

# Uttrykket av P-glykoprotein i tarm og lever hos gastrisk bypass pasienter

*Sammenhengen mellom uttrykket av P-glykoprotein og  
biotilgjengeligheten av atorvastatin*

**Marit Nordeng**



Mastergradsoppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2011

# Uttrykket av P-glykoprotein i tarm og lever hos gastrisk bypass pasienter

*Sammenhengen mellom uttrykket av P-glykoprotein og biotilgjengeligheten av atorvastatin*

**Marit Nordeng**



Mastergradsoppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2011

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 2010 og avsluttet mai 2011.*

*Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Hege Christensen og Anders Åsberg for deres dyktighet og hjelpelighet. Som veiledere har dere gitt meg kunnskapsrike råd underveis, og jeg er svært takknemlig for deres inspirerende engasjement. Takk til Hege for at du alltid er positiv og i godt humør. Takk for retningssansen til Anders Åsberg da det ble mørkt på vei frem til farmasihytten, det var en lattervekkende og uforglemmelig hyttetur med forskningsgruppen.*

*Jeg vil også rette en stor takk til Siri Johannesen for opplæring på laboratoriet. Din dør har alltid vært åpen når problemene har oppstått. En spesiell stor takk til Chinh Huynh for et enestående samarbeid på laboratoriet. Du har spredt godt humør og gjort det trivelig å være på laboratoriet selv ved mislykkede resultater. Tusen takk til alle i 4. etasje for et hyggelig arbeidsmiljø.*

*Avslutningsvis vil jeg takke venner og familie som har støttet meg igjennom studieårene. En spesiell takk til Eirik for å ha lyttet tålmodig, spredt humor og vært min treningskamerat i skrivepausene.*

*Blindern 1. mai, 2011*

*Marit Nordeng*

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUKSJON .....</b>	<b>9</b>
1.1 BIOTILGJENGELIGHET .....	9
1.1.1 <i>Absorpsjon</i> .....	9
1.1.2 <i>Metabolisme</i> .....	10
1.1.3 <i>Transportører</i> .....	11
1.2 P-GLYKOPROTEIN .....	11
1.2.1 <i>P-gp translasjon og glykosylering i cellen</i> .....	14
1.3 ATORVASTATIN .....	15
1.3.1 <i>Farmakokinetikk</i> .....	16
1.4 OVERVEKTSKIRURGI (BARIATRISK KIRURGI) .....	17
1.5 HENSIKTEN MED OPPGAVEN .....	19
<b>2. MATERIALER OG METODE.....</b>	<b>20</b>
2.1 PASIENTMATERIALE .....	20
2.2 ANALYSEMETODER .....	22
2.2.1 <i>Homogenisering til Western analyse</i> .....	22
2.2.2 <i>Homogenisering av biopsier til cellefraksjonering</i> .....	23
2.2.3 <i>Fraksjonering</i> .....	23
2.2.4 <i>Western blott analyse</i> .....	26
2.2.5 <i>Kvantifisering av proteiner</i> .....	29
2.2.6 <i>Måling av totalprotein</i> .....	29
2.2.7 <i>Databearbeidelse</i> .....	30

---

<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>31</b>
3.1	METODEUTVIKLING.....	31
3.2	LOKALISASJONEN AV GLYKOSYLERT P-GP I CELLEN .....	33
3.3	RESULTATER FRA PASIENTPOPULASJONEN .....	33
3.3.1	<i>Standardkurve</i> .....	33
3.3.2	<i>Semikvantifisering av P-gp hos GBP pasientgruppen</i> .....	34
3.4	SAMMENHENGEN MELLOM UTTRYKKET AV P-GP OG KINETIKKDATA.....	37
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>41</b>
4.1	METODEUTVIKLING.....	41
4.2	P-GP BÅND .....	42
4.3	FRAKSJONERING.....	42
4.4	P-GP UTTRYKK I PASIENTBIOPSIER.....	43
4.5	SAMMENHENGEN MELLOM UTTRYKKET AV P-GP OG KINETIKKDATA.....	45
4.6	FREMTIDIGE BETRAKNINGER .....	47
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>KILDELISTE</b> .....	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>APPENDIKS</b> .....	<b>52</b>
7.1	MATERIALER.....	52
7.2	OPPSKRIFTER .....	54
7.2.1	<i>Løsning til homogenisering</i> .....	54
7.2.2	<i>Løsninger til Western blott</i> .....	54
7.3	MÅLING AV TOTALPROTEIN .....	57
7.4	RESULTATER FRA PASIENTBIOPSIENE .....	58

## FORKORTELSER

ABC	ATP bindende kassett
ADME	Absorpsjon, distribusjon, metabolisme, eliminasjon
ATP	Adenosin trifosfat
AUC	Areal under plasma-konsentrasjons-tidskurven
BMI	Kroppsmasseindex (Body Mass Index)
CYP	Cytokrom P450
EH	Epoksid hydrolaser
ER	Endoplasmatisk retikulum
FMO	Flavin-innholdene monooksidaser
GBP	Gastrisk bypass
GI	Gastrointestinal
GST	Glutathione-S-transferase
HMG-CoA	3-hydroksey-3-metyl glytaryl koenzym A
kDa	Kilodalton
LDL	low-density lipoprotein
MDR	Multidrug resistent
MT	Metyltransferase
NAT	N-acetyltransferase
NBD	Nukleotid-bindende domene
OATP	Organsk anion transportør
P-gp	Permeabilitetsglykoprotein
PGNase	Endo-N-glykosidase peptid
PK3	Farmakokinetikk 3
Rpm	Omdreining per minutt
SDS-PAGE	Natrium dodekyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese
SLC	Solute carrier
SNP	Enkelt nukleotid polymorfismer
SULT	Sulfontransferase
T-TBS	Tris-tween-bufret saltvannsløsning
UGT	UDP-glukuronosyltransferase
WHO	World health organization

## SAMMENDRAG

**Bakgrunn:** Gastrisk bypass (GBP) er en prosedyre innen bariatrisk kirurgi hvor magesekkens volum reduseres og deler av tarmen blir forbikoblet. Dette resulterer i redusert absorpsjon av næringsstoffer. Biotilgjengeligheten til eksempelvis det kolesterolsenkende legemiddelet atorvastatin endres også etter bariatrisk kirurgi. Atorvastatin har en biotilgjengelighet på 12 % siden legemiddelet utsettes for vesentlig “first pass metabolisme” av CYP3A4 og CYP3A5, samtidig som det transporteres av P-glykoprotein (P-gp) og OATP1B1.

**Mål:** Denne studien er en del av et større samarbeidsprosjekt med Senter for Sykkelig Overvekt ved sykehuset i Vestfold. Det overordnede målet for studien var å undersøke hvordan bariatrisk kirurgi påvirker farmakokinetikken til atorvastatin. Målet med denne delstudien var å utvikle en Western blott metode for å semikvantifisere P-gp uttrykket i tarm og lever biopsier fra pasienter som gjennomgikk GBP operasjon, samt i en tarmbiopsi 2 år etter operasjon. Det skulle undersøkes om det var en sammenheng mellom proteinuttrykket og biotilgjengeligheten til atorvastatin i disse pasientene. I tillegg skulle den subcellulære lokalisasjonen til den delvis- og fullt glykosylerte formen av P-gp studeres.

**Metode:** Biopsier fra jejunum, ileum og lever tatt under GBP operasjon, samt en biopsi fra jejunum 2 år etter operasjon (PK3) ble homogenisert med Precellys 24<sup>®</sup>. En tradisjonell Western blott metode (SDS-PAGE) ble utført med separering på en 6,5 % polyakrylamidgel. Proteinene ble påvist med et spesifikt antistoff (C219) for P-gp, og semikvantifisert mot en kalibrator med ukjent konsentrasjon ved hjelp av programmet Genetools. En biopsi fra jejunum ble homogenisert i en Potter-Elvehjem homogenisator, og etter subcellulær fraksjonering ble P-gp uttrykket studert i de ulike fraksjonene.

**Resultater:** P-gp viste stor interindividuell variasjon, og en tendens til økt totaluttrykk nedover i tarmen hos GBP pasientene ble vist. Det ble avdekket to P-gp bånd (140 kDa og 170 kDa). Ved subcellulær fraksjonering ble både 140 kDa og 170 kDa P-gp funnet i cellemembranen, men kun 140 kDa P-gp ble avdekket i endoplasmatisk reticulum (ER) og Golgi apparatet. Det viste seg ikke å være en korrelasjon mellom P-gp uttrykket og systemisk eksponering av atorvastatin, og hos pasientene hadde ikke estimert mengde bortkoblede P-gp molekyler noen betydning for endring i den systemiske atorvastatinkonsentrasjonen.

**Konklusjon:** Det ble utviklet en metode for å semikvantifisere P-gp i biopsier fra tarm og lever ved bruk av Western blott. To P-gp bånd ble identifisert (140 kDa og 170 kDa), der både 140 kDa og 170 kDa P-gp ble funnet i cellemembranen, mens kun 140 kDa P-gp ble lokalisert til Golgi apparatet og ER. Det ble vist stor variasjon mellom pasientene i P-gp uttrykk i tarm og lever, og en tendens til økende P-gp uttrykk nedover i tarmen hos GBP pasientene ble funnet. De foreløpige resultatene antyder at P-gp ikke spiller en betydelig rolle i verken biotilgjengeligheten til atorvastatin før GBP operasjon, eller endringen i biotilgjengeligheten etter operasjon.



# 1. INTRODUKSJON

## 1.1 Biotilgjengelighet

Sentrale prosesser i farmakokinetikk inkluderer absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon (ADME), og det er absorpsjon og metabolisme som begrenser biotilgjengeligheten av legemidler. I tillegg kan transportører bidra med å begrense biotilgjengeligheten ved influks av substanser inn i lever for videre metabolisme eller effluks tilbake til tarmlumen. Transportøren P-glykoprotein (P-gp) og cytokrom P450 (CYP) enzymer er mye studert, og bidrar til å begrense biotilgjengeligheten til et vidt spekter av legemidler.

### 1.1.1 Absorpsjon

Absorpsjon av legemidler påvirkes av faktorer som overflateareal, blodflow i absorpsjonsvevet, partikkelstørrelse, løselighet, konsentrasjon av stoffet og pH ved absorpsjonsstedet. Absorpsjon fra gastrointestinaltraktus (GI) kan foregå både i ventrikkelen og tynntarmen, men hovedvekten av absorpsjon foregår i tynntarmen. De fleste legemidler absorberer ved passiv diffusjon som krever en uionisert og lipofil form. Basert på pH-fordelings prinsippet skulle en anta at svake syrer hovedsakelig ble absorbert i ventrikkelen (pH 1-2) fremfor i øverste del av tynntarmen (pH 3-6), og motsatt for svake baser. Derimot er ventrikkelens overflateareal minimal i motsetning til tynntarmen, og av den grunn vil hovedvekten av absorpsjonen foregå i tynntarmen både for syrer og baser (Brunton L.L 2006).

Det store overflatearealet i tynntarmen skyldes at den indre overflaten er sterkt foldet. Dessuten er overflaten dekket av fingeraktige utvekster, tarmtotter (villi). Hver tarmtott har et enkelt epitellag som består av enterocytter, der hver enterocytt har 3000-6000 håraktige utvekster, mikrovilli. Til sammen utgjør den totale epiteloverflaten på omtrentlig 200 m<sup>2</sup> hos et vokset menneske mot 0,3 m<sup>2</sup> hvis tarmen hadde vært et glatt rør (Sand O 2005). Tynntarmen er omtrent 4-6 meter lang og består av de tre delene *duodenum* (ca. 25 cm), *jejunum* (2,5-4 meter) og *ileum* (1,5-2 meter) (Budowick M 2005).

Legemidler kan enten absorberes mellom cellene (paracellulært) eller igjennom cellene (transcellulært). Tight junctions mellom enterocytene gjør at stoffer hovedsakelig må passere gjennom cellemembranen ved hjelp av passiv eller aktiv transport (Keldenich 2009). Lipofile stoffer diffunderer passivt gjennom cellelaget, men passiv transport kan også inkludere spesifikk transport utført av transportproteiner og vannfylte proteinkanaler. Ved aktiv transport pumpes substanser ut mot en konsentrasjonsgradient eller en elektrokjemisk gradient, og energien innhentes fra nedbrytning av ATP eller antiport med et ion (Sand O 2005).

### ***1.1.2 Metabolisme***

I enterocytten finnes det enzymer som metaboliserer xenobiotika, og reaksjonene deles inn i to reaksjonsfaser. Fase I reaksjoner involverer enzymer som oksiderer, reduserer eller hydrolyserer xenobiotika og dermed setter på en funksjonell gruppe, eksempelvis en hydroksylgruppe. Stoffene blir mer vannløselige og kan biologisk inaktiveres eller aktiveres som er tilfellet ved prodrugs. Fase I enzymer inkluderer blant annet CYP-enzym, flavin-innholdene monooksidaser (FMO) og epoxide hydrolaser (EH) (Brunton L.L 2006). Det er CYP1, CYP2 og CYP3 familiene som er ansvarlig for 70-80 % av all fase I metabolisme av klinisk brukte legemidler (Bozina, Bradamante et al. 2009). Fase II reaksjoner er den andre gruppen av reaksjoner, og de øker eliminasjonen av legemidlet ved å danne et hydrofilt konjugat med substratet. Det finnes mange fase II enzymer. Blant de viktigste er glutathione-S-transferase (GST), UDP-glucuronosyltransferase (UGT), sulfontransferase (SULT), N-acetyltransferase (NAT) og metyltransferase (MT) (Brunton L.L 2006).

### ***“First pass” metabolismen***

Transportører er lokalisert i cellemembranen til enterocytene, mens xenobiotika-metaboliserende enzymer befinner seg i cytosol eller er festet til intracellulære membraner. CYP-enzym, FMO, EH og enkelte fase II enzymer (UGT) er lokalisert i fosfolipidlaget til ER. Hydrofobe, uioniserte legemidler entrer cellen og blir oksidert av fase I enzymer i ER. Videre kan de utsettes for effluks tilbake til tarmlumen eller ytterligere metaboliseres av UGT i membranen eller av transferaser i cytosol (SULT, GST). Metabolittene kan deretter

transporteres gjennom cellen og over i portåresystemet, og entre leveren. Det er leveren som er hovedsetet for legemiddelmetabolisme der 90 % av cellene i leveren, nemlig hepatocytene, inneholder metaboliserende enzymer. "First pass" metabolismen inkluderer både tynntarmen og leveren, og biotilgjengeligheten vil variere for legemidler administrert oralt avhengig av om de unnslipper "first pass" metabolismen eller ikke (Brunton L.L 2006).

### ***1.1.3 Transportører***

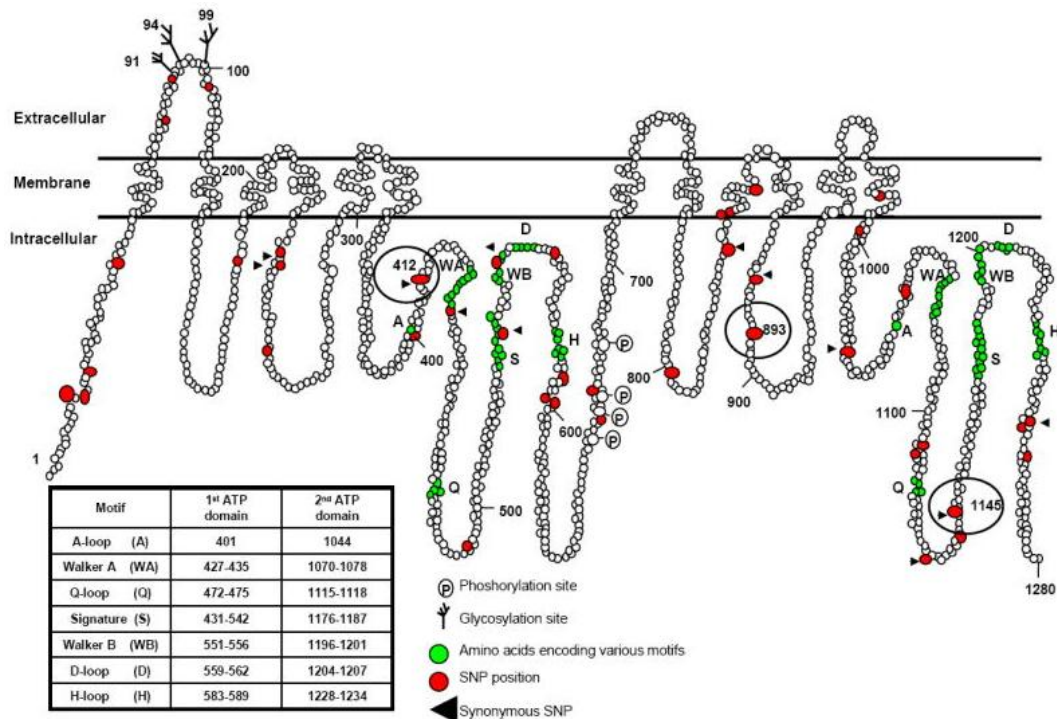
Transportører er membranproteiner som kontrollerer influks og effluks av kjemiske og biologiske stoffer, og de påvirker fordelingen og eliminasjonen av legemidlet i kroppen. Det er to hovedfamilier av transportører, nemlig solute carrier familien (SLC) og ATP bindende kassett familien (ABC). I solute carrier familien finnes det omtrent 300 transportører som frakter ulike endogene og eksogene substanser (Brunton L.L 2006). Organisk anion-transporterende proteiner (OATP) tilhører SLC familien. De elleve transportørene i OATP familien er videre inndelt i 6 underklasser, der OATP1 familien er den største og best karakteriserte gruppen. OATP1B1 (kodet av *SLCO1B1* genet) tilhører denne gruppen, og er lokalisert i den basolaterale membranen til hepatocytene. OATP1B1 transporterer endogene og eksogene substanser inn i hepatocytene (Hagenbuch and Gui 2008), og spiller en viktig rolle i reguleringen av opptaket av blant annet statiner.

I ABC familien er det totalt 49 kjente gener for ABC proteiner. Disse kan igjen inndeles i syv underklasser (ABCA til ABCG) der ABCB1, også kalt *MDR-1* genet koder for P-gp, som er en av de mest studerte. ABC familien er hovedsakelig effluks transportører som benytter ATP for å frakte substrater over cellemembranen og ut av cellen mot en konsentrasjonsgradient (Brunton L.L 2006).

## **1.2 P-glykoprotein**

P-gp ble først oppdaget av Juliano og Ling i multidrug resistent (MDR) kreftceller der P-gp reduserte den intracellulære legemiddelkonsentrasjonen (Juliano and Ling 1976), og i dag er det et vel karakterisert protein bestående av 1280 aminosyrer (Zhang and Benet 2001). Proteinets har tolv transmembrane domener, og to ATP bindende domener, også kalt nukleotid-bindende domene (NBD), intracellulært etter det sjette og det tolvte

transmembrane domenet (Figur 1). ATP må bindes til begge bindingssetene for at P-gp skal bli aktivt (Zhou 2008). Transporten settes i gang ved at substansen binder seg til sitt bindingssete inne i det transmembrane domenet og dette øker ATPase aktiviteten. ATP binding og hydrolyse forårsaker effluks av substansen, mens den sekundære ATP bindingen og hydrolysen tillater en konformasjonsendring tilbake til den opprinnelige formen av P-gp (Li, Yuan et al. 2010).



**Figur 1** Skissen viser den strukturelle oppbygningen av P-gp (Fung and Gottesman 2009)

P-gp er lokalisert i den apikale membranen på epitelceller i gallegangen, proksimale tubuli (nyren), asteroctytter i blod-hjerne-barrieren, blod-placenta-barrieren, blod-testis-barrieren, ulike typer immunceller og i enterocytter i tynntarmen. Proteinet kan transportere et bredt spekter av viktige legemidler, blant annet statiner som atorvastatin, lovastatin og simvastatin. I motsetning til de andre statinene er ikke pravastatin et P-gp substrat (Sakaeda, Takara et al. 2002). Hovedsubstratene til P-gp er store kationiske eller nøytrale hydrofobe stoffer (DuBuske 2005).

Individuelle forskjeller i både P-gp uttrykk og P-gp aktivitet er med på å forårsake variasjon i biotilgjengeligheten av xenobiotika. Uttrykket av P-gp er rapportert å variere mellom 2-8

ganger i tynntarmbiopsier fra nyretransplanterte og friske frivillige forsøkspersoner (Zhang and Benet 2001). De individuelle forskjellene i P-gp aktiviteten skyldes enten genetiske forskjeller eller interaksjoner med xenobiotika. Det finnes både inhibitorer og inducere av P-gp, og en potent P-gp hemmer er valspodar (et potent derivat av cyclosporin) som gir en 200 % økning av digoxin i plasma (Lee, Cook et al. 2010). I motsetning kan en sterk inducer som rifampicin (Rimactan<sup>®</sup>) gi en 30 % reduksjon i systemisk eksponering av digoxin (Lee, Cook et al. 2010).

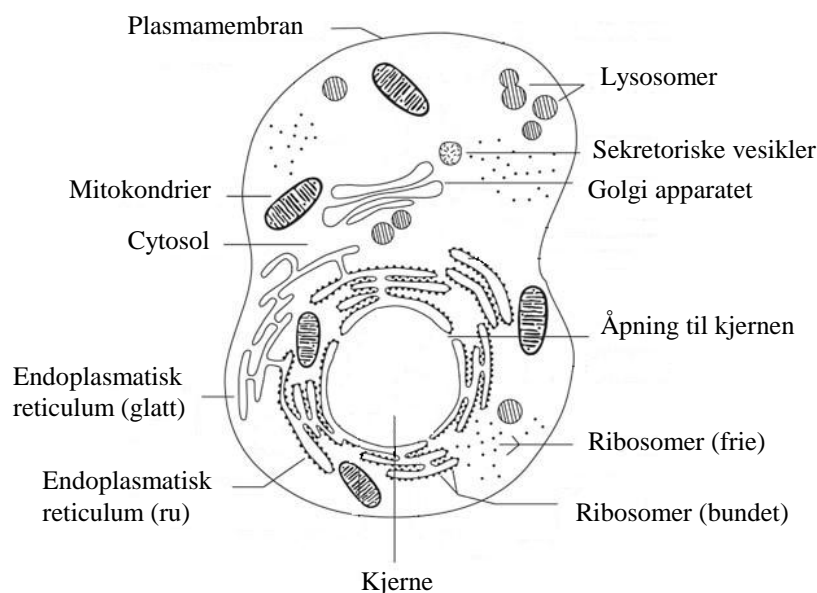
Genetiske forskjeller i P-gp bidrar sannsynligvis også med å gi variasjon i systemisk eksponering av legemidler. Det har blitt identifisert over 50 singel nukleotid polymorfismer (SNP) i genet *ABCB1* som resulterer i både synonyme og ikke synonyme mutasjoner (Li, Yuan et al. 2010). Flertallet av SNPene er lokalisert på det intracellulære domene til P-gp. Det er ikke funnet SNP'er på glykosylering- eller fosforyleringssteder, og kun 4 SNP'er er oppdaget i de transmembrane domene (Figur 1) (Fung and Gottesman 2009). Det er ikke underforstått at alle synonyme SNP'er er stille (silent) kun fordi de ikke endrer den kodede aminosyren. Det har blitt foreslått at synonyme SNP'er ved en enkelt nukleotidendring fra et vanlig kodon til et mer sjeldent kodon kan endre P-gp funksjonen. Dette forklares med at det sjeldne kodonet trenger lenger tid til translasjonen på grunn av den lave tilgjengeligheten av tRNA. På den måten får proteinet en annen tredimensjonal struktur og endret funksjon, selv om aminosyresekvensen var identisk (Cascorbi 2011). Denne hypotesen må ytterligere studeres. Ved enkelt studier har en reduksjon i P-gp uttrykk blant homozygote 3435C>T blitt vist, men korrelasjonen mellom P-gp uttrykket og 3435C>T polymorfismen er kontroversiell (Ishikawa, Sakurai et al. 2010). Det spekuleres om endret form og funksjon av P-gp skyldes flere mutasjoner, og det har blitt rapportert at haplotypen 1236C>T/ 2677G>T/ 3435C>T kan endre substratspesifisiteten til P-gp (Ishikawa, Sakurai et al. 2010). Det er i tillegg påvist ulike alleler av både 3435C>T og 2677G/T/A hos de ulike etnisitetene, men betydningen av disse er ikke kjent (Ishikawa, Sakurai et al. 2010).

Det er overlapp mellom substratspesifisitet og vevsdistribusjon for CYP3A-enzymet (CYP3A4 og CYP3A5) og P-gp. De er lokalisert i nærheten av hverandre og jobber sammen som en beskyttende barriere mot legemidler som administreres oralt. Det antas at CYP3A-enzymet og P-gp jobber sammen i en syklus der substansene først diffunderer inn i cellen, og inne i cellen utsettes de for metabolisme av CYP3A. De substansene som unnslipper biotransformasjonen, blir pumpet tilbake til lumen av P-gp. I lumen kan de igjen absorberes

og på nytt bli utsatt for metabolisme av CYP3A. Denne syklusen reduserer biotilgjengeligheten av xenobiotika (DuBuske 2005).

### 1.2.1 P-gp translasjon og glykosylering i cellen

I en eukaryot celle transkriberes mRNA i cellekjernen (Figur 2), og proteinsyntesen tar plass på ribosomer som enten er bundet mot yttermembranen til ru ER eller ribosomer som er frie i cytosol. Ribosomer som syntetiserer cytosoliske proteiner forblir frie i cytosol, mens proteiner som er forutbestemt til ER har en signalfrekvens som leder ribosomet til ER membranen for proteinsyntese, og deretter translokerer proteinet inn i ER. Det er i ru ER translasjonen av P-gp skjer, og der blir P-gp glykosylert ved at enzymer kobler på et glykan som sidekjede på aminosyren asparagin (N-glykosylering). De enkelte sidekjedene på P-gp kan blant annet beskytte proteinet mot degradering, holde proteinet i ER til det er tilstrekkelig foldet eller fungere som et transportsignal og veilede proteinet til riktig organelle (Alberts, Bray et al. 2004). Etter proteinfoldingen gjennomgår P-gp en kvalitetskontroll i ru ER, og ved defekt P-gp degraderes proteinet av proteaser (Xie, Burcu et al. 2010). P-gp som blir kvalitetsgodkjent pakkes inn i vesikler og transporteres videre til Golgi apparatet for videre glykosylering. De ulike modifiseringene i glykosyleringen kan brukes til å indikere når et protein har passert et bestemt subcellulær lokasjon (Freeze and Kranz 2010). Når P-gp er ferdig glykosylert (170 kDa), pakkes det inn i sekretoriske vesikler og transporteres til cellemembranen (Alberts, Bray et al. 2004).



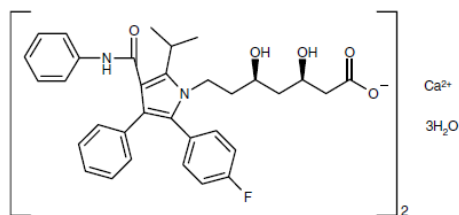
**Figur 2** Illustrert en eukaryot celle.

Det finnes 10 mulige seter for N-glykosylering på P-gp, men bare 3 seter antas å bli eksponert for lumen i ER og bli glykosylert. Disse setene er lokalisert i den første ekstracellulære sløyfen (Gribar, Ramachandra et al. 2000). Den kjerne-glykosylerte P-gp har en molekylvekt på 140-150 kDa (Loo and Clarke 1999; Gribar, Ramachandra et al. 2000; Draheim, Reichel et al. 2010; Siczkowski, Lehner et al. 2010; Xie, Burcu et al. 2010), og videre glykosylering i Golgi apparatet kan gi P-gp en molekylvekt på 170 kDa uttrykt i cellemembranen (Greer and Ivey 2007). Det er ytterligere rapportert P-gp uttrykk med ulik molekylvekt, eksempelvis på 110 kDa, 130 kDa og 180 kDa. Den komplette forklaringen er ikke kjent, men årsaker som deglykosylering i cellen eller ulik glykosylering grunnet mutasjoner i *ABCB1* er beskrevet (Siczkowski, Lehner et al. 2010; Xie, Burcu et al. 2010).

En spesifikk mutasjon i P-gp (E875C) ble vist i en studie å kunne gi en endret topologi av P-gp. Den muterte formen viste seg ikke å bli glykosylert (150 kDa), mens den glykosylerte P-gp manglet den mutasjonen. Funksjonaliteten til den muterte P-gp ble ikke avdekket i studien (Loo and Clarke 1999), men enkelt studier har vist at kjerne-glykosylert P-gp (140-150 kDa) har blitt uttrykt i et lavere antall enn glykosylert P-gp (170 kDa) i plasmamembranen som en aktiv transportør (Schinkel, Kemp et al. 1993; Gribar, Ramachandra et al. 2000). Det har blitt utviklet en hypotese om at polymorfisme av P-gp kan gi ulik grad av glykosylering. Dette er av betydning siden glykosylering har vist å være viktig for normalt uttrykk av proteinet i plasmamembranen, men hvilken betydning glykosyleringen har på struktur og funksjon av P-gp er fremdeles uklar (Greer and Ivey 2007).

### 1.3 Atorvastatin

Atorvastatin (Lipitor<sup>®</sup>) (Figur 3) er en hemmer av 3-hydroksey-3-metyl-glutaryl-koenzym A reduktase (HMG-CoA), som er det hastighetsbestemmende enzymet i biosyntesen av kolesterol. Enzymhemmingen resulterer i mindre omdannelse av HMG-CoA til mevanolat, som er forstadiet til ulike steroler, som blant annet kolesterol. Redusert kolesterolnivå i hepatocytene vil stimulere syntesen av very low density lipoprotein (LDL) reseptorer, og uttrykket av reseptorene vil øke på overflaten av hepatocytene. Totaleffekten er økt opptak i lever og dermed en reduksjon av kolesterol i blodet (Vaughan, Gotto et al. 2000).



**Figur 3** Den kjemiske strukturen til atorvastatin (van Leuven and Kastelein 2005).

Atorvastatin gis til pasienter med høy risiko for kardiovaskulær hendelse og mot hyperlipoproteinemi, når kost- og livsstilsendringer ikke har gitt tilstrekkelig effekt. Doseringen varierer fra 10-80 mg per dag. Gastrointestinale sykdommer og myalgier er hyppige bivirkninger (1 av 100), mens de svært alvorlige bivirkningene som eksempelvis rhabdomyolyse hører til sjeldenheten (1 av 10 000) (Lennernas 2003). Ifølge tall fra Reseptregisteret bruker omtrent 113 000 nordmenn atorvastatin av 480 000 statinpasienter i dag (tall fra 2010).

### **1.3.1 Farmakokinetikk**

Atorvastatin administreres oralt i form av kalsiumsaltet av den aktive hydroksysyren, og har derfor god oppløslighet. Legemiddelet utsettes for vesentlig "first pass metabolisme" av CYP3A4 og CYP3A5, samtidig som den transporteres av P-gp og OATP1B1. Biotilgjengeligheten er derfor kun 12 % (Lennernas 2003). Den aktive atorvastatinsyren som administreres konverteres *in vivo* til den inaktive laktonformen, og en likevekt innstiller seg mellom de to formene. Det er kun syren som reduserer kolesterolnivået, men interaksjoner med andre substanser påvirker både syre- og laktonformen (Hoffmann and Nowosielski 2008). Det er hovedsakelig laktonformen som metaboliseres av CYP3A4 og CYP3A5 til metabolitter siden den har en signifikant høyere affinitet (Lennernas 2003). Metabolittene konverterer deretter til de tilhørende aktive syreformene, 2-hydroksy- og 4-hydroksyatorvastatinsyre, og de formene eksisterer i likevekt (Schachter 2005). Atorvastatin og dens metabolitter glukuronideres av UGT 1A1 og 1A3, og elimineres primært via gallen etter hepatisk metabolisme eller ved direkte sekresjon fra blod til tarm. Med under 1 % av den totale utskillelsen er renal eliminasjon av mindre betydning (Lennernas 2003). Maksimal plasmakonsentrasjon oppnås etter 1-2 timer, med en plasmaproteinbinding på omtrentlig 98 % og et distribusjonsvolum på 381 liter. Halveringstiden til atorvastatin er gjennomsnittlig



---

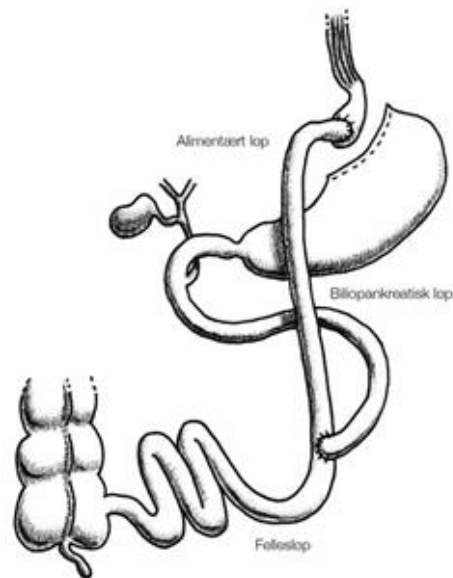
14 timer, mens inhiberingen av HMG-CoA reduktase har en halveringstid på 20-30 timer som følge av de aktive metabolitter (Lennernas 2003).

## 1.4 Overvektskirurgi (Bariatrisk kirurgi)

World Health Organization (WHO) definerer overvekt med en Body Mass Index (BMI) fra 25 kg/m<sup>2</sup>, mens BMI fra 30 kg/m<sup>2</sup> og 40 kg/m<sup>2</sup> klassifiseres henholdsvis som fedme og svært alvorlig fedme. I Norge må en ha forsøkt i tilstrekkelig grad å gå ned i vekt ved hjelp av kosthold-, livsstilsendring og medisinsk behandling før en kan henvises til spesialisthelsetjenesten. I dag er det kun virkestoffet orlistat (Xenical<sup>®</sup> og Alli<sup>®</sup>) som har markedsføringstillatelse mot fedme i Norge. For kosthold-, livsstilsendring og medisinsk behandling anses 10 % reduksjon i overvekt opprettholdt i 1 år som vellykket. Sannsynligheten for dette er dessverre bare 5 %, altså 95 % av personene vil ikke oppnå disse resultatene. I motsetning er definisjonen på vellykket resultat ved bariatrisk kirurgi på minst 50 % reduksjon av overvekt, og erfaringsmessig har reduksjonen i overvekt vært på 54-67 % avhengig av hvilken fedmeoperasjon som har blitt utført. Denne vektreduksjonen har blitt opprettholdt i en 10 års periode (Fontana and Wohlgenuth 2010). Det kan konkluderes med at bariatrisk kirurgi er den mest effektive langsiktige behandlingen mot fedme. Derimot er det knyttet visse alvorlige komplikasjoner til kirurgi, slik at pasienter individuelt avveies med hensyn til nytte og risiko før en eventuell kirurgisk behandling tilbys. Godt informerte, psykisk stabile, motiverte pasienter med BMI over 40 kg/m<sup>2</sup> eller med BMI over 35 kg/m<sup>2</sup> med alvorlig følgesykdom er generelt ansett som kandidater for denne behandlingen, uten at dette er et absolutt krav (Bult, van Dalen et al. 2008).

Kirurgisk behandling av sykkelig fedme baserer seg på to hovedprinsipper, restriksjon og malabsorpsjon, som enten brukes hver for seg eller i kombinasjon. Restriksjon av magesekkens volum reduserer lagringskapasiteten i magen slik at en tidlig metthetsfølelse oppnås og matinntaket reduseres. Tarmshunt (bypass) gir malabsorpsjon ved å korte ned eller omkoble den funksjonelle delen av tynntarmen slik at kaloriopptaket reduseres. Tarmshuntoperasjoner vil dessuten også øke utskillelse av gastrointestinale hormoner som følge av at ufordøyd mat når distale deler av tynntarmen. Disse hormonene bidrar i reguleringen av appetitt og blod-glukosenivået (Aasheim, Mala et al. 2007).

I Norge er gastrisk bypass en av de hyppigste utførte kirurgiske inngrepene der deler av magesekken atskilles og føde ledes forbi deler av ventrikkelen, hele duodenum og en andel av jejunum. Det lages en kanal (alimentært løp) der føde transporteres, og biliopankreatisk løp kobles sammen med alimentært løp i området mellom jejunum og ileum (Figur 4). Graden av malabsorpsjon avhenger av hvor stor andel av jejunum som blir forbikoblet og hvor løpene for føde og fordøyelsessaftene kobles sammen (Aasheim, Mala et al. 2007).



**Figur 4** Skisse som viser endringene ved gastrisk bypass (Aasheim, Mala et al. 2007).

## 1.5 Hensikten med oppgaven

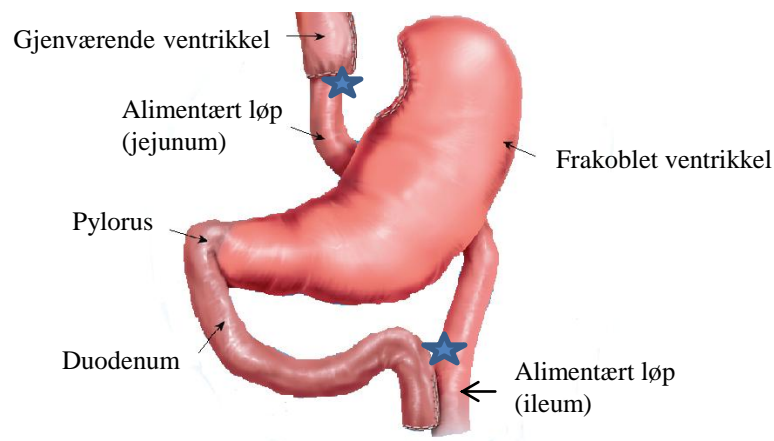
- Utvikle en Westernmetode til semikvantifisering av P-gp i humane biopsier.
- Undersøke hvor i cellen ulikt glykosylert P-gp er lokalisert ved hjelp av subcellulær fraksjonering.
- Relatere uttrykket av P-gp til individuell systemisk eksponering av atorvastatin, for å undersøke om det var en sammenheng mellom P-gp uttrykket og biotilgjengeligheten til atorvastatin.

## 2. MATERIALER OG METODE

### 2.1 Pasientmateriale

Den overordnede studien var en prospektiv, åpen, kontrollert, ikke-randomisert, enkeltcenter studie. Studien ble utført i henhold til internasjonale og nasjonale retningslinjer, og var godkjent av Etisk Komité. I den overordnede studien ble betydningen av GBP på farmakokinetikken til atorvastatin undersøkt hos 12 overvektige pasienter som inntok 20-80 mg atorvastatin hver morgen. Med 24 timers intervall dagen før operasjon, og 8 timers intervall 3-6 uker etter operasjon ble farmakokinetikken til atorvastatin undersøkt. Biopsier fra jejunum, ileum og lever fra 12 pasienter ble innhentet under GBP operasjonen (Figur 5). I tillegg ble det innhentet biopsier ved gastroskopi hos 7 pasienter fra den øverste delen av den gjenværende tynntarmen 2 år etter operasjonen. Disse biopsiene går under navnet farmakokinetikk 3 (PK3). Biopsiene har blitt homogenisert og oppbevart ved  $-70^{\circ}\text{C}$  frem til videre analyser. Demografiske data fra pasientpopulasjonen er fremstilt ved Tabell 1.

Tidligere er sammenhengen mellom CYP3A4 og CYP3A5 og biotilgjengeligheten av atorvastatin blitt studert i pasientmaterialet (Ofstedahl 2009). I denne studien skal biotilgjengeligheten til atorvastatin kobles opp mot uttrykket av P-gp hos GBP pasientene. Biopsier fra jejunum, ileum og lever fra 12 pasienter og PK3 fra 7 pasienter innhentet fra den overordnede studien inngikk i denne studien (Skottheim, Stormark et al. 2009). Tarmbiopsier fra en pasient ervervet fra jejunum proksimalt (70 cm distalt for Treitz ligament) har blitt homogenisert til bruk som P-gp standard og til subcellulær fraksjonering.



**Figur 5:** Skissen markerer hvor i GI de ulike biopsiene er tatt. I tillegg ble det tatt biopsier fra leveren (Fontana and Wohlgemuth 2010).

**Tabell 1** Demografiske data fra pasientpopulasjonen. Tidsintervall blir definert her som tiden i uker fra farmakokinetikkundersøkelser ble utført før operasjon til farmakokinetikkstudier utført etter operasjon (Skottheim, Stormark et al. 2009).

Pasient	Kjønn	Alder (år)	BMI pre (kg/m <sup>2</sup> )	BMI post (kg/m <sup>2</sup> )	Dose (mg/dag)	Tid etter operasjon (uke)	PK3 (2 år etter operasjon)
1	IR	IR	IR	IR	20	IR	Nei
2	K	51	40	IR	40	6	Ja
3	IR	IR	IR	IR	80	IR	Nei
4	M	50	34	31	20	4	Ja
5	K	47	42	IR	20	3	Ja
7	M	54	40	40	80	5	Ja
8	K	56	45	45	40	5	Nei
9	K	64	40	40	20	4	Ja
19	M	56	46	46	20	6	Nei
21	K	29	38	38	20	4	Nei
25	K	59	47	47	40	5	Ja
26	K	57	40	40	40	4	Ja
Gjennomsnitt		52	41	39	44	5	
Minimum		29	34	31	20	3	
Maksimum		64	47	47	80	6	
Median	7 K/3 M	54	40	39	30	5	

IR: Ikke rapportert

## 2.2 Analysemetoder

### 2.2.1 Homogenisering til Western analyse

#### Prinsipp

Precellys<sup>®</sup>24 er et instrument som er utviklet for å forenkle homogeniseringsprosessen. Instrumentet kan romme opptil 24 rør, og rørstørrelsen på 2 ml oppnår de optimale betingelsene. Perler av keramikk, glass eller metall tilføres hvert rør avhengig av robustheten til homogeniseringsmaterialet. Prøvene tilføres egnet buffer, og rørene lukkes igjen slik at krysskontaminasjon og svinn av materiale forhindres. Precellys<sup>®</sup>24 utfører bevegelse i åtte forskjellige retninger i høy hastighet, og apparatet kan justere parametere som omdreininger per minutt (rpm), antall sekunder og antall sykluser ut i fra hvilket vev det arbeides med. Sammenliknet med tradisjonelle homogeniseringsmetoder gir Precellys<sup>®</sup>24 høyere andel av intakt DNA, RNA og proteiner (Verollet 2008).

#### Utførelse

Biopsiene ble skåret i små biter på en glassplate plassert på is. For å oppnå 5 % vev i homogeniseringsbuffer (Appendiks, pkt 7.1.1), ble alle tarmbitene veid hver for seg i homogeniseringsrøret med fem porselenperler i. Mengde homogeniseringsbuffer ble deretter utregnet ut i fra vekten til tarmbiten og tilsatt røret. Det ble benyttet et minimumsvolum på 400 µl ved små biopsier (<20 mg) for å sikre et adekvat homogeniseringsvolum. Precellys<sup>®</sup>24 ble justert til 5000 omdreininger per minutt (rpm) i 50 sekunder med 3 sykluser. Mellom hver syklus sto prøvene på is i 3 minutter. Dette programmet ble valgt på bakgrunn av en tidligere studie (Oftedahl 2009).

Tarmbiopsier fra en pasient tatt fra proksimale jejunum (70 cm distalt for Treitz ligament) ble homogenisert til bruk som P-gp standardprøver, og videre pipettert over i en erlenmeyerkolbe plassert på is. Under konstant omrøring ble 300 µl pipettert over i eppendorfrør. Bevegelse under pipetteringen ble gjennomført for å oppnå høyst oppnåelig homogenitet mellom standardprøvene. Pasientprøvene ble etter homogeniseringen overført til hvert sitt eppendorfrør, og fryst ned til -70°C sammen med P-gp standardprøvene for senere analyser.

### ***2.2.2 Homogenisering av biopsier til cellefraksjonering***

#### **Prinsipp**

Potter-Elvehjem- og Dounce homogenisator gir en væskehomogenisering som er mer skånsom og kontrollert imotsetning til hva Precellys<sup>®</sup>24 gir. Potter-Elvehjem- og Dounce homogenisator består av teflon eller glass pistill som roterer opp og ned i et tykt tilpasset glassrør. Vevet vil skades når det blir tvunget til å passere det smale rommet mellom pistillen og glassrøret, mens organellene til cellene og deler av cellemembraner vil være intakte. Forskjellen mellom homogenisatorene er at Dounce homogenisator håndteres manuelt, mens Potter-Elvehjem homogenisator er motordrevet (Dey and Harborne 1997).

#### **Utførelse**

Tarmbiopsi fra en pasient ervervet fra proksimale jejunum (70 cm distalt for Treitz ligament) ble veid til 1,12 g og overført til glassrør tilsatt 22,4 ml homogeniseringsbuffer (Appendiks, pkt 7.1.1) for å oppnå 5 % vev i løsningen. Tarmbiopsien ble homogenisert ved hjelp av Potter-Elvehjem homogenisator med 8 pumpinger med vri, og ble deretter plassert på is for å minimalisere denaturering av proteiner og membran proteaseaktivitet grunnet varmeutviklingen under homogeniseringen (Dey and Harborne 1997). Prosessen ble gjentatt 2 ganger, og så overført til rør klar for sentrifugering.

### ***2.2.3 Fraksjonering***

#### **Prinsipp**

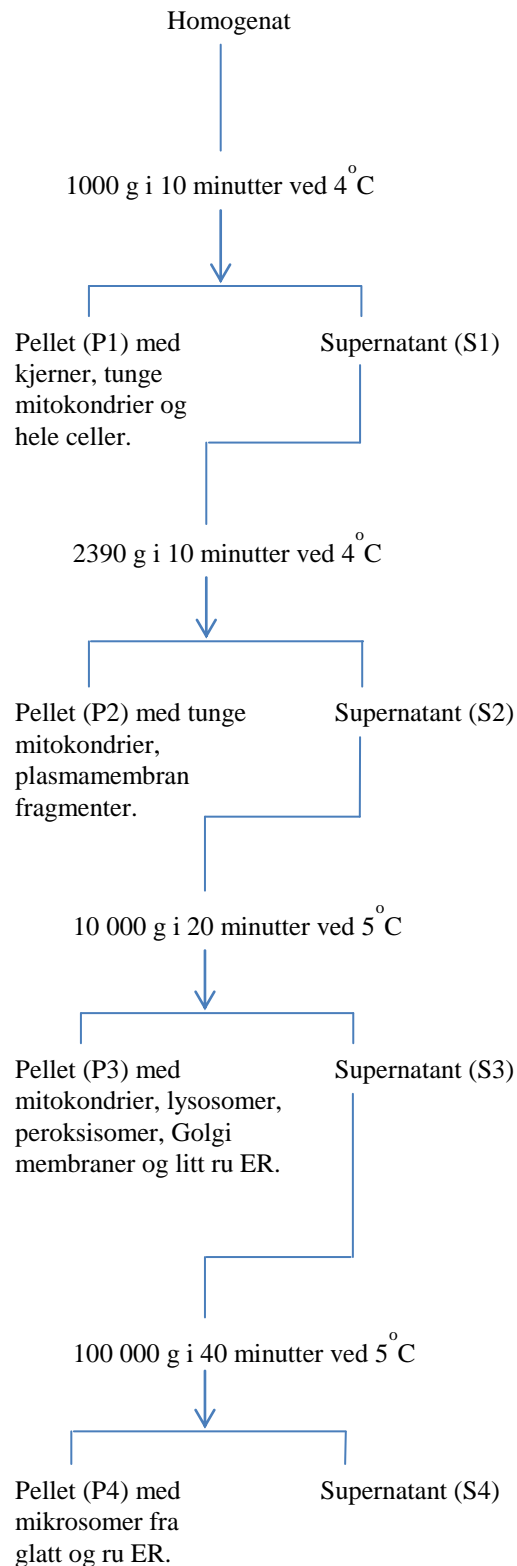
Differensiell sentrifugering er en enkel metode for å skille et homogenat i ulike fraksjoner. Metoden består av å sentrifugere med økende hastigheter der de følgende pelletene vil bestå av cellekomponenter med økende sedimenteringshastighet. Differensiell sentrifugering skiller partikler etter størrelse, form og vekt. Dette resulterer i at tunge, sfæriske partikler med høy tetthet vil sedimentere først. Ulempen med differensiell sentrifugering er blant annet at heterogene peller dannes. Det skyldes at en type organeller i homogenatet kan variere både i størrelse og tetthet, eksempelvis vil den minste mitokondrien trenge en sentrifugeringskraft som er 64 ganger større for å sedimentere ved samme hastighet som den største mitokondrien (Graham 1984).

---

**Utførelse**

Det ferdige 5 % homogenatet ble sentrifugert ved 1000 g (2590 rpm) i 10 min ved 4°C i en Hettich Zentrifugen (Figur 6). Pelleten (P1) som ble dannet ble fryst ned ved -70°C, mens supernatanten videre ble sentrifugert ved 2390 g (6190 rpm) i 10 min ved 4°C. Den nye pelleten (P2) ble reløst i 1 ml homogeniseringsbuffer, mens supernatanten ytterligere ble sentrifugert ved 10 000 g (13 978 rpm) i 20 min ved 5°C i en Optima™ MAX Ultracentrifuge. Den nydannede pelleten (P3) ble reløst i 3 ml homogeniseringsbuffer, mens supernatanten ble videre sentrifugert ved 100 000 g (45 000 rpm) i 40 min ved 5°C. Pelleten (P4) som ble dannet ble reløst i 400 µl homogeniseringsbuffer. De reløste pelletene (P2, P3 og P4) ble fryst ned ved -70°C for videre Western blott analyse.





**Figur 6** En illustrasjon av den trinnvise fraksjoneringen av homogenatet. Pelletene (P1-P4) inneholder subcellulære komponenter av reduserende størrelse ettersom sentrifugeringshastigheten øker.

### 2.2.4 Western blott analyse

#### Metodeutvikling

Målet var å utvikle en Western blott metode slik at proteinuttrykket til P-gp kunne detekteres i pasientbiopsier. Mengden av P-gp uttrykk i pasientbiopsier ble bestemt ved hjelp av en standardkurve med ukjent P-gp mengde.

Det ble utført ulike forsøk der ulike parametere ble endret underveis for å optimalisere metoden. Basert på tidligere resultater (Brekke 2010) ble det forsøkt med kokte og ukokte, konsentrerte og 10 x fortynnet tarmprøver. Kokte og ukokte prøver ble påført en 10 % polyakrylamidgel, og primærantistoffet JSB-1 (Enzo Life Science) i fortynning 1:100 og 1:500 ble forsøkt. Grunnet uspesifikk binding ble det ytterligere forsøkt med ukokte prøver i fortynningen 2 x, 4 x og 6 x applisert på en 8 % polyakrylamidgel, og primærantistoffet JSB-1 fortynnet 1:100 ble testet. Videre ble en 4-12 % NuPage gradientgel forsøkt, og etter et litteratursøk (Graber-Maier, Gutmann et al. 2010) ble en 6,5 % polyakrylamidgel testet. Et nytt primærantistoff ble utprøvd, C219 (Alexis Biochemicals), i fortynningene 1:100, 1:200 og 1:500 inkubert over natten og i 1 time. Det ble i tillegg testet ut ulike fremkallingstider.

#### Endelig metode

##### *Prøveopparbeidelse av P-gp standard og pasientprøver*

En standardrekke av den homogeniserte P-gp standardprøven med ukjent P-gp mengde ble tillaget per gel. Homogenatet ble fortynnet i forhold 1:1 med 2 x sampelbuffer (Appendiks, pkt 7.2.5) tilsatt 5 % bromfenolblått og 10 %  $\beta$ -merkaptoetanol, for videre å bli fortynnet med 1 x sampelbuffer (Appendiks, pkt 7.1.2) i fortynningsfaktoren 2 x, 4 x, 6 x, 8 x og 10 x. Den lange standardrekken ble valgt i den hensikt å kunne inkludere både glykosylert og kjerne-glykosylert P-gp (170 kDa og 140 kDa) i pasientprøvene. Grunnet tidligere sentrifugering av pasientprøvene (Oftedahl 2009) ble reløst pellet og supernatant blandet sammen i forholdet 1:1. Pasientprøvene ble deretter fortynnet med 2 x sampelbuffer tilsatt 5 % bromfenolblått og 10 %  $\beta$ -merkaptoetanol i forholdet 1:1, for videre å bli fortynnet med 1 x sampelbuffer med ulike fortynningsfaktorer for å komme innenfor standardkurven.

*Prøveopparbeidelse av pelletene fra cellefraksjoneringen*

De reløste pelletene ble fortynnet i forhold 1:1 med 2 x sampelbuffer, og videre fortynnet med 1 x sampelbuffer i fortynningsfaktoren 10 x, 20 x, 25 x, 50 x, 100 x og 200 x. De ulike fortynningene ble valgt underveis på bakgrunn av resultatene fra Western analysen for å oppnå entydige, definerte bånd.

*Støping av gel*

To 6,5 % polyakrylamidgeler ble støpt parallelt. Ammonium persulfat (APS) og TEMED setter i gang polymeriseringsprosessen (EnCorBiotechnologyInc 2010), slik at disse stoffene ble tilsatt gelblandingen umiddelbart før overføringen til støpeformen. Det ble pipettert ut 200 µl isobutanol over gelene slik at det ble oppnådd en rett geloverflate og dette forhindret også at oksygen økte polymeriseringstiden. Etter 60 min ble isobutanolen fjernet og en 4 % stacking gel (Appendiks, pkt 7.1.2) ble støpt over polyakrylamidgelen i støpeformen. Brønnskammere ble plassert i før stacking gelen polymeriserte (60 min).

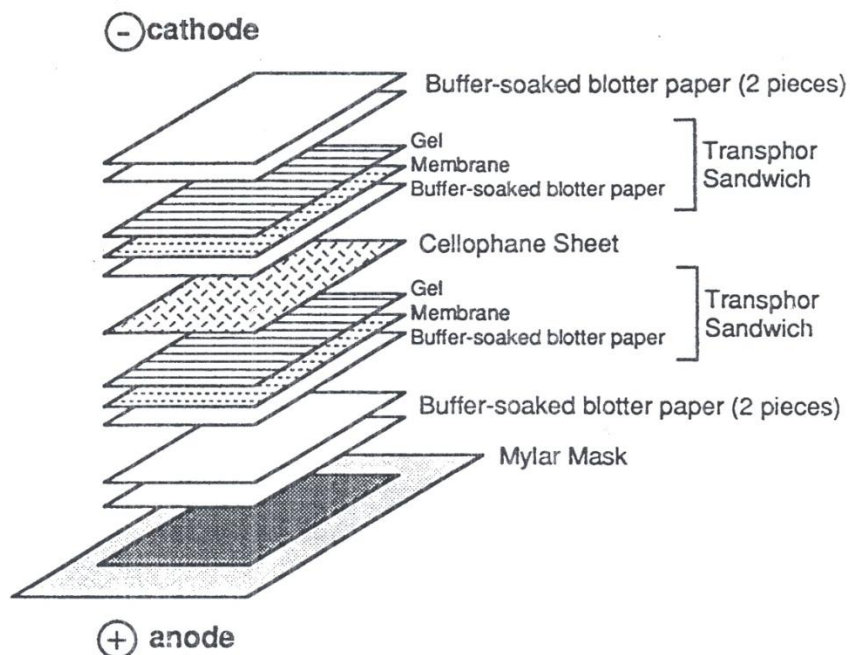
*Gelelektroforese*

Standardrekken og en pasientprøve i ulike fortynninger ble virvlet på en whirlmikser (Heigar lab) før de ble applisert på gelen. En SDS-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) ble igangsatt der det elektriske feltet og elektroforesebufferen (Appendiks, pkt 7.1.2) bidro til at proteinene vandret mot anoden, og ble separert etter størrelse. Elektroforesen pågikk i 1 time og 20 minutter med elektrisk spenning på 200 volt under konstant kjøling.

*Blotting over til membran*

Filterpapir, nitrocellulosemembraner og cellofan ble fuktet i blottingsbuffer (Appendiks, pkt 7.1.2) og overført til et blottingsapparat som vist i Figur 7. Strømstyrken ble stilt inn til 100 mA i 45 minutter. Ferdig blott ble farget med 0,1 % (w/v) Ponceau S i 5 % (v/v) eddiksyre i 1 minutt på "bellydancer" (Alfa-Lab A/S), for å kontrollere overføring av proteinene til nitrocellulosemembranene. Membranene ble deretter vasket med destillert vann i 1 min, skylt to ganger med T-TBS (Appendiks, pkt 7.1.2) og vasket i 10 min med T-TBS. For å hindre uspesifikk binding ble membranene blokket med 5 % blotto (Appendiks, pkt 7.1.2) i 60 min. Primærantistoffet C219 fortynnet 1:200 løst i 5 ml blotto ble så tilsatt membranene til vipping over natt i kjølerom. Membranene ble vasket 3 x 10 minutter i romtemperatur før

peroksydasemerket sekundærantistoffet geit anti-mus fortynt 1:1500 ble inkubert i 60 minutter. Ytterligere skylling med T-TBS og 3 x 10 minutter vasking med T-TBS ble utført før fremkalling.



**Figur 7** Skisse av hvordan filterpapirene, nitrocellulosemembranene og cellofanen ble plassert i blottingapparatet.

### Fremkalling

Membranene ble inkubert med 10 ml “enhanced chemiluminescence” (ECL) reagens i 1 min og pakket inn i plastfolie. Eventuelle luftbobler og væskeansamlinger ble eliminert fra overflaten. Membranene ble plassert i en fremkallerbok. Lyset ble slukket og filmen (Kodak BioMax Ms Film) ble lagt over membranene og eksponert i ulikt antall minutter fra membran til membran. Filmen ble fremkalt i noen sekunder i Kodak LX-24 røntgenfremkaller (100 ml fremkaller + 300 ml vann), skylt i vann og lagt i fikseringsløsning (50 ml fiksatør + 150 ml vann) i noen sekunder. Filmen ble ytterligere skylt i vann før den ble hengt opp til tork.

## **Stripping av membran**

Membranen ble vasket noen minutter i T-TBS før den ble inkubert med strippingbuffer ferdiglaget fra produsent (Thermo Scientific) på “bellydancer” i 5-15 minutter. Membranen ble videre vasket med T-TBS i 2 x 10 minutter, reblokket med blotto i 60 minutter og inkubert med nytt primærantistoff spesifikt for P-gp og sekundærantistoff.

### ***2.2.5 Kvantifisering av proteiner***

Filmen med bilde av Westernblottet ble skannet med en hp Scanjet 5590 skanner (Hewlett-Packard Norge as, Oslo, Norge) via skanningprogrammet 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 som kvantifiserer intensiteten av flekkene på filmen ved å lokalisere de manuelt, og samtidig korrigerer for bakgrunnen. Resultatene ble videre eksportert til Excel 2010 og proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av tilhørende standardkurve.

### ***2.2.6 Måling av totalprotein***

Metoden for måling av totalprotein er basert på arbeidet til Bradford (1976). En standardrekke som besto av bovint serumalbumin (BSA) og homogeniseringsbuffer ble laget i 7 fortyninger (0-300 µl). Vevsprøvene ble fortennet 1:9 med homogeniseringsbuffer, og 10 µl av standardrekken og vevsprøvene ble pipettert ut i en 96- brønners-mikrotiterplate i 2 paralleller. Til hver brønn ble 200 µl Bio-Rad Protein Assay fargeløsning (10 ml Bio-Rad med Coumassi Brilliant Blue G-250 og 40 ml destillert vann) tilsatt, og inkubert 5 minutter ved romtemperatur. Fargestoffet reagerer med basiske og aromatiske aminosyrer i et surt miljø (fargeendring fra rød til blå) og danner et kompleks som øker absorpsjonsnivået til 595 nm (Noble and Bailey 2009). Den totale mengden protein ble derfor estimert via spektrofotometrisk måling ved 595 nm bølgelengde i Wallac 1420 (Perkin Elmer). De ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene ble estimert ved hjelp av standardkurve basert på de kjente proteinkonsentrasjoner fra standardprøvene.

### *2.2.7 Databehandling*

Siden P-gp standard ikke er kommersielt tilgjengelig har det blitt laget en P-gp standard til bruk i alle forsøkene og alle bestemmelser av P-gp er relatert til denne. En fortynningsrekke av standarden ble fremstilt for å inkludere P-gp mengden i biopsien i standardkurven. Siden mengden P-gp i standarden er ukjent er beregningene av P-gp mengden i biopsiene oppgitt i P-gp enhet/ng totalprotein. Betegnelsen P-gp enhet er beregnet ved å multiplisere den semikvantifiserte P-gp verdien, som er utregnet fra den lineære standardkurven, med fortynningsfaktoren til biopsien. Når P-gp mengde i standarden blir kjent, kan konsentrasjonen videre beregnes til mg P-gp/ng totalprotein.

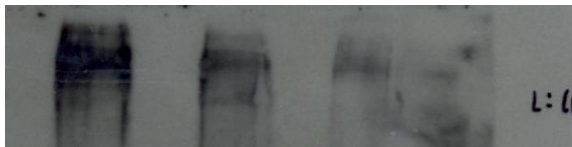
Semikvantifisert P-gp uttrykk (P-gp enhet/ng totalprotein) ble multiplisert med lengden på den bortkoblede jejunum for hver pasient. Disse beregningene ble korrelert mot endringen i  $AUC_{0-8}$  per mg gitte dose av atorvastatin (Figur 21).

### 3. RESULTATER

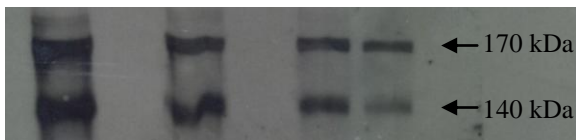
#### 3.1 Metodeutvikling

##### *Type gel*

Det ble detektert to P-gp bånd under metodeutviklingen, det ene båndet ble påvist ved 170 kDa og det andre båndet ved 140 kDa. En polyakrylamidgel 8 % og 10 % samt 4-12 % NuPage gradientgel ble forsøkt, men gelene viste en dårligere separasjon av proteinene enn hva en 6,5 % polyakrylamidgel fremstilte (Figur 8 og 9).



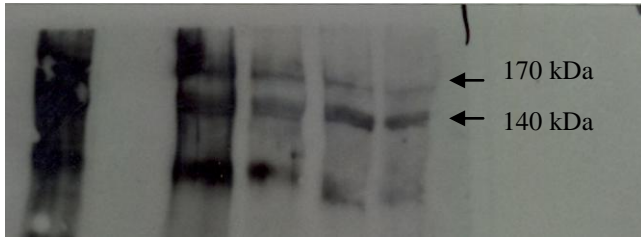
**Figur 8** Applisert ukokt prøve (fortynnet konsentrert, 2 x, 4 x og 6 x) på en 8 % polyakrylamidgel, primærantistoffet JSB-1 fortynnet 1:100.



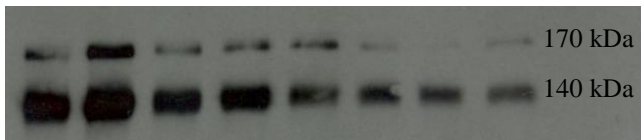
**Figur 9** Applisert ukokt prøve (fortynnet konsentrert, 2 x, 4 x, 6 x) på en 6,5 % polyakrylamidgel, primærantistoffet JSB-1 fortynnet 1:100.

##### *Primærantistoff*

Primærantistoffet C219 i fortynning 1:200 ga skarpere bånd enn JSB-1 fortynnet 1:100, og C219 viste å gi lavest grad av uspesifikk binding (Figur 10 og 11).



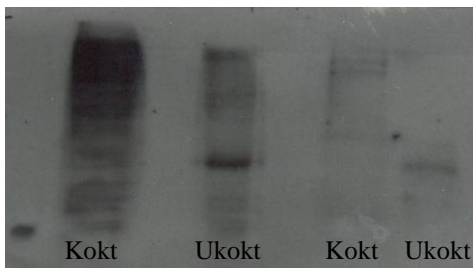
**Figur 10** Applisert ukokte prøver (fortynnet 2 x, 4 x, 6 x, 8 x) på en 6,5 % polyakrylamid gel, primærantistoffet JSB-1 fortynnet 1:100, fremkalt i 15 min.



**Figur 11** Applisert ukokte prøver (paralleller av fortynning 2 x, 4 x, 6 x, 8 x) på en 6,5 % polyakrylamidgel, primærantistoffet C219 fortynnet 1:200, fremkalt i 10 min.

### Kokte versus ukokte prøver

Sammenlikningen av kokte og ukokte prøver avdekket at ukokte prøver ga mindre uspesifikk binding (Figur 12).



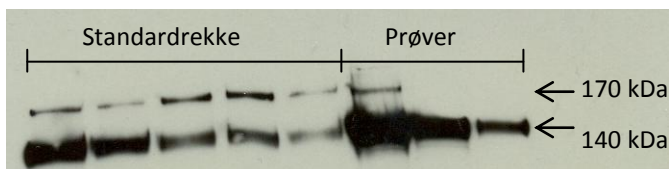
**Figur 12** Appliser kokt og ukokt prøve i konsentrert og 10 x fortynning på en 10 % polyakrylamidgel, primærantistoff JSB-1.

Avslutningsvis viste metodeutviklingen at ukokte prøver i fortynningen 2-6 x applisert på en 6,5 % polyakrylamidgel var gunstig for å semikvantifisere uttrykket av P-gp. Elektroforese pågående i 1 time og 20 minutter ga en ideell separasjon av P-gp, og en optimal deteksjon av P-gp ble oppnådd ved primærantistoffet C219 fortynnet 1:200 inkubert over natten. Den gunstigste fremkallingstiden viste å variere mellom gelene.

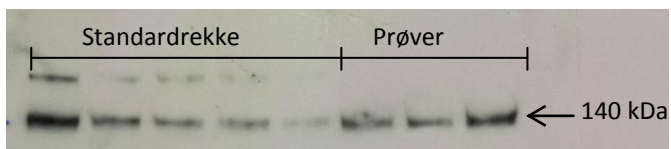


## 3.2 Lokalisasjonen av glykosylert P-gp i cellen

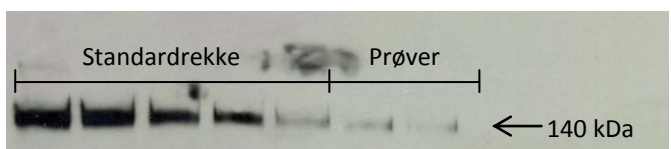
Den subcellulære fraksjoneringen viste 140 kDa P-gp bånd i fraksjoner med plasmamembraner, Golgi apparat, mitokondrier og ER (P2, P3 og P4 fraksjonene), mens 170 kDa P-gp bånd kun ble påvist i plasmamembran fraksjonen (P2 fraksjonen) (Figur 6, 13-15).



**Figur 13** Western blott der pellet 2 som består av plasmamembranfragmenter og tunge mitokondrier ble applisert på gelen med fortynningsfaktor 4 x, 10 x, 20 x.



**Figur 14** Western blott der pellet 3 som består av Golgi apparatet, mitokondrier, lysosomer og peroksisomer ble applisert på gelen med fortynningsfaktorene 20 x og 25 x. Det siste båndet viser pellet 4 (mikrosomer) i 25 x fortynning.



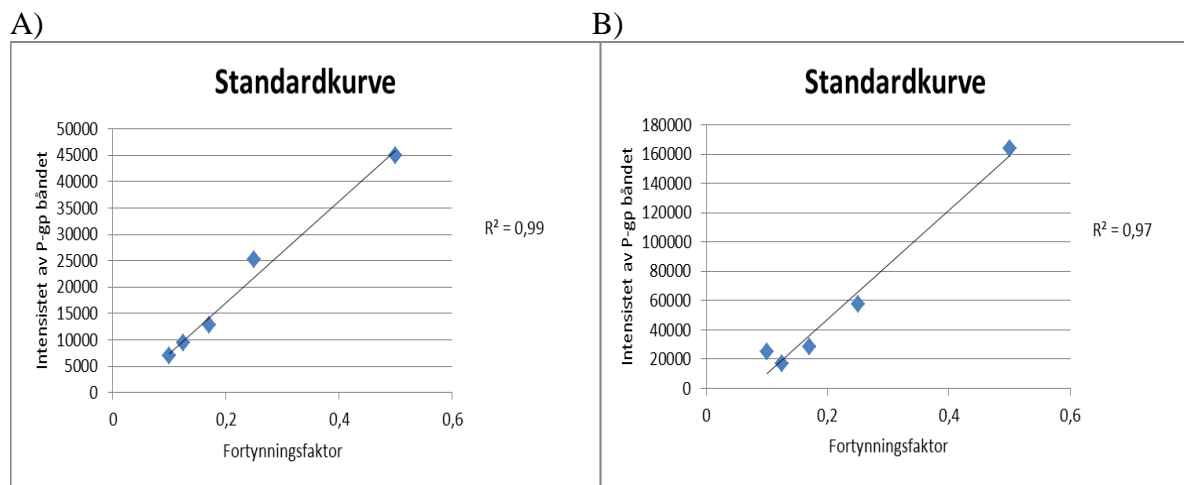
**Figur 15** Western blott der pellet 4 (mikrosomer) er applisert på gelen i fortynningsfaktorene 50 x og 100 x.

## 3.3 Resultater fra pasientpopulasjonen

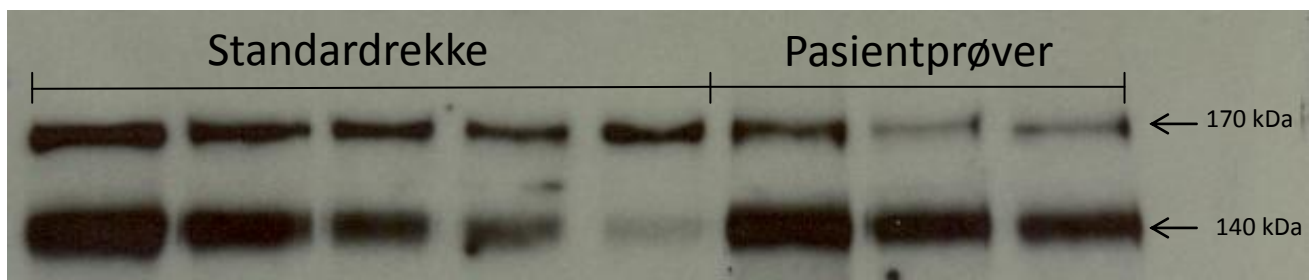
### 3.3.1 Standardkurve

Standardkurvene viste linearitet for både 140 og 170 kDa P-gp (Figur 16), og den utviste en varierende  $r^2$  verdi med første kvartil på 0,86, median 0,94 og tredje kvartil på 0,97. Hvis korrelasjonen til standardkurven var lav ( $r^2 < 0,80$ ) ble forsøket kjørt om igjen. Den laveste

aksepterte  $r^2$  verdien var på 0,71, og den ble akseptert unntaksvis på bakgrunn av punktenes plassering i plottet og at båndene på filmen var skarpe og definerte.



**Figur 16** Illustrert standardkurve for 170 kDa (A) og 140 kDa (B) P-gp i ulike fortynninger.



**Figur 17** Western blott av pasient 26 jejunum som uttrykker både 170 kDa og 140 kDa P-gp.

Det ble detektert to P-gp bånd (Figur 17), det ene båndet ble påvist ved 170 kDa og det andre båndet ved 140 kDa. Totalproteinmålingene var innenfor den tilhørende standardkurven (Appendiks, pkt 7.3).

### 3.3.2 Semikvantifisering av P-gp hos GBP pasientgruppen

#### Jejunum

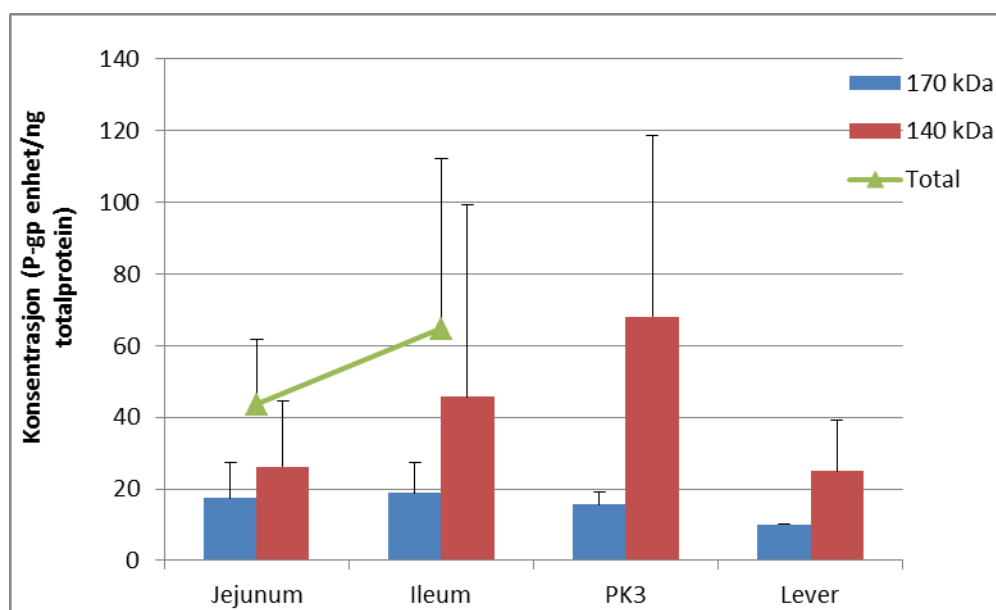
P-gp ble detektert i 11 av 12 pasientprøver tatt fra jejunum, ettersom P-gp ikke ble detektert i homogenatet fra den tolvte pasienten tross gjentatte forsøk. Gjennomsnittlig konsentrasjon

av total P-gp (sum av 140 kDa og 170 kDa båndene) i jejunum var 43,5 P-gp enheter/ng totalprotein. Individuelt utviste pasient 5 høyest konsentrasjon av total P-gp med 69,8 P-gp enheter/ng totalprotein, mens pasient 25 ble estimert med det laveste nivået med 8,3 P-gp enheter/ng totalprotein (Tabell 2). Dette tilsvarer en variasjon på 8,4 ganger. Tre pasienter uttrykte P-gp på 170 kDa og alle pasientene uttrykte 140 kDa.

### *Ileum*

For ileum var gjennomsnittlig totalkonsentrasjon av P-gp for de 11 pasientprøvene 64,9 P-gp enheter/ng totalprotein. Pasient 5 uttrykte høyest totalkonsentrasjon av P-gp med 177,9 P-gp enheter/ng totalprotein, mens pasient 7 utviste det laveste nivået med 5,8 P-gp enheter/ng totalprotein, noe som tilsvarte 30,7 gangers forskjell (Tabell 2). Det var 4 pasienter som uttrykte 170 kDa P-gp og alle pasientene uttrykte P-gp på 140 kDa.

Det ble påvist en tendens til at total P-gp og 140 kDa P-gp økte nedover i tarmen siden konsentrasjonen av P-gp uttrykket gjennomsnittlig var høyere i ileum enn i jejunum (Figur 18). For 170 kDa P-gp ble det ikke avdekket et entydig mønster i pasientverdiene (Tabell 2).



**Figur 18** Gjennomsnittlig mengde (+ SD) P-gp (P-gp enhet/ng totalprotein) fra jejunum (n=11), ileum (n=11), PK3 (n=7) og lever (n=11) i biopsier fra GBP-pasienter.

### *PK3*

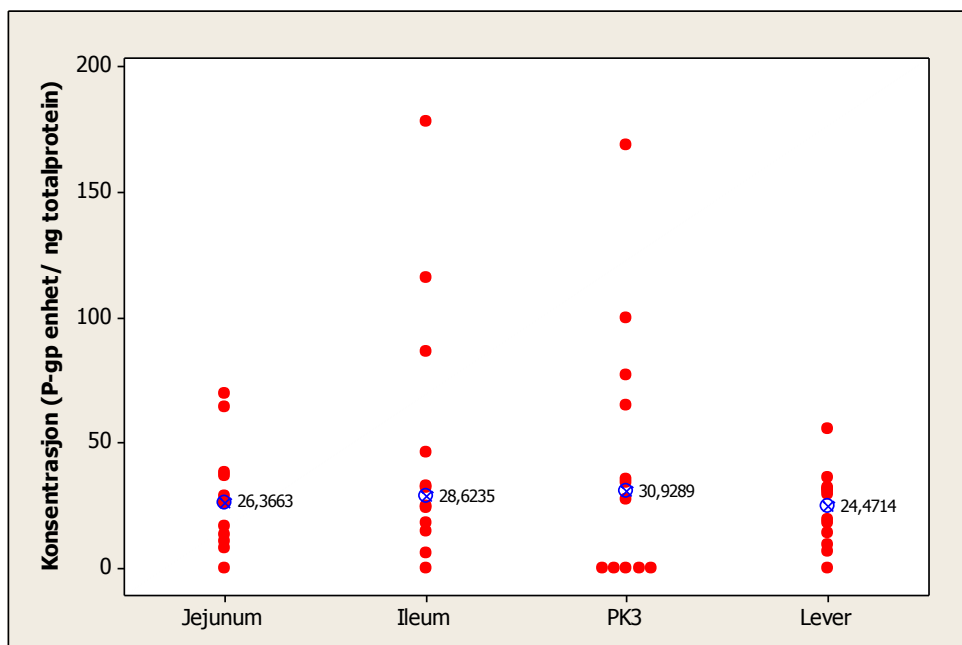
PK3 er biopsi tatt fra den øverste delen av den gjenværende jejunum (nåværende proksimale tynntarm) ved gastroskopi 2 år etter gjennomgått operasjon. Av de 7 pasientene der PK3

prøver ble tatt var nivået jevnt over høyt sammenliknet med nivået fra tarmbiopsiene tatt under operasjon. For 6 av 7 pasienter hadde konsentrasjonen av total P-gp økt i PK3 prøvene med en gjennomsnittlig 1,9 gangers økning sammenliknet med biopsiene fra jejunum før operasjon (Figur 18). Pasient 4 hadde høyeste konsentrasjon av P-gp med 168,5 P-gp enheter/ng totalprotein, mens pasient 26 viste lavest konsentrasjon med 27,4 P-gp enheter/ng totalprotein, tilsvarende 6,1 gangers forskjell (Figur 19). To pasienter uttrykte P-gp på 170 kDa og alle 7 pasientene uttrykte 140 kDa P-gp.

### Lever

P-gp ble detektert i 11 av 12 pasientprøver, og selv etter gjentatte forsøk ble ikke P-gp detektert i homogenatet fra den tolvte pasienten. Det var ulike pasienter som ikke utviste P-gp uttrykk i jejunum og lever. Det laveste totale P-gp uttrykket ble detektert i lever med en gjennomsnittsverdi på 34,9 P-gp enheter/ng totalprotein. Med den høyeste konsentrasjonen på 55,6 P-gp enheter/ng totalprotein og den laveste med 6,6 P-gp enheter/ng var variasjonen mellom pasientprøvene på 8,4 ganger (Figur 19). Det var kun pasient 7 som uttrykte P-gp på 170 kDa, mens alle pasientene uttrykte 140 kDa P-gp.

I lever var gjennomsnittlig konsentrasjon av total P-gp 80 % av gjennomsnittlig konsentrasjon i jejunum og 50 % av gjennomsnittlig konsentrasjon i ileum.



**Figur 19** Variasjonen i total P-gp uttrykk (170 kDa+ 140 kDa) hos pasientene. Median er angitt i plottet.

**Tabell 2** Konsentrasjon av P-gp i pasientbiopsiene angitt i P-gp enhet/ng totalprotein.

Konsentrasjon (P-gp enhet/ng totalprotein)					
P-gp størrelse	Pasient	Jejunum	Ileum	PK3	Lever
170 kDa	1	-	IR	IR	-
140 kDa	1	13,7	IR	IR	18,2
170 kDa	2	-	-	-	-
140 kDa	2	16,8	33,1	65,0	ID
170 kDa	3	27,8	19,2	IR	-
140 kDa	3	36,4	27,3	IR	31,7
170 kDa	4	-	30,6	-	-
140 kDa	4	36,7	55,5	168,5	6,6
170 kDa	5	-	-	-	-
140 kDa	5	69,8	177,9	77,3	36,1
170 kDa	7	-	-	18,2	10,0
140 kDa	7	ID	5,8	81,8	19,4
170 kDa	8	16,7	-	IR	-
140 kDa	8	9,7	14,5	IR	55,6
170 kDa	9	-	15,6	13,1	-
140 kDa	9	28,9	16,5	21,4	19,6
170 kDa	19	-	-	IR	-
140 kDa	19	37,9	17,8	IR	13,8
170 kDa	21	-	-	IR	-
140 kDa	21	11,0	116,1	IR	31,2
170 kDa	25	-	-	-	-
140 kDa	25	8,3	25,1	35,5	32,2
170 kDa	26	7,6	10,2	-	-
140 kDa	26	18,7	14,2	27,4	9,4
<b>Gjennomsnittlig konsentrasjon av total P-gp (140 kDa+170 kDa)</b>		<b>43,5</b>	<b>64,7</b>	<b>83,8</b>	<b>34,9</b>
<b>Standardavvik av total P-gp (140 kDa+170 kDa)</b>		<b>18,1</b>	<b>47,7</b>	<b>51,9</b>	<b>15,1</b>

IR: Ikke rapportert

ID: Ingen deteksjon

- : Ingen deteksjon av P-gp bånd

### 3.4 Sammenhengen mellom uttrykket av P-gp og kinetikkdata

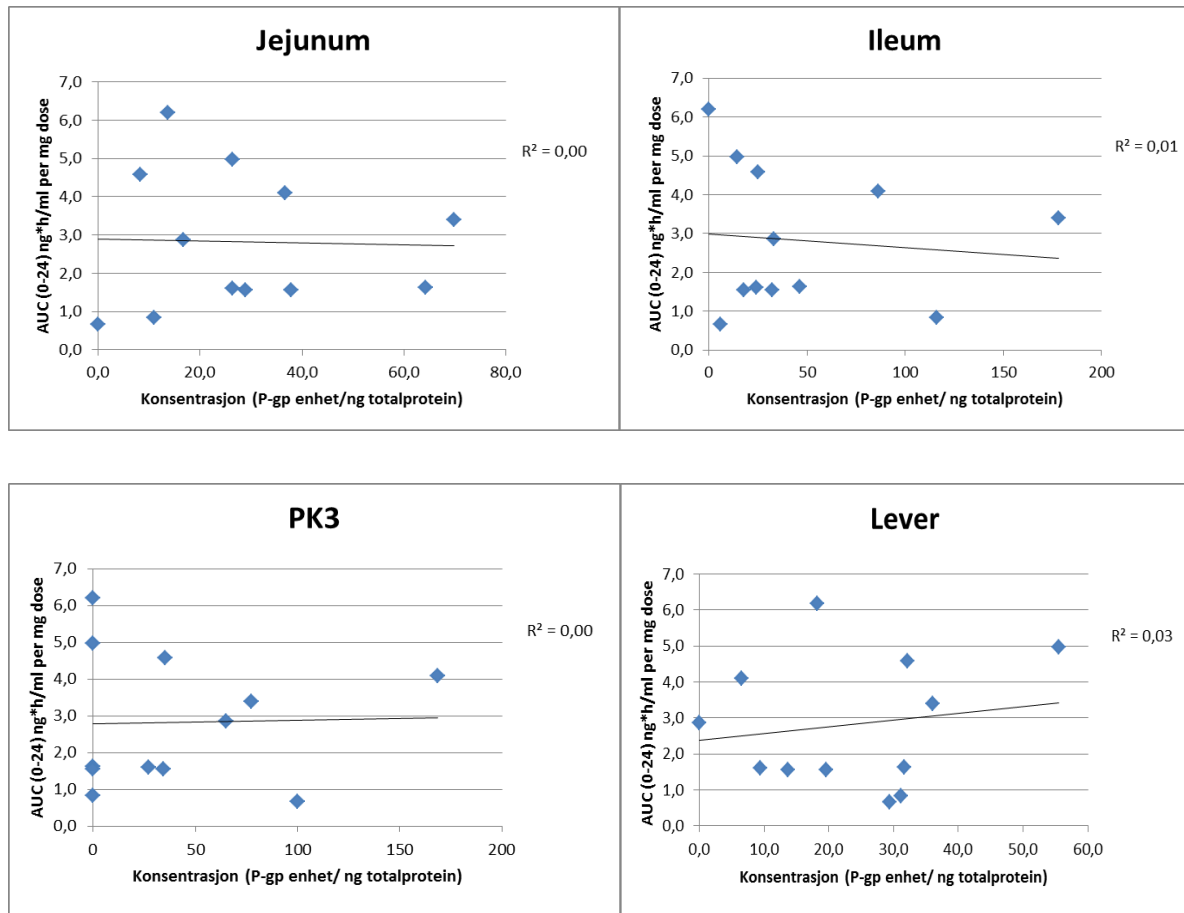
Farmakokinetikkdata fra hovedstudien er presentert i Tabell 3 (Skottheim, Stormark et al. 2009). Pasient 1 og 3 ble ekskludert fra hovedstudien på grunn av avvikene alimentær og biliopankreatisk avledning, men foreliggende farmakokinetikkdata og målbar P-gp uttrykket i biopsiene avgjorde at pasientene ble inkludert i denne delstudien. GBP operasjonen viste å gi variabel effekt på den systemiske eksponeringen av atorvastatin, der  $AUC_{0-8}$  ratio varierte fra 2,6 ganger reduksjon til 2,3 ganger økning. Det var en gjennomsnittlig økning i  $AUC_{0-8}$  ratio på  $1,2 \pm 0,6$ , hvorav kun tre pasienter viste en reduksjon etter operasjonen. Verdiene for  $AUC_{0-8}$  varierte 17,9 ganger preoperativt, og 3,1 ganger postoperativt. To av de inkluderte

pasientene røyket (17 %), og ingen av pasientene inntok medisiner som kjent interagerer med farmakokinetikken til atorvastatin (Skottheim, Stormark et al. 2009).

**Tabell 3** Oversikt over den systemiske eksponeringen av atorvastatin hos den enkelte pasient i et tidsintervall på 24 timer ( $AUC_{0-24}$ ) vist før (pre) operasjon og 8 timer ( $AUC_{0-8}$ ) vist før og etter (post) operasjonen. I tillegg er forholdet og endringen i den systemiske eksponeringen før og etter operasjon vist i tabellen (Skottheim, Stormark et al. 2009).

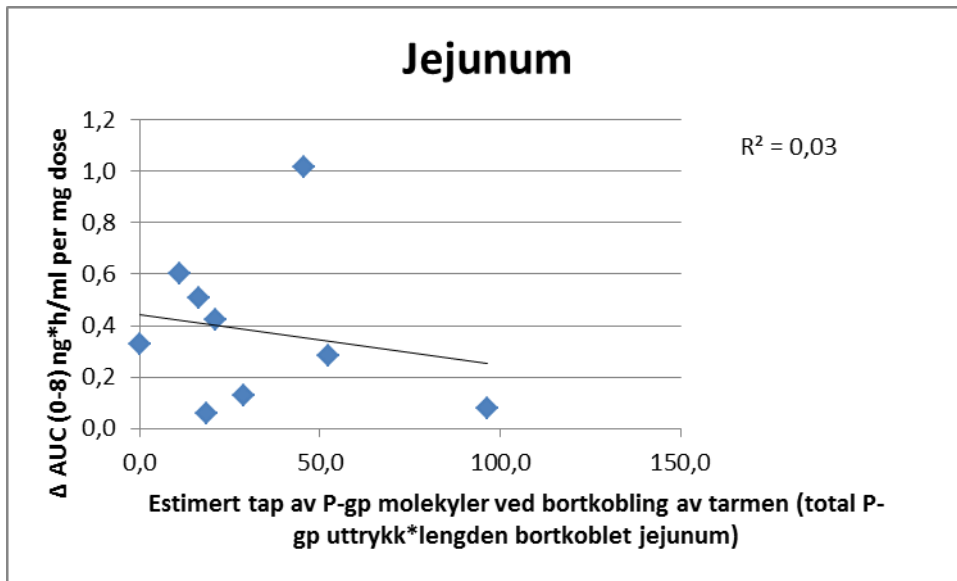
Pasient	Dose (mg)	$AUC_{0-24}$ (ng*h/ml) Pre	$AUC_{0-8}$ (ng*h/ml) Pre	$AUC_{0-8}$ (ng*h/ml) Post	$AUC_{0-8}$ ratio	$\Delta AUC_{0-8}$
1	20	123,8	54,8	64,9	1,2	10,1
2	40	114,5	62,8	65,2	1,0	2,4
3	80	129,6	69,9	76	1,1	6,1
4	20	81,7	43,2	34,6	0,8	-8,7
5	20	67,8	42,4	48,0	1,1	5,7
7	80	53,2	34,9	61,1	1,7	26,2
8	40	199,2	138,1	64,9	0,5	-73,1
9	20	31,1	18,5	21,0	1,1	2,5
19	20	31,1	17,6	37,9	2,2	20,3
21	20	16,6	9,1	21,1	2,3	12,0
25	40	183,1	162,9	63,1	0,4	-99,8
26	40	64,3	37,1	54,0	1,5	16,9
Gjennomsnitt	36,7	91,3	57,6	51,0	1,2	-6,6
Minimum	20	16,6	9,1	21,0	0,4	-99,8
Maksimum	80	199,2	162,9	65,2	1,7	26,2
Standardavvik	22,3	59,4	47,3	18,4	0,6	38,8

P-gp uttrykket i pasientbiopsiene fra jejunum, ileum, PK3 og lever viste ingen sammenheng med biotilgjengeligheten til atorvastatin før operasjon (Figur 20). Hvis P-gp skulle hatt en sammenheng med systemisk eksponering av atorvastatin, ville de pasienter med høyt uttrykk av P-gp vist lavest  $AUC_{0-24}$ . Det var ingen slik sammenheng for verken jejunum, ileum, PK3 eller lever.



**Figur 20** Konsentrasjonen av P-gp (P-gp enhet/ng totalprotein) for samtlige pasienter korrelert til atorvastatin konsentrasjonen ( $AUC_{0-24}$  ng\*h/ml) per gitt mg dose før operasjon.

I Figur 21 er det illustrert hvor mange P-gp molekyler som er estimert tapt under den bariatriske kirurgien mot endringen i  $AUC_{0-8}$  pre- og postoperativt ( $AUC_{0-8}$  postoperativt -  $AUC_{0-8}$  preoperativt). Hos en pasient har den bortkoblede tarmdelen spilt en stor rolle for  $AUC_{0-8}$  verdien ved at endringen av  $AUC_{0-8}$  er høy, mens en annen pasient endret  $AUC_{0-8}$  lite til tross for det høye tapet av P-gp molekyler under avkoblingen. Hvis det skulle vært en sammenheng mellom bortkoblede P-gp molekyler og endring av  $AUC_{0-8}$ , ville en høy andel av bortkoblede P-gp gitt en høy endring i  $AUC_{0-8}$ . Det ble ikke vist en slik sammenheng mellom bortkoblede P-gp og endring i  $AUC_{0-8}$  hos GBP pasientene.



**Figur 21** Illustrert betydningen av den kirurgiske bortkoblede delen av jejunum har på den systemiske eksponeringen av atorvastatin hos pasientene. En lineær regresjonslinje er plottet for GBP pasientene ( $r^2=0,03$ ). Pasient 4, 8 og 25 viste en nedgang i biotilgjengeligheten av atorvastatin, og er ekskludert fra plottet for å illustrere en eventuell sammenheng mellom tapt P-gp molekyler ved operasjon og endring i den systemiske eksponeringen av atorvastatin.



## 4. DISKUSJON

Det ble utviklet en Western blott metode for å semikvantifisere P-gp, og det ble identifisert to P-gp bånd på 140 kDa og 170 kDa. Ved subcellulær fraksjonering av et tarmhomogenat ble både 140 kDa og 170 kDa P-gp lokalisert i cellemembranfraksjonen, men kun 140 kDa P-gp ble lokalisert i fraksjonene fra ER og Golgi apparatet. Det ble vist en høy grad av variasjon i P-gp uttrykk fra person til person, og uttrykket av total P-gp viste en tendens til å øke nedover i tarmen. Det ble ikke funnet en sammenheng mellom P-gp uttrykket og den systemiske eksponeringen av atorvastatin hos GBP pasientene. Av de tolv pasientene kunne ikke den bortkoblede P-gp mengden forklare endringen i den systemiske konsentrasjonen av atorvastatin som ble observert etter GBP operasjonen.

### 4.1 Metodeutvikling

En 8 % og 10 % polyakrylamidgel viste å gi en dårlig separasjon av proteinene grunnet den høye prosentandelen av polymer. En 4-12 % NuPage gradientgel ble derfor forsøkt i den hensikt å få frem skarpe og separerte bånd, men overføringen fra gelen til membranen ble dårlig og separasjonen var heller ikke tilfredsstillende. Det dårlige resultatet ved blottingen kunne skyldes for lite fuktighet eller luft mellom lagene i sandwich, som har gitt ufullstendig overføring av proteinene til membranen. En 6,5 % polyakrylamidgel viste å gi den gunstigste separasjonen av P-gp båndene.

Primærantistoffet C219 binder til et epitop nær det ATP bindende domenet til P-gp (Kuttesch, Parham et al. 1996). JSB-1 er et primærantistoff som binder spesifikt til et epitop på P-gp lokalisert i cytoplasma, men dette antistoffet kryssreagerer med pyruvat karboksylase, et enzym i mitokondrier (Del Poeta, Stasi et al. 1996). En kryssreaksjon med andre proteiner for JSB-1 kan være en forklaring på at C219 ga mindre uspesifikk binding og skarpere bånd enn JSB-1.

Kokte prøver kan gi dårlig løslighet og aggregering av P-gp, som resulterer i varierende separering i gelen og uspesifikk binding (Greenberger, Lisanti et al. 1991; al-Shawi and Senior 1993; Eufemia and Epel 2000). Basert på tidligere studier ble kokte og ukokte tarmprøver applisert på en gel (Brekke 2010), men som antydte viste ukokte tarmprøver å gi

lavest grad av uspesifikk binding. Ukokte tarmprøver var gunstig å benytte i analysen for å oppnå et mer nøyaktig kvantitativt mål på P-gp mengden i homogenatene.

## 4.2 P-gp bånd

Western blott metoden avdekket to bånd for P-gp og 140 kDa P-gp er beskrevet å være en kjerne-glykosylert form for P-gp (Gribar, Ramachandra et al. 2000; Greer and Ivey 2007; Draheim, Reichel et al. 2010), mens 170 kDa P-gp er fullt glykosylert P-gp (Xie, Burcu et al. 2010). Det strides om 140 kDa er funksjonell eller ikke funksjonell. Tre *in vitro* artikler viser at 140 kDa P-gp er funksjonell, men stabiliteten og uttrykket av P-gp i cellemembranen er redusert (Schinkel, Kemp et al. 1993; Bentley, Quinn et al. 1997; Gribar, Ramachandra et al. 2000). En annen *in vitro* studie indikerer at 140 kDa P-gp ikke er funksjonell siden den ikke viste ATPase aktivitet og ATP-indusert konformasjonsendring ved tilstedeværelse av et spesifikt substrat, i motsetning til hva tilfellet var for 170 kDa P-gp (Loo and Clarke 1999). Videre rapporterte *Sieczowski et al.* at 180 kDa P-gp ble redusert til 140 kDa etter minst 24 timers eksponering for atorvastatin og simvastatin *in vitro*. Dette ble blant annet forklart med at hemming av HMG-CoA reduktase fjernet dolichol fra cellen, og dette er en essensiell substans for starten av glykosyleringen i ER (Sieczkowski, Lehner et al. 2010). Pasientene som inngår i denne oppgaven inntok 20-80 mg atorvastatin hver morgen, og det kan være en mulig forklaring på det høye uttrykket av 140 kDa P-gp i biopsier fra lever og tarm. For å besvare spørsmålet om 140 kDa P-gp er funksjonell og dens glykosylering ved tilstedeværelse av atorvastatin *in vivo*, trengs det ytterligere studier.

## 4.3 Fraksjonering

For å avdekke hvor i cellen ulikt glykosylert P-gp befant seg, ble en subcellulær fraksjonering utført. Fraksjoneringen viste 140 kDa P-gp i fraksjoner med plasmamembran, Golgi apparatet, mitokondrier og ER, mens 170 kDa P-gp kun ble påvist i plasmamembranfraksjonen. Denne fordelingen av de ulikt glykosylerte P-gp variantene i cellen kan være reell, men lokalisasjonen kan også ha gitt et feilaktig bilde av virkeligheten ved at den differensielle sentrifugeringen kan ha dannet heterogene pelleter. Rotor med fast vinkel har en sentrifugeringskraft i toppen av røret som kan være halvparten av kraften i

bunnen av røret. Dette resulterer i at den kraften som må til for å fraksjonere de større partiklene i toppen av løsningen tilsvarende også den kraften som vil fraksjonere de små partiklene nær bunnen av røret. En homogen pellet vil derfor kun være mulig i siste steg av fraksjoneringen der kun små organeller er igjen i løsningen. Overlapp mellom størrelsen på de ulike organellene er også med på å skape heterogene pelleter. Den minste mitokondrien vil trenge 64 ganger høyere sentrifugeringskraft enn den største mitokondrien trenger for å sedimentere (Graham 1984). Det vil ikke være mulig å oppnå en 100 % homogen fraksjon ved differensiell fraksjonering, men pelleten kan reløses og sentrifugeres igjen for å redusere kontaminasjon.

Årsaker til heterogene pelleter kan også skyldes homogeniseringsprosessen. Ved Potter-Elvehjem homogenisatorer skal ikke avstanden mellom teflonpistill og beholderens vegg være for liten (>0,05 mm) siden det kan gi i overkant mye fragmentering av organeller og membraner. Sentrifugeringskraften for å sedimentere disse fragmentene vil dermed øke og kontaminasjon mellom de subcellulære fraksjonene vil forekomme (Graham 1984).

Homogenatet som ble benyttet til den subcellulære fraksjoneringen var fra en pasient som inntok atorvastatin hver morgen. Som tidligere nevnt kan P-gp ha blitt redusert til 140 kDa etter minst 24 timers eksponering av atorvastatin (Sieczkowski, Lehner et al. 2010). Denne reduksjonen av størrelsen på P-gp kan være en medvirkende årsak på tilstedeværelsen av 140 kDa P-gp i plasmamembranen. Lokalisasjonen av de ulikt glykosylerte P-gp variantene i cellen er derfor uviss, men resultatene antydte at den fullt glykosylerte P-gp varianten var kun å finne i plasmamembranfraksjonen.

#### 4.4 P-gp uttrykk i pasientbiopsier

Totaluttrykket av P-gp viste en tendens til å øke nedover i tarmen i pasientbiopsiene. Dette støtter tidligere studier som har beskrevet økende P-gp uttrykk nedover tarmsystemet (Zhang and Benet 2001; Mouly and Paine 2003; Bruyere, Decleves et al. 2010). Det har blitt vist kun 170 kDa P-gp i humane biopsier fra duodenum innhentet under en bariatrisk operasjon (Huynh 2011), men den nåværende studien (GBP-studien) inkluderte ikke biopsier fra duodenum. Mens uttrykk av 140 kDa P-gp økte nedover i tarmen, viste uttrykk av 170 kDa P-gp ikke å ha noe klart mønster i biopsiene fra jejunum og ileum. Det kan skyldes at P-gp

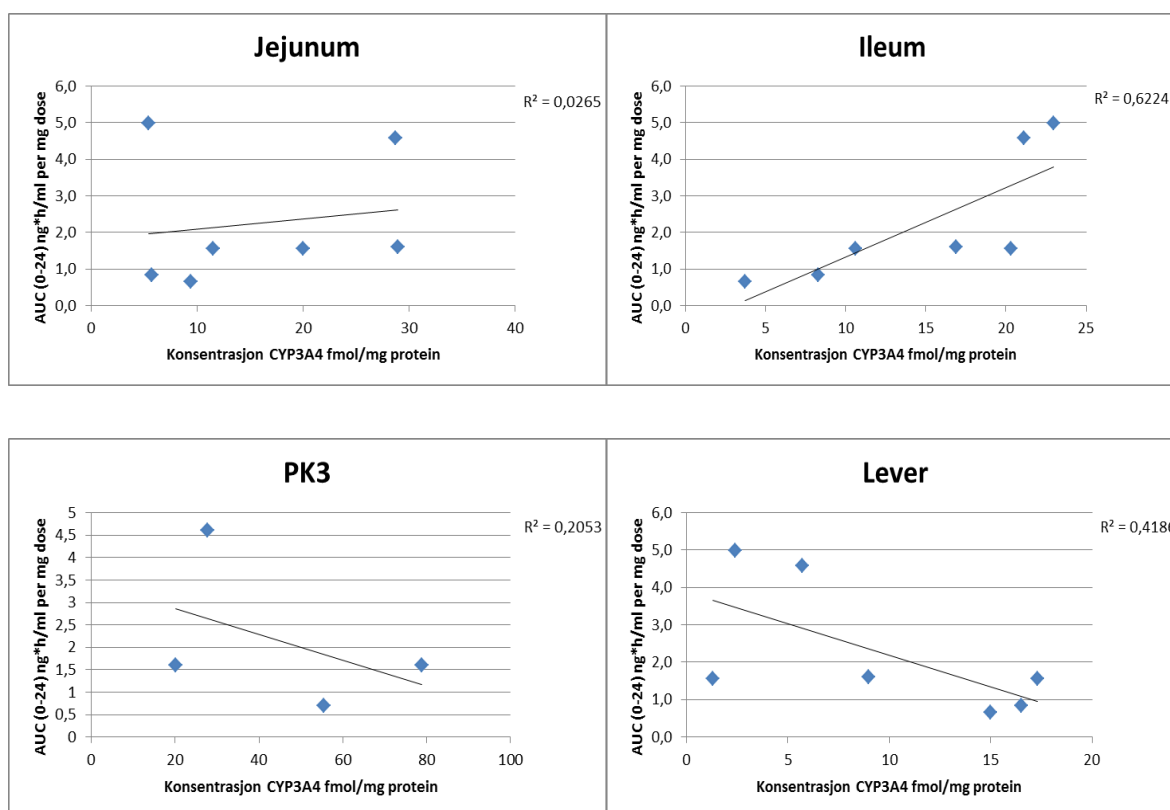
på 170 kDa ble detektert i et fåtall av pasientene, og i et større pasientmateriale kunne det ha blitt oppdaget et mønster i uttrykket av 170 kDa P-gp. Som tidligere nevnt kan alternativt atorvastatin inntatt av pasientene ha redusert P-gp på 170 kDa til 140 kDa (Sieczkowski, Lehner et al. 2010). Pasientene har fått ulik dose av atorvastatin, og sammen med individuelle forskjeller i antall isofome P-gp varianter kan det ha skapt ulikt uttrykk av 170 kDa P-gp. Det ble ikke detektert P-gp i to av pasientprøvene tross gjentatte forsøk. Den mest sannsynlige årsaken er at det var for lite P-gp uttrykt i biopsiene for å bli detektert selv ved applisering av konsentrert prøve, siden analysene ble repetert 3 ganger.

Et interessant funn i denne oppgaven var at det ble vist en høy grad av interindividuell variabilitet mellom pasientene for total P-gp med en variasjon på 8,4 ganger, 30,7 ganger, 6,1 ganger og 8,4 ganger i henholdsvis jejunum, ileum, PK3 og lever. Det er tidligere rapportert en interindividuell variasjon av P-gp uttrykk på 3 ganger i duodenum (n=3), 1,4 ganger i jejunum (n=3) og 2 ganger i ileum (n=3) (Vautier and Fernandez 2009; Bruyere, Decleves et al. 2010). En annen studie viste en variasjon i uttrykket av P-gp fra person til person på 2,1 ganger i duodenum/jejunum proksimalt, 1,5-2 ganger i jejunum og 1,2-1,9 ganger i ileum (n=8-24) (Mouly and Paine 2003). En interindividuell variasjon i uttrykket av P-gp er som nevnt vist før, men den høye graden av variasjon som resultatene viste er ikke tidligere rapportert.

PK3 er en biopsi tatt fra den øverste delen av den gjenværende jejunum, så en lik mengde P-gp uttrykk i PK3 og jejunum biopsiene kunne forventes. Uttrykket av P-gp i PK3 prøvene var derimot 1,9 ganger høyere sammenliknet med jejunumbiopsiene før operasjon. Dette kan skyldes at P-gp har blitt oppregulert etter operasjon, men en annen forklaring kan være at de ulike metodene som ble benyttet for å innhente biopsiene kan ha forårsaket denne økningen i P-gp uttrykket. Biopsiene fra jejunum ble skåret ut under operasjon (mucosa + submucosa + muskelfiber + serosa), mens PK3 biopsiene ble tatt ved hjelp av klypetang under en gastroskopiundersøkelse (mucosa). Det økte uttrykket av P-gp i PK3 biopsiene er et interessant funn, men dette må videre undersøkes i biopsier tatt ved lik teknikk.

## 4.5 Sammenhengen mellom uttrykket av P-gp og kinetikkdata

Resultatene viste at det ikke var en sammenheng mellom P-gp uttrykket i GBP pasientene og den systemiske eksponeringen av atorvastatin preoperativt. Dette er i overenstemmelse med tidligere funn som viste at atorvastatin økte mer enn proporsjonalt i  $C_{max}$  og  $AUC_{0-24}$  ved økende dose (Cilla, Whitfield et al. 1996). En foreslått forklaring på den manglende linearitet i økningen av  $AUC_{0-24}$  i plasma ved økning av dosen (10 mg til 80 mg), er en metning av effluksen mediert av P-gp (Lennernas 2003). En rask metning av P-gp aktiviteten vil føre til at P-gp ikke vil kunne påvirke biotilgjengeligheten til atorvastatin i terapeutiske doser. Det betyr altså at det er andre faktorer som hovedsakelig påvirker biotilgjengeligheten. Atorvastatin metaboliseres av CYP3A4 og CYP3A5, samt transporteres av P-gp og OATP1B1. Sammenhengen mellom CYP3A4 og farmakokinetikken til atorvastatin er tidligere undersøkt (Oftedahl 2009), men som Figur 22 viser er det kun for leverdataene at det er en viss grad av sammenheng mellom CYP3A4 og den systemiske eksponeringen av atorvastatin.



**Figur 22** Sammenhengen mellom konsentrasjonen av CYP3A4 (fmol/mg protein) og systemisk eksponering av atorvastatin ( $AUC_{0-24}$  ng\*h/ml per mg dose). Datamaterialet er hentet fra en tidligere delstudie (Oftedahl 2009).

Det har blitt rapportert polymorfisme i genet *SLCO1B1* og enkelt studier har vist endret transportfunksjon av OATP1B1 som kan endre den systemiske eksponeringen av atorvastatin (Romaine, Bailey et al. 2010). Det mangler fremdeles å kartlegge korrelasjonen mellom CYP3A5 og OATP1B1 med biotilgjengeligheten til atorvastatin, og dermed kunne helhetlig avdekke hvilken faktor som har størst betydning i biotilgjengeligheten.

I forbindelse med GBP operasjonen har tynntarmen blitt kuttet 80-120 cm distalt for Treitz ligament (overgangen mellom duodenum og jejunum). Den bortkoblede delen av duodenum og jejunum har blitt sydd på lenger ned i tarmen, og fungerer som et biliopankreatisk løp. Det er i alimentært løp, bestående av den resterende delen av jejunum og ileum, føde passerer og atorvastatin absorberes. Figur 21 viser hvilken betydning den avkoblede tarmdelen har hatt på biotilgjengeligheten til atorvastatin. Hvis det skulle vært en sammenheng mellom estimert mengde P-gp molekyler tapt etter operasjon og endring av  $AUC_{0-8}$ , ville en høy andel av bortkoblet P-gp molekyler gitt en høy endring i  $AUC_{0-8}$ . Det ble ikke vist en slik lineær sammenheng mellom bortkoblet P-gp og endring i  $AUC_{0-8}$ , og estimert mengde bortkoblet P-gp molekyler viste derfor å ha ingen betydning for endring i den systemiske eksponeringen av atorvastatin hos pasientene.

Den overordnede studien viste at biotilgjengeligheten økte hos 8 av 12 pasienter etter GBP operasjonen (Skottheim, Stormark et al. 2009). Estimert uttrykk av P-gp i biopsier fra pasientene funnet i denne oppgaven, viste at P-gp uttrykket ikke kunne forklare den endringen i systemisk eksponering av atorvastatin som ble observert. Siden CYP uttrykket er høyest øverst i tarmen (Zhang and Benet 2001), kan det tenkes at den økte konsentrasjonen av atorvastatin skyldes reduksjon i "first pass" metabolismen ved frakobling av duodenum og deler av jejunum. Likeledes kan det tenkes at de tre pasientene som viste en reduksjon i den systemiske eksponeringen av atorvastatin etter operasjon hadde i utgangspunktet lavere CYP aktivitet, og derfor hadde en høy konsentrasjon av atorvastatin før operasjonen. Bildet er derimot trolig mer kompleks enn dette. Ved GBP operasjonen reduseres det tilgjengelige overflatearealet for absorpsjon. Ytterligere vil sannsynligvis en økt pH i den gjenværende ventrikkelen postoperativt, endret peristaltikk og transittid kunne påvirke løsligheten til atorvastatin. Diaré, oppkast, inflammasjon, fysisk aktivitet og polyfarmasi kunne likeledes endre biotilgjengeligheten (Skottheim, Stormark et al. 2009; Skottheim, Jakobsen et al. 2010). I dag er det vanskelig å generalisere og forutse endringer i systemisk eksponering av

atorvastatin etter GBP operasjon, og det trengs økt kunnskap om de ulike faktorene som spiller inn.

#### 4.6 Fremtidige betrakninger

- Lokalisasjonen av de ulikt glykosylerte P-gp variantene i cellen bør bekreftes, og funksjonaliteten av 140 kDa bør avdekkes.
- Den kliniske betydningen av polymorfe P-gp former på biotilgjengeligheten av atorvastatin og andre substanser bør undersøkes.
- Flere studier trengs for å stadfeste om statiner reduserer 170 kDa P-gp til 140 kDa, og undersøke årsaken til dette.
- Uttrykket av CYP3A5 og OATP1B1 bør kvantifiseres for å få et mer helhetlig bilde av sammenhengen mellom biotilgjengeligheten av atorvastatin.

## 5. KONKLUSJON

Det ble utviklet en Western blott metode for å semikvantifisere P-gp uttrykket i biopsier fra tynntarmen og lever under en gastrisk bypass operasjon, og fra den proksimale tynntarmen ved gastroskopi 2 år etter operasjon. Det ble avdekket to P-gp bånd på henholdsvis 140 kDa og 170 kDa. Ved subcellulær fraksjonering ble 140 kDa og 170 kDa P-gp lokalisert i cellemembranen, mens kun 140 kDa P-gp ble lokalisert i Golgi apparatet og ER. Resultatene viste at det var stor variasjon mellom gastrisk bypass pasientene i P-gp uttrykk i ulike deler av tarm og i lever. Det var en tendens til økende uttrykk av P-gp nedover i tarmen hos pasientene.

Det var ingen sammenheng mellom estimert P-gp uttrykk og de individuelle AUC-verdiene før operasjonen. De foreløpige resultatene antyder at P-gp ikke spiller en vesentlig rolle for endringen av biotilgjengeligheten til atorvastatin ved operasjon.



## 6. KILDELISTE

- Alberts, Bray, et al. (2004). "Essential cell biology." Second edition, Garland Science, New York and London: 516.
- Bentley, J., D. M. Quinn, et al. (1997). "The human KB multidrug-resistant cell line KB-C1 is hypersensitive to inhibitors of glycosylation." *Cancer Lett* **115**(2): 221-227.
- Bozina, N., V. Bradamante, et al. (2009). "Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk." *Arh Hig Rada Toksikol* **60**(2): 217-242.
- Brekke, M. (2010). "Analyse av T-lymfocytter og tarmceller for å detektere P-glykoprotein." *Masteroppgave*: Universitetet i Oslo.
- Brunton L.L, L. J., Parker K (2006). "Goodman & Gilman`s The Pharmacological Basis of Therapeutics." *11 th edition* Copyright: 9-71.
- Bruyere, A., X. Decleves, et al. (2010). "Effect of Variations in the Amounts of P-Glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2) and CYP3A4 along the Human Small Intestine on PBPK Models for Predicting Intestinal First Pass." *Mol Pharm* **7**(5): 1596-1607.
- Budowick M, B. J. G., Rolstad B, Toverud K (2005). "Anatomisk Atlas." 8. utgave Oslo, Gyldendal Norsk Forlag AS: 234-237.
- Bult, M. J., T. van Dalen, et al. (2008). "Surgical treatment of obesity." *Eur J Endocrinol* **158**(2): 135-145.
- Cascorbi, I. (2011). "P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations." *Handb Exp Pharmacol* **201**: 261-283.
- Cilla, D. D., Jr., L. R. Whitfield, et al. (1996). "Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects." *Clin Pharmacol Ther* **60**(6): 687-695.
- Del Poeta, G., R. Stasi, et al. (1996). "Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia." *Blood* **87**(5): 1997-2004.
- Dey, P. M. and J. B. Harborne (1997). "Plant biochemistry." San Diego, Academic Press: 25-27.
- Draheim, V., A. Reichel, et al. (2010). "N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes." *Eur J Pharm Sci* **41**(2): 201-209.
- DuBuske, L. M. (2005). "The role of P-glycoprotein and organic anion-transporting polypeptides in drug interactions." *Drug Saf* **28**(9): 789-801.
- EnCorBiotechnologyInc (2010). "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)." fra <http://www.encorbio.com/protocols/SDS-PAGE.htm>: sitert 03.12.2010.
- Eufemia, N. A. and D. Epel (2000). "Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses." *Aquat Toxicol* **49**(1-2): 89-100.
- Fontana, M. A. and S. D. Wohlgenuth (2010). "The surgical treatment of metabolic disease and morbid obesity." *Gastroenterol Clin North Am* **39**(1): 125-133.
- Freeze, H. H. and C. Kranz (2010). "Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans." *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 12**: Unit 12 14.
- Fung, K. L. and M. M. Gottesman (2009). "A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function." *Biochim Biophys Acta* **1794**(5): 860-871.

- Graber-Maier, A., H. Gutmann, et al. (2010). "A New Intestinal Cell Culture Model To Discriminate the Relative Contribution of P-gp and BCRP on Transport of Substrates Such as Imatinib." Mol Pharm **7**(5): 1618-1628.
- Graham, J. (1984). "Centrifugation, A practical Approach." Oxford, England, IRL Press Limited: 162-170.
- Greenberger, L. M., C. J. Lisanti, et al. (1991). "Domain mapping of the photoaffinity drug-binding sites in P-glycoprotein encoded by mouse *mdr1b*." J Biol Chem **266**(31): 20744-20751.
- Greer, D. A. and S. Ivey (2007). "Distinct N-glycan glycosylation of P-glycoprotein isolated from the human uterine sarcoma cell line MES-SA/Dx5." Biochim Biophys Acta **1770**(9): 1275-1282.
- Gribar, J. J., M. Ramachandra, et al. (2000). "Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system." J Membr Biol **173**(3): 203-214.
- Hagenbuch, B. and C. Gui (2008). "Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family." Xenobiotica **38**(7-8): 778-801.
- Hoffmann, M. and M. Nowosielski (2008). "DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin." Org Biomol Chem **6**(19): 3527-3531.
- Huynh, C. (2011). "Uttrykk av P-gp i gastrointestinaltrakten og lever hos pasienter som har gjennomgått biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling." Masteroppgave: Universitetet i Oslo.
- Ishikawa, T., A. Sakurai, et al. (2010). "Emerging new technologies in Pharmacogenomics: rapid SNP detection, molecular dynamic simulation, and QSAR analysis methods to validate clinically important genetic variants of human ABC Transporter ABCB1 (P-gp/MDR1)." Pharmacol Ther **126**(1): 69-81.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.
- Keldenich, J. (2009). "Measurement and prediction of oral absorption." Chem Biodivers **6**(11): 2000-2013.
- Kuttesch, J. F., D. M. Parham, et al. (1996). "P-glycoprotein expression at diagnosis may not be a primary mechanism of therapeutic failure in childhood rhabdomyosarcoma." J Clin Oncol **14**(3): 886-900.
- Lee, C. A., J. A. Cook, et al. (2010). "P-glycoprotein related drug interactions: clinical importance and a consideration of disease states." Expert Opin Drug Metab Toxicol **6**(5): 603-619.
- Lennernas, H. (2003). "Clinical pharmacokinetics of atorvastatin." Clin Pharmacokinet **42**(13): 1141-1160.
- Li, Y., H. Yuan, et al. (2010). "The structure and functions of P-glycoprotein." Curr Med Chem **17**(8): 786-800.
- Loo, T. W. and D. M. Clarke (1999). "The glycosylation and orientation in the membrane of the third cytoplasmic loop of human P-glycoprotein is affected by mutations and substrates." Biochemistry **38**(16): 5124-5129.
- Loo, T. W. and D. M. Clarke (1999). "The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy." FASEB J **13**(13): 1724-1732.
- Mouly, S. and M. F. Paine (2003). "P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine." Pharm Res **20**(10): 1595-1599.

- Noble, J. E. and M. J. Bailey (2009). "Quantitation of protein." Methods Enzymol **463**: 73-95.
- Oftedahl, T. (2009). "Linken mellom uttrykket av CYP3A4 og biotilgjengelighet av atorvastatin ved gastrisk bypass." Masteroppgave: Universitetet i Oslo.
- Romaine, S. P., K. M. Bailey, et al. (2010). "The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy." Pharmacogenomics J **10**(1): 1-11.
- Sakaeda, T., K. Takara, et al. (2002). "Simvastatin and lovastatin, but not pravastatin, interact with MDR1." J Pharm Pharmacol **54**(3): 419-423.
- Sand O, S. Ø., Haug E (2005). "Menneskets fysiologi." 3. opplag, Oslo, Gyldendal Norsk Forlag AS: 446-447.
- Schachter, M. (2005). "Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update." Fundamental & Clinical Pharmacology **19**(1): 117-125.
- Schinkel, A. H., S. Kemp, et al. (1993). "N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein." J Biol Chem **268**(10): 7474-7481.
- Sieczkowski, E., C. Lehner, et al. (2010). "Double impact on p-glycoprotein by statins enhances doxorubicin cytotoxicity in human neuroblastoma cells." Int J Cancer **126**(9): 2025-2035.
- Skottheim, I. B., G. S. Jakobsen, et al. (2010). "Significant increase in systemic exposure of atorvastatin after biliopancreatic diversion with duodenal switch." Clin Pharmacol Ther **87**(6): 699-705.
- Skottheim, I. B., K. Stormark, et al. (2009). "Significantly altered systemic exposure to atorvastatin acid following gastric bypass surgery in morbidly obese patients." Clin Pharmacol Ther **86**(3): 311-318.
- van Leuven, S. I. and J. J. Kastelein (2005). "Atorvastatin." Expert Opin Pharmacother **6**(7): 1191-1203.
- Verollet, R. (2008). "A major step towards efficient sample preparation with bead-beating." Biotechniques **44**(6): 832-833.
- 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.
- Wu, X., L. R. Whitfield, et al. (2000). "Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter." Pharm Res **17**(2): 209-215.
- Xie, Y., M. Burcu, et al. (2010). "Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression." Mol Pharmacol **78**(2): 310-318.
- Zhang, Y. and L. Z. Benet (2001). "The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein." Clin Pharmacokinet **40**(3): 159-168.
- Zhou, S. F. (2008). "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition." Xenobiotica **38**(7-8): 802-832.

## 7. APPENDIKS

### 7.1 Materialer

Akrylamid	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Ammonium persulfat	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
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. Lous, Missouri, USA
Fettfri tørrmelk	Normilk AS, Oslo, Norge
Glycin	AnalaR Normapur, Belgia
Glyserol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Isobutanol	Arcus produkter, AS
Kodak AL-4 røntgenfiksator	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak BioMax MS Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodax LX-24 røntgenfremkaller	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NaCl	Merck, Damstadt, Tyskland
Primært antistoff JSB-1 (mus IgG1)	Enzo Life Science
Primært antistoff C219 (mus IgG1)	Alexis Biochemicals
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

---

SDS	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sekundært antistoff (geit anti-mus mab)	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
$\beta$ -merkaptøetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 7.2 Oppskrifter

### 7.2.1 Løsning til homogenisering

#### Homogeniseringsbuffer pH 7,4

0,32 M Sukrose	10,96 g
10 mM Trizma base	0,12 g
1,0 mM EDTA	0,0372 g
Destillert vann	ad 100 ml

### 7.2.2 Løsninger til Western blott

#### Løsning til 6,5 % gel

Destillert vann	6,74 ml
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	3,25 ml
Monomer, 30 % akrylamid	2,82 ml
SDS løsning (10 %)	130 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	65 µl
TEMED	6,5 µl

**4 % Stacking gel**

Destillert vann	6,10 ml
1,5 M tris-Cl pH 8,8	2,50 ml
Monomer, akrylamid	1,30 ml
10 % SDS	100 µl
10 % Ammonium persulfat	50 µl
TEMED	10 µl

**Løsning til 2 x sampelbuffer**

0,5 M Tris-HCl pH6,8	12,50 ml
10 % SDS	20 ml
Glyserol	10 ml

**Løsning til 1 x sampelbuffer**

2 x sampelbuffer tilsatt 5 % bromfenolblått og 10 % β-merkaptotanol	5 ml
Destillert vann	5 ml

**Elektroforesebuffer pH 8,3**

0,025 M Trizabase	7,60 g
0,192 M Glycine	36 g
0,1 % SDS	2,50 g
Destillert vann	ad 2500 ml

**Blottingsbuffer pH 8,3**

0,025 M Trizmabase	12 g
0,192 M Glycine	57,60 g
SDS	0,80 g
Destillert vann	3200 ml
20 % Metanol	800 ml

**10 x T-TBS pH 7,5**

10 mM Trizmabase	24,23 g
100 mM NaCl	116,89 g
Destillert vann	1600 ml
Justerer pH til 7,5	
Tween 20	10 ml
Destillert vann	ad 2000 ml

**1 x T-TBS**

10 x T-TBS	100 ml
Destillert vann	900 ml

**5 % blotto**

Tørrmelk	12,50 g
T-TBS	250 ml



### 7.3 Måling av totalprotein

**Tabell 4** Estimert mengde totalprotein i pasientprøvene ved hjelp av det spektrofotometriske instrumentet Wallac Victor™ (Perkin Elmer).

Mengde totalprotein (mg/ ml)				
Pasient	Jejunum	Ileum	PK3	Lever
1	2,495	IR	IR	1,313
2	3,404	3,445	3,365	2,358
3	2,228	2,905	IR	3,292
4	2,539	1,979	3,236	0,881
5	2,933	0,618	3,554	3,778
7	2,458	2,224	0,838	2,033
8	1,015	1,220	IR	1,069
9	1,123	1,378	1,497	0,725
19	0,974	1,052	IR	1,139
21	1,660	0,885	IR	1,373
25	0,903	0,864	1,562	1,388
26	1,519	1,895	0,877	0,456

## 7.4 Resultater fra pasientbiopsiene

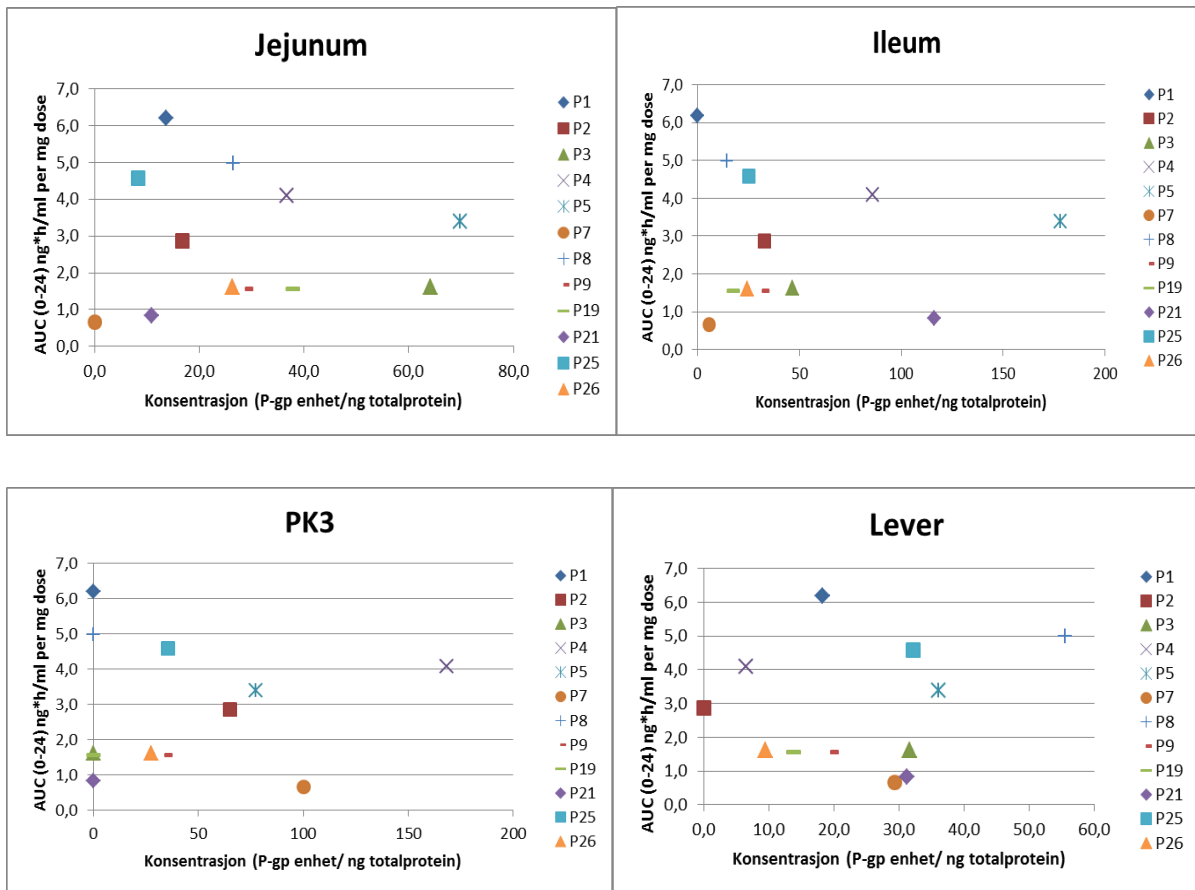
*Tabell 5 Konsentrasjon av P-gp fra pasientbiopsiene angitt i P-gp enhet/ mg biopsi.*

P-gp størrelse	Konsentrasjon (p-gp enhet/ mg biopsi)				
	Pasient	Jejunum	Ileum	Lever	PK3
170 kDa	1	-	IR	-	IR
140 kDa	1	0,68	IR	0,48	IR
170 kDa	2	-	-	ID	-
140 kDa	2	1,14	2,28	ID	4,38
170 kDa	3	1,24	1,11	-	IR
140 kDa	3	1,62	1,59	2,08	IR
170 kDa	4	-	1,21	-	-
140 kDa	4	1,87	2,20	0,12	10,91
170 kDa	5	-	-	-	-
140 kDa	5	4,10	2,20	2,72	5,50
170 kDa	7	ID	-	0,63	0,61
140 kDa	7	ID	0,52	1,57	2,74
170 kDa	8	0,68	-	-	IR
140 kDa	8	0,39	0,71	2,38	IR
170 kDa	9	-	0,86	-	0,78
140 kDa	9	1,30	0,91	0,57	1,28
170 kDa	19	-	-	-	IR
140 kDa	19	1,48	0,75	0,63	IR
170 kDa	21	-	-	-	IR
140 kDa	21	0,73	4,11	1,71	IR
170 kDa	25	-	-	-	-
140 kDa	25	0,30	0,87	1,79	2,22
170 kDa	26	0,46	0,77	-	-
140 kDa	26	1,14	1,07	0,17	0,96

IR: Ikke rapportert

ID: Ingen deteksjon

- : Ingen deteksjon av P-gp bånd



Figur 23 Konsentrasjonen av P-gp uttrykket (P-gp enhet/ ng totalprotein) i jejunum, ileum, PK3 og lever for alle pasientene (P) korrelert til AUC<sub>0-24</sub> ng\*h/ml per mg dose.