

Uttrykk av P-gp i gastrointestinaltrakten og lever hos pasienter som har gjennomgått biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling

Utvikling av en Western blott metode

Duy-Chinh Thuy Huynh



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Uttrykk av P-gp i gastrointestinaltrakten og lever hos pasienter som har gjennomgått biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling

Utvikling av en Western blott metode

Duy-Chinh Thuy Huynh



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

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.

Jeg vil først og fremst rette en spesiell takk til Hege Christensen og Anders Åsberg. Dere har bidratt mye med deres kunnskap og dyktige veiledning. Hege, ditt engasjement og din positivitet smitter veldig, og det har vært til stor hjelp dette året. Tusen takk for at du alltid tar deg tid når jeg trenger veiledning. Anders, tusen takk for din tålmodighet og gode veiledning, og for at du alltid tar deg tid til å hjelpe.

En stor takk rettes til Siri Johannesen for super opplæring på lab. Ditt gode humør og din tålmodighet har vært uunnværlig.

Jeg vil i tillegg takke alle i 4. etasje for et hyggelig arbeidsmiljø. Tusen takk til alle jeg deler plass med i lesesalen. Dette året har blitt flott takket være dere. En stor, spesiell takk rettes til Marit Nordeng. Takk for et godt samarbeid dette året, og for ditt gode humør. Du har vært en fantastisk labpartner, og året hadde ikke vært det samme uten deg.

Avslutningsvis vil jeg takke familie for god støtte underveis.

Blindern, 12. mai, 2011

Chinh Huynh

Innholdsfortegnelse

FORORD	3
INNHALDSFORTEGNELSE	4
FORKORTELSER	6
SAMMENDRAG.....	8
1. INTRODUKSJON	10
1.1 BIOTILGJENGELIGHET.....	10
1.2 TRANSPORTMEKANISMER.....	12
1.3 TRANSPORTØRER	12
1.3.1 ABC-superfamilien.....	13
1.3.1.1 P-glykoprotein.....	13
1.4 ATORVASTATIN.....	16
1.4.1 Statiner.....	16
1.4.2 Absorpsjon og distribusjon.....	17
1.4.3 Metabolisme og eliminasjon.....	17
1.5 OVERVEKTSKIRURGI	18
1.5.1 Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling.....	19
1.6 MÅL MED OPPGAVEN.....	21
2. MATERIALER OG METODE.....	22
2.1 MATERIALER.....	22
2.2 PASIENTMATERIALE	24
2.3 HOMOGENISERING.....	26
2.3.1 Prinsipp.....	26
2.3.2 Utførelse.....	26

2.4	WESTERN BLOTT ANALYSE	27
2.4.1	<i>Prinsipp</i>	27
2.4.2	<i>Metodeutvikling for Western blott analyse av P-gp</i>	27
2.4.3	<i>Endelig metode</i>	28
2.5	KVANTIFISERING AV PROTEINENE.....	30
2.6	PROTEINMÅLING	30
3.	RESULTATER	31
3.1	METODEUTVIKLING	31
3.2	P-GP UTTRYKK I BIOPSIER	34
3.2.1	<i>Variasjon i P-gp uttrykk i ulike deler av tarm og lever for hver pasient</i>	40
3.2.2	<i>Resultater proteinmåling</i>	43
3.2.3	<i>Sammenhengen mellom uttrykt P-gp og kinetikdata</i>	44
4.	DISKUSJON	48
4.1	METODEUTVIKLING	48
4.2	UTTRYKK AV P-GP I BIOPSIER FRA PASIENTER.....	49
4.3	SAMMENHENGEN MELLOM P-GP OG FARMAKOKINETISK PROFIL.....	50
5.	KONKLUSJON	52
6.	KILDELISTE	53
7.	APPENDIKS	56
7.1	OPPSKRIFTER	56
7.1.1	<i>Løsning til homogenisering</i>	56
7.1.2	<i>Løsninger til Western blott analyse</i>	56
7.1.3	<i>Prosedyre for Western blott analyse</i>	58

Forkortelser

ABC	ATP-bindende kassett
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin trifosfat (adenosine triphosphate)
AUC	Areal under plasmakonsentrasjons-tidskurven (Area under the plasma concentration time curve)
BBB	Blod-hjerne-barriere (blood-brain-barrier)
BMI	Kroppsmasseindeks (body mass index)
BPD-DS	Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (biliopancreatic diversion with duodenal switch)
BSA	Bovint serumalbumin
CHD	Koronar hjertesykdom (coronary heart disease)
CNS	Sentralnervesystem (central nervous system)
CYP	Cytokrom P450
ECL	Enhanced chemiluminescence
ER	Endoplasmatisk retikulum
GBP	Gastric bypass
GI-trakt	Gastrointestinaltrakt
HDL-C	High-density lipoprotein-kolesterol
HMG-CoA	3-hydrokxy-3-metylglutaryl coenzym A
IOD	Integrated Optical Density
kDa	Kilodalton
LDL-C	Low-density lipoprotein-kolesterol
MDR	Multidrug resistens
NBF	Nukleotidbindende folder
NIH	National Institutes of Health
OATP1B1	Organisk anion transporterende polypeptid 1B1
P-gp	Permeabilitetsglykoprotein
PK1	Farmakokinetikk 1
PK2	Farmakokinetikk 2
PK3	Farmakokinetikk 3
Rpm	Omdreininger per minutt (revolutions per minute)

SDS	Natrium dodecyl sulfat (sodium dodecyl sulphate)
SLC	Solute carrier
TEMED	Tetrametylenylendiamin
T-TBS	Tris-tween-bufret saltvannsløsning
UGT	Uridin difosfat-glukuronosyltransferase
WHO	World Health Organization

Sammendrag

Problemstilling:

Det er tidligere vist i en studie gjort av Skottheim et al (2010) at biotilgjengeligheten av atorvastatin øker etter biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (BPD-DS). Det ble i denne studien tatt biopsier fra de 10 pasientene for å undersøke mekanismen bak denne forandringen i biotilgjengelighet. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle en metode for å estimere P-gp uttrykket i biopsiene fra de ulike delene av tarmsystemet og lever hos disse pasientene, samt studere sammenhengen mellom forandring i AUC og AUC før operasjonen og P-gp uttrykk i tarm.

Metode:

En tradisjonell Western blott metode (SDS-PAGE) ble utviklet med separering på en 6,5 % polyakrylamidgel, der en standardrekke og pasientprøver ble applisert. Proteinene ble påvist med et spesifikt antistoff (C219). Uttrykket av P-gp i pasientbiopsiene ble relativt kvantifisert ved hjelp av programmet Genetools og det ble laget en standardkurve bestående av fortyninger av en kalibrator med ukjent konsentrasjon.

Resultater og Diskusjon:

Resultatene viste to P-gp bånd. Det ene båndet ble påvist ved 170 kDa, og angir den fullt funksjonelle og fullt glykosylerte P-gp. Det andre påviste båndet, 140 kDa, er en delvis glykosylert versjon av transportøren. Hvorvidt denne er funksjonell er gjenstand for diskusjon. I duodenum ble det kun påvist P-gp bånd på 170 kDa, og det ble funnet en reduksjon av dette båndet nedover tarmen. For 140 kDa P-gp derimot, ble det vist en økning fra jejunum og nedover tarmen. For enkelte pasienter var totaluttrykket av P-gp (140 kDa + 170 kDa) lavest i duodenum og økte nedover i tarmen. Dette støtter tidligere studier som har beskrevet økende P-gp uttrykk nedover tarmsystemet. Noen pasienter hadde imidlertid minkende P-gp nedover tarmen. Ulik glykosylering av P-gp i forskjellige deler av tarmsystemet er et interessant funn, og betydningen av dette må undersøkes videre. Ved sammenligning av P-gp konsentrasjonen i ulike deler av tarmen og AUC før operasjonen hos pasientene, ble det f.eks. vist minkende biotilgjengelighet av atorvastatin med økende P-gp konsentrasjon i duodenum. Denne sammenhengen ble imidlertid ikke funnet i jejunum eller ileum. Det var heller ingen klar sammenheng mellom konsentrasjonen av P-gp i tarmen og forandring i AUC for atorvastatin.

Konklusjon:

Det ble påvist to P-gp bånd; et på 170 kDa og et på 140 kDa, og en økende mengde total P-gp nedover tarmen. I duodenum ble det kun påvist 170 kDa bånd for P-gp. Det var stor variasjon i P-gp uttrykk i både tarm- og leverprøvene mellom pasientene. I duodenum ble det funnet en viss sammenheng mellom AUC før operasjonen og P-gp konsentrasjon, men det var ellers ingen slik sammenheng i de resterende tarmdelene. Det var heller ingen klar sammenheng mellom forandringen av AUC etter operasjonen og P-gp konsentrasjon i noen av tarmdelene.

1. Introduksjon

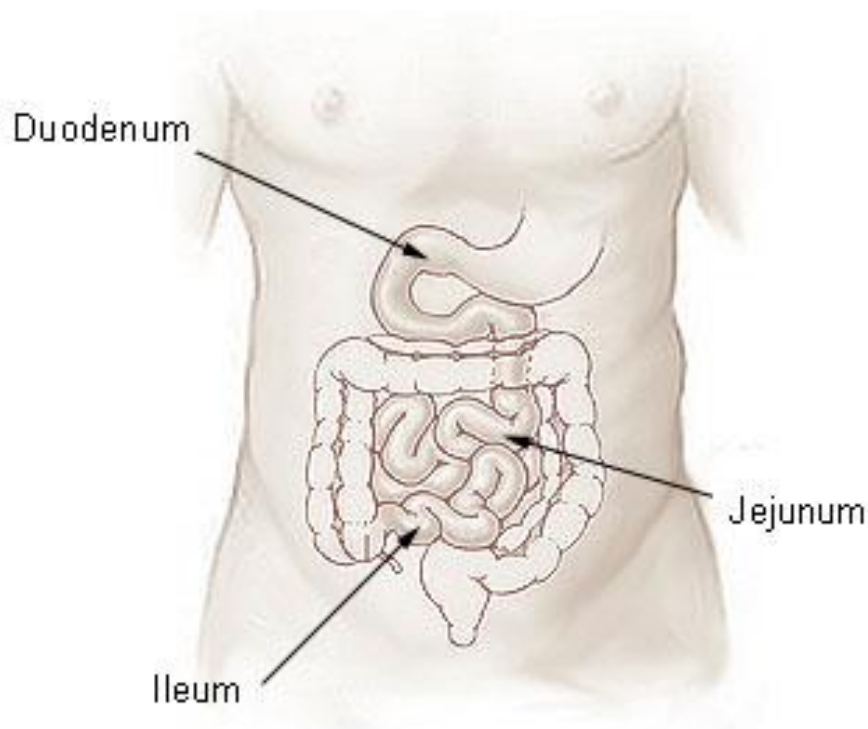
For å få en respons etter inntak av legemiddel er det nødvendig med en egnet eksponering- og tidsprofil i kroppen. Det krever en forståelse av faktorer som påvirker eksponeringsprofilen. Forholdet mellom det som er inntatt og responsen er delt inn i en farmakokinetisk fase og en farmakodynamisk fase. Det farmakokinetiske er forholdet mellom inntatt legemiddel og konsentrasjon over tid. Det farmakodynamiske er forholdet mellom legemiddelkonsentrasjon og både ønskede effekter og bivirkninger over tid. En viktig variabel innen farmakokinetikk er biotilgjengelighet (Rowland and Tozer 2009).

1.1 Biotilgjengelighet

Biotilgjengelighet er den fraksjonen av inntatt legemiddel som når systemisk sirkulasjon intakt. Et legemiddel som blir gitt oralt må først absorberes i mage og tarm. Denne absorpsjonen kan bli begrenset av legemidlets doseringsform og fysikalsk-kjemiske egenskaper. Legemidlet må passere tarm og lever, hvor metabolisme og utskillelse ved hjelp av P-glykoprotein (P-gp) kan forekomme før den når den systemiske sirkulasjonen. Dersom metabolisme og/eller P-gp transport i lever og tarm er høy, vil biotilgjengeligheten bli redusert. Dette kalles first-pass effekt (Brunton, Lazo et al. 2006). Ulik uttrykk og aktivitetsnivå av legemiddelmetaboliserende enzymer (cytokrom P450 (CYP) enzymer) og P-gp medvirker til høy intervariabilitet. I lever og tynntarm kan P-gp-mediert utskillelse skje i koordinasjon med fase 1-metabolisme og fase 2-metabolisme, som f.eks. via CYP-enzymssystemet og glutation S-transferaser. Spesielt CYP3A4 spiller en synergistisk rolle med P-gp ved regulering av biotilgjengelighet til oralt inntatte stoffer ettersom den er uttrykt i lever og tarm i stor grad (henholdsvis 30 % og 70 %) (Chan, Lowes et al. 2004).

Absorpsjon av legemidler kan forekomme langs hele gastrointestinaltrakten (GI-trakten), men det meste av legemidler absorberes langs tynntarmen pga. bl.a. høy permeabilitet av tarmmembranen og lang kontakttid. Total absorpsjonsareal i tynntarmen er 200 m^2 , og 1 L blod strømmer gjennom tarmens kapillærer hvert minutt. Til sammenligning er absorpsjonsarealet i magen 1 m^2 og blodgjennomstrømningen er 150 ml/min (Rowland and Tozer 2009). Strukturene som bidrar til tynntarmens store absorpsjonsareal er bl.a. villi, som går ut til lumen og består av hundrevis av enterocytter, kapillærer og lymfatiske kar for transport av næringsstoffer og legemidler ut av enterocytten.

Mesteparten av absorpsjonen og nedbrytningen av næringsstoffer skjer i tynntarmen (Gropper, Smith et al. 2008). Den består av tre deler, totalt omtrent 6 m (Figur 1). Duodenum er den korteste, og hovedoppgaven til duodenum er å nøytralisere magesyren slik at maten kan fordøyes videre (Hoffmann 2009). Resten av tynntarmen består av jejunum og ileum, hvorav jejunum og ileum utgjør henholdsvis $\frac{2}{5}$ og $\frac{3}{5}$ av tynntarmen (Lin, Chiba et al. 1999). Jejunum er ansvarlig for hovedabsorpsjonen av næringsstoffer og væsker, mens ileum i tillegg har spesifikke funksjoner; bl.a. absorpsjon av vitamin B₁₂ og gallesalter (Warrell, Cox et al. 2005).



Figur 1: Oversikt over fordelingen av tynntarmen; duodenum, jejunum og ileum (som går over til tykktarmen) (UCSF 2010).

Overflatearealet i tarmen minker fra duodenum til rektum pga. ulik distribusjon av overflateøkende villi, mikrovilli og sirkulære folder. Proteolytiske og metabolske enzymer, i tillegg til fasiliterte transportsystemer, er også ulikt distribuert langs tarmen (Lin, Chiba et al. 1999).

1.2 Transportmekanismer

Transport av legemiddel (og andre xenobiotika) kan skje hovedsakelig via to veier: transmembran og paracellulær transport. Cellemembranen er relativt permeabel for vann ved diffusjon eller ved transport pga. hydrostatiske eller osmotiske forandringer gjennom membranen; og transporten av vann kan føre med seg legemiddelmolekyler. Paracellulær transport gjennom intercellulære åpninger er stor nok til at passasje gjennom de fleste kapillærer er kun begrenset av blodflow (f.eks. glomerulær filtrasjon). Kapillærer i bl.a. sentralnervesystemet (CNS) har tight junctions som begrenser paracellulær transport. Transmembran transport innebærer enten passive eller aktive prosesser (Brunton, Lazo et al. 2006).

Passiv transport innebærer at legemidlet går gjennom membranen ved diffusjon ned konsentrasjonsgradienten. Slik transport er direkte proporsjonal med størrelsen av konsentrasjonsgradienten; altså jo høyere konsentrasjonen er over membranen, jo høyere blir transportaktiviteten. Fasilitert diffusjon er en bærer-mediert transport hvor det også skjer en transport langs konsentrasjonsgradienten slik som tilfellet er for transport av glukose gjennom muskelcellemembraner mediert av transportørproteinene GLUT4 (Brunton, Lazo et al. 2006).

Aktiv transport innebærer et behov om energi og en bevegelse mot en konsentrasjonsgradient. Primær aktiv transport er en transport som er direkte koblet til ATP hydrolyse mens sekundær aktiv (koblet) transport bruker den elektrokjemiske energien som er lagret i en gradient til å flytte på andre molekyler mot en konsentrasjonsgradient; f.eks. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -utvekslingsprotein bruker energien lagret i Na^+ -gradienten etablert av Na^+/K^+ -ATPase for å transportere Ca^{2+} (Brunton, Lazo et al. 2006).

1.3 Transportører

Transportører er membranproteiner som kontrollerer influks av essensielle næringsstoffer og ioner og effluks av avfallsstoffer, toksiner og andre xenobiotika. De er lokalisert i bl.a. intestinal-, renal- og hepatisk epitel. De virker sammen med legemiddelmetaboliserende enzymer for å eliminere legemidler og deres metabolitter i tillegg til at noen medierer vevsspesifikk legemiddeldistribusjon og beskytter visse organer og cellyper.

Membrantransportører kan også spille en viktig rolle ved utvikling av resistens til f.eks. kreftmedisiner og antivirale legemidler ved å pumpe ut disse legemidlene. Gjennom influks- og effluksmekanismer kan transportører kontrollere eksponering av toksiner og legemidler til cellene.

Transportører kan deles inn i to superfamilier: ABC-transportører (ATP-bindende kassett) og SLC-transportører (solute carrier). De fleste ABC-transportører er primært aktive mens SLC superfamilien inkluderer fasilitert transport og ionekoblet sekundær aktiv transport.

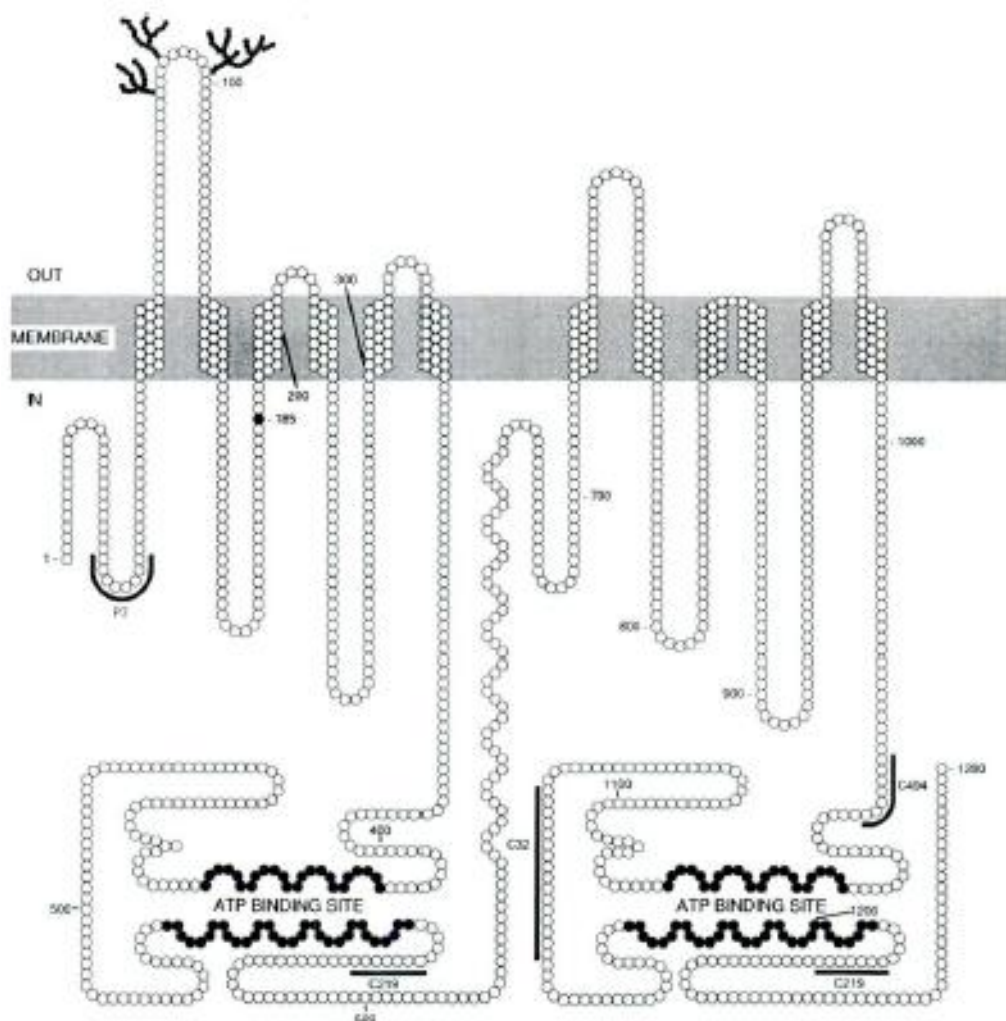
1.3.1 ABC-superfamilien

ABC-transportørene representerer den største gruppen av transmembrane proteiner, og P-gp tilhører denne gruppen. Proteiner klassifiseres som ABC-transportører basert på sekvensen og organiseringen av deres ATP-bindende domener, også kjent som nukleotidbindende folder (NBF) (Dean, Rzhetsky et al. 2001). En generell struktur av ABC-transportører består av 12 transmembrane domener delt inn i to halvdel, hver med en NBF. Det finnes likevel unntak til denne strukturen (Chan, Lowes et al. 2004). De transmembrane domenene sørger for spesifisiteten for substratet. NBF ligger i cytoplasma og overfører energi for å transportere substratet gjennom membranen (Dean, Rzhetsky et al. 2001).

1.3.1.1 *P-glykoprotein*

P-glykoprotein (P-gp, MDR1) er den best karakteriserte legemiddeltransportøren i denne superfamilien (Cascorbi 2006) (Figur 2). P-gp er en energiavhengig pumpe som pumper ut bl.a. anticancer legemidler i multidrug resistens (MDR) celler. Det er tidligere blitt observert at P-gp-mediert MDR forekommer i human kreft og at det spiller en rolle i pasientens respons til kjemoterapi (Juranka, Zastawny et al. 1989). På grunn av dette kalles genet som koder for P-gp *MDR gen 1* (tidligere *PGY1*, nå *ABCB1*). P-gp spiller en viktig rolle for transport over blod-hjerne-barrieren (BBB), og er ansvarlig for apikal transport av diverse hydrofobe substrater (Tabell 1) (Cascorbi 2006). P-gp har en veldig bred substratspesifisitet med en tendens mot lipofile, kationiske forbindelser. Listen av substrater er stor og inkluderer alt fra antibiotika til immunsupprimerende legemidler (Chan, Lowes et al. 2004).

Hvordan ABC-transportørene har en så bred, men likevel så distinkt substratspesifisitet har vært mye diskutert; og det er utviklet mange modeller for hvordan virkningsmekanismen til disse transportørene er. En av de mest foretrukkede modellene er “the hydrophobic vacuum cleaner model” som sier at P-gp pumper substrater enten fra den ytre membranen av lipid bilaget eller fra den indre membranen av bilaget til det ekstracellulære mediet. P-gp-substrater vil da velges ut i fra deres evne til å både interagere med lipid bilaget og å fordele seg inn i lipidfasen før den treffer på P-gp (Chan, Lowes et al. 2004).



Figur 2: Modell for transmembran P-gp hvor sirklene representerer aminosyre-residuer (Juranka, Zastawny et al. 1989).

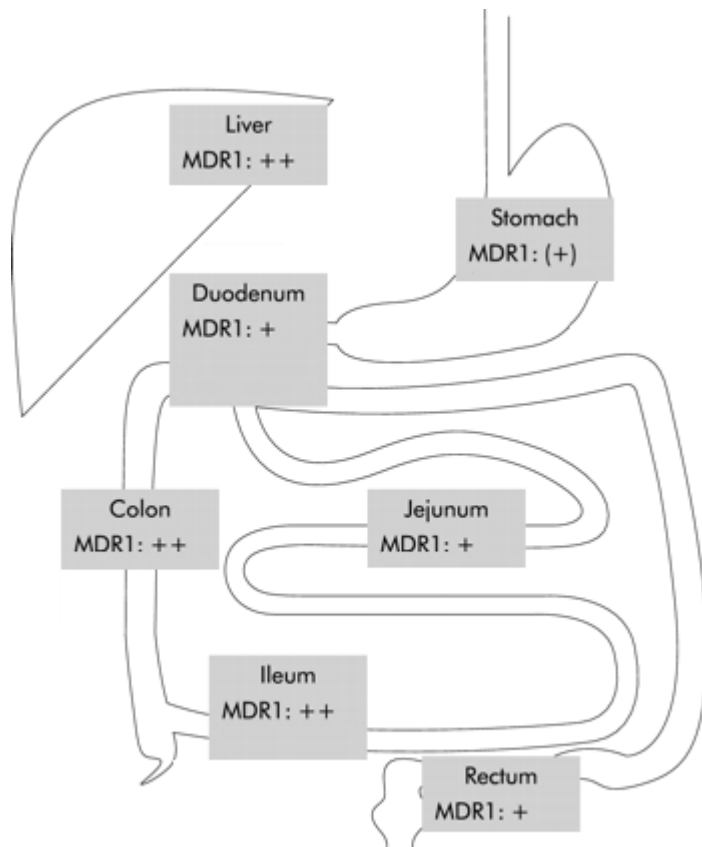
P-gp medierer altså transport av en rekke forbindelser over tarmmembranen og den virker dermed som en funksjonell barriere mot legemidler i tillegg til at den kan bidra til utskillelse i galle (Tabell 1). P-gp ved BBB virker som en forsvarsmekanisme mot skader i hjernen forårsaket av toksiner, og den forhindrer legemidler fra å nå CNS.

Det er vist at det er 7 ganger høyere konsentrasjon av P-gp i enterocytter i tynntarmen enn i leveren. Det er imidlertid stor interindividuell variabilitet av P-gp uttrykk hos mennesker (Cascorbi 2006). I leveren kan f.eks. P-gp konsentrasjonene variere opptil 50 ganger, i tillegg til at P-gp uttrykk og aktivitet kan påvirkes av legemiddelinteraksjoner (Cascorbi 2006). Uttrykk av P-gp har blitt rapportert å øke fra proksimale til distale områder i tarmen; med økt mengde P-gp i kolon (Chan, Lowes et al. 2004) (Figur 3).

P-gp finnes i store mengder i nyre og BBB og i intermediære mengder i lever, tynntarm, kolon og lunge, mens det er svært lite i bl.a. hjerte, skjelettmuskulatur og mage. Intestinal P-gp er lokalisert på villiene i enterocytter; det vil si hovedstedet for absorpsjon av oralt inntatte stoffer og nær lumen. P-gp er dermed ideelt posisjonert for å begrense absorpsjon av potensielt toksiske stoffer ved å pumpe disse tilbake ut i tarmlumen (Chan, Lowes et al. 2004).

Tabell 1: Eksempler på P-gp substrater innenfor ulike legemiddelklasser (Cascorbi 2011)

Legemiddelklasse	P-gp
Kreftmedisin	docetaxel, doksorubicin, etoposid, imatinib, paclitaxel, teniposid, vinblastin, vinkristin
Steroider	deksametason, metylprednisolon
Immunsuppressive	ciklosporin, sirolimus, takrolimus
HIV proteasehemmere	amprenavir, indinavir, nelfinavir, saquiniavir, ritonavir
Antibiotika	erytromycin, ofloksacin
β-blokkere	bunitrolol, karvedilol, celiprolol, tanilolol
Ca²⁺-kanalblokkere	diltiazem, verapamil
Hjertemedisin	digoksin, digitoksin, quinidin
3-hydroksy-3-metylglutaryl coenzym A reduktase (HMG-CoA reduktase-hemmere)	atorvastatin, lovastatin, simvastatin
H₁-antihistaminer	deksofenadin, terfenadin
Antiemetika	ondansetron
Diverse	amitryptilin, kolkisin, itrakonazol, lansoprazol, loperamid, losartan, morfin, fenytoin, rifampicin
Fluorescerende farger	rhodamin 123



Figur 3: Nivå av uttrykk av transportøren P-gp (MDR1). Det er høyest uttrykk i lever, ileum og kolon, mens uttrykket i duodenum, jejunum og rektum er mindre. Modifisert figur (Dietrich, Geier et al. 2003).

1.4 Atorvastatin

1.4.1 Statiner

Flere epidemiologiske studier har vist at hyperkolesterolemi er en viktig risikofaktor for koronar hjertesykdom (CHD) (Wilson, D'Agostino et al. 1998; Enbergs, Bürger et al. 2000). HMG-CoA reductasehemmere (statiner) har vist en signifikant reduksjon i koronare hendelser i pasienter med CHD (4S ; Shepherd, Cobbe et al.). Det hastighetsbestemmende enzymet i kolesterolsyntesen er HMG-CoA reductase, som katalyserer HMG-CoA til mevalonsyre (Corsini, Bellosta et al. 1999). Redusert hepatisk kolesterolsyntese fører til en oppregulering av low density lipoprotein (LDL)-reseptor syntese, noe som fører til økt LDL-kolesterol (LDL-C) clearance fra plasma til leverceller. Hovedeffekten til statiner er dermed å redusere LDL-C i plasma. Det blir i tillegg en reduksjon i triglyserider og en økning i high

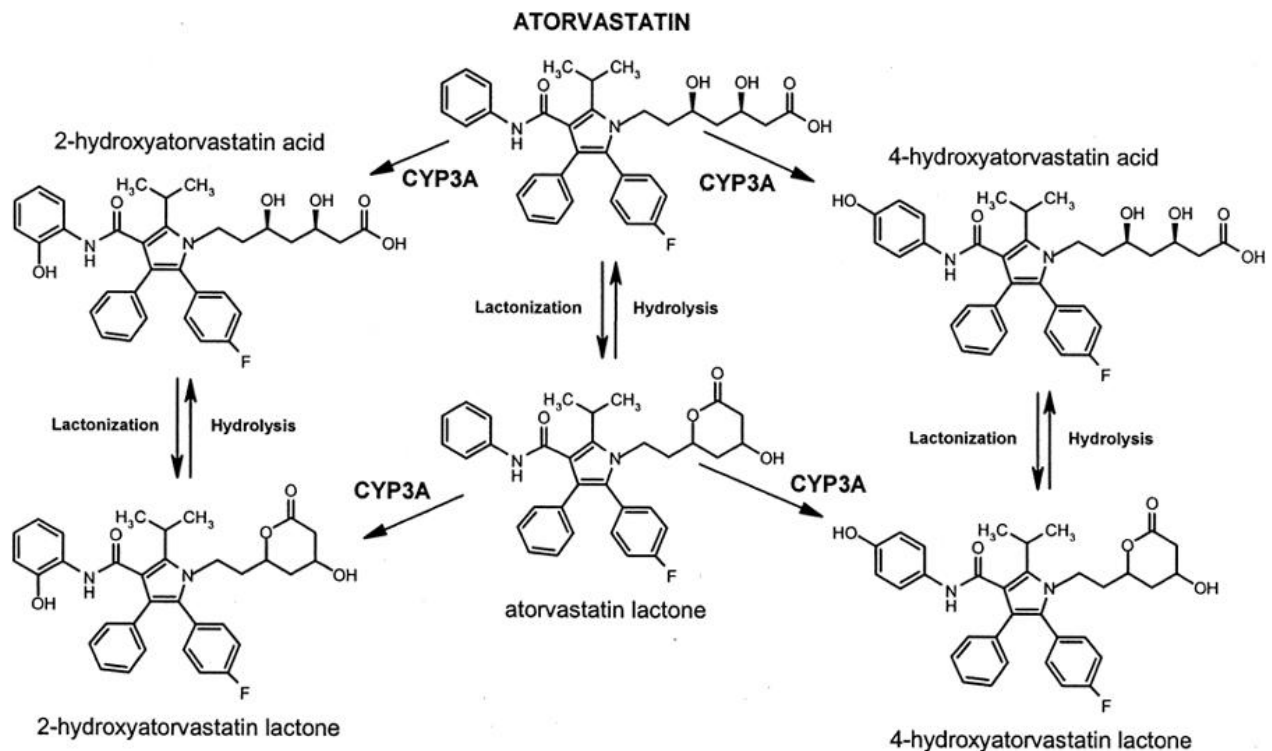
density lipoprotein kolesterol (HDL-C) (Gribar, Ramachandra et al. 2000). Atorvastatin er en syntetisk kompetitiv hemmer av HMG-CoA-reduktase (Brunton, Lazo et al. 2006).

1.4.2 Absorpsjon og distribusjon

Atorvastatin, et relativt lipofilt legemiddel, administreres oralt (når som helst på døgnet) i doseringsområdet 10-80 mg pr. døgn (Schachter 2005). Den tas i form av kalsiumsaltet av den aktive β -hydroksysyren og absorberes dermed raskt fra GI-trakten. Atorvastatin har likevel en lav absolutt biotilgjengelighet (12 %) grunnet presystemisk clearance i GI og lever (bl.a. ved first-pass metabolisme). Den metaboliseres til en rekke aktive metabolitter, og 70 % av den hemmende effekten på HMG-CoA reduktase skyldes effekt av disse metabolittene (Corsini, Bellosta et al. 1999; Williams and Feely 2002; Hoffmann and Nowosielski 2008).

1.4.3 Metabolisme og eliminasjon

Det foreligger en likevekt mellom syreformen og laktonformen til atorvastatin. Det er allikevel kun syreformen som reduserer kolesterolnivået. Under mildt sure og basiske forhold er laktonformen ustabil. Ved sure forhold derimot, flyttes likevekten mot laktonformen (Hoffmann and Nowosielski 2008). Atorvastatin gjennomgår CYP3A4- og CYP3A5-mediert metabolisme, og er P-gp- og OATP1B1-substrat (organisk anion transporterende polypeptid). Den tas dermed opp aktivt i leveren før den blir metabolisert (Shitara and Sugiyama 2006). Hovedmetabolittene er 2-hydroksy-atorvastatinsyre og 4-hydroksy-atorvastatinsyre (Schachter 2005) (Figur 4). Det viser seg at laktonformen metaboliseres raskere enn syreformen. I tillegg til oksidering av CYP-enzymmer, kan statinsyrer omdannes til deres laktonform ved en coenzym-A-avhengig mekanisme. Det er også vist en uridin difosfat-glukuronosyltransferase (UGT)-mediert laktonerisering av statinsyrer, selv om denne effekten på total clearance er minimal (Neuvonen, Niemi et al. 2006). Hovedruten for eliminasjon er via gallen etter metabolisering i leveren. Dermed er leverdysfunksjon en risikofaktor for statinindusert myopati (Schachter 2005).



Figur 4: Metabolismen av atorvastatin. Atorvastatin tas i form av kalsiumsaltet av den aktive hydroksysyren, og blir omdannet til to hovedmetabolitter ved hjelp av CYP3A4 og CYP3A5. Det foreligger en likevekt mellom syreform og laktonform *in vivo* (Backman, Luurila et al. 2005).

1.5 Overvektskirurgi

Fedme er en voksende epidemi, hvor 1,6 milliarder voksne er overvektige (BMI ≥ 25) og 400 millioner er klassifisert som fete (BMI ≥ 30) i 2005. I Norge er 42 % av befolkningen klassifisert som overvektige og 9 % er klassifisert som fete. World Health Organization (WHO) og National Institutes of Health (NIH) bruker et vekstsystem som tar i bruk kroppsmasseindeks (BMI) som definerer grad av vektoverskudd og fedme i en voksen befolkning. Sykelig overvekt er en tilstand som er karakterisert med en BMI over 40 kg/m^2 (Killackey, Zhang et al. 2010). Bariatrisk kirurgi er den eneste intervensjonen som har vist en langvarig reduksjon i vekt og komorbiditeter i denne pasientgruppen. Dette har ført til en økning i bruk av denne behandlingen for sykelig overvekt (Brolin 2002). Bariatrisk kirurgi baserer seg på to prinsipper, som kan brukes hver for seg eller i kombinasjon. Restriksjon av magesekkens volum gir en tidlig metthetsfølelse og kan dermed begrense matinntaket. Bypass medfører malabsorpsjon og reduserer tarmens opptak av kalorier. Med bypass vil også ufordøyd mat som når distal del av tynntarmen øke utskillelsen av GI-hormoner som bidrar i reguleringen av appetitt og blod-glukosenivå (Aasheim, Mala et al. 2007). Det er

flere bariatriske prosedyrer i bruk, hvorav gastrisk bypass (GBP) er mest brukt. Gastrisk innsnøring og biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (BPD-DS) er andre vanlige metoder (Farrell, Haggerty et al. 2009).

Vektreduksjon etter kirurgi antas ofte å være pga. restriksjon i matinntak, men dette er bare en liten del av mekanismen. En økning i metthetsfølelse og en reduksjon i appetitt er også signifikante, men hvordan denne mekanismen fungerer er ikke helt kjent. En mulig mediator er ghrelin, som er et hormon som blir utskilt fra fundus i magesekken når et måltid forventes, og dette kan øke appetitten. Ghrelinnivåene er redusert hos overvektige personer og øker ved faste, og det er også rapportert et redusert ghrelinnivå hos pasienter etter GBP (Crookes 2006).

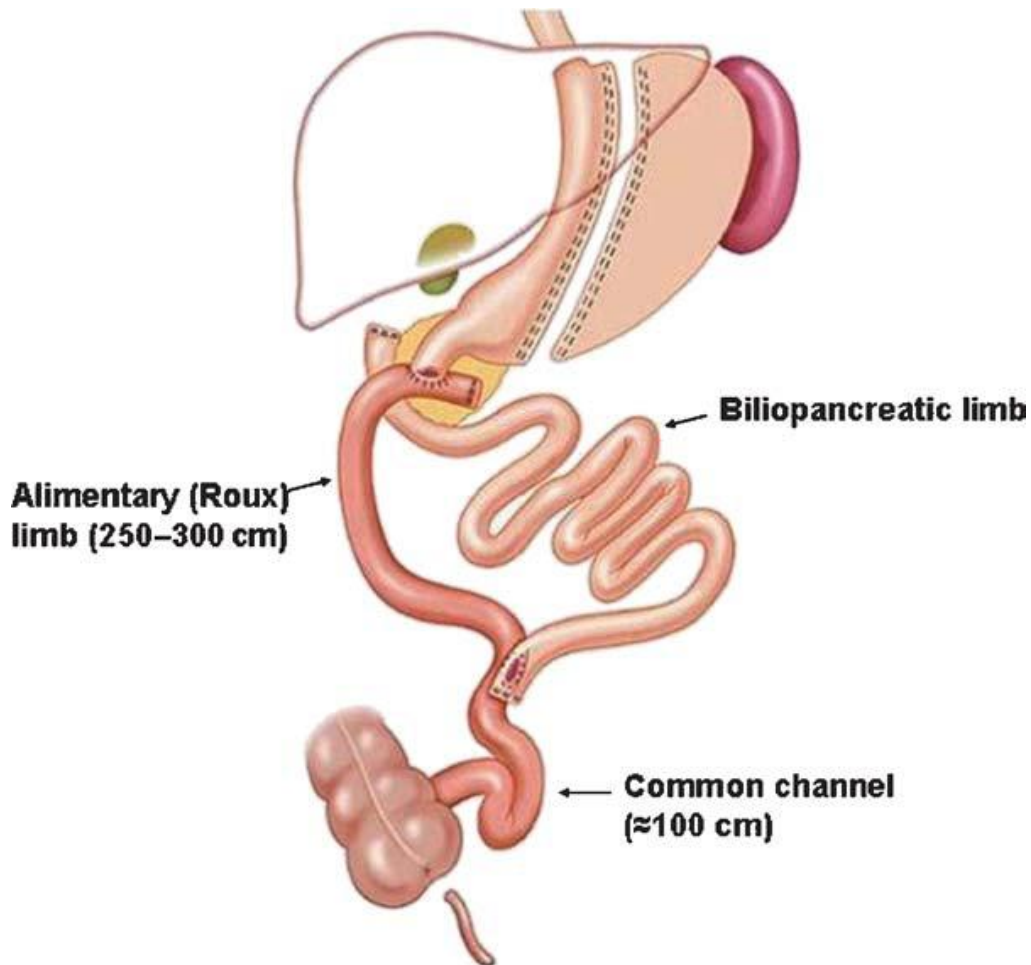
Hos pasienter som har gjennomgått GBP, vil toppen av magesekken produsere mindre syre enn før, noe som kan redusere absorpsjon av legemidler som er avhengig av surt miljø for løselighet eller absorpsjon. Ved å forbyr store deler av tynntarmen, vil absorpsjonsarealet bli redusert pga. tap av villi og mikrovilli. Legemidler med lange absorpsjonsfaser, og som blir i tarmen i lengre perioder kan vise lavere biotilgjengelighet etter GBP (Miller and Smith 2006).

En reduksjon i legemiddelabsorpsjon sees oftere hos pasienter som har gjennomgått en kombinert restriktiv og malabsorptiv prosedyre enn hos pasienter som har kun gjennomgått en restriktiv prosedyre. En reduksjon i funksjonell tarmlengde gjør det sannsynlig at preparater med forlenget frisetting har passert GI-trakten før absorpsjonen er komplett. Det samme vil gjelde preparater med forsinket frigjøring og entero- eller filmdrasjerte preparater (Miller and Smith 2006).

1.5.1 Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling

BPD-DS er en kombinert restriktiv og malabsorptiv prosedyre som resulterer i en større vektreduksjon sammenlignet med GBP. Det er dermed en verdifull metode for de som er svært overvektige. En BPD-DS involverer en reduksjon av magesekken til en smal gastrisk tube (Skottheim, Jakobsen et al. 2010). Det alimentære løpet blir ikke forbundet til magen, men til duodenum, 3-5 cm fra pylorus (Figur 5). Dermed er normal pylorisk funksjon vedlikeholdt (Crookes 2006). Dette vil teoretisk sett regulere gastrisk tømming og redusere dumping syndrom (besvær og ubehag). Bypass av proksimal tynntarm påvirker både

absorpsjon av næringsstoffer og vitaminer og biotilgjengeligheten til oralt inntatte legemidler. Fordi BPD-DS er en kombinert restriktiv og malabsorptiv prosedyre, vil man unngå store bivirkninger slik som ekstrem restriksjon eller malabsorpsjon (Crookes 2006).



Figur 5: Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (Crookes 2006).

Malabsorpsjon av fett og stivelse er mer uttalt ved BPD-DS enn ved GBP. Denne malabsorpsjonen avhenger av lengden av fellesløpet for mat og fordøyelsessafter. Det brukes vanligvis en lengde mellom 75-100 cm; hvorav et kort løp gir høyere vektapp, men også økt risiko for underernæring (Aasheim, Mala et al. 2007).

Hovedforskjellen mellom GBP og BPD-DS er at ved BPD-DS er jejunum fullstendig forbikoblet og normal pylorisk funksjon vedlikeholdes, mens ved GBP er kun den proksimale delen (50-60 cm) av jejunum forbikoblet. Som tidligere nevnt ble biotilgjengeligheten av atorvastatin økt etter GBP (Skottheim, Stormark et al. 2009), og dette er antakeligvis grunnet bypass av den mest metabolske aktive delen av tynntarmen. Dermed

burde effekten være større med BPD-DS ettersom hele jejunum blir omgått. Denne hypotesen ble bekreftet i en studie gjort i 2010 av Skottheim et al (Skottheim, Jakobsen et al. 2010).

1.6 Mål med oppgaven

- Metodeutvikling for å kvantifisere uttrykket av P-gp protein i humane biopsier.
- Analysere proteinuttrykket av P-gp i biopsier fra tarm og lever fra pasienter som har gjennomgått BPD-DS.
- Knytte proteinuttrykket av P-gp til plasmakonsentrasjonen av atorvastatin for å se om dette kan bidra til å forklare både endringer i biotilgjengeligheten til atorvastatin hos pasientene og biotilgjengeligheten av atorvastatin før operasjonen.

2. Materialer og metode

2.1 Materialer

Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories Inc, California, 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	Aquatrín 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)
Glyserol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glysin	BDH, VWR International Ltd, Leuven, Belgia
HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hybond-ECL nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Isobutanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumfosfat	Merck, Darmstadt, 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
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Monomer-løsning (30 % Akrylamid/Bis løsning (37,5:1))	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

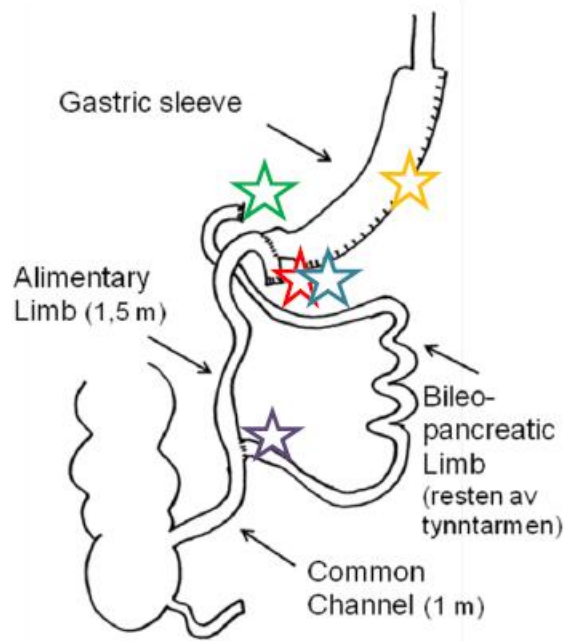
Precision Plus protein standard (Dual colour)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Primært antistoff C219 mab (Lot: L26199/b & L26199/d)	Axxora Europe, Lausen, Sveits
Primært antistoff JSB-1 mab (Lot: L23111)	Alexis Corporation, Lausen, Sveits
SDS	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sekundært antistoff (geit anti-mus mab) (LS1706516)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Strippebuffer	Thermo scientific, Rockford, USA
Sukrose	Merck, Darmstadt, Tyskland
TEMED	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
β -merkptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.2 Pasientmateriale

Denne studien var designet som en prospektiv, åpen, kontrollert, ikke-randomisert enkeltcenter-studie. Den ble gjennomført i henhold til nasjonale og internasjonale lover og retningslinjer. Det ble i tillegg gitt godkjenning av regional etisk komité og alle relevante norske myndigheter. Studien er registrert ved ClinicalTrials.gov (NCT00331565). Det var inkludert 10 pasienter i denne studien, hvorav alle var behandlet med statiner før de ble inkludert.

Det ble tatt biopsier fra lever, mage, duodenum, jejunum og ileum fra alle 10 pasienter (Figur 6). Pasientene hadde gjennomgått BPD-DS, og i studien ble atorvastatinkinetikken undersøkt dagen før operasjonen og 4-8 uker etter operasjonen. Blodprøver ble samlet før administrasjonen av atorvastatin (0 t), og ved gitte tider etter administrasjonen (½, 1, 1½, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 22 og 24 t). Ved oppfølgingsundersøkelsen etter operasjonen ble det gjennomført en 8-timers farmakokinetikkundersøkelse. Biopsiene ble tatt i forbindelse med operasjonen, og for 4 pasienter (1, 3, 4 og 7) ble det i tillegg gjort en farmakokinetikk 3 (PK3) undersøkelse og gastroskopi fra den nye proksimale delen av tynntarmen (opprinnelig ileum) ca. 2 år etter operasjonen. Til sammenligning tilsvarende PK1 biopsier som er tatt rett etter operasjonen mens PK2 tilsvarende biopsier som er tatt uker etter operasjonen. En oversikt over hvor biopsiene er tatt i de enkelte pasientene kan sees i tabell 2. I studien er uttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 i homogenater fra biopsiene tidligere blitt målt, mens nå skulle uttrykket av transportøren P-gp undersøkes.

Alle pasientene fikk atorvastatin én gang hver morgen, og de gikk på uforandret dose minst 2 uker før undersøkelsen; 7 pasienter fikk 20 mg atorvastatin, 2 pasienter fikk 40 mg atorvastatin og 1 pasient fikk 80 mg atorvastatin. Gjennomsnittsalderen var 44 (\pm 7) år og gjennomsnittlig BMI ved inklusjon var 53 (\pm 3) kg/m² og 43 (\pm 5) kg/m² ved oppfølging 3-6 uker etter operasjon. Tre av pasientene hadde komorbiditet (type 2 diabetes mellitus, hypertensjon, obstruktiv søvnapné og osteoartritt), men ingen av pasientene fikk legemidler som interagerer med atorvastatin. Demografiske data av pasientene kan sees i tabell 3 (Skottheim, Jakobsen et al. 2010).



Figur 6: Illustrasjon av GI etter BPD-DS. Stjernene markerer hvor biopsiene er tatt. Gul stjerne: magesekk, rød stjerne: jejunum, grønn stjerne: duodenum, lilla stjerne: ileum, blå stjerne: PK3. Det ble i tillegg tatt biopsier fra lever (Vist 2010).

Tabell 2: Oversikt over biopsier for pasienter som har gjennomgått BPD-DS

Pasient	Duodenum (x cm distalt for pylorus)	Jejunum (x cm proksimalt for ileocøkalstedet)	Ileum (x cm proksimalt for ileocøkalstedet)	Mage	Lever	PK3
12	2	250	100	*	NA	*
13	1	250	100	*	*	NA
14	1	150	100	*	*	*
15	4	NA	250	*	*	*
16	1	250	100	*	*	NA
17	3	250	100	*	*	NA
18	1	250	100	*	NA	*
20	2	250	100	*	*	*
23	2	100	250	*	*	NA
24	2	100	250	*	*	NA

* = tatt biopsi

NA = not available; ingen biopsi tilgjengelig

Tabell 3: Demografiske pasientdata før operasjonen og 4-8 uker etter (Skottheim, Jakobsen et al. 2010)

Pasient	Kjønn	Alder (år)	BMI pre (kg/m ²)	BMI post (kg/m ²)	Atorvastatin dose (mg/dag)	Tidsintervall (uker)
12	K	45	55	38	20	7
13	M	42	59	52	20	4
14	M	43	57	43	20	5
15	M	34	53	44	20	8
16	K	44	51	40	20	6
17	K	54	49	37	40	5
18	M	31	54	49	80	4
20	M	46	50	39	20	6
23	K	53	52	43	40	7
24	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, Tidsintervall = antall uker mellom farmakokinetiske studier utført før og etter operasjonen.

2.3 Homogenisering

2.3.1 Prinsipp

Precellys 24 er et instrument utviklet av Bertin Technologies. Den er effektiv for homogenisering av biologiske prøver; både ferske og fryste. Apparatet kan ta inntil 24 prøver på 2 ml samtidig (Bertin 2010). Protokollene må justeres slik at vevet blir godt homogenisert uten degradering eller denaturering av målmolekylene. Til sammenligning med tradisjonelle homogeniseringsmetoder, gir Precellys 24 høyere utbytte. Hvert rør fylles med keramikkuler og en homogeniseringsbuffer, og dekkes med lokk for å hindre krysskontaminering (Verollet 2008).

2.3.2 Utførelse

Det ble i denne oppgaven benyttet homogenater opparbeidet i et tidligere masterprosjekt (Vist 2010). Det ble også laget en P-gp standard til bruk som kalibrator fra en tarmbit fra en ekskludert pasient. Tarmbiten ble delt opp med en steril skalpell på en glassplate. Bitene ble

veid og overført til Precellys rør. Disse rørene ble tilsatt 0,32 M sukrosebuffer (Appendiks, pkt. 7.1.1) i en mengde som gjorde at tarmbiten utgjorde 5 % av løsningen. Rørene ble homogenisert i Precellys 24 ved 5000 rpm i 4x50 sekunder. Mellom hver runde var det 3 minutters pause hvor rørene stod på is. Etter homogenisering ble eventuelle tarmbiter og skum fjernet, alle rørene ble samlet og løsningen ble deretter fordelt i eppendorfrør. Disse rørene ble så lagret i en -70°C fryser.

2.4 Western blott analyse

2.4.1 Prinsipp

Western blott, også kalt protein immunoblott, er en metode som kan brukes for å karakterisere komplekse blandinger med antigener fra vev. Prøvene appliseres på en polyakrylamid gel og separeres etter molekylvekt i en natrium dodecyl sulfat (SDS)-gelelektroforese. Bruk av nitrocellulosemembraner kombinert med hovedsakelig komplett og kvantitativ proteinoverføring, i tillegg til en antigen-deteksjon ved hjelp av antistoffer, gjør at Western blott er en sensitiv metode for visualisering av spesifikke proteiner i komplekse antigenmiksturer (Burnette 1981).

2.4.2 Metodeutvikling for Western blott analyse av P-gp

Det ble gjort forsøk med to ulike antistoffer: JSB-1 (Alexis) og C219 (Axxora). Disse ble testet ved forskjellige konsentrasjoner; 1:100 og 1:500 for JSB-1 og 1:100, 1:500 og 1:200 for C219. Begge antistoffene er av isotypen mus IgG1. Det ble kommet frem til at det skulle jobbes videre med C219 ved konsentrasjonen 1:200 (se resultater, pkt. 3.1). Ulike konsentrasjoner av geler ble også testet ut; 10 %, 8 % og 6,5 %, i tillegg til at det ble gjort forsøk på å bruke en gradientgel (4-12 %, NuPAGE). Det ble bestemt å utføre de resterende forsøkene med en 6,5 % gel (se resultater, pkt. 3.1). Tarmhomogenatene ble fortynnet til forskjellige konsentrasjoner; alt fra en konsentrert prøve til en 20x fortynning, i tillegg til at det ble gjort forsøk på både kokte og ukokte prøver. For å lage en konsentrert prøve ble tarmhomogenatene fortynnet med 2x samplebuffer tilsatt 5 % bromfenolblått og 10 % β -merkaptetanol. Videre fortynninger ble laget ved å fortynne med 1x samplebuffer. På bakgrunn av resultatene fra metodeutviklingen, ble det laget en standardrekke av ukokte P-gp standarder: 2x fortynning, 4x fortynning, 6x fortynning, 8x fortynning og 10x fortynning. Ved tilsetning av primærantistoff skal rørene rotere kaldt over natten, men det er også mulig

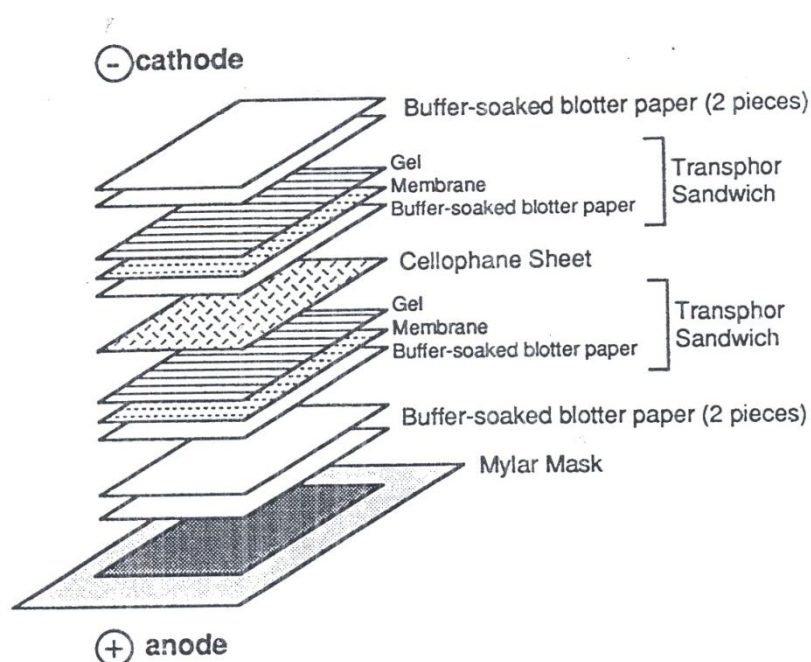
å la de rotere ved romtemperatur i 1½ time. Begge disse metodene ble prøvd ut, men det ble kommet frem til at det var mest gunstig å la den gå over natten. Forskjellige fremkallingstider ble også prøvd ut; fra 1 minutt til 40 minutter. Det endte opp med en fremkallingstid på 1-10 minutter.

2.4.3 Endelig metode

Støpeapparatet ble satt sammen og en 6,5 % gel ble støpt (Tabell 4). Ammonium persulfat (APS) og tetrametyletyldiamin (TEMED) ble tilsatt til slutt for å initiere polymeriseringen, og løsningen ble tilført støpeformen. Det ble tilsatt 200 µl isobutanol over gelen for å gi den en glatt overflate og for å fjerne eventuelle luftbobler. Etter 45-60 minutter ble isobutanolen fjernet, og en 4 % stackinggel ble laget (Tabell 4). Brønnskammene ble satt på, og dette stod i 60 minutter. Etter støpingen ble kassetene (metallplate, spacere og glassplate) lagt i et elektroforesekammer. Brønmarkører ble satt på, brønnskammene ble fjernet og standardrekken (15 µl) og pasientprøvene (15 µl) ble tilsatt, i tillegg til en standard (5 µl). Disse ble separert i 1 time og 20 minutter ved 200 V. Etter elektroforesen ble det laget en sandwich med gelene, filterpapir, membran og cellofan (Figur 7). Disse ble blottet i blottingmaskinen (100 mA i 45 minutter). Denne prosessen gjør at proteinene på gelen går over til membranen i sandwichen. Etter blotting ble disse membranene farget med Ponceau-farge for å sjekke at proteinene hadde bundet seg til dem. De ble så skylt i destillert vann i noen minutter, og deretter i tris-tween-bufret saltvannsløsning (T-TBS) (Appendiks, pkt. 7.1.2) i 10 minutter. Membranen ble blokkert i 1 time i 5 % Blotto (Appendiks, pkt. 7.1.2). Denne løsningen ble fjernet, og membranene ble tilsatt primært antistoff løst i Blotto (5 ml/membran). Dette ble inkubert over natten på kjølerom med vipping. Primærantistoffet ble tatt vare på da dette kunne brukes flere ganger. Membranene ble vasket med Blotto 3 x 10 minutter. Peroksidasemerket sekundært antistoff løst i Blotto (5 ml/membran) ble tilsatt og satt på vipping i 1 time ved romtemperatur. Til slutt ble membranene skylt 2 ganger og vasket 3 x 10 minutter med 1x T-TBS ved romtemperatur og vipping.

Tabell 4: Oppskrift på 6,5 % gel og 4 % stackinggel

	6,5 % separasjonsgel	4 % stackinggel
Destillert vann	6,74 ml	6,10 ml
1,5 M tris-HCl pH 8,8	3,25 ml	-
0,5 M tris-HCl pH 6,8	-	2,50 ml
Monomer-løsning	2,82 ml	1,30 ml
10 % SDS-løsning	130 µl	100 µl
10 % APS	65 µl	50 µl
TEMED	6,5 µl	10 µl

**Figur 7:** Illustrasjon av en sandwich som brukes ved blottingen. Sandwichen er beregnet for 2 geler, og består av 3 filterpapir, membran, gel, cellofan, filterpapir, membran, gel og 2 filterpapir i den rekkefølgen.

Membranene ble inkubert i 1 minutt i “enhanced chemiluminescence” (ECL) reagens og pakket i plastfolie. Eventuelle luftbobler ble fjernet. Membranene ble lagt i fremkallingskassetten med film (Kodak BioMax MS Film) og eksponert så lenge det var ønskelig. For C219-antistoffet, varierte eksponeringstiden fra 1 minutt til 10 minutter. Filmen ble så fremkalt i Kodak LX-24 røntgenfremkaller (100 ml fremkaller + 300 ml vann) i 30 sekunder, skylt i vann, fiksert i et par minutter i Kodak AL-4 røntgenfiksator (50 ml fiksator + 150 ml vann) og til slutt skylt i vann før den ble hengt opp til tork. For en mer detaljert prosedyre, se appendiks pkt. 7.1.3.

2.5 Kvantifisering av proteinene

Filmen med båndene ble skannet og importert til dataprogrammet GeneTools (SynGene, Cambridge, UK). Båndintensiteten ble bestemt og resultatene ble eksportert til Excel 2007 hvor det ble laget en standardkurve og hvor uttrykk av P-gp i de ulike prøvene ble estimert. Siden P-gp standard ikke er kommersielt tilgjengelig, ble det laget en P-gp standard fra en tarmbiopsi, og denne fikk enheten "P-gp enheter". Fortynningsrekken ble gitt verdier, hvor en konsentrert prøve tilsvarer 1, en 2 gangers fortynning tilsvarer 0,5, en 4 gangers fortynning er 0,25, 6 gangers fortynning er 0,167, 8 gangers fortynning er 0,125 og 10 gangers fortynning tilsvarer 0,1.

2.6 Proteinmåling

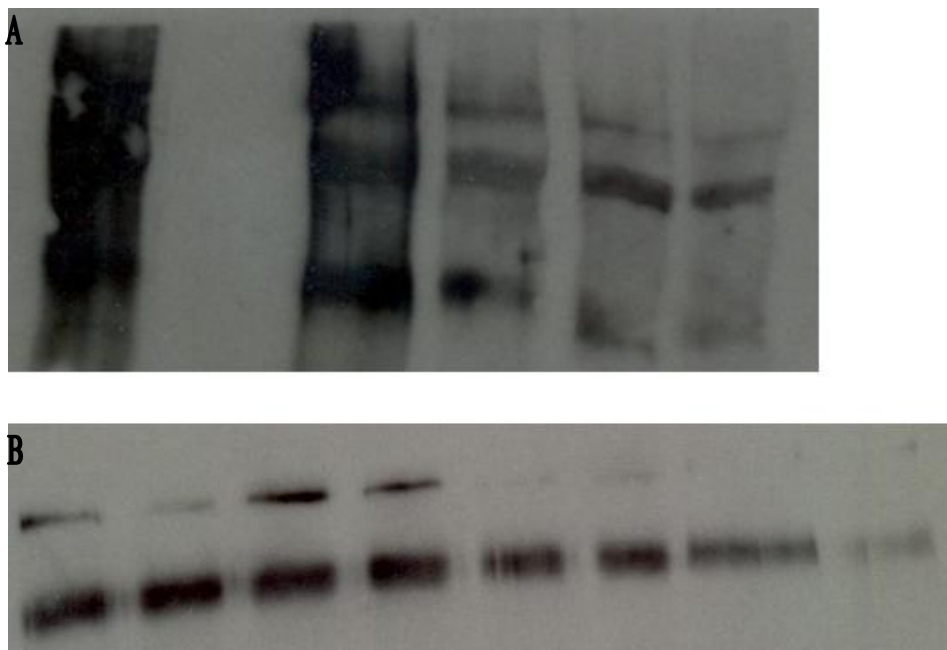
Totalprotein ble målt som beskrevet av Bradford (1976). Det ble laget en standardrekke, som var basert på bovint serumalbumin (BSA). BSA ble fortynnet til 7 ulike konsentrasjoner med sukrosebuffer (0 µg/ml – 300 µg/ml). Vevsprøvene ble også fortynnet med sukrosebuffer, og 10 µl av hver prøve ble pipettert i et 96-brønners mikroplate. Hver av disse ble deretter tilsatt 200 µl BioRad Protein Assay fargeløsning, bestående av 10 ml BioRad Coomassie Brilliant Blue G-250 og 40 ml destillert vann. Når fargestoffet danner et kompleks med proteinet, skjer det en endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Absorbansen måles dermed ved 595 nm i Wallac 1420 (Perkin Elmer). Verdiene ble så beregnet ut i fra standardkurven.

3. Resultater

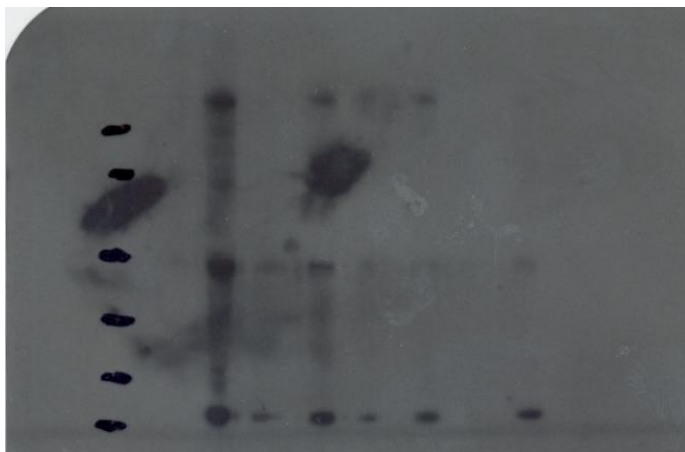
3.1 Metodeutvikling

Først ble antistoffet JSB-1 testet ved forskjellige konsentrasjoner (1:100, 1:500) (Figur 8a), men antistoffet C219 (Kartner, Evernden-Porelle et al. 1985) viste mer spesifikke bånd med mindre bakgrunnstøy (Figur 8b). Antistoffet C219 ble dermed benyttet videre i oppgaven, og ble testet ved forskjellige konsentrasjoner. Fortynningene 1:100, 1:200 og 1:500 ble testet, men 1:200 ga mest spesifikke og klare bånd og ble brukt videre i oppgaven (Figur 8b).

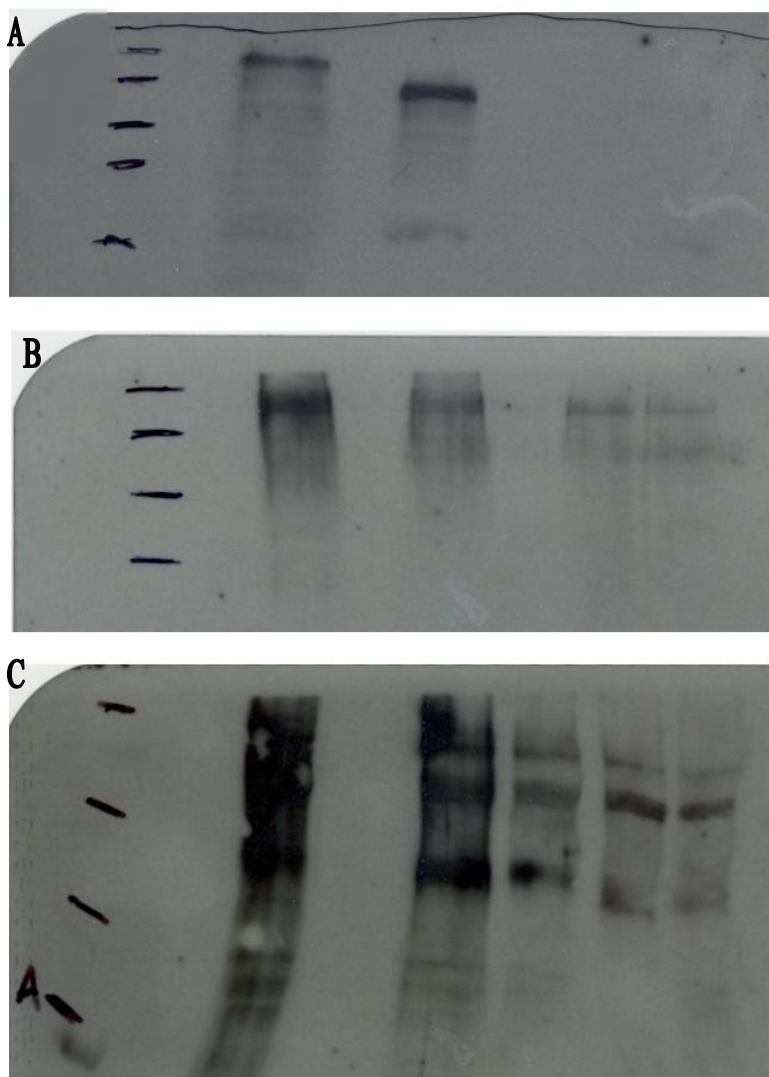
Gradientgel (4-12 % NuPAGE) ble studert, men denne ga ikke like fine bånd som vanlig gel (Figur 9). Ved undersøkelse av ulike gelkonsentrasjoner, ble det funnet at 10 % og 8 % gel ikke ga god nok separasjon av båndene. På 10 % gelen (Figur 10a) var det tegn til to bånd, men disse lå veldig nær hverandre. Det ble dermed forsøkt med en 8 % gel, og denne ga bedre separasjon mellom båndene (Figur 10b), men det var 6,5 % gelen som ga mest tilfredsstillende separasjon (Figur 10c).



Figur 8: Geler fra metodeutviklingen. A: JSB-1-antistoffet med fortynning 1:100 B: C219-antistoffet med fortynning 1:200.

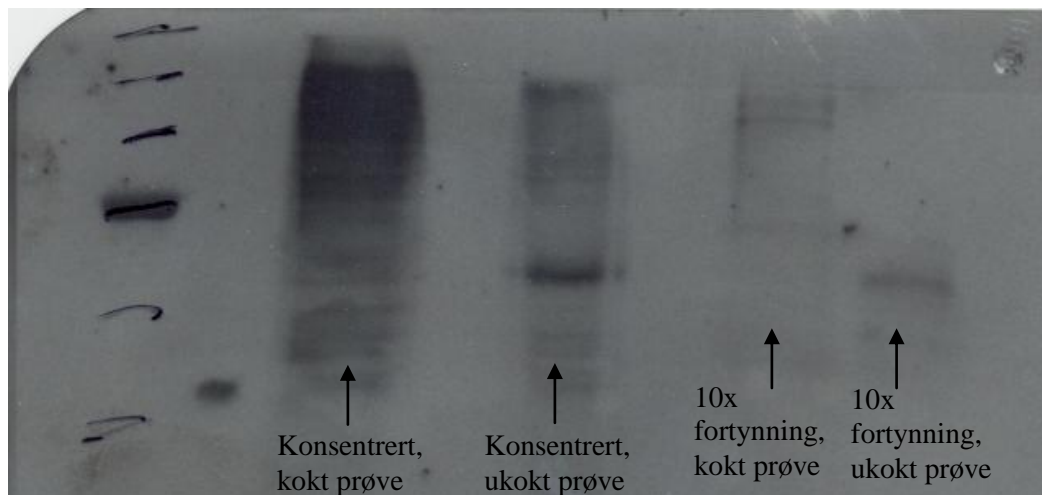


Figur 9: Gradientgel (4-12 % NuPAGE) med antistoffet JSB-1 ved fortynningen 1:100.



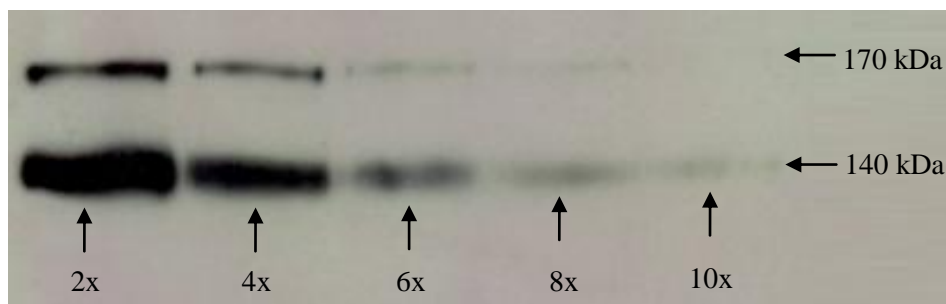
Figur 10: Geler fra metodeutviklingen med antistoffet JSB-1 ved fortynningen 1:100. A: 10 %. B: 8 %. C: 6,5 %.

Forsøk med ukokte og kokte prøver viste at de ukokte prøvene ga mindre uspesifikk binding, og resten av forsøkene ble utført med ukokte prøver i en fortynningsrekke fra 2x til 10x (Figur 11).

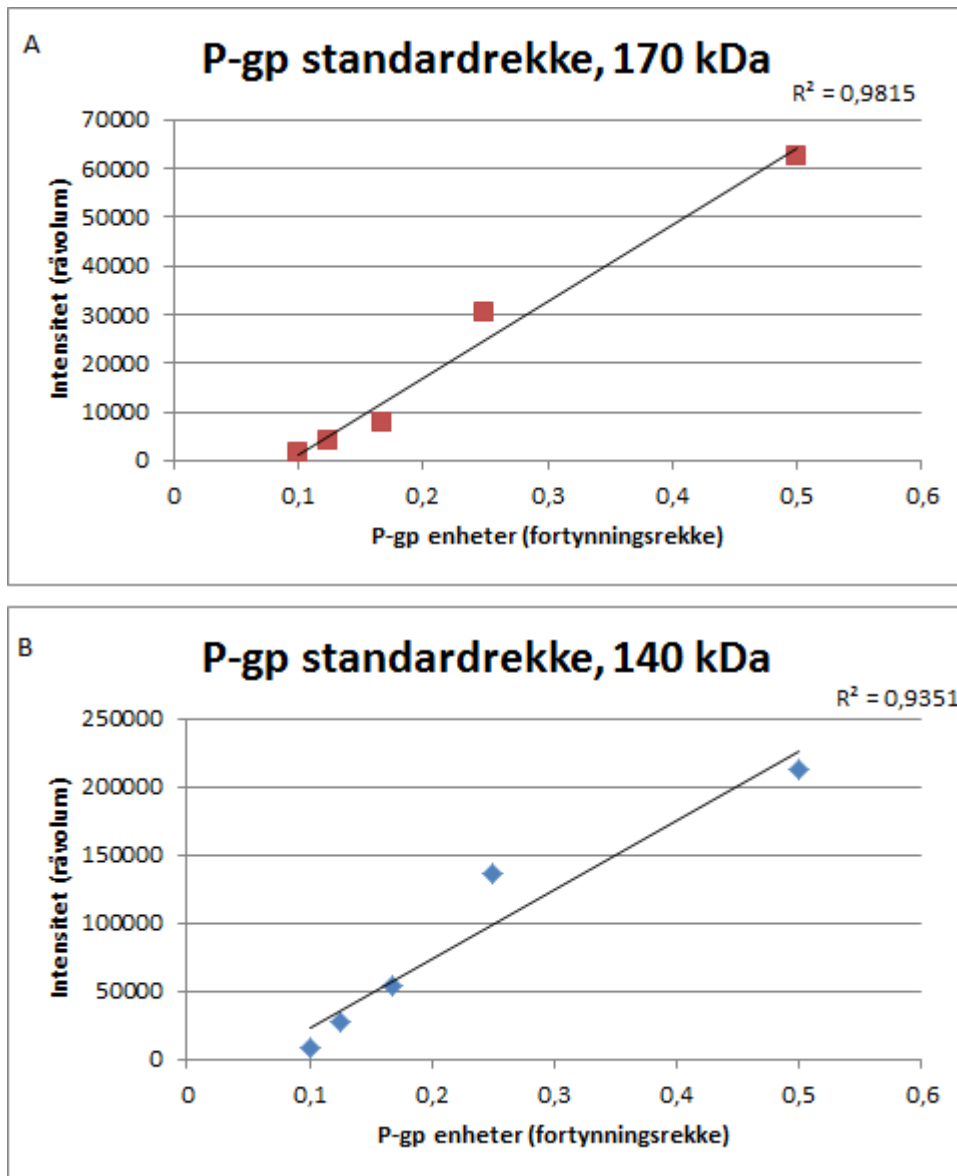


Figur 11: 10 % gel med antistoffet JSB-1 ved fortynningen 1:100. Prøvene er både kokt, ukokt, fortynnet og konsentrert.

Gelene fra metodeutviklingen viste to bånd, et på 140 kDa og et på 170 kDa (Figur 12). Disse viste begge god linearitet i forhold til mengde P-gp prøve som ble tilsatt (Figur 13).



Figur 12: Standardrekke i en 6,5 % gel med fortynningen 2x, 4x, 6x, 8x og 10x.



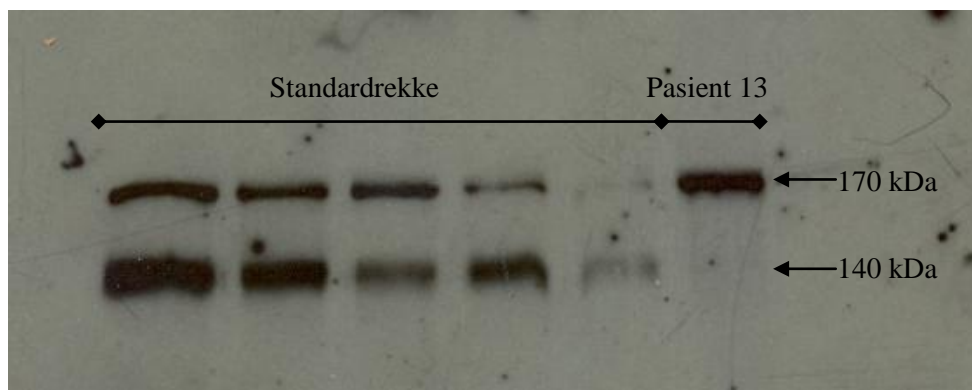
Figur 13: Graf over standardrekke for 170 kDa P-gp (A) og 140 kDa P-gp (B) med R^2 -verdier (regresjonskoeffisient). Fortynningsrekken; 2x=0,5, 4x=0,25, 6x=0,167, 8x=0,125 og 10x=0,1. I begge grafer er intensiteten av båndene en funksjon av P-gp enheter.

3.2 P-gp uttrykk i biopsier

Duodenum

P-gp ble detektert i biopsier fra duodenum fra alle pasientene unntatt pasient 18, som ikke viste tegn til bånd, selv om forsøket ble utført med en konsentrert prøve. I duodenum ble det kun detektert P-gp bånd med molekylvekt 170 kDa (Figur 14). Gjennomsnittlig konsentrasjon av P-gp i duodenum (n=9) ble funnet å være 49 (\pm 31) P-gp-enheter/ng protein. Pasient 24 viste lavest konsentrasjon av P-gp (14 Pgp-enheter/ng protein) mens

pasient 14 viste høyeste konsentrasjon (117 P-gp enheter/ng protein). Dette tilsvarer en forskjell på 8,3 ganger (Tabell 5).



Figur 14: Western blott gel for pasient 13 (duodenum), hvor det siste båndet er pasientprøven.

Tabell 5: Konsentrasjon av P-gp i biopsiene angitt i P-gp enhet/ng protein

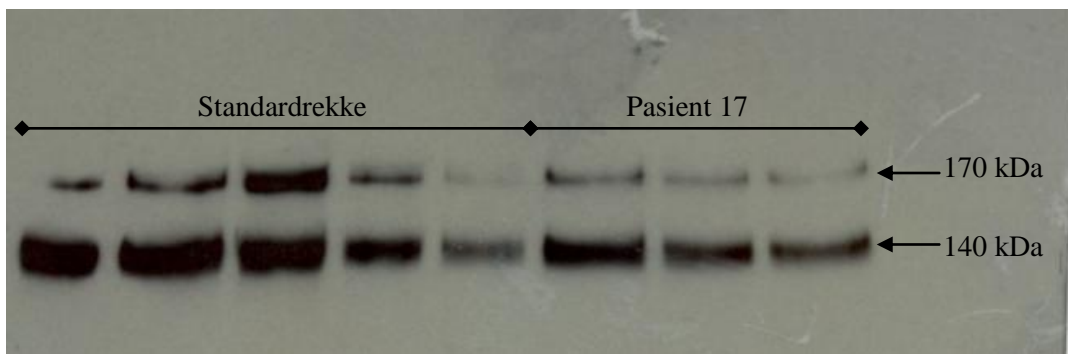
P-gp størrelse (kDa)	Pasient	Duodenum	Jejunum	Ileum	PK3	Lever
170	12	24,0	14,3			-
140			9,2	16,7	98,7	-
170	13	54,1			-	
140			19,1	77,0	-	42,6
170	14	116,6	39,9			
140			57,5	37,7	58,9	8,5
170	15	57,4	-			
140			-	19,e	121,4	51,0
170	16	65,4			-	
140				159,9	60,4	-
170	17	29,1	13,1		-	-
140				23,9	64,3	-
170	18	ND	18,1			
140				91,3	55,1	20,3
170	20	52,2	78,9		-	
140				33,7	71,6	-
170	23	32,7			-	
140				38,0	38,0	-
170	24	14,1			-	
140				23,3	47,7	-
Gjennomsnitt	170 kDa	49,5	32,9			
	140 kDa		50,6	48,8	74,8	45,2
Minimum	170 kDa	14,1	13,1			
	140 kDa		9,2	16,7	20,3	4,4
Maksimum	170 kDa	116,6	78,9			
	140 kDa		159,9	77,0	121,3	211,8
Standardavvik	170 kDa	30,5	27,9			
	140 kDa		47,8	20,7	44,5	69,4

ID = ingen deteksjon

- = manglet biopsier

Jejunum

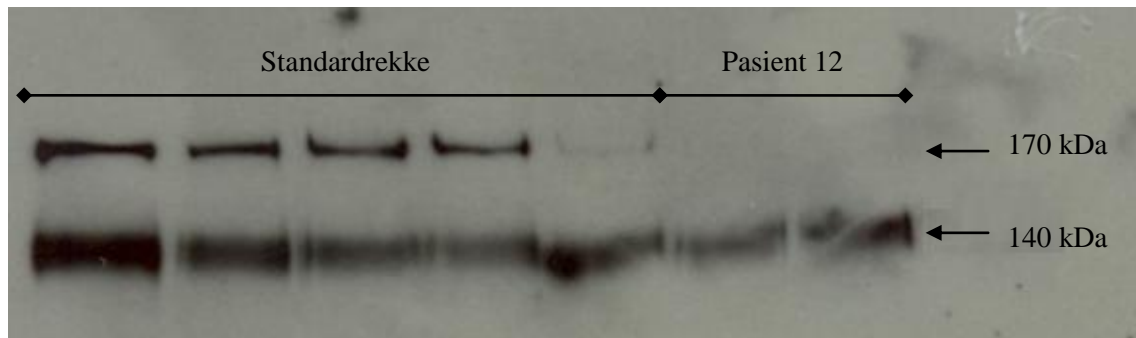
I jejunumprøvene ble det funnet 140 kDa-bånd i alle biopsiene. 170 kDa bånd ble for P-gp identifisert for 5 av pasientene (Pasient 12, 14, 17, 18 og 20) (Tabell 5). Western blott fra pasient 17 med 140 kDa og 170 kDa bånd for P-gp er vist i Figur 15. Gjennomsnittlig konsentrasjon av 170 kDa P-gp og 140 kDa P-gp er henholdsvis $32,9 (\pm 27,9)$ P-gp enheter/ng protein og $50,6 (\pm 47,8)$ P-gp enheter/ng protein. For 170 kDa båndene var det en 6 gangers forskjell mellom høyeste P-gp konsentrasjon og laveste P-gp konsentrasjon; pasient 20 viste høyest konsentrasjon av P-gp ($78,9$ P-gp enheter/ng protein) mens pasient 17 viste lavest konsentrasjon med $13,1$ P-gp enheter/ng protein. Båndene på 140 kDa var sterkere hos pasientene enn 170 kDa båndene. Dataene viser 2 gangers forskjell mellom høyeste konsentrasjon av 140 kDa og 170 kDa. Høyeste konsentrasjon av 140 kDa P-gp fantes hos pasient 16 ($159,9$ P-gp enheter/ng protein), mens laveste konsentrasjon var hos pasient 12 ($9,2$ P-gp enheter/ng protein); noe som gir en forskjell på 17 ganger.



Figur 15: Western blott gel for jejunum (fra pasient 17) med 140 kDa bånd, og 170 kDa bånd for P-gp.

Ileum

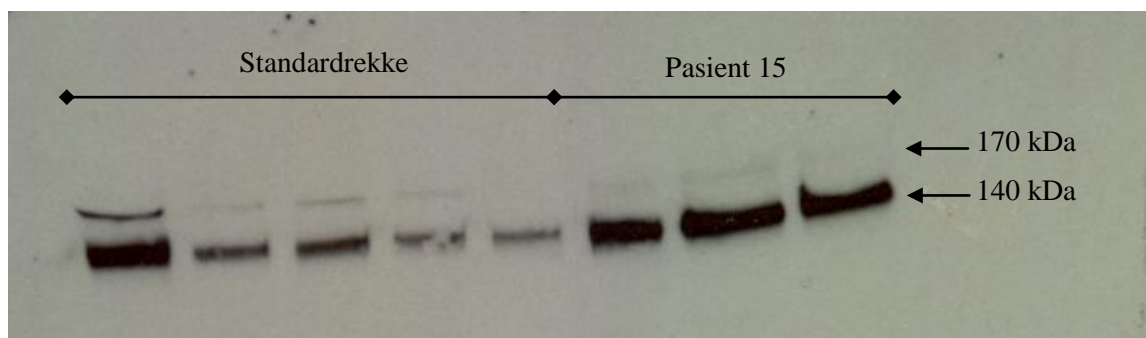
Det ble detektert P-gp i alle ileumprøvene fra pasientene. Her var det hovedsakelig kun 140 kDa bånd som ble påvist (Figur 16). Unntaket var pasient 23, som hadde 170 kDa bånd for P-gp ($72,2$ P-gp enheter/ng protein) i tillegg til 140 kDa bånd. Gjennomsnittlig P-gp konsentrasjon for 140 kDa båndet var $48,8 (\pm 20,7)$ P-gp enheter/ng protein. Pasient 13 hadde høyest konsentrasjon av 140 kDa P-gp ($77,0$ P-gp enheter/ng protein) mens pasient 12 hadde lavest konsentrasjon ($16,7$ P-gp enheter/ng protein). Dette er en forskjell på 4,5 ganger.



Figur 16: Western blott gel for ileum (fra pasient 12) med 140 kDa bånd for P-gp på pasientprøven.

PK3

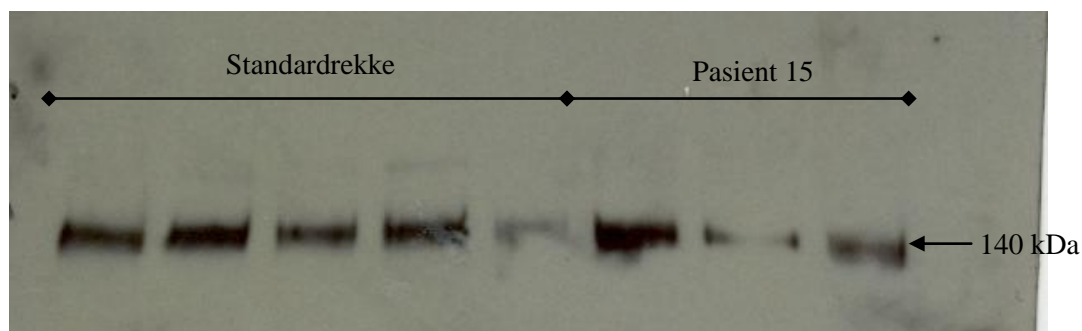
I de 4 PK3-prøvene (Pasient 12, 14, 15 og 18) ble det detektert 140 kDa bånd (Tabell 5). Western blott gel fra pasient 15 er vist i Figur 17, med en gjennomsnittskonsentrasjon på $74,8 (\pm 44,5)$ P-gp enheter/ng protein. Pasient 15 hadde høyest konsentrasjon av P-gp 2 år etter operasjonen ($121,3$ P-gp enheter/ng protein) og pasient 18 hadde lavest konsentrasjon ($20,3$ P-gp enheter/ng protein); noe som tilsvarer en forskjell på 6 ganger.



Figur 17: Western blott gel for pasient 15 (PK3) med 140 kDa bånd for P-gp.

Lever

Det ble kun detektert 140 kDa bånd for leverprøvene (Tabell 5); (Figur 18). Gjennomsnittlig konsentrasjon av P-gp i lever var $45,2 (\pm 69,4)$ P-gp enheter/ng protein. Pasient 18 hadde høyest P-gp konsentrasjon i lever ($211,8$ P-gp enheter/ng protein), mens pasient 20 hadde lavest konsentrasjon i lever ($4,4$ P-gp enheter/ng protein). Dette tilsvarer en forskjell på 52 ganger.



Figur 18: Western blott gel for pasient 15 (lever) med 140 kDa bånd for P-gp.

Det var høy interindividuell variabilitet i P-gp uttrykk hvor det er tegn til at pasient 12 har lavere konsentrasjoner av P-gp, mens pasient 16 har høyere konsentrasjoner, uten at det foreligger klare mønstre for dette (Tabell 6). Hvis P-gp ble relatert til ng biopsi i stedet for ng protein ble verdiene noe annerledes. Pasient 14, 16, 20 og 23 viste høyt nivå av P-gp enheter/ng biopsi (Tabell 7).

Tabell 6: Konsentrasjon av P-gp i biopsiene (total P-gp enheter/ng protein)

Pasient	Duodenum	Jejunum	Ileum	PK3	Lever
12	24,0	23,4	16,7	98,8	-
13	54,1	19,1	77,0	-	42,6
14	116,6	97,4	37,7	59,0	8,5
15	57,4	-	19,3	121,3	51,0
16	65,4	159,9	60,4	-	22,9
17	29,1	37,0	64,3	-	-
18	ID	109,3	55,1	20,3	211,8
20	52,2	112,6	71,6	-	4,4
23	32,7	38,0	110,1	-	11,2
24	14,1	23,3	47,7	-	9,3
Gjennomsnitt	49,5	68,9	56,0	74,8	45,2
Minimum	14,1	19,1	16,7	20,3	4,4
Maksimum	116,6	159,9	110,1	121,3	211,8
Standardavvik	30,5	51,5	27,9	44,5	69,4

- = manglet biopsier

ID = ingen deteksjon

Tabell 7: Konsentrasjon av P-gp i biopsiene (total P-gp enheter/ng biopsi)

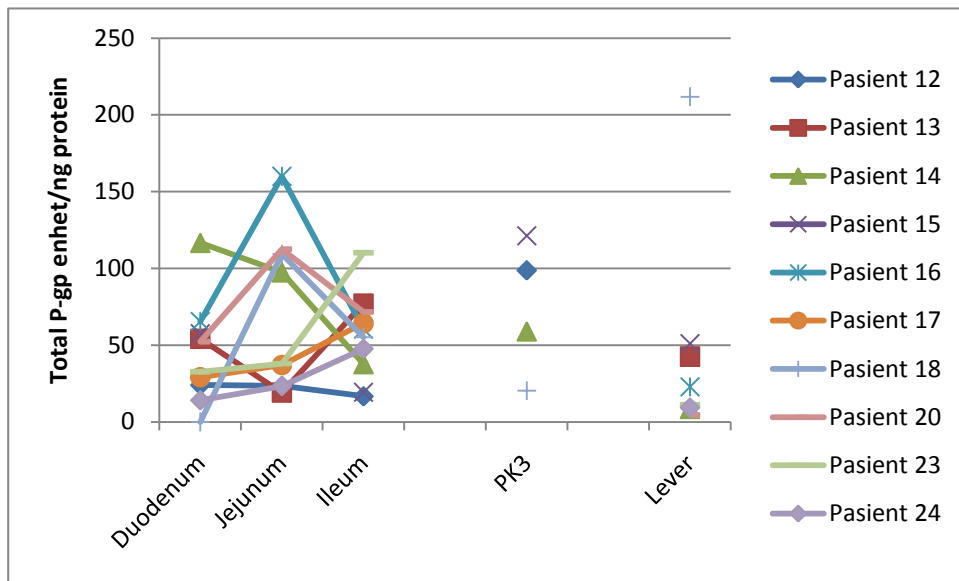
Pasient	Duodenum	Jejunum	Ileum	PK3	Lever
12	605	812	508	2787	-
13	1192	317	642	-	1936
14	2957	3160	506	2977	568
15	1055	-	931	8498	4287
16	1399	4433	2108	-	1662
17	1662	1872	4329	-	-
18	ID	3486	1756	1989	4902
20	1209	5654	3141	-	364
23	2595	2423	9947	-	811
24	586	1383	2329	-	787
Gjennomsnitt	1473	2616	2620	4063	1915
Minimum	586	317	506	1989	364
Maksimum	2957	5654	9947	8498	4902
Standardavvik	819	1740	2861	2987	1745

- = manglet biopsier

ID = ingen deteksjon

3.2.1 Variasjon i P-gp uttrykk i ulike deler av tarm og lever for hver pasient

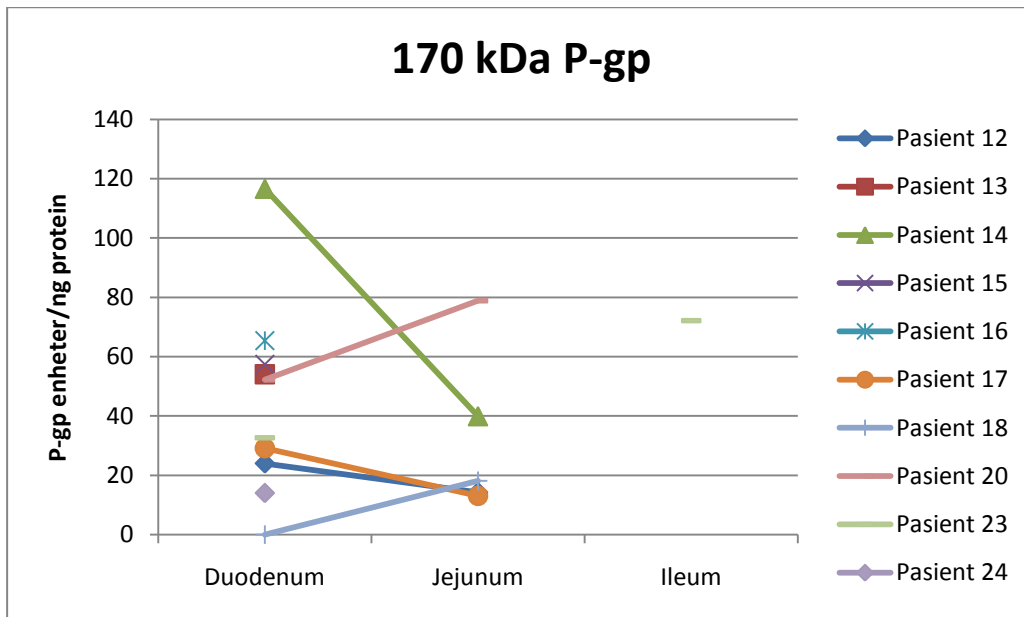
Konsentrasjonen av P-gp i pasientbiopsiene viste også en høy variasjon mellom de ulike vevene for hver pasient. De fleste pasientene viste en økende konsentrasjon av total P-gp nedover tarmen (bl.a. pasient 23 og 24, Figur 19), mens én pasient viste motsatt trend (Pasient 14, Figur 19). Det var i tillegg noen pasienter som ikke hadde noe klart mønster (bl.a. pasient 16 og 20, Figur 19).



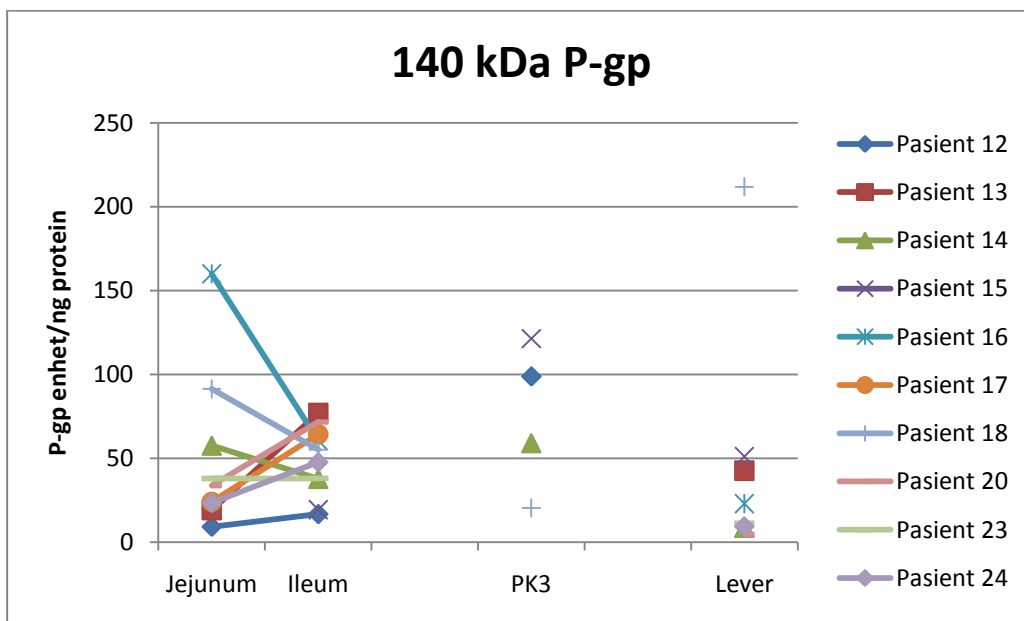
Figur 19: Graf av total P-gp enheter/ng protein for alle 10 pasienter i ulike deler av tarm og lever.

For 170 kDa P-gp, hadde de fleste pasientene kun dette båndet i duodenum. For pasienter som hadde 170 kDa P-gp i andre tarmdeler også, var det en tendens til minkende konsentrasjon av denne nedover tarmen (bl.a. pasient 14, Figur 20). Det finnes likevel pasienter som har en økende konsentrasjon av 170 kDa P-gp nedover tarmen (bl.a. pasient 20, Figur 20).

Det var en tendens til økning av 140 kDa P-gp nedover tarmen (bl.a. pasient 20, Figur 21), men det fantes også pasienter som hadde en minking av denne nedover tarmen (bl.a. pasient 16, Figur 21). Det var i tillegg pasienter som ikke hadde noe klart mønster på konsentrasjonen av 140 kDa P-gp i tarmen.

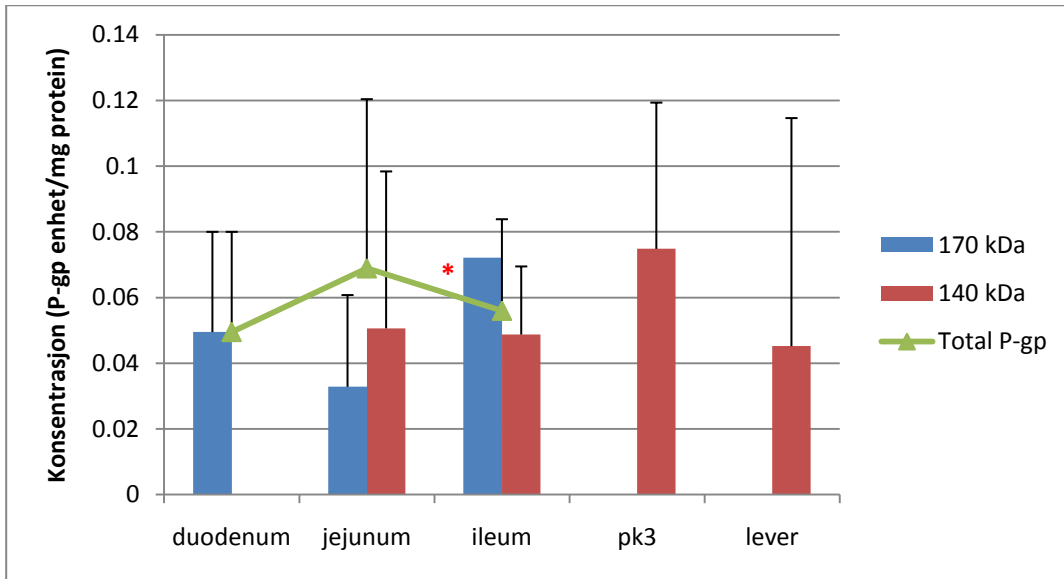


Figur 20: Graf av 170 kDa P-gp i biopsiene hos alle 10 pasienter i ulike deler av tarm.



Figur 21: Graf av 140 kDa P-gp i biopsiene hos alle 10 pasienter i ulike deler av tarm og lever.

Ser man på gjennomsnittlig konsentrasjon av P-gp i tarmen, ser det ut til å være en økning av total P-gp fra duodenum til jejunum, og en reduksjon fra jejunum til ileum (Figur 22). I den figuren er det også mulig å se at i duodenum ble det kun funnet 170 kDa båndet av P-gp.



Figur 22: Et histogram over gjennomsnittlig konsentrasjon av P-gp (P-gp-enhet/mg protein) i duodenum, jejunum, ileum, PK3 og lever for BPD-DS-pasientene. Én pasient viste tegn til 170 kDa P-gp i ileum; denne er markert med *.

3.2.2 Resultater proteinmåling

Konsentrasjon av totalprotein for pasientene ble estimert ved hjelp av spektrofotometrisk måling. Resultatene viser en interindividuell variasjon (Tabell 8).

Tabell 8: Estimert mengde totalprotein (mg/ml) i tarm og lever

Pasient	Duodenum	Jejunum	Ileum	PK3	Lever
12	1,3	1,7	1,5	1,4	-
13	1,1	0,8	0,4	-	2,3
14	1,3	1,6	0,7	2,5	3,3
15	0,9	-	2,4	3,5	4,2
16	1,1	1,4	1,7	-	3,6
17	1,2	2,5	3,4	-	-
18	2,5	2,4	1,6	2,8	4,9
20	1,2	2,3	3,0	2,2	4,1
23	4,0	3,2	4,5	-	3,6
24	2,1	3,0	2,4	-	4,3
Gjennomsnitt	1,7	2,1	2,2	2,5	3,8
Standardavvik	0,9	0,8	1,3	0,8	0,8

- = manglet biopsier

3.2.3 Sammenhengen mellom uttrykt P-gp og kinetikkdata

Farmakokinetikkdata for pasientpopulasjonen fra studien gjort av Skottheim et al (2010) er vist i Tabell 9. For 9 av 10 pasienter økte AUC av atorvastatinsyre etter gjennomgått BPD-DS. Unntaket er pasient 12, som ikke viste noen endring. Det ble vist en gjennomsnittlig økning på 2 ganger for AUC₀₋₈ ratio. AUC₀₋₈ preoperativt varierte fra 14 til 153 ng*t/ml, mens AUC₀₋₈ postoperativt varierte fra 26 til 220 ng*t/ml (Skottheim, Jakobsen et al. 2010).

Tabell 9: Farmakokinetiske data for pasientpopulasjonen. Tabellen viser eksponering av atorvastatinsyre før og etter operasjonen (ng*t/ml) og endring i AUC (ratio og Δ) (Skottheim, Jakobsen et al. 2010)

Pasient	Dose	AUC (0-8 ng t/ml) PK1	AUC (0-8 ng t/ml) PK2	Ratio AUC	Δ AUC/mg atorvastatin
12	20	44	43	0,97	-0,07
13	20	53	221	4,2	8,4
14	20	14	27	1,9	0,6
15	20	17	31	1,8	0,69
16	20	38	51	1,3	0,61
17	40	89	167	1,9	2,0
18	80	153	216	1,4	0,78
20	20	18	36	2,0	0,89
23	40	133	216	1,6	2,1
24	20	25	85	3,4	3,0
Gjennomsnitt	30	58	109	2,0	1,7
Minimum	20	14	27	0,97	0,62
Maksimum	80	153	221	4,2	0,84
Standardavvik	19	50	85	0,99	1,8

PK1 = rett etter operasjonen

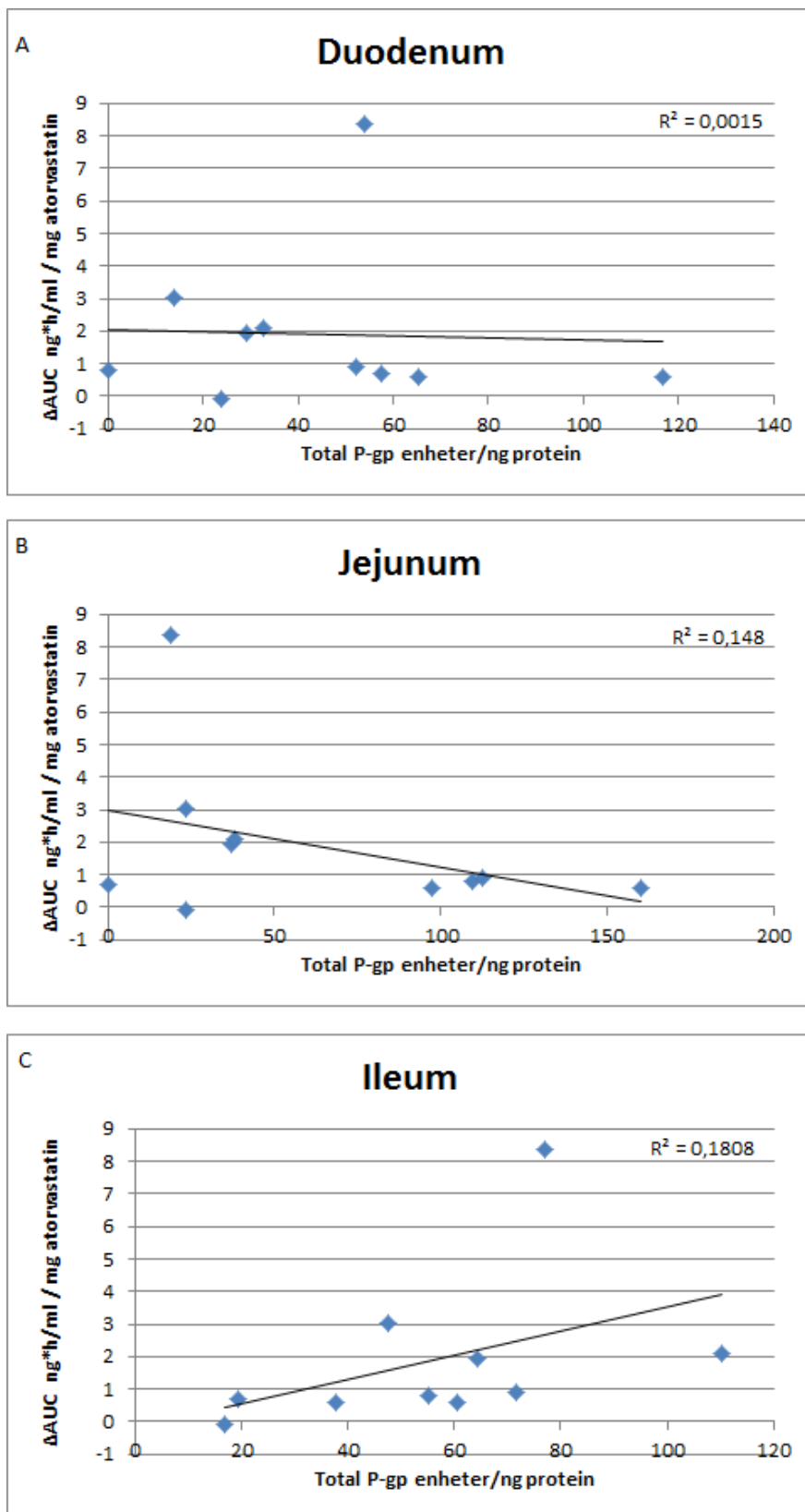
PK2 = uker etter operasjonen

Proteinuttrykk av P-gp i ulike deler av tarmen ble relatert til forandring i AUC (Δ AUC = AUC (PK2) – AUC (PK1)) etter operasjonen i forhold til før operasjonen. Det var en tendens til økende effekt på AUC med økende konsentrasjon av P-gp i ileumbiopsiene; dette kan man se pga. stigningen i grafen (Figur 23c). For duodenum og jejunum var forholdet motsatt (Figur 23a,b).

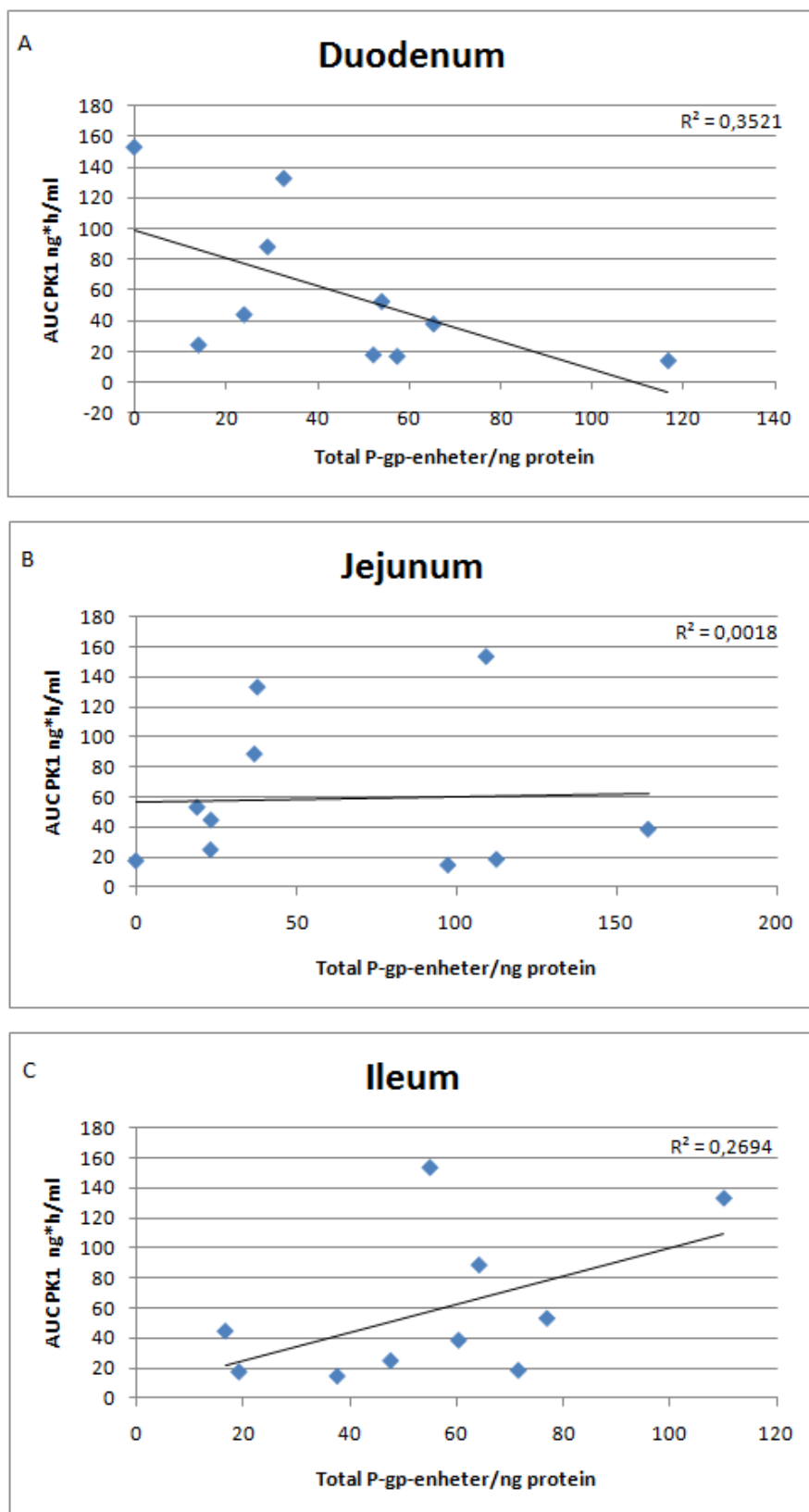
Proteinuttrykket av P-gp ble også relatert til AUC før operasjonen (Figur 24). Pasienten som uttrykte mest P-gp i duodenum (116,6 total P-gp enheter/ng protein), viste lav systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (14,45 ng*t/ml). Motsatt var det for den pasienten som ikke hadde detekterbare nivåer av P-gp i duodenum. Denne pasienten viste høy systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (153,5 ng*t/ml). Det var en viss sammenheng mellom AUC før operasjonen og mengden P-gp i duodenum ($r^2 = 0,35$).

For jejunum ble det vist lav systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (38,36 ng*t/ml og 52,99 ng*t/ml) både for pasienten som uttrykte mest P-gp i jejunum og for pasienten som uttrykte minst P-gp (159,9 total P-gp enheter/ng protein og 19,07 total P-gp enheter/ng protein). Det var ingen klar sammenheng mellom AUC før operasjonen og mengden P-gp i jejunum i pasientgruppen (Figur 24b).

For ileum ble det vist høy systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (133,1 ng*t/ml) hos pasienten som uttrykte mest P-gp i ileum. Motsatt var det for den pasienten som uttrykte minst P-gp i ileum (16,70 total P-gp enheter/ng protein). Denne pasienten viste lav systemisk eksponering av atorvastatin preoperativt (44,48 ng*t/ml). Det var ingen klar sammenheng mellom AUC før operasjonen og mengden P-gp i ileum.



Figur 23: P-gp konsentrasjon i duodenum, jejunum og ileum (total P-gp enheter/ng protein) for alle pasienter korrelert til endring i AUC ($\Delta AUC = AUC(PK2) - AUC(PK1)$) (normalisert til dose).



Figur 24: Konsentrasjon av P-gp i duodenum, jejunum og ileum (total P-gp enheter/ng protein) for alle pasienter korrelert til AUC før operasjonen (PK1).

4. Diskusjon

4.1 Metodeutvikling

Det er blitt utviklet en Western blott metode til estimering av P-gp konsentrasjonen i homogenater fra pasientbiopsier ved å bruke antistoffet C219 (Kartner, Evernden-Porelle et al. 1985). Metoden viste god linearitet for estimering av P-gp med C219 antistoffet (Figur 13). Generelt sett kan P-gp-antistoffer klassifiseres etter lokalisasjonen til de interagerende epitopene i P-gp; intracellulært eller ekstracellulært. Antistoffene JSB-1 og C219 interagerer begge intracellulært, men de reagerer på forskjellige typer epitoper. C219 har to definerte epitoper, mens den eksakte lokalisasjonen til JSB-1 sin epitop er uklar. Dette kan forklare hvorfor C219 ga mer spesifikke bånd i denne oppgaven selv om begge antistoffene binder seg til P-gp. Bruk av ukokte prøver og en 6,5 % polyakrylamid gel ga skarpe bånd uten uspesifikk binding (Figur 12). Dette er muligens pga. at en lavere gelkonsentrasjon gir bedre oppløsning for proteiner med høy molekylvekt, mens en høy gelkonsentrasjon er bedre for proteiner med lav molekylvekt.

Det ble detektert to bånd; et på 140 kDa og et på 170 kDa. Begge er P-gp (Kramer, Weber et al. 1995). P-gp båndet med molekylvekt 170 kDa er den fullt funksjonelle og fullt glykosylerte versjonen av P-gp. P-gp båndet med molekylvekt 140 kDa er en delvis glykosylert variant av P-gp (Kramer, Weber et al. 1995). Hvorvidt den delvis glykosylerte P-gp varianten er funksjonell er imidlertid usikkert og gjenstand for diskusjon. Det har blitt postulert at glykosyleringen ikke påvirker selve funksjonen av proteinet, men at det er med på å stabilisere det. Det er dermed mulig at 140 kDa P-gp også er en funksjonell variant (Gribar, Ramachandra et al. 2000). Andre kilder viser at glykosylering er nødvendig for aktivitet av P-gp, og at 140 kDa P-gp dermed er en mindre funksjonell variant enn 170 kDa P-gp (Draheim, Reicheil et al. 2010). Det postuleres også at 140 kDa, som er kjerneglykosylert, er inaktiv og at den akkumuleres i endoplasmatiske retikulum (ER) (Sieczkowski, Lehner et al. 2009). Det er dermed usikkert hvorvidt glykosylering av P-gp er nødvendig for full aktivitet av transportøren, og dette må studeres videre.

Forsøk utført av Sieczkowski et al (2009) *in vitro* viste at glykosyleringen av P-gp kan påvirkes av statiner (f.eks. atorvastatin og simvastatin). Det ble vist at den fullt glykosylerte formen av P-gp ble redusert til 140 kDa. Det ble sett en reduksjon i den fullt glykosylerte

formen av P-gp (170 kDa) og en økning av den delvis deglykosylerte formen (140 kDa). Dette var kun observert ved lenger statineksponering enn 24 timer. En mulig forklaring på dette er at hemming av HMG-CoA reduktase fører til mindre dolichol; som er et viktig trinn ved glykosylering av proteiner i ER (Sieczkowski, Lehner et al. 2009). Siden pasientene i denne studien alle har benyttet atorvastatin, kan dette være en grunn til at en betydelig del av prøvene viste 140 kDa bånd for P-gp.

4.2 Uttrykk av P-gp i biopsier fra pasienter

Et interessant funn var at det kun ble funnet den fullt glykosylerte varianten av P-gp, nemlig 170 kDa P-gp, i biopsier fra duodenum. Det ble vist en reduksjon av 170 kDa P-gp fra duodenum til jejunum, og det ble ingen deteksjon av 170 kD båndet i ileum. For 140 kDa P-gp var det en tendens til økning nedover tarmen, med ingen deteksjon i duodenum. Det virker dermed som om glykosylering av P-gp reduseres jo lenger ned i tarmen man er. I forhold til total mengde P-gp, tyder resultatene på at konsentrasjonen av P-gp øker nedover tarmen. Dette støtter tidligere funn gjort på tynntarmen til 4 humane donorer (Mouly and Paine 2003). I denne studien ble P-gp uttrykket angitt som P-gp/villin IOD (integrated optical density) ratio, hvorav IOD tilsvarer båndintensitet. Det ble vist et økende uttrykk av P-gp nedover tarmen, med de laveste verdiene i den proksimale delen av tarmen (bl.a. 0,52 og 0,73 for to av donorene) og de høyeste verdiene i den distale delen av tarmen. For de samme donorene varierte jejunumverdiene fra henholdsvis 0,52-0,69 og 0,74-0,95, mens ileumverdiene varierte fra henholdsvis 0,60-1,00 og 0,93-1,00 (Mouly and Paine 2003).

Det var stor variasjon i konsentrasjon av P-gp i tarmen hos pasientene. I duodenum var det 8 gangers forskjell mellom høyeste og laveste konsentrasjon av 170 kDa P-gp mellom pasientene. Til sammenligning ble det i jejunum vist 2 gangers forskjell for 170 kDa P-gp. For 140 kDa P-gp i jejunum var det 17 gangers forskjell mellom pasientene, mens i ileumprøvene var det en forskjell på 4,5 ganger. Forsøk gjort av Mouly et al (2003) viste imidlertid at det var 2,1 gangers forskjell i duodenumprøvene, mens i jejunum var det en forskjell på 1,5-2 ganger. Her er det ikke nevnt noe om forskjellige molekylvekter av P-gp, men total mengde P-gp. Det er altså betydelig høyere interindividuell variasjon i P-gp uttrykk i tarmen i denne oppgaven enn tidligere beskrevet.

Det var stor variasjon i PK3-prøvene også, med en forskjell på 6 ganger mellom høyeste og laveste konsentrasjon av P-gp. Konsentrasjonen av P-gp i PK3-prøvene var høyere enn i de

andre biopsiene, noe som tyder på en oppregulering av transportøren etter BPD-DS. Det må imidlertid her nevnes at PK3-prøvene er tatt fra tarmlumen med gastroskopitang, i motsetning til de andre prøvene. Dette kan være en medvirkende årsak til at PK3-prøvene var høyere enn de andre prøvene, som er skjærebiopsier.

I lever ble det vist en forskjell på 52 ganger mellom høyeste og laveste konsentrasjon av P-gp. Dette stemmer med data fra Schuetz et al (1995), hvor det ble vist en 55 gangers forskjell i P-gp uttrykk i lever fra 41 ulike pasienter. Det er dermed stor forskjell fra pasient til pasient i henhold til konsentrasjonen av P-gp. Forsøk av Mouly et al (2003) i en leverdonor viste derimot en forskjell på 1,2-1,9 ganger. Resultatene tyder på at det er mindre P-gp i leveren enn det er i tarm, noe som stemmer i overens med tidligere funn. Tidligere er det funnet at det er 7,2 ganger mindre P-gp i leveren enn det er i tarm (von Richter, Burk et al. 2004).

4.3 Sammenhengen mellom P-gp og farmakokinetisk profil

I studien utført av Skottheim et al (2010) ble det vist en økning i systemisk eksponering av atorvastatin hos 9 av 10 pasienter som hadde gjennomgått BPD-DS. Dette kan til dels forklares av en reduksjon i CYP-mediert first-pass metabolisme i tynntarmen grunnet forbikobling ved BPD-DS. En sammenligning av konsentrasjonen av P-gp i duodenum og AUC før operasjonen, viste en tendens til lavere biotilgjengelighet med økende konsentrasjon av P-gp (Figur 24a). Motsatt var det for ileumbiopsiene som viste en økning i biotilgjengelighet med økende konsentrasjon av P-gp.

P-gp konsentrasjonen vil kun være et estimat på faktisk mengde P-gp hos de ulike pasientene da lengden på tynntarmen varierer fra pasient til pasient. Ettersom jejunumbiopsiene ikke viste noen klar sammenheng mellom biotilgjengeligheten til atorvastatin før operasjonen og P-gp konsentrasjon, kan det tyde på at andre faktorer har større påvirkning på biotilgjengeligheten til atorvastatin enn P-gp i tarmen. Dette kan være peristaltikk, ulike nivåer av metaboliserende enzymer i tarmen og andre legemiddeltransportører (Skottheim, Jakobsen et al. 2010).

Figur 23 viser konsentrasjonen av P-gp hos pasientene korrelert til Δ AUC. En høy Δ AUC vil si at AUC har endret seg mye etter operasjonen. Man vil forvente en stigning i grafen dersom forbikoblingen av P-gp i tarmsegmentene fører til økt biotilgjengelighet av

atorvastatin. For duodenum, f.eks., kan man imidlertid se en svak nedgang i grafen (Figur 23a). Dette betyr at det ikke er mulig å si noe om forbikoblingen av P-gp påvirker biotilgjengeligheten ut i fra denne studien, selv om dette ikke kan utelukkes.

Fremtidige betraktninger

Flere P-gp studier må til for å bekrefte disse funnene. Sammenhengen mellom P-gp uttrykk og biotilgjengelighet må studeres nærmere. Effekten av glykosyleringen av P-gp og funksjonalitet bør studeres for å forstå viktigheten av 140 kDa P-gp kontra 170 kDa P-gp. Uttrykket av transportøren OATP1B1 bør kvantifiseres for et mer helhetlig bilde av sammenhengen mellom biotilgjengeligheten av atorvastatin og betydningen av ulikt nivå av CYP-enzymmer og transportører.

5. Konklusjon

En metode for estimering av P-gp konsentrasjon ved bruk av Western blott analyse ble utviklet. Metoden viste god presisjon og spesifikk deteksjon av to P-gp bånd; 140 kDa P-gp og 170 kDa P-gp.

Det ble påvist to P-gp bånd, 170 kDa og 140 kDa, hvorav førstnevnte er en fullt glykosylert og funksjonell variant, mens sistnevnte er delvis deglykosylert med uviss funksjonalitet. I duodenum ble det kun funnet 170 kDa P-gp, og det var en reduksjon av dette båndet nedover tarmen, mens 140 kDa P-gp økte nedover tarmen. Ulik glykosylering av P-gp er et interessant funn, og betydningen av dette må undersøkes videre. Det var stor variasjon i både tarm og lever mellom pasientene i P-gp uttrykk, med størst variasjon i leverbiopsiene. Konsentrasjonen av P-gp i PK3-prøvene var høyere enn i lever og de andre tarmsegmentene, noe som kan tyde på en oppregulering av P-gp etter BPD-DS.

Ved sammenligning av konsentrasjon av P-gp i ulike deler av tarmen og AUC før operasjonen hos de enkelte pasientene, ble det funnet redusert biotilgjengelighet av atorvastatin med økende P-gp konsentrasjon i duodenum. Det ble ikke funnet en slik sammenheng i jejunum eller ileum. Det var heller ingen klar sammenheng mellom den observerte økningen i AUC etter operasjonen og uttrykket av P-gp i det bortkoblede tarmsegmentet.

6. Kildeliste

- 4S, S. S. S. S. G.-. (1994). "Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study." The Lancet **344**: 1383-1389.
- Aasheim, E. T., T. Mala, et al. (2007). "Kirurgisk behandling av sykkelig fedme." Tidsskrift for den norske lægeforening **127**(1): 38-42.
- Backman, J. T., H. Luurila, et al. (2005). "Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites." Clinical Pharmacology & Therapeutics **78**(2): 154-167.
- Bertin. (2010). "Precellys 24." Retrieved 28.september, 2010.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.
- Brolin, R. E. (2002). "Bariatric surgery and long-term control of morbid obesity." The Journal of the American Medical Association **288**(22): 2793-2796.
- Brunton, L., J. Lazo, et al. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill.
- 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." Analytical Biochemistry **112**: 195-203.
- Cascorbi, I. (2006). "Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs." Pharmacology & Therapeutics **112**(2): 457-473.
- Cascorbi, I. (2011). "P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations." Handbook of Experimental Pharmacology **201**: 261-283.
- Chan, L. M., S. Lowes, et al. (2004). "The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability." European Journal of Pharmaceutical Sciences **21**(1): 25-51.
- Corsini, A., S. Bellosta, et al. (1999). "New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins." Pharmacology & Therapeutics **84**(3): 413-428.
- Crookes, P. F. (2006). "Surgical treatment of morbid obesity." Annual review of medicine **57**: 243-264.
- Dean, M., A. Rzhetsky, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Cold Spring Harbor Laboratory Press **11**: 1156-1166.
- Dietrich, C. G., A. Geier, et al. (2003). "ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut." Gut **52**(12): 1788-1795.
- Draheim, V., A. Reicheil, et al. (2010). "N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes." European Journal of Pharmaceutical Sciences **41**: 201-209.
- Enbergs, A., R. Bürger, et al. (2000). "Prevalence of coronary artery disease in a general population without suspicion of coronary artery disease: angiographic

- analysis of subjects aged 40 to 70 years referred for catheter ablation therapy." European Heart Journal **21**: 45-52.
- Farrell, T. M., S. P. Haggerty, et al. (2009). "Clinical application of laparoscopic bariatric surgery: an evidence-based review." Surgical endoscopy **23**(5): 930-949.
- Gribar, J. J., M. Ramachandra, et al. (2000). "Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system." Journal of Membrane Biology **173**: 203-314.
- Gropper, S. S., J. L. Smith, et al. (2008). Advanced nutrition and human metabolism. Belmont, Wadsworth Publishing.
- Hoffmann, G. (2009). Digestive system. New York, Marshall Cavendish Benchmark.
- Hoffmann, M. and M. Nowosielski (2008). "DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin." Organic & Biomolecular Chemistry **6**(19): 3527-3531.
- Juranka, P. F., R. L. Zastawny, et al. (1989). "P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins." The FASEB Journal **3**(14): 2583-2592.
- Kartner, N., D. Evernden-Porelle, et al. (1985). "Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies." Nature **316**: 820-823.
- Killackey, M., R. Zhang, et al. (2010). "Challenges of abdominal organ transplant in obesity." Southern Medical Journal **103**(6): 523-540.
- Kramer, R., T. K. Weber, et al. (1995). "Inhibition of N-linked glycosylation of P-glycoprotein by tunicamycin results in a reduced multidrug resistance phenotype." British Journal of Cancer **71**: 670-675.
- Lin, J. H., M. Chiba, et al. (1999). "Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?" Pharmacological Reviews **51**(2).
- Miller, A. D. and K. M. Smith (2006). "Medication and nutrient administration considerations after bariatric surgery." American Journal of Health-System Pharmacy **63**: 1852-1857.
- Mouly, S. and M. F. Paine (2003). "P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine." Pharmaceutical Research **20**(10): 1595-1599.
- Neuvonen, P. J., M. Niemi, et al. (2006). "Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance." Clinical Pharmacology & Therapeutics **80**(6): 565-581.
- Rowland, M. and T. Tozer (2009). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics - concepts and applications. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Schachter, M. (2005). "Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update." Fundamental & Clinical Pharmacology **19**(1): 117-125.
- Schuetz, E. G., K. N. Furuya, et al. (1995). "Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **275**(2): 1011-1018.
- Shepherd, J., S. M. Cobbe, et al. (1995). "Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)." The New England journal of medicine **333**(20): 1301-1307.

- Shitara, Y. and Y. Sugiyama (2006). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic alteration of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions." Pharmacology & Therapeutics **112**(1): 71-105.
- Sieczkowski, E., C. Lehner, et al. (2009). "Double impact on P-glycoprotein by statins enhances doxorubicin cytotoxicity in human neuroblastoma cells." International Journal of Cancer **126**: 2025-2035.
- Skottheim, I. B., G. S. Jakobsen, et al. (2010). "Significant increase in systemic exposure of atorvastatin after biliopancreatic diversion with duodenal switch." Clinical Pharmacology & Therapeutics **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." Clinical Pharmacology & Therapeutics **86**(3): 311-318.
- UCSF (2010). Illustration of the small intestine. **2011**.
- Verollet, R. (2008). "A major step towards efficient sample preparation with bead-beating." Biotechniques **44**(6): 832-833.
- Vist, S. (2010). Uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 i magesekk-, tynntarm- og leverprøver fra overvektige personer. Farmasøytisk Institutt. Oslo, Universitetet i Oslo.
- 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." Clinical Pharmacology & Therapeutics **75**(3): 172-183.
- Warrell, D. A., T. M. Cox, et al. (2005). Oxford Textbook of Medicine. New York, Oxford University Press.
- Williams, D. and J. Feely (2002). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors." Clinical Pharmacokinetics **41**(5): 343-370.
- Wilson, P. W. F., R. B. D'Agostino, et al. (1998). "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." Circulation **97**: 1837-1847.

7. Appendiks

7.1 Oppskrifter

7.1.1 Løsning til homogenisering

Sukrosebuffer 0,32 M pH ~ 7,4	
Sukrose	27,4 g
10 mM Trizabase	0,12 g
1,0 mM EDTA	0,037 g
Destillert vann	ad 100 ml

7.1.2 Løsninger til Western blott analyse

5 % tørrmelk i T-TBS løsning (Blotto)	
Tørrmelk, fettfri	5 g
1x T-TBS	ad 100 ml

2x samplebuffer (Laemmlibuffer)	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	12,5 ml
10 % SDS	20 ml
Glyserol	10 ml

1x samplebuffer (Laemmlibuffer)	
2x samplebuffer	5 ml
Destillert vann	5 ml

10x TBS-Tween (T-TBS) pH 7,5	
Trizmabase	24,228 g
NaCl	116,89 g
Destillert vann	1,6 l
Løsningen settes til røring, og pH-justeres	
Tween 20	10 ml
Destillert vann	ad 2 l

1x TBS-Tween (T-TBS)	
10x TBS-Tween	0,1 l
Destillert vann	0,9 l

Towbinbuffer pH 8,3 (Blottingbuffer)	
Trizmabase	12 g
Glysin	57,6 g
Destillert vann	3,2 l
Metanol	0,8 l

Elektroforesebuffer pH 8,3	
0,025 M Tris-HCl	7,5 g
SDS	2,5 g
0,192 M glysin	35 g
Destillert vann	2,5 l

7.1.3 Prosedyre for Western blott analyse

Støping av gel

- Støpeform: Plastring, plastplater (1 stor og 7 små til 2 geler, 7 små til 4 geler), papir, metallplate (bue opp), spacere (0,75 mm), glassplate, papir, metall, spacere, glassplate (plastplatene brukes for å fylle opp slik at formen blir tett)
- Reagenser: Alt står i den hvite kurven i kjøleskapet, unntatt SDS og isobutanol som står i benken
- Gel lages etter oppskrift i benken. APS og TEMED tilsettes tilnærmet samtidig; løsningen blandes med pipette og gelen settes i støpeformen
- 200 µl isobutanol tilsettes hver gel
- La stå i 45-60 minutter. Sjekk at rester av gelen har stivnet i røret gelen ble laget
- Isobutanol helles av
- 4 % stacking gel lages etter oppskrift i benken, og støpeformen fylles helt opp. Kammer legges i hver gel (skal hvile på metallkantene), og det etterfylles med gel
- La stå i 60 minutter. Sjekk at rester av gelen har stivnet i røret gelen ble laget
- Ta platene fra hverandre med kniv, og vask hver gel med destillert vann for å fjerne gelrestene
- Enhetene kan entes brukes direkte, eller pakkes i plast og folie og lagres i kjøleskap

Gelektroforese

- Elektroforeseskjema fylles ut
- Finn frem: gelbad, strømhoder, klyper og korte pakninger
- Gelplatene settes på strømhodene; metalldelen skal inn på begge sider og klyper settes på. Dette settes i gelkaret, og kjøleslanger kobles til
- Hell elektroforesebuffer bak gelene; ca. 80 ml bak hver gelplate og ca. 80 ml i badet. Det viktigste er at det er nok buffer til å få strømvandring
- Sett på brønnmarkører og fjern kammene
- Sjekk at det er buffer godt over brønnene
- Tilsett 15 µl prøver i brønnene og 5 µl standard. Det er best å ikke bruke ytterste brønn på hver side
- Sett på strømløkket og sett på kjølevannet

- Start elektroforesen (200V i 1 time og 20 minutter). Dersom det er behov for å stanse elektroforesen et kort øyeblikk, bruk pauseknappen.

Blotting

- Finn frem: blottingmaskinen, kar, kniv, filterpapir, membran og cellofan. Kutt disse i riktig størrelse etter strømstanseren i plast som ligger på bunnen i blottingmaskinen (ca. 6x8 cm)
- Hell blottingbuffer i karet, og fukt filterpapir, membran og cellofan. Nummerer membranene med blyant dersom det brukes flere
- Lag en sandwich etter Hoefer-metoden. Ta ut gelen ved å fjerne glasset. Skjær av stackinggelen og ta gelen ut av metallplaten. Tilsett litt blottingbuffer med en pipette etter hvert lag i sandwichen
- Undersøk at sandwichen ligger riktig, og gå over sandwichen med en ruller for å fjerne eventuelle luftbobler
- Sett på strøm til lokket, og koble blottingmaskinen til strømuttaket (100 mA i 45 minutter). Bruk ca. 1 kg vekt på lokket.
- Ferdige blott farges med Ponceau i 1 minutt. Bruk “bellydanceren” for at fargen skal blandes godt. Skyll deretter med destillert vann

Deteksjon av immunoblott

- Membranen legges i destillert vann noen minutter, og deretter 10 minutter i T-TBS
- Blokk membranene i Blotto i 60 minutter ved romtemperatur og med vipping
- Hell av blokkerløsningen, og tilsett primært antistoff løst i Blotto (5 ml/membran). Dette inkuberes over natt på kjølerom og med vipping
- Dagen etter helles antistoffløsningen av; og dette skal tas vare på i kjøpeskapet
- Membranene vaskes 3 x 10 minutter i Blotto ved romtemperatur og vipping
- Sekundær antistoff løses i Blotto og tilsettes. Dette inkuberes 60 minutter ved romtemperatur og vipping
- Løsningen med sekundær antistoff kastes, og membranene skylles 2 ganger med 1x T-TBS
- Vask deretter med 1x T-TBS 3 x 10 minutter i romtemperatur og vipping

På mørkerom

- Finn frem: 5 ml pipetter, Pipetboy, pinsett, ECL-reagens, liten skål, film, bok til eksponeringen/fremkallingskassett, nøkkel til mørkerom, tusj til merking av film, saks og klokke. Plastfolie og hansker finnes i mørkerommet fra før.
- Løsninger som lages i mørkerommet:
 - ECL-reagens: Tilsett 4 ml fra hver flaske i en liten skål
 - Fremkaller: Blandes med vann i forholdet 50:150
 - Fix: Blandes med vann i forholdet 50:150
 - Stopp: et kar med vann
- Membranene inkuberes i ECL-reagens i 1 minutt. Disse pakkes deretter i plastfolie
- Rødt lys slås på og vanlig lys skrur av
- Film og membran legges sammen i boken til eksponering av film (det runde hjørnet av filmen skal legges slik at det ligger øverst til venstre)
- Husk å pakke inn filmene før lyset slås på
- Eksponeringstid vil variere. Kan begynne med noen få minutter, og jobbe seg oppover dersom det er behov for det
- Legg filmen i fremkalleren i ca. ½ - 1 minutt
- Skyll filmen i vannkaret, og legg det over i fix i ca. 5 minutter. Lyset kan slås på etter et par minutter i fix
- Skyll til slutt filmen i vann i ca. 1 minutt, og heng det til tork
- Husk å merke filmen!