Miller M. Drug transport across the placenta, role of the ABC drug efflux transporters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2007 Dec;3(6):819-30.
- [5] Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, Schrenk D, Lennernäs H. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol Pharm*. 2007 Mar-Apr;4(2):252-7.
- [6] Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H. A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Oct 2;647(2):169-76.
- [7] Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J*. 2005 Feb 16;7(1):E1-5.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-254.
- [9] Burger D, van der Heiden I, la Porte C, van der Ende M, Groeneveld P, Richter C, Koopmans P, Kroon F, Sprenger H, Lindemans J, Schenk P, van Schaik R. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*. 2006 Feb;61(2):148-54.
- [10] Canaparo R, Finnström N, Serpe L, Nordmark A, Muntoni E, Eandi M, Rane A, Zara GP. Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Nov;34(11):1138-44.
- [11] Cascorbi I. P-glycoprotein: Tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. U: Fromm M.F., Kim R.B. ur. *Drug transporters, Handbook of experimental pharmacology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. p. 261-294.
- [12] Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol*. 2006 Oct;22(3):400-10.
- [13] Chai X, Zeng S, Xie W. Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013 Mar;9(3):253-66.

- [14] Chandler B, Detsika M, Khoo SH, Williams J, Back DJ, Owen A. Factors impacting the expression of membrane-bound proteins in lymphocytes from HIV-positive subjects. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep;60(3):685-9.
- [15] Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood.* 1992 Dec 1;80(11):2735-9.
- [16] Chu X, Bleasby K, Evers R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013 Mar;9(3):237-52.
- [17] Coles LD, Lee IJ, Voulalas PJ, Eddington ND. Estradiol and progesterone-mediated regulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR). *Mol Pharm.* 2009 Nov-Dec;6(6):1816-25.
- [18] Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990 Sep;38(9):1277-87.
- [19] Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, Housman DE. The three mouse multidrug resistant (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissue. *Mol Cell Biol.* 1989; 9:1346–1350.
- [20] Csajka C, Marzolini C, Fattinger K, Décosterd LA, Telenti A, Biollaz J, Buclin T. Population pharmacokinetics of indinavir in patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep;48(9):3226-32.
- [21] CSPT History of Pharmacology. Dostupno s URL: <https://pharmacologycanada.org/history-of-pharmacology-therapeutics>. Pristupljeno: 22. studenog 2014.
- [22] Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, Klaassen CD. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jan;37(1):203-10.
- [23] Cummins CL, Jacobsen W, Benet LZ. Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Mar;300(3):1036-45.
- [24] de Zwart L, Scholten M, Monbaliu JG, Annaert PP, Van Houdt JM, Van den Wyngaert I, De Schaepdrijver LM, Bailey GP, Coogan TP, Coussement WC, Mannens GS. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. *Reprod Toxicol.* 2008 Nov-Dec;26(3-4):220-30.
- [25] del Moral RG, Olmo A, Aguilar M, O'Valle F. P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol.* 1998 Mar-Apr;6(2):89-97.

- [26] Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, et al. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1996;23:904–8.
- [27] Devault A, Gros P. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol.* 1990 Apr;10(4):1652-63.
- [28] Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, van Waarde A. PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des.* 2004;10(13):1493-503.
- [29] Eraly SA, Blantz RC, Bhatnagar V, Nigam SK. Novel aspects of renal organic anion transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003 Sep;12(5):551-8.
- [30] Fedoruk MN, Giménez-Bonafé P, Guns ES, Mayer LD, Nelson CC. P-glycoprotein increases the efflux of the androgen dihydrotestosterone and reduces androgen responsive gene activity in prostate tumor cells. *Prostate.* 2004 Apr 1;59(1):77-90.
- [31] Fletcher CV, Jiang H, Brundage RC, Acosta EP, Haubrich R, Katzenstein D, Gulick RM. Sex-based differences in saquinavir pharmacology and virologic response in AIDS Clinical Trials Group Study 359. *J Infect Dis.* 2004 Apr 1;189(7):1176-84.
- [32] Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jan;84(1):265-9.
- [33] Fortuna A, Alves G, Falcão A (2011) In vitro and In vivo Relevance of the P-glycoprotein Probe Substrates in Drug Discovery and Development: Focus on Rhodamine 123, Digoxin and Talinolol. *J Bioequiv Availab S2.* doi: 10.4172/jbb.S2-001
- [34] Freeman TC. Parallel patterns of cell-specific gene expression during enterocyte differentiation and maturation in the small intestine of the rabbit. *Differentiation.* 1995 Oct;59(3):179-92.
- [35] Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C. Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br J Pharmacol.* 1996 Aug;118(7):1841-7.
- [36] Fröhlich M, Albermann N, Sauer A, Walter-Sack I, Haefeli WE, Weiss J. In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins. *Biochem Pharmacol.* 2004 Dec 15;68(12):2409-16.
- [37] Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Aug;25(8):423-9.

- [38] Fujise H, Annoura T, Sasawatari S, Ikeda T, Ueda K. Transepithelial transport and cellular accumulation of steroid hormones and polychlorobiphenyl in porcine kidney cells expressed with human P-glycoprotein. *Chemosphere*. 2002 Mar;46(9-10):1505-11.
- [39] Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:499-523.
- [40] Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):14581-7.
- [41] Goralski KB, Hartmann G, Piquette-Miller M, Renton KW. Downregulation of *mdr1a* expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. *Br J Pharmacol*. 2003 May;139(1):35-48.
- [42] Gould SJ. *Ontogeny and Phylogeny*. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press, 1977.
- [43] Greer DA, Ivey S. Distinct N-glycan glycosylation of P-glycoprotein isolated from the human uterine sarcoma cell line MES-SA/Dx5. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Sep;1770(9):1275-82.
- [44] Gohel M. Novel drug delivery approaches to bypass p-glycoprotein efflux pump. Dostupno na URL:<http://www.pharmainfo.net/reviews/novel-drug-delivery-approaches-bypass-p-glycoprotein-efflux-pump>
- [45] Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, Lockhart PB, Patton LL, Porter S, Thornhill MH. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 Jan;64(1):16-28.
- [46] Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci*. 1992 Jan;17(1):18-21.
- [47] Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut*. 2003 May;52(5):759-66.
- [48] Hodorova I, Mihalik J, Vecanova J, Dankova M, Rybarova S. Renal Ontogeny of P-Glycoprotein/MDR1 in Rat. *Acta Medica Martiniana*. 2011 ;11(1):23-27.
- [49] Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Administration strategies for proteins and peptides. *Int J Pharm*. 2014 Dec 30;477(1-2):578-589.
- [50] Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. *Clin Liver Dis* 2000;4:753–63.
- [51] Jancis EM, Carbone R, Loechner KJ, Dannies PS. Estradiol induction of rhodamine 123 efflux and the multidrug resistance pump in rat pituitary tumor cells. *Mol Pharmacol*. 1993 Jan;43(1):51-6.
- [52] Janneh O, Jones E, Chandler B, Owen A, Khoo SH. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir

- in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Nov;60(5):987-93.
- [53] Jones K, Bray PG, Khoo SH, Davey RA, Meaden ER, Ward SA, Back DJ. P-Glycoprotein and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance? *AIDS.* 2001 Jul 27;15(11):1353-8.
- [54] Ketelslegers JM, Hetzel WD, Sherins RJ, Catt KJ. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology.* 1978 Jul;103(1):212-22.
- [55] Kochwesi J, Schechter P. "Schmiedeberg in Strassburg 1872–1918: The making of modern pharmacology". *Life Sciences.* 1978; 22 (13–15): 1361–1371.
- [56] König J, Müller F, Fromm MF. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev.* 2013 May 17;65(3):944-66.
- [57] Krecic-Shepard ME, Barnas CR, Slimko J, Jones MP, Schwartz JB. Gender-specific effects on verapamil pharmacokinetics and pharmacodynamics in humans. *J Clin Pharmacol.* 2000 Mar;40(3):219-30.
- [58] Krecic-Shepard ME, Barnas CR, Slimko J, Schwartz JB. Faster clearance of sustained release verapamil in men versus women: continuing observations on sex-specific differences after oral administration of verapamil. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Sep;68(3):286-92.
- [59] Kvackajová-Kisucká J, Barancík M, Breier A. Drug transporters and their role in multidrug resistance of neoplastic cells. *Gen Physiol Biophys.* 2001 Sep;20(3):215-37.
- [60] Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol.* 2006;103(3):p97-106.
- [61] Lee MR. William Withering (1741-1799): A Birmingham Lunatic. *Proc R Coll Physicians Edinb.* 2001 ;31:77-83.
- [62] Lifschitz A, Ballent M, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C. Sex-related differences in the gastrointestinal disposition of ivermectin in the rat: P-glycoprotein involvement and itraconazole modulation. *J Pharm Pharmacol.* 2006 Aug;58(8):1055-62.
- [63] Ligon B. Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004 ;15(1): 52–7.
- [64] Lin Y, Shen Q, Katsumi H, Okada N, Fujita T, Jiang X, Yamamoto A. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol Pharm Bull.* 2007 Jul;30(7):1301-7.
- [65] Locher KP. Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Jan 27;364(1514):239-45.

- [66] Löscher W. Molecular mechanisms of drug resistance in status epilepticus. *Epilepsia*. 2009 Dec;50 Suppl 12:19-21.
- [67] Lu H, Klaassen C. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug Metab Dispos*. 2008 Jan;36(1):16-23.
- [68] Ljubojević M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G, Sabolić I. Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jan; 292(1):F361-72.
- [69] MacLean C, Moenning U, Reichel A, Fricker G. Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in male and female rats. *Drug Metab Dispos*. 2008 Jul;36(7):1249-54.
- [70] Makhey VD, Guo A, Norris DA, Hu P, Yan J, Sinko PJ. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm Res*. 1998 Aug;15(8):1160-7.
- [71] Mariana B, Adrián L, Guillermo V, Juan S, Laura M, Carlos L. Gender-related differences on P-glycoprotein-mediated drug intestinal transport in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2011 May;63(5):619-26.
- [72] Matheny CJ, Ali RY, Yang X, Pollack GM. Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues. *Drug Metab Dispos*. 2004 Sep;32(9):1008-14.
- [73] Miyachi Y, Nieschlag E, Lipsett MB. The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat. *Endocrinology*. 1973 Jan;92(1):1-5.
- [74] Mouly S, Paine MF. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res*. 2003 Oct;20(10):1595-9.
- [75] N'Da DD. Prodrug Strategies for Enhancing the Percutaneous Absorption of Drugs. *Molecules*. 2014 Dec 12;19(12):20780-20807.
- [76] Ogihara T, Kamiya M, Ozawa M, Fujita T, Yamamoto A, Yamashita S, Ohnishi S, Isomura Y. What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil with vinblastine. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006 Jun;21(3):238-44.
- [77] Otten H. "Domagk and the development of the sulphonamides". *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1986; 17 (6): 689–696.
- [78] Oude Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch*. 2007 Feb;453(5):601-10.
- [79] Pai MP, Schriever CA, Diaz-Linares M, Novak RM, Rodvold KA. Sex-related differences in the pharmacokinetics of once-daily saquinavir soft-gelatin capsules boosted with low-dose

ritonavir in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Pharmacotherapy*. 2004 May;24(5):592-9.

- [80] Paine MF, Ludington SS, Chen ML, Stewart PW, Huang SM, Watkins PB. Do men and women differ in proximal small intestinal CYP3A or P-glycoprotein expression? *Drug Metab Dispos*. 2005 Mar;33(3):426-33.
- [81] Pavek P, Smutny T. Nuclear receptors in regulation of biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier. *Drug Metab Rev*. 2014 Feb;46(1):19-32.
- [82] Piekarczyk RL, Cohen D, Horwitz SB. Progesterone regulates the murine multidrug resistance *mdr1b* gene. *J Biol Chem*. 1993 Apr 15;268(11):7613-6.
- [83] Potter JM, McWhinney BC, Sampson L, Hickman PE. Area-under-the-curve monitoring of prednisolone for dose optimization in a stable renal transplant population. *Ther Drug Monit*. 2004 Aug;26(4):408-14.
- [84] Raju, TN. "The Nobel chronicles. 1939: Gerhard Domagk (1895-1964)". *Lancet*. 1999; 353 (9153): 681–620.
- [85] Reading C, Cole M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977; 11 (5): 852–7.
- [86] Rosati A, Maniori S, Decorti G, Candussio L, Giraldi T, Bartoli F. Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. *Dev Growth Differ*. 2003 Aug;45(4):377-87.
- [87] Sabolić I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G. Gender differences in kidney function. *Pflugers Arch*. 2007 Dec;455(3):397-429.
- [88] Salphati L, Benet LZ. Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P450 3A inducers in male and female rat livers. *Biochem Pharmacol*. 1998 Feb 15;55(4):387-395.
- [89] Santos Cavaiola T, Edelman S. Inhaled insulin: a breath of fresh air? A review of inhaled insulin. *Clin Ther*. 2014 Aug 1;36(8):1275-89.
- [90] Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 21;55(1):3-29.
- [91] Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):4028-33.
- [92] Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 1996 Feb;49(2):311-8.

- [93] Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Nov;275(2):1011-8.
- [94] Sharom FJ. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Front Oncol.* 2014 Mar 3;4:41.
- [95] Sharom FJ. Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem Cell Biol.* 2006 Dec;84(6):979-92.
- [96] Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 2011 Sep 7;50(1):161-78.
- [97] Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):451-62.
- [98] Stephens RH, Tanianis-Hughes J, Higgs NB, Humphrey M, Warhurst G. Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a(-/-)* mouse intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Dec;303(3):1095-101.
- [99] Stewart PA, Béliveau R, Rogers KA. Cellular localization of P-glycoprotein in brain versus gonadal capillaries. *J Histochem Cytochem.* 1996 Jul;44(7):679-85.
- [100] Storch V, Welsch U, Wink M. *Evolutionsbiologie.* Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 2007.
- [101] Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T. Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci.* 2006 Jun 27;79(5):455-61.
- [102] Svirnovski AI, Shman TV, Serhiyenka TF, Savitski VP, Smolnikova VV, Fedasenka UU. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology.* 2009 Aug;14(4):204-12.
- [103] Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S. A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci.* 1997;61(26):2567-74.
- [104] The INN crowd. Editorial. *Nature Biotechnology.* 2013; 31(12 (1055)):155.
- [105] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(21):7735-8.
- [106] Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jan;304(1):223-8.



- [107] Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24248-52.
- [108] Ufer M, Häslér R, Jacobs G, Haenisch S, Lächelt S, Faltraco F, Sina C, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S, Cascorbi I. Decreased sigmoidal ABCB1 (P-glycoprotein) expression in ulcerative colitis is associated with disease activity. *Pharmacogenomics*. 2009 Dec;10(12):1941-53.
- [109] Unschuld PU. *Huang Di nei jing su wen: Nature, Knowledge, Imagery in an Ancient Chinese Medical Text*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press. 2003.
- [110] van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, Feller N, Dekker H, Lankelma J, Giaccone G. Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Br J Cancer*. 1993 Feb;67(2):284-9.
- [111] von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivistö KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Mar;75(3):172-83.
- [112] Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog*. 1995 Jul;13(3):129-34.
- [113] Wani M, Taylor H, Wall M, Coggon P, McPhail A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 1971; 93 (9): 2325–7.
- [114] Warrington JS, Greenblatt DJ, von Moltke LL. The effect of age on P-glycoprotein expression and function in the Fischer-344 rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 May;309(2):730-6.
- [115] Yumoto R, Murakami T, Nakamoto Y, Hasegawa R, Nagai J, Takano M. Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Apr;289(1):149-55.
- [116] Zakeri-Milani P, Valizadeh H. Intestinal transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014 Jun;10(6):859-71.
- [117] Zhang H, Zhang J, Streisand JB. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(9):661-80.
- [118] Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(3):159-68.
- [119] Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem*. 2011 Sep 7;50(1):43-61.

## 8. POPIS KRATICA

ABC	eng. <i>adenosine triphosphate-binding cassette</i>
ANOVA	analiza varijance
ATP	adenozin trifosfat
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
BLM	bazolateralna membrana
BCRP	eng. <i>breast cancer resistance protein</i>
BSA	albumin goveđeg seruma
BSEP	eng. <i>bile salt export pump</i>
C	cekum
CAR	konstitutivni androstanski receptor
CP	citratni pufer
CYP450	citokromi P450
ČM	četkaste membrane
D	duodenum
DAM-CY3	magareće protutijelo protiv mišjeg imunoglobulina klase G obilježeno fluorescencijskom bojom CY3
E	estrogen
G	glomerul
GAMAP	kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom
GAR-CY3	kozje protutijelo protiv kunićjeg imunoglobulina klase G obilježeno fluorescencijskom bojom CY3
GF	glomerularna filtracija
GI	gastrointestinalni
HIV	virus humane imunodeficijencije
HMG-CoA	3-hidroksi-metilglutaril-koenzim A
I	ileum
IgG	imunoglobulin klase G
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	jejunum
K	kolon
KAS	kastracija
kDa	kilodalton
M	mužjaci
MATE	eng. <i>multidrug and toxin extrusion</i>
MDR	eng. <i>multidrug resistance protein</i>
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
MRP	eng. <i>multidrug-resistance-associated protein</i>
OATP	eng. <i>organic anion-transporting polypeptide</i>
OCT	eng. <i>organic cation transporter</i>
PBS	fosfatni pufer
P-gp	glikoprotein P
PK	proksimalni kanalić
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluorid
PXR	pregnanski receptor X
S (1, 2, 3)	odsječak proksimalnih kanalića
S1	početni dio proksimalnog kanalića
S3	ravni odsječak proksimalnog kanalića
SDS	natrij-dodecilsulfat
SDS-PAGE	natrij dodecil sulfat elektroforeza u gelu poliakrilamida
SE	standardna pogreška
SLC	eng. <i>solute carriers</i>
SŽS	središnji živčani sustav

TAE	tris-acetat-etilendiamin tetraoctena kiselina
TEMED	tetra-metil-etilen-diamin
USM	ukupne stanične membrane
Ž	ženke
βME	β-merkaptoletanol

## 9. POPIS ILUSTRACIJA

**Tablica 1.** Sustavan prikaz podrijetla i zastupljenosti lijekova u suvremenoj farmakologiji.

**Tablica 2.** Sustavan pregled biljnih izvora lijekova, te njihov farmakološki učinak.

**Tablica 3.** Korijen/sufiks lijeka definira farmakološko djelovanje i klasu lijeka.

**Tablica 4.** Pregled najvažnijih supstrata P-gp.

**Slika 1.** Shematski prikaz stanične membrane.

**Slika 2.** Prijenosnici lijekova u različitim tipovima epitelnih stanica.

**Slika 3.** Struktura glikoproteina P.

**Slika 4.** Najvažniji organi i lokalizacija P-gp u membranama.

**Slika 5.** Shematski prikaz vezivanja ATP i izbacivanja supstrata iz stanice uz pomoć transportnog mehanizma P-gp.

**Slika 6.** Određivanje optimalnih uvjeta za imunocitokemijsko obilježavanje P-gp u jetri štakora.

**Slika 7.** Određivanje optimalnih uvjeta za Western analizu P-gp u uzorcima četkastih membrana iz bubrega čovjeka i štakora te ukupnih staničnih membrana štakora.

**Slika 8.** Prikaz optimalnih uvjeta za imunocitokemijsko obilježavanje i Western analizu P-gp u ileumu štakora.

**Slika 9.** Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) i Western analiza (C).

**Slika 10.** Učinak gonadektomije na ekspresiju P-gp u jetri odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C i D) u jetri odraslih životinja i učinak gonadektomije.

**Slika 11.** Estrogenska stimulacija ekspresije P-gp u jetri odraslih štakora.

**Slika 12.** Dobne razlike u ekspresiji P-gp u jetri štakora mužjaka (M) i ženki (Ž); Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C) u jetri neonatalnih (novorođenih, 1 dan starih), predpubertetskih (3 tjedna starih) i odraslih (3 mjeseca starih) životinja.

**Slika 13.** Razlike u ekspresiji P-gp u jetri odraslih (3 mjeseca starih) i starih (dvogodišnjih) štakora mužjaka (M) i ženki (Ž); Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C).

**Slika 14.** Spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C).

**Slika 15.** Zonske i spolne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) štakora; Western analiza P-gp u uzorcima USM izoliranih iz kore (A) i vanjskog tračka vanjske srži (B) bubrega mužjaka i ženki, te denzitometrijsko mjerenje istih proteinskih pruga.

**Slika 16.** Učinak kastracije na ekspresiju P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) štakora mužjaka; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C).

**Slika 17.** Učinak ovarijektomije na ekspresiju P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) ženskih štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C).

**Slika 18.** Hormonska regulacija ekspresije P-gp u bubrezima; Učinak tretmana estradiolom u kastriranih mužjaka; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C).

**Slika 19.** Dobne razlike u ekspresiji Oat2 u bubrezima; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije Oat2 u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) i predpubertetskih (3 tjedna starih) životinja.

**Slika 20.** Dobne razlike u ekspresiji P-gp u bubrezima štakora; Imunocitokemijski prikaz (A i B) ekspresije P-gp i Western analiza (C) u bubrezima novorođenih (neonatalnih, 1 dan starih, predpubertetskih (3 tjedna starih) i odraslih (3 mjeseca starih) muških i ženskih štakora.

**Slika 21.** Ekspresija P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) i starih (dvogodišnjih) mužjaka; Imunocitokemijski prikaz (A i B) u krionaescima i Western analiza u izoliranim USM (C).

**Slika 22.** Ekspresija P-gp u bubrezima odraslih (3 mjeseca starih) i starih (dvogodišnjih) ženki; Imunocitokemijski prikaz u krionaescima (A i B) i Western analiza u izoliranim USM (C).

**Slika 23.** Imunocitokemijska lokalizacija P-gp duž probavnog trakta.

**Slika 24.** Distribucija P-gp duž probavnog trakta; Intenzitet fluorescencije (A) P-gp i Western analiza (B) u probavnom traktu mužjaka i ženki.

**Slika 25.** Ekspresija P-gp u probavnom traktu mužjaka i ženki; Denzitometrija (A) i Western analiza (B) u izoliranim ukupnim staničnim membranama.

**Slika 26.** Spolne razlike u ekspresiji P-gp u jetri i bubrezima miša; Western analiza USM izoliranih iz jetre (A) i bubrega (B).

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

---

Ime i prezime: **Jana Ivković** (rođena Dupor)  
Datum i mjesto rođenja: 18.02.1977., Zadar  
Mjesto stanovanja: Zagreb  
E-pošta: [jana\\_dupor@yahoo.com](mailto:jana_dupor@yahoo.com)

### OBRAZOVANJE

---

2011. – 2015. Poslijediplomski doktorski studij „Medicinska kemija“  
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

2003. – 2006. Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina“  
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

2003. Državni ispit

1995. – 2002. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci  
Doktor medicine

### RADNO ISKUSTVO

---

07.2015. – Teva Pharmaceuticals Europe B.V.  
Medicinski savjetnik

04.2014. – 06.2015. Teva Pharmaceuticals Europe B.V.  
Viši specijalist za kliniku

06.2013. – 03.2014. Teva Pharmaceuticals Europe B.V.  
Specijalist za kliniku

09.2011. – 06.2013. Novartis Hrvatska d.o.o.  
Viši medicinski savjetnik

07.2007. – 08.2011. Novartis Hrvatska d.o.o.  
Medicinski savjetnik, Zamjenik odgovorne osobe za  
Farmakovigilanciju

06.2006. – 07.2007. Pliva Hrvatska d.o.o.  
Kordinator terapeutskog područja

03.2004. – 12.2004. Sveučilište u Milanu, Mario Negri Institut  
Gostujući znanstvenik

04.2002. – 06.2006. Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet  
Znanstveni novak – asistent

### ZNANSTVENI RADOVI

---

#### Radovi u časopisima indeksiranim u bazama podataka *Current Contents*:

1. Herak-Kramberger CM, Breljak D, Ljubojević M, Matokanović M, Lovrić M, Rogić D, Brzica H, Vrhovac I, Karaica D, Micek V, **Dupor JI**, Brown D, Sabolić I. Sex-dependent expression

of water channel AQP1 along the rat nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):F809-21.

2. Gusić N, Ivković A, VaFaye J, Vukasović A, **Ivković J**, Hudetz D, Janković S. Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review. *Int Orthop*. 2014 Sep;38(9):1877-84.
3. Martinez de la Torre Y, Buracchi C, Borroni EM, **Dupor J**, Bonecchi R, Nebuloni M, Pasqualini F, Doni A, Lauri E, Agostinis C, Bulla R, Cook DN, Haribabu B, Meroni P, Rukavina D, Vago L, Tedesco F, Vecchi A, Lira SA, Locati M, Mantovani A. Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2319-2324.
4. Laskarin G, Cupurdija K, Tokmadzic VS, Dorcic D, **Dupor J**, Juretic K, Strbo N, Crncic TB, Marchezi F, Allavena P, Mantovani A, Randic Lj, Rukavina D. The presence of functional mannose receptor on macrophages at the materno-fetal interface. *Hum Reprod*. 2005;20(4):1057-1066.
5. de la Torre YM, Locati M, Buracchi C, **Dupor J**, Cook DN, Bonecchi R, Nebuloni M, Rukavina D, Vago L, Vecchi A, Lira SA, Mantovani A. Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy receptor D6. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1342-1346.
6. Bogovic Crncic T, Laskarin G, Juretic K, Strbo N, **Dupor J**, Srsen S, Randic Lj, Le Bouteiller Ph, Tabiasco J, Rukavina D. Perforin and Fas/FasL Cytolytic Pathways at the Maternal-Fetal Interface. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54(5):241-248.

#### **Radovi u časopisima indeksiranim u bazama podataka *Science Citation Index*:**

1. Pećina M, **Ivković J**, Pećina-Cicvara T, Ivković A. Orthogeriatrics – considerations in caring for older orthopaedic patient. // *Periodicum biologorum*. 4 (2013); 527-533.

#### **Poglavlje u knjizi:**

1. Sršen Medančić S, Juretić Franković K, Veljković D, Laškarin G, **Dupor J**, Rukavina D. Cytolytic and apoptotic signalling pathways at the maternal-fetal interface // *Embryo implantation: from basics to clinics / Rukavina, Daniel; Chaouat, Gerard (ur.)*. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, 2006. Str. 119-131.