

Uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 i magesekk-, tynntarm- og leverprøver fra overvektige personer

Solveig Vist



Mastergradsoppgave i farmasi
Farmasøytisk Institutt
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2010

Uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 i magesekk-, tynntarm- og leverprøver fra overvektige personer

Solveig Vist



Mastergradsoppgave i farmasi
Farmasøytisk Institutt
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO
Mai 2010

Veiledere:

Professor Hege Christensen, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt
Professor Anders Åsberg, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt

FORORD

Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Hege Christensen og professor Anders Åsberg. Arbeidet ble påbegynt august 2009 og avsluttet mai 2010.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Hege Christensen og Anders Åsberg. Dere har begge bidratt med deres solide og imponerende kunnskap, samt dyktig og målrettet veiledning gjennom hele dette året. Hege, du er et unikum. Et besøk på kontoret ditt, og dagen ser betraktelig bedre ut med en gang. Takk for at du alltid har tatt deg tid, og at du gjennom hele året har utvist et uendelig engasjement. Anders, takk for din tålmodighet og tid. Det har vært svært inspirerende å ha deg som veileder. Håper for øvrig at du vinner tittelen som "Ironman" i Sveriges tuffaste triathlontävling! Så tusen takk for denne erfaringen som dette også har blitt, og da mye takket være dere.

Tusen takk til Siri Johannesen for enestående opplæring på lab. Din evne til å spre godt humør og positivitet har vært uunnværlig. Jeg vil også takke Tone Oftedahl for opplæring i metode og dataprogram brukt i denne oppgaven. Du la et supert grunnlag for meg med din oppgave, og det er jeg svært takknemlig for.

En stor takk vil jeg også gi til alle i 4.etasje for et hyggelig arbeidsmiljø. Og en spesiell takk til Ingrid Kristine, Robert, Nina, Kaja, Torkild og Kjerstin som jeg har hatt gleden av å dele kontor med. Det er en klisjé som er opplest og vedtatt, men året hadde virkelig ikke blitt det samme uten dere. En stor takk går også til Mari, for humorinnslag og lunsjpauser fritt for samtaler om oppgaven.

Avslutningsvis vil jeg takke venner og familie som har støttet meg gjennom denne prosessen, og alltid vært lydhøre for hva som har skjedd med tarmbitene til enhver tid. En spesiell takk til Hanne for korrekturlesning og konstruktive tilbakemeldinger. Jeg gleder meg til å være forloveren din.

Sist men ikke minst vil jeg takke min kjære Carolin. Takk for din tålmodighet, støtte, humor og kjærleik, når jeg har gravd meg ned i min egosentriske masterhule. Så da gjør jeg som Lars Sponheim og takker for meg med en strofe signert Neil Young:

"You really make my day, with the little things you say".

Blindern 12.mai, 2010

Solveig Vist

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORKORTELSER	7
SAMMENDRAG	8
1. INTRODUKSJON	10
1.1 PROSESSER INVOLVERT I BIOTILGJENGELIGHETEN AV LEGEMIDLER.....	10
1.2 CYTOKROM P450 (CYP) SYSTEMET.....	15
1.2.1 <i>CYP superfamilien</i>	17
1.2.2 <i>CYP3A underfamilien</i>	17
1.2.3 <i>CYP3A4</i>	18
1.2.4 <i>CYP3A5</i>	18
1.3 ATORVASTATIN.....	19
1.3.1 <i>Generelt om HMG-CoA reduktase hemmere (statiner)</i>	19
1.3.2 <i>Farmakokinetikk</i>	20
1.4 OVERVEKT	22
1.4.1 <i>Fedmekirurgi</i>	23
1.5 HENSIKTEN MED OPPGAVEN.....	26
2. MATERIALER OG METODE	27
2.1 PASIENTMATERIALE.....	27
2.2 ANALYSEMETODER	29
2.2.1 <i>Homogenisering</i>	29
2.2.2 <i>Western blott analyse</i>	30
2.2.3 <i>Måling av totalprotein</i>	34

3.	RESULTATER	35
3.1	OPTIMALISERING AV METODE	35
3.1.1	<i>Homogenisering</i>	35
3.1.2	<i>Western blott</i>	36
3.1.3	<i>Validering av metoden</i>	39
3.2	RESULTATER PASIENTER.....	41
3.2.1	<i>CYP3A4</i>	41
3.2.2	<i>CYP3A5</i>	43
3.2.3	<i>Villin</i>	44
3.2.4	<i>Måling av totalprotein</i>	45
3.2.5	<i>Farmokinetikkdata for pasientpopulasjonen</i>	45
3.2.6	<i>Linken mellom uttrykt CYP3A4 og kinetikkdata</i>	46
4.	DISKUSJON	48
4.1	OPTIMALISERING AV METODE	48
4.1.1	<i>Homogenisering</i>	48
4.1.2	<i>Western blott</i>	49
4.2	UTTRYKK AV CYP3A-ENZYMER I PASIENTER.....	50
4.2.1	<i>Pasientprøver CYP3A4</i>	50
4.2.2	<i>Pasientprøver CYP3A5</i>	54
4.2.3	<i>Link til farmakokinetisk profil til pasientene</i>	56
4.2.4	<i>Fremtidige betraktninger</i>	57
5.	KONKLUSJON	58
6.	KILDELISTE	59
7.	APPENDIKS	64

7.1	MATERIALER	64
7.2	OPPSKRIFTER	66
7.2.1	<i>Løsning til homogenisering</i>	66
7.2.2	<i>Løsninger til Western blott</i>	66
7.2.3	<i>Pasienttabeller</i>	68
7.2.4	<i>Måling av totalprotein</i>	71

FORKORTELSER

ABC	ATP bindende kassett
AUC	Areal under plasma-konsentrasjons-tidskurven
BMI	Kroppsmasseindeks (Body Mass Index)
BPD	Biliopankreatisk avledning (biliopancreatic diversion)
BPD-DS	Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (biliopancreatic diversion with duodenal switch)
BSA	Bovint serumalbumin
CL	“Clearance”
CYP	Cytokrom P450
DPYD	Dihydropyrimidin dehydrogenase
ER	Endoplasmatisk retikulum
GBP	Gastrisk bypass
GI	Gastrointestinal
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyl glutaryl koenzym A
LASGB	Laparoskopisk justerbar gastrisk innsnøring (adjustable silicon gastric banding)
LDL	Low-density lipoprotein
LM	Legemiddel
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OATP	Organisk anion transportør
P-gp	Permeabilitetsglykoprotein
PK3	Farmakokinetikk 3
Rpm	Omdreininger per minutt (revolutions per minute)
SDS	Natrium dodekyl sulfat (sodium dodecyl sulfat)
SLC	“Solute carrier”
SNP	Enkeltnukleotidpolymorfismer (singel nucleotid polymorphism)
TBS	Tris-bufret saltvannsløsning (tris buffered saline)
TP	Totalprotein
T-TBS	Tris-tween-bufret saltvannsløsning (tris tween buffered saline)
UGT	UDP-glukuronosyltransferase
VBG	Vertikal innsnørt gastroplastikk (vertikal banded gastroplasty)
VLDL	Very low-density lipoprotein
WHO	World health organization

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (switch) (BPD-DS) er en operasjonsmetode som benyttes ved sykelig overvekt. Magesekkens volum reduseres, og store deler av tynntarmen forbikobles. Dette påvirker ikke bare opptak av næringsstoffer, men også biotilgjengeligheten av atorvastatin. Atorvastatin er et kolesterolsenkende legemiddel med begrenset biotilgjengelighet (12 %). Mye av grunnen til den lave biotilgjengeligheten er at atorvastatin er utsatt for metabolisme via CYP3A4 og CYP3A5, i tillegg til å være et substrat for P-glykoprotein og OATP1B1-transportøren.

Mål: Oppgaven er en del av et større samarbeidsprosjekt med Senter for Sykelig Overvekt i Helse Sør-Øst, Tønsberg. Det overordnede målet var å undersøke i hvilken grad bariatrisk kirurgi påvirker farmakokinetikken til atorvastatin. I utgangspunktet var dette en trearmet studie som skulle inkludere 36 pasienter totalt, hvorav 12 pasienter gjennomgikk gastrisk bypass (GBP), 12 gastric sleeve (GS) og 12 biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (BPD-DS). Målet for denne oppgaven var å optimalisere og validere en allerede utviklet metode for å homogenisere biopsier og kvantifisere proteinuttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 i biopsier tatt fra magesekk, lever og tynntarm. Metoden som ble brukt er en modifisert versjon av Western blott (dot-blott). I tillegg skulle en mulig korrelasjon mellom proteinuttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 i biopsiene fra pasientene som hadde gjennomgått BPD-DS, og farmakokinetikken til atorvastatin studeres.

Metode: Biopsiene ble tilsatt sukrosebuffer og homogenisert i en Precellys 24. Homogenat ble avsatt på en nitrocellulosemembran, og et immunoanalytisk dot-blott ble fremkalt etter å ha benyttet en metode som kombinerer tradisjonell Western blotting med bruk av Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparat. Uttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 ble kvantifisert ved hjelp av dataprogrammene Syngene og Genetools. Cytoskjelettproteinet villin, som spesifikt uttrykkes i enterocytter, ble benyttet for å korrigere for ulik biopsidybde i tynntarm mellom pasienter, og konsentrasjonen av CYP3A4- og CYP3A5-enzymmer ble relatert til totalproteinmålinger for hver biopsi.

Resultater: Optimalisering av metoden ble gjennomført, og validering av metoden for CYP3A4 og CYP3A5 i GI-traktus og lever viste tilfredsstillende verdier for både interdag-

og intradagpresisjon. CYP3A4 var uttrykt i hele GI-traktus og lever med stor inter- og intraindividuell variasjon. CYP3A5 var uttrykt i tynntarm hos en pasient, og i magesekk hos 5 av 10 pasienter. Det så ut til å være en svak sammenheng mellom konsentrasjonen av CYP3A4 i duodenum og endring i AUC fra før operasjonen til 1 måned etter. Ved sammenligning av CYP3A4-konsentrasjonen i tynntarm med AUC preoperativt, så det ikke ut til å være en sammenheng for majoriteten av pasientene.

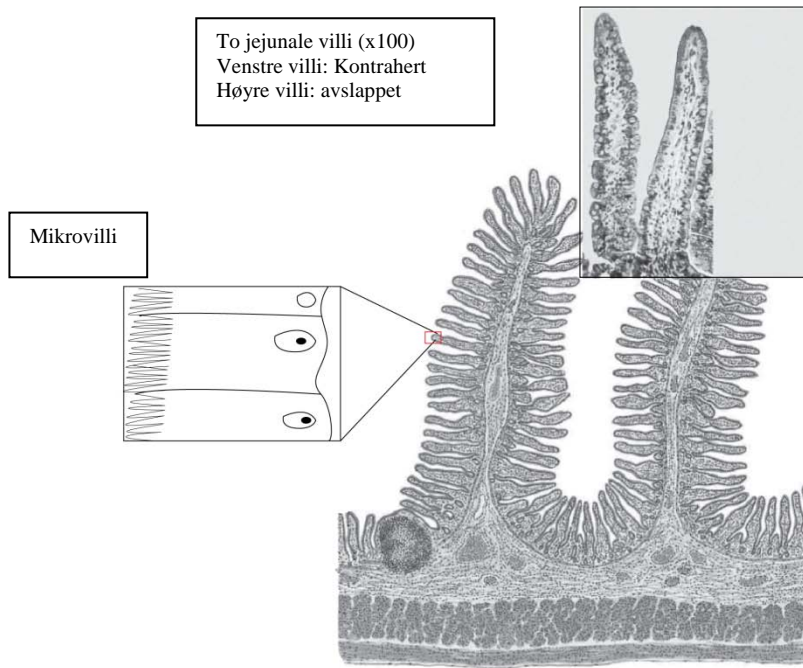
Konklusjon: En tidligere utviklet metode for kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 ved bruk av dot-blott ble optimalisert. Konsentrasjonen av CYP3A4 og CYP3A5 ble kvantifisert i biopsier tatt fra magesekk, ulike deler av tynntarm og lever. Resultatene viste som forventet store inter- og intraindividuelle forskjeller i uttrykk. Ved sammenligning av CYP3A4-konsentrasjoner i bortkoblet tynntarm og forandring i AUC etter operasjonen, så tenderte det til å være en større økning i biotilgjengelighet med økende CYP3A4-konsentrasjon i duodenum.

1. INTRODUKSJON

1.1 Prosesser involvert i biotilgjengeligheten av legemidler

GI fysiologi

Absorpsjon fra gastrointestinaltrakten (GI-trakten) påvirkes av faktorer som absorpsjonsareal, blodtilførsel til absorpsjonsstedet, konsentrasjon av legemiddel på absorpsjonsstedet og legemidlets fysikalsk-kjemiske egenskaper. Absorpsjon av legemidler foregår både i magesekk og tynntarm, men på grunn av stor overflate og lang kontakttid er tynntarmen det viktigste absorpsjonsstedet for de fleste legemidler (Goodman, Gilman *et al.* 2006). Tynntarmen varierer i lengde (4,5-7,5 meter), med en gjennomsnittlig lengde på omtrent 6 meter, og en gradvis nedgang i diameter ned mot tykktarmen. Den er delt inn i 3 morfologisk ulike regioner: duodenum, jejunum og ileum, hvorav hver del utgjør henholdsvis 5 %, 50 % og 45 % av lengden. Det totale overflatearealet tilsvarer omtrent 300 m² på grunn av overflateøkende forhold som de sirkulære foldene, villiene og mikrovilliene (Figur 1) (Gropper 2009). Villiene strekker seg innover i lumen og varierer både i høyde (~300-780 µm) og form i de ulike delene av tynntarmen (Lin, Chiba *et al.* 1999). Den dominante celletypen i villiene kalles enterocytter. De er ansvarlige for majoriteten av absorpsjonen av legemidler og næringsstoffer i tynntarmen, og inneholder legemiddel-metaboliserende enzymer, inkludert cytokrom P450-enzymmer (CYP-enzymmer) (Zanger, Raimundo *et al.* 2004). På luminal side har enterocytterne tettpakkede forlengelser kalt mikrovilli, som ytterligere øker absorpsjonsarealet. For hver mm² tynntarm er det estimert å være omtrent 200 millioner mikrovilli (Hoffman 2009).



Figur 1: Mikroskopert villi i jejunum. Modifisert figur fra Hansen (2002).

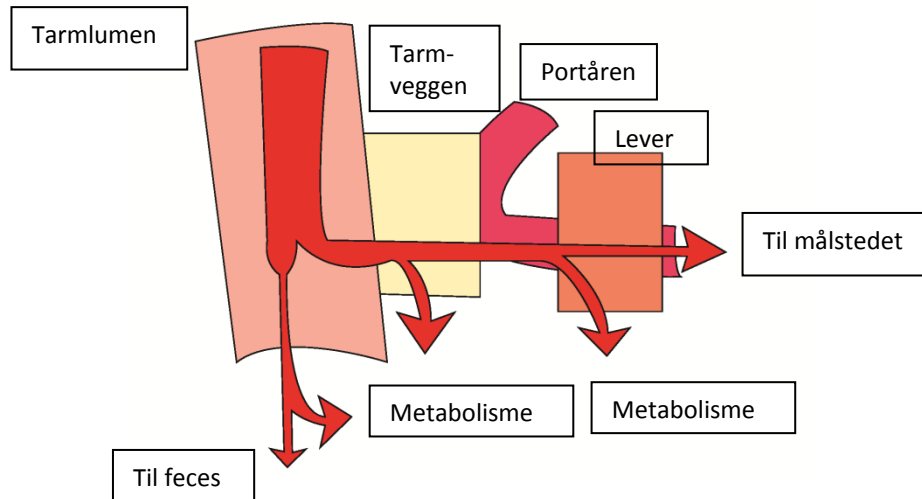
Absorpsjon

Absorpsjon av oralt inntatte legemidler i tynntarmen kan foregå på to måter, enten gjennom cellen (transcellulært) eller mellom cellene (paracellulært). Transcellulær absorpsjon av et molekyl kan foregå på flere måter; ved hjelp av passiv diffusjon, ved hjelp av spesifikke transportere eller ved endocytose. For lipofile legemidler er det vanligste passiv diffusjon gjennom cellemembranen (Goodman, Gilman *et al.* 2006).

Metabolisme

Når et legemiddel administreres peroralt vil det i varierende grad nå systemisk sirkulasjon grunnet flere prosesser på veien som kan eliminere legemidlet, dette kalles førstepassasjemetabolisme. Leveren er på grunn av sin størrelse og sitt høye innhold av legemiddelmetaboliserende enzymer hovedorganet for slik metabolisme. Til tross for dette, er tynntarmen sentral for begrensning av biotilgjengeligheten på grunn av at den metaboliserer legemidlene og andre xenobiotika (substanser som er fremmede for kroppen) før systemisk opptak, og reduserer på denne måten legemidlets biotilgjengelighet i første instans. Dette skyldes at legemidler som tas oralt må passere fra gastrointestinal lumen, gjennom

tarmveggen, for så å passere leveren for å komme inn i systemisk sirkulasjon (Figur 2) (Rowland and Tozer 1995).



Figur 2: Stadier involvert i biotilgjengeligheten av et legemiddel som administreres oralt. Tegnet etter illustrasjon fra Rowland & Tozer (1995).

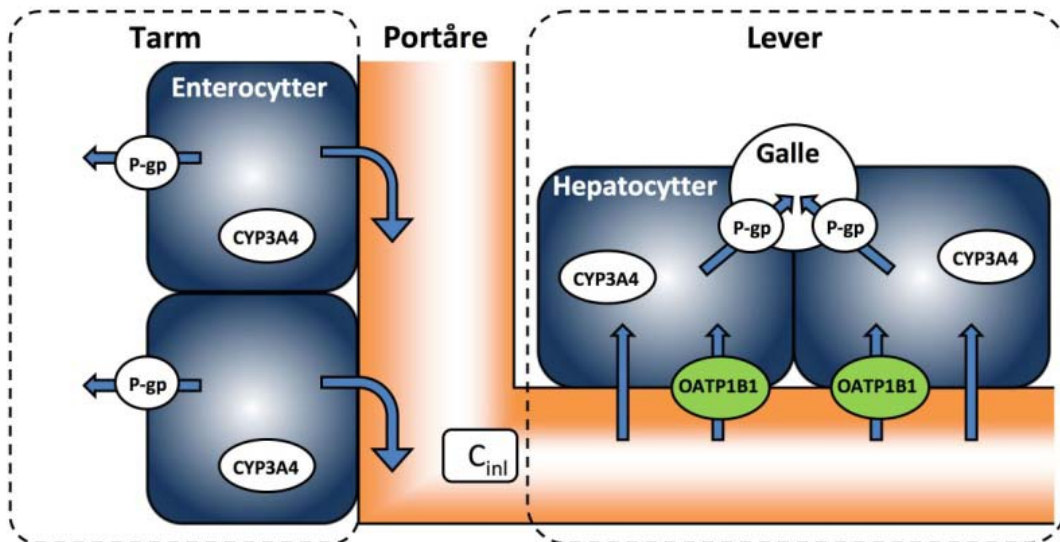
Evnen til å metabolisere og å eliminere legemidler er en naturlig prosess som involverer de samme transportsystemene som er i bruk ved normal metabolisme og effluks av næringsstoffer i maten (Goodman, Gilman *et al.* 2006). Legemiddelmetabolisme deles inn i to ulike biokjemiske reaksjoner, kalt fase I og fase II reaksjoner. Som et generelt paradigme, konverteres hydrofobe kjemikalier til derivater som lettere kan elimineres gjennom urinen eller gallen (Rang 2003). Fase I reaksjoner introduserer funksjonelle grupper i molekylet via oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse, noe som resulterer i et modifisert legemiddel. Den ekstra gruppen kan i stor grad endre legemidlets biologiske egenskaper. Fase I metabolisme klassifiseres som den funksjonelle fasen av legemiddelmetabolisme, noe som stort sett resulterer i en inaktivering av det aktive legemidlet. I enkelte tilfeller kan det imidlertid dannes metabolitter med potent biologisk aktivitet eller toksiske egenskaper. I Fase II reaksjoner konjugeres legemiddel eller metabolitter med polare grupper (sulfat, glutation, glukuronsyre, aminosyrer eller acetat) for å øke vannløseligheten, og dermed utskillelsen av legemidlet (Goodman, Gilman *et al.* 2006).

Transportører

De senere årene har interessen økt for transportørers effekter på farmakokinetikken til legemidler. I tillegg til fase I- og fase II metabolisme bidrar en rekke transportører til transporten av endogene komponenter (gallesyre og elektrolytter), så vel som xenobiotika over biologiske membraner. Transportører lokalisert i tarmen står for absorpsjonen, og i enkelte tilfeller effluks av legemidler, mens de som befinner seg i leveren og nyrene bidrar til henholdsvis eliminasjon og sekresjon (Beringer and Slaughter 2005).

Det finnes 2 hovedfamilier av transportører involvert i absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon av legemidler; ATP-bindende-kassett familien (ABC) og solute carrier familien (SLC). Effluks-transportøren P-glykoprotein (P-gp), er det mest kjente proteinet i førstnevntes familie (Goodman, Gilman *et al.* 2006). P-gps rolle er å frakte legemidler (og andre fremmedstoffer) ut av cellene for å redusere intracellulær akkumulering av potensielle toksiner, men dette medfører også at P-gp fungerer som en barriere for opptak og absorpsjon av legemidler. P-gp uttrykkes hovedsakelig i lever, nyrer, tynn- og tykktarm (Figur 3), i tillegg til interne barrierer som blod-hjerne-barrieren, blod-placenta-barrieren og blod-testis-barrieren (Ambudkar, Kimchi-Sarfaty *et al.* 2003).

Solute carrier familien inkluderer rundt 300 medlemmer organisert i 43 familier, og er følgelig den største superfamilien av transportører (Hediger, Romero *et al.* 2004). Medlemmer av organisk anion-transporterende polypeptider (OATPs), som tilhører solute carrier familie 21A (SLC21A), representerer en viktig familie med tanke på rollen den har i membranopptaket av fysiologiske substrater og legemidler. OATP1B1-transportøren som er et medlem i denne familien uttrykkes spesifikt i lever (Figur 3), og spiller en viktig rolle i reguleringen av opptak av legemidler og endogene substanser inn i hepatocytene, blant annet 3-hydrokso-3-metyl glutaryl koenzym (HMG-CoA) reduktasehemmere. På denne måten øker mengde legemiddel tilgjengelig for metabolisme fra leverenzymmer som CYP-enzymmer (Lau, Huang *et al.* 2007).



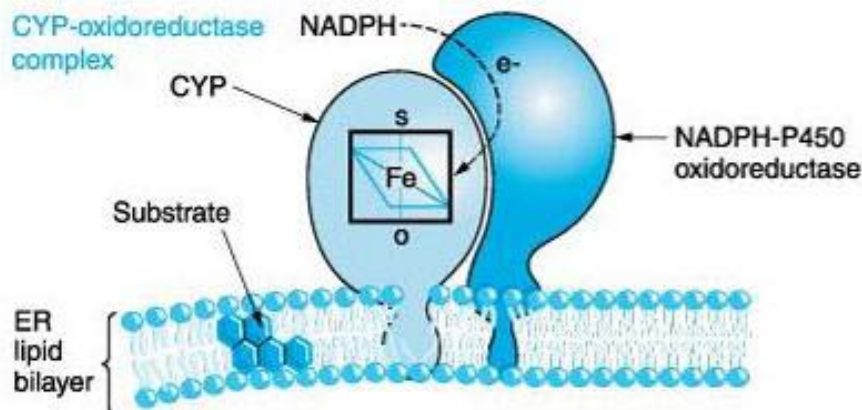
Figur 3: P-gp lokalisert i enterocytter og lever, og OATP1B1 lokalisert i lever (Rune Amundsen, personlig meddelelse).

Villin

I tynntarmen uttrykkes CYP3A-enzymet kun i modne enterocytter på tuppen av villi i mukosa (Figur 1). Enterocytterne representerer kun en liten fraksjon av det totale celleinnholdet fra biopsier tatt fra tynntarmen (Kolars, Schmieglin-Ren *et al.* 1992). Studier har vist stor interbiopsi variasjon i innholdet av modne enterocytter, til og med blant biopsier tatt fra samme pasient (Lown, Kolars *et al.* 1994). Ulikheter i prosentvis enterocytinnhold i individuelle tarmbiopsier resulterer i endret mengde immunoreaktivt protein observert i et blott. Eksempelvis vil en dyp biopsi inneholde en relativt liten proporsjon enterocytter/mg protein, mens en mer overfladisk biopsi vil inneholde en relativt høy proporsjon enterocytter/mg protein. For å korrigere for dette kan cytoskjelettproteinet villin, som spesifikt uttrykkes i enterocytter, brukes for å kontrollere variasjonen av modne enterocytter i en biopsi, og dermed normalisere uttrykket av CYP-enzymet ved bruk av biopsier tatt fra tynntarmen (Lown, Kolars *et al.* 1994).

1.2 Cytokrom P450 (CYP) systemet

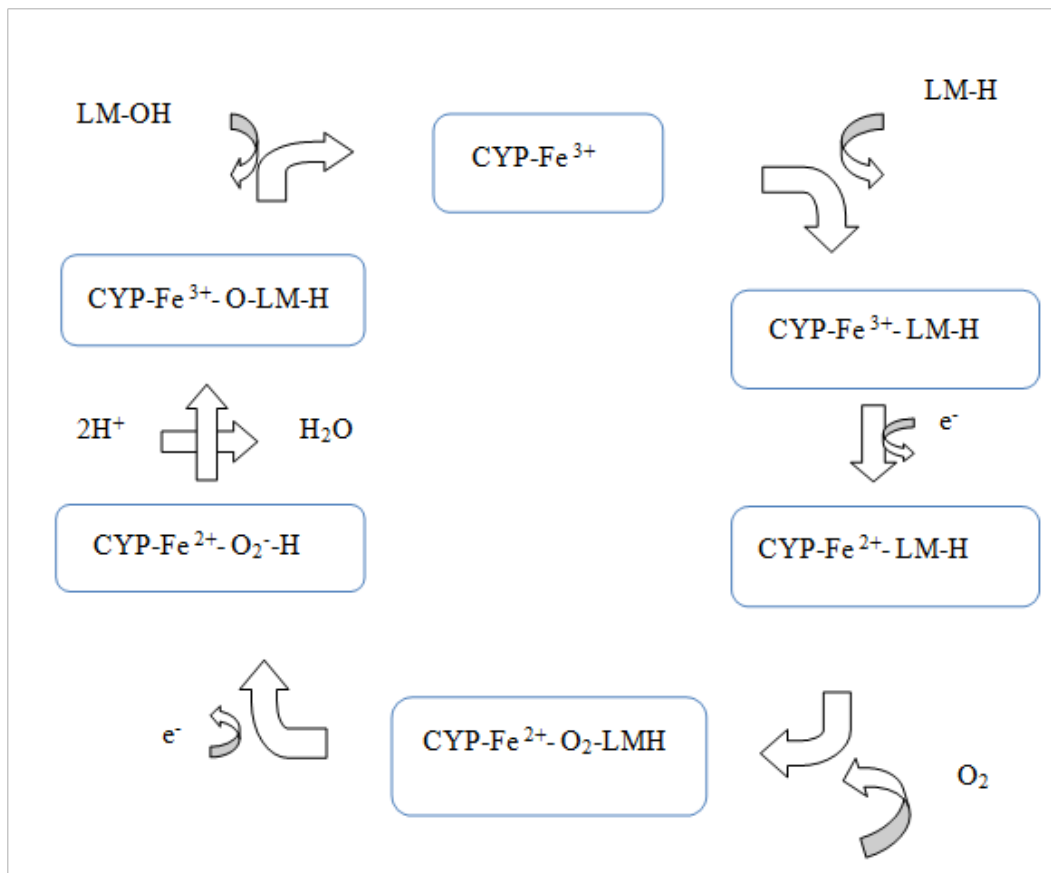
Cytokrom P450 enzymsystemet (CYP-enzymsystemet) er det viktigste enzymsystemet involvert i metabolismen av legemidler (Lin and Lu 2001). Enzymsystemet er også viktig for syntese og metabolisme av mange endogene forbindelser, blant annet steroider, fettsyrer, prostaglandiner, gallesyrer og retinoider (Lewis 2004). Proteinene er bundet til membranen i endoplasmatisk retikulum (ER) og i mitokondriene, hvor de også assosieres med nikotinamid adenin dinukleotid fosfatase (NADPH) cytokrom P450 reduktase (Figur 4) som kreves for oksidativ aktivitet av CYP-enzymene.



Figur 4: Cytokrom P450 enzymene er lokalisert i fosfolipid-bilaget i endoplasmatisk retikulum (ER), sammen med NADPH-cytokrom reduktase. Substratet (eksempelvis legemidlet) har ofte hydrofobe egenskaper og ligger løst i membranen (Goodman, Gilman *et al.* 2006).

Metabolisme via cytokrom P450 enzymsystemet krever molekylært oksygen, redusert NADPH, flavoproteinet NADPH-cytokrom P450 reduktase og enkelte ganger elektrondonoren cytokrom b_5 (Rang 2003). Figur 5 viser en skjematisk oversikt over den flertrinnede oksidasjonsreaksjonen. Legemidlet (LM) reagerer med oksidert form av CYP-enzymet (CYP- Fe^{3+}), og danner et legemiddel-enzym-kompleks (CYP- Fe^{3+} - LM). Cytokrom

P450 reduktase, alternativt cytokrom b_5 , overfører et elektron til CYP- Fe^{3+} - LM-komplekset, som resulterer i et redusert kompleks, CYP- Fe^{2+} - LM, som videre reagerer med molekylært oksygen, O_2 , etterfulgt overføring av nok et elektron og et proton fra NADPH. Avslutningsvis frigjøres en oksidert metabolitt (LM-OH), og et regenerert cytokrom P450 enzym (Rang 2003; Goodman, Gilman *et al.* 2006).



Figur 5: Katalytisk syklus for CYP-enzym. Overføringen av elektronene (e^-) skjer via NADPH-cytokrom P450 reduktase, alternativt via cytokrom b_5 . Avslutningvis frigjøres en oksidert metabolitt (LM-OH), og et regenerert cytokrom P450 enzym. Modifisert figur fra Rang (2003).

1.2.1 CYP superfamilien

Det humane CYP-enzymssystemet består av 57 heme-tiolat enzymer (Nelson 2009) ansvarlig for oksidativ metabolisme av et stort antall endogene og eksogene komponenter (Lewis 2004). Omtrent 80 % av all oksidativ metabolisme og omtrent 50 % av all eliminasjon av vanlige legemidler tilskrives et av de mange CYP-enzymene som klassifiseres i tre ulike familier, CYP1, -2 og -3 (Wilkinson 2005). CYP-enzymene fra disse tre familiene assosieres hovedsakelig med fase I metabolisme av legemidler, mens de øvrige CYP-familiene stort sett utøver endogene roller (Lewis 2004). CYP-enzymene uttrykkes primært i hepatisk vev, men også i ekstrahepatiske vev som magetarm-systemet, nyrene, lungene, hjernen og huden (Lin and Lu 2001). Superfamilien av cytokrom P-450 enzymer forkortes CYP, og klassifiseres i ulike familier ut i fra likhet i aminosyresekvensen. CYP-enzymmer som utviser mer enn 40 % likhet i aminosyresekvens rangeres i forskjellige familier som betegnes med et arabisk tall, eksempelvis CYP3. Deretter deles hver familie inn i subfamilier av enzymer. Enzymene innen en subfamilie har over 55 % likhet i aminosyresekvens, og betegnes med stor bokstav, CYP3A. Avslutningsvis betegnes isoenzymet innen denne subfamilien med et arabisk tall, mens hele genet som koder for dette enzymet oppgis som *CYP3A4* (Rendic and Di Carlo 1997).

1.2.2 CYP3A underfamilien

CYP3 genene er lokalisert mellom kromosom 7q22-qter og 7qter (Spurr, Gough *et al.* 1989), og koder for minst fire homologe gener. Den humane CYP3A subfamilien består av fire isoenzymer: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43, og er et av de mest allsidige biotransformasjons-systemene som eliminerer legemidler, andre xenobiotika og endogene molekyler fra kroppen (Lamba, Lin *et al.* 2002). Denne allsidigheten tilskrives et stort aktivt sete som muliggjør bindingen av en rekke strukturelt ulike molekyler (Guengerich 1999). CYP3A subfamilien bidrar til metabolisme av 45-60 % av alle legemidler i klinisk bruk (Li, Kaminski *et al.* 1995; Evans and Relling 1999). Blant voksne mennesker er CYP3A4 det dominerende enzymet i CYP3A subfamilien i både lever og tarm. CYP3A5 er et polymorft enzym som hovedsakelig uttrykkes i lever og tarm hos voksne med **1* genotype. Både

CYP3A7 og CYP3A43 uttrykkes i lever hos foster og voksne, men det antas at de i liten grad er involvert i metabolismen av legemidler (Daly 2006).

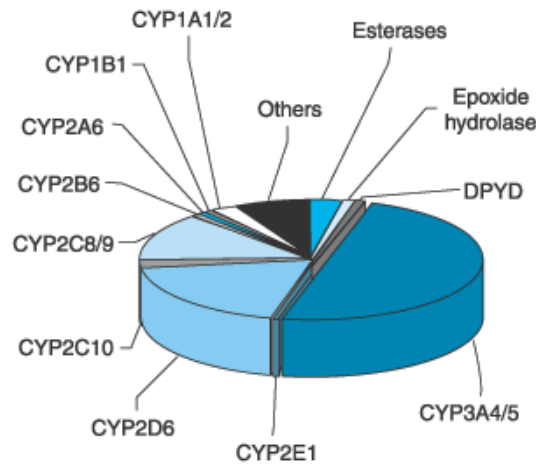
1.2.3 CYP3A4

CYP3A4 er som nevnt det dominante CYP3A-enzymet i lever og tarm hos de fleste mennesker (Guengerich 1999). Legemidler som er kjente substrater for CYP3A4, har en lav og variabel biotilgjengelighet som forklares ut i fra presystemisk metabolisme ved CYP3A4-enzymet i tarm og lever. Uttrykk og funksjon av CYP3A4 styrer i stor grad hastighet og omfang av metabolismen av substrater for CYP3A subfamilien (Lemke 2008). CYP3A4 utviser en unimodal distribusjon i den humane populasjon (Burton 1980), og de store interindividuelle forskjellene i CYP3A aktivitet hos mennesker, tilskrives både genetikk og miljøfaktorer, inkludert legemiddelinteraksjoner som involverer hemming og indusering (Xie, Wood *et al.* 2004). En rekke arvelige mutasjoner forekommer i genene som koder for CYP-enzymet og kan resultere i alt fra fraværende, nedsatt, uendret eller økt enzymaktivitet. Mutasjoner med forekomst høyere enn 1 % i en befolkning blir definert som genetisk polymorfisme (Dahl 2002). Det er beskrevet flere ulike CYP3A4 alleler, men ingen defekte alleler er knyttet til fravær av enzymaktivitet (Isoherranen, Ludington *et al.* 2008).

1.2.4 CYP3A5

I motsetning til CYP3A4 distribueres det hepatiske uttrykket av CYP3A5 bimodalt, noe som indikerer tilstedeværelsen av en klassisk polymorfisme (Burk and Wojnowski 2004). Fravær av uttrykt CYP3A5 er blitt relatert til flere ulike polymorfismer, der *CYP3A5*3* er den vanligste. Dette skyldes en enkeltnukleotidpolymorfisme (SNP) i intron 3 som forårsaker alternativ spleising, og inkludering av et nytt ekson (3B) som inneholder et stoppkodon. Dette medfører at CYP3A5-proteinet blir forkortet og inaktivt. Den alternative spleisingen er ikke fullstendig, noe som forklarer at lave mengder CYP3A5-protein også kan være tilstede hos individer som er homozygot for *CYP3A5*3* (Kuehl, Zhang *et al.* 2001; Lamba, Lin *et al.* 2002). Hovedkarakteristikken for CYP3A5, likt som for andre CYP-enzymet, er den store interindividuelle variasjonen i uttrykk av enzymene (Lin and Lu 2001). I tillegg utvises

etniske ulikheter, hvor studier viser at hepatisk CYP3A5 er tilstede hos cirka 55 % afroamerikanere, 33 % japanere og 10-25 % kaukasiere (Burk and Wojnowski 2004).



Figur 6: Kakediagrammet viser andel legemidler som metaboliseres av de enkelte fase I enzymene, hvorav CYP-enzymene utgjør store deler av diagrammet. DPYD, dihydropyrimidine dehydrogenase (Goodman, Gilman *et al.* 2006).

1.3 Atorvastatin

1.3.1 Generelt om HMG-CoA reduktase hemmere (statiner)

Statiner representerer den legemiddelgruppen som i størst grad senker kolesterolet ved hyperkolesterolemi. De reduserer lipidkonsentrasjonen i plasma, og har generelt få alvorlige bivirkninger (Lennernas and Fager 1997). Statiner virker ved spesifikk hemming av enzymet HMG-CoA reduktase som katalyserer det hastighetsbestemmende trinnet i kolesterolsyntesen; omdannelsen av HMG-CoA til mevalonsyre. Dette fører til at kolesterolsyntesen i leveren reduseres, noe som medfører en oppregulering av low-density lipoprotein- (LDL) reseptorer på leverens overflate. Økt antall LDL-reseptorer gir økt clearance av LDL fra systemisk sirkulasjon, og plasmanivået av LDL i blod vil synke (Rang 2003). Høyere doser av de mer potente statinene atorvastatin og simvastatin, kan også redusere triglyseridnivået som skyldes økt nivå av very low-density lipoprotein (VLDL) (Goodman, Gilman *et al.* 2006). Atorvastatin, som tilhører 2.generasjonsstatiner, er en

syntetisk kompetitiv hemmer av HMG-CoA reduktase (Evans and Rees 2002). Statiner er en mye brukt legemiddelgruppe, og i 2009 ble det i følge Reseptregisteret registrert omtrent 450 000 statinbrukere i Norge, hvorav omtrent 80 000 brukte atorvastatin (2009).

1.3.2 Farmakokinetikk

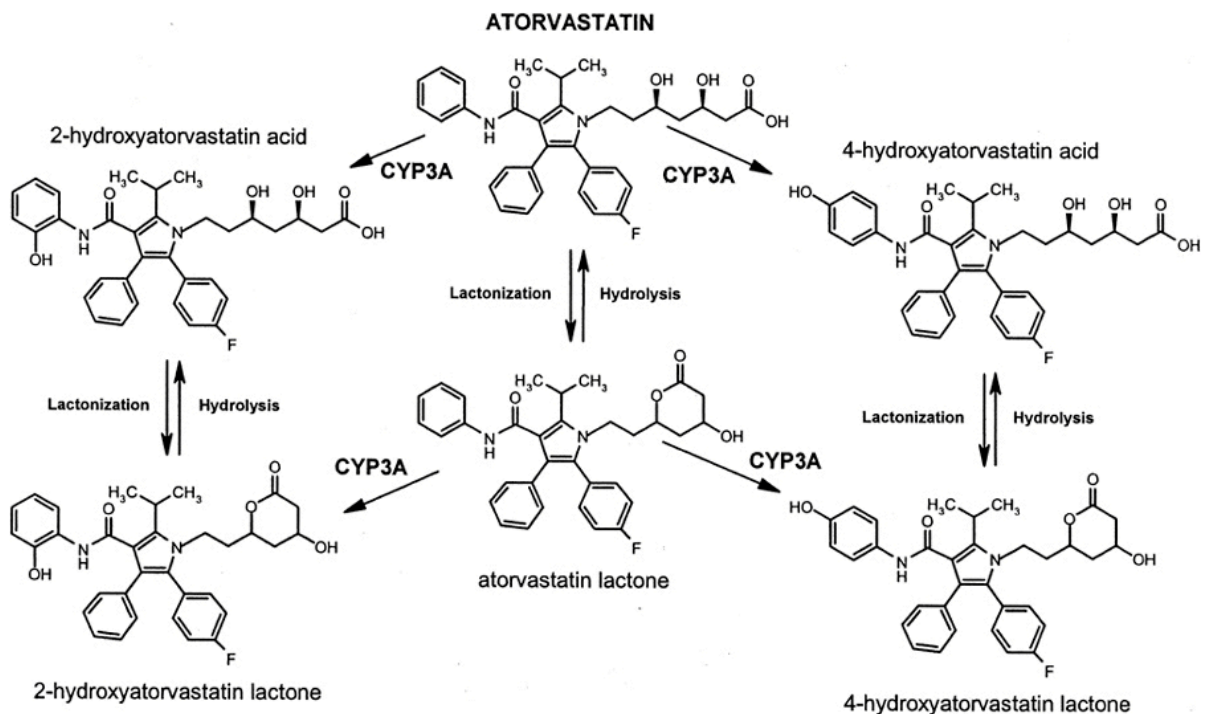
Absorpsjon og distribusjon

Atorvastatin er et syntetisk legemiddel som administreres oralt i doseringsområdet 10-80 mg/døgn. Atorvastatin inntas i form av kalsiumsaltet av den aktive hydroksysyren (Figur 7), som er høyoppløselig. Syreformen består av en lipofil og en hydrofil del, noe som gjør at den enkelt kan diffundere over biologiske membraner. Dette muliggjør fullstendig absorpsjon av legemidlet etter oral administrasjon. Imidlertid utviser atorvastatin en lav biotilgjengelighet (12 %) på grunn av utstrakt CYP3A4 og CYP3A5 metabolisme, og OATP1B1 og P-gp transport (Williams and Feely 2002; Lennernas 2003). *In vivo* konverteres atorvastatin til laktonformen, og en likevekt vil oppstå mellom syren og laktonet. Atorvastatinlaktonet og atorvastatinsyren utviser ulikheter i fysiokjemiske egenskaper, men selv om laktonformen er mer lipofil enn syreformen (Lennernas 2003), har arealet under plasma-konsentrasjons-tidskurven (AUC) for laktonet vist seg å være tilsvarende AUC for syreformen (Kantola, Kivistö *et al.* 1998).

Metabolisme og eliminasjon

Som nevnt tidligere administreres atorvastatin på syreform, men *in vivo* foreligger den i likevekt med laktonformen. Ved fysiologisk pH og høyere, er laktonformen ustabil, og likevekten favoriserer hydrolyse av laktonringen, slik at man får syreformen. Under sure forhold, vil syreformen kunne danne et lakton. Generelt vil syre- og laktonformen koeksistere i likevekt *in vivo*, men det er kun syreformen som hemmer enzymet HMG-CoA reduktase (Grabarkiewicz, Grobelny *et al.* 2006). Atorvastatinsyre er mest sannsynlig utsatt for fullstendig metabolisme, hovedsakelig grunnet metabolisme i lever og tarm. To aktive metabolitter er detektert i plasma, para-hydroksyatorvastatinsyre og orto-hydroksyatorvastatinsyre. Metabolittene blir også konvertert til tilhørende lakton, og de to formene eksisterer i likevekt (Kantola, Kivistö *et al.* 1998). *In vitro* forsøk har vist at CYP3A4 er hovedenzymet ansvarlig for dannelsen av de to aktive metabolittene (Kantola,

Kivistö *et al.* 1998; Jacobsen, Kuhn *et al.* 2000). *In vitro* data har også vist at atorvastatinsyre med tilhørende metabolitter er utsatt for glukuronidering ved UDP-glukuronosyltransferase (UGT) 1A1 og 1A3 i human lever, i tillegg til CYP3A4 mediert oksidering, β -oksidering, laktonisering og hydrolyse (kjemisk og av esteraser). Metabolittene elimineres ved biliær sekresjon og direkte sekresjon fra blod til tarm. Total plasmaclearance av atorvastatinsyre er 625 ml/min, og halveringstiden er omtrent 7 timer. Renal eliminasjon er av mindre betydning (Lennernas 2003).



Figur 7: Metabolisme av atorvastatin. Atorvastatin inntas i form av kalsiumsaltet av den aktive hydroksysyren, vist øverst i midten. CYP3A4 er hovedenzymet som omdanner atorvastatin til de to hovedmetabolittene; 2 - (orto) hydroksy-atorvastatinsyre og 4 - (para) hydroksy-atorvastatinsyre illustrert på hver sin side av kalsiumsaltet. *In vivo* foreligger begge metabolittene i likevekt med den inaktive laktonformen vist nederst på figuren (Backman, Luurila *et al.* 2005).

1.4 Overvekt

For å beskrive graden av overvekt og fedme brukes kroppsmasseindeks (Body Mass Index; BMI = kg/høyde²). Overvekt defineres som BMI > 25 kg/m², og fedme defineres som BMI > 30 kg/m². Videre deles fedme inn i fedme grad I med BMI 30-34,9, grad II med BMI 35-39,9 og grad III med BMI ≥ 40, hvorav grad II med alvorlig følgesykdom og grad III betegnes som sykkelig overvekt (WHO 2006). Forekomsten av overvekt og fedme er et økende problem for både barn og voksne i Norge, og i store deler av den vestlige verden forøvrig (SHdir 2004; WHO 2005). I 2005 anslo Verdens helseorganisasjon (WHO) at omtrent 1,6 milliarder av verdens befolkning var overvektige, og at andelen med definert fedme var minst 400 millioner. Årsaken til denne økningen er trolig en kombinasjon av økt tilgang på energirik mat og nedsatt fysisk aktivitet som totalt gir en positiv energibalanse. Dette resulterer i vektøkning som assosieres med økt risiko for blant annet type 2-diabetes, hjerte- og karsykdom, søvnapnè, slag, enkelte kreftsykdommer, kne- og ryggplager, hypertensjon og gallesteinssykdom (Buchwald, Avidor *et al.* 2004). WHO anslår at disse tilleggslidelsene står for 2-6 % av de totale helsekostnadene i industrialiserte land (WHO 2003), men det største problemet er ofte det psykososiale og stigmatiseringen fra samfunnet rundt, som er en medvirkende faktor i å redusere generell livskvalitet. Anbefalt behandling av overvekt og fedme er først og fremst omlegging av kosthold og økt fysisk aktivitet. Flere studier har imidlertid vist at det er vanskelig for mange å holde vekten nede ved hjelp av livsstilstiltak alene (Safer 1991; Bray and Tartaglia 2000; Leibbrand and Fichter 2002; McTigue, Harris *et al.* 2003). Når diett, økt fysisk aktivitet og eventuell atferdsterapi ikke gir vedvarende eller tilstrekkelige resultater alene, kan medikamentbruk vurderes om personen har en BMI mellom 27-30 kg/m². Effekten sett over flere år synes derimot å være minimal (Hauptman, Lucas *et al.* 2000; Fauci 2008; Robinson and Niswender 2009). Det ene medikamentet som er godkjent for behandling av fedme i Norge per dags dato er pankreaslipasehemmeren orlistat (Xenical®). Noradrenalin- og serotoninreopptakshemmeren sibutramin (Reductil®) ble i januar i år midlertidig trukket fra markedet grunnet økt risiko for hjerte- og karhendelser som hjerteinfarkt og slag (EMA 2010). Felles for all medikamentell terapi av fedme er at effekten ikke er varig utover den tida medikamentet tas, og som en konsekvens av dette vil det for mange være vanskelig å beholde vekten etter seponering. Effekten man oppnår er vanligvis mellom 5 og 10 % vektnedgang, og

behandlingen bør seponeres hvis ikke ønsket effekt oppnås (Elder and Wolfe 2007). Om konservativ behandling har feilet, kan kirurgi være en løsning for personer som lider av sykelig overvekt. Data fra ulike metaanalyser viser at bariatrisk kirurgi er den metoden som er mest effektiv for de som lider av sykelig overvekt. Generelt vises en nedgang på 30-35 % av total kroppsvekt, og denne nedgangen opprettholdes hos omtrent 60 % av pasientene etter 5 år (Fauci 2008).

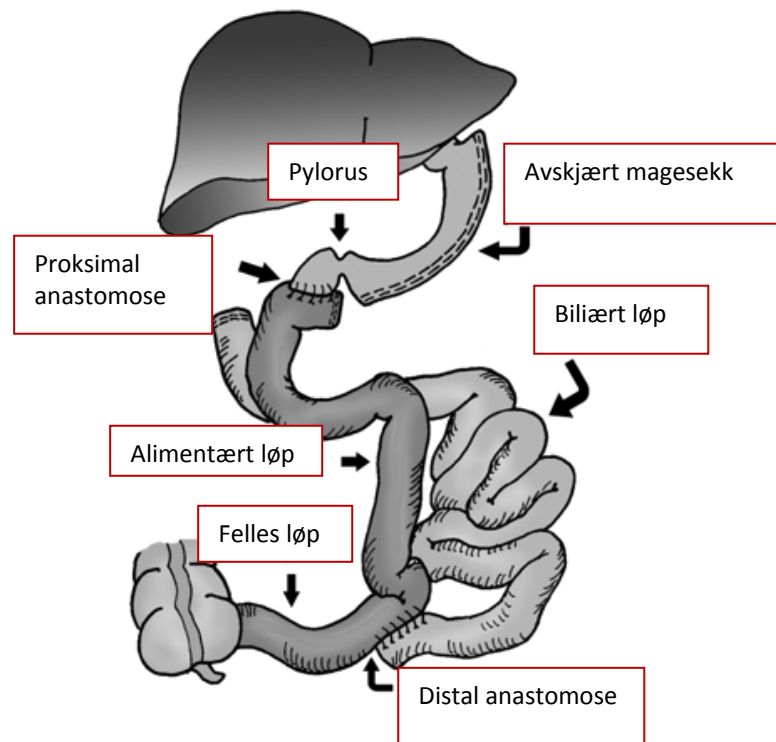
1.4.1 Fedmekirurgi

Fra 1970-årene fram til starten på 2000-tallet har ulike kirurgiske metoder mot fedme vært utprøvd (i Norge) med varierende resultater. Alvorlige bivirkninger som blant annet leversvikt, nyresvikt og behandlingsresistent reflukssykdom gjorde at det var behov for en forbedring. Kirurgisk behandling av sykelig fedme (bariatrisk kirurgi) i dag baserer seg på to hovedprinsipper (restriksjon og malabsorpsjon) som brukes hver for seg, eller i kombinasjon. Ved restriksjon minsker man magesekkens volum, noe som gir tidlig metthetsfølelse og begrenser kaloriinntaket. Tarmshunt (bypass) reduserer tarmens opptak av kalorier ved malabsorpsjon. I tillegg bidrar dette til utskillelse av gastrointestinale hormoner som regulerer appetitt og blod-glukosenivå, grunnet ufordøyd mat som når distale deler av tynntarmen (Aasheim, Mala *et al.* 2007).

Vertikal banded gastroplasty (VBG), regnes som prototypen innen bariatrisk kirurgi, men på grunn av manglende effektivitet i langtidsstudier har man nå i stor grad gått bort fra denne prosedyren. Laparoskopisk adjustable silicon gastric banding (LASGB) har erstattet VBG som den mest utførte restriktive prosedyren. Silikonbåndets diameter kan reguleres ved at det er festet til et reservoar som er implantert under huden. Ved å fjerne eller injisere sterilt saltvann reguleres båndets indre diameter, som medfører at magesekkens størrelse endres. De tre restriktive-malabsorptive bypass prosedyrene kombinerer elementer av gastrisk restriksjon og selektiv malabsorpsjon. Disse prosedyrene inkluderer gastrisk bypass (GBP), biliopankreatisk diversion (BPD), og biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (BPD-DS), hvorav GBP er den mest brukte prosedyren (Fauci 2008).

Duodenal omkobling

Duodenal omkobling (Figur 8) er en modifisering av bileopankreatisk bypass. Operasjonen er primært en malabsorptiv prosedyre. Det gjøres en partiell langsgående gastrektomi som etterlater seg en magesekk formet som en tube på 100-200 ml, med en intakt pylori. Duodenum deles distalt for pylorus og skjøtes til den proksimale ende av ileum. Tynntarmen får dermed to separate løp, et alimentært løp for føde og et biliopankreatisk løp for galle og bukspytt. De siste 100 cm før cøcum kobles de to løpene sammen i et fellesløp. Den langsgående gastrektomien kalles også gastric sleeve, og kan foretas uten fullførelsen som inngår i duodenal omkobling. Magesekken blir da mindre, men normal tarmanatomi bevares. Duodenal omkobling gir noe høyere vekttap enn gastrisk bypass, men er et mer omfattende inngrep (Hess 2005; Aasheim, Mala *et al.* 2007).



Figur 8: Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (switch). Det er gjort en partiell langsgående gastrektomi. Duodenal omkobling er foretatt ved at duodenum er delt distalt for pylorus og anastomosert til proksimale ende av ileum. Tynntarmen får da to separate løp, et biliopankreatisk løp for galle og bukspytt, og et alimentært for føde. De to kobles sammen til et felles løp 100 cm før cøcum (Mitchell, Carabetta *et al.* 2009).

Villi og mikrovilli øker absorpsjonsarealet i tynntarmen betraktelig i forhold til tykktarmen (Rowland and Tozer 1995). Dermed vil omkoblingen av duodenum og jejunum føre til tap av overflateareal tilgjengelig for absorpsjon av legemidler. I tillegg til redusert absorpsjonsareal, vil en omkobling føre til at mengden CYP-enzymene og P-gp som er tilgjengelig for å begrense legemidlers biotilgjengelighet reduseres betraktelig. Uttrykket av CYP-enzymene og P-gp utviser høy interindividuell variabilitet, i tillegg til å variere i uttrykk nedover i GI-traktus. Uttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 er høyest i duodenum for så å minske ned mot colon (Paine, Khalighi *et al.* 1997; Thorn, Finnstrom *et al.* 2005). For P-gp er situasjonen motsatt, P-gp uttrykkes i mindre grad øverst i tynntarmen, med en gradvis økning ned mot colon (Paine, Khalighi *et al.* 1997; Thorn, Finnstrom *et al.* 2005; Englund, Rorsman *et al.* 2006).

For pasienter som har gjennomgått kombinerte malabsorptive- og restriktive prosedyrer, vil en reduksjon i absorpsjon av legemidler opptre hyppigere i forhold til de pasientene som gjennomgår hver enkelt prosedyre. Eksempelvis vil redusert tarmlengde og overflateareal føre til nedsatt absorpsjon av "extended release" preparater på grunn av at denne typen formuleringer blir absorbert over en tidsperiode på 2-12 timer. "Extended release" preparater vil da kunne passere den forkortede GI-trakten før absorpsjonen er fullstendig. De samme prinsippene kan videreføres til "delayed release" preparater og enterisk- eller filmdrasjerte formuleringer (Miller and Smith 2006). Det foreligger lite data fra pasienter som har gjennomgått bariatrisk kirurgi, og studiene som er gjennomført omfavner stort sett et begrenset antall pasienter. En studie utført av Beerman *et al.* i 1973 viste ingen endring i farmakokinetikken av digoxin i 7 pasienter som hadde gjennomgått jejunoileal bypass, en prosedyre der man fjerner distale jejunum og proksimale ileum (Beermann, Hellstrom *et al.* 1973). Victor *et al.* (1987) undersøkte absorpsjonen av orale antikonseptiva i 7 kvinner som hadde gjennomgått jejunoileal bypass. Pasientene fikk 3 mg noretisteron, og plasmakonsentrasjoner av noretisteron og levonorgestrel ble sammenlignet med data fra kontrollgruppen. Det viste seg at pasientene som hadde gjennomgått jejunoileal bypass hadde en lavere konsentrasjon av aktivt legemiddel ved måling, i forhold til kontrollgruppen. Dette kunne ha sin årsak i ufullstendig absorpsjon grunnet at gestagener normalt har god absorpsjon i ileum. I en studie utført av Skottheim *et al.* (2009) ble endringen i farmakokinetikken til atorvastatin undersøkt i 12 pasienter som hadde gjennomgått gastrisk bypass. Biotilgjengeligheten av atorvastatin økte for 8 av 12 pasienter. I den påfølgende

studien med BPD-DS pasienter økte biotilgjengeligheten av atorvastatin for 9 av 10 pasienter. Siden BPD-DS er en prosedyre som omfatter en omkobling av store deler av tynntarmen, er det en passende metode å bruke for å undersøke eventuelle endringer i opptak av legemiddel (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010).

1.5 Hensikten med oppgaven

- Optimalisering og validering av en allerede utviklet metode for å homogenisere biopsier og kvantifisere proteinuttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 ved bruk av en modifisert versjon av Western blott (dot-blott). Biopsiene var tatt fra tynntarm, lever og magesekk.
- Beskrive intra- og interindividuell variasjon i uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 i de ulike vevene.
- Relatere uttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 til individuell systemisk eksponering av atorvastatin, for å undersøke en eventuell sammenheng mellom uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 og biotilgjengeligheten av atorvastatin.

2. MATERIALER OG METODE

Oversikt over materialer benyttet i oppgaven er presentert i Appendiks, pkt 7.1.

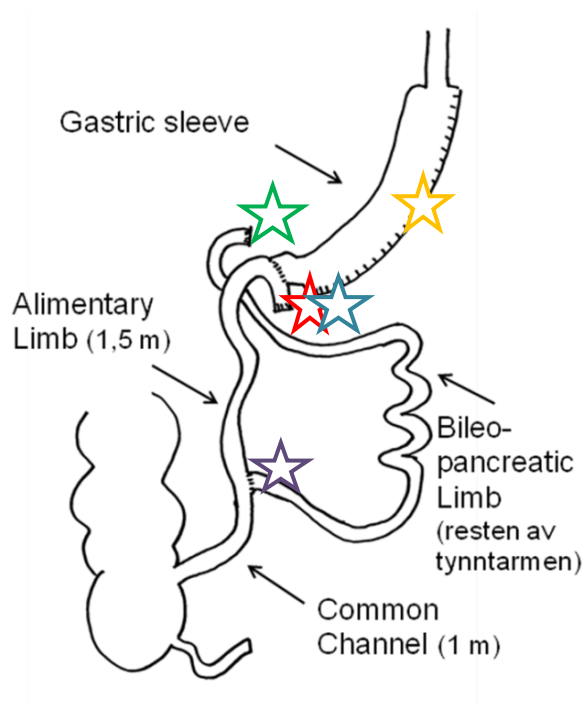
2.1 Pasientmateriale

I denne studien ble biopsier fra duodenum, jejunum, ileum, lever og magesekk fra 10 pasienter analysert for uttrykk av CYP3A-proteiner. Pasientene hadde gjennomgått BPD-DS, og i hovedstudien var atorvastatin-kinetikken undersøkt dagen før operasjon, og 4-8 uker etter operasjon (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010). Forut for operasjonen ble blodprøver tatt før ($t=0$) og 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 22 og 24 timer etter administrasjon av atorvastatin, mens det ble utført 8-timers undersøkelser ved oppfølgingsundersøkelsen. Biopsiene ble tatt i forbindelse med operasjonen, og i tillegg ble det for pasient 1, 3, 4 og 7 utført en farmakokinetikk undersøkelse 3 (PK3) ved gastroskopi fra den nye proksimale delen av tynntarmen (opprinnelig ileum) 2 år etter operasjonen. Syv pasienter ble behandlet med 20 mg atorvastatin (Lipitor[®]), 2 pasienter ble behandlet med 40 mg og 1 pasient fikk 80 mg daglig. Studien var designet som en prospektiv, åpen, kontrollert, ikke-randomisert, enkeltcenter studie. Studien ble utført i henhold til internasjonale og nasjonale lover og retningslinjer. Godkjenning ble gitt av regional etisk komité og alle norske relevante myndigheter. Studien er registrert ved Clinicaltrials.gov (NCT00331565). Demografiske data av pasientene er presentert i tabell 1 (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010). Oversikt over hvor de ulike biopsiene ble tatt under operasjonen er presentert i figur 9.

Tabell 1: Demografiske data av pasientpopulasjonen ved operasjon, og 4-8 uker etter.

Pasient	Kjønn	Alder (år)	BMIpre (kg/m ²)	BMI 4-8 uker (kg/m ²)	Dose (mg/daglig)	Tidsintervall (Uke)
1	K	45	55	38	20	7
2	M	42	59	52	20	4
3	M	43	57	43	20	5
4	M	34	53	44	20	8
5	K	44	51	40	20	6
6	K	54	49	37	40	5
7	M	31	54	49	80	4
8	M	46	50	39	20	6
9	K	53	52	43	40	7
10	K	45	52	46	20	5
Gjennomsnitt	5	44	53	43	30	6
Standardavvik	5	7,2	3,1	4,8	19,4	1,3

K = kvinne, M = mann, BMI = Body Mass Index, dose = antall mg atorvastatin administrert daglig, tidsintervall = antall uker mellom farmakokinetisk studier utført før og etter operasjon (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010)



Figur 9: Stjernene markerer hvor i tarmen de ulike biopsiene er tatt (Rune Sandbu, personlig meddelelse). Gul stjerne: magesekk, rød stjerne: jejunum, grønn stjerne: duodenum, lilla stjerne: ileum, blå stjerne: PK3. I tillegg ble det tatt biopsier fra leveren.

2.2 Analysemetoder

2.2.1 Homogenisering

Prinsipp

Precellys 24 er et nytt instrument utviklet av Bertin Technologies (Bertin 2009). Precellys 24 representerer en effektiv måte å homogenisere ulike biologiske materialer på. Hver prøve blandes med egnet buffer i hvert sitt engangsrør med keramikkuler og lokk, for å hindre krysskontaminasjon. Apparatet tar opptil 24 prøver samtidig, noe som effektiviserer prosedyren betraktelig i forhold til tidligere manuelle metoder. Ut i fra hvilket vev man har, stilles apparatet inn på egnet program med definerte parametre som omdreininger per minutt (rpm), antall sekunder og antall sykluser. Dette sikrer effektiv og reproducerbar homogenisering med minimalt svinn under prosessen (Verollet 2008).

Utførelse

Biopsibiten ble delt i to ved hjelp av steril skalpell på en RNasefri glassplate, som var vasket med isopropylpropanol. Etter veiing ble den ene biten overført til et sterilt eppendorfrør for videre mRNAkvantifisering. Den andre biopsibiten ble etter veiing overført til et Precellys rør (CK 28 kit), og tilsatt 0,32 M sukrosebuffer (Appendiks, pkt 7.2.1) i et standardisert forhold der biopsibiten utgjorde maks 5 % av løsningen. Ved små biopsier ble det benyttet 400 µl totalvolum for å sikre et adekvat homogeniseringsvolum. Rørene ble så plassert i Precellys 24 og homogenisert ved 5000 rpm, 4x50 sekunder med 3 minutters pause mellom hver runde, et program bestemt på bakgrunn av tidligere resultater (Ofstedahl 2009), og utført stresstesting. Ved utførelse av stresstesting ble en biopsiprøve homogenisert i 150, 200 og 250 sekunder, og konsentrasjonen av CYP3A4 ble målt for å se om homogeniseringstiden påvirket recovery. Mellom hver syklus ble rørene satt på is for nedkjøling. Prøvene med ferdig homogenat ble så fryst ned ved -70 °C inntil videre bearbeiding.

2.2.2 Western blott analyse

Prinsipp

Western blott, alternativt kalt protein immunoblott, er en analytisk teknikk som brukes til å detektere spesifikke proteiner i vevshomogenat eller ekstrakter. Ved tradisjonell Western appliseres prøver på en polyakrylamidgel for makromolekylær separasjon. Proteinene separeres så ved gelelektroforese (Burnette 1981). Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparat (Bio-Rad Laboratories Inc, California, UK), er et nyere apparat som optimaliserer deteksjonen av et spesifikt protein ved å immobilisere proteinet på en membran laget av nitrocellulose (dot-blotting). I tillegg kreves et spesifikt antistoff for deteksjonen av proteinet.

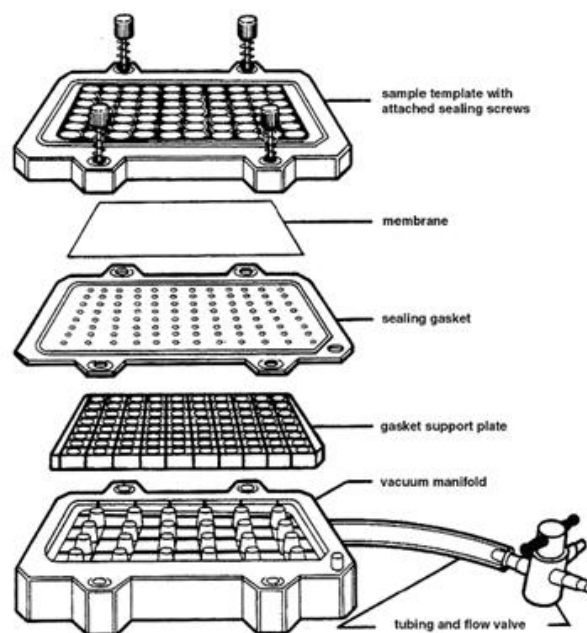
Utførelse

Det ble laget en standardrekke av rekombinante insektsmikrosomer med deklartert mengde av henholdsvis CYP3A4 (0,95 nmol/ml funnet spektrofotometrisk) og CYP3A5 (1,1 nmol/ml funnet spektrofotometrisk). For CYP3A4 ble det laget en stamløsning av mikrosomer fortynnet i kaliumfosfatbuffer (Appendiks, pkt 7.2.2) i forholdet 1:50. Denne løsningen ble videre blandet ut med 2 x samplebuffer (Appendiks, pkt 7.2.2) tilsatt 5 % bromfenolblå og 10 % β -merkaptoetanol, i forholdet 1:1 i ulike fortynninger tilsvarende et konsentrasjonsområde fra 15,8 μ M til 63,3 μ M CYP3A4. Standardrekken for CYP3A5 ble tillaget på samme måte i konsentrasjonsområdet 16,8 μ M til 67,3 μ M. Prøvene ble til slutt kokt i 5 minutter ved 90 °C. En batch av villinstandard var fra før laget ved å blande homogenater fra flere pasienter (Oftedahl 2009). Villinstandarden ble fortynnet 1:200 og preparert på samme måte som standardrekkene. Pasientprøvene ble tillaget på samme måte som standardrekkene, og fortynnet for å få dem innenfor det lineære konsentrasjonsområdet. De ble ytterligere fortynnet og reanalysert om de lå utenfor konsentrasjonsområdet for standardrekken.

Western blotting

Blotteprosessen ble utført ved en ny western blotting teknologi som vist tidligere, såkalt dot-blott (Oftedahl 2009). Nitrocellulosemembranen ble klippet til og fuktet med tween-bufret saltvannsløsning (TBS) (Appendiks, pkt 7.2.2) i 10 minutter. Biodot-apparatet ble satt sammen som vist i Figur 10. Skruene ble festet diagonalt for hverandre. Vakuum ble koblet til og skruene ble festet ytterligere. Ventilen ble åpnet for luft med vakuum av, og membranen ble refuktet med 100 μ l TBS ved hjelp av 8-kanalspipette. Bufferen ble forsiktig

trukket gjennom membranen ved hjelp av vakuum. Apparatet ble så koblet fra vakuum, og prøvene ble applisert (15 μ l) etter først å ha blitt virvlet på whirlmikser (Heigar lab). Standardrekken og alle prøver ble tilsatt i to paralleller, villinstandarden ble tilsatt i to paralleller eller mer, og negativ kontroll ble tilsatt i seks paralleller. Prøvene passerte gjennom filteret kun ved hjelp av gravitasjonskraften. Etter 30 minutter ble membranen sugd tørr ved hjelp av vakuum. Det ble tilsatt 2 x 200 μ l tris-tween-bufret saltvannsløsning (T-TBS) (Appendiks, pkt 7.2.2) til alle brønner. Bufferen ble forsiktig trukket gjennom membranen ved hjelp av vakuum, og blotteprosedyren fortsatte med modifisert versjon av Westernmetode.



Figur 10: Sammenkobling av bio-dot apparatet. Figuren er hentet fra BioRad Dot-Blot bruksmanual.

Membranen ble så inkubert i blotto (Appendiks, pkt 7.2.2), 30 ml/membran, og vippet på ”bellydancer” (Alfa-lab) i 60 minutter ved romtemperatur. Blotto ble deretter fjernet og primært antistoff fortynnet i 30 ml blotto ble tilsatt, for så å bli satt til vipping i romtemperatur 1-2 timer, alternativt over natt i kjølerom. Membranen ble vasket med 30 ml blotto (Appendiks, pkt 7.2.2), 3 x 10 minutter. Peroksidasemerket sekundært antistoff fortynnet i 30 ml blotto ble tilsatt og brettet ble vippet på ”bellydancer” i 60 minutter ved

romtemperatur. Membranen ble deretter skylt 2 ganger, for så å bli vasket med T-TBS 3 x 10 minutter.

For å kunne kvantifisere CYP3A4 og CYP3A5 på samme membran ble standardrekket for begge enzymer avsatt på hver sin side av membranen. Pasientprøvene ble så applisert, etterfulgt av vipping med blotto i 60 minutter. Membranen ble så klippet i to, og lagt i hver sin beholder tilsatt primært antistoff for henholdsvis CYP3A4 og CYP3A5.

Tabell 2: Oversikt over de ulike antistoffene og fortyninger brukt ved Western blotting.

Protein	Primært antistoff	Fortynning	Sekundært antistoff	Fortynning
CYP3A4	Kanin anti-CYP3A4 mab	1:10 000	Geit anti-kanin mab	1:3 000
CYP3A5	Kanin anti-CYP3A5 mab	1:10 000	Geit anti-kanin mab	1:3 000
Villin	Mus anti-villin mab	1:10 000	Geit anti-mus mab	1:1 500

Fremkalling i mørkerom

Membranen ble inkubert med 8 ml "enhanced chemiluminescence" (ECL) reagens i 1 minutt, og pakket inn i plastfolie. Eventuelle luftansamlinger ble trykket bort. Membranen ble så lagt i fremkallingskassetten med film (Kodak BioMax Ms Film) og eksponert i ønsket tid. Eksponeringstiden varierte fra membran til membran. For CYP3A4 varierte det mellom 22 og 40 minutter, og for CYP3A5 mellom 15 og 30 minutter. Filmen ble fremkalt i 30 sekunder i Kodak LX-24 røntgenfremkaller (50 ml fremkaller + 150 ml vann), skylt i vann, fiksert i 5 minutter i Kodak AL-4 røntgenfiksator (50 ml fiksatør + 150 ml vann) og skylt i springvann i 1 minutt før den ble hengt opp til tork.

Kvantifisering av proteiner

Filmen med bildet av dot-blottet ble skannet med vanlig hp Scanjet 5590 skanner (Hewlett-Packard Norge as, Oslo, Norge) via skanningsprogrammet HP Photo Imaging (Hewlett-Packard Norge as, Oslo, Norge). Bildene ble lagret som TIFF-filer og importert til dataprogrammet GeneTools (SynGene, Cambridge, UK), et bildeanalyseprogram utviklet for alle former for geler, som kvantifiserer intensiteten av flekkene der prøve ble påført. Dot-blott flekkene ble lokalisert manuelt, og bakgrunnen ble korrigert for. Resultatene ble deretter eksportert direkte i Excel 2007 og Graphpad Prism versjon 5. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av respektive standardrekker ved lineær regresjon, og villinkonsentrasjonen i pasientprøvene ble relatert til villinstandard ved hjelp av gitte formel:

$$\text{Relativt forhold til villinstandard} = \frac{\text{Intensitet villin prøve}}{\text{Intensitet villin standard}} \times \frac{\text{Fortynning villin prøve}}{\text{Fortynning villin standard}}$$

CYP3A4 og CYP3A5 ble kvantifisert i biopsier tatt fra duodenum, jejunum, ileum, magesekk og lever. For de av pasientene der det var tatt en PK3-prøve, ble konsentrasjonen av enzymer fra ileum 2 år etter operasjon (PK3) estimert. Estimert CYP3A4- og CYP3A5-konsentrasjon ble korrigert for villin, og angitt i pmol CYP3A/villinstandard.

Spesifisitet av CYP3A4 og CYP3A5 antistoff

For å undersøke spesifisiteten til antistoffene ble en membran påført standardrekker i 2 paralleller for CYP3A4 og CYP3A5. Konsentrasjonsområdet var henholdsvis 15,8 µM til 63,3 µM for CYP3A4 standardrekken og 16,8 µM til 67,3 µM for CYP3A5 standardrekken. Membranen ble først blottet for CYP3A4, deretter strippet, for så å bli blottet for CYP3A5.

Stripping av membranen og deteksjon av villin

Villinstandard ble avsatt på samtlige membraner for senere deteksjon. Etter gjennomført kvantifisering av henholdsvis CYP3A4 og CYP3A5, ble membranen inkubert med strippebuffer (Appendiks, pkt 7.2.2) og plassert i et 50 graders vannbad i 30 minutter med vipping. Enkelte membraner ble strippet med en strippebuffer ferdiglaget av produsent. Disse ble da inkubert med 30 ml strippebuffer (Thermo scientific, Rockford, USA) i

romtemperatur i 15 minutter. Videre ble det for begge prosedyrene vasket med store volum T-TBS i 2 x 10 minutter. Prosedyren fortsatte deretter som beskrevet tidligere (under avsnittet western blotting), med reblokkering av membranen i blotto 60 minutter, for så å bli inkubert med tilhørende primære- og sekundære antistoff.

Validering av metoden

I tråd med GLP ble det utført en validering av intradag- og interdagpresisjon. Det ble avsatt 5 paralleller med CYP3A4 standardrekke på samme membran. Relativt standardavvik ble beregnet, og prosentvis avvik notert. Det ble gjort en validering av spatialvariasjon i 4 cm duodenum tatt fra en pasient, delt opp i 10 biter. Samtlige biter ble preparert på samme måte som pasientprøvene. CYP3A4 innhold ble kvantifisert, og totalprotein ble målt i hver bit, variasjonskoeffisienten ble deretter beregnet. Ved validering av interdagpresisjon, ble en og samme biopsiprøve tatt fra duodenum i pasient 1 avsatt i 2 paralleller og fremkalt på 3 ulike dager. CYP3A4-konsentrasjon ble kvantifisert, og variasjonskoeffisienten ble beregnet.

2.2.3 Måling av totalprotein

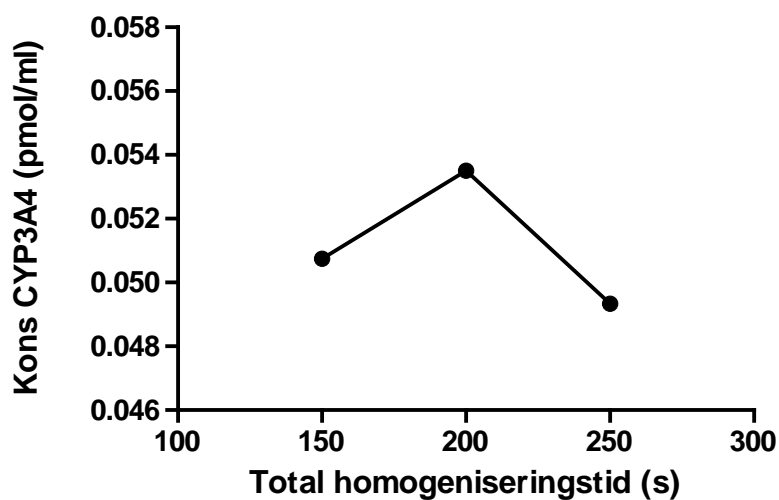
Totalprotein i vevsprøvene ble målt med utgangspunkt i metoden beskrevet av Bradford (1976). Standardrekken besto av bovint serumalbumin (BSA) og sukrosebuffer i 7 ulike konsentrasjoner fra 0 µg/ml til 300 µg/ml. Vevsprøvene ble fortynnet i sukrosebuffer, og 10 µl av hver prøve, ble pipettert ut på en 96-brønners mikroplate i 2 paralleller. Bio-Rad Protein Assay fargeløsning (200 µl), bestående av 10 ml Bio-Rad med Coomassie Brilliant Blue G-250 og 40 ml destillert vann, ble så pipettert i hver brønn med proteinløsning. Platen ble inkubert i 5 minutter for å oppnå kompleksdannelse mellom fargeløsningen og proteinene. Komplekset som dannes mellom proteinet og Bio-Rad reagensen, øker absorpsjonsnivået fra 365 til 595 nm, og den totale totalproteinkonsentrasjonen ble derfor estimert via spektrofotometrisk måling ved 595 nm bølgelengde i Wallac 1420 (Perkin Elmer). Deretter ble tilhørende verdier beregnet fra standardkurven ved hjelp av lineær regresjon.

3. RESULTATER

3.1 Optimalisering av metode

3.1.1 Homogenisering

For å finne et optimalt homogeniseringsprogram for biopsiene, ble ulike tidsintervall testet, og recovery beregnet. Detektert konsentrasjon av CYP3A4 viste en topp etter 4 sykluser på 50 sekunder hver (Figur 11). På bakgrunn av dette ble denne tiden benyttet videre.

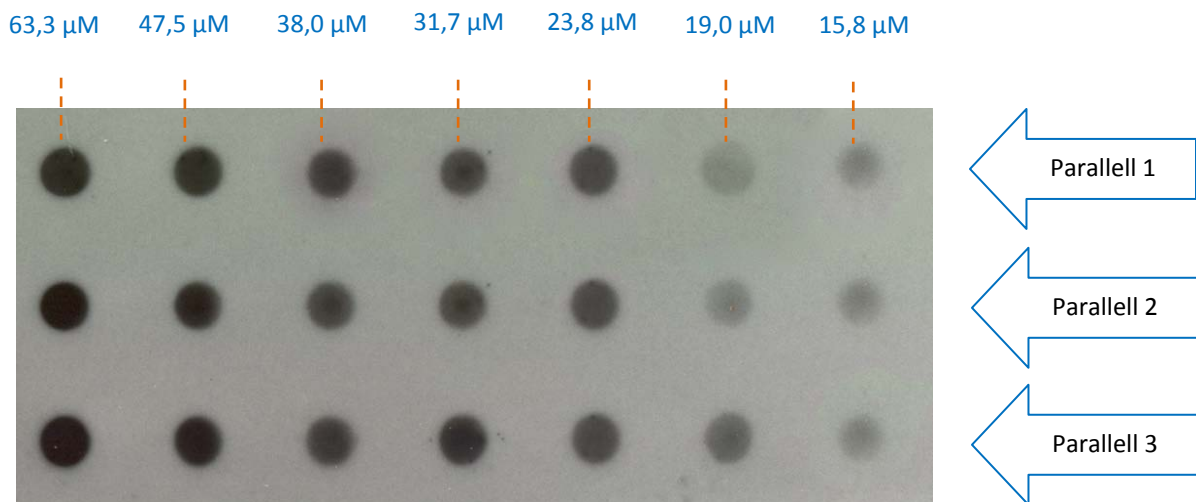


Figur 11: Grafen viser konsentrasjonen av CYP3A4 (pmol/ml) målt i samme homogenat fra duodenum etter henholdsvis 150, 200 og 250 sekunder homogenisering.

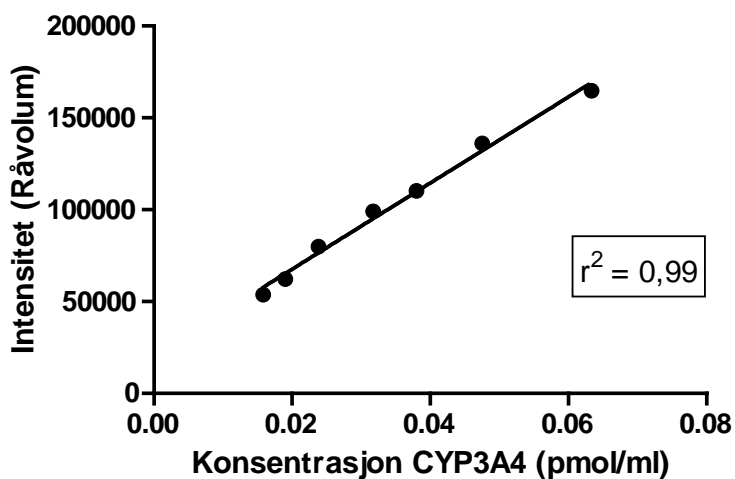
3.1.2 Western blott

CYP3A4

Dot-blott av en CYP3A4 standardrekke (3 paralleller) viste en tydelig lineær nedgang i signal med økende fortykning fra 15,8-63,3 μM (Figur 12). Standardkurven viste en tilfredsstillende korrelasjon (Figur 13).



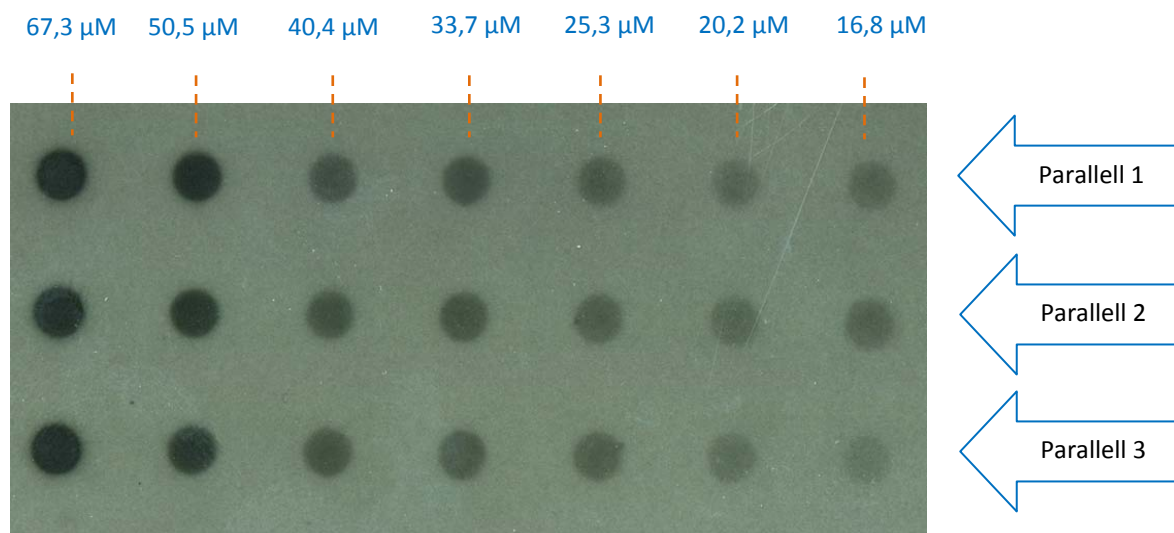
Figur 12: Standardrekke for rekombinante insektmikrosomer med CYP3A4 avsatt i 3 paralleller på nitrocellulosemembran i 7 ulike fortyninger.



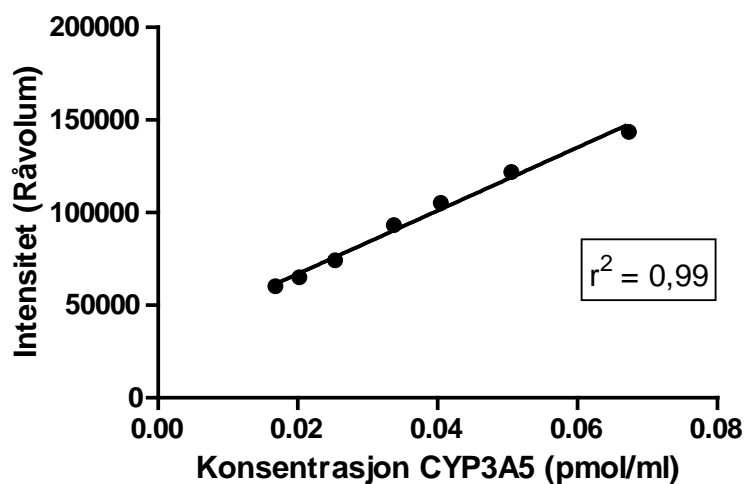
Figur 13: Standardkurve for CYP3A4 beregnet der hvert punkt er gjennomsnittet av 3 paralleller. Lineær regresjon ga korrelasjonsverdi på 0,99.

CYP3A5

Dot-blott av en CYP3A5 standardrekke (3 paralleller) viste samme tydelige lineære nedgang i signal som CYP3A4 med økende fortynning fra 16,8-67,3 μM (Figur 14). Standardkurven viste en tilfredsstillende korrelasjon (Figur 15).



Figur 14: Standardrekke for rekombinante insektmikrosomer med CYP3A5 avsatt i 3 paralleller på nitrocellulosemembran i 7 ulike fortynninger.



Figur 15: Standardkurve for CYP3A5 beregnet der hvert punkt er gjennomsnittet av 3 paralleller. Lineær regresjon ga korrelasjonsverdi på 0,99.

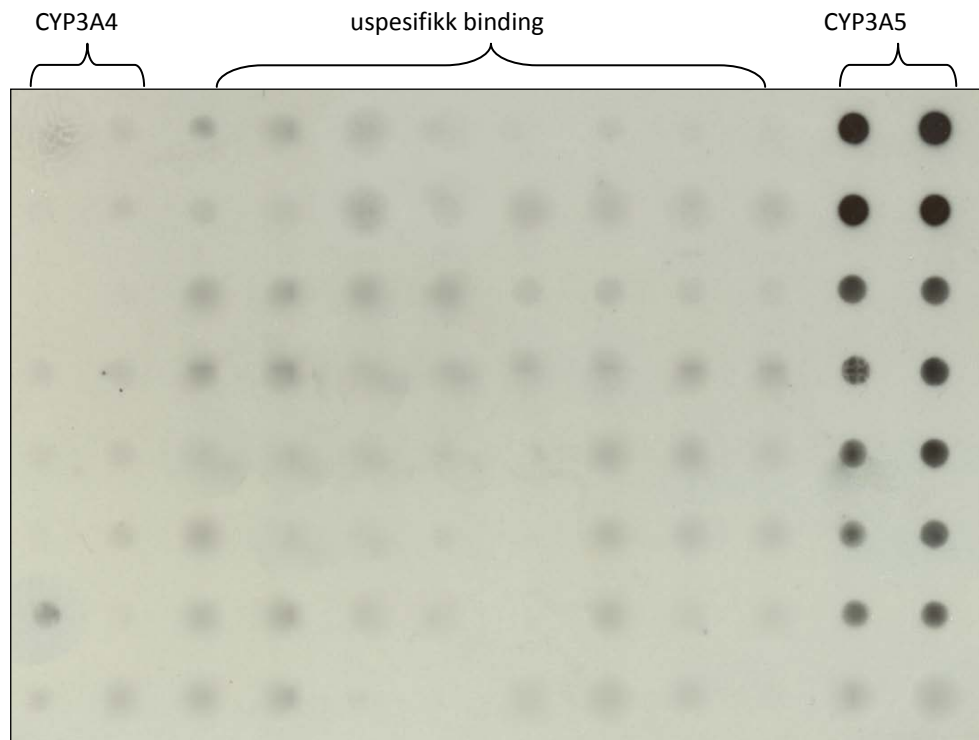
Spesifisitet av CYP3A4 og CYP3A5 antistoff

For å undersøke spesifisiteten til antistoffene ble en membran påført standardrekker i 2 paralleller for CYP3A4 (venstre side) og CYP3A5 (høyre side) (Figur 16). Membranen ble først blottet for CYP3A4, deretter strippet, for så å bli blottet for CYP3A5. Figur 16 viser at standardrekken for CYP3A4 kom tydelig frem, og det ble ikke observert kryssreaktivitet til CYP3A5 standardrekken. En minimal grad av uspesifikk binding ble observert i de tomme brønnene.



Figur 16: Membran påført standardrekker for CYP3A4 og CYP3A5 i 2 paralleller, blottet med antistoff spesifikt for CYP3A4.

Figur 17 viser det samme dot-blottet blottet for CYP3A5 antistoff etter stripping av CYP3A4 antistoff. De mørke flekkene indikerer en viss grad av uspesifikk binding til tomme brønner, men det ble ikke observert kryssreaktivitet mot CYP3A4.



Figur 17: Membran påført standardrekker for CYP3A4 og CYP3A5 i 2 paralleller med antistoff spesifikt for CYP3A5.

3.1.3 Validering av metoden

Intradagpresisjon

Gjennomsnittet av 5 parallelle standardrekker av CYP3A4 i 7 ulike fortynninger avsatt på samme membran ga et tilfredsstillende resultat i forhold til analysemetodens presisjon. Variasjonskoeffisienten var under 12 % for alle fortynninger (Tabell 3).

Tabell 3: Estimert intradagpresisjon av 5 parallelle standardkurver.

Fortynning	Intensitet (Gjennomsnitt \pm SD)	Variasjons- koeffisient (%)
1:15000	769090 \pm 5870	0,8
1:20000	650435 \pm 32986	5,1
1:25000	562093 \pm 50446	9,0
1:30000	510140 \pm 9153	1,8
1:40000	423661 \pm 15370	3,6
1:50000	319848 \pm 25883	8,1
1:60000	254357 \pm 29804	11,7

Spatial variasjon

Spatial variasjon fra analyse av 10 ulike biopsier tatt fra samme sted i tynntarmen til en pasient viste en variasjonskoeffisient på 26,5 %.

Interdagpresisjon

Metodens interdagpresisjon var også tilfredsstillende, hvor bestemmelse av presisjon av CYP3A4-konsentrasjon bestemt i en biopsi tatt i fra duodenum i pasient 1, avsatt i 2 paralleller på 3 ulike dager viste en variasjonskoeffisient på 9,1 %. Dette ligger godt under kravet om maksimalt avvik på 20 % (U.S Department of Health and Human Services 2001) (Tabell 4).

Tabell 4: Estimert interdagpresisjon av duodenum blottet på 3 ulike dager.

Type biopsi	pmol CYP3A4/mg totalprotein (Gjennomsnitt \pm SD)	Variasjonskoeffisient (%)
Duodenum	1,22 \pm 0,11	9,1

3.2 Resultater pasienter

3.2.1 CYP3A4

Tynntarm

CYP3A4 ble detektert i samtlige prøver tatt fra tynntarmen (Tabell 5). Estimert konsentrasjon av CYP3A4 utviste en høy grad av både intra- og interindividuell variabilitet. Gjennomsnittlig konsentrasjon av CYP3A4 i duodenum fra de 10 pasientene var 3,0 pmol/mg totalprotein. Individuelt utviste pasient 8 høyest konsentrasjon av CYP3A4 i duodenum med 5,9 pmol/mg totalprotein, mens det for pasient 9 ble kvantifisert lavest nivå med 0,8 pmol/mg totalprotein, tilsvarende en 7,4 gangers forskjell. For jejunum hadde pasient 2 høyest konsentrasjon av CYP3A4 med 3,3 pmol/mg totalprotein, og pasient 6 utviste lavest konsentrasjon med 0,2 pmol/mg totalprotein, en forskjell på 16,5 ganger. For ileum ble det kvantifisert høyest konsentrasjon av CYP3A4 for pasient 2, tilsvarende 2,7 pmol/mg totalprotein. Lavest konsentrasjon ble estimert for pasient 8 med 0,6 pmol/mg totalprotein, en forskjell på 4,5 ganger.

Gjennomsnittlig konsentrasjon av CYP3A4 i duodenum for de 10 pasientene var henholdsvis 3 og 2,5 ganger høyere i forhold til jejunum og ileum. Gjennomsnittlig CYP3A4-konsentrasjon i jejunum lå så vidt under gjennomsnittlig konsentrasjon detektert i ileum, henholdsvis 1,0 pmol/mg totalprotein og 1,2 pmol/mg totalprotein. Gjennomsnittet av CYP3A4-konsentrasjonen i duodenum, jejunum og ileum var på 1,7 pmol/mg totalprotein.

Lever

Laveste konsentrasjon av CYP3A4 ble estimert i lever, der den gjennomsnittlige konsentrasjonen var 0,5 pmol/mg totalprotein (Tabell 5). Variasjonen av CYP3A4-konsentrasjonen i lever fra person til person var liten, der pasient 3, 7 og 8 utviste laveste konsentrasjon med 0,3 pmol/mg totalprotein. Høyest konsentrasjon ble kvantifisert for pasient 5 med 0,7 pmol/mg totalprotein. En forskjell på 2,3 ganger mellom laveste og høyeste verdi.

Gjennomsnittlig totalkonsentrasjon av CYP3A4 i tynntarmen på 1,7 pmol/mg totalprotein var dermed 3,4 ganger høyere i forhold til gjennomsnittlig konsentrasjon i lever.

Magesekk

CYP3A4 ble detektert i alle pasientbiopsiene tatt fra magesekk, med store interindividuelle forskjeller (Tabell 5). Gjennomsnittlig konsentrasjon var på 0,8 pmol/mg totalprotein, med laveste konsentrasjon estimert i pasient 3 med 0,2 pmol/mg totalprotein, og høyest konsentrasjon estimert i pasient 4 med 1,4 pmol/mg totalprotein. Gjennomsnittlig totalkonsentrasjon av CYP3A4 i tynntarmen var 2,1 ganger høyere enn konsentrasjonen estimert i magesekken.

PK3

PK3 er en biopsi tatt fra den opprinnelige ileum ved gastroskopi 2 år etter gjennomgått operasjon. For de 5 pasientene der PK3 prøver ble tatt, var det store forskjeller. PK3 verdiene var jevnt over høye, med høyeste konsentrasjon for pasient 4 med 3,2 pmol/mg totalprotein, og laveste konsentrasjon for pasient 7 med 0,6 pmol/mg totalprotein, en forskjell på 5,3 ganger (Tabell 5). For 3 av pasientene hadde konsentrasjonen av CYP3A4 økt i ileum 2 år etter operasjonen. Pasient 7 utviste en lavere verdi 2 år etter.

Tabell 5: Konsentrasjon av CYP3A4 i biopsiene angitt i pmol/mg totalprotein.

	Duodenum	Jejunum	Ileum	Magesekk	Lever	PK3
Pas 1	1,1	0,5	1,0	0,4	-	2,7
Pas 2	2,7	3,3	2,7	1,1	0,5	IR
Pas 3	1,6	0,9	1,1	0,2	0,3	2,5
Pas 4	5,6	-	0,8	1,4	0,4	3,2
Pas 5	3,0	1,3	1,9	0,5	0,7	IR
Pas 6	4,7	0,2	0,7	0,9	-	IR
Pas 7	3,0	0,8	2,2	0,8	0,3	0,6
Pas 8	5,9	0,6	0,6	0,8	0,3	3,1
Pas 9	0,8	0,6	0,7	0,4	0,6	IR
Pas 10	1,2	1,0	0,8	1,0	0,5	IR
Gjennomsnitt	3,0	1,0	1,2	0,8	0,5	2,4
Standardavvik	1,8	0,9	0,7	0,3	0,1	1,0
Minimum	0,8	0,2	0,6	0,2	0,3	0,6
Maksimum	5,9	3,3	2,7	1,4	0,7	3,2

IR: Ikke rapportert

- Biopsien manglet/plastikkåret ble knust i Precellys 24

3.2.2 CYP3A5

Pasient 7 var den eneste av pasientene som uttrykte CYP3A5 i duodenum med 1,4 pmol/mg protein (Tabell 6). Denne pasienten uttrykte også en lav konsentrasjon i magesekk (< 0,1 pmol/mg protein). Pasient 4, 6, 8 og 10 uttrykte CYP3A5 kun i magesekk. Pasient 4 uttrykte CYP3A5 i størst grad tilsvarende 1,2 pmol/mg protein, mens i pasient 10 ble det funnet 1,0 pmol/mg protein. Pasient 6 og 8 uttrykte henholdsvis 0,3 pmol/mg totalprotein og 0,8 pmol/mg totalprotein. For pasient 2, som var eneste pasient heterozygot for *CYP3A5*1*, ble det ikke kvantifisert CYP3A5 i noen av prøvene. De øvrige pasientene var homozygote for *CYP3A5*3*.

Tabell 6: Konsentrasjon av CYP3A5 i biopsiene angitt i pmol/mg totalprotein. Alle unntatt pasient 2 hadde *CYP3A5*3/*3* genotype.

	Duodenum	Jejunum	Ileum	Gastrik	Lever	PK3
Pas 1	ID	ID	ID	ID	IR	ID
Pas 2 *	ID	ID	ID	ID	ID	IR
Pas 3	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Pas 4	ID	IR	ID	1,2	ID	ID
Pas 5	ID	ID	ID	ID	ID	IR
Pas 6	ID	ID	ID	0,3	IR	IR
Pas 7	1,4	ID	ID	< 0,1	ID	ID
Pas 8	ID	ID	ID	0,8	ID	1,6
Pas 9	ID	ID	ID	ID	ID	IR
Pas 10	ID	ID	ID	1,0	ID	IR
Gjennomsnitt	1,4	-	-	0,8	-	1,6
Standardavvik	-	-	-	0,4	-	-
Minimum	1,4	-	-	0,3	-	1,6
Maksimum	1,4	-	-	1,2	-	1,6

ID: Ikke detektert

IR: Ikke rapportert

* *CYP3A5*1/*3*

3.2.3 Villin

For å justere for antall enterocytter i de ulike biopsiene fra tynntarm, ble konsentrasjonen av CYP3A4 og CYP3A5 justert for konsentrasjonen av det enterocyttspesifikke proteinet villin (Se metode pkt 3.2.2). Tallene i tabell 7 viser stor inter- og intraindividuell variasjon i pmol CYP3A4/villin standard. Gjennomsnittlig konsentrasjon av CYP3A4 i duodenum fra de 10 pasientene var 9,7 pmol CYP3A4/villinstandard. Pasient 9 utviste lavest konsentrasjon med 3,6 pmol CYP3A4/villinstandard, mens det for pasient 2 ble kvantifisert høyest nivå med 20,1 pmol CYP3A4/villinstandard, tilsvarende en forskjell på 5,7 ganger. I jejunum var forskjellen på 15,8 ganger mellom laveste og høyeste verdi. Størst var variasjonen i ileum, med en forskjell på 32,4 ganger. I de pasientene der PK3 ble estimert var variasjonen lik 23,9 ganger. Pasient 7 var den eneste som uttrykte CYP3A5 i tarm, med 3,2 pmol CYP3A5/villinstandard estimert fra duodenum (Data ikke vist).

Tabell 7: Konsentrasjon av CYP3A4 i biopsiene angitt som pmol CYP3A4/villinstandard.

	Duodenum	Jejunum	Ileum	PK3
Pas 1	7,0	0,88	2,52	5,13
Pas 2	20,62	7,77	14,92	IR
Pas 3	6,41	1,49	6,12	1,87
Pas 4	6,62	-	3,11	11,94
Pas 5	13,50	2,10	3,58	IR
Pas 6	4,09	0,69	2,86	IR
Pas 7	16,15	0,69	5,50	0,5
Pas 8	9,07	0,49	1,09	2,89
Pas 9	3,61	0,67	0,46	IR
Pas 10	9,27	0,60	0,59	IR
Gjennomsnitt	9,70	1,71	4,08	4,47
Standardavvik	5,83	2,33	4,26	4,51
Minimum	3,61	0,49	0,46	0,5
Maksimum	20,62	7,77	14,92	11,94

IR: Ikke rapportert
- Biopsien manglet

3.2.4 Måling av totalprotein

Totalproteinkonsentrasjonen for samtlige pasienter ble estimert ut i fra vevsprøvene ved hjelp av spektrofotometrisk måling (Appendiks, pkt 7.2.4).

3.2.5 Farmakokinetikkdata for pasientpopulasjonen

Farmakokinetikkdata fra den overordnede studien er presentert i tabell 8. For 9 av 10 pasienter økte systemisk eksponering av atorvastatinsyre etter gjennomgått BPD-DS (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010). AUC_{0-8} ratio for atorvastatinsyre viste en gjennomsnittlig økning på 2 ganger. Absolutte verdier for AUC_{0-8} varierte fra 14 til 153 ng·h/mL preoperativt, og fra 27 til 221 ng·h/mL postoperativt. AUC_{0-8} ratio for disse var $2,17 \pm 0,98$. En pasient viste ingen endring i systemisk eksponering av atorvastatinsyre etter operasjonen (AUC_{0-8} ratio lik 1,0).

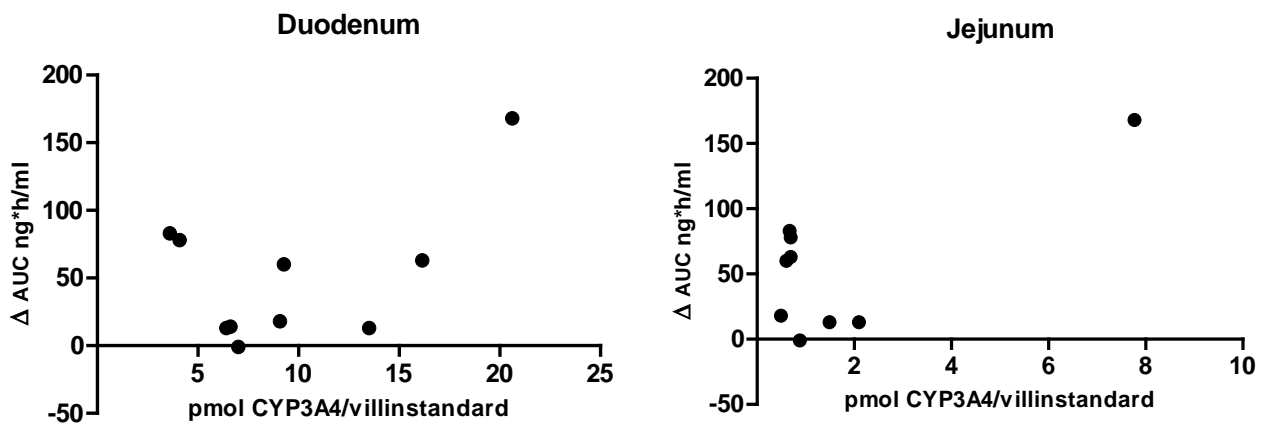
Tabell 8: Farmakokinetiske data for pasientpopulasjonen. Tabellen viser systemisk eksponering av atorvastatinsyre før (pre) og etter (post) operasjonen, målt i ng·h/ml. Endringen i $AUC_{(0-8)}$ etter operasjonen er vist som ratio og ΔAUC (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010).

Pasient	Dose	$AUC_{(0-8)}$ (ng·h/ml) Pre	$AUC_{(0-8)}$ (ng·h/ml) Post	Ratio AUC	ΔAUC
1	20	44	43	1,0	-1
2	20	53	221	4,2	168
3	20	14	27	1,9	13
4	20	17	31	1,8	14
5	20	38	51	1,3	13
6	60	89	167	1,9	78
7	80	153	216	1,4	63
8	20	18	36	2,0	18
9	40	133	216	1,6	83
10	20	25	85	3,4	60
Gjennomsnitt	30	59	53	2,0	50,9
Minimum	20	14	27	1,0	-1
Maksimum	80	153	221	4,2	168
Standardavvik	19,4	50,0	3,1	1,0	51,3

AUC = Areal under plasma-konsentrasjons-tidskurven

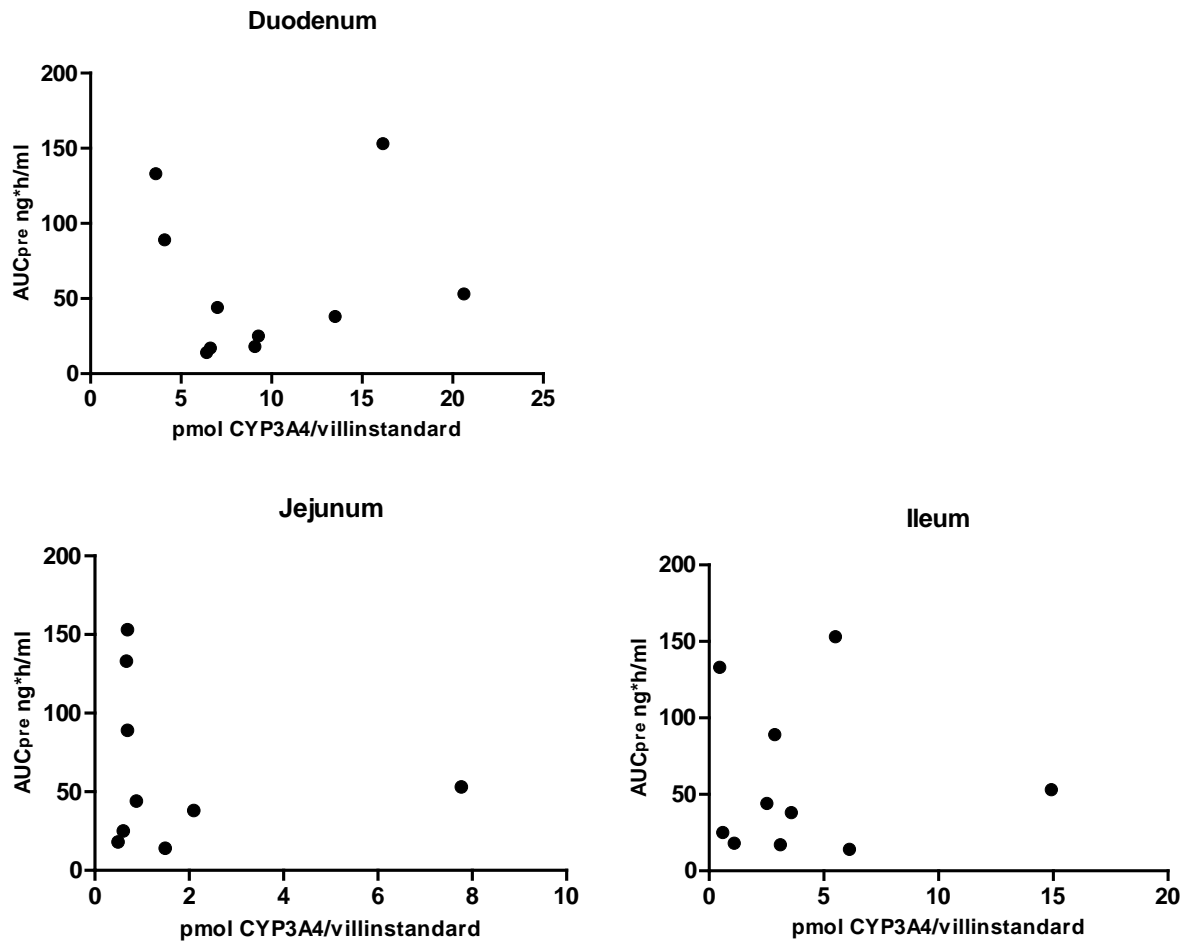
3.2.6 Linken mellom uttrykt CYP3A4 og kinetikdata

For samtlige pasienter ble proteinuttrykket av CYP3A4 i duodenum og jejunum relatert til forandring i AUC (AUC etter operasjon – AUC før operasjon). Ved sammenligning av CYP3A4-konsentrasjonen i bortkoblet tarm og forandring i AUC, så tenderte det til å være en større økning i biotilgjengelighet med økende konsentrasjon av CYP3A4 i duodenum (Figur 18). Data for jejunum viste ingen sannsynlig sammenheng med endret biotilgjengelighet (Figur 18).



Figur 18: CYP3A4-konsentrasjoner i duodenum og jejunum (pmol CYP3A4/villinstandard) for alle pasienter korrelert til endringen i AUC (AUC etter operasjon – AUC før operasjon).

For samtlige pasienter ble proteinuttrykket av CYP3A4 i duodenum, jejunum og ileum relatert til AUC før operasjonen. Pasienten som i størst grad uttrykte CYP3A4 i duodenum (20,6 pmol CYP3A4/villinstandard) utviste relativt lav systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (53 ng*h/ml). Pasienten som uttrykte CYP3A4 i lavest grad i duodenum (3,6 pmol CYP3A4/villinstandard), utviste relativt høy systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (133 ng*h/ml) (Figur 19). Sammenhengen var ikke like uttalt for de andre pasientene. For jejunum og ileum så det ikke ut til å være en sammenheng mellom uttrykk av CYP3A4 og AUC før operasjonen. Resultater for antall pmol CYP3A4/villinstandard estimert for hver pasient er presentert i Appendiks pkt 7.2.3.



Figur 19: CYP3A4-konsentrasjoner i duodenum, jejunum og ileum (pmol CYP3A4/villinstandard) for alle pasienter korrelert til AUC før operasjonen.

4. DISKUSJON

4.1 Optimalisering av metode

4.1.1 Homogenisering

Ved optimalisering av tidligere utviklet metode (Ofstedahl 2009) ble det i denne oppgaven brukt hele homogenat fra de ulike biopsiene, framfor S9 fraksjoner som er betegnelsen på en mikrosomfraksjon isolert ved sentrifugering av et homogenat. Bakgrunnen for dette var at det i tidligere forsøk ble brukt S9 fraksjoner opparbeidet ved differensiell fraksjonering, noe som resulterte i ufullstendig fraksjonering. Det ble gjenfunnet CYP3A4-enzymet i supernatanten, og enzymverdier for supernatant og pellet ble derfor slått sammen (Ofstedahl 2009). Dette er i samsvar med resultater fra Lown *et al.* (1994), som utførte en studie hvor verdier fra S9 fraksjoner ble sammenlignet med hele homogenat. Der ble det vist at over 80 % av CYP3A4 enzymene ble tapt under opparbeidelse av S9 fraksjon ved differensiell fraksjonering sammenlignet med homogenat.

Vevsprøvene ble etter deling homogenisert ved hjelp av Precellys 24. Blending, vortexing, morter og pistill er tradisjonelle metoder brukt for å ødelegge vev for å frigjøre aminosyrer og proteiner. Disse metodene kan være tidkrevende, og man bruker gjerne tid på å lære seg rett teknikk. Precellys 24 er et apparat med tilhørende kit i ulike utgaver, utviklet spesielt for forskjellige vev. Rørene blir ristet i apparatet med definert tid, hastighet, antall sykluser og spesifisert pause mellom hver syklus. Dette er med på å øke reproducerbarhet, spare tid og minske svinn (Bertin 2009). Foreløpig er det få publikasjoner som angir bruken av Precellys 24. En studie utført i 2008 påpekte imidlertid apparatets optimaliseringsegenskaper (Wu, Southam *et al.*). Precellysen ble i denne studien brukt til å homogenisere lever fra 3 ulike fiskearter, for videre NMR- og MS-analyse. Det foreligger ingen studier på bruken av Precellys 24 for humant vev, men på selskapets hjemmeside er det lagt ut protokoller som henviser til bruk av apparatet på flere ulike vev, deriblant lever, hjerte, muskel, hjerne og bein (Bertin 2009).

Under utviklingen av metoden som ble benyttet i denne oppgaven, ble vevsprøvene homogenisert i sykluser på 3 x 50 sekunder, med en pause på 60 sekunder mellom hver

syklus uten nedkjøling (Oftedahl 2009). Under homogeniseringen kan CYP-enzymene denaturere og ødelegges av varmeutviklingen som oppstår. For å unngå dette ble homogenatene i denne oppgaven avkjølt på is i 3 minutter mellom hver syklus. Under optimalisering av denne metoden ble det også testet ut hvilken tidssyklus som ga best utbytte. Det ble testet for 150, 200 og 250 sekunder av en biopsi tatt fra duodenum. Best utbytte ble det ved homogenisering i 200 sekunder, og denne homogeniseringstiden ble derfor anvendt for alle biopsiene. Ved 250 sekunder ble det sett en svak nedgang i detektert konsentrasjon av CYP3A4-enzymet. En mulig årsak til dette kan være nevnte varmeutvikling som ødelegger CYP-enzymene. Biopsiene som ble brukt varierte i størrelse og vevssammensetning. En biopsi tatt fra leveren er mykere i forhold til en biopsi tatt i fra magesekken som inneholder mye bindevev. Det er derfor mulig at hvert vev trenger et eget program beregnet på størrelse og mykhet, men på grunn av lite prøvemateriale var det ikke gjennomførbart å teste dette i denne studien.

4.1.2 Western blott

Det ble benyttet en modifisert versjon av Western blott, kalt dot-blott, som representerer en forenkling av Western blott ved at støping av gel med påfølgende gel-elektroforese unngås. Imidlertid trengs et spesifikt antistoff for deteksjonen av proteiner. Validering av metoden viste tilfredsstillende interdag- og intradagpresisjon for bestemmelse av CYP3A4- og CYP3A5-enzymet. Resultatene lå godt under kravene fastsatt av U.S. Department of Health and Human Services for bioanalytiske metoder. Standardrekkene viste god linearitet med en regresjonskoeffisient mellom 0,97-0,99 funnet ved lineær regresjon. Interdagpresisjon ble målt ved blotting av en prøve tatt fra duodenum i pasient 1, avsatt i 2 paralleller på 3 ulike dager. God interdagpresisjon viser at metoden er velegnet til sammenligning av prøver på tvers av membraner. På membraner blottet for både CYP3A4 og CYP3A5 viste begge antistoffene god spesifisitet.

4.2 Uttrykk av CYP3A-enzymmer i pasienter

4.2.1 Pasientprøver CYP3A4

Tynntarm

Resultatene oppgitt som pmol CYP3A4/villinstandard i denne oppgaven viste store inter- og intraindividuelle forskjeller. Gjennomsnittsverdien funnet i duodenum for de 10 pasientene var på 9,7 pmol CYP3A4/villinstandard, med en forskjell fra laveste til høyeste verdi på 5,7 ganger. For jejunum var gjennomsnittsverdien på 1,7 pmol CYP3A4/villinstandard, og forskjellen mellom laveste og høyeste verdi var på 15,8 ganger. Størst var variasjonen i ileum med en forskjell på 32,4 ganger mellom laveste og høyeste verdi, og en gjennomsnittskonsentrasjon på 4,1 pmol CYP3A4/villinstandard. Den villinkorrigerte gjennomsnittskonsentrasjonen av CYP3A4 i duodenum, jejunum og ileum var på 5,2 pmol CYP3A4/villinstandard. Prosedyren med korreksjon for villin fungerer som en intern standard for enterocytter, og benyttes for å normalisere innholdet av andre proteiner i forhold til biopsidybde (Lown, Bailey *et al.* 1997).

Ved å relatere konsentrasjonen av CYP3A4 til totalproteinmålingene, ble det for duodenum funnet en gjennomsnittsverdi på 3,0 pmol CYP3A4/mg totalprotein, og en interindividuell forskjell på 7,4 ganger i de 10 pasientene. I jejunum var den interindividuelle forskjellen størst med 16,5 ganger, og en gjennomsnittsverdi på 1,0 pmol CYP3A4/mg totalprotein. Variasjonen i tynntarmen var minst i ileum, tilsvarende 4,5 ganger forskjell fra laveste til høyeste verdi, og en gjennomsnittskonsentrasjon estimert til 1,2 pmol CYP3A4/mg totalprotein. Gjennomsnittskonsentrasjonen av CYP3A4 i duodenum, jejunum og ileum var på 1,7 pmol CYP3A4/mg totalprotein. I CYP3A subfamilien representerer CYP3A4 det isoenzymet som uttrykkes i størst grad i lever og tarm hos voksne mennesker (Paine, Hart *et al.* 2006). Det er imidlertid stor enighet om at CYP3A4 utviser store inter- og intraindividuelle forskjeller (Paine, Khalighi *et al.* 1997). I denne oppgaven ble det kvantifisert CYP3A4-enzymet fra homogenat opparbeidet fra humane skjærebiopsier. Lin *et al.* (2002) kvantifiserte en gjennomsnittlig konsentrasjon på 17 pmol CYP3A4/mg totalprotein i jejunum ved Western blotting fra homogenat opparbeidet fra 31 humane

biopsier. Denne konsentrasjonen er i samme størrelsesorden som konsentrasjonen av CYP-enzymmer estimert i fra tynntarm i denne oppgaven.

Ved sammenligning av verdiene for CYP3A4 korrigert for villinstandarden og verdiene korrigert for totalproteinkonsentrasjon, er det liten variasjon mellom duodenum og jejunum. For ileum er forskjellen større. På grunn av at mengde villin er høyest i duodenum, og avtar ned mot ileum, vil dette kunne gi en falsk forhøyet konsentrasjon av CYP-enzymmer i ileum. Dette vanskeliggjør sammenligning av CYP3A4/villinstandard-verdier mellom duodenum, jejunum og ileum. Imidlertid kan man sammenligne innad i hvert tarmsegment for hver pasient, og mellom pasienter. Siden studiene ofte varierer i måten villinstandarden er preparert på, og hvilken metode som er brukt for å isolere enterocytene, bør forsiktighet utvises ved sammenligning av studier på tvers av ulike laboratorier. I tillegg er det ikke mulig å kvantifisere villin da ingen deklarerer standard finnes, noe som ytterligere kompliserer sammenligning med andre studier. Ved bruk av totalprotein som en korreksjonsfaktor, er det mulig å sammenligne på tvers av tarmsegmenter. Imidlertid vil det ved måling i hele homogenater resultere i et høyere proteinnivå i forhold til subcellulære fraksjoner, hvor man sentrifugerer vekk store deler av proteinmengden. Dermed blir verdien man får i pmol CYP3A4/mg totalprotein fra homogenat lavere, som et resultat av at nevneren blir større. For å si hva som fungerer best av villin og totalprotein som korreksjonsfaktor, må videre studier utføres. Som nevnt senere i diskusjonen, vil det optimale være å estimere total mengde CYP-enzymmer i tarmen som kobles bort.

De fleste studiene publisert innenfor dette området baserer seg på konsentrasjoner av CYP-enzymmer estimert i mikrosomfraksjoner fra tarm. Det er rapportert opptil 30 gangers interindividuell variabilitet i uttrykket av CYP3A4, noe som bidrar til stor variasjon i resultatene publisert av ulike forfattere. Paine *et al.* (2006) kvantifiserte CYP3A4 ved Western blotting, fra mikrosomer opparbeidet ved skraping av mukosa i duodenum og jejunum hos 31 pasienter. Gjennomsnittlig innhold som ble funnet var 58 pmol CYP3A4/mg totalprotein. Laveste verdi var 8,8 pmol/mg totalprotein, og høyeste verdi var 150 pmol/mg totalprotein, tilsvarende en interindividuell forskjell på 17 ganger. Dette samsvarer med en 16,5 gangers forskjell fra laveste til høyeste verdi funnet i jejunum i denne oppgaven. Watkins *et al.* (1987) fant 70 pmol CYP3A4/mg totalprotein i mikrosomer opparbeidet fra jejunum, og De Waziers *et al.* (1990) kvantifiserte et gjennomsnittlig innhold på 160, 120 og

70 pmol CYP3A4/mg totalprotein i mikrosomer opparbeidet fra humane biopsier fra henholdsvis duodenum, jejunum og ileum. Resultatene i denne oppgaven kan ikke sammenlignes med nevnte studier når det gjelder CYP3A4-konsentrasjoner, da totalproteininnholdet er ulikt. I denne oppgaven ble totalprotein målt i hele homogenater, mens det ved bruk av mikrosomer måles i subcellulære fraksjoner.

En annen årsak til de lave verdiene funnet i dette arbeidet sammenlignet med andre studier, kan være at det i de fleste andre studiene er brukt mikrosomer som er opparbeidet fra mukosale skrapinger. I tynntarmen uttrykkes CYP-enzymene kun i modne enterocytter lokalisert i tuppen av villi, og representerer derfor kun en fraksjon av cellene man får fra en biopsi kontra skraping av mukosa. Det ble derfor korrigert for villin i denne oppgaven, men som nevnt tidligere bør forsiktighet utvises ved sammenligning av studier på tvers av hverandre.

Lever

Gjennomsnittlig CYP3A4-konsentrasjon i lever ble estimert til 0,5 pmol/mg protein for de 10 pasientene. Det var liten interindividuell variasjon med en 2,3 gangers forskjell fra minste til høyeste verdi. Gjennomsnittlig totalkonsentrasjon av CYP3A4/mg totalprotein i tynntarmen var 3,4 ganger høyere enn gjennomsnittlig konsentrasjon i lever.

Tidligere publikasjoner antyder at CYP3A4 innhold er betraktelig lavere i tarm i forhold til lever (Paine, Khalighi *et al.* 1997; Lin, Dowling *et al.* 2002). Westlind-Johnsson *et al.* fant et gjennomsnittlig innhold på 155,8 pmol CYP3A4/mg totalprotein ved Western blotting, i en studie av levermikrosomer opparbeidet fra 46 humane biopsier. Resultatene varierte fra 15,2 pmol/mg protein til 600,7 pmol/mg protein, en variasjon på 40 ganger (2003). Denne forskjellen er betraktelig større i forhold til variasjonen i leverkonsentrasjoner funnet i dette arbeidet. En mulig årsak til dette kan være at majoriteten av leverprøvene fra Westlind-Johnssons studie var tatt fra pasienter som sto på ulike medikamenter grunnet sykdom. Dette kan føre til en indusering av CYP-enzymmer. I tillegg hadde denne studien leverprøver tatt fra en større pasientpopulasjon tilsvarende 46 pasienter, i forhold til leverprøver fra 8 pasienter i denne oppgaven. Shimada *et al.* estimerte et innhold på 96 ± 51 pmol CYP3A4/mg totalprotein i mikrosomer opparbeidet fra 46 humane leverbiopsier (1994). Kvantitative konsentrasjoner av CYP3A4 i samtlige leverprøver funnet i denne oppgaven, er lavere i forhold til resultatene publisert i nevnte studier. Som nevnt tidligere kan en mulig forklaring

være at homogeniseringen kan ødelegge og denaturere CYP-enzymmer. Det kan derfor være aktuelt å forsøke å benytte en kortere homogeniseringstid av leverprøvene. En annen forklaring på de lave verdiene kan være at biopsiene er tatt fra et område i leveren som sannsynligvis inneholder en lavere konsentrasjon av CYP-enzymmer enn hva tilfellet er for resten av leveren. I følge kirurgene som opererte BPD-DS pasientene, ble biopsiene tatt fra ytterkanten av leveren. CYP-enzymene er i utgangspunktet jevnt fordelt i hele leveren (Watkins, Murray *et al.* 1990; Debri, Boobis *et al.* 1995). Imidlertid er leveren dekket av et kapsellag, noe som gjør vevet i kantene mer fibrøst (Martini and Ober 2006). Det er derfor sannsynlig at det er mindre CYP-enzymmer lokalisert i det fibrøse vevet, så dette kan være en medvirkende årsak til det lave nivået CYP-enzymmer funnet i leverbiopsiene. Det ble altså funnet en betydelig høyere CYP3A4-konsentrasjon i tynntarm i forhold til lever i denne oppgaven. I samsvar med dette ble det i en lignende studie utført av Von Richter *et al.* (2004) funnet 3 ganger høyere konsentrasjon av CYP3A4 i tynntarm i forhold til lever, henholdsvis $76,0 \pm 50,6$ pmol CYP3A4/mg homogenat protein og $23,6 \pm 17,4$ pmol CYP3A4/mg homogenat protein.

For å studere betydningen av konsentrasjonen CYP-enzymmer i tynntarm og lever for biotilgjengeligheten av legemidler, er det nødvendig å estimere mengden CYP i de ulike organene. Dette krever informasjon om mg mikrosomalt protein/g lever/tarm og homogenat protein/g lever/tarm. I en artikkel publisert av Yang *et al.* (2004) ble et regnestykke for korreksjon av CYP-enzymmer i enterocytter i forhold til CYP-enzymmer i lever foreslått. Etersom regnestykket baserte seg på enterocytter, var det ikke gjennomførbart å gjøre samme korreksjon i denne oppgaven på grunn av at det ble benyttet biopsier tatt med saks. Det ble forsøkt å korrigere for tarmvekt i forhold til levervekt, ved å detektere CYP-enzymmer og måle totalprotein fra en 4 centimeters tarmbit delt i 10 biter. Tanken bak var å gange opp antall mg totalprotein/g biopsi med vekt av biopsibit for å finne mg totalprotein/4 cm tarm, for så og gange opp dette med hele tarmlengden. På denne måten kunne man i teorien sammenligne antall CYP-enzymmer i tynntarm med CYP-enzymmer i lever. I ettertid viste det seg at tarmbiten var klippet på tvers av tarmen i motsetning til pasientbiopsiene som var klippet ut av lumen. Grunnet dette kunne ikke resultatene fra den 4 cm lange tarmbiten brukes for å korrigere mot resultatene fra lever. Nytt normaliseringmateriale må derfor samles inn.

Magesekk

Interessant var det at det i denne oppgaven ble kvantifisert et gjennomsnittlig nivå på 0,8 pmol CYP3A4/mg totalprotein i magesekk. Et resultat som er lavere i forhold til tynntarm, men høyere enn for lever. Det er gjort få studier på uttrykk av CYP-enzymmer i magesekk. Canaparo *et al.* (2007) fant imidlertid en gjennomsnittlig konsentrasjon på 1,9 pmol CYP3A4/mg protein, i en studie av homogenat opparbeidet fra vevsprøver fra magesekk. Sammenlignet med resultatene fra Canaparos studie, er konsentrasjonen av CYP3A4 funnet i magesekk for denne oppgaven i samme størrelsesorden.

PK3

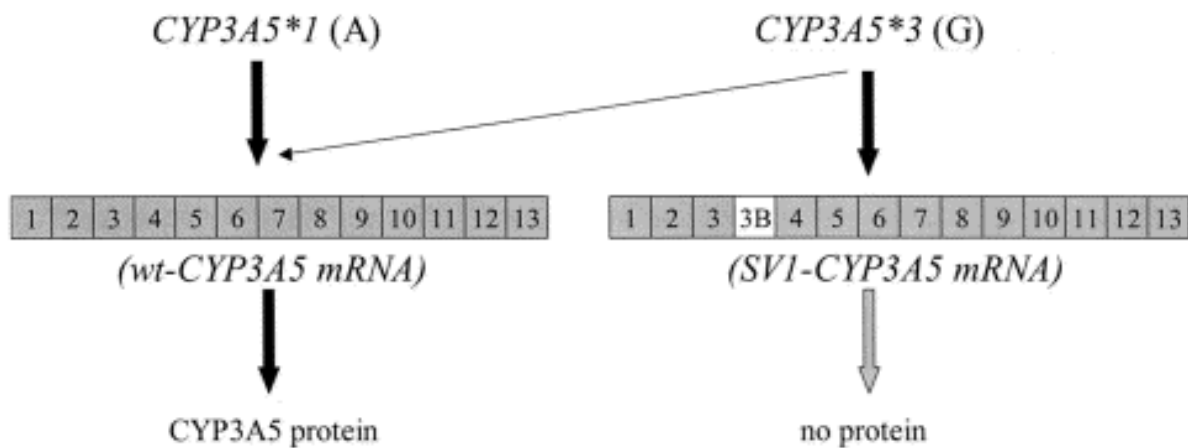
PK3 prøvene tatt fra ileum 2 år etter operasjonen, viste en forandring i konsentrasjonen av CYP-enzymmer i forhold til biopsiene tatt under operasjonen. Etter å ha korrigert for villin, ble det sett en økning for 3 av 5 pasienter. Størst var endringen for pasient 4, med en 3,8 gangers økning fra operasjonstidspunktet til 2 år etter. Årsaken til dette kan være at enterocytene gjennomgår en morfologisk endring over tid etter gjennomgått bariatrisk kirurgi, resulterende i endret konsentrasjon av CYP-enzymmer (Dudrick, Daly *et al.* 1977).

4.2.2 Pasientprøver CYP3A5

Uttrykket av CYP3A5 i tarm utviser et polymorft mønster, tilsvarende det man finner i lever (Lown, Kolars *et al.* 1994; Lamba, Lin *et al.* 2002; Lin, Dowling *et al.* 2002). Av de 10 pasientene undersøkt i denne studien var det kun pasient 2 som var genotypet til å skulle uttrykke funksjonelt CYP3A5-protein ($CYP3A5^{*3/1*3}$). Interessant var det at den eneste pasienten som var heterozygot for $CYP3A5^{*3}(*1/*3)$ ikke uttrykte CYP3A5-protein i noen av prøvene. Imidlertid ble det i en studie utført av Kuehl *et al.* (2001) funnet kun små konsentrasjoner av CYP3A5-protein i en pasient genotypet til $CYP3A5^{*1/*3}$. Forfatteren mente at dette kunne skyldes en sekundær degradering av proteinet på grunn av dårlig vevsbevaring, alternativt en sekundær mutasjon i den kodende regionen av CYP3A5 som bidro til ustabilitet av proteinet. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor det i denne oppgaven ikke ble detektert CYP3A5 i pasienten genotypet som $CYP3A5^{*1/*3}$. En annen årsak kan være at det ved genotyping kun utelukkes om pasienten er $CYP3A5^{*3}$ eller

*CYP3A5*2*, man kan derfor ikke for sikkert vite at pasienten faktisk har *CYP3A5*1*, eller en annen (ukjent) genotype.

Nivået av uttrykt CYP3A5-protein var under detekterbar grense i de fleste pasientprøvene. Pasient 7 var den eneste som uttrykte CYP3A5 i tynntarm, med 1,4 pmol CYP3A5/mg protein kvantifisert i duodenum. I magesekk ble det funnet CYP3A5-protein over detekterbar grense i pasient 4, 6, 8 og 10. I en studie utført av Canaparo *et al.* (2007) ble det i 5 pasienter genotypet til **3/*3*, funnet lave nivåer av CYP3A5 i homogenater opparbeidet fra magesekk. Imidlertid viste 3 av de 5 pasientene konsentrasjoner under detekterbar grense (< 0,1 pmol/mg). For prøvene tatt fra jejunum, uttrykte 2 av 6 pasienter med genotype **3/*3* proteinverdier på 0,2 pmol CYP3A5/mg protein. For prøver tatt fra ileum uttrykte 3 av 7 pasienter CYP3A5 nivåer over detekterbar grense, alle genotypet **3/*3*. Resultatene fra Canaparos studie underbygger resultatene fra denne studien ved at en person kan uttrykke CYP3A5-enzym, selv om denne er homozygot for *CYP3A5*3*. En mulig forklaring på dette kan være at fullstendig spleiset villtype mRNA produseres av *CYP3A5*1A*, men også i en viss grad av *CYP3A5*3* (Figur 20) (Lamba, Lin *et al.* 2002). I hvor stor grad *CYP3A5*3* bidrar til fullstendig spleising opplyses ikke om.



Figur 20: Alternativ mRNA-spleising som kontrollerer polymorft CYP3A5-uttrykk. Villtype mRNA produseres av *CYP3A5*1*, og i en mindre grad *CYP3A5*3* (Lamba, Lin *et al.* 2002).

Det er velkjent at alternativ spleising kan være kvantitativt forskjellig i ulike vev, og ved ulike cellulære betingelser (Kim, Magen *et al.* 2007). I magesekken er miljøet surt, noe som avviker fra miljøet i tarmen og leveren. I tillegg består magesekken av et annet type vev sammenlignet med tarm og lever. På bakgrunn av dette kan det tenkes at spleisingen i magesekk er ulik den som inntreffer i lever og tarm, noe som resulterer i endret uttrykk av CYP3A5-protein for genotyper homozygot for *CYP3A5**3.

4.2.3 Link til farmakokinetisk profil til pasientene

I den overordnende studien ble det sett en økning i systemisk eksponering av atorvastatinsyre for 9 av 10 pasienter etter gjennomgått BPD-DS. Forfatteren konkluderte med at den økte biotilgjengeligheten kunne forklares ut i fra en redusert førstepassasjemetabolisme ved CYP-enzymet i tynntarmen, som et resultat av at store deler av tynntarmen omkobles ved en BPD-DS. Ved sammenligning av CYP3A4-konsentrasjoner i bortkoblet tarm og forandring i AUC i denne oppgaven, så tenderte det til å være en større økning i biotilgjengelighet med økende konsentrasjon av CYP3A4 i duodenum. Etersom lengde på tynntarmen avviker fra pasient til pasient, vil konsentrasjon kun være et surrogatmål på antall CYP-enzymet som blir bortkoblet ved kirurgi. Som nevnt tidligere ble det forsøkt å korrigere for tarmvekt, men av ulike grunner må nytt normaliseringsmateriale samles inn ved videre arbeid. Sannsynligvis vil estimert mengde CYP3A4 som blir bortkoblet gi et enda mer relevant sammenligningsgrunnlag. Resultatene for jejunum viste ingen uttalt sammenheng med endret biotilgjengelighet (Figur 18). Dette kan være en indikasjon på at flere faktorer er med på å påvirke biotilgjengeligheten av atorvastatin etter en BPD-DS, som ulik peristaltikk, endret nivå av andre metaboliserende enzymer i tynntarmen og ulike transportører (Skottheim, Jakobsen *et al.* 2010). Før operasjonen viste det seg at pasienten som i størst grad uttrykte CYP3A4 i duodenum utviste en relativ lav systemisk eksponering av atorvastatin. Pasienten som i minst grad uttrykte CYP3A4, utviste en relativ høy systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt. Dette mønstret var ikke like uttalt for de andre pasientene. I denne oppgaven ble det kun brukt estimerte konsentrasjoner av CYP3A4 og CYP3A5. Ved videre arbeid bør totalmengde CYP-enzymet i tarmen som kobles bort

estimeres, for å forbedre sammenligningsgrunnlaget med biotilgjengeligheten av atorvastatin etter gjennomgått BPD-DS.

4.2.4 Fremtidige betraktninger

- Total mengde CYP3A4 bør estimeres for hele tynntarmen, for å få et tilfredsstillende sammenligningsgrunnlag for kinetikkdataene.
- Korrelasjonen mellom uttrykk av CYP3A5-protein og CYP3A5-avhengig katalytisk aktivitet bør studeres nærmere.
- Uttrykket av P-gp og OATP1B1-transportøren bør kvantifiseres for å få et mer helhetlig bilde av sammenhengen mellom metabolisme og biotilgjengeligheten av atorvastatin ved BPD-DS.

5. KONKLUSJON

En tidligere utviklet metode for homogenisering og kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 ved bruk av Western blott ble optimalisert. Metoden viste god intradag- og interdagpresisjon.

Konsentrasjoner av CYP3A4 og CYP3A5 ble kvantifisert i biopsier tatt fra magesekk, tynntarm og lever fra pasienter som hadde gjennomgått biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling. Resultatene viste store inter- og intraindividuelle forskjeller. Gjennomsnittlig CYP3A4-konsentrasjon var høyest i duodenum, med en noe lavere konsentrasjon i jejunum og ileum. Konsentrasjonen var tilsynelatende lav i lever i forhold til tynntarm. I magesekk ble det funnet en relativt høy konsentrasjon av både CYP3A4 og CYP3A5.

Ved sammenligning av CYP3A4-konsentrasjoner i bortkoblet tarm og forandring i AUC, så tenderte det til å være en større økning i biotilgjengelighet med økende konsentrasjoner av CYP3A4 i duodenum. Uttrykket av CYP3A4 i duodenum for de enkelte pasientene sammenlignet med individuell systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt, viste ingen uttalt sammenheng i forhold til biotilgjengeligheten av atorvastatin.

6. KILDELISTE

- Aasheim, E. T., T. Mala, et al. (2007). "[Surgical treatment of morbid obesity]." Tidsskr Nor Laegeforen **127**(1): 38-42.
- Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, et al. (2003). "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." Oncogene **22**(47): 7468-7485.
- Backman, J. T., H. Luurila, et al. (2005). "Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites." Clin Pharmacol Ther **78**(2): 154-167.
- Beermann, B., K. Hellstrom, et al. (1973). "The gastrointestinal absorption of digoxin in seven patients with gastric or small intestinal reconstructions." Acta Med Scand **193**(4): 293-297.
- Beringer, P. M. and R. L. Slaughter (2005). "Transporters and their impact on drug disposition." Ann Pharmacother **39**(6): 1097-1108.
- Bertin, T. (2009). "Precellys homepage." Retrieved 11.11., 2009, from www.precellys.com.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bray, G. A. and L. A. Tartaglia (2000). "Medicinal strategies in the treatment of obesity." Nature **404**(6778): 672-677.
- Burk, O. and L. Wojnowski (2004). "Cytochrome P450 3A and their regulation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(1): 105-124.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Burton, M. E., Shaw, L.M., Schentag J.J., Evans W.E. (1980). Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug. T. D. Baltimore.
- Canaparo, R., N. Finnstrom, et al. (2007). "Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(11): 1138-1144.
- Dahl, M. L. (2002). "Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing?" Clin Pharmacokinet **41**(7): 453-470.
- Daly, A. K. (2006). "Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms." Clin Pharmacokinet **45**(1): 13-31.
- de Waziers, I., P. H. Cugnenc, et al. (1990). "Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues." J Pharmacol Exp Ther **253**(1): 387-394.
- Debri, K., A. R. Boobis, et al. (1995). "Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues." Biochem Pharmacol **50**(12): 2047-2056.
- Dudrick, S. J., J. M. Daly, et al. (1977). "Gastrointestinal adaptation following small bowel bypass for obesity." Ann Surg **185**(6): 642-648.
- Elder, K. A. and B. M. Wolfe (2007). "Bariatric surgery: a review of procedures and outcomes." Gastroenterology **132**(6): 2253-2271.
- EMA. (2010). "European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for sibutramine " Retrieved 15.03., 2010, from <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/referral/sibutramine/3940810en.pdf>.

- Englund, G., F. Rorsman, et al. (2006). "Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells." *Eur J Pharm Sci* **29**(3-4): 269-277.
- Evans, M. and A. Rees (2002). "Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same?" *Drug Saf* **25**(9): 649-663.
- Evans, W. E. and M. V. Relling (1999). "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." *Science* **286**(5439): 487-491.
- Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J., Loscalzo, J. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. **2**.
- Goodman, L. S., A. Gilman, et al. (2006). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York, McGraw-Hill.
- Grabarkiewicz, T., P. Grobelny, et al. (2006). "DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: The case of fluvastatin." *Org Biomol Chem* **4**(23): 4299-4306.
- Gropper, s. s., Ed. (2009). *Advanced nutrition and human metabolism*. Belmont.
- Guengerich, F. P. (1999). "Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 1-17.
- Hansen, J. T., Koeppen, B.M. (2002). *Netter's Atlas of Human Physiology* Teterboro.
- Hauptman, J., C. Lucas, et al. (2000). "Orlistat in the long-term treatment of obesity in primary care settings." *Arch Fam Med* **9**(2): 160-167.
- Hediger, M. A., M. F. Romero, et al. (2004). "The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction." *Pflugers Arch* **447**(5): 465-468.
- Hess, D. S. (2005). "Biliopancreatic diversion with duodenal switch." *Surg Obes Relat Dis* **1**(3): 329-333.
- Hoffman, G. (2009). *Digestive system*, Bisson, M.
- Isoherranen, N., S. R. Ludington, et al. (2008). "The influence of CYP3A5 expression on the extent of hepatic CYP3A inhibition is substrate-dependent: an in vitro-in vivo evaluation." *Drug Metab Dispos* **36**(1): 146-154.
- Jacobsen, W., B. Kuhn, et al. (2000). "Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin." *Drug Metab Dispos* **28**(11): 1369-1378.
- Kantola, T., K. T. Kivistö, et al. (1998). "Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin." *Clin Pharmacol Ther* **64**(1): 58-65.
- Kim, E., A. Magen, et al. (2007). "Different levels of alternative splicing among eukaryotes." *Nucleic Acids Res* **35**(1): 125-131.
- Kolars, J. C., P. Schmiedlin-Ren, et al. (1992). "Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes." *J Clin Invest* **90**(5): 1871-1878.
- Kuehl, P., J. Zhang, et al. (2001). "Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression." *Nat Genet* **27**(4): 383-391.
- Lamba, J. K., Y. S. Lin, et al. (2002). "Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism." *Adv Drug Deliv Rev* **54**(10): 1271-1294.
- Lau, Y. Y., Y. Huang, et al. (2007). "effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers." *Clin Pharmacol Ther* **81**(2): 194-204.

- Leibbrand, R. and M. M. Fichter (2002). "Maintenance of weight loss after obesity treatment: is continuous support necessary?" Behav Res Ther **40**(11): 1275-1289.
- Lemke, T. L., Ed. (2008). Foye's principles of medicinal chemistry. Baltimore.
- Lennernas, H. (2003). "Clinical pharmacokinetics of atorvastatin." Clin Pharmacokinet **42**(13): 1141-1160.
- Lennernas, H. and G. Fager (1997). "Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences." Clin Pharmacokinet **32**(5): 403-425.
- Lewis, D. F. (2004). "57 varieties: the human cytochromes P450." Pharmacogenomics **5**(3): 305-318.
- Li, A. P., D. L. Kaminski, et al. (1995). "Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4." Toxicology **104**(1-3): 1-8.
- Lin, J. H., M. Chiba, et al. (1999). "Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?" Pharmacol Rev **51**(2): 135-158.
- Lin, J. H. and A. Y. Lu (2001). "Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 535-567.
- Lin, Y. S., A. L. Dowling, et al. (2002). "Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism." Mol Pharmacol **62**(1): 162-172.
- Lown, K. S., D. G. Bailey, et al. (1997). "Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression." J Clin Invest **99**(10): 2545-2553.
- Lown, K. S., J. C. Kolars, et al. (1994). "Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test." Drug Metab Dispos **22**(6): 947-955.
- Martini, F. H. and W. C. Ober (2006). Fundamentals of anatomy & physiology. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings.
- McTigue, K. M., R. Harris, et al. (2003). "Screening and interventions for obesity in adults: summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force." Ann Intern Med **139**(11): 933-949.
- Miller, A. D. and K. M. Smith (2006). "Medication and nutrient administration considerations after bariatric surgery." Am J Health Syst Pharm **63**(19): 1852-1857.
- Mitchell, M. T., J. M. Carabetta, et al. (2009). "Duodenal Switch Gastric Bypass Surgery for Morbid Obesity: Imaging of Postsurgical Anatomy and Postoperative Gastrointestinal Complications." Am. J. Roentgenol. **193**(6): 1576-1580.
- Nelson, D. R. (2009). "The Cytochrome P450 Homepage." Retrieved 10.02, 2010, from <http://drnelson.uthsc.edu/Genome.list.htm>.
- Oftedahl, T. (2009). Linken mellom uttrykket av CYP3A4 og biotilgjengelighet av atorvastatin ved gastrisk bypass. Oslo, T. Oftedahl.
- Paine, M. F., H. L. Hart, et al. (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos **34**(5): 880-886.
- Paine, M. F., M. Khalighi, et al. (1997). "Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism." J Pharmacol Exp Ther **283**(3): 1552-1562.
- Rang, H. P. (2003). Pharmacology. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Rendic, S. and F. J. Di Carlo (1997). "Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors." Drug Metab Rev **29**(1-2): 413-580.

- Robinson, J. R. and K. D. Niswender (2009). "What are the risks and the benefits of current and emerging weight-loss medications?" *Curr Diab Rep* **9**(5): 368-375.
- Rowland, M. and T. N. Tozer (1995). *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Safer, D. J. (1991). "Diet, behavior modification, and exercise: a review of obesity treatments from a long-term perspective." *South Med J* **84**(12): 1470-1474.
- SHdir. (2004). "Forebygging og behandling av overvekt/fedme i helsetjenesten." 01.03. Retrieved 01.03., 2010, from http://www.helsedirektoratet.no/vp/multimedia/archive/00001/IS-1150_1075a.pdf.
- Shimada, T., H. Yamazaki, et al. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." *J Pharmacol Exp Ther* **270**(1): 414-423.
- Skottheim, I., K. Stormark, et al. (2009). "Significantly Altered Systemic Exposure to Atorvastatin Acid Following Gastric Bypass Surgery in Morbidly Obese Patients." *Clin Pharmacol Ther*.
- Skottheim, I. B., G. S. Jakobsen, et al. (2010). "Significantly increased systemic exposure of atorvastatin following biliopancreatic diversion with duodenal switch." *Clin Pharmacol Ther* **AOP**.
- Spurr, N. K., A. C. Gough, et al. (1989). "The human cytochrome P450 CYP3 locus: assignment to chromosome 7q22-qter." *Hum Genet* **81**(2): 171-174.
- Thorn, M., N. Finnstrom, et al. (2005). "Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract." *Br J Clin Pharmacol* **60**(1): 54-60.
- Verollet, R. (2008). "A major step towards efficient sample preparation with bead-beating." *Biotechniques* **44**(6): 832-833.
- Victor, A., V. Odland, et al. (1987). "Oral contraceptive absorption and sex hormone binding globulins in obese women: effects of jejunoileal bypass." *Gastroenterol Clin North Am* **16**(3): 483-491.
- von Richter, O., O. Burk, et al. (2004). "Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens." *Clin Pharmacol Ther* **75**(3): 172-183.
- Watkins, P. B., S. A. Murray, et al. (1990). "Distribution of cytochromes P-450, cytochrome b5, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in an entire human liver." *Biochem Pharmacol* **39**(3): 471-476.
- Watkins, P. B., S. A. Wrighton, et al. (1987). "Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man." *J Clin Invest* **80**(4): 1029-1036.
- Westlind-Johnsson, A., S. Malmebo, et al. (2003). "Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism." *Drug Metab Dispos* **31**(6): 755-761.
- WHO. (2003). "Obesity and overweight." Retrieved 02.02., 2010, from <http://www.who.int/dietphysicalactivity/media/en/gsf Obesity.pdf>.
- WHO. (2005). "Obesity and overweight." Retrieved 02.02., 2010, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- WHO. (2006). "BMI classification." Retrieved 02.02., 2010, from http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.
- Wilkinson, G. R. (2005). "Drug metabolism and variability among patients in drug response." *N Engl J Med* **352**(21): 2211-2221.

-
- Williams, D. and J. Feely (2002). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors." Clin Pharmacokinet **41**(5): 343-370.
- Wu, H., A. D. Southam, et al. (2008). "High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics." Anal Biochem **372**(2): 204-212.
- Xie, H. G., A. J. Wood, et al. (2004). "Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences." Pharmacogenomics **5**(3): 243-272.
- Yang, J., G. T. Tucker, et al. (2004). "Cytochrome P450 3A expression and activity in the human small intestine." Clin Pharmacol Ther **76**(4): 391.
- Zanger, U. M., S. Raimundo, et al. (2004). "Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(1): 23-37.

7. APPENDIKS

7.1 Materialer

Bovint serumalbumin	Pierce, Oud-Beijerland, Nederland
Bio-Rad Protein Assay fargeløsning	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Bromfenolblå	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Destillert vann	Aquatrin A4S, Bibby Science Products SA, Frankrike
ECL kjemiluminescense reagens	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fettfri tørrmelk	Normilk AS, Oslo, Norge (gave)
Fosfat	Merck, Damstadt, Tyskland
Glyserol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Insekt CYP3A4-xenosomer (lot pd34.283776B)	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
Insekt CYP3A5-xenosomer (lot pd35.30742B)	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
Isopropylpropanol	Arcus produkter AS
Kaliumfosfat	Merck, Damstadt, Tyskland
Kodak AL-4 røntgenfiksator	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Kodak GBX røntgenfiksator	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak BioMax MS Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak LX-24 røntgenfremkaller	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak GBX røntgenfremkaller	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NaCl	Merck, Damstadt, Tyskland
Primært antistoff CYP3A4 (kanin anti-CYP3A4 mab)	Dr. Rob Edwards, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, UK (gave)
Primært antistoff CYP3A5 (kanin anti-CYP3A5 mab)	Dr. Rob Edwards, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, UK (gave)
Primært antistoff villin (mus anti-villin mab) (Lot VR1361181/VR1377881)	Chemicon International, Inc., Millipore, Oslo, Norway
SDS	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sekundært antistoff (geit anti-kanin mab) (LS1706515)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sekundært antistoff (geit anti-mus mab) (LS1706516)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Strippebuffer	Thermo scientific, Rockford, USA
Sukrose	Merck, Damstadt, Tyskland
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
β -merkptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

7.2 Oppskrifter

7.2.1 Løsning til homogenisering

SUKROSEBUFFER 0,32 M pH 7,4

0,32 M Sukrose	27,4 g
10 mM Trizmabase	0,30 g
1,0 mM EDTA	0,093 g
Destillert vann	ad 250 ml

7.2.2 Løsninger til Western blott

KALIUMFOSFATBUFFER 0,1 M pH 7,4

0,1 M Kaliumhydrogenfosfat	1,36 g
Destillert vann	ad 100 ml

2 x SAMPLEBUFFER

0,5 M Tris-HCL pH 6,8	12,5 ml
10 % SDS	20 ml
Glyserol	10 ml

TBS-LØSNING pH 7,5

10 mM Trizma base	2,43 g
100 mM NaCl	11,69 g
Destillert vann	ad 2000 ml

T-TBS-LØSNING pH 7,5

TBS Løsning	1500 ml
0,05 % Tween 20	750 µl

5 % tørrmelk i T-TBS løsning (BLOTTO)

Tørrmelk	25 g
T-TBS Løsning	ad 500 ml

STRIPPEBUFFER

100 mM 2-βmerkaptoetanol	350 µl
10 % SDS	10 ml
0,5 mM Tris pH 6,8	6,25 ml

7.2.3 Pasienttabeller

Tabellene presenterer estimater for CYP3A4-konsentrasjoner i biopsiene til hver enkelt pasient.

Tabell 9: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 1.

Pasient 1	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	7	1,1
Jejunum	0,6	0,9	0,5
Ileum	0,4	2,5	1
Gastrik	IR	IR	0,4
PK3	0,5	5,1	2,7

IR: Ikke rapportert

Tabell 10: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 2.

Pasient 2	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duo	0,1	20,6	2,7
jejunum	0,4	7,8	3,3
Ileum	0,2	14,9	2,7
Gastrik	IR	IR	1,1
Lever	IR	IR	0,5

IR: Ikke rapportert

Tabell 11: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 3.

Pasient 3	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	6,4	1,6
Jejunum	0,6	1,5	0,9
Ileum	0,2	6,1	1,1
Gastrik	IR	IR	0,2
Lever	IR	IR	0,3
PK3	1,3	1,9	2,5

IR: Ikke rapportert

Tabell 12: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 4.

Pasient 4	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,1	43,6	5,6
Ileum	0,2	5,3	0,8
Gastrik	IR	IR	1,4
Lever	IR	IR	0,4
PK3 1:200	0,1	47,8	3,2

IR: Ikke rapportert

Tabell 13: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 5.

Pasient 5	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	13,5	3,0
Jejunum	0,6	2,1	1,3
Ileum	0,5	3,6	1,9
Gastrik	IR	IR	0,5
Lever	IR	IR	0,7

IR: Ikke rapportert

Tabell 14: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 6.

Pasient 6	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	21,7	4,7
Jejunum	0,3	0,7	0,2
Ileum	0,2	2,9	0,7
Gastrik	IR	IR	0,9

IR: Ikke rapportert

Tabell 15: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 7.

Pasient 7	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	16,2	3,0
Jejunum	1,1	0,7	0,8
Ileum	0,4	5,5	2,2
Gastrik	IR	IR	0,8
Lever	IR	IR	0,3
PK 3	1,1	0,5	0,6

IR: Ikke rapportert

Tabell 16: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 8.

Pasient 8	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	34,8	5,9
Jejunum	1,2	0,5	0,6
Ileum	0,6	1,1	0,6
Gastrik	IR	IR	0,8
Lever	IR	IR	0,3
PK 3	1,1	2,9	3,1

IR: Ikke rapportert

Tabell 17: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 9.

Pasient 9	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,2	3,6	0,8
Jejunum	0,9	0,7	0,6
Ileum	1,4	0,5	0,7
Gastrik	IR	IR	0,4
Lever	IR	IR	0,6

IR: Ikke rapportert

Tabell 18: Kvantitative data for estimert konsentrasjon av CYP3A4 i pasient 10.

Pasient 10	Relativt forhold til villinstandard	pmol CYP3A4/relativt villin	pmol CYP3A4/mg protein
Duodenum	0,1	9,3	1,2
Jejunum	1,7	0,6	1,0
Ileum	1,3	0,6	0,8
Gastrik	IR	IR	1,0
Lever	IR	IR	0,5

IR: Ikke rapportert

7.2.4 Måling av totalprotein

Tabell 19: Estimert innhold av totalprotein i homogenat fra pasientprøvene.

Pasient	Duodenum	Jejunum	Ileum	Gastrik	Lever	PK 3
1	94	121	103	136	IR	62
2	39	61	36	100	146	IR
3	26	53	29	82	102	36
4	23	IR	125	90	124	62
5	37	44	50	76	125	IR
6	38	118	137	109	IR	IR
7	12	65	71	110	134	152
8	62	110	119	111	140	68
9	147	89	125	107	109	IR
10	110	120	146	129	97,5	IR
Standardavvik	42	30	41	18	17	40
Gjennomsnitt	59	87	95	105	122	76