

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 3 • J U L I J 2 0 1 1 • L E T N I K 6 2

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Petra Slanc Može

Uredniški odbor

Janja Marc
Lucija Peterlin Mašič
Alenka Rutar Pariš
Andrijana Tivadar
Jurij Trontelj
Matjaž Tuš

Izdajateljski svet

Mira Abazovič
Mitja Kos
Polonca Fiala
Katja Razinger
Sonja Rupret
Tanja Šegula
Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,
Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01
Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:
02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.400 izvodov

Farmaceutski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 6 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in:
BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS,
PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC
PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

Letnik 2011 sofinancira Javna agencija za knjigo
Republike Slovenije.

UVODNIK

Med lekarniškimi farmacevti je ondan završalo. Zaradi lokalnih interesov je pred razpadom sistem javnih lekarn v kraško-primorski regiji, prav tako pa zasebna lekarnarica ni dobila podaljšanja koncesije za naslednje obdobje. Z vsakim dnem bolj se uresničuje napoved, ki smo jo več let nazaj večkrat javno zapisali: z notranjimi nesoglasji med javnim in zasebnim lekarništvom bomo ustvarili pogoje za lažje zunanje interesne igre, ki vodijo do zmanjševanja osnovne lekarniške dejavnosti, predvsem pa omogočili lokalnim oblastem pridobivanje dobička, ki ni namenjen stroki. V pravilnikih o finančnem poslovanju mnogih javnih zavodov je namreč zapisano, da se bo višek prihodkov nad odhodki vrnil v stroko za večjo dodano vrednost lekarniškega dela, med katerimi je prav gotovo na prvem mestu vložek v znanje in dodatno izobraževanje farmacevtov.

V številki Farmaceutskega vestnika, ki je pred vami, se boste lahko seznanili s člankom o novostih pri zdravljenju raka z imunskimi celicami, dvema prispevki iz področja farmacevtske tehnologije o izdelavi mikrokapsul in proučevanju farmacevtskih materialov in oblik s pomočjo sodobne mikroskopije na atomsko silo. Glede na trenutne razmere je aktualen pregledni članek o glukozaminu za peroralno zdravljenje osteoartroz, na koncu prispevkov pa lahko preberemo o sistemu identifikacije taksonomije z uporabo črtnih kod, kar je nov korak k večji biovarnosti.

Sicer pa vsem kolegicam in kolegom ter bralcem Farmaceutskega vestnika želim lep dopust.

Naberimo si moči za naporene jesenske dni.

Prof.dr. Borut Štrukelj

Urednik

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Ana Herman, Matjaž Jeras

Zdravljenje raka z imunskimi celicami
Cellular immunotherapies of cancer

123

Alenka Zvonar, Mirjana Gašperlin

Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo
Microcapsules for pharmaceutical application: review of microencapsulation methods

131

Biljana Govedarica, Janez Kerč, Stane Srčič

Aplikacija mikroskopije na atomsko silo (AFM) v farmacevtsko tehnoloških raziskavah
Application of Atomic Force Microscopy in pharmaceutical technology studies

139

Marjetka Pal, Matjaž Vogrin, Polonca Ferk

Glukozamin za peroralno zdravljenje osteoartroze
Glucosamine for oral treatment of osteoporosis

147

Živa Fišer Pečnikar, Elena Varljen Bužan

Taksonomska identifikacija s pomočjo sistema črtnih kod DNA kot sodobna podpora biovarnosti
Taxonomic identification using DNA barcoding as a modern support for biosafety

154

36. skupščina SFD

159

Novosti iz sveta farmacije

163

Navodila avtorjem

164

Zdravljenje raka z imunskimi celicami

Cellular immunotherapies of cancer

Ana Herman, Matjaž Jeras

Povzetek: V zadnjem času smo priča velikemu porastu rakavih obolenj. Stopnja umrljivosti je žal še vedno visoka, zato so raziskave usmerjene v razvoj novih pristopov zdravljenja. Veliko obeta imunsko zdravljenje malignih bolezni, ki pa je še vedno v fazi kliničnih preizkušanj. Za zdravljenje raka z imunskimi celicami se uporablja različne vrste celic, vse od limfocitov T, naravnih celic ubijalk, dendritičnih celic, preko imunohibridomov do gensko manipuliranih imunskih celic. Zdravljenje z adoptivnim prenosom celic počasi pridobiva na pomenu, vendar pa bo do njegove vsakdanje uporabe preteklo še nekaj časa, saj bo prej potrebno optimizirati postopek priprave efektorskih celic, odpraviti ali vsaj omiliti neželene stranske učinke ter natančno določiti kriterije za izbiro darovalcev in prejemnikov.

Ključne besede: Rak, celično imunsko zdravljenje

Abstract: A vast increase in malignant diseases is lately being observed. Unfortunately, the death rate still remains on a very high level, resulting in many researches committed to finding new therapeutic approaches. This paper focuses on adoptive cell therapy, a part of immunotherapy cancer treatments that appears to be one of the novel promising strategies. Many different immune cells – lymphocytes T, NK cells, dendritic cells, immunohybridomas and genetically manipulated immune cells, have already been used for that purpose. Adoptive cell therapy is gaining on its importance, but as long as at least the manufacturing process of effector cells is not optimized, the adverse effects are not at least mitigated or even dismissed and the criteria for selection of donors and recipients is not precisely defined, the adoptive cell therapy will not become a common practice in cancer treatment.

Keywords: Cancer, cellular immunotherapy

1 Uvod

Rakave bolezni so eden izmed treh vodilnih vzrokov smrti v razvitem svetu. Onkološko zdravljenje danes temelji na lokoregionalnem zdravljenju, kamor sodita kirurgija in obsevanje, ter sistemskem zdravljenju, ki poleg različnih oblik kemoterapije vključuje tudi zdravljenje z biološkimi zdravili. Kljub nenehnemu razvoju in napredku vseh omenjenih načinov zdravljenja pa z njimi žal ne dosegajo zadovoljivega napredka v času preživetja in kvaliteti življenja bolnikov, zato so prizadevanja številnih raziskovalcev že dolgo časa usmerjena v razvoj novih pristopov zdravljenja.

Največ novosti je prav gotovo na področju imunskega zdravljenja malignih bolezni in eden izmed trenutno najbolj aktualnih pristopov je zdravljenje z imunskimi celicami ali zdravljenje z adoptivnim prenosom celic (ACT – Adoptive Cell Therapy) (1). Med drugim bomo predstavili tudi izsledke nekaterih uspešnih kliničnih testiranj, ki dajejo upanje na vključitev zdravljenja z imunskimi celicami v standardno obliko zdravljenja bolnikov z rakom.

Temelj novih pristopov zdravljenja raka predstavlja paradigma ponovne vzpostavitve ravnovesja imunskega sistema, ki je v bolnikih porušeno. To se med drugim kaže v porastu števila regulatornih imunskih celic, kar omogoča razvoj in vzdrževanje neželene tolerance na tumorske antigene, zaradi česar bolnikov imunski sistem ne zmore obvladati

razrasta novotvorb. Izražena tumorskih antigenov na tumorskih celicah, dokazana imunska odzivnost na večino tumorjev ter različni mehanizmi, s katerimi se tumorske celice uspešno izogibajo nadzoru imunskega sistema, kažejo na to, da je prav normalno delovanje slednjega ključno za uspešno zdravljenje. Zato si številne raziskovalne skupine prizadevajo najti ustrezne načine za njegovo modulacijo v smislu ponovne vzpostavitve polne funkcionalnosti pri preprečevanju rasti oziroma popolni odstranitvi tumorja. Hiter tehnološki napredek danes omogoča osamitev posameznih limfocitnih subpopulacij, pripravo čistih tumorskih antigenov in njihovo natančno opredelitev, učinkovito gojenje izbranih, za točno določene antigene specifičnih klonov celic T ter krepitev imunskega odziva s provnetnimi citokini. S tem pa se krepi potencial in zanimanje za imunsko zdravljenje tumorjev (2).

Trenutne dosežke na področju imunskega zdravljenja človeških trdnih tumorjev razvrščamo v tri glavne kategorije:

- nespecifična imunomodulacija,
 - aktivna imunizacija s tumorskimi cepivi in
 - zdravljenje z adoptivnim prenosom celic (ACT),
- ki so podrobneje predstavljene v preglednici 1 (3).

V nadaljevanju se bomo posvetili predvsem imunskemu zdravljenju z adoptivnim prenosom celic in aktivni imunizaciji s cepivi, pripravljenimi na osnovi dendritičnih celic.

Preglednica 1: Pregled trenutnih imunskih pristopov za zdravljenje raka (3), (4), (5).

Table 1: A list of contemporary anti-cancer immunotherapeutic approaches (3), (4), (5).

PRISTOP	PRIMER UPORABE	STRANSKI UČINKI
NESPECIFIČNA IMUNOMODULACIJA		
Vzpodbujanje vnetja	Klasičen primer je aplikacija živih bakterij BCG (Bacillus Calmette-Guérin) neposredno v tumor. Uporaba: zdravljenje karcinoma mehurja; nadaljni razvoj v smeri genskega inženirstva.	Pneumonitis in/ali hepatitis; ledvična ali razsejana okužba z BCG.
Zdravljenje s citokini	Prva je bila sistemska aplikacija IL-2 z namenom razmnoževanja naravnih celic ubijalk (NK) in celic T <i>in vivo</i> . Zaradi hude toksičnosti so ta pristop opustili. Danes uporabljajo GM-CSF kot dodatek skupaj s tumorskimi cepivi.	Sistemska toksičnost, kot npr. sindrom kapilarnega puščanja pri zdravljenju z IL-2.
Zdravljenje z monoklonskimi protitelesi	Uporaba monoklonskih protiteles (MoAb), namnoženih <i>ex vivo</i> , kot npr.: proti-CD25 (daclizumab) za zdravljenje T-celičnih levkemij; proti-CD20 (rituximab) za zdravljenje B-celičnih limfomov; proti-HER2 (trastuzumab) za zdravljenje raka dojke ter proti-CTLA4 (implimumab) za zdravljenje melanoma in karcinoma ledvic.	Toksičnost za normalna tkiva, npr. kardiotoksičnost (trastuzumab) ali povzročitev nastanka hudih avtoimunskih reakcij (implimumab).
AKTIVNA IMUNIZACIJA		
Protitumorska cepiva	Protitumorska cepiva, ki izražajo/vsebujejo tumorske antigene. Uporabimo lahko celice, proteine, peptide in/ali širok spekter imunizacijskih vektorjev. Primer: virusni vektorji z genskim zapisom za tumorske antigene z ali brez vgrajenega adjuvansa, ki okrepi T-celične ali prirojene imunske odgovore; hibridne celice pripravljene s fuzijo dendritičnih in tumorskih celic; dendritične celice z dodanimi ali vgrajenimi tumorskimi antigeni, ki delujejo kot antigen predstavitvene celice (APC).	Relativno majhno število resnih komplikacij, potencialno lahko pride do pojava avtoimunosti.
ACT – ZDRAVLJENJE Z ADOPTIVNIM PRENOSOM CELIC		
Celično imunsko zdravljenje	Infuzije avtolognih ali alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC) za zdravljenje hematopoetskih malignih bolezni, po predhodni delni ali popolni odstranitvi bolnikovih imunskih celic. Infuzije tumorsko-specifičnih limfocitov za zdravljenje melanoma in drugih trdnih tumorjev po predhodni delni ali popolni odstranitvi bolnikovih imunskih celic. Tumorsko specifične limfocite pripravijo <i>ex vivo</i> iz imunskih celic, ki se nahajajo v tumorju.	Nastanek avtoimunosti zaradi delovanja na druga tkiva; GvHD - bolezen presadka proti gostitelju po presaditvi alogenskih KMC; uveitis in vitiligo pri zdravljenju melanoma.

2 Kratek zgodovinski pregled področja adoptivnega celičnega imunskega zdravljenja rakavih bolezni

Koncept adoptivnega prenosa imunskih celic ter prvi poskusi na živalih segajo v začetek dvajsetega stoletja. Leta 1988 pa je Rosenberg s sodelavci objavil izsledke prvega kliničnega preizkušanja na ljudeh (6). Kot prvi so pri bolnikih z napredovalim rakom ledvic ter melanomom izvedli adoptivni prenos avtolognih imunskih celic, sposobnih specifičnega prepoznavanja in uničevanja tumorskih celic (LAK cells – Lymphokine Activated Killer cells), sočasno z visokimi odmerki IL-2 (7). Le okoli 20 odstotkov bolnikov se je odzvalo na celične infuzije, ki so vsebovale pretežno celice NK, kasnejša preizkušanja pa so dokazala, da lahko podoben protitumorski učinek dosežejo že po sistemski aplikaciji samega IL-2. Ti prvi, sicer precej skromni uspehi, so spodbudili mnoge raziskovalne skupine k nadaljnjemu proučevanju uporabe adoptivnega T-celičnega imunskega zdravljenja. Slika 1 prikazuje časovni potek razvoja adoptivnega prenosa imunskih celic v preteklosti (6).

Trenutno širom sveta potekajo številna klinična preizkušanja s tega področja, s čimer eksponentno narašča tudi število bolnikov, ki so oziroma še bodo zdravljeni s tovrstnimi pripravki (8).

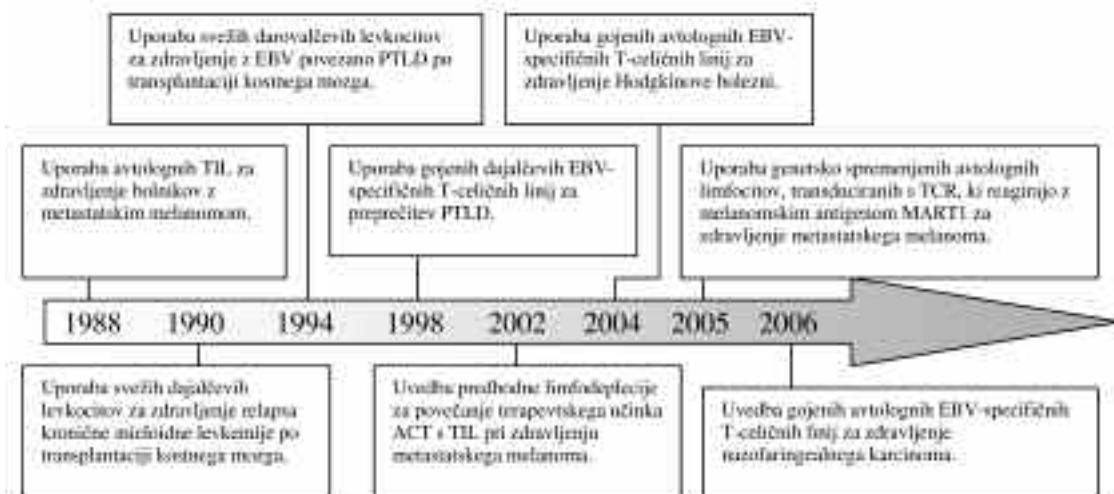
3 Uporaba različnih vrst imunskih celic in njihovih kombinacij za zdravljenje raka

Specifični celično posredovani imunski odziv na tumorske antigene izvaja več različnih vrst efektorskih celic. Mednje sodijo citokine izdelujoče celice T CD4⁺ T_H1 in T_H2 ter citotoksični limfociti T CD8⁺. Poleg

teh svoj delež prispevajo tudi različne nespecifične celice, zlasti makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci in seveda naravne celice ubijalke. Zelo pomembno vlogo igrajo tudi dendritične celice (DC), profesionalne antigen predstavitvene celice, ki so nujne za učinkovito sprožitev protitumorskega T-celičnega odziva (2). Delno uspešen in precej toksičen postopek ACT temelji na uporabi bolnikovih lastnih tumor infiltrirajočih limfocitov (TIL), ki jih lahko izoliramo, namnožimo in aktiviramo ex vivo, v prisotnosti velikih količin človeškega rekombinantnega IL-2. Celice nato vrnemo v bolnika, ki so mu bile predhodno specifično odstranjene imunske celice, hkrati pa mu apliciramo tudi rekombinantni IL-2, ki ob sistemski aplikaciji lahko povzroča neželene učinke. Najboljše rezultate so s tem postopkom dosegli pri zdravljenju melanoma, vendar je njegova uporaba omejena izključno na bolnike z resektabilnimi tumorji, v katerih se nahaja dovolj velika količina TIL (4), (9).

3.1 Limfociti T CD8⁺ in CD4⁺

Celice T CD8⁺ so se pri adoptivnem protitumorskem imunskem odzivu izkazale kot zelo učinkovite. Tarčni antigeni, ki jih s svojimi T-celičnimi receptorji (TCR) specifično prepoznavajo tumorsko reaktivne celice T CD8⁺, so največkrat nemutirani lastni antigeni, ki jih v organizmu poleg normalnih izražajo tudi tumorsko spremenjene celice ter tumor specifični antigeni (TA), ki jih na svoji površini, vezane na molekule MHC razreda I, izražajo rakave celice (10). Dokazali so tudi prisotnost tumorsko specifičnih celic T CD4⁺, vendar te lahko delujejo na več različnih načinov in so zato zmožne bodisi ojačati ali pa izrazito oslabiti protitumorske imunske odzive, kar je odvisno predvsem od mikrookolja v katerem se nahajajo. Adoptivni prenos protitumorskih limfocitov T v bolnike, ki so bili predhodno podvrženi limfodepleciji, predstavlja obetaven nov pristop k imunskemu zdravljenju malignih bolezni in med vsemi predstavljenimi možnostmi imunskega celičnega zdravljenja dosega najboljše rezultate (1), (9), (10).



Slika 1: Časovni prikaz razvoja in izvajanja različnih vrst ACT pri bolnikih z rakom (3).

Opomba: EBV-virus Epstein-Barr, PTLD – postransplantacijska limfoproliferativna bolezen, TCR-T-celični receptor, TIL-tumorje infiltrirajoči limfociti, ACT – zdravljenje z adoptivnim prenosom celic, GvHD – bolezen presadka proti gostitelju.

Figure 1: Time scaled evolution of different types of ACT approaches used in cancer patients (3).

Note: EBV- Epstein-Barr virus, PTLD – posttransplantation lymphoproliferative disease, TCR-T-cell receptor, TIL-tumor infiltrating lymphocytes, ACT – adoptive cell therapy, GvHD – graft versus host disease.

3.1.1 Predhodna odstranitev bolnikovih limfocitov

V preteklosti so bolniki pred adoptivnim prenosom protitumorskih limfocitov prejemali sistemsko imunosupresijo, ki jo je v novejšem času nadomestila specifična odstranitev imunskih celic (limfodeplecija) z uporabo različnih kemoterapevtikov ali obsevanja celotnega telesa. S takšno predpripravo vplivamo na številne mehanizme preko katerih lahko povečamo učinkovitost zdravljenja z ACT. Z limfodeplecijo dosežemo:

- odstranitev imunosupresivnih celic, kot so CD4⁺CD25⁺ regulatorni limfociti T (T_{reg}), mieloidne supresorske celice (MSC) in celo celice NK,
- odstranitev endogenih imunskih celic, ki tekmujejo za aktivirajoče citokine IL-2, IL-7 in IL-15 (limfociti T in B, celice NK) ter
- izboljšanje funkcije ter razpoložljivosti antigen predstavitvenih celic (APC), in sicer kljub temu, da pride do zmanjšanja njihovega celotnega števila, saj se zaradi tega poveča možnost srečanja tumorsko reaktivnih klonov limfocitov T CD8⁺ z antigeni, izraženimi v okviru molekul MHC na površini APC; sproščanje agonistov toll-like receptorjev (TLR), ki je posledica poškodb sluznice po uporabi kemoterapevtikov ali obsevanja, pospešuje dozorevanje DC in s tem izražanje kostimulatornih molekul na njihovih površinah ter izrazito povečanje njihove sposobnosti aktiviranja limfocitov (10).

3.2 Naravne celice ubijalke (celice NK)

Naravne celice ubijalke ali celice NK so pomembno orožje za boj proti raku. V pogojih *in vitro* povsem spontano, brez predhodne imunske senzibilizacije gostitelja, lizirajo določene tumorske celice. Predstavljajo edinstveno podvrsto limfocitov, ki jih razdelimo na dve populaciji. Celice NK CD56^{bright} (močna izraženost) imajo imunoregulatorne lastnosti, ki so posledica obilne proizvodnje citokinov, medtem ko so celice CD56^{dim} (šibka izraženost) izrazito citotoksične.

Celice NK imajo edinstven mehanizem prepoznavanja tumorjev, saj se njihovo citotoksično delovanje sproži ob stiku s tumorskimi celicami, ki ne izražajo posameznih ali celo vseh telesu lastnih molekul MHC razreda I, kar je pogost mehanizem, s katerim se izognejo specifičnemu imunskemu prepoznavanju. Celice NK izražajo receptorje KIR (inhibitory Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) in receptorski kompleks CD94-NKG2A, s pomočjo katerih prepoznavajo različne skupine molekul HLA-A, HLA-B, HLA-C in HLA-E (molekule MHC razreda I). Posamezniki se med seboj razlikujemo glede na število in vrsto podedovanih genov KIR. Večina celic NK izraža najmanj en inhibitorni KIR, ki je specifičen za lastne antigene HLA razreda I. V primeru, da pride celica NK v stik s tarčno celico, ki na svoji površini nima tega antigena, jo lizira, saj ni ustrezno inhibirana (KIR-ligand neujemanje).

S številnimi preizkušnji na mišjih eksperimentalnih modelih so dokazali ključno vlogo celic NK pri uničevanju vsajenih tumorskih celičnih linij ter spontano nastalih tumorjev. Ugotovili so, da so celice NK najučinkovitejše pri uničevanju metastazirajočih celic in majhnih tumorskih mas, medtem ko večjih niso mogle izkoreniniti (6).

3.2.1 Različni pristopi pri zdravljenju raka s celicami NK

Povečanje odziva celic NK na tumor lahko dosežemo z določenimi citokini, ki jih neposredno ali posredno aktivirajo. Aktivnost naravnih celic ubijalk lahko izboljšajo tudi imunomodulatorni zdravili talidomid in lenalidomid, BCG ter imunostimulatorni kompleksi DNA.

Po alogenski presaditvi kostnega mozga pride pri bolnikih do izboljšanja tako zaradi same kemoterapije oziroma obsevanja celotnega telesa (kondicioniranje) pred transplantacijo krvotvornih matičnih celic (KMC) kot tudi zaradi vzpostavitve funkcionalnega darovalčevega imunskega sistema po njej, ki je sposoben sprožiti reakcijo presadka proti tumorju (GvT – Graft versus Tumor effect) in tako uničiti bolnikove zaostale tumorske celice. Pri tem igrajo pomembno vlogo tudi celice NK, saj v primeru, da prejemnik nima vsaj enega izmed ligandov HLA razreda I, ki bi ustrezal darovalčevim KIR, lahko po presaditvi KMC pride do aloreaktivnega NK-celičnega odziva (6).

Zanimiva so novejša klinična preizkušanja adoptivnega prenosa celične linije NK-92. Ta izraža različne vrste NK-celičnih aktivirajočih receptorjev, ne pa tudi inhibitornih KIR in je izrazito citotoksična za veliko število drugih celičnih linij. Obsevane celice NK-92 so infundirali več kot 20 bolnikom z napredovalim ledvičnim karcinomom in malignim melanomom. Izkazale so se kot varne, pri nekaterih bolnikih so opazili protitumorski učinek. Prednost uporabe celične linije je v tem, da lahko celice pripravljajo v standardiziranih in nadzorovanih pogojih dobre proizvodne prakse (GMP), poleg tega jih lahko tudi gensko spreminjajo, kar odpira številne zanimive možnosti za nadaljnja klinična preizkušanja (6).

3.3 Dendritične celice

Dendritične celice so diferencirane potomke krvotvornih matičnih celic, ki najučinkoviteje med vsemi antigen predstavitvenimi celicami imunskega sistema aktivirajo celice T pomagalke CD4⁺ in citotoksične limfocite T CD8⁺. Poleg tega so sposobne aktivirati tudi celice NK in NKT ter limfocite B. Zaradi izjemne sposobnosti uravnavanja vseh elementov imunskega odziva so primerna tarča in orodje za cepljenje (11), (12).

Njihovo delovanje povezuje mehanizme tako naravne odpornosti kot tudi specializiranih procesov imunskega odziva. Dendritične celice izzovejo nastanek specifičnega imunskega odziva, določajo njegove lastnosti, trajanje in obseg ter sodelujejo pri vzpostavitvi tolerance na telesu lastne antigene. Zaradi vseh izjemnih lastnosti so jih kmalu začeli uporabljati v namen zdravljenja in danes predstavljajo pomemben del dopolnilnega zdravljenja raka. Kot celična cepiva posredno sodelujejo pri odstranjevanju neoplastičnih celic, ki na svojih površinah izražajo specifične tumorske antigene (TA). Dendritične celice privzamejo TA, jih predelajo v peptide, ki se vežejo na molekule HLA razredov I in II in jih tako, ob zagotavljanju močnih kostimulacijskih signalov, ponujajo v prepoznavo nezrelim/neaktiviranim limfocitom T. So daleč najučinkovitejše APC pri aktivaciji primarnega protitumorskega imunskega odziva. Raziskovalci zato verjamejo, da lahko DC, ki jih ustrezno pripravimo *in vitro*, prekinejo toleranco limfocitov T na tumorske celice *in vivo*. Večje količine DC lahko v definiranih pogojih *in vitro* pripravimo iz monocitov, osamljenih iz periferne krvi (5), (13), (14), (15).

Čeprav so DC, pripravljene *ex vivo* tako, da so izražale TA, doslej uporabili v številnih kliničnih preizkušanjih za zdravljenje rakavih obolenj, so bili rezultati slabši od pričakovanih. Vsekakor je dokazano, da cepiva z DC delujejo, vendar bo potrebno bolje definirati številne imunološke in klinične parametre, s katerimi bi lahko povečali učinkovitosti takšnega cepljenja. Zato so v zadnjem času številne raziskave ponovno usmerili v proučevanje delovanja DC *in vitro*, da bi določili najboljši način priprave imunostimulacijskih DC in uporabili najustreznejši vir tumorskih antigenov (11), (13).

Poleg uporabe DC obstajajo še drugi pristopi za cepljenje bolnikov z rakom. Mednje sodijo: uporaba avtolognih in alogenskih tumorskih celic, ki jih lahko gensko spremenijo tako, da proizvajajo različne proznetne citokine, tumorskih proteinov, peptidov in DNA cepiv. Večinoma lahko z njimi izzovejo tumorsko specifične imunske odzive in delno regresijo tumorjev. Vsi omenjeni pristopi temeljijo na naključnem srečanju vira TA, ki ga vnesemo v bolnika v obliki cepiv in gostiteljevih DC. Žal je verjetnost takšnega srečanja razmeroma majhna. Poleg tega obstaja tudi možnost, da cepljenje naleti na nezrele oziroma neaktivirane DC, kar lahko, zaradi odsotnosti kostimulacijskih signalov, vodi v dodatno zaviranje protitumorskega imunskega odziva. S tem lahko delno pojasnimo slabosti takšnih protitumorskih cepiv (11).

Kljub zgoraj naštetim pomanjkljivostim cepiv z dendritičnimi celicami nas opogumlja dejstvo, da je bilo pred kratkim v ZDA registrirano prvo avtologno celično zdravilo Provenge (sipuleucel-T), namenjeno zdravljenju raka prostate, narejeno prav na osnovi dendritičnih celic.

3.3.1 Klinična učinkovitost DC cepiv

Ključno vprašanje je, ali so cepiva, pripravljena z DC učinkovitejša od drugih. Odgovor nanj lahko iščemo v izsledkih številnih kliničnih preizkušanj faze I in II, v okviru katerih so proučevali delovanje različnih vrst cepiv: peptidov iz TA, samih tumorskih celic, TA izraženih s pomočjo virusnih vektorjev ter DC, ki so predstavljale TA, uporabljene na bolnikih z različnimi vrstami metastatskega raka. Pri tem lahko kaj hitro ugotovimo, da je zaradi zelo različne dovzetnosti posameznih vrst raka za imunsko zdravljenje smiselno primerjati izsledke le pri eni vrsti bolezni. V tem članku predstavljamo povzetek izidov kliničnih preizkušanj na bolnikih z metastatskim melanomom, ker ta bolezen predstavlja dober model za cepljenje, saj so mnogi melanomski antigeni dobro okarakterizirani. Cepljenje z DC z melanomskimi antigeni je v 9,5% pripeljalo do tumorske regresije (v šestih različnih preizkušanjih se je na to zdravljenje odzvalo 11 od 116 bolnikov), medtem ko najboljši rezultat z ostalimi vrstami cepljenj daje cepljenje s tumorskimi celicami, to je 4,6% (2 izmed 43 bolnikov). Temu sledijo še peptidna cepiva z 2,7% uspešnostjo (11 izmed 410 bolnikov), na zadnjem mestu pa so virusni vektorji z 1,9% uspešnostjo (3 izmed 160 bolnikov). Ti rezultati še vedno dajejo le približno oceno objektivne regresije tumorjev, vendar vseeno vzbujajo določeno upanje in opravičujejo nadaljnja preizkušanja s cepivi na osnovi DC (11), (16). Ker so rakava obolenja kronične bolezni, bi lahko že podaljšanje preživetja in izboljšanje kvalitete življenja lahko obravnavali kot merili za uspešnost zdravljenja, s čimer bi še bolj promovirali uporabo in razvoj novih pristopov zdravljenja (11). Prednost imunskega zdravljenja s cepivi, pripravljenimi na osnovi dendritičnih celic, ki jo je potrebno omeniti, je vsekakor varnost takšnega zdravljenja, saj gre za zdravljenje z bolniku lastnimi celicami.

3.3.2 Imunohibridomi

Imunohibridom je celica, ki jo dobimo po zlitju (fuziji) dendritične in tumorske celice. Gre za idealno kombinacijo celotnega nabora TA in lastnosti najučinkovitejših APC. Največja prednost uporabe imunohibridomov kot cepiv je dejstvo, da imunskim celicam bolnika predstavijo celoten nabor TA, torej tudi tistih, ki jih še ne poznamo, in jih učinkovito aktivirajo (17), (18), (19). Poleg tega lahko tovrstna cepiva pripravimo tudi tako, da v primeru pomanjkanja zadostnih količin avtolognih tumorskih celic za fuzijo uporabimo kar določene komercialno dostopne tumorske celične linije (18).

V eksperimentalnih živalskih modelih so dokazali, da cepljenje z imunohibridomi deluje zaščitno proti nastanku določenih vrst tumorjev, poleg tega pa tudi terapevtsko, saj so na ta način dosegli regresijo že prisotnih novotvorb. V kliničnih preizkušanjih na bolnikih z različnimi metastatskimi oblikami raka so ugotovili, da bolniki tako zdravljenje dobro prenašajo. Dokazali so tudi, da cepljenje z imunohibridomi omogoča ne le zaščito pred razrastom tumorskih celic, temveč tudi zmanjšuje obstoječe tumorje. V nekaterih kliničnih preizkušanjih so po aplikaciji cepiva pri večini bolnikov potrdili tumorsko specifične imunske odzive, a žal le pri manjšem številu tudi objektivno tumorsko regresijo (17), (18). Kljub temu mnogi avtorji s svojimi raziskavami *in vitro* prikazujejo bistveno močnejšo aktivacijo limfocitov T s strani *hibridomov* kot s strani različnih kombinacij dendritičnih in tumorskih celic oziroma tumorskih antigenov, zaradi česar je prihodnost zdravljenja s hibridomi verjetno še obetavnejša od zdravljenja s cepivi, pripravljenimi na osnovi dendritičnih celic (20), (21).

3.4 Možne izboljšave že uveljavljenih postopkov ACT in aktivne imunizacije s tumorskimi cepivi

V predkliničnih in kliničnih preizkušanjih so po aplikaciji ACT uspeli razjasniti številne kompleksne mehanizme, ki so ključni za uspešnost zdravljenja z adoptivnim prenosom imunskih celic in ki predstavljajo osnovo za razvoj novih, izboljšanih kliničnih protokolov za zdravljenje rakavih bolnikov.

Eden od pristopov za izboljšanje učinkovitosti ACT je uporaba selektivnejših načinov limfodeplecije, ki so bistveno manj toksični za bolnika kot nespecifična kemoterapija in obsevanje. Celice T_{REG} in ostale imunosupresivne celice, ki aktivno ščitijo tumorsko tkivo pred delovanjem imunskega sistema bolnika, bi bilo mogoče selektivno odstraniti s pomočjo usmerjenih imunotoksinov ali pa njihovo delovanje preprečiti z uporabo določenih citokinov, na primer tumorje nekrotizirajočega dejavnika (TNF). Pomanjkanje določenih topnih dejavnikov, do katerega pride zaradi prisotnosti drugih celic, ki jih porabljajo, bi lahko rešili z dodajanjem aktivirajočih (proznetnih) rekombinantnih citokinov.

Zgodnejše diferencijske stopnje celic T so primernejše za uporabo v ACT. Zato bodo v prihodnosti za doseganje optimalnih kliničnih rezultatov najverjetneje morali natančno definirati kriterije za izbiro efektorskih celic. Mednje nedvomno sodijo fenotip, dolžina telomer, sposobnost proizvodnje želenih citokinov in afiniteta TCR do izbranih tumorskih antigenov (10).

Za večjo uspešnost zdravljenja z adoptivnim prenosom celic NK bo potrebna optimizacija priprave celic NK za uporabo v zdravljenju (aktivacija, gojenje *ex vivo*, izbor specifičnih celičnih podvrst), veliko pozornost bo treba nameniti tudi izboru darovalcev (fenotipizacija in genotipizacija KIR ter delež aloreaktivnih celic NK) (6).

Pri zdravljenju z DC cepivi bo z namenom izboljšanja učinkovitosti potrebno opredeliti naslednje kriterije: različni načini priprave DC (iz monocitov ali iz krvotvornih matičnih celic CD34⁺); zrelost in migracija DC (nezrele DC praviloma delujejo kot zelo učinkovite antigene zajemajoče in predelujoče celice, medtem ko so zrele DC najučinkovitejše antigen predstavitvene celice) (15). Stopnja zrelosti DC *in vivo* je tesno povezana s sposobnostjo njihove migracije iz perifernih

tkiv v bezgavke. Zaradi tega moramo posebno pozornost posvetiti tudi načinu in mestu njihove aplikacije (11).

Med najpomembnejše dejavnike lahko vsekakor štejemo določitev kriterijev za izbiro bolnikov ter vrst tumorjev, dovzetnih za omenjeno zdravljenje, saj je znano, da so določene vrste raka, na primer melanom in rak prostate, bolj imunogene in zato bolj dovzetne za celično zdravljenje. Prav tako ostaja odprto tudi vprašanje optimalnega števila in časovnih intervalov aplikacij takšnega zdravljenja ter izbere najboljših kombinacij z drugimi načini zdravljenja (6), (11), (18).

3.5 Novi pristopi na področju imunskega zdravljenja raka

Kot smo omenili, lahko ACT izvajamo s pomočjo TIL z visoko afiniteto do avtolognih TA, pri čemer je ta možnost primerna le za razmeroma majhno število bolnikov z rakom, pri katerih lahko TIL osamimo v zadostnih količinah. Zato razvijajo postopke za pripravo takšnih limfocitov T *in vitro*, ki bi reagirali na široko paleto znanih in neznanih TA, izraženih na različnih vrstah tumorjev. Z vnosom različnih vrst genov v cirkulirajoče človeške limfocite, lahko te opremimo z različnimi receptorji tako za prepoznavo TA kot tudi z drugimi molekulami, ki lahko izboljšajo predvsem njihove aktivacijske in efektorske lastnosti, nujne za uspešno ACT. Tako lahko iz redkih celičnih klonov, ki izjemno učinkovito prepoznavajo TA, osamimo njihove T-celične receptorje TCR in jih z uporabo vektorjev vnesemo v nezrele/neaktivirane limfocite T. Takšne TCR lahko pridobimo tudi iz celic T transgenih miši, potem ko jih imuniziramo s človeškimi TA, s čimer se elegantno izognemo nastanku tolerance, ki pogosto močno zavira razmnoževanje učinkovitih protitumorskih limfocitov T pri bolnikih z rakom. Tako so na primer uspeli pripraviti limfocite s transficiranimi TCR z visoko afiniteto do epitopov p53, CEA (Carcino-Embryonic Antigen), NY-ESO-1 (antigen raka testisov), ki so izraženi na različnih vrstah rakavih celic, ter specifičnih melanomskih antigenov gp100 in MART1. Nekatere izmed njih, na primer limfocite T, transficirane z geni za visokoafinitetne TCR za gp100 in MART1, so že preizkusili v kliničnih preizkušanjih (3), (4).

Med novejšje pristope za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja s celicami NK poleg uporabe specifičnih citokinov, ki pospešujejo proizvodnjo endogenih citokinov v omenjenih celicah, sodi tudi genska manipulacija. Z njo želijo doseči obsežnejše izražanje ligandov za aktivacijske receptorje celic NK na tarčnih celicah oziroma povečati učinkovitost njihovega prepoznavanja s strani naravnih celic ubijalk, kar je nujen pogoj za njihovo uničenje (6), (22). Poleg specifičnih protiteles, s katerimi lahko blokirajo KIR, so v ta namen uporabili tudi majhno interferenčno RNA (si-RNA - Small Interfering RNA). Poskušajo tudi s povečevanjem obsega izražanja aktivirajočih receptorjev na celicah NK ali z uvedbo novih himernih receptorjev, ki so sposobni prepoznavati določene ligande, izražene le na tumorjih (6).

Pri cepivih, izdelanih na osnovi DC, skušajo njihovo učinkovitost povečati tako, da uporabijo čimvečjo paleto naravnih TA, ki jih DC nato predelajo v peptide in jih, vezane na molekule MHC razredov I in II, ponujajo v prepoznavo TCR, izraženim na limfocitih T. Tako lahko izzovejo nastanek raznolikega imunskega odziva, ki ga izvaja večje število klonov celic. V ta namen lahko uporabijo rekombinantne, za tumorje značilne proteine, tumorske eksosome, transdukcijo DC z virusnimi vektorji, ki vsebujejo kodirajoče genske informacije o TA, transfekcijo DC s tumorsko RNA ali

ustrezno pripravljeno plazmidno DNA, inkubacijo DC z imunskimi kompleksi ali s specifičnimi protitelesi, ki prepoznavajo določene površinske molekule DC (11), (23).

K novim odkritjem na tem področju pomembno prispevajo tudi slovenski avtorji, ki z rezultati svojih raziskav na živalskih modelih dokazujejo uspešnost imunskega zdravljenja raka (24), (25). Kot primer lahko navedemo zanimiv pristop zdravljenja s kombiniranim cepivom, sestavljenim iz obsevanih tumorskih celic in oligonukleotidov s CpG motivom (CpG ODN) razreda C, ki statistično značilno poveča preživetje pri testirani skupini miši (25).

4 Imunsko zdravljenje raka in avtoimunost

Pri katerikoli obliki imunskega zdravljenja raka se moramo zavedati, da je za sprožitev in vzdrževanje učinkovite protitumorske imunosti potrebno izzvati praktično enake odzive, kot jih opazimo pri avtoimunosti, saj gre tudi v tem primeru za reaktivnost na rahlo modificirane (mutirane) lastne antigene. To pomeni, da imunski sistem bolnika z rakom pri tovrstnem zdravljenju neizogibno spravimo iz ravnotežja, saj pomembno vplivamo na bistvene mehanizme, ki vzdržujejo toleranco do lastnega in skrbijo za učinkovito obrambo pred mikroorganizmi (4). Praviloma TA niso izraženi le na rakavo spremenjenih celicah, temveč tudi na določenih normalnih tkivih. Pri imunskem zdravljenju melanoma z aktivnim cepljenjem proti TA ali z ACT s TIL pogosto opazijo nastanek vitiliga in/ali celo reakcije, zelo podobne avtoimunskemu uveitisu. Vitiligo sicer lahko v takih primerih jemljemo kot povsem sprejemljiv stranski učinek, česar pa ne moremo trditi za uveitis. Na žalost se bodo morali bolniki in zdravniki odločiti med relativno manjšim ali večjim zlom, torej med poslabšanjem ali celo izgubo vida in smrtjo zaradi raka (4).

5 Pregled novejših kliničnih preizkušanj

V preglednici 2 smo strnili trenutno dosegljive podatke o novejših kliničnih preizkušanjih, z namenom, da bi poudarili pomen imunskega zdravljenja raka, ki je glede na navedena dejstva nedvomno avtoimunska bolezen, do katere lahko pride zaradi najrazličnejših endogenih in eksogenih vzrokov.

6 Prihodnost celičnega zdravljenja v onkologiji

Poleg optimizacije postopkov izdelave zdravilnih celičnih pripravkov sta pomembni vprašanja kdaj in v kolikšnem obsegu bo v prihodnosti ta oblika zdravljenja uvrščena med stroške zdravstvene blagajne, še posebej zato, ker gre za obliko zdravljenja, namenjenega vsakemu bolniku posebej in terja zahtevno in visoko specializirano interdisciplinarno znanje. Ker so celična zdravila narejena praktično po meri, je takšne pripravke težko komercializirati. Farmacevtska in biotehnoška podjetja namreč že od nekdaj iščejo takšna zdravila, ki jih je mogoče proizvajati, pakirati, uporabljati in nadzirati serijsko. Najprimernejše ustanove, ki imajo na razpolago ustrezno opremo in znanje za proizvodnjo protitumorskih imunskih celic so nedvomno krvne banke, v katerih med drugim pripravljajo tudi krvotvorne matične celice za rutinsko klinično uporabo (3).

Preglednica 2: Primeri kliničnih preizkušanj s področja celičnega zdravljenja, ki trenutno potekajo oziroma so bili zaključeni pred nedavnim (8).

Table 2: Some examples of current and recent clinical studies based on anti-tumor immunotherapies (8).

NASLOV KLINIČNEGA PREIZKUŠANJA	FAZA	TRAJANJE	OZNAKA (ClinicalTrials.gov)
Imunsko zdravljenje z intratumorskim injiciranjem nezrelih DC, skupaj s pripravkom iz S. Pyogenes (OK-432), pri bolnikih z resektabilnim rakom pankreasa	I/II	2003 - 2012	NCT00795977
Imunsko zdravljenje z DC, predhodno inkubiranimi s tumorskim lizatom pri bolnikih z atipičnimi in malignimi, primarnimi ali metastatskimi tumorji centralnega živčnega sistema	II	2001 - 2008	NCT00576537
Limfodeplecija in adoptivni T-celični prenos z ali brez imunizacije z DC, v kombinaciji z visokimi odmerki IL-2, pri bolnikih z metastatskim melanomom	II	2006 - 2010	NCT00338377
Cepljenje bolnikov z limfomom z imunohibidomi (dendritične celice /celice limfoma), v primerjavi z DC, inkubiranimi s tumorskimi lizati	I/II	2003 - 2010	NCT00937183
Cepljenje bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom z DC, predhodno inkubiranimi s tumorskimi lizati, po zdravljenju z visokimi odmerki kemoterapevtikov	III	2000 - 2005	NCT00006434
Randomizirano klinično preizkušanje z uporabo DC, pripravljenih iz celic CD34+ ali z DC, pripravljenih iz perifernih monocitov, inkubiranih z melanomskima antigenoma MART-1 in gp100, pri bolnikih z metastatskim melanomom v III. fazi, v primerjavi z bolniki s kirurško popolnoma odstranjenim metastatskim melanomom	II	- 2007	NCT00019890
Modulacija imunskega sistema z definiranimi citokinskimi mešanici pred uporabo cepiv, pripravljenih na osnovi DC (imunohibidomi in DC po predhodni inkubaciji z apoptotičnimi tumorskimi celicami) pri bolnikih s trdnimi tumorji	II	2006 - 2009	NCT00521287
Zdravljenje z adoptivnim prenosom celic pri bolnikih z akutno mieloblastno levkemijo z visokim tveganjem, z uporabo haploidentičnih celic NK, ob načrtnem upoštevanju neujemanj v ligandih KIR med prejemniki in darovalci naravnih celic ubijalk	I	2005 - 2009	NCT00799799
Zdravljenje bolnikov z napredovalim rakom s celicami po presaditvi KMC istega alogenskega darovalca	I/II	2009 - 2012	NCT00823524
Zdravljenje bolnikov po resekciji jetrnega raka s celicami ubijalkami, predhodno induciranimi s citokini (CIK - Cytokine-Induced Killer Cells)	III	2008 - 2013	NCT00769106
Zdravljenje bolnikov s ponovnim izbruhom (relapsom) limfoma, pozitivnega na virus Epstein-Barr, s citotoksičnimi celicami T (CD8+)	I	2006 - 2025	NCT00675571
Zdravljenje bolnikov z relapsom Hodgkinovega limfoma, povezanega z virusom Epstein-Barr, ne-Hodgkinovim limfomom ali z limfoproliferativnimi motnjami, z limfociti T in monoklonskimi protitelesi proti molekulam CD45	I	2006 - 2013	NCT00608478
Zdravljenje bolnikov z relapsom ali refraktarnimi hematološkimi malignimi obolenji ter bolnikov s trdnimi tumorji, po predhodni presaditvi KMC, z infuzijami obsevanih limfocitov istega darovalca	II	2000 -	NCT00161187
Provenge (TM) za zdravljenje hormonsko občutljivega raka prostate (PROTECT)	III	2001 - 2006	NCT00779402

Preglednica 2: Primeri kliničnih preizkušanj s področja celičnega zdravljenja, ki trenutno potekajo oziroma so bili zaključeni pred nedavnim (8).

Table 2: Some examples of current and recent clinical studies based on anti-tumor immunotherapies (8).

NASLOV KLINIČNEGA PREIZKUŠANJA	FAZA	TRAJANJE	OZNAKA (ClinicalTrials.gov)
Provenge® (Sipuleucel-T) celično imunsko zdravljenje metastaznega raka prostate, ki se ne odziva na hormonsko zdravljenje	III	2000 - 2009	NCT00065442
Zdravljenje mieloidne levkemije in mielodisplastičnega sindroma z adoptivnim prenosom avtolognih celic ubijalk, predhodno induciranih s citokini	II	2006 -	NCT00394381
Zdravljenje refraktarne ali ponovljene akutne mieločne levkemije (AML) s kemoterapijo, obsevanjem celotnega telesa, infuzijo dajalčevih celic ubijalk, aldesleukinom in presaditvijo matičnih celic iz popkovnične krvi	II	2009 - 2015	NCT00871689
Zdravljenje bolnikov z metastaznim melanomom z laboratorijsko obdelanimi celicami T z ali brez dodatka ipilimumaba	II	2009 - 2012	NCT00871481
Haploidentične celice ubijalke za zdravljenje refraktarne ali ponovljene akutne mieločne levkemije (AML)	II	2010 - 2014	NCT01106950
Haploidentična presaditev z zgodnjim adoptivnim prenosom celic ubijalk CD56+CD3-	II	2001 - 2011	NCT01220544
Zdravljenje razsejanega raka s proti-VEGFR2 gensko obdelanimi CD8+ limfociti T	II	2010 - 2016	NCT01218867

7 Sklep

Celično imunsko zdravljenje počasi, a vztrajno pridobiva na pomenu in obeta učinkovito in naravno zdravljenje številnih bolezni. Vendar pa nas od njegove vsakdanje klinične uporabe loči še kar nekaj časa, ki ga bo potrebno izkoristiti za odpravo določenih pomanjkljivosti, zlasti neželenih stranskih učinkov, optimizacijo postopkov priprave, načinov in pogostnosti aplikacij ter spremljanja učinkovitosti in varnosti protitumorskih zdravil, izdelanih iz različnih vrst imunskih celic *ex vivo*.

8 Literatura

- Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003 Sep; 3(9): 666-675.
- Vozelj M. Temelji imunologije. 1. izd., 1. natis. ed. Ljubljana: DZS; 2000: 513.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2008 Apr; 8(4): 299-308.
- Caspi RR. Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nat. Rev. Immunol* 2008 Dec; 8(12): 970-976.
- Obermajer N. Priprava protitumorskih cepiv na osnovi dendritičnih celic. *Farm Vest* 2011 Apr; 62(1): 9-14.
- Ljunggren H, Malmberg K. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol* 2007 May; 7(5): 329-339.
- Rosenberg S, Lotze M, Muul L, Leitman S, Chang A, Ettinghausen S, Matory Y, Skibber J, Shiloni E, Vetto J, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 Dec; 313(23): 1485-1492.
- ClinicalTrials.gov. <http://www.clinicaltrials.gov/>. Dostop: 27-04-2011.
- Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol* 2009 Apr; 21(2): 233-240.
- Gattinoni L, Powell DJ, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol* 2006 May; 6(5): 383-393.
- Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol* 2005 Apr; 5(4): 296-306.
- Tacken PJ, de Vries IJM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nat. Rev. Immunol* 2007 Oct; 7(10): 790-802.

- Bergant M. Dendritične celice transficirane s celokupno tumorsko RNA - učinkoviti aktivatorji specifičnih protitumorskih imunskih odzivov *in vitro*. Doktorska disertacija. Ljubljana; 2006: 3-4.
- Štrukelj B. Celično in tkivno inženirstvo. In: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1st ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 633.
- Jeras M, Bergant M, Repnik U. *In vitro* preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of *in vivo* immune responses. *Transpl. Immunol* 2005 Aug; 14(3-4): 231-244.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med* 2004 Sep; 10(9): 909-915.
- Shu S, Zheng R, Lee WT, Cohen PA. Immunogenicity of dendritic-tumor fusion hybrids and their utility in cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Immunol* 2007; 27(5): 463-483.
- Koido S, Hara E, Homma S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic cells and tumor cells [Internet]. 2008; Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/1750743X.1.1.49> Dostop: 20-3-2010.
- Gabrijel M, Repnik U, Kreft M, Grlic S, Jeras M, Zorec R. Quantification of cell hybridoma yields with confocal microscopy and flow cytometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 Feb; 314(3): 717-723.
- Kim T-B, Park HK, Chang JH, Choi IH, Kim KH, Yoon SJ, Lee MS, Jung H, Kim C-S. The establishment of dendritic cell-tumor fusion vaccines for hormone refractory prostate cancer cell. *Korean J Urol* 2010 Feb; 51(2): 139-144.
- Gabrijel M, Bergant M, Kreft M, Jeras M, Zorec R. Fused late endocytic compartments and immunostimulatory capacity of dendritic-tumor cell hybridomas. *J. Membr. Biol* 2009 May; 229(1): 11-18.
- Zhang T, Barber A, Sentman CL. Generation of Antitumor Responses by Genetic Modification of Primary Human T Cells with a Chimeric NKG2D Receptor. *Cancer Res* 2006 Jun; 66(11): 5927-5933.
- Bergant M, Meden L, Repnik U, Sojar V, Stanisavljević D, Jeras M. Preparation of native and amplified tumour RNA for dendritic cell transfection and generation of *in vitro* anti-tumour CTL responses. *Immunobiology* 2006; 211(3): 179-189.
- Stegel V, Kopitar A, Jezersek Novaković B, Ihan A, Novaković S. Dendritic cells incubated with irradiated tumor cells effectively stimulate T lymphocyte activation and induce enhanced expression of CD69, CD25 as well as production of IFN γ and IL4. *Int. Immunopharmacol* 2006 Jan; 6(1): 79-89.
- Novaković S, Stegel V, Kopitar A, Ihan A, Novaković BJ. Preventive and therapeutic antitumor effect of tumor vaccine composed of CpG ODN class C and irradiated tumor cells is triggered through the APCs and activation of CTLs. *Vaccine* 2007 Nov; 25(49): 8241-8256.

Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo

Microcapsules for pharmaceutical application: review of microencapsulation methods

Alenka Zvonar, Mirjana Gašperlin

Povzetek: Splošno gledano je mikrokapsuliranje proces, s katerim zelo drobne kapljice ali trdne delce obdamo s kontinuiranim filmom iz ustreznega materiala z namenom zaščite kapsuliranega jedra ali spremembe njegovih lastnosti. Na področju farmacije, kjer smo v zadnjih letih pričali zelo hitremu razvoju omenjene tehnologije, se mikrokapsuliranja poslužujemo zlasti s ciljem zaščititi vgrajeno učinkovino pred vplivi iz okolja in zagotoviti nadzorovano sproščanje vgrajene učinkovine. Razen tega izkoriščamo izdelavo mikrokapsul tudi za spremembo agregatnega stanja snovi ter za izboljšanje dispergiranja zdravilnih učinkovin, ki so slabo vodotopne. Zaradi velikega nabora in raznolikosti razpoložljivih metod mikrokapsuliranja, smo v tem prispevku predstavili splošne značilnosti omenjenega procesa, ter podrobneje opisali nekaj najpogostejših metod mikrokapsuliranja. Le-te niso univerzalno uporabne za vgradnjo različnih učinkovin, saj je pri izbiri ustrezne metode potrebno upoštevati tako osnovni namen kapsuliranja kot tudi lastnosti kapsulirane snovi. Posledično moramo prilagoditi tudi izbiro ogrodnega materiala in procesne pogoje ter upoštevati tako željeno velikost in morfološke lastnosti mikrokapsul kot tudi učinkovitost vgradnje in mehanizem sproščanja vgrajene učinkovine.

Ključne besede: mikrokapsuliranje, metode izdelave, mikrosfere, mikrokapsule.

Abstract: Microencapsulation is a process in which tiny droplets or solid particles are surrounded with a continuous layer of appropriate material in order to protect the encapsulated core or modify its properties. In recent years rapid development of microencapsulation technology can be observed also in the field of pharmaceutical technology. Microencapsulation enables protection of incorporated drug, controlled drug release, transformation of the aggregate state of material, and enhanced water dispersibility of hydrophobic drugs. Due to high diversity of methods, this paper proposes a classification and description of the main microencapsulation technologies. When deciding for microencapsulation technique one should consider that available methods can not be used universally, therefore the goal and the characteristics of encapsulate should be considered carefully. Afterwards suitable matrix material and process conditions can be selected in relation to the desired size and morphology of microcapsules as well as encapsulation efficiency and drug release mechanism.

Key words: microencapsulation, preparation methods, microspheres, microcapsules.

1 Uvod

Mikrokapsuliranje so razvili s posnemanjem procesov v naravi. Narava z ovojnico zaščiti obdani material pred vplivi okolja; najenostavnejši primer na makroskopskem nivoju predstavljata ptičje jajce in seme, na mikro-oz. nanometriškem pa celica s svojo vsebino. (1)

Razvoj postopka mikrokapsuliranja se je začel v tridesetih letih prejšnjega stoletja. Sprva so ga uporabljali v papirni industriji za pripravo brezsjajnega kopirnega papirja. Danes se omenjena tehnologija široko uporablja tudi na drugih področjih, kot so prehrabena industrija, kozmetologija, biotehnologija, medicina in farmacija. Na področju farmacije mikrokapsuliranje izrazito pridobiva na pomenu, saj omogoča zaščito vgrajene učinkovine pred vplivi okolja in njeno nadzorovano sproščanje, prekrivanje neprijetnega okusa in vonja zdravilne učinkovine, spremembo agregatnega stanja (iz tekočega v trdno), ločitev reaktivnih sestavin zmesi, izboljšanje dispergiranja v vodnem mediju netopnih zdravilnih učinkovin in pripravo bioadhezivnih oblik. Med prednostmi

mikrokapsuliranja omenjajo tudi izboljšanje biološke uporabnosti peptidov in proteinov ter ciljano terapijo. Moramo pa se zavedati, da je z ekonomskega vidika to draga tehnologija, zato je njeno uporabo potrebno tehtno utemeljiti. (2, 3, 4)

2 Mikrokapsule

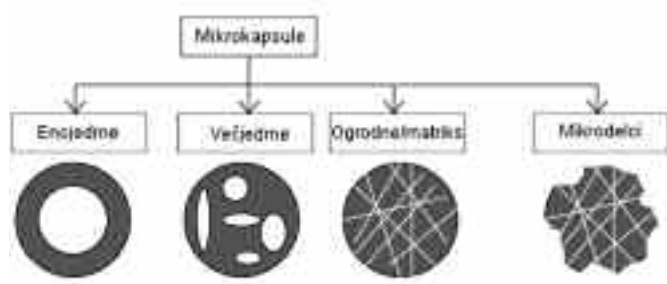
Mikrokapsuliranje je proces, pri katerem zelo drobne kapljice, trdne delce ali zračne mehurčke obdamo oz. obložimo s kontinuiranim slojem polimera, lipida ali drugih ustreznih snovi (preglednica 1). Če je velikost nastalih delcev v mikrometriškem nivoju, le-ti ustrezajo širši definiciji mikrokapsul, ki zajema s postopkom mikrokapsuliranja izdelane delce mikrometriških velikosti. Vendar lahko v literaturi zasledimo precejšnjo nedoslednost v rabi termina mikrokapsule, saj obstaja tudi ožja definicija le-teh. Slednja zajema tudi morfološke lastnosti nastalih delcev in mikrokapsule definira kot majhne, trdne delce okroglih oblik, velikosti 1-1000 (2000) μm , ki so sestavljeni iz jedra in ovojnice.

Preglednica 1: Materiali, ki so primerni za tvorbo ogrodja oz. ovojnice mikrokapsul (5).

Table 1: Materials used as matrix or coating material of microcapsules (5).

Proteini:	albumin, kazein, želatina, gluten, peptidi, sojini proteini idr.
Sladkorji in njihovi produkti:	fruktoza, galaktoza, glukoza, maltoza, saharoza, oligosaharidi, koruzni sirup, idr.
Škrob in njegovi produkti:	maltodekstrini, dekstrini, škrobi, modificirani škrobi
Gumiji:	agar, alginati, karagenani, arabski gumi, pektini idr.
Derivati celuloze:	metilceluloza, etilceluloza, karboksimetil celuloza, celulozni acetat-ftalat, hidroksipropil metilceluloza, hidroksipropil celuloza idr.
Ostali ogljikovi hidrati:	hitosan, ciklodekstrini
Lipidi:	voski, mono- in digliceridi, naravne masti in olja, frakcionirane in hidrogenirane masti, lecitin, parafin
Ostali vodotopni polimeri:	polietilen glikol, polivinil pirolidon, polivinil alkohol,
Ostali nevodotopni polimeri:	polimlečna kislina, polikaprolakton idr.

Morfološke lastnosti mikrokapsul so odvisne predvsem od sestave jedra, ki je lahko trdno, tekoče ali plinasto, in procesa izdelave. Po širši definiciji, ki jo bomo upoštevali tudi v tem prispevku, so mikrokapsule lahko tako pravilnih kot tudi nepravilnih oblik, na osnovi njihove morfološke sestave pa jih delimo na enojedrne, večjedrne in ogrodne mikrokapsule (slika 1). Pri *ogrodnem oz. matriks tipu mikrokapsul* sta mikrokapsulirana snov in ogrodni material enakomerno razporejena po celotnem volumnu delca; za takšen tip mikrokapsul je v uporabi izraz *mikrosfera*. Podobno notranjo strukturo imajo tudi *mikrodelci*, ki se od mikrosfer ločijo le po tem, da so nepravilnih oblik. Za enojedrne in večjedrne mikrokapsule, ki ustrezajo tudi ožji definiciji mikrokapsul, pa je značilno, da lahko v njihovi strukturi jasno razločimo eno ali več jeder ki ga/jih obdaja ovojnica; za poimenovanje takšnih mikrokapsul uporabljamo tudi izraz *filmski tip mikrokapsul*. (2)



Slika 1: Morfološke lastnosti mikrokapsul; vgrajena učinkovina je lahko bodisi enakomerno dispergirana po celotnem volumnu delca (*mikrosfere*) bodisi se nahaja le v jedru delca (*mono- oz. večjedrne mikrokapsule*).

Figure 1: Morphological properties of microcapsules; incorporated drug can be either homogeneously dispersed through the whole particle volume (*microspheres*) or entrapped in the microcapsule's core (*mono-core or poly-core microcapsules*).

3 Postopki izdelave mikrokapsul

Prve mikrokapsule so izdelali z metodo, imenovano *kompleksna koacervacija*, do danes pa so razvili in izpopolnili še mnogo drugih metod. Izmed teh nekatere temeljijo na popolnoma fizikalnih fenomenih, druge za tvorbo ovojnice mikrokapsul izkoriščajo reakcijo polimerizacije, mnoge pa kombinacijo omenjenih procesov. Metode mikrokapsuliranja lahko torej v grobem razdelimo na *kemijske* (medfazna polimerizacija,

polimerizacija *in situ*) in *fizikalno-kemijske* (koacervacija, oblaganje plast-na-plast, tehnologije s superkritičnimi fluidi, ohlajanje dispergirane taline in metode z odstranjevanjem topila) ter *fizikalno-mehanske* (sušenje z razprševanjem, mikrokapsuliranje na rotirajočem disku, metode (ko-)ekstruzije curka tekočine in ekstruzije talin ter mikrokapsuliranje z razprševanjem v zvrtničenih plasteh in v bobnih).

Ne glede na mehanizem nastanka mikrokapsul lahko vsako izmed metod razdelimo v tri osnovne korake: vgradnja učinkovine, oblikovanje mikrokapsul in stabiliziranje le-teh (6).

1. korak: Vgradnja učinkovine v sistem, ki bo kasneje tvoril bodisi ogrodje bodisi jedro mikrokapsule; omenjeni sistem je lahko v obliki raztopine, emulzije ali suspenzije. Ta korak lahko vključuje procese, kot so mešanje, mletje oz. drobljenje, sejanje, sušenje in dispergiranje.

2. korak: Oblikovanje (izdelava) mikrokapsul;

(a) kadar izhajamo iz tekočega ogrodja, slednjega v tej fazi dispergiramo v zraku (s postopkom kapljanja oz. ekstruzije tekočine ali s postopkom razprševanja), v drugi tekočini (postopek emulgiranja ali mikroemulgiranja) ali v superkritičnem fluidu.

(b) Kadar izhajamo iz trdnega ogrodja, na gibajoče delce slednjega razpršujemo raztopino za oblaganje (oblaganje v zvrtničenih plasteh, oblaganje v bobnih).

3. korak: Stabiliziranje/utrjevanje izdelanih mikrokapsul s kemijskimi (polimerizacija), fizikalno-kemijskimi (geliranje/premreževanje, koacervacija) ali fizikalnimi postopki (sušenje, obarjanje, strjevanje), ki vodijo v nastanek trdne farmacevtske oblike.

Reakcija *polimerizacije* se običajno uporablja za utrjevanje mikrokapsul izdelanih s kemijskimi metodami, ki so predstavljene v poglavju 3.1.

Postopek *geliranja* se uporablja za utrjevanje mikrokapsul, ki v ogrodju oz. ovojnici vsebujejo hidrofilen polimer ali protein, ki lahko tvori hidrogel. Pri kapljanju takšnega materiala v raztopino za utrjevanje (poglavje 3.3.1.), je nastanek hidrogela lahko posledica tvorbe ionskih interakcij med polimernimi verigami (npr. nastanek hidrogela pri kapljanju raztopine alginata v raztopino Ca-ionov), geliranja zaradi spremembe temperature (npr. pri ohlajanju raztopine agaroze) ali spremembe pH (geliranje raztopine hitosana v alkalnem mediju). Geliranje se izkorišča kot metoda utrjevanja mikrokapsul tudi pri postopku razprševanja termogelov (razprševanje s strjevanjem, poglavje 3.3.2.) ter pri metodah emulgiranja raztopin hidrofilnih polimerov oz. polipeptidov (poglavje 3.2.3.).

Proces koacervacije se izkorišča za utrjevanje mikrokapsul izdelanih z metodo koacervacije, ki je podrobneje opisana v poglavju 3.2.1.

Kadar oblikujemo kapljice oz. neutrjene mikrokapsule iz raztopine ogrodnega polimera in učinkovine v organskem topilu, je nastanek čvrstih mikrokapsul posledica bodisi odstranitve organskega topila (z odparevanjem ali difuzijo) bodisi dodatka netopila. V obeh primerih se začne ogrodni polimer *obarjati* in nalagati okoli učinkovine, ki jo kapsuliramo. Proces *obarjanja* se izkorišča za oblikovanje in utrjevanje mikrokapsul izdelanih na osnovi tehnologij s superkritičnimi fluidi (poglavje 3.2.2.), metode emulgiranja raztopin hidrofobnih polimerov v organskih topilih (poglavje 3.2.1.), metode sušenja z razprševanjem (poglavje 3.3.2.) ter postopkov oblaganja z razprševanjem (poglavje 3.3.4.).

Mikrokapsule lahko utrdimo tudi z znižanjem temperature, pod vplivom katere se tekoče ogrodje mikrokapsul strdi. *Proces strjevanja* se izkorišča za utrjevanje mikrokapsul, ki smo jih izdelali z uporabo talin ogrodnih materialov. Slednje lahko bodisi emulgiramo v vodnem mediju (poglavje 3.2.3), razpršujemo v hladen zrak (poglavje 3.3.2.) ali iztiskamo s pomočjo ekstrudorja (poglavje 3.3.3.).

3.1 Kemijske metode

Med najpomembnejše kemijske metode izdelave mikrokapsul uvrščamo *medfazno polimerizacijo* ter *in situ polimerizacijo*. Postopek mikrokapsuliranja z medfazno polimerizacijo se uporablja za mikrokapsuliranje tekočin. Polimerna stena mikrokapsul nastaja na mejni površini dveh faz, ki se med seboj ne mešata; v reakciji sta udeležena vsaj dva komplementarna monomera, od katerih je eden topen v hidrofilni, drugi pa v hidrofobni fazi pripravljene emulzije. Z metodo *in situ* polimerizacije pa kapsuliramo trdna ali tekoča jedra. Reakcija poteka na površini dispergiranih delcev ali kapljic, pri čemer sta monomer in katalizator prisotna v isti fazi. Rezultat je zelo čvrsta polimerna ovojnica mikrokapsul (2, 7). Zaradi možnih zaostankov monomerov in katalizatorjev se omenjene metode na področju farmacije redkeje uporabljajo.

3.2 Fizikalno-kemijske metode

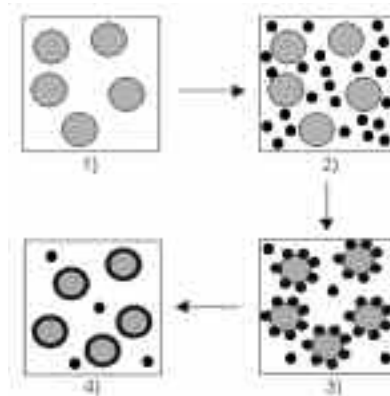
3.2.1. Koacervacija in ločitev faz

Koacervacija je proces spontane ločitve faz, ki se pojavi, kadar s spremembo temperature, pH ali z dodajanjem različnih snovi zmanjšamo topnost makromolekul v koloidni vodni raztopini. Pri tem lahko preide velika večina makromolekul v novo, s koloidom bogato fazo (tj. koacervat oz. faza z visoko koncentracijo polimera), ki je dispergirana v s koloidom revni fazi (tj. kontinuirana faza z nizko koncentracijo polimera). Stopnja koacervacije tako predstavlja vmesno stopnjo med koloidno raztopino in končno stopnjo - oborino.

Koacervati težijo k sprejemanju netopnih trdnih delcev in kapljic hidrofobnih tekočin in to njihovo lastnost so izkoristili pri izdelavi mikrokapsul z metodo koacervacije. Slednja obsega štiri faze (Slika 2): (1) *tvorba trifaznega sistema* (jedra mikrokapsul dispergiramo v raztopini polimera, ki bo nato tvoril steno mikrokapsul), (2) *indukcija koacervacije* (s spremembo temperature ali pH, dodatkom tekočine, ki sproži ločevanje faz, dodatkom soli ali inkompatibilnega polimera), (3) *tvorba ovojnice* z obdajanjem jeder s koacervatnimi kapljicami (v primeru ustrezne afinitete med jedri in koacervatom se polimer adsorbira na stični

površini med jedri in kontinuirano fazo) ter (4) *utrjevanje stene mikrokapsul* (z znižanjem temperature, spremembo pH, premreženjem ter drugimi primernimi postopki).

Pri metodi *enostavne koacervacije* je zmanjšanje topnosti polimera posledica odvzema topila molekulam polimera zaradi dodatka visoko koncentrirane raztopine soli (npr. Na_2SO_4), organskega (ne)topila (npr. etanol), inkompatibilnega polimera, ali zaradi znižanja temperature. (2, 4, 8, 9)



Slika 2: Shematska predstavitev procesa koacervacije. Dispergiranje jeder mikrokapsul v raztopini stenskega polimera (1), ločitev koacervata od raztopine (2), oblaganje jeder z mikrokapljicami koacervata (3) ter koalesciranje koacervatnih kapljic in tvorba kontinuirane ovojnice okoli jedernih delcev (4); povzeto po: (10).

Figure 2: Schematic presentation of the coacervation process. Core material dispersion in solution of shell polymer(a), separation of coacervate from solution (b), coating of core material by microdroplets of coacervate(c), and coalescence of coacervate to form continuous shell around core particles (d); adapted from: (10).

Kada je zmanjšanje topnosti polimera posledica nevtralizacije nasprotnih nabojev dveh polimerov, pa govorimo o ti. *kompleksno koacervaciji*. Pri slednji se kot amfoterni oz. kationski polimer običajno uporablja želatina (lahko tudi albumin, kazein ipd.), kot anionski vodotopni polimer, ki po reakciji s polikationom tvori kompleksni koacervat, pa različni naravni (npr. arabski gumi, alginat, karagenani) in (pol)sintezni polimeri (npr. karboksimetil celuloza). Ovojnico tako izdelanih mikrokapsul utrdimo s kovalentim (glutaraldehyd, genipin, ipd.) ali nekovalentnim (tanini, šiškovalna kislina, pektin, arabski gumi) premreženjem želatine. Ta postopek je primeren predvsem za izdelavo kapsul s premerom 20-800 μm , ki vsebujejo 80-90 % (m/m) jedrne faze. Večinoma nastanejo kapsule s kontinuirano jedrno fazo in ovojnico, čeprav debelina slednje ni enakomerna. Njihova primernost za farmacevtsko in prehrabeno industrijo bi bila še boljše, če bi jih bilo mogoče izolirati brez uporabe kemijskih premreževal. (2, 4, 8, 9)

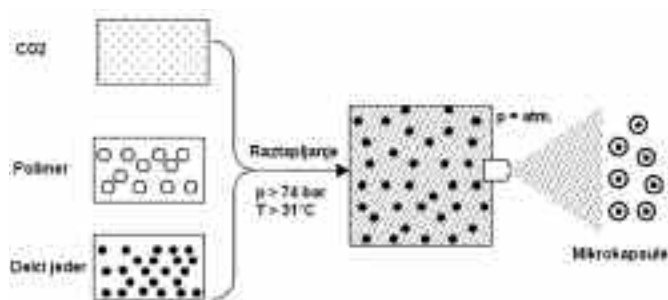
3.2.2 Tehnologije s superkritičnimi fluidi

To je relativno nova tehnologija, s katero lahko zmanjšamo uporabo organskih topil. Superkritični fluidi obstajajo nad kritično temperaturo in tlakom, kjer ne moremo razlikovati med tekočo in plinasto fazo snovi.

Njihove lastnosti so med lastnostmi tekočin in plinov; po gostoti so podobni tekočinam, po viskoznosti in stisljivosti plinom, difuzivnost in prenos mase pa sta večja kot pri tekočinah. V superkrično stanje lahko prevedemo mnoge snovi, kot so voda, propan, dušik in ogljikov dioksid. Slednji se zaradi ugodnih lastnosti uporablja najpogosteje, saj omogoča tudi izvedbo procesa pri dokaj milih pogojih (74bar, 31°C) in prenos proizvodnje na industrijski nivo. Izmed metod mikrokapsuliranja z uporabo superkričnih fluidov se najpogosteje uporabljata *metoda s hitrim razširjanjem superkričnih raztopin* in *metoda s superkričnim fluidom kot netopilom*.

Hitro razširjanje superkričnih raztopin (*»Rapid Expansion of Supercritical Solutions-RESS«*); pri tej metodi zdravilno učinkovino in ogrodni material raztopimo v superkričnem fluidu, ki ga vzdržujemo pod visokim tlakom. Tako pripravljeno raztopino nato razpršujemo skozi ozko šobo v komoro z atmosferskim tlakom. Nenaden padec tlaka povzroči odparevanje superkričnega fluida, ki se tako pretvori v bistveno slabše topilo, in obarjanje ogrodnega materiala. Le-ta se nato naloži okoli jeder učinkovine in tvori ovojico nastajajoče mikrokapsule (slika 3).

Pomanjkljivost te metode je zahteva, da morata biti tako učinkovina kot ogrodni material dobro topna v superkričnem fluidu, saj je v splošnem zelo malo primernih polimerov, ki so topni v superkričnem ogljikovem dioksidu. Topnost hidrofilnih polimerov, kot sta hidroksipropilmetil celuloza in želatina, lahko izboljšamo z dodatkom sotopil; ta povečajo topnost v superkričnem fluidu, pri atmosferskem tlaku pa se ogrodni material v njih ne raztaplja. (4, 9, 10)



Slika 3: Shematski prikaz mikrokapsuliranja z metodo s hitrim razširjanjem superkričnih raztopin (RESS); povzeto po: (4)

Figure 3: Schematic presentation of microencapsulation process by rapid expansion of supercritical solutions (RESS); adapted from: (4).

Metoda s superkričnim fluidom kot netopilom (*»Supercritical fluid Anti-Solvent-SAS«* ali *»Gas Anti-Solvent-GAS«* method); metoda je bila zasnovana na hipotezi, da je absorpcija plina v tekočino povezana z ekspanzijo le-te. V kolikor se volumen raztopine pod vplivom plina dovolj razširi, tekoča faza ni več dobro topilo za topljenec. Posledica je tvorba kristalizacijskih jeder in obarjanje topljenca. Pri SAS metodi zdravilno učinkovino in ogrodni polimer najprej raztopimo ali suspendiramo v organskem topilu. Tako pripravljeno disperzijo nato razpršujemo v superkrični fluid, ki ima vlogo netopila. Slednji povzroči ekspanzijo topila, ki vodi do obarjanja ogrodnega polimera in tvorbe mikrokapsul. Pri izbiri sestavin upoštevamo pravilo, da se morata organsko topilo in superkrični fluid (netopilo) dobro mešati in da mora biti ogrodni polimer v izbranem organskem topilu dobro topen, v zmesi le-tega s

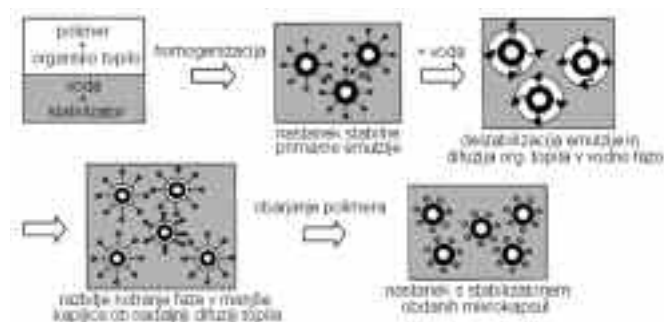
superkričnim fluidom (netopilo) pa netopen. Ker je mešanje vode s superkričnimi fluidi nezadostno, SAS metoda ni primerena za kapsuliranje vodotopnih učinkovin. (4, 9, 10)

3.2.3 Metode emulgiranja s sledečim odstranjevanjem topila oz. strjevanjem notranje faze

Metode iz te skupine temeljijo na pripravi enojnih ali dvojnih emulzij, odvisno od vodotopnosti snovi, ki jo želimo mikrokapsulirati, in ogrodnega polimera.

Pri mikrokapsuliranju hidrofobnih učinkovin v nevodotopen polimer najprej obe komponenti raztopimo v organskem topilu. Po dodatku primerne emulgatorja in vodnega medija z ustreznim postopkom izdelamo emulzijo tipa O/V. Kadar želimo v nevodotopen polimer vgraditi vodotopne učinkovine pa se poslužimo izdelave dvojnih emulzij tipa V/O/V. Po izdelavi tako enojnih kot dvojnih emulzij je dispergirane kapljice z raztopljenima polimerom in učinkovino (notranja faza emulzije) potrebno nato še pretvoriti v trdne delce. To lahko dosežemo z odparevanjem ali ekstrakcijo/difuzijo topila, v katerem je ogrodni polimer dobro topen. Glede na uporabljeni način odstranitve topila ločimo **metodo z odparevanjem topila ter metode z difuzijo topila** (slika 4); pri obeh se kot ogrodni polimer najpogosteje uporabljajo polimlečna kislina, kopolimeri polimlečne in poliglikolne kisline, polimetakrilati ipd. (11, 12, 13)

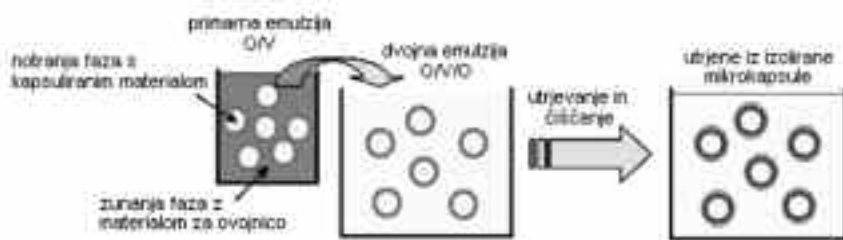
V primeru mikrokapsuliranja vodotopnih učinkovin v vodotopen polimer oz. polipeptid (želatina, alginat, pektin, albumin, hitosan, hialuronska kislina, ipd.) najprej obe komponenti raztopimo v vodni fazi, ki jo nato dispergiramo v lipofilni fazi (nastane V/O emulzija). V kolikor želimo v vodotopen polimer/polipeptid vgraditi hidrofobne učinkovine, pa izdelamo dvojno emulzijo tipa O/V/O (slika 5). Izdelavi primarne enojne ali dvojne emulzije sledi proces utrjevanja dispergiranih kapljic/mikrokapsul; hidrofilen polimer oz. polipeptid v ogrođu mikrokapsul lahko utrdimo z ustreznim postopkom premreževanja (**termično ali kemijsko premreženje, ionotropno geliranje, tvorba interpolimernih kompleksov**). (2, 9, 14)



Slika 4: Priprava mikrokapsul z emulzijsko-difuzijsko metodo, ki temelji na uporabi topil, ki se z vodo delno mešajo.

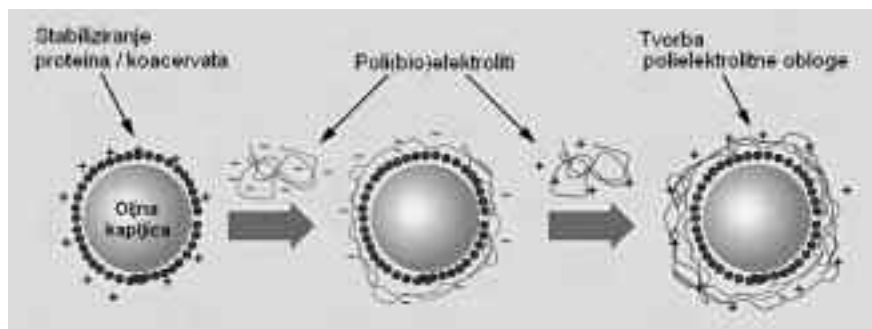
Figure 4: Preparation of microcapsules by emulsion-diffusion method based on partially water-miscible solvents.

S previdno izbiro sestave dveh nemešajočih se tekočin (npr. voda in lipid) lahko dosežemo, da bo njuna medfazna napetost zelo blizu nič. Pod takšnimi pogoji že ob rahlem stresanju nastane (mikro)emulzija oz. zelo



Slika 5: Shematski prikaz mikroenkapsuliranja hidrofobnih snovi v vodotopen polimer z dvojno emulzijsko metodo.

Figure 5: Schematic presentation of microencapsulation of hydrophobic substance into water-soluble polymer by double emulsion method.



Slika 6: Shematski prikaz mikroenkapsuliranja z metodo oblaganja plast-na-plast.

Figure 6: Schematic presentation of microencapsulation process via layer-by-layer coating.

fina disperzija z velikostjo kapljic notranje faze manjših od $1\mu\text{m}$ (**metoda mikroemulgiranja**). Poleg tega, da nastanejo že ob nizkem vnosu energije, so ti sistemi tudi zelo stabilni v primerjavi s klasičnimi emulzijami. Za utrjevanje nastalih mikrokapsul uporabljamo enake metode, kot je opisano zgoraj. (6)

Pri **mikrokapsuliranju z ohlajanjem dispergirane taline** lipidno fazo segrejemo nad temperaturo tališča lipida, v njej raztopimo oz. dispergiramo učinkovino in ji dodamo na enako temperaturo segreto vodno raztopino stabilizatorja. Zmes nato pri konstantni temperaturi ($\sim 5^\circ\text{C}$ nad tališčem lipida) homogeniziramo (npr. z rotor-stator homogenizatorjem). Dispergiranje je odvisno od dovedene energije, zato je potrebno optimizirati čas in hitrost mešanja. Z ohlajanjem nastale O/V emulzije taline lipida v vodni raztopini stabilizatorja omogočimo otrditev lipidnih kapljic in nastanek trdnih mikrokapsul. (15, 16)

Emulgiranje v mikroporoznih membranskih sistemih je novejša metoda, ki omogoča nadzorovano izdelavo emulzij ter trdnih delcev mikro- in nano-metrskih velikosti. Osnova procesa je potiskanje notranje faze skozi mikropore membrane v zunanjo fazo, pri čemer nastane (dvojna) emulzija z ozko porazdelitvijo velikosti kapljic. Uporabnost metode je široka, saj lahko emulgirane kapljice nadalje izpostavimo sekundarnim procesom kot so polimerizacija, odparevanje, liofilizacija, strjevanje itd. in tako izdelamo zelo različne trdne delce. (17)

3.2.4 Oblaganje plast-na-plast

Ena od metod izdelave mikrokapsul je tudi oblaganje plast-na-plast (angl. *layer-by-layer*), ki temelji na zaporedni adsorpciji nasprotno nabitih komponent na trdno površino, kar omogoča natančen nadzor nad sestavo in debelino obloge do nekaj nanometrov. Relativno tega postopka je obloga, ki jo sestavlja več plasti polimernih molekul, stabiliziranih z močnimi elektrostatskimi vezmi. Najprimernejši so polielektroliti, ki se elektrostatsko vežejo na oblaganec (slika 6). Prvi sloj se veže neposredno na površino oblaganca, zato mora imeti naboj, nasproten naboju oblaganca. Pri oblagancu, ki ima manjšo sposobnost za tvorbo

elektrostatskih interakcij, pride po prvih nanosih do t. i. okrepljene površinske funkcionalnosti, saj se na površino oblaganca s šibkejšim nabojem veže plast polielektrolitov, ki imajo na voljo več skupin za vezavo naslednje plasti. (18)

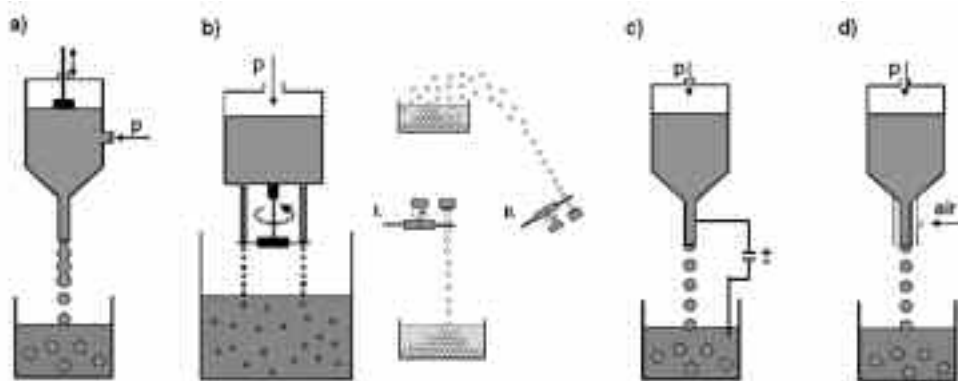
3.3 Fizikalno-mehanske metode

Pri mehanskih metodah kapsuliranja je nastanek mikrokapsul predvsem posledica mehanskega delovanja in ne toliko dobro definiranih fizikalnih ali kemijskih pojavov. Številne metode oblaganja in sušenja z razprševanjem se rutinsko uporabljajo v industriji. V laboratorijskem merilu pa se za izdelavo mikroser in mikrokapsul pogosto uporablja ekstruzija raztopin polimera skozi šobe.

3.3.1 Metode ekstruzije curka tekočine

Metode ekstruzije curka tekočine so osnovane na principu razbitja laminarnega curka tekočine v enako velike kapljice z uporabo različnih tehnik. Medtem ko pri enostavnih metodah ekstruzije črpamo raztopino ogrodnega polimera skozi enojno šobo, pa v primeru ti. ko-ekstruzije uporabljamo koncentrično šobo, pri čemer fazo z jedrnim materialom črpamo skozi notranjo, fazo z ogrodnim materialom pa skozi zunanjo šobo. Laminaren curek tekočine nato razbijemo v drobne kapljice (tj. neutrjene mikrokapsule) z uporabo različnih tehnik. Ovojnico nastalih mikrokapsul nato utrdimo s termičnim/kemijskim premreženjem, ohlajanjem, odparevanjem topila ali drugimi primernimi postopki.

Pri **metodi z vibrirajočo membrano** se laminaren curek tekočine razbije v enakomerno velike kapljice pod vplivom nihanja membrane, ki se nahaja nad šobo enkapsulatorja. Nastale kapljice oz. mikrokapsule nato potujejo skozi električno polje; pri tem se njihova površina nabije, kar privede do odbojnih sil med mikrokapsulami, ki preprečujejo njihovo zlepljanje med padanjem v raztopino premreževala (slika 7a). S spreminjanjem procesnih spremenljivk (velikost šob, hitrost pretoka raztopin, amplituda in frekvenca nihanja membrane) in lastnosti jedrnega ter ogrodnega materiala lahko pripravimo mikrokapsule različnih



Slika 7: Shematska slika naprav za enkapsuliranje z metodo z vibrirajočo membrano (a), „jet cutter“ metodo; z normalnim postopkom-I in postopkom z mehkim pristankom kapsul-II (b), elektrostatsko ekstruzijo (c) in s ko-aksialnim tokom zraka (d).

Figure 7: Schematic presentation of devices for encapsulation by vibrating nozzle method (a), jet cutter-operated in the normal mode-I and in the soft-landing mode-II (b), electrostatic extrusion (c), and co-axial air flow (d).

velikosti. Velika prednost tega postopka je nastanek mikrokapsul z ozko porazdelitvijo velikosti (najpogosteje v območju od 100–5000 μm) in možnost izdelave v aseptičnih pogojih. Smo pa pri tej metodi omejeni z viskoznostjo tekočine, ki ne sme biti previsoka. Omenjena metoda se je izkazala kot primerna tudi za mikrokapsuliranje samo-mikroemulgirajočih sistemov v ogrodje iz Ca-alginata in Ca-pektinata. (19, 20, 21)

Uporabo visoko viskoznih tekočin nam omogoča »**jett cutter**« metoda, ki ima v primerjavi z metodo z vibrirajočo membrano tudi večjo kapaciteto proizvodnje. Pri tej metodi laminaren curek tekočine razbijemo s pomočjo vrtečega kolesja z rezalnimi žičkami, ki prekinjajo tok tekočine. Pri tem nastajajo mikrokapsule cilindrične oblike, ki se zaradi površinske napetosti oblikujejo v sferične mikrokapsule, ki jih nato utrdimo (slika 7b). Z »jett-cutter« metodo lahko mikrokapsuliranje izvajamo na dva načina in sicer po ti. *navadnem postopku* ter po ti. *postopku z mehkim pristankom*. Oba postopka se razlikujeta v krivulji leta nastalih mikrokapsul proti raztopini za utrjevanje; pri navadnem postopku mikrokapsule padajo navpično navzdol, pri postopku z mehkim pristankom pa jih usmerimo diagonalno navzgor, s čimer močno zmanjšamo njihovo hitrost ob padcu v raztopino za utrjevanje. Poleg krivulje leta na lastnosti mikrokapsul vplivajo tudi procesne spremenljivke, kot so hitrost vrtenja kolesja, število rezalnih žičk, hitrost pretoka tekočin skozi šobo in premer šob. (22)

Nastanek mikrokapsul je lahko tudi posledica razbitja curka tekočine pod vplivom delovanja elektrostatskih sil. **Elektrostatska ekstruzija** (slika 7c) je kot metoda mikrokapsuliranja primerna zlasti takrat, ko želimo izdelati zelo majhne mikrokapsule. Na velikost ter na naboj na površini slednjih lahko vplivamo z ustrežno izbiro procesnih parametrov (hitrost pretoka, velikost šobe, električna napetost, ipd.), lastnostmi raztopine ogrodnega polimera ter celotnega sistema. Nizka produktivnost je glavna pomanjkljivost te metode, ki ovira njeno uporabo v industriji; z izboljšanjem slednje se trenutno ukvarja več raziskovalnih skupin. (23, 24)

Podobno kot elektrostatska ekstruzija tudi **metoda s ko-aksialnim tokom zraka** temelji na tvorbi posameznih mikrokapsul na površini šobe. Raztopino ogrodnega materiala dovajamo skozi notranjo šobo, medtem

ko skozi zunanjo pod tlakom dovajamo zrak ali dušik. Na izhodu koncentrične šobe tok zraka prekinja tok tekočine, pri čemer se tvorijo mikrokapsule, ki jih je nato potrebno še učvrstiti (slika 7d). Tudi pri tej metodi je velikost nastalih mikrokapsul odvisna predvsem od hitrosti pretoka tekočine in velikosti šobe ter hitrosti pretoka zraka. V nasprotju z metodo z vibrirajočo membrano ter »jett-cutter« metodo elektrostatska ekstruzija ter metoda s ko-aksialnim tokom zraka nista primerni za proizvodnjo v večjem merilu. (22)

3.3.2 Metode z razprševanjem

Sušenje z razprševanjem (»spray drying«) je cenovno ugoden enostopenjski proces, ki omogoča mikrokapsuliranje trdnih in tekočih snovi. Jedrno fazo najprej dispergiramo v vodni ali nevodni raztopini ogrodnega materiala. Nastalo disperzijo nato skozi šobo razpršujemo v sušilno komoro s krožečim vročim zrakom (slika 8). Disperzijo lahko razpršujemo bodisi v smeri pretoka vročega zraka (ti. sotočno razprševanje, ki se uporablja zlasti za kapsuliranje termolabilnih spojin) bodisi proti toku zraka (ti. protitočno razprševanje, ki sušečim mikrokapsulam omogoča, da se dlje časa zadržijo v sušilni komori). Zaradi izhlapevanja topila se komponente ovojnice strjujejo na delcih jedra, posledica česar je nastanek bodisi večjedrnih mikrokapsul bodisi mikrosfer.

Sušenje z razprševanjem se uporablja predvsem za mikrokapsuliranje snovi v živilski industriji, farmaciji, kozmetiki in v agrokulturi. V nadaljevanju poglavja se bomo osredotočili predvsem na razprševanje vodnih raztopin, z uporabo katerih se izognemo tudi težavam povezanim z zaostanki topil v produktu. Zaradi hladilnega učinka izparevanja vode ter hitrega procesa sušenja je metoda pod določenimi pogoji primerna tudi za kapsuliranje termolabilnih snovi, saj je temperatura vzorca dokaj nizka (pod 100°C). Rezultati sušenja z razprševanjem so močno odvisni od lastnosti uporabljenih snovi, kot so vodotopnost, molekulska masa, kristaliničnost, temperature steklastega prehoda in sposobnost emulgiranja ter tvorbe filma. V literaturi kot primerne materiale za tvorbo ogrodja mikrokapsul navajajo naravne gumije (arabski gumi, natrijev alginat, karagenani), proteine (sojini, sirotkini, želatina), ogljikove hidrate (maltodekstrini, škrob in derivati celuloze) ter nekatere lipide (26). Na

lastnosti produkta, kot so velikost delcev, izkoristek vgradnje ter vsebnost zaostalih topil, lahko vplivamo tudi s spreminjanjem razmerja med jedrom in ovojnico (pogosto 1:4), z nadzorovanjem velikosti kapljic po razprševanju, s temperaturo vhodnega (150-220°C) in izhodnega (50-80 °C) zraka ter s časom zadrževanja mikrokapsuliranega materiala v komori (običajno 5-100 s). Velikost nastalih mikrokapsul je običajno med 10-400 µm z vsebnostjo kapsulirane snovi med 5-50%. Prednost te metode je predvsem v tem, da je to široko dostopna tehnologija, ki omogoča kontinuirano, enostavno, hitro in cenovno ugodno proizvodnjo mikrokapsul. Vendar se je potrebno zavedati, da je potrebno celoten postopek optimirati za vsako učinkovino posebej ter da je profil sproščanja iz tako izdelanih mikrokapsul težko nadzorovati. (9, 25, 26)

Razprševanje s strjevanjem (»spray congealing«, »spray cooling« in »spray chilling«) lahko izvajamo v isti aparaturi kot sušenje z razprševanjem, s to razliko, da v komoro namesto vročega zraka dovajamo hladen oz. mrzel zrak. Jedro fazo dispergiramo v talini ogradnega materiala. Tako pripravljeno talino nato razpršujemo v hladno komoro, pri čemer se nastale kapljice strdijo, jedrni material pa ostane ujet v notranjosti mikrokapsul. Pri tej metodi mikrokapsuliranja se kot ogradni material uporabljajo dve skupini spojin; hidrofilni polioksigliceridi, nekateri poloksameri, polietilenglikoli z molskimi masami med 2000 in 20000 in estri polietilenglikolov ter hidrofobni voski, gliceridi in maščobne kisline. Primerni so materiali, ki so pri sobni temperaturi trdni, ob tem pa nimajo previsoke temperature tališča (običajno med 45 in 75 °C) in viskoznosti v talini. Za izdelavo mikrokapsul z metodo razprševanja s strjevanjem ne potrebujemo topila, kar je bistvena prednost te metode. Slednja je tako primerna zlasti za mikrokapsuliranje učinkovin, ki so bodisi termolabilne bodisi občutljive na hidrolizo ter v primerih, ko se želimo izogniti uporabi organskih topil. Izdelamo lahko tako trdne kot mehke neporozne mikrokapsule z velikostjo med 20 in 2000 µm. (10, 26)

Mikrokapsuliranje na rotirajočem disku prav tako uvrščamo med metode priprave mikrokapsul s pomočjo razprševanja. Pri tej metodi visokotlačno šobo nadomestimo z rotirajočim diskom (slika 8b). Trdna jedra, ki jih želimo mikrokapsulirati, suspendiramo v talini ali raztopini materiala za oblaganje. Suspenzijo nato dovajamo na rotirajoči disk, kjer poteka oblaganje jeder. Zaradi delovanja centrifugalne sile se obložena jedra in presežen material za oblaganje pomikajo proti robu diska in se v končni fazi od njega tudi ločijo. Sledi faza utrjevanja mikrokapsul, običajno s procesom ohlajanja. Ta tehnologija je hitra, enostavna ter

cenovno ugodna. Optimalne pogoje kapsuliranja zagotovimo z izbiro sferično oblikovanih jeder, velikih med 100 in 150 µm, ter obloge, ki jo je mogoče utrditi s hitrim ohlajanjem. (4, 26)

3.3.3 Mikrokapsuliranje z iztiskanjem talin

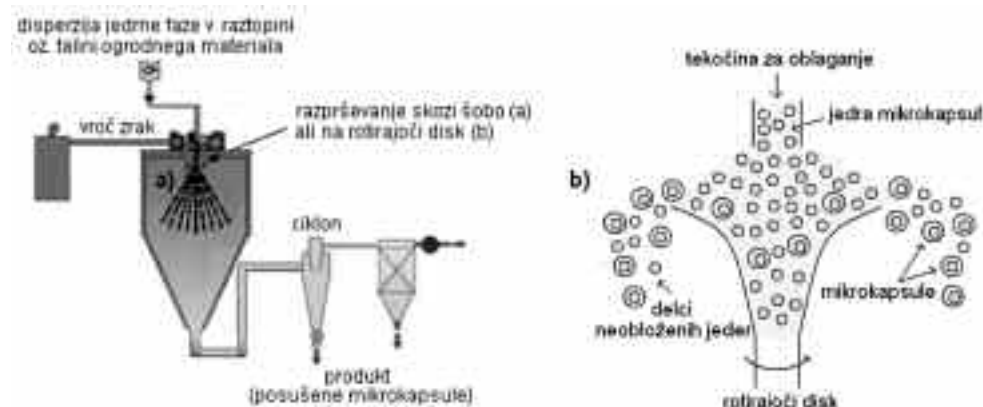
Bistvena ideja v ozadju mikrokapsuliranja z iztiskanjem oz. ekstruzijo talin je tvorba taline, v kateri je učinkovina dispergirana ali raztopljena. Med pomikanjem začetna zmesi ogradnega materiala in učinkovine skozi napravo za iztiskanje (ekstrudor) poteka mešanje, stiskanje ter taljenje zmesi in nazadnje iztiskanje taline skozi šobo. Po ohladitvi se ta masa ponovno strdi, pri čemer ostane učinkovina ujeta v notranjost nastalih delcev. Za iztiskanje se najpogosteje uporabljajo različni polimeri, predvsem polietilenglikoli (PEG) in polivinilpirolidoni (PVP), mono-, di- in trigliceridi ter derivati celuloze (HPMC, HPC).

Delce izdelane z iztiskanjem talin uvrščamo v zgornji velikostni razred mikrokapsul, med katere po širši definiciji mikrokapsul uvrščamo tudi pelete. Za izdelavo slednjih se pogosto uporablja metoda iztiskanja s krogličanjem, ki je služila tudi kot osnova za razvoj postopka mikrokapsuliranja z iztiskanjem talin. Tehnologije s talinami so na področju farmacije sicer že dobro uveljavljene in so že bile podrobneje predstavljene v Farmacevtskem vestniku (27).

3.3.4 Oblaganje z razprševanjem

Pri oblaganju z razprševanjem razpršujemo oblogo v obliki koloidne raztopine ali suspenzije (lahko tudi taline) na trdna jedra z učinkovino, ki rotirajo v komori za oblaganje. Trdna jedra so lahko tudi nevtralna (npr. sladkorne pelete) in jih oblagamo z učinkovino v obliki raztopine, suspenzije ali prahu (»layering«). Naprave za oblaganje delcev razdelimo na bobne za oblaganje (»pan coaters«) in na naprave, ki temeljijo na tehnologiji z vrtnčenjem (»fluid bed coating«).

Mikrokapsuliranje z razprševanjem (»Fluid bed coating«); zračni tok vzdržuje delce jedra v zvrtnčenem stanju, ki je podobno gibanju tekočin. Skozi šobo (eno ali dvo-kanalno) razpršujemo raztopino (ali talino) substance za oblogo, ki obda jedra (optimalna velikost je med 50 in 500 µm). Mikrokapsule s kompaktno ovojnico nastanejo pod vplivom bodisi toplega zraka, ki odpari topilo za ogradni polimer, bodisi hladnega zraka, ki povzroči strjevanje taline v primeru oblaganja s talinami. Odvisno od komore razpršujemo raztopino/talino za oblaganje od zgoraj



Slika 8: Shematski prikaz mikrokapsuliranja z metodo sušenja z razprševanjem; osnovno disperzijo lahko v komoro razpršujemo skozi visokotlačno šobo (a) ali na ti rotirajoči disk (b).

Figure 8: Schematic presentation of microencapsulation by spray technologies; feed dispersion is atomized into a chamber with high pressure nozzle (a) or rotating disk (b).

(»top spray«), spodaj (»bottom spray«-Wursterjeva komora) ali od strani (»tangential spray«-rotorska komora). (28, 29)

Mikrokapsuliranje v bobnih (»Pan coating«) je eden najstarejših industrijskih procesov izdelave majhnih, obloženih delcev ali tablet. Metoda je primerna za oblaganje večjih delcev. Trdna jedra, ki jih želimo obdati z ovojnico oz. mikrokapsulirati, damo v vrteči se boben, nakar nanje dovajamo raztopino polimerov za oblaganje. Ovojnico tako izdelanih mikrokapsul utrdimo s postopkom sušenja s toplim zrakom. Pri tem nastanejo mikrokapsule oz. pelete, ki so večje od 600 µm in jih uvrščamo v zgornji velikostni razred mikrokapsul. (8, 28)

6 Sklep

Z razvojem tehnologij mikrokapsuliranja in novih izdelkov na osnovi mikrokapsul se intenzivno ukvarja veliko število raziskovalnih skupin. Posledično lahko v strokovni literaturi zasledimo naraščanje števila znanstvenih publikacij s tega področja (30). Prav tako hitro narašča tudi število podeljenih patentov (30), kar priča o intenzivnem razvoju tega področja tako na znanstvenem kot tudi industrijskem nivoju.

Kot je razvidno iz prispevka, obstaja mnogo različnih metod mikrokapsuliranja, vendar le-te niso univerzalno uporabne za vgradnjo različnih učinkovin oz. jedernih faz. Pri razvoju novega mikronosilca za določeno učinkovino je zato pomembno, da dobro poznamo fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine oz. jedrne faze (vodotopnost, viskoznost, termična stabilnost) ter nato na osnovi le-teh izberemo ustrezno metodo izdelave mikrokapsul in primerno ogrodno snov. Izbira ustrezne metode je v veliki meri odvisna tudi od fizikalnega stanja učinkovine oz. jedrne faze ter želene velikosti in morfoloških lastnosti mikrokapsul. Z izbiro metode izdelave in ogrodnega materiala so povezani tudi učinkovitost vgradnje jedrne faze, mehanizem in profil sproščanja vgrajene učinkovine ter kapaciteta in stroški proizvodnje mikrokapsul.

Izdelava mikrokapsul je zahteven tehnološki proces, ki se že vse od konca petdesetih let prejšnjega stoletja neprestano izpopolnjuje ter prilagaja vedno širšemu področju uporabe. Rezultati dolgoletnega dela so vidni vse okoli nas, mikrokapsuliranje pa je postalo tipičen primer hitro razvijajoče se tehnologije z visokim deležem znanja.

7 Literatura

- Hemsley AR, Griffiths PC. Architecture in the microcosm: Biocolloids, self-assembly and pattern formation. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser.* 2000; 358, 547-564.
- Park K, Yeo Y. Microencapsulation technology. In: Swarbric A. (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd Ed. Vol 4. Informa healthcare. New York 2007: 2315-2327.
- Benita S. *Microencapsulation methods and industrial applications* 2nd ed. Taylor & Francis Inc, New York, 2006.
- Ghosh SW. Functional coatings in microencapsulation: a generale perspective. In: Ghosh S.W. (Ed.) *Funcional coatings*, Wiley-VCH Verlag, 2006.
- Benita S. *Microencapsulation : methods and industrial applications*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1996.
- Poncelet D. *Microencapsulation: fundamentals, methods and applications*. In: J.P. Blizt and V.M. Gun'ko (Eds.), *Surface chemistry in biomedical and environmental science*, Springer, Netherlands 2006: 23-34.
- Dubey R, Shami TC, Bhasker Rao KU. Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal* 2009; 59(1): 82-95.
- Bogataj M, Kristl A, Mrhar A, Kozjek F. Postopki priprave in kontrole mikrokapsul. *Farm Vestn* 1988; 39(4): 239-252.
- Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Tech* 2004; 15: 330-347.
- Jyothi NVN. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: a review. *The Internet Journal of Nanotechnology* 2009; 3(1).
- Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Cont Rel* 2005; 102: 313-332.
- Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent-evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm* 2008; 363: 26-39.
- Obeidat WM. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using the emulsion solvent removal methods. *Recent Patentes on Drug Delivery & Formulation* 2009; 3: 178-192.
- Pavli M, Vrečer F, Baumgartner S. Interpolimerni komplekski. *Farm Vestn* 2008; 59(3): 121-127.
- Gombač K, Šentjerc M, Ahlin Grabnar P et al. Oblikovanje trdnih lipidnih nanodelcev in proučevanje interakcij z modelno membrano. *Farm Vestn*. 1999; 50(3): 417-424.
- Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles-production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47: 165-196.
- Zvonar A, Ahlin Grabnar P, Kristl J. Emulgiranje v mikroporoznih membranskih sistemih. *Farm Vestn* 2006; 57(3): 183-188.
- Dolenc A, Kristl J. Razvoj polielektrolitne nanoobloge na mikrodelcih učinkovine. *Farm Vestn* 2008, 59(5): 273-277.
- Pluess-Wenzinger R, Widmer F, Heinzen C, Brandenberger H. Method and device for capsulating microbial, plant and animal cells or biological and chemical substances. EP1062032. Inotech AG. 2000.
- Homar M, Šuligoj D, Gašperlin M. Preparation of microcapsules with self microemulsifying core by a vibrating nozzle method. *J Microencapsulation* 2007; 24: 72-81.
- Zvonar A, Berginc K, Kristl A, Gašperlin M. Microencapsulation of self-microemulsifying system: Improving solubility and permeability of furosemide. *Int J Pharm* 2010; 1-2: 151-158.
- Prüsse U, Bilancetti L, Bučko M. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers* 2008; 62(4): 364-374.
- Manojlovic V, Djonlagic J, Obradovic B et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine. *Int J Nanomedicine* 2006; 1(2): 163-171.
- Jaworek A. Electrostatic micro- and nanoencapsulation and electroemulsification: a brief review. *J Microencapsulation* 2008; 25(7): 443-468.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International* 2007; 40: 1107-1121.
- Zuidam NJ, Shimon E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. V: Zuidam N.J., Nedovic V.A. (Ur.): *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, 2009, pp: 3-29.
- Homar M, Gašperlin M, Kerč J. Tehnologije s talinami/Hot melt technologies. *Farm Vestn* 2003; 54: 697-703.
- Burgess DJ, Hickey AJ. Microsphere technology and applications. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd Ed. Vol 4. Informa healthcare. New York 2007: 2315-2327.
- Luštrik M, Dreu R, Srčič S. Primerjava in razvoj naprav za oblaganje delcev. *Farm Vest* 2010; 61(3): 155-161.
- Boh B. Developpements et applications industrielles des microcapsules. In: Vandamme T.F. (Ed.). *Microencapsulation: des sciences aux technologies*. Paris, Lavoisier, 2007, pp.9-22.

Aplikacija mikroskopije na atomsko silo v farmacevtsko tehnoloških raziskavah

Application of Atomic Force Microscopy in Pharmaceutical Technology Studies

Biljana Govedarica, Janez Kerč, Stane Srčič

Povzetek: Razvoj novih formulacij in dostavnih sistemov narekuje tudi razvoj novih metod za vrednotenje površinskih lastnosti na nanometriškem nivoju, še posebej nedestruktivnih tehnik, kot je vrstična preiskovalna mikroskopija, med katere sodijo mikroskopija na atomsko silo, preiskovalna tunelska mikroskopija ter bližnja vrstična optična mikroskopija. Mikroskopija na atomsko silo omogoča vpogled in razumevanje fizikalno-kemijskih in mehanskih lastnosti učinkovin in pomožnih snovi, kar je izjemnega pomena za razvoj in načrtovanje farmacevtskih oblik. Mikroskopija na atomsko silo lahko poleg topografskih slik da je še kvantitativne informacije o hrapavosti, trdnosti ter elastičnosti/plastičnosti preiskovanih površin. Navedene aplikacije mikroskopije na atomsko silo zagotavljajo uporabnost te tehnike predvsem v predformulacijskih študijah, pri načrtovanju izdelave delcev, proučevanju njihovih »bulk« in površinskih lastnosti ter interakcij med njimi. Poleg tega, ta tehnika omogoča pregled in vrednotenje površin nekaterih farmacevtskih oblik, npr. filmsko obloženih tablet in pelet, aplikacijo pa je našla tudi pri analizi sprememb površin primarne (stične) ovojnine, izdelanih npr. iz polimernih ali steklenih materialov.

Abstract: Novel drug formulations and delivery systems involve development of new methods for characterization of surface properties at the nanometer level. This is especially evident in case of non-destructive techniques such as scanning probe microscopes (atomic force microscopy, scanning tunnelling microscopy and near-field scanning optical microscopy). Atomic force microscopy provides the investigation and understanding of physico-chemical and mechanical attributes of pharmaceutical solids that is essential for research and development of solid dosage forms. Besides the topographic images, it is possible to obtain quantitative data about roughness, hardness and elastic/plastic properties of investigated surfaces. According to that, atomic force microscopy is used in preformulation studies, particle engineering, and investigations of material's "bulk" and surface properties as well as particle interactions. Additionally, this technique is practical in characterization of surface properties of solid forms such as film coated pellets and tablets and analysis of primary packaging made from polymeric and glass materials.

Keywords: atomic force microscopy, surface and mechanical properties, preformulation studies

1 Uvod

V farmaciji uporabljamo številne pristope za vrednotenje farmacevtskih snovi, predvsem in najprej v predformulacijskih študijah, kar omogoča razvoj in proizvodnjo ustrezno kakovostnih farmacevtskih oblik. Različne učinkovine ter pomožne snovi, praviloma v trdnem stanju, zahtevajo različne pristope ter tehnike vrednotenja: optična in elektronska mikroskopija, rengentska praškovna difraktometrija, različne spektroskopske tehnike (FTIR - Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija, Ramanska spektroskopija, NMR – Jedrska magnetna resonanca), termične (DSC - Diferenčna dinamična kalorimetrija, TGA – Termogravimetrična analiza, TMA – Termomehanična analiza) in druge (1).

Razvoj novih farmacevtskih oblik in dostavnih sistemov zahteva tudi razvoj novih metod za vrednotenje površinskih lastnosti na nanometriškem nivoju, še posebej nedestruktivnih tehnik, kot je npr. vrstična preiskovalna mikroskopija (ang.: *Scanning Probe Microscopy* – SPM). Osnovne vrste SPM tehnik so mikroskopija na atomsko silo (ang.: *Atomic Force Microscopy*, AFM), vrstična tunelska mikroskopija (ang.: *Scanning Tunneling Microscopy*, STM) ter bližnja vrstična optična mikroskopija (ang.: *Near-field Scanning Optical Microscopy*, NSOM). Mikroskopija na atomsko silo daje vpogled in omogoča razumevanje fizikalno-kemijskih in mehanskih lastnosti učinkovin in pomožnih snovi, kar je izjemnega pomena za razvoj in načrtovanje farmacevtskih oblik, predvsem pa trdih (2).

V primerjavi z ostalimi SPM tehnikami se je AFM izkazala kot bolj zmogljiva in vsestranska tehnika, ker omogoča vizualizacijo neprevodnih in prevodnih vzorcev v tekočinah, zraku in vakuumu (preglednica 1) (2).

Preglednica 1: Značilnosti AFM in drugih mikroskopskih tehnik (2).

Table 1: Main characteristics of AFM and other microscopic techniques (2).

Značilnosti	SEM/TEM	AFM
Vzorec	Neprevoden/Prevoden	Neprevoden/Prevoden
Merjenje	2D	3D višine, hrapavost
Pogoji snemanja	Vakuum	Vakuum/Zrak/Teškočina
Čas snemanja	0.1- 1 min	1-5 min
Ločljivost v ravnini slike	0.2 nm (TEM) 5 nm (FE-SEM)	0.2 nm
Velikost površin snemanja	100 nm (TEM) 1 mm (SEM)	100 μ m

2 Princip delovanja AFM

Princip delovanja AFM je prikazan na sliki 1 in temelji na merjenju odmika tipala (nosilec + konica), ki ga po površini vzorca premikamo. Odmik tipala je posledica delovanja različnih sil, t.j. van der Waalsovih, elektrostatskih, magnetnih, ionskih in kapilarnih med površino vzorca in vrhom konice tipala. Gibanje tipala omogoča piezoelektrično vodilo. Laserski žarek, ki se odbija od tipala, detektiramo s krajevno občutljivim fotodetektorjem (angl.: *position sensitive photodetector*) ter merimo vertikalni (topografija) in tudi lateralni premik konice tipala (trenje). Zelo velika občutljivost detektorja zagotavlja zaznavanje spremembe položaja konice, ki je manjša od 10 Å. Povratna zanka med fotodiodo in piezoelektričnim vodilom zagotavlja vzdrževanje konstantne sile, amplitude ali faze nihanja v ravnovesni legi (angl.: *set point*). AFM slika oziroma kontrastiv slikah nastanejo zaradi številnih interakcij med atomi na vrhu konice z atomi na površini vzorca (3).

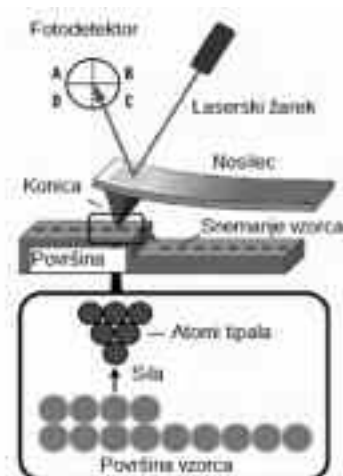
3 Načini vizualizacije površin vzorcev z AFM

Osnovni načini preiskovanja površin vzorcev z uporabo AFM so naslednji:

- Kontaktni način snemanja (angl.: *Contact mode*) – CM AFM
- Tipalni način snemanja (angl.: *Tapping mode*) - TM AFM
- Nekontaktni način snemanja (angl.: *Non-contact mode*) - NC AFM

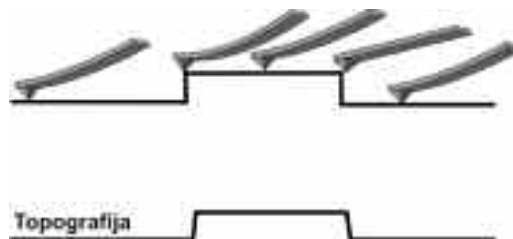
3.1 Kontaktni način snemanja

Konica tipala je med preiskovanjem v direktnem stiku s površino vzorca, tako da med njima prevladujejo medatomske odbojne sile. Rezultat stika med konico in vzorcem predstavlja upogib tipala pri čemer s spremljanjem lege ročice nad površino vzorca dobimo sliko oziroma topografijo površine (Slika 2) (4,5).



Slika 1: Shematski prikaz delovanja mikroskopa na atomsko silo (AFM) (3).

Figure 1: Basic principle of AFM (3).

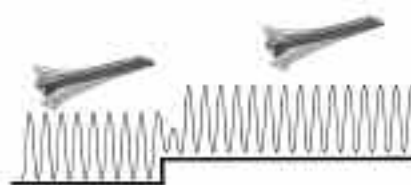


Slika 2: Kontaktni način AFM snemanja.

Figure 2: Contact mode AFM.

3.2 Tipalni način snemanja

V tem načinu konica tipala oscilira z lastno frekvenco in se v določenem delu svojega nihalnega cikla dotakne površine vzorca (Slika 3). Dvigovanje in spuščanje konice je posledica nihanja nosilca konice, ki ga z lastno frekvenco vzbuja piezoelektrično vodilo. Pri dotiku se amplituda osciliranja zmanjša, kar predstavlja merilo za ohranjanje konstantne razdalje med konico tipala in površino vzorca (4,5).

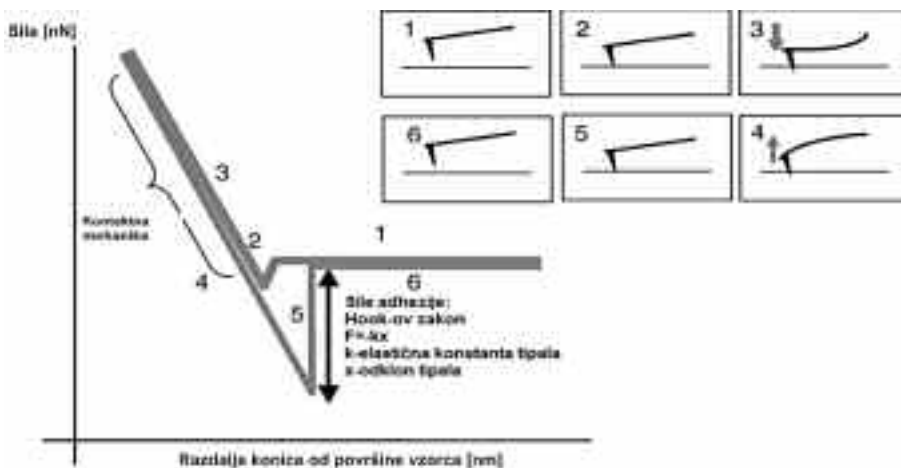


Slika 3: Tipalni način AFM snemanja.

Figure 3: Tapping mode AFM.

3.3 Nekontaktni način

Pri nekontaktnem načinu tipalo niha nad površino vzorca z majhno amplitudo in določeno lastno frekvenco (Slika 4). Na majhnih razdaljah (1-10 nm) so med konico tipala in površino vzorca prisotne van der

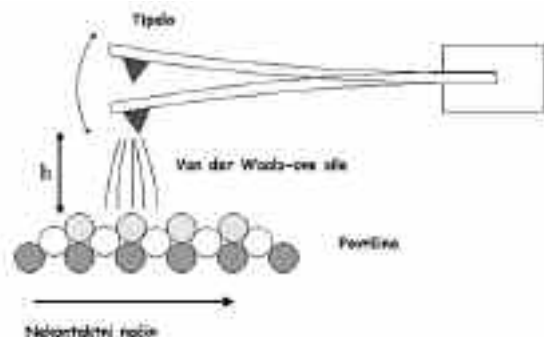


Slika 5: Odvisnost sile od razdalje konice od površine vzorca (2).

Figure 5: Force – distance curve (2).

Waalsove, elektrostatske, magnetne in/ali kapilarne sile. Frekvenca osciliranja se zato zniža, amplituda pa zmanjša (2).

V nadaljevanju so predstavljene AFM tehnike za vrednotenje mehanskih lastnosti trdnih snovi, ki so pomembne predvsem v farmacevtsko-tehnoloških procesih, kot so npr. mletje, mešanje in stiskanje.



Slika 4: Nekontaktni način AFM snemanja.

Figure 4: Non-contact mode AFM.

3.4 AFM tehnike za določanje mehanskih lastnosti

Spektroskopija sil

Spektroskopija sil, »Force Spectroscopy«, predstavlja merjenje sil, ki so prisotne med konico tipala in površino preiskovanega vzorca, v odvisnosti od razdalje med njima. Na ta način je možno poleg merjenja adhezije določati tudi nano-mehanske lastnosti snovi (npr. elastičnost, slika 5). Na začetku je tipalo oddaljeno od površine vzorca in zato ni interakcij med konico in preiskovano površino (Slika 5-1, 5-2). S približevanjem konice pa kapilarne sile staknejo konico s površino (angl.: *jump to contact*) (Slika 5-3). Ta stik je odvisen tudi od debeline plasti kondenzirane vode na površini vzorca, ki je praviloma vselej prisotna, razen če ne izvajamo eksperimenta v vakuumu oz. popolnoma posušenem zraku (plinu). Kadar pride do prekrivanja elektronskih

oblakov atomov konice zatmina površini vzorca, se pojavijo odbojne sile, ki povzročijo odboj tipala od površine (Slika 5-4, 5-5, 5-6) (2).

Nanoindentacija (angl.: Nanoindentation)

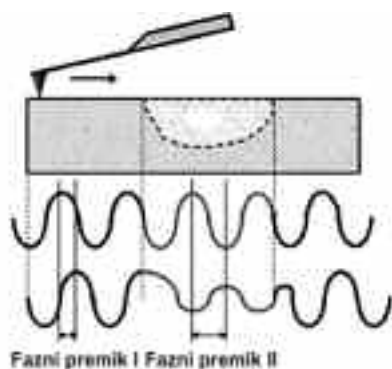
Nanoindentacija je tehnika, ki omogoča pregledovanje površine vzorcev in študijo lokalnih mehanskih lastnosti s pomočjo merjenja sil v odvisnosti od položaja konice. Metoda temeljna deformaciji površine vzorca z AFM tipalom. Iz dobljenih podatkov določimo parametre kot so Young-ov modul elastičnosti, trdnost snovi (angl.: *hardness*), mejno silo (angl.: *yield stress*) in lomno trdnost (angl.: *fracture toughness*) (2).

Nanoindentacijoin spektroskopijosil praviloma izvajamo v kontaktnem načinu snemanja (CM-AFM). Za določanje razlik v teksturi materialov uporabljamo:

- Mikroskopijo na vzdolžno silo (angl.: **Lateral force/Frictional forcemicroscopy**) – omogoča določitev koeficienta trenja na osnovi ukrivljanja tipala med snemanjem. V temu primerju lahko npr. z merjenjem torzijske obremenitve ročice identificiramo sestavine polimernih oblog, ki imajo različne koeficiente trenja, izmerimo debelino polimernih oblog (filmov) in detektiramo v njih eventualno prisotne nečistote.
- Fazno slikanje (angl.: **Phase imaging**)

Kontrast na AFM slikah je posledica razlik v mehanskih lastnostih preiskovanih površin, kot sta npr. adhezivnost in elastičnost. Da bi dobili jasno sliko topografije površine, mora biti analizirani material relativno tog v primerjavi s tipalom. Če je material mehek, je kakovost nastale slike odvisna od elastičnih lastnosti površine vzorca. V ekstremnih primerih lahko interakcija v obliki direktnega kontakta med tipalom in vzorcem povzroči tudi spremembo površine.

Med preiskovanjem s tipalnim načinom, se zmanjšanje amplitude in sprememba frekvence nihanja kaže v zmanjšanju energije osciliranja zaradi prenosa energije v vzorec. Znižanje amplitude osciliranja povzroči premik faze osciliranja tipala. Fazni premik kot funkcija različno absorbirane energije je značilnost trdnih in mehkih materialov (slika 6) (2).



Slika 6: Tipalni način: tipalo oscilira z lastnofrekvenco. Ko se dotakne vzorca, pride do zmanjšanja amplitude nihanja kot tudi faznega premika fazni premik II (2).

Figure 6: Tapping mode AFM: cantilever oscillates with its resonance frequency. When brought into contact with the sample, a damping of the lower amplitude as well as a phase shift are observed (2).

4 AFM preiskave materialov, farmacevtskih oblik in ovojnine

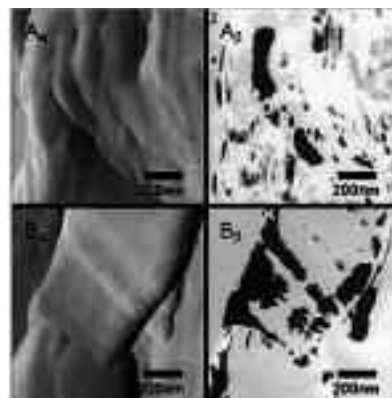
4.1 Predformulacijske študije

Razvoj optimalnih farmacevtskih oblik zahteva podrobne raziskave materialov v času predformulacijskih študij, kot so npr. določitev števila polimorfnih oblik, prisotnost amorfne snovi, ugotavljanje interakcij med učinkovinami in pomožnimi snovmi, določitev oblike in velikosti delcev, proučevanje stabilnosti in topnosti ter procesa raztapljanja.

Mletje trdnih snovi je visoko energijski proces in lahko povzroči nastanek amorfne oblike. Amorfna oblika je termodinamsko nestabilna in lahko pri določenih atmosferskih pogojih (T, RV), ki zagotavljajo primerno visoko mobilnost molekul, prehaja v kristalno obliko. Znano je, da je po procesu mletja (mikronizacije) prisoten praviloma zelo majhen odstotek amorfne oblike, ki je locirana na površini trdnih delcev, katerih notranjost pa je še vedno lahko popolnoma kristalinična (6). Iz tega razloga se takšna snov lahko obnaša kot popolnoma amorfna, in predvsem tedaj, ko gre za pojave, ki so omejeni izključno na mejne površine (npr. adsorpcija vlage ali drugih plinov). AFM je tehnika, ki omogoča direktno vizualizacijo amorfne regije na površini kristaliničnih snovi po mletju oz. mikronizaciji. Poleg uporabe tipalnega načina (TM-AFM) za preiskavo površin, se je za fazno slikanje (ang.: *Phase Imaging*) izkazala kot dodatna tehnika, ki omogoča vrednotenje površine trdnih snovi. S svetlimi toni so prikazana trša kristalinična mesta in s temnimi mehkejša amorfna področja. Na ta način je lahko npr. postaviti korelacijo med časom mletja kristalinične snovi in tvorbo amorfne oblike na površini delcev (slika 7). *Begat s sodelavci* (7) so na ta način ugotavljali optimalen čas mikronizacije salbutamola (kot sulfata), ki se sicer uporablja v inhalacijskih farmacevtskih oblikah za bronhodilatacijo.

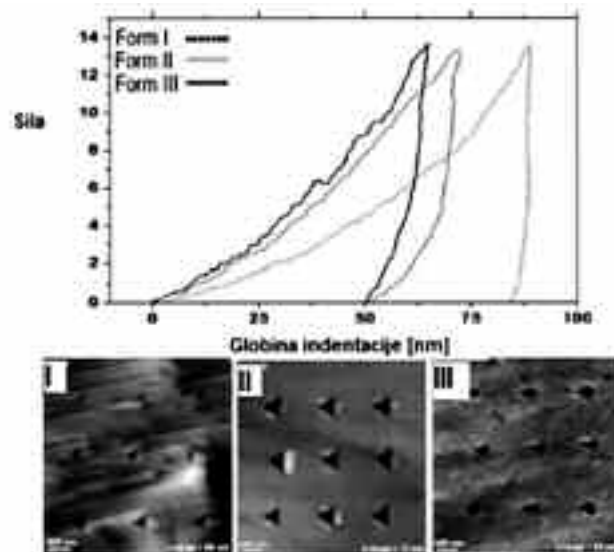
Površinsko aktivacijo v amorfne regijah, ki je nastala zaradi mehanske deformacije in spremembe kristalov salbutamola med procesom mletja,

je posledica razlik fizikalno-mehanskih lastnosti površin. Vzrok temu so lokalno različno urejena področja molekul in različnih interakcij med njimi (7).



Slika 7: Topografija površine delcev salbutamolijevega sulfata (Aa, Ba) ter primerjava s faznimi slikami (A_β, B_β) po 6-min (A) in 12-min (B) mletja (7).

Figure 7: Topographical AFM amplitude images (Aa, Ba) with accompanying phase shift data (A_β, B_β) for salbutamol sulfate crystal surfaces after exposure to (A) 6-min and (B) 12-min milling times (7).



Slika 8: Odvisnosti sile od globine indentacije treh polimorfnih modifikacij karbamazepina -zgoraj; Topografije površin polimorfne oblike karbamazepina I, II, III po nanoindentaciji – spodaj (10).

Figure 8: An illustration of the force-indentation plots for three forms of carbamazepine. The respective AFM images are also shown highlighting the indentation profiles (10).

Poleg merjenja adhezije z uporabo krivulj sila/razdalja (slika 5), lahko informacije o mehanskih lastnostih površine vzorca pridobimo tudi s tehniko nanoindentacije. Mehanske lastnosti posameznih sestavin

določajo njihovo obnašanje med drobljenjem, mešanjem ali/in stiskanjem (npr. kompaktiranje ali tabletiranje). Relevantne parametre sestavin določamo na osnovi odvisnosti sile od odmika tipala z uporabo različnih modelov, kot sta npr. Hertz-ov in Oliver/Pharr-ov. Hertz-ov model popisuje elastično deformacijo dveh homogenih površin (konice ter vzorca) pri določeni sili, pri čemer upošteva, da med konico in tipalom ne pride do adhezije. Ta model se najpogosteje uporablja za izračun Young-ovega modula elastičnosti proučevanega vzorca in idealno trde (referenčne) površine, kot je npr. sljuda ali steklo(8). Oliver/Pharr-ov model pa omogoča na osnovi stične površine in sile indentacije izračun trdnosti, togosti ter mejne sile (ang.: *yield stress*), pri kateri pride do plastične deformacije (9).

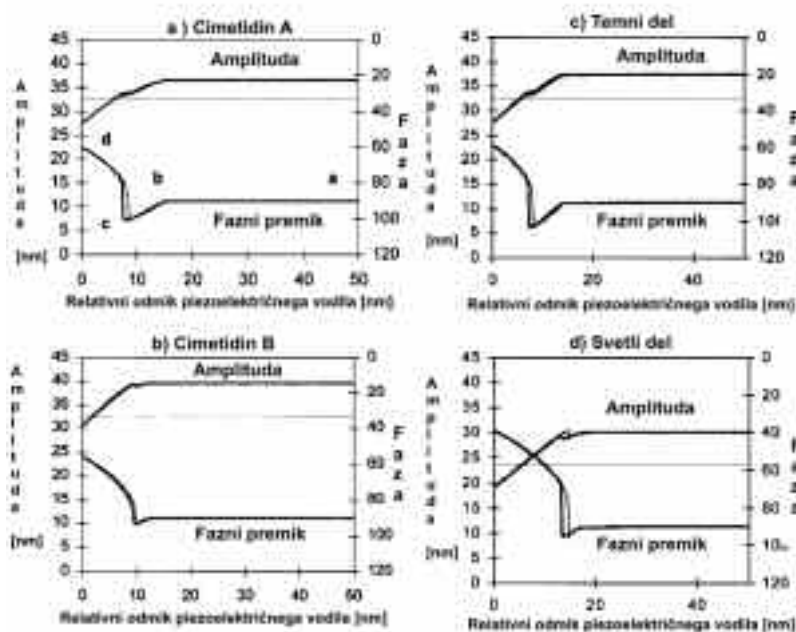
Praktična uporabnost nanoindentacije je npr. ugotavljanje povezave med mehanskimi lastnostmi materialov in spremembe površinskih ter »bulk« lastnosti pri drobljenju ali mešanju (10).

Perkins *et al.* so z nanoindentacijo proučevali povezavo med mehanskimi lastnostmi, površinsko energijo in mletjem polimorfnih oblik karbamazepina. Karbamazepin obstaja v treh polimorfnih modifikacijah, ki se medsebojno razlikujejo v mehanskih lastnostih in po adheziji. Največji Young-ov modul elastičnosti ter največjo trdnost kaže oblika III. Primerjava materialov na osnovi površinske energije je pomembna v fazi razvoja farmacevtske oblike, ker daje informacije o njihovih adhezivnih in kohezivnih lastnostih. Na splošno velja, da materiali z višjo površinsko

energijo izkazujejo močnejšo adhezijo in kohezijo. Na osnovi raziskave površinske energije z AFM so ugotovili, da ima oblika III karbamazepina najnižjo površinsko energijo in zato posledično šibko ad(ko)hezivnost (slika 8) (10).

Najpogosteje se razlike med polimorfnimi modifikacijami učinkovin izražajo kot razlike v biološki uporabnosti zaradi različne topnosti (ampicilin, ritonavir) ter različnih profilov raztapljanja (prednizolon). TM-AFM se je pokazal kot ustrezno orodje za razlikovanje med polimorfnimi oblikami cimetidina (A in B), specifičnega kompetitivnega antagonist – receptorjev H_2 . S tehniko faznega slikanja so ugotovili prisotnost več kot enega polimorfa v zmesi, s pomočjo meritev amplitude/razdalje pa so identificirali polimorfni obliki A in B na osnovi njunih različnih adhezivnih lastnosti (slika 9) (1).

V točki *a* na krivulji amplituda/razdalja tipalo niha z določeno resonančno frekvenco in na določeni razdalji od površine vzorca (Slika 6a). V točki *b* se tipalo nahaja na razdalji, ko so že prisotne privlačne sile med njim in molekulami na površini vzorca. Posledično pride do zmanjšanja amplitude nihanja ter povečanja faznega zamika. V stiku konice z vzorcem (točka *c*) se pojavijo odbojne (repulzivne) sile, kar se kaže v dodatnem znižanju amplitude nihanja ter dodatnem faznemu zamiku. Iz grafov (slika 9) je razvidno, da ima polimorfna oblika A bolj izražen privlačni (adhezivni) del (b) v primerjavi s polimorfno obliko B. To



Slika 9: Odvisnost amplitude tipala od relativne razdalje in krivulje faznega zamika: (a) Polimorf A; (b) Polimorf B; (c) temna regija zmesi polimorfov (50:50) in (d) svetla regija zmesi polimorfov (50:50).

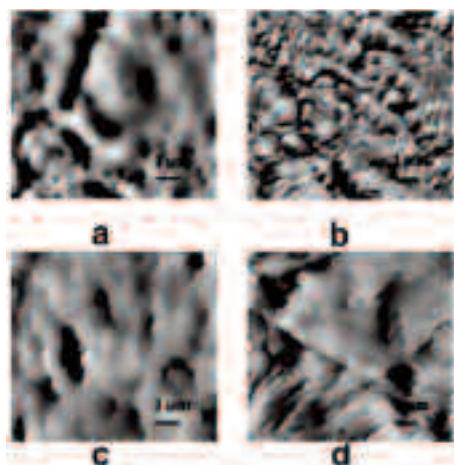
Figure 9: Amplitude and phase to distance (a-p,d) curves from (a) polymorph A disk, (b) polymorph B disk, (c) dark region of a 50:50 mixed disk, and (d) light region of a 50:50 mixed disk.

pripisujejo različni porazdelitvi molekul na površini te modifikacije v primerjavi z drugo (1).

4.2 AFM vrednotenje površin trdnih farmacevtskih oblik

4.2.1. Vrednotenje površine tablet

Optična in elektronska mikroskopija podajata kvalitativne informacije o lastnostih površin, kvantitativnih podatkov, npr. hrapavosti površin, pa z njima ni možno pridobiti. Hrapavost površin je npr. izjemnega pomena pri interakcijah med delci (npr. pri mešanju ali drobljenju) ali pa pri procesih oblaganja pelet in tablet. Ena od uporabljanih metod za določanje površinske hrapavosti je laserska profilometrija (11). Danes se za to uporablja tudi AFM, ki kvantificira hrapavost površin z visoko lateralno (1 nm) in višinsko ločljivostjo (0,1 nm). Pomanjkljivost tehnike je majhna velikosti analizirane površine vzorca, daljši čas analize in nujnost ravnih površin. (12).



Slika 10: Topografija površine tablet. (a) KCl tablete stisnjene s silo 80 kN (površina 10 μm x 10 μm , višina 100 nm). (b) 30 kN KCl tablete (površina 10 μm x 10 μm , višina 320 nm). (c) 80 kN NaCl tablete (površina 10 μm x 10 μm , višina 300 nm). (d) 30 kN NaCl tablete (površina 10 μm x 10 μm , višina 350 nm) (12).

Figure 10: AFM micrographs of the tablets. (a) 80 kN KCl tablet measurement area 10 μm x 10 μm , height 100 nm. (b) 30 kN KCl tablet measurement area 10 μm x 10 μm , height 320 nm. (c) 80 kN NaCl tablet measurement area 10 μm x 10 μm , height 300 nm. (d) 30 kN NaCl tablet measurement area 10 μm x 10 μm , height 350 nm (12).

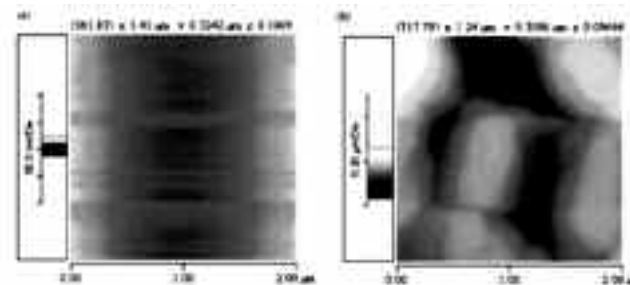
Površine tablet KCl in NaCl, stisnjene pri dveh različnih silah stiskanja (30 kN in 80 kN), so vrednotili z lasersko profilometrijo, elektronsko mikroskopijo in AFM. Parametri hrapavosti kot so Ra (angl.: *roughness average*), Rms (angl.: *root mean square roughness*) in Rp-v (angl.: *peak to valley height*), dobljeni z AFM tehniko, so potrdili višjo hrapavost površine tablet NaCl. To je potrdila tudi laserska profilometrija. Večja sila stiskanja je po pričakovanju zagotovila nastanek bolj gladkih površin tablet. Sila stiskanja 80 kN je povzročila nastanek plastne strukture, ki bi lahko bila rezultat sintranja delcev NaCl (Slika 10). AFM meritve hrapavosti na majhnih površinah tablet (10 μm x 10 μm) odslikavajo bolj

hrapavost posameznih kristaliničnih delcev in njihovo deformacijo zaradi sile stiskanja. Ne dobimo pa s tem pristopom hrapavosti celotne površine tablet, kar sicer zagotavlja laserska profilometrija (12).

4.2.2. Vrednotenje filmsko obloženih pelet

Filmsko oblaganje pelet in tablet predstavlja pogost način nadziranja hitrosti sproščanja zdravilnih učinkovin. Funkcionalnost obloženih farmacevtskih oblik je zelo odvisna od kakovosti polimerne obloge.

Znana je raziskava, ko so spomočjo CM-AFM proučevali (ne)kompatibilne snovi v polimernih oblogah iz Eudragit® RS 30 D. Na osnovi SEM in AFM podatkov so ugotovili, da dodatek hidrofilnega polimera hidroksietilceluloze (HEC) prepreči koalescenco med polimernimi molekulami ter zgoščevanje in homogenost nastalega filma (Slika 11). Ker HEC v Eudragit® RS 30 D ni netopna, nastane bolj porozen film, ki ima večjo permeabilnost in zato zagotavlja hitrejše sproščanje teofilina iz obloženih pelet (13).



Slika 11: AFM topografija polimernega filma. (a) Eudragit RS 30 D; (b) Eudragit RS 30 D in 10% hidroksietilceluloze (13).

Figure 11: AFM topography of polymeric films. (a) Eudragit RS 30 D; (b) Eudragit RS 30 D and 10% hydroxyethyl cellulose (13).

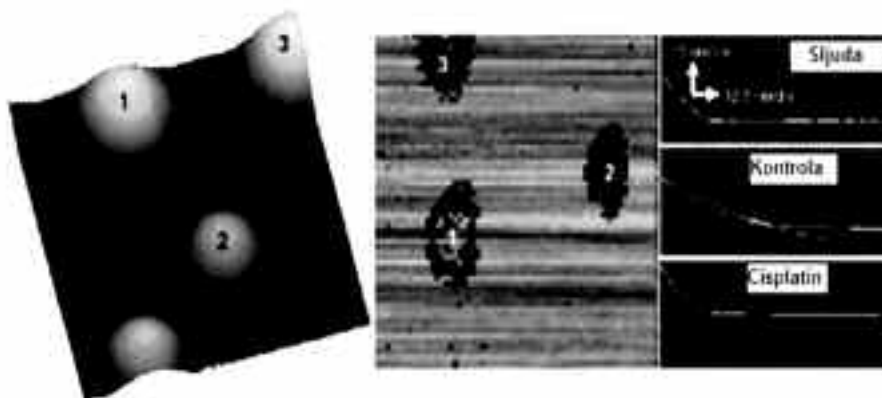
4.3 AFM študije liposomov

Rigidnost liposomov je ključnega pomena za sproščanje enkapsuliranih učinkovin. Meritve rigidnosti (togosti) liposomov je mogoče izvesti z nanoindentacijo, za vrednotenje površinskih lastnosti ter velikosti in oblike liposomov pa je primeren tipalni način AFM, predvsem zaradi zelo občutljive strukture liposomov. Raziskovalci so na primeru vgrajenega cisplatinu, alkilirajočega citostatika, z AFM potrdili 100% povečanje rigidnosti površine glede na liposome brez učinkovine. Preko spremembe togosti so zato lahko ocenjevali učinkovitost učinkovine vgrajevanja v liposomsko strukturo (14).

Krivulje odvisnosti sile od razdalje določene na sljudi, idealno trdni površini (sestavljene iz silikatov aluminija, magnezija ter kalija), liposomih brez vgrajenega cisplatinu ter liposomih z vgrajenim cisplatinom potrjujejo zmanjšanje elastičnosti po vgradnji učinkovine (slika 12)(14).

4.4 Uporaba AFM pri inhalacijskih aerosolih za lokalno in sistemsko dostavo učinkovin

Inhalacija predstavlja način dostave zdravilnih učinkovin v pljuča z namenom doseganja lokalnega ali sistemskega učinka. Uporabljajo se inhalatorji pod tlakom z odmernim ventilom (angl.: *pressurized metered dose inhalers*) ter inhalatorji za suhe praške (angl.: *dry powder inhalers*).



Slika 12: Fizikalne lastnosti liposomov z vgrajenim cisplatinom. Topografija površine 4 različnih liposomov (levo). Mapiranje adhezije pri analizi »Force-Volume« (v sredini). Krivulje sila razdalja na idealno trdi površini- sljuda, liposomu brez cisplatinu ter liposomu z vgrajenim cisplatinom (desno).

Figure 12: Physical properties of cisplatin-encapsulated liposomes. Left panel: AFM height mode image of different liposomes. Middle panel: Adhesion map of liposomes acquired during force volume mapping. Right panels: AFM force curves on a hard mica surface (top), liposome without cisplatin (middle), and liposome encapsulated cisplatin (bottom).

V obeh primerih je dostava učinkovine v pljuča primarno vezana na lastnosti trdnih sestavin, tako učinkovin kot pomožnih snovi. Adhezija oziroma interakcija učinkovine s pomožnimi snovmi ter ovojnino je kritični parameter. Adhezijske sile namreč odločajo o hidrodinamskih lastnostih, kar je pomembno za proizvodnjo ter odmerjanje. Primarne interakcije, ki zagotavljajo adhezijo so privlačne van der Walsove ali elektrostatske sile, če so prisotni tudi nabiti delci (15).

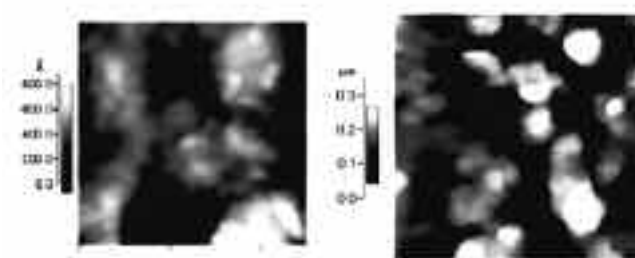
Eve in sodelavci so proučevali adhezijo salbutamola (pritrjenem na AFM tipalu) z laktozo, salbutamolom, steklom ter fluoropolimerom (PTFE). Fluoropolimeri se pogosto uporabljajo kot obloga v inhalatorjih z namenom zmanjšati adhezijo na stenah ovojnine inhalatorja. Laktoza monohidrat se uporablja za izdelavo suhih praškov za inhalacijo kot diluent ali kot nosilec zdravilne učinkovine za izboljšanje hidrodinamskih lastnosti ter zmanjšanja nastanka aglomeratov (16).

Z analizo spektroskopije sil so ugotovili naslednje zaporedje interakcij med salbutamolom in preiskovanimi snovmi: steklo>laktoza>salbutamol>PTFE. Iz tega lahko sklepamo, da je laktoza najprimernejši nosilec za salbutamol, ter da je PTFE najbolj primeren material za ovojnino. Visoka vrednost adhezije med salbutamolom in steklom kaže, da le-to pri teh inhalatorjih ni primerno kot ovojnina (16).

4.5 AFM preiskave ovojnine

Infuzije za popolno parenteralno prehrano (angl.: Total Parenteral Nutrition –TPN), ki vsebujejo aminokislino, elektrolite ter glukozo, se praviloma pakirajo kot suhi praški v stekleni obojnini. Z AFM študijami so potrjevali primernost alternativne polimerne ovojnine, in kot najbolj primerni materiali so se pokazali kopolimer etilen-vinilacetata (EVA), polietilen (PE) in poli-vinilklorid (PVC). Osnovni problem uporabe polimerne ovojnine predstavlja adsorpcija sestavin infuzijskih raztopin. Shranjevanje TPN v polimernih vrečkah vpliva na polarni del površinske energije, kar se kaže v povečani močljivosti ovojnine. Disperzijski prispevek se ob tem bistveno ni spremenil. Sprememba površine zaradi adsorpcije sestavin iz TPN je odvisna od časa shranjevanja in hidrofobnih ter hidrofilnih lastnosti sestavin. Nizka hidrofilnost PE zagotavlja majhne

spremembe njegovih površinskih lastnosti po daljšem času shranjevanja TPN raztopin. Nasprotno pa se obnašajo polimerne vrečke iz PVC ali EVA. Z AFM so ugotovili povečanje hrapavosti površin ovojnin iz PVC in EVA, kar je povezano s povečanjem polarne prispevka površinske energije. Topografski sliki površin PVC-ja kažejo na nastanek velikih agregatov po šestih mesecih shranjevanja raztopin z aminokisljinami in glukozo (Slika 13). Iz teh rezultatov so sklepali, da so plastične vrečke iz PE zato najbolj primena ovojnina za shranjevanje infuzijskih raztopin aminokisljin, glukoze ter elektrolitov (17).



Slika 13: AFM slika notranje površine PVC vrečk pred polnjenjem z raztopino za totalno parenteralno prehrano (levo) in po 6 mesecih po polnjenju z raztopino aminokisljin (17).

Figure 13: AFM images of inner surface of plastic bags (PVC) before filling with the TPN solution (left) and after storage for 6 months with amino acid solution (17).

5 Sklep

Pomen vrstične preiskovalne mikroskopije, in predvsem mikroskopije na atomsko silo postaja v farmaciji vse bolj evidenten. Ta tehnika predstavlja močno in izjemno orodje za proučevanje površinskih lastnosti različnih farmacevtskih snovi, končnih izdelkov in materialov za ovojnino. Osnovne prednosti AFM so visoka ločljivost, enostavna priprava vzorcev ter proučevanje površinskih lastnosti vzorcev v realnih pogojih.

AFM je uporabna v vseh fazah raziskav in industrijske izdelave zdravil: študijedelcev sestavin in interakcij med njimi, preiskave mejnih površin različnih dostavnih sistemov in primernost primarnih ovojnin, predvsem v povezavi s stabilnostjo. AFM omogoča tudi pridobivanje kvantitativnih podatkov o hrapavosti, trdnosti ter elastičnosti preiskovanih površin, kar je izjemnega pomena pri optimizaciji nekaterih tehnoloških procesov (npr. drobljenja, stiskanja).

6 Literatura

1. Danesh A, Chen X, Davies MC, Roberts CJ, Sanders GHW, Tandler SJB, et al. Polymorphic Discrimination Using Atomic Force Microscopy: Distinguishing between Two Polymorphs of the Drug Cimetidine. *Pharm Res* 2000; 17 (7): 887-890.
2. Butt H, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep* 2005;59(1-6):1-152.
3. Blanchard CR. Atomic Force Microscopy. *Chem Educator* 1996;1(5):1-8.
4. Jalili N, Laxminarayana K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics* 2004;14(8):907-945.
5. Tivadar A, Kočevar K, Mušević I, Srčić S. Mikroskopija na atomsko silo. *Farm Vest* 2002; (53):277-291.
6. Ward GH, Schultz RK. Process-induced crystallinity changes in albuterol sulfate and its effect on powder physical stability. *Pharm Res* 1995;12(5):773-779.
7. Begat P, Young PM, Edge S, Kaerger JS, Price R. The effect of mechanical processing on surface stability of pharmaceutical powders: visualization by atomic force microscopy. *J Pharm Sci* 2003;92(3):611-620.
8. Heim L, Blum J, Preuss M, Butt H. Adhesion and Friction Forces between Spherical Micrometer-Sized Particles. *Phys Rev Lett* 1999;83(16):3328.
9. Taylor LJ, Papadopoulos DG, Dunn PJ, Bentham AC, Mitchell JC, Snowden MJ. Mechanical characterisation of powders using nanoindentation. *Powder Technol* 2004;143-144:179-185.
10. Perkins MC, Bunker M, James J, Rigby-Singleton S, Ledru J, Madden-Smith C, et al. Towards the understanding and prediction of material changes during micronisation using atomic force microscopy. *Eur J Pharm Sci* 2009;38(1):1-8.
11. Luo X-, Silikas N, Allaf M, Wilson NHF, Watts DC. AFM and SEM study of the effects of etching on IPS-Empress 2TM dental ceramic. *Surf Sci* 2001;491(3):388-394.
12. Seitavuopio P, Rantanen J, Yliruusi J. Tablet surface characterisation by various imaging techniques. *Inter J Pharm* 2003;254(2):281-286.
13. Zheng W, Sauer D, McGinity JW. Influence of hydroxyethylcellulose on the drug release properties of theophylline pellets coated with Eudragit RS 30 D. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;59(1):147-154.
14. Ramachandran S, Quist AP, Kumar S, Lal R. Cisplatin Nanoliposomes for Cancer Therapy: AFM and Fluorescence Imaging of Cisplatin Encapsulation, Stability, Cellular Uptake, and Toxicity. *Langmuir* 2006;22(19):8156-8162.
15. Staniforth JN. Performance-Modifying Influences in Dry Powder Inhalation Systems. *Aerosol Sci Tech* 1995;22(4):346.
16. Eve JK, Patel N, Luk SY, Ebbens SJ, Roberts CJ. A study of single drug particle adhesion interactions using atomic force microscopy. *Inter J Pharm* 2002;238(1-2):17-27.
17. Realdon N, Zennaro L, Perin F, Bettero A, Bortoluzzi S, Rigo A, et al. Surface characterisation of bags for total parenteral nutrition by tensiometry and atomic force microscopy. *Int J Pharm*;265(1-2):27-35.

Glukozamin za peroralno zdravljenje osteoartroze

Glucosamine for oral treatment of osteoarthritis

Marjetka Pal, Matja Vogrin, Polonca Ferk

Povzetek: Osteoartraza (OA) je najpogostejša degenerativna bolezen sklepov. Zdravljenje OA je omejeno predvsem na lajšanje simptomov z analgetiki. V zadnjih nekaj letih se je tudi v Sloveniji močno razširila peroralna uporaba glukozamina, ki naj bi imel vpliv na simptome OA in mogoče tudi na strukturne spremembe v sklepih. Njegovo učinkovitost in varnost so proučevali v številnih kontroliranih kliničnih študijah, vendar so rezultati o učinkovitosti nasprotujoči. Molekularni mehanizmi delovanja glukozamina še niso popolnoma pojasnjeni. Na podlagi dosedanjih študij sklepajo, da je glukozamin varna učinkovina z malo in blagimi neželenimi učinki. Vključen je v večino priporočil za zdravljenje OA kolena, za ostale sklepe pa obstaja malo dokazov o njegovi učinkovitosti.

Ključne besede: osteoartraza, glukozamin, učinkovitost, varnost, priporočila

Abstract: Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative joint disease. Treatment of OA is limited to alleviate symptoms by the use of analgetics. In Slovenia, the oral use of glucosamine has expanded in recent years. Glucosamine may have symptomatic effect on OA and perhaps also on structural changes in joints. Despite multiple controlled clinical trials on efficacy and safety of glucosamine, the findings concerning efficacy are still controversial. Molecular mechanisms of action of glucosamine are not fully explained yet. According to the present studies, glucosamine is a safe active substance with few and mild adverse effects. Glucosamine is included in the majority of recommendations for the management of knee OA. However, less evidence exists about its efficacy on other joints.

Key words: osteoarthritis, glucosamine, efficacy, safety, recommendations

1 Uvod

Med degenerativnimi boleznimi sklepov je najpogostejša osteoartraza (OA; MIM165720). Angleško govoreči pisci pogosto uporabljajo izraz osteoarthritis, označujoč klinični sindrom sklepne bolečine s prisotnim vnetjem sinovije in spremljajočo gibalno omejenostjo ter zmanjšano kakovostjo življenja. Prevalenco in incidenco OA je težko natančno določiti, ker bolnikovi simptomi ne sovpadajo vedno s strukturnimi (radiološkimi) znaki bolezni in tudi zaradi nejasne meje začetka bolezni. Prevalenca OA narašča s starostjo. Pri starostnikih nad 65 let je prevalenca pri ženskah okrog 68 % in pri moških okrog 58 % (1). Ocenjujejo, da ima v Evropski uniji OA okrog 100 milijonov ljudi. Do leta 2020 bo OA zaradi staranja prebivalstva četrti najpogostejši vzrok za gibalno nezmožnost (2).

Bolezen lahko odkrijemo kot rentgensko nenormalnost – radiografska OA ali po njenih značilnih simptomih – simptomatska OA. Ločimo lahko tudi primarno ali idiopatsko obliko ter sekundarno obliko. Pri prvi igrajo pomembno vlogo dedni dejavniki, spol, starost, hormonsko stanje, kostna gostota, debelost, klimatske razmere in prehrana. Sekundarna oblika je lahko posledica poškodbe, prirojjenih anomalij, čezmernih obremenitev sklepa ali drugih bolezni (1). Osteoartraza je presnovno

aktiven, dinamičen proces, ki lahko prizadene vsa sklepna tkiva (hrustanec, subhondralno kost, sinovijo, sklepno kapsulo, meniskuse, ligamente in periartikularno mišičje). Predilekcijska mesta pojavljanja pri starostnikih so kolena, kolki in distalni interfalangealni sklepi na rokah, bolezen pogosto prizadene tudi stopala in hrbtenico. O generalizirani obliki OA govorimo, ko so prizadete tri ali več skupin sklepov.

Glavni cilji pri trenutnem zdravljenju OA so zmanjšanje bolečine, izboljšanje gibljivosti in upočasnitev progresije bolezni. Priporoča se kombinacija nefarmakološkega (npr. fizikalna terapija) in farmakološkega zdravljenja, pogosto je potrebno tudi kirurško posredovanje (1). Težko bi rekli, da poznamo zdravilo za OA. Trenutna farmakološka terapija temelji namreč na zmanjševanju simptomov in znakov bolezni z analgetiki, v manjši meri pa vpliva na potek razvoja OA. Nekatere učinkovine vplivajo na razvoj bolezni šele dolgoročno in te je Mednarodna organizacija za raziskovanje osteoartritisa (OARSI, ang. Osteoarthritis Research Society International) poimenovala kot počasi delujoča zdravila za osteoarthritis (SADO, ang. Slow Acting Drugs in Osteoarthritis). Ta se delijo v dve skupini: simptomatsko učinkovita in zdravila, ki zavirajo progresijo bolezni. Med SADO uvrščamo med drugim glukozamin, hondroitin-sulfat in diacerein (1). Trenutno imajo v Sloveniji za peroralno zdravljenje OA dovoljenje za promet samo izdelki z glukozaminom.

2 Patogenetski mehanizmi v sklepnem hrustancu pri osteoartrozi

Sklepni hrustanec je elastično vezivno tkivo z izjemnimi mehanskimi lastnostmi. Zgrajen je iz zunajceličnega matriksa (ECM) in v njem razporejenih celic hondrocitov, ki predstavljajo le 10 % mase hrustanca, 80 % mase pa predstavlja voda. Strukturno ogrodje ECM je kolagenska mreža (predvsem kolagen tipa II), v katero so vgrajeni glikozaminoglikani in proteoglikani. Glavni proteoglikan pri humanem hrustancu je agrekan, ki tvori makromolekularne agregate s hialuronsko kislino, ti pa interagirajo s kolagenskimi vlakni. Sklepni hrustanec je avaskularen in ni oživčen. Metabolizem je anaeroben, glukoza difundira s sklepane površine ali subhondralne kosti v hrustanec. Hondrociti imajo nizko stopnjo presnovne aktivnosti, čeprav se odzivajo na mehanske dražljaje, rastne faktorje in citokine ter tako uravnavajo homeostazo hrustanca (3). V normalnem odraslem hrustancu hondrociti sintetizirajo komponente ECM zelo počasi. Ravnovesje med izgradnjo in razgradnjo sklepnega hrustanca je pri OA porušeno. Okvaro hrustanca pri OA lahko razdelimo v dve fazi. Prva je biosintezna, ko hondrociti poskušajo popraviti poškodovani ECM s povečanjem svoje anabolične aktivnosti. Izgube proteoglikanov kljub temu ne morejo preprečiti, zato sledi druga faza, v kateri je sinteza ECM zavarta, sproščajo se številni razgradni encimi, kar vodi v nadaljnjo erozijo hrustanca. V hrustancu pri OA nazadnje katabolizem prevlada nad anabolizmom, spremenijo se tudi proliferativne, sintezne ter fenotipske lastnosti hondrocitov (4).

3 Kemijske značilnosti glukoamina

Glukoamin je naravni aminomonosaharid, 2-amino-2-deoksi- α -D-glukoza. V telesu nastaja iz glukoze in je substrat za biosintezo glikozaminoglikanov in proteoglikanov, ki sestavljajo sklepni hrustanec. Glukoamin, ki se uporablja za zdravljenje OA, obstaja v treh oblikah: glukoaminijev sulfat (GS), glukoaminijev klorid (GHCl) in N-acetilglukoamin. Najpogosteje se uporablja prva oblika, ki so jo proučevali v največ študijah. Glukoamin pridobivajo iz hitina, predvsem morskih navretenčarjev ter tudi iz gliv, zato je pomembno poudariti pomen čistosti izdelkov in možnost preobčutljivostne reakcije pri ljudeh, ki so alergični na lupinarje. Glukoaminijev sulfat je nestabilna, zelo higroskopična spojina, zato ji za povečanje stabilnosti dodajajo natrijev ali kalijev klorid. To je potrebno upoštevati pri bolnikih, katerim se priporoča omejen vnos natrija oz. kalija (5).

4 Možni molekularni mehanizmi delovanja glukoamina

Sprva so učinkovitost glukoamina pripisovali predvsem njegovemu anaboličnemu učinku vgradnje v makromolekule hrustanca. Danes mu pripisujejo tudi druge mehanizme delovanja, predvsem na hrustanec: antikatabolični in protivnetni učinek, zmanjšanje oksidativnega stresa, antiapoptotično delovanje. Predpostavljajo, da je za učinek lahko pomembna tudi sulfatna skupina pri GS. Večino teh učinkov so proučevali v poskusih *in vitro* na celičnih kulturah hondrocitov. Pri tem so pogosto uporabili veliko večje koncentracije glukoamina, kot jih dosežemo v

serumu ali sinovijski tekočini pri priporočenem odmerjanju, zato rezultati teh študij ne morejo biti neposredno uporabni v klinični praksi (6, 7).

4.1 Anabolični in antikatabolični učinki

Glukoaminijev sulfat (1-150 μ M) je na celičnih kulturah izoliranih hondrocitov, pridobljenih od bolnikov z OA kolena, povečal koncentracijo agrekana in zmanjšal ekspresijo ter aktivnost metaloproteaze 3 (MMP-3). Dodatek radioaktivno označenega GS kulturi hondrocitov je povečal nastanek proteoglikanov z neposrednim privzemom glukoamina. Dodatek GHCl v mikromolarnem območju koncentracij je povečal ekspresijo kolagena II in agrekana ter povečal vsebnost sulfatiranih glikozaminoglikanov v celični kulturi hondrocitov. V nekaterih študijah pa anaboličnega učinka glukoamina pri koncentracijah do 5 mM niso potrdili, medtem ko so dokazali antikatabolični učinek z zmanjšanjem ekspresije MMP-3 in agrekanaze-1. V več študijah so dokazali, da glukoamin v fizioloških koncentracijah zmanjša aktivnost agrekanaz, ki povzročajo razgradnjo agrekana in se izločajo pod vplivom interleukina 1 β (IL-1 β) ali dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α). Če povzamemo rezultate študij *in vitro*, lahko danes sklepamo, da glukoamin izkazuje pretežno antikatabolični in v manjši meri anabolični učinek na celicah hondrocitov (7, 8).

V nekaj študijah so proučevali tudi vpliv glukoamina na osteoblaste. Glukoaminijev sulfat je v fizioloških koncentracijah na kulturah humanim osteoblastom podobnih celic povečal aktivnost alkalne fosfataze, sintezo kolagena, izločanje osteokalcina in mineralizacijo (7).

4.2 Protivnetni učinki

Glukoaminijev sulfat je v fizioloških koncentracijah v celicah hondrocitov, ki so jih stimulirali z IL-1 β , zaviral aktivacijo jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B, ki vpliva na ekspresijo mnogih protivnetnih genov. Zmanjšala se je tudi sinteza prostaglandina E2 (PGE2). Podobno je v celičnih linijah makrofagov zmanjšal nastanek TNF- α , IL-1 β in PGE2. Primerljive rezultate so opazili tudi z GHCl, z njim so v fizioloških koncentracijah dokazali tudi zmanjšanje ekspresije mRNA za inducibilno sintazo za dušikov oksid; slednja omogoča nastanek dušikovega oksida, ta pa lahko vpliva na uravnavanje apoptoze hondrocitov (7).

4.3 Zaviranje oksidativnega stresa

Osteoartroza je povezana s staranjem, zato tudi oksidativnemu stresu pripisujejo pomen pri patogenezi OA. Na zajčjih hondrocitih so dokazali, da lahko glukoamin v koncentraciji 25 mM zavre napredovali lipooksidativni proces in tako prepreči nadaljnjo razgradnjo kolagena (7).

4.4 Pomen sulfatne skupine

Nekatere študije pripisujejo poseben pomen tudi sulfatni skupini GS. Hrustanec je zgrajen iz številnih glikozaminoglikanov, ki potrebujejo pri svoji sintezi anorganski vir žvepla. V študiji na zdravih prostovoljcih so ugotovili, da GS v odmerku 1 g poveča koncentracijo anorganskega sulfata v serumu in da dodatek paracetamola to povečanje zmanjša, verjetno zato, ker se paracetamol v veliki meri presnavlja s sulfatiranjem v jetrih. V drugi študiji so pokazali, da se koncentracija sulfata v urinu pri zdravih prostovoljcih po aplikaciji GS poveča bolj pri posameznikih, ki uživajo hrano, bogatejšo z žveplom. Jemanje GS z vidika nadomeščanja sulfata je torej bolj učinkovito za ljudi z manjšim vnosom žvepla (vegetarijance ali ljudi, ki uživajo manj mesa) (7).

5 Varnost in neželeni učinki glukozamina

Odmerek glukozamina za peroralno aplikacijo, ki je smrten za 50 % populacije (LD_{50}) pri podganah in miših, je okrog 8000 mg/kg. Enoletna aplikacija velikih odmerkov pri živalih ni pokazala pomembnih neželenih ali toksičnih učinkov. V nekaterih študijah na živalih so opazili vpliv glukozamina na glukozno toleranco, lipidni profil in hemostazo. V kliničnih študijah na ljudeh ni dokazov, da glukozamin v priporočenih odmerkih vpliva na plazemske koncentracije glukoze. Ljudje z zmanjšano občutljivostjo na inzulin lahko imajo pri jemanju priporočenih odmerkov glukozamina večje tveganje za poslabšanje inzulinske rezistence in žilne funkcije v primerjavi z zdravo populacijo. Pri 12 ljudeh s sladkorno boleznijo tipa 1 ali 2 priporočeni odmerki glukozamina po dveh tednih niso statistično značilno vplivali na glikemično kontrolo, lipidni profil in raven apolipoproteina A1 (9). Dolgotrajna aplikacija glukozamina je povzročila pri miših brez gena za LDL-receptor hiperlipidemijo, vendar pojavnost ateroskleroze ni bila povečana (10). Leta 2004 je Danska agencija za zdravila (ang. Danish Medicine Agency) izdala opozorilo, da lahko glukozamin pri določenih ljudeh poviša raven holesterola. Leto kasneje je ta agencija na podlagi izsledkov belgijske študije na 212 bolnikih z OA kolena to domnevo ovrgla. Kljub temu velja opozorilo za bolj intenziven nadzor ljudi z znanim večjim tveganjem za srčno-žilne bolezni, ki uživajo glukozamin (11). Enako velja za bolnike z glukozno intoleranco ali slabo nadzorovano sladkorno boleznijo. Previdnost je potrebna tudi pri bolnikih, ki sočasno jemljejo antikoagulate, saj se lahko učinek antikoagulantov poveča. Glukozamina ne smejo jemati ljudje z alergijo na lupinarje. Previdnost je zaradi možnosti poslabšanja astme potrebna tudi pri astmatikih (10).

Blagi prehodni neželeni učinki so bili v kliničnih študijah podobni med skupino, ki je prejela placebo in skupino, ki je prejela glukozamin, ter veliko manjši kot pri zdravljenju z nesteroidnimi antirevmatikami. To je ena od glavnih prednosti glukozamina. Pogosti neželeni učinki (1 do 10 na 100 bolnikov) so gastrointestinalne motnje (epigastrična bolečina, zgaga, diareja, slabost, zaprtje) in glavobol. V redkih primerih (1 do 10 na 1000 bolnikov) se lahko pojavijo tudi kožni izpuščaji, srbenje, rdečica na koži, še redkeje (... na 1000 bolnikov) pa otekanje nog, angioedem, koprivnica, bruhanje in omotica (10).

Interakcij med glukozaminom in drugimi zdravili je malo. Previdnost je potrebna pri hkratnem jemanju tetraciklinov ali antikoagulantov (11).

Informacije o uporabi med nosečnostjo in dojenjem so skope. Pri skupini 54 nosečih žensk (34 med organogenezo), ki so jemale glukozamin, niso odkrili povečanega tveganja za teratogeni učinek. Vendar je tovrstnih študij premalo, da bi lahko tveganje v nosečnosti izključili, zato se uporaba glukozamina med nosečnostjo in dojenjem ne priporoča (12).

6 Farmakokinetika glukozamina

Farmakokinetika glukozamina se razlikuje med različnimi pripravki. Proučevali so jo na živalih in ljudeh, najpogosteje z GS. Po peroralni aplikaciji radioaktivno označenega GS zdravim prostovoljcem je bila gastrointestinalna absorpcija glukozamina 90 %, biološka uporabnost pa 40 % zaradi intenzivnega metabolizma prvega prehoda. V drugi študiji na ljudeh so določili še manjšo (26 %) biološko uporabnost (7, 13). Glukozamin se v veliki meri veže na plazemske proteine in se izloča

predvsem v izdihanem zraku kot ogljikov dioksid in voda ter v manjši meri v urinu in blatu. Aplikacija radioaktivno označenega GS pri živalih in ljudeh kaže tropizem do skeletnega sistema (kosti in hrustanec). Radioaktivnost so zaznali tudi v sinovijski tekočini (7). Pri živalih so večje koncentracije glukozamina v sinovijski tekočini zaznali še 12 ur, v serumu pa še 6 ur po peroralni aplikaciji. Plazemske in sinovijske koncentracije glukozamina po peroralni aplikaciji 1500 mg GS v enkratnem odmerku korelirajo in so v 10 mikromolarnem območju ter niso veliko večje od koncentracij pri posameznikih, ki glukozamina niso zaužili (7). To je potrebno upoštevati pri vrednotenju eksperimentalnih rezultatov pri poskusih na celičnih ali tkivnih modelih, v katerih se uporabljajo veliko večje koncentracije od tistih, ki jih dosežemo pri priporočenem odmerjanju. Merili so tudi koncentracijo glukozamina v serumu in sinovijski tekočini pri 12 bolnikih z OA po 14 dneh jemanja 1500 mg GS na dan. Koncentracija glukozamina v serumu se je povprečno povečala za 20,5-krat, koncentracija v sinovijski tekočini pa za 21,5-krat glede na začetne vrednosti (7, 13).

V celice se glukozamin prenaša z aktivnim transportom preko glukoznih prenašalcev. Metabolizem eksogenega glukozamina v celicah poteka po enakih biokemijskih poteh kot metabolizem endogenega glukozamina in je natančno reguliran s hitrostjo transporta v celice in vplivom intermediatov na ključne encime (9).

7 Klinične študije z glukozaminom

Opravljenе so bile številne klinične študije, ki so proučevale vplive glukozamina na simptome ali strukturne spremembe pri OA. Rezultati med njimi se zelo razlikujejo. Obstaja tudi veliko metaanaliz in preglednih člankov, v katerih so vrednotili učinkovitost glukozamina. Klinične študije se med seboj razlikujejo po številu in vključitvenih kriterijih za preiskovance, trajanju študije, po kemijski obliki in pripravku apliciranega glukozamina, po merilih, s katerimi so dokazovali učinkovitost glukozamina in tudi po načinu sponzoriranja. Nekatere so se bolj osredotočile na vpliv glukozamina na izboljšanje simptomov (predvsem bolečine), druge pa na njegov vpliv na strukturne spremembe (širino sklepne špranje). Izboljšanje simptomov so v študijah pogosto merili z dvema indeksoma: WOMAC (Western Ontario and McMaster Osteoarthritis Index) in Lequesne. Vprašalnik WOMAC je osredotočen na sklepno bolečino, otrdelost in izgubo sklepne funkcije pri OA kolena ali kolka, pri čemer več zbranih točk pomeni bolj napredovano OA. Vprašalnik Lequesne je sestavljen iz manj vprašanj, ki obsegajo sklepno bolečino, zmožnosti za dnevne aktivnosti in hojo pri OA kolena ali kolka. Več zbranih točk pomeni bolj napredovano OA.

Preglednica 1 prikazuje rezultate randomiziranih kliničnih študij z glukozaminom na večjem številu bolnikov z OA kolka ali kolena (vsaj 100 bolnikov in vsaj 100 kontrol). V preglednici 1 so zbrane samo študije, v katerih je bil dnevni odmerek glukozamina večji ali ekvivalenten 1500 mg GS (14). Farmacevtsko podjetje Rottapharm je sponzoriralo več teh študij, kar je potrebno upoštevati pri interpretaciji rezultatov (14).

Glede na rezultate navedenih študij ter glede na številne metaanalize in pregledne članke se mnenja o učinkovitosti glukozamina razhajajo, tako glede lajšanja simptomov kot zaviranja progresije bolezni. Večino študij so naredili pri bolnikih z OA kolena, manj na drugih sklepih; tako se podatki o učinkovitosti bolj nanašajo na kolena kot na preostale sklepe.

Preglednica 1: Izbrane klinične študije z glukozaminom. Temnejše ozadje – študije, v katerih niso potrdili učinkovitosti glukozamina; v preostalih navedenih študijah so učinkovitost glukozamina potrdili. *GHC*-glukozaminijev klorid, *GS*-glukozaminijev sulfat, *NIH*-Ameriški nacionalni inštitut za zdravje, *NLM*-Ameriška nacionalna knjižnica za medicino. Opomba: Vključene so študije, ki imajo v vsaki proučevani skupini vsaj 100 preiskovancev. Dnevni odmerek glukozamina je bil večji ali ekvivalenten 1500 mg glukozaminijevega sulfata. Delno povzeto po (14).

Table 1: Selected glucosamine clinical trials. Dark background – studies that did not confirm glucosamine efficacy; in other clinical trials listed above, glucosamine efficacy was confirmed. *GHC*-glucosamine hydrochloride, *GS*-glucosamine sulphate, *NIH*-US National Institute of Health, *NLM*-US National Library of Medicine. Notes: In selected studies, at least 100 participants were included in both the study and the control group of patients. The daily dose of glucosamine was higher or equivalent 1500 mg of glucosamine sulphate. Partly cited from (14).

Študija	Število bolnikov/ število kontrol	Kontrola kakovosti pripravka	Kemijska oblika glukozamina	Trajanje zdravljenja (v tednih)	Prizadet sklep	Rezultati študij	Sponsorstvo
<i>Primerjava jemanja glukozamina s placebom</i>							
Noack et al., 1994	126/126	da	GS	4	koleno	Merilo za učinkovitost zdravljenja je bilo zmanjšanje indeksa Lequesne za vsaj tri točke in pozitivna celostna ocena raziskovalca. Na zdravljenje se je glede na izbrana merila učinkovito odzvalo 55 % bolnikov, ki so prejeli glukozamin, pri placebu pa 38 % bolnikov, kar so ovrednotili kot statistično značilno. <i>Zaključek študije:</i> glukozamin je varno in učinkovito, počasi delujoče zdravilo za lajšanje simptomov OA kolena (15).	Rottapharm
Reginster et al., 2001	106/106	da	GS	156	koleno	Ta študija je trajala tri leta. Proučevali so spremembe v simptomih in zoženju sklepne špranje. Razlika v zoženju sklepne špranje med obema skupinama je bila statistično značilna. Tudi simptomi so se v tej skupini izboljšali v primerjavi s poslabšanjem pri skupini, ki je prejela placebo. <i>Zaključek študije:</i> GS ima pri dolgotrajnem jemanju vpliv na simptome in strukturne spremembe pri OA kolena in tako verjetno vpliva tudi na progresijo bolezni (16).	Rottapharm
Pavelka et al., 2002	101/101	da	GS	156	koleno	Tudi ta študija je trajala tri leta. Proučevali so spremembe v simptomih in zoženju sklepne špranje. Ugotovili so statistično pomembno razliko v zoženju sklepne špranje med obema skupinama. Statistično pomembna razlika je bila tudi v izboljšanju simptomov glede na indeksa WOMAC in Lequesne. <i>Zaključek študije:</i> GS zmanjša progresijo OA kolena, z možnim vplivom na strukturne spremembe (17).	Rottapharm

Študija	Število bolnikov/ število kontrol	Kontrola kakovosti pripravka	Kemijska oblika glukozamina	Trajanje zdravljenja (v tednih)	Prizadet sklep	Rezultati študij	Sponsorstvo
McAlindon et al., 2004	101/104	da	GS/GHCI	12	koleno	V tej študiji so proučevali spremembe v simptomih, predvsem bolečine, otrdelosti, fizične funkcije sklepa ter uporabo analgetikov. Pri nobenem od proučevanih znakov ni bilo statistično pomembne razlike med obema skupinama. <i>Zaključek študije:</i> Glukozamin je varen, vendar ni bolj učinkovit kot placebo pri izboljšanju simptomov OA (18).	NLM in Arthritis foundation
Herrero-Beaumont et al., 2007	109/107	da	GS	26	koleno	V šestmesečni študiji GUIDE (Glucosamine Unum In Die) so spremljali spremembe v simptomih. Statistično značilno razliko so dokazali pri merjenju simptomov z indeksoma Lequesne in WOMAC. <i>Zaključek študije:</i> GS je bolj učinkovit pri zmanjševanju simptomov OA kolena kot placebo (19).	Rottapharm
Rozendaal et al., 2008	111/111	ni razvidno	GS	104	kolk	V tej študiji so proučevali spremembe v simptomih in zoženju sklepne špranje pri bolnikih z OA kolka. Po 24 mesecih pri nobenem od proučevanih kriterijev niso dokazali statistično pomembne razlike v primerjavi s skupino, ki je prejemale placebo (20). <i>Zaključek študije:</i> GS ni bolj učinkovit od placeba pri zmanjševanju simptomov in progresije OA kolka.	Erasmus Medical Center Breesstrategie
Wilkens et al., 2010	125/125	da	GS	24	hrbtenica	V tej študiji so proučevali vpliv GS na bolečino v križu pri bolnikih z degenerativno lumbarno OA. Za vrednotenje so uporabili druge vprašalnike in ne WOMAC ali Lequesne. <i>Zaključek študije:</i> GS ni statistično značilno vplival na zmanjšanje bolečine (21).	Ulleval University Hospital, Stiftelsen Helse og Rehabilitering
<i>Primerjava jemanja glukozamina s hondroitinom, s kombinacijo glukozamina in hondroitina ter s placeboom</i>							
Clegg et al., 2006	317/318/ 317/313	da	GHCI	24	koleno	V tej študiji, imenovani GAIT (Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial), so proučevali vpliv glukozamina in hondroitina na bolečino pri OA kolena (22). <i>Zaključek študije:</i> GHCI, sam ali v kombinaciji s hondroitin-sulfatom, ni statistično značilno zmanjšal bolečine pri celotni skupini bolnikov, ki je prejemale glukozamin v primerjavi s kontrolno skupino. Podrobnejše analize so pokazale večjo učinkovitost GHCI pri podskupini bolnikov s srednjo do močno bolečino, ne pa na celotni skupini.	NIH

8 Glukozamin v mednarodnih priporočilih za zdravljenje osteoartroze

Kljub razlikam v učinkovitosti glukozamina med kliničnimi študijami je glukozamin vključen v večino evropskih, ameriških in svetovnih priporočil za zdravljenje OA kolka in kolena. V Sloveniji lastnih smernic in priporočil za zdravljenje OA nimamo. Za nas pomembni so tudi zaključki izida arbitražnega postopka Odbora za zdravila za uporabo v humani medicini Evropske agencije za zdravila (EMA) za zdravilo, ki vsebuje GHCI (Glucomed). Ti so naslednji: (i) GHCI in GS imata podobno biološko uporabnost, (ii) kljub temu, da se izsledki študij razlikujejo, menijo, da sta oba, GHCI in GS, učinkovita pri lajšanju simptomov pri bolnikih z blago do zmerno obliko OA kolena, (iii) varnost glukozamina je primerljiva s placebom, (iv) farmakovigilancijske študije niso pokazale novih vprašanj glede varnosti, (v) uradnih študij interakcij glukozamina z drugimi zdravili ali prehranskimi dopolnili ni, zato je potrebna pozornost pri spremljanju le-teh (23).

8.1 Priporočila EULAR (ang. The European League Against Rheumatism; Evropska liga proti revmatizmu)

1. Z dokazi podprta priporočila za zdravljenje OA kolka (2005):

Počasi delujoča, simptomatska zdravila (GS, hondroitin-sulfat, diacerein) imajo vpliv na lajšanje simptomov in majhno toksičnost. Vendar je vpliv majhen, primerni bolniki slabo definirani, klinično pomemben vpliv na progresijo OA in farmakoekonomske vidiki sta slabo ovrednotena (24).

2. Z dokazi podprta priporočila za zdravljenje OA kolena (2003):

Počasi delujoča, simptomatska zdravila (GS, hondroitin-sulfat, diacerein) imajo simptomatski učinek in možen vpliv na strukturne spremembe.

Preglednica 2: Zdravila z glukozaminom za peroralno uporabo, ki imajo dovoljenje za promet v Sloveniji. (podatki april 2011) - BRp-izdaja brez recepta, GHCI-glukozaminijev klorid, GS-glukozaminijev sulfat, Rp-izdaja na recept. *-povzeto po navodilu za uporabo za bolnike (30).

Table 2: Oral glucosamine preparations, authorised in Slovenia. (data april 2011) BRp-without prescription, GHCI-glucosamine hydrochloride, GS-glucosamine sulphate, Rp- prescription only. *-cited from patient information leaflet (30).

Ime zdravila, farmacevtska oblika, režim izdaje	Vsebnost, kemijska oblika glukozamina	Izdelovalec pripravka, država	Izvor glukozamina
Bonartros®, tablete, BRp	1500 mg, GS (kar ustreza 1178 mg glukozamina)	Jemo-Pharm A/S, Danska in Central-Pharma Limited, Velika Britanija	morski lupinarji
Dona®, praški za peroralno suspenzijo, BRp	1500 mg, GS (kar ustreza 1178 mg glukozamina)	Rottapharm Ltd., Irska in Rottapharm S.p.A., Italija	morski lupinarji
Fidiflex®, praški za peroralno suspenzijo, BRp	1500 mg, GS (kar ustreza 1178 mg glukozamina)	Fidimed, d.o.o., Slovenija	morski lupinarji
Flexodon®, praški za peroralno suspenzijo, BRp	1500 mg, GS (kar ustreza 1200 mg glukozamina*)	Labiana Pharmaceuticals, S.L.U., Španija	morski lupinarji
Glukozamin Pharma Nord®, kapsule, BRp	509 mg, GS (kar ustreza 400 mg glukozamina)	Pharma Nord Aps, Danska	morski lupinarji
Voltaflex®, kapsule, BRp	750 mg, GHCI (kar ustreza 625 mg glukozamina)	Lek Pharmaceuticals, d. d., Slovenija	morski lupinarji

Glede na moč priporočila spada glukozamin v isti razred kot paracetamol (25).

8.2 Priporočila OARSI (ang. Osteoarthritis Research Society International; Mednarodna organizacija za raziskovanje osteoartritisa)

Priporočila za zdravljenje OA kolena in kolka (2008):

Zdravljenje z glukozaminom in/ali hondroitin-sulfatom lahko ima simptomatski učinek pri zdravljenju OA kolena, to ni navedeno za kolka. Če po 6 mesecih zdravljenja ni učinka, zdravljenje prekinemo. Pri simptomatski OA kolena ima GS mogoč vpliv na strukturne spremembe (26). Leta 2010 so izšle dopolnitve, ki upoštevajo še študije, objavljene po letu 2006. V teh ugotavljajo, da je med objavljenimi študijami velika heterogenost v rezultatih in da ima GS glede na prejšnja priporočila še nekoliko manjši vpliv na zmanjšanje bolečine (27).

8.3 Priporočila ACR (ang. American College of Rheumatology; Ameri ko zdru enje za revmatologijo)

Priporočila za zdravljenje OA kolka in kolena (2000):

Prezgodaj je delati priporočila za uporabo glukozamina in hondroitin sulfata za zdravljenje OA zaradi metodoloških vprašanj, pomanjkanja standardizacije bolnikov in izsledkov ter premalo informacij o načrtovanju raziskav v številnih objavljenih študijah (28).

9 Pripravki z glukozaminom za peroralno jemanje v Sloveniji

V Sloveniji so izdelki z glukozaminom za peroralno zdravljenje registrirani kot zdravila, ki se izdajajo na recept ali brez njega, od aprila 2011 v

odmerkih do 600 mg glukozamina pa tudi kot prehranska dopolnila (29). Po svetu, predvsem v ZDA, pa je glukozamin na trgu večinoma kot prehransko dopolnilo (5). Preglednica 2 prikazuje zdravila z glukozaminom, ki imajo dovoljenje za promet v Sloveniji.

10 Sklep

Prodaja glukozamina za peroralno zdravljenje OA v Sloveniji in po svetu narašča, čeprav številne študije njegove učinkovitosti niso potrdile. Največ študij je bilo narejenih na bolnikih z OA kolena, zato se priporoča predvsem za ta sklep. Vključen je tudi v večino priporočil za zdravljenje OA kolena, v nekaterih primerih tudi kolka. Njegova uporaba, tudi dolgotrajna, je varna, neželeni učinki so blagi. Glede na dosedanje študije ne moremo določiti podskupine bolnikov z OA, pri katerih bi bil glukozamin bolj učinkovit, zato se jemanje glukozamina priporoča nekaj mesecev, predvsem pri OA kolena. Če v tem času ni znakov izboljšanja, se priporoča, da bolnik zdravljenje opusti. Glavna vprašanja, ki ostajajo neodgovorjena o učinkovitosti glukozamina so: ali lahko glukozamin vpliva na progresijo bolezni in v kolikšnem času, za katere sklepe je bolj učinkovit, katere podskupine bolnikov se bolje odzovejo na zdravljenje, ali se kemijske oblike glukozamina med seboj razlikujejo v učinkovitosti ter kakšen je pomen sulfatne skupine pri GS.

11 Literatura

- Bregar M. Novejša spoznanja na področju etiopatogeneze in zdravljenja primarne osteoartroze. *Zdrav Vest* 2002; 71: 235–39.
- Kraus VB, Jordan JM, Doherty M et al. The Genetics of Generalized Osteoarthritis (GOGO) study: study design and evaluation of osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 120–127.
- Zigang G, Yang H, Boon C et al. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis and Rheumatism* 2006; 55: 493–500.
- Pal M, Krajnc I, Potočnik U. Osteoarthritis: patogeneza in farmakološko zdravljenje. *Medicinski mesečnik* 2008; 4: 88–93.
- Reginster JY, Bruyere O, Neuprez A. Current role of glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology* 2007; 46: 731–735.
- Towheed TE, Anastassiades T. Glucosamine therapy for osteoarthritis: an update. *J Rheumatol* 2007; 34: 1787–1790.
- Black C, Clar C, Henderson R et al. The clinical effectiveness of glucosamine and chondroitin supplements in slowing or arresting progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2009; 13:1–148.
- Uitterlinden EJ, Jahr H, Koevoet JL et al. Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 250–257.
- Anderson JW, Nicolosi RJ, Borzelleca JF. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 187–201.
- Tannock LR, Kirk EA, King VL et al. Glucosamine supplementation accelerates early but not late atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 2006; 136: 2856–2861.
- Federal Institute for Risk Development. Food supplements that contain glucosamine can constitute a health risk for patients who take coumarin anticoagulants as blood coagulation inhibitor. http://www.bfr.bund.de/cm/245/food_supplements_that_contain_glucosamine_can_constitute_a_health_risk.pdf. Dostop: 7. 11. 2010.
- Sivojelezova A, Koren G, Einarson A. Glucosamine use in pregnancy: an evaluation of pregnancy outcome. *J Womens Health* 2007; 16: 345–348.
- Setnikar I, Palumbo R, Canali S et al. Pharmacokinetics of glucosamine in man. *Arzneimittelforschung* 1993; 43:1109–1013.
- Wandel S, Jüni P, Tendal B et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *BMJ* 2010; 341:c4675. doi: 10.1136/bmj.c4675.
- Noack W, Fischer M, Förster KK et al. Glucosamine sulfate in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1994; 2:51–59.
- Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC et al. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* 2001; 357: 251–256.
- Pavelká K, Gatterová J, Olejarová M et al. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 211–223.
- McAlindon T, Formica M, LaValley M et al. Effectiveness of glucosamine for symptoms of knee osteoarthritis: results from an internet-based randomized double-blind controlled trial. *Am J Med* 2004; 117: 643–649.
- Herrero-Beaumont G, Ivorra JA, Del Carmen Trabado M et al. Glucosamine sulfate in the treatment of knee osteoarthritis symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled study using acetaminophen as a side comparator. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 555–567.
- Rozendaal RM, Koes BW, van Osch GJ et al. Effect of glucosamine sulfate on hip osteoarthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2008; 148: 268–277.
- Wilkens P, Scheel IB, Grundnes O et al. Effect of glucosamine on pain-related disability in patients with chronic low back pain and degenerative lumbar osteoarthritis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010; 304: 45–52.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 795–808.
- European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Opinion following an article 29 (4)¹ referral for Glucomed and associated names. Annex II. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Glucomed_29/WC500009591.pdf. Dostop: 6. 4. 2011.
- Zhang W, Doherty M, Arden N et al. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCIIT). *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 669–681.
- Jordan KM, Arden NK, Doherty M et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCIIT). *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1145–1155.
- Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 137–162.
- Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 476–499.
- American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Recommendations for the Medical Management of Osteoarthritis of the Hip and Knee. <http://www.rheumatology.org/practice/clinical/guidelines>. Dostop: 7. 11. 2010.
- Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke. Razvrstitev izdelkov z glukozaminom. <http://jazpm.si/objave/Objave-2011-06-29.pdf> Dostop: 1. 7. 2011.
- Baza podatkov o zdravilih. www.zdravila.net. Dostop: 6.4.2011.

Taksonomska identifikacija s pomočjo sistema črtnih kod DNA kot sodobna podpora biovarnosti

Taxonomic identification using DNA barcoding as a modern support for biosafety

Živa Fišer Pečnikar, Elena Varljen Bužan

Povzetek: Do nedavnega je določanje taksonov temeljilo na uporabi morfoloških značilnosti predstavnikov vrst. Razvoj molekularnih orodij v zadnjem času nakazuje možnost hitre in zanesljive taksonomske identifikacije preko sistema črtnih kod DNA (angl. DNA barcoding). Sistem temelji na uporabi kratkih, v znanstvenih krogih sprejetih in standardiziranih odsekov DNA, ki vsebujejo dovolj informacije, da lahko na njihovi podlagi predstavnika neznane vrste uvrstimo v znano taksonomsko skupino. V ta namen se pri živalih in nekaterih drugih evkariontih najpogosteje uporablja regija podenote mitohondrijskega gena za citokrom c oksidazo (COI), pri rastlinah pa regiji kloroplastne DNK rbcL in matK. Poleg uporabe črtnih kod DNA v taksonomiji raziskovalci napovedujejo vedno večjo uporabo takih informacij tudi v drugih naravoslovnih panogah, na primer v varstveni biologiji (trgovanje z zavarovanimi vrstami, vnos potencialno invazivnih vrst), medicini (identifikacija medicinsko pomembnih patogenov in njihovih vektorjev) ali farmaciji (identifikacija zdravilnih čajnih mešanic).

Gljučne besede: molekularna orodja, črna koda DNA, identifikacija organizmov

Abstract: Until recently, the determination of taxa has been based on the use of morphological characteristics. Recent development of molecular tools suggests the possibility of fast and reliable taxonomic identification through DNA barcoding. Such determination is based on the use of short and standardized sections of DNA that contain sufficient information to enable the discrimination of specimens into taxonomic groups. The most commonly used region to discriminate animals and some other eukaryotes is the mitochondrial gene for cytochrome c oxidase (COI), whereas in plants the most frequently used markers are the chloroplast DNA regions rbcL and matK. In addition to using DNA barcodes in taxonomic studies, researchers predict an increase in the use of such information in other fields of natural science, for example in conservation biology (trafficking with protected species, introduction of potentially invasive species), medicine (identification of medically important pathogens and their vectors) or pharmacy (identification of individual herbal drugs in tea mixtures).

Key words: molecular tools, DNA barcode, identification of organisms

1 Uvod

Identifikacija organizmov na podlagi morfoloških znakov neredko predstavlja zahtevno nalogo. Številne vrste so si tako podobne, da jih lahko prepoznajo le strokovnjaki, specializirani za posamezno skupino organizmov (1). Poleg tega imajo živali pogosto tudi kompleksen razvojni krog, sestavljen iz različnih razvojnih stadijev, kar še dodatno otežuje delo raziskovalcev, ki se ukvarjajo z razvrščanjem organizmov. Včasih so vzorci lahko poškodovani ali pa imajo strokovnjaki za identifikacijo na voljo le majhen del tkiva. V slednjem primeru je določanje s pomočjo morfoloških znakov nemogoče. Podobno velja tudi za številne rastline, ki jih pogosto v vegetativnem stanju (brez cvetov ali plodov) ne moremo določiti vse do taksonomske stopnje vrste.

Identifikacija vzorcev vse do vrste je pogosto ključnega pomena, še posebno ko gre za prepoznavanje izdelkov iz ogroženih vrst, kmetijskih škodljivcev, invazivnih vrst, patogenih organizmov, živalskih prenašalcev bolezni oz. vektorjev (vmesnih gostiteljev), zajedavcev (parazitov) ter zdravilnih ali strupenih rastlin (2). Zaradi omenjenih težav z identifikacijo ter dejstva, da se število odkritih vrst iz leta v leto večja, število strokovnjakov za taksonomijo pa konstantno zmanjšuje, postajajo pri identifikaciji vse bolj pomembna molekularna orodja. Identifikacija vzorcev preko sistema črtnih kod se naslanja na dejstvo, da se v genomu dveh vrst, četudi sta si morfološko izjemno podobni, nahaja dovolj razlik, da se ju na njihovi podlagi uvrsti v dve ločeni taksonomski enoti.

Sistem črtnih kod DNA rešuje številne težave taksonomske identifikacije, saj lahko nestrokovnjaki iz majhnih delov tkiva pridobijo potrebno informacijo za uvrstitev vzorca v določeno taksonomsko kategorijo. Uporaba zaporedij DNA zagotavlja relativno zanesljivo določanje taksonov, med katerimi ni jasno opredeljivih morfoloških razlik ter identifikacijo organizmov v vseh razvojnih stopnjah (1, 3, 4). Metodologija je že v uporabi v primeru organizmov z morfološko najtežje določljivimi vrstami, kot so virusi, bakterije in protisti (1), v zadnjih letih pa so vedno pogostejše tudi študije na višjih organizmih (5, 6, 7). To seveda ne pomeni, da postaja tradicionalna taksonomija manj pomembna. Identifikacija s pomočjo DNA služi dvojnemu namenu: kot nov pristop v taksonomiji, ki se ga lahko uporabi v kombinaciji z morfološki znaki, ter kot orodje za hitro določanje organizmov ali bioloških vzorcev, katerih morfološka identifikacija zahteva čas in znanje, ki nista vedno na voljo.

Izredno pomembna je tudi povezava sistema črtnih kod DNA z muzejskimi in herbarijskimi primerki, kar v nasprotju z drugimi podatkovnimi bazami (npr. *GenBank*) omogoča veliko večjo taksonomsko zanesljivost. Določitev po sistemu črtnih kod na mednarodnem nivoju koordinira Konzorcij za črtne kode življenja (Consortium for the Barcode of Life; CBOL). V februarju 2010 je podatkovna zbirka *BOLD* (angl. The Barcode of Life Datasystem) vsebovala več kot 790.000 nukleotidnih zaporedij 67.000 formalno opisanih vrst (2, 8). Le-ta pa ne predstavlja edine podatkovne zbirke nukleotidnih zaporedij. *All Leps Barcode of Life* je podatkovna zbirka za identifikacijo metuljev, v kateri je trenutno shranjenih okoli 450.000 nukleotidnih zaporedij, pripadajočih 41.000 vrstam metuljev (9). Tudi za rastline obstajajo nekatere specializirane podatkovne zbirke, na primer *Genome Database for Rosaceae* (GDR), ki hrani nukleotidna zaporedja vrst iz družine rožnic (9).

2 Lastnosti črtnih kod DNA

Kljub temu, da je izraz »črtna koda DNA« (DNA barcode) v uporabi šele od leta 2002 (4), je sama metodologija določanja organizmov na podlagi nukleotidnih zaporedij veliko starejša (10). Novost principa črtnih kod je v določitvi enotnega odseka DNA (označevalca), ki bi bil uporaben pri identifikaciji vseh živih bitij.

Kljub večletnemu delu na tem področju si strokovnjaki zaenkrat še niso enotni glede enotnega označevalca, ki bi bil primeren za identifikacijo vseh taksonov. Želene lastnosti črtnih kod DNA pa so dokaj jasno opredeljene.

- 1) Odsek DNA mora biti skoraj identičen pri osebkih znotraj iste vrste in različen pri osebkih različnih vrst.
- 2) Odsek mora biti standardiziran, t.j. isti odsek mora biti uporaben pri različnih taksonomskih skupinah.
- 3) Odsek mora vsebovati dovolj filogenetske informacije, da se na njegovi podlagi osebek lahko razporedi v ustrezno taksonomsko skupino (vrsto, rod, družino...).
- 4) Odsek mora biti robusten, imeti mora ohranjena mesta za vezavo začetnih oligonukleotidov in mora omogočati enostavno pomnoževanje odseka ter določanje nukleotidnega zaporedja (to je zlasti pomembno pri kompleksih vzorcih iz narave, na primer vzorcih zemlje, pri katerih želimo identificirati veliko vrst naenkrat).

- 5) Odsek mora biti dovolj kratek, da ga lahko pomnožimo tudi v primeru degradirane DNA (fragmenti, krajši od 150 baznih parov) (11).

Žal pa regije, ki bi bila uporabna za vse organizme in bi vsebovala vse našete lastnosti, še niso našli in morda sploh ne obstaja. Največ težav predstavlja iskanje primernih označevalcev za identifikacijo nižjih organizmov (12), medtem ko je bila identifikacija s črtnimi kodami DNA do sedaj uspešna pri določanju alg (13), gliv (13), bakterij (14), rastlin (15, 16, 17), pajkov (18), rib (19), ptic (1), in glodavcev (20).

2.1 Vretenčarji in nekatere druge živalske skupine

Pri vretenčarjih in nekaterih drugih živalskih skupinah temelji sistem črtnih kod na 648 baznih parov dolgi regiji na mitohondrijskem genu za podenoto I citokroma C (COI). Trenutno so v javno dostopni bazi *GenBank* shranjena nukleotidna zaporedja za približno 60.000 različnih vrst živali. Za identifikacijo s črtnimi kodami je mitohondrijski genom v primerjavi z jedrnim primernejši, saj ne vsebuje intronov, je manj izpostavljen rekombinaciji in je haploiden, kar omogoča enostavnejšo in nedvoumnejšo analizo njegovih nukleotidnih zaporedij (1, 21). Zaporedje COI je visoko spremenljivo, mutacije so večinoma substitucijskega tipa in ne vstavitve ali izbrisi, ki bi otežile poravnavanje nukleotidnih zaporedij (23). Na splošno velja, da vsebuje gen COI višji filogenetski signal kot katerikoli drugi mitohondrijski gen. Zaradi pogostih substitucij na tretjem mestu v kodonu poteka njegova evolucija dovolj hitro, da omogoča diskriminacijo na različne vrste in celo na linije znotraj posameznih vrst (22).

2.2 Rastline

Iskanje enotne črtno kode DNA pri rastlinah predstavlja mnogo trši oreh kot pri živalih. Zaradi nižje heterogenosti v rastlinskem mitohondrijskem genu COI ta ni primeren za razlikovanje rastlinskih vrst, zato so botaniki kar nekaj časa posvetili iskanju odseka DNA, ki bi ustrezal genu COI pri živalih. Nekaj časa se je kot najbolj ustrežno regijo omenjalo zaporedje jedrne regije ITS (Internal Transcribed Spacer) in kloroplastnega medgenskega vmesnika trnH-psbA (24). Z vse boljšim poznavanjem in večanjem količine dostopnih začetnih oligonukleotidov pa se je v zadnjih letih razširil tudi izbor potencialnih regij za črtne kode rastlin. Kljub temu kaže, da pri rastlinah ne obstaja nobena regija, ki bi bila tako spremenljiva, kot je pri živalih odsek COI.

Iskanje ustrezne regije za črtno kodo DNA se je pri rastlinah osredotočilo na kloroplastni genom, ki predstavlja alternativo živalskemu mitohondrijskemu genomu. Kloroplastni genom je za črtne kode ustrezen, saj se v vsaki celici nahaja v visokem številu kopij in ga sestavlja ohranjeno zaporedje genov, njegova slaba lastnost pa je relativno nizka stopnja evolucije. Znanstveniki so se tako osredotočili na iskanje regije znotraj kloroplastnega genoma, ki bi se relativno hitro spreminjala, po drugi strani pa bi morala biti regija dovolj ohranjena, da bi bila prisotna pri vseh kopenskih rastlinah in bi jo bilo mogoče pomnožiti na enostaven način (z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi).

Zaradi odsotnosti regije, ki bi ustrezala potrebnim standardom, so raziskovalci predlagali hkratno uporabo več regij. Prvi predlogi so obsegali kombinacijo treh regij, na primer kombinacijo treh kloroplastnih genov (rpoC1, rpoB in matK) ali kombinacijo dveh kloroplastnih genov (rpoC1 in matK) in enega medgenskega vmesnika (psbA-trnH) (25), še

vedno pa se omenja tudi zaporedje ITS jedrnega genoma. Prelomnico v napredku iskanja najboljše rešitve pa zaenkrat predstavlja publikacija skupne CBOL Plant Working Group v reviji PNAS avgusta 2009 (26). Kratek prispevek s kar 52 avtorji s celega sveta obravnava potencialne kandidate DNA črtne kode. Raziskovalci so pomnoževali različne regije kloroplastne DNA 907 vzorcev rastlin, med katerimi je bilo 445 vrst kritosemenk, 38 vrst golosemenk in 68 vrst nižjih rastlin. Pri vrednotenju potencialnih kandidatov za DNA črtne kode so upoštevali kriterije CBOL in na njihovi podlagi ovrednotili sedem najbolj resnih kandidatov: štiri kodirajoče (matK, rbcL, rpoC1, rpoB) in tri nekodirajoče regije (psbA-trnH, atpF-atpH, psbK-psbL).

Na podlagi testiranja vseh sedmih regij so ovrgli štiri. Ostale tri regije – rbcL, psbA-trnH in matK so relativno dobro ustrezale kriterijem za črtne kode, čeprav nobena izmed njih ni povsem zadovoljila vseh. Na podlagi omenjenega so nekateri raziskovalci skupine za rastline v okviru CBOL za črtno kodo DNA za rastline predlagali kombinacijo vseh treh regij.

Kljub vsemu pa se zdi kombinacija kar treh regij pri rastlinah v primerjavi z eno samo regijo pri živalih veliko. Pomnoževanje večjega števila regij je dražje in zamudnejše, zato je bil narejen korak dlje: med testiranimi regijami so izbrali kombinacijo tistih dveh, ki sta dali najboljše rezultate glede na kriterije CBOL. Izkazalo se je, da najugodnejšo kombinacijo predstavljata regiji matK in rbcL. Pri testiranju njune uporabnosti so ugotovili, da omogočata učinkovito določanje do vrste v 72% primerov, v ostalih primerih pa vsaj do rodu. Kljub temu, da je odstotek relativno nizek, lahko ob poznavanju geografskega izvora vzorca število potencialnih vrst krepko zmanjšamo, v najboljšem primeru na eno samo.

2.3 Ostali organizmi

Glede črtnih kod za ostale organizme si raziskovalci še niso enotni. Pri nekaterih glivah se kot ustrezno regijo uporablja gen COI, torej istega kot za živali (8). V drugih skupinah gliv pa ta gen ni uporaben, kar onemogoča univerzalno uporabo za vse glive. V zadnjem času predstavlja potencialnega kandidata tudi jedrna regija ITS (7).

Regijo COI se zaenkrat uporablja tudi pri nekaterih nevretenčarskih skupinah, na primer spužvah in koralah (27, 28), pri morskih planktonskih ličinkah (29) ter pri nekaterih invazivnih vrstah, prisotnih v balastnih vodah (30). Pri nekaterih drugih skupinah, na primer glistah, regijo COI nadomeščajo zaporedja ribosomskih genov (4, 31, 32). Zaporedje COI se je izkazalo za neuporabno tudi pri določanju ožigalkarjev zaradi premajhne raznolikosti mitohondrijskega genoma (1, 33).

3 Uporaba črtnih kod DNA

Z razvojem novih, hitrejših in enostavnejših molekularno-genetskih metod postajajo informacije o nukleotidnih zaporedjih DNA vedno bolj dostopne in koristne tudi v drugih vejah biologije. Raziskovalci napovedujejo vedno večjo uporabo črtnih kod DNA v varstveni biologiji (trgovanje z zavarovanimi vrstami in izdelki iz njih, vnos potencialno invazivnih vrst v komercialne namene itd.), v ekoloških raziskavah (npr. pri ocenjevanju biotske pestrosti ali raziskavah prehrane), v medicini, farmaciji in sistemski biologiji. Ena od najpomembnejših vlog sistema črtnih kod DNA je taksonomska identifikacija medicinsko pomembnih patogenov in njihovih nevretenčarskih vektorjev, pri katerih je morfološka identifikacija pogosto zelo zahtevna ali nemogoča (34, 35) ter za identifikacijo vrst, ki se uporabljajo pri izdelavi zdravil naravnega izvora.

Glede na število obolelih in stopnjo umrljivosti, ki so posledica okuženosti s paraziti in njihovimi prenašalci, lahko trdimo, da sta ti ekološki skupini med nevarnejšimi skupinami organizmov na Zemlji (34). Taksonomska identifikacija parazitov je zelo zahtevna; poleg tega, da so številni paraziti izredno majhni, se ponavadi razvijajo preko zapletenega življenjskega kroga (iz jajčeca preko ličinke, nimfe do odraslega osebk), ki lahko vključuje tudi več gostiteljev. V gostitelju pa so lahko paraziti prisotni tudi kot združba različnih vrst, ki so si včasih morfološko izjemno podobne (t.i. kriптиčni kompleks). Taksonomska določitev je osrednjega pomena za razumevanje interakcije med gostiteljem in paraziti, saj pomeni osnovo za razumevanje poteka parazitskih bolezni, ki pestijo ljudi ter domače in prostoživeče živali (36). Za določitev parametrov, kot so specifičnost gostitelja, virulenca in prenos, je zelo pomembno poznavanje ekološko-evolucijskega odnosa med parazitom in gostiteljem. Pravilna taksonomska identifikacija parazitov zagotavlja tudi nadaljnjo prepoznavnost njegovih pomembnih rezervoarjev ter razlikovanje morfološko podobnih vrst, ki povzročajo različne bolezni.

Sistem črtnih kod DNA se je kot uspešen pokazal pri določitvi vektorjev lišmanioze, bolezni kože, sluznic in notranjih organov, ki se prenaša s pikom dvokrilca peščene muhe (*Lutzomyia* spp.; 37) in jo povzročajo bičkarji različnih vrst lišmanije (*Leishmania* spp.). Pri analizi 20 vrst rodu *Lutzomyia* so ugotovili, da dve vrsti, ki pripadata ločenima filogenskima kladama, prenašata lišmaniozo v visoki koncentraciji in služita kot vektorja za bolezen pri ljudeh in drugih sesalcih.

V tropskih območjih predstavljajo komarji ene izmed najpogostejših prenašalcev bolezni. Od 3.500 znanih vrst komarjev je medicinsko pomembnih le peščica, ker so vektorji pri prenosu virusov, glist ali praživali. Nekatere vrste komarjev širijo med drugim malarijo, mrzlico denga, virus vročice chikungunya, japonski encefalitis in rumeno mrzlico ter tako vplivajo na zdravstveno stanje milijonov ljudi (32). V Afriki uporabljajo DNA identifikacijo za določanje komarjev, ki širijo limfatično filariozo, s katero je okuženo več kot 120 milijonov ljudi v 80 državah (38, 39).

Identifikacija vrst preko črtnih kod DNA se vse pogosteje uporablja tudi pri razkrivanju sestavin zeliščnih mešaníc ali pripravkov (40). Zdravilne snovi iz naravnih virov se že stoletja uporabljajo v zdravljenju vsakdanjih bolezni. V zadnjih letih tudi v zahodnem svetu narašča trend »naravnega« zdravljenja s pomočjo zdravilnih rastlin. Učinkovitost takega zdravljenja pa je kritično odvisna od pravilno uporabljenega rastlinskega materiala (9, 41). Napačno uporabljene zdravilne rastline pogosto motijo terapevtske učinke mešaníc in lahko celo vodijo do življenjsko nevarnih zastrupitev. Leta 1989 sta na primer dve osebi v Hong Kongu utrpeli hudo nevropatijo in encefalopatijo po zaužitju juhe, pripravljene iz korenin rastline *Hexandrum podophyllum*, strupenega zelišča, ki sta ga zamenjala z vrsto *Gentiana rigescens*. Leta 2002 je 63 ljudi na Nizozemskem poročalo o splošno slabem počutju in bruhanju po zaužitju zeliščnega čaja, ki je vseboval nevrotoksični japonski zvezdasti janež (*Illicium anisatum*) (42). Leta 2008 se je ženska v Singapurju zastrupila zaradi uživanja pripravka, ki je namesto vrste slreča *Rhododendron molle* vseboval strupeni indijski kristavec (*Datura metel*) (43).

Gao in sod. (44) so raziskovali možnost identifikacije vrst iz družine metuljnic (fam. Fabaceae) s pomočjo zaporedja jedrnega gena ITS2. Metuljnice so druga največja družina rastlin, ki se uporablja v zdravilne

namene (kar 490 vrst). Pri treh vrstah iz rodu sladkega korena (*Glycyrrhiza uralensis*, *G. inflata* in *G. glabra*), ki so pogosto uporabljene v tradicionalni medicini, so odkrili inhibitorne učinke pri *in vitro* podvojevanju virusa HIV (29), pri vrsti *Trigonella foenum-graecum* pa so dokazali sposobnost zmanjševanja nivoja glukoze v krvi (44). Po drugi strani pa družina metuljnic vsebuje tudi številne strupene vrste, saj je toksičnih kar 290 vrst iz 100 rodov: vrsta *Acacia rigidula* vsebuje precejšnje vrednosti toksičnih alkaloidov (44), številne vrste rodu *Crotalaria* vsebujejo pirolozidinske alkaloidne, ki so strupeni za sesalce in ptiče (45). Problematične so vrste, ki so si med seboj podobne ali vrstni kompleksi (morfološko izjemno podobne vrste istega rodu), pri katerih so lahko nekatere vrste zdravilne, druge pa ne, ali pa so celo strupene. Za take vrste je pravilna identifikacija ključnega pomena. V raziskavi, ki je zajela 1.507 zaporedij regije ITS2, pripadajočih 1.126 vrstam iz 196 družin, je Gao s sod. (44) ugotovil, da je bila identifikacija do vrste uspešna v 80% in do rodu v 100% primerov.

Kot primer uporabnosti identifikacije s pomočjo črtnih kod DNA lahko navedemo raziskavo ameriškega profesorja porodništva, ginekologije in reproduktivne medicine Davida Bakerja z Univerze Stony Brook (46). Številne pacientke v ZDA v postmenopavzalni dobi uporabljajo kot nadomestilo za hormonske terapije zeliščne pripravke iz grozdnate svetilke (*Actaea racemosa*). Izvleček iz te rastline lajša simptome menopavze preko vezave na estrogenske receptorje. Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA), ki je med drugim zadolžena za varnost in učinkovitost zdravil, bioloških proizvodov in živil, nima nadzora nad prehranskimi dodatki. Baker je želel preveriti, ali pripravki, ki so mu jih prinašale pacientke, res vsebujejo izvleček grozdnate svetilke. Po testiranju več kot dvajsetih na trgu dostopnih pripravkov se je izkazalo, da jih je precej vsebovalo popolnoma drugo vrsto. Uporaba takšnih pripravkov je problematična, saj nekatere vrste istega rodu (*Actea*) vsebujejo toksine in ima njihovo jemanje lahko negativne stranske učinke.

Zaradi številnih napak, ki se dogajajo pri uporabi zdravilnih mešanic, je bila leta 2009 vzpostavljena baza MMDBD (angl. *Medical Materials DNA Barcode Database*), ki vsebuje nukleotidna zaporedja rastlinskih in živalskih vrst, opisanih v različnih farmakopejah (npr. Ameriški in Kitajski) (9). Ta zbirka podatkov omogoča spletno platformo za shranjevanje, iskanje, primerjanje in analizo DNA zaporedij medicinsko uporabnih vrst in njihovih najpogostejših zamenjav (9).

4 Sklep

Na podlagi omenjenih raziskav je razvidno, da je sistem črtnih kod DNA tako pri živalih kot tudi pri rastlinah in drugih organizmih še na stopnji razvoja. Cilj raziskav je predvsem usmerjen predvsem v zmožnost večjega vrstnega razlikovanja. Razvoj in napredek pa je tesno povezan tudi z razvojem novih tehnologij določanja nukleotidnega zaporedja DNA (npr. pirosekveniranje), ki bodo omogočale hitrejšo in cenejšo analizo nukleotidnih zaporedij, kar bo najverjetneje doprineslo k širši aplikativni uporabi v različnih panogah, kot sta medicina in farmacija.

5 Literatura

1. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*. 2003; 270: 313–321.

2. Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*. 2010; 11(4): 440–453.
3. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2005; 360(1462): 1805–1811.
4. Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 2002; 11: 839–850.
5. Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 6350–6355.
6. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2004; 2(10): e312.
7. Seena S, Pascoal C, Marvanová L, Cássio F. DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Diversity* 2010; 44: 77–87.
8. Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 2007; 7: 355–364.
9. Lou SK, Wong KL, Li M, But PPH, Tsui SKW, Shaw PC. An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database) *BMC Genomics* 2010; 11: 402.
10. Wilson KH. Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 192–208.
11. Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 2008; 24(2): 110–117.
12. Kuksa P, Huang PH, Pavlovic V. Efficient use of unlabeled data for protein sequence classification: a comparative study. *BMC Bioinformatics* 2009; 10 (Suppl 4): S2.
13. Saunders G. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2005; 360, 1879–1888.
14. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM and Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103(32):12115–12120
15. Kress W, Wurdack K, Zimmer E and Weigt L: Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 8369–8374.
16. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N and Savolainen V. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 2005, 360(1462):1889–95.
17. Kress WJ, Erickson DL. DNA Barcoding – a Windfall for Tropical Biology? *Biotropica* 2008; 40(4): 405–408.
18. Barrett R and Hebert P. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool* 2005, 83(3): 481–491.
19. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR and Hebert PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2005, 360(1462): 1847–1857.
20. Robins J, Hingston M, Matisoo-Smith E, Ross H. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 2007; 7(5): 717–729.
21. Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 270: S596–S599.
22. Cox AJ, Hebert PDN. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 2001; 10: 371–386.
23. Lynch M, Jarrell PE. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 1993; 135, 1197–1208.
24. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23): 8369–74.
25. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans, Ser B* 2007; 360: 1889–1895.
26. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12794–12797.
27. Moura CJ, Harris DJ, Cunha MR, Rogers AD. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zool. Scr.* 2008; 37: 93–108.

28. Wörheide G, Erpenbeck D. DNA taxonomy of sponges - progress and perspectives. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 2007; 87: 1629-1633.
29. Heimeier D, Lavery S, Sewell MA. Using DNA barcoding and phylogenetics to identify Antarctic invertebrate larvae: Lessons from a large scale study. *Marine Genomics* 2010; 3(3-4): 165-177.
30. Briski E, Cristescu ME, Bailey SA, MacIsaac HJ. Use of DNA barcoding to detect invertebrate invasive species from diapausing eggs. *Biological Invasions* 2010. Online publication date: 9-Nov-2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-010-9892-7>. Dostop: 15-12-2010.
31. Holterman M, Rybarczyk K, Van Den Elsen S, Van Megen H., Mooyman P, Santiago RP, Bongers T, Bakker J, Helder J. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources* 2008; 8: 23-34.
32. Virgilio M, Backeljau T, Nevado B, De Meyer M. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* 2010, 11: 206.
33. Shearer TL, Coffroth MA. Barcoding corals: Limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources* 2008; 8(2): 247-255.
34. Besansky NJ, Severson DW, Ferdig MT. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology* 2003; 19 (12): 545-546.
35. Powers T. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands To Barcodes. *Annual Review of Phytopathology* 2004; 42: 367-383.
36. Leung TLF, Donald KM, Keeney DB, Koehler AV, Peoples RC, Poulin R. Trematode parasites of Otago Harbour (New Zealand) soft-sediment intertidal ecosystems: life cycles, ecological roles and DNA barcodes. *N.Z. J. Mar. Freshwater Res.* 2009; 43: 857-865.
37. Azpurua J, De La Cruz D, Anayansi V, Windsor D. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(3): e627.
38. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2007; 44: 1-7.
39. Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Kaiser A. Mosquitoes and their control. Second edition. Springer-Verlag, 2010: 39. 40. Slanc P, Ravnikar M, Strukelj B. Identification of individual herbal drugs in tea mixtures using restriction analysis of ITS DNA and real-time PCR. *Pharmazie* 2006; 61(11): 912-5.
41. Sucher NJ, Carles MC. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Med* 2008; 74(6): 603-623.
42. Johanns ES, Van der Kolk LE, Van Gemert HM, Sijben AE, Peters PW, De Vries I. An epidemic of epileptic seizures after consumption of herbal tea. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; 146: 813-816.
43. Phua DH, Cham G, Seow E. Two instances of Chinese herbal medicine poisoning in Singapore. *Singapore Med J* 2008; 49: e131-133.
44. Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. Jul 06, 2010. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130(1): 116-121.
45. Williams MC, Molyneux RJ. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed Sci* 1987. 35: 476-481.
46. Harmon K. Rare flowers and common herbal supplements get unmasked with plant DNA barcoding. *Scientific American*, 18 Apr 2010.

36. skupščina SFD

V okviru srečanja ob 36. skupščini SFD, ki je potekalo v GH Bernardin v Portorožu, od 12. do 14. maja 2011, je Društvo organiziralo tri simpozije. Vodenje simpozija je izvršni odbor tudi letos zaupal prof. dr. Borutu Štruklju. V treh dneh so se zvrstile teme:

Farmakogenetika - okno v personalizirano farmacijo in medicino

Zdravljenje bolezni urogenitalnega trakta

Okrogla miza - Samozdravljenje: kdaj in kako?

Kvalitetna strokovna srečanja, ki pritegnejo številne udeležence in sponzorje, so podlaga za dober poslovni rezultat, ki je spremljal Slovensko farmacevtsko društvo zadnjih nekaj let. Tako je društvo ustvarilo materialno osnovo za nakup dodatnih poslovnih prostorov spomladi 2011.

Velik dosežek, tako s strokovnega, kot materialnega vidika, predstavlja tudi knjiga *Samozdravljenje - priročnik za bolnike*, ki je na simpoziju doživela svojo krstno predstavitev. Izkušnje s pripravo strokovno-informativnih brošur ob Dnevh slovenskih lekarn, ki so namenjene laični javnosti, so usmerjale pripravljalce knjige pri pripravi strokovnih besedil. Priročnik o samozdravljenju je prva obsežnejša knjiga, ki jo je farmacevtska stroka namenila laični javnosti in priča o velikem strokovnem potencialu lekarniških farmacevtov.

Letošnjo skupščino je zaznamovalo dogajanje v javnih lekarnah na Primorskem, kjer se pojavljajo pritiski, ki jih spodbujajo ustanovitelji lekarniških zavodov oziroma mestne oblasti in ki lahko ogrozijo neodvisnost lekarniške službe znotraj zdravstvenega sistema. Skupščina je sprejela sklepe, da se Slovensko farmacevtsko društvo kot krovna organizacija farmacevtske stroke, v sodelovanju z Lekarniško zbornico Slovenije in s Fakulteto za farmacijo, zavzame:

ZA strokovno neodvisnost lekarniškega farmacevta,

ZA funkcionalno ohranitev lekarn v sistemu javne zdravstvene službe,

PROTI komercializaciji in vzpodbujanju potrošništva v lekarnah.

Na 36. skupščini SFD so delegati potrdili poročila o delu, poslovanju in sklepe nadzornega odbora.

Skupščina je potrdila finančni plan za leto 2011 in članarino za leto 2012, ki ostaja nespremenjena:

Farmacevti – zaposleni 32 €

Tehniki 25 €

Študenti, seniorji 15 €

Kandidat za predsednika SFD, dr. Gašper Marc, je predstavil vizijo razvoja SFD za naslednji dve leti, ki bo temeljila na realnih ciljih in bo zagotavljala prepoznavnost SFD znotraj in zunaj stroke.

Člani so soglasno potrdili dr. Gašperja Marca za predsednika SFD in svoje predstavnike v organe Društva za obdobje 2011-13

Predsednik SFD	Gašper Marc
IZVRŠNI ODBOR	
Podružnice	
Celjska podružnica	Marina Urbanc Mokotar
Dolenjska podružnica	Marjan Balkovec
Gorenjska podružnica	Valerija Bezjak
Ljubljanska podružnica	Vladka Češek Bizjak
Mariborska podružnica	Matjaž Tuš
Pomurska podružnica	Damir Domjan
Posavska podružnica	Alenka Koritnik
Primorska podružnica	Tina Kajan
Zasavska podružnica	Sabina Drobnič
Sekcije	
Homeopatska sekcija	Maruša Hribar – predsednica Tanja Šegula – članica IO
Sekcija bolnišničnih farmacevtov	Tajda Gala Miharija
Sekcija farmacevtskih tehnikov	Zdenko Taušič
Sekcija farmacevtskih tehnologov	Jernej Zadnik
Sekcija farmacevtskih znanosti	Aleš Obreza
Sekcija kliničnih farmacevtov	Nataša Faganelli
Sekcija farmacevtov javnih lekarn	Nina Pisk
Sekcija seniorjev	Tatjana Kogovšek Vidmar
Sekcija študentov	Meta Čosič
Sekcija za farmacevtsko kemijo	Lucija Peterlin Mašič
Regulatorna sekcija	Smilja Milošev
Nadzorni odbor	Janez Kerč Jasna Majdič Dionizij Petrič
Disciplinsko sodišče	Aleš Krbavčič Ivan Remškar Ivan Zajc
Odbor za podeljevanje društvenih priznanj	Simona Cencelj Lovro Dermota Tatjana Kogovšek Vidmar Breda Kosirnik Aleš Mrhar Slavko Rataj Zofija Vitkovič
Izdajateljski svet	Mira Abazovič Polonca Fiala Mitja Kos Katja Razinger Sonja Rupret Tanja Šegula Anamarija Zega
Odgovorni urednik Farmacevtskega vestnika	Borut Štrukelj
Glavna urednica Farmakona	Marija Sollner Dolenc

Izvršni odbor SFD je na 36. skupščini podelil društvena priznanja, ki so jih prejeli

Minariškovo odličje

dr. Darja Frankič, mag. farm.

Minariškova priznanja

Sabina Grm, mag. farm.

*Darja Potočnik Benčič, mag. farm., spec.
mag. Franci Tratar, mag. farm., spec.*

Minariškova priznanja za leto 2011 - utemeljitev

Magistra **Sabina Grm** se je po diplomii na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani zaposlila v Lekarni Velenje, ki jo sedaj vodi kot direktorica. V svojem delovnem okolju je prepoznavna zaradi bogate publicistične dejavnosti v lokalnih medijih, s katero popularizira lekarniško stroko. Kot predsednica delovne skupine vodi delo za pripravo Kodeksa magistralnih pripravkov, s svojim prizadevanjem za zagotavljanje kakovosti storitev v lekarniški dejavnosti pa je pridobila Lekarni

Velenje certifikat za sistem vodenja kakovosti ISO 9001. Bila je oz. je še članica mnogih odborov v SFD, LZS in na MZ.

Magistra **Darja Potočnik Benčič**, specialistka klinične farmacije, se širši strokovni javnosti predstavlja že mnogo let kot predavateljica, ki na racionalen, a učinkovit način opozarja na potrebo po vključevanju lekarniških farmacevtov v zdravstveni sistem preko storitev. Vključena je v vrsto tovrstnih aktivnosti v SFD in na LZS. Zelo aktivna je pri sodelovanju z lokalnimi mediji, s čimer kot direktorica Lekarne Ptuj daje pozitivne zglede svojim mlajšim sodelavcem. S svojim nastopanjem v javnosti dnevno doprinaša k večji prepoznavnosti lekarniškega farmacevta kot strokovnjaka za zdravlila in kot strokovnjaka za samozdravljenje.

Magister znanosti **Franci Tratar**, specialist klinične farmacije, predstojnik bolnišnične lekarne v Splošni bolnišnici Celje je širši strokovni javnosti znan preko sodelovanja v sekcijah SFD in v komisijah oz. delovnih skupinah LZS. V SBC je uvedel sistem racionalnega predpisovanja antibiotikov, ki omogoča spremljanje porabe oz. uporabe protimikrobnih zdravil po oddelku, zdravniku ali

bolniku. Nadalje, v zadnjih letih je poskrbel za prenovo lekarne ter kadrovske okrepitve, uvedel je pripravo citostatične terapije po centraliziranem postopku ter pričel tudi z uvajanjem kliničnih farmacevtov na oddelkih, kjer aktivno sodelujejo z drugimi zdravstvenimi delavci pri racionalnem zdravljenju z zdravili. Je zelo aktiven član Sekcije bolnišničnih farmacevtov, za potrebe katere je tudi postavil spletno stran.

Minariškovo odličje za leto 2011 - utemeljitev

Dr. **Darja Frankič** je ena najbolj vidnih in prepoznavnih osebnosti v slovenski lekarniški farmaciji. Kjerkoli je delovala, je s svojo neizmerno voljo, podprto z visoko strokovnostjo, pustila za seboj neizbrisen pečat. Njene najodmevnejše aktivnosti lahko strnemo v nekaj naslednjih ugotovitev: v prvem obdobju svoje profesionalne kariere, ko je delovala kot farmacevt receptor v Lekarni Ljubljana, je kot prva v Sloveniji organizirala informativno službo za potrebe institucij zdravstvenega sistema, stroke in bolnikov. Ko je na IVZ prevzela Oddelek za spremljanje ambulantne porabe zdravil, ga je kmalu po



Prejemniki društvenih priznanj v Tartinijevem gledališču v Piranu, s predsednikom Odbora za podeljevanje društvenih priznanj in predsednikom SFD



Sabini Grm je priznanje izročil predsednik SFD



Franci Tratar



Darja Potočnik Benčič in predsednik SFD

prevzemu preimenovala v Oddelek za socialno farmacijo in s tem uvedla terminus na področju farmacije, ki je analogen terminusu Socialna medicina, s čimer je bistveno povečala prepoznavnost tega področja farmacije. S tem v zvezi je tudi uspela pripraviti program

Socialne farmacije v okviru programov strokovnih izpitov za magistre farmacije, ki je nadomestil program socialne medicine. V svojstvu vodje Oddelka za socialno farmacijo je vzpostavila prvo računalniško podprto podatkovno zbirko za poslovne potrebe lekarn

in avtomatsko obdelavo receptov na nacionalnem nivoju in kasneje že v samostojni Sloveniji vodila aktivnosti za pripravo in izdajo prvega nacionalnega Registra zdravil. V pedagoško in raziskovalno delo na fakulteti se je vključila že zelo zgodaj. Njen magisterij in kasneje doktorat sta bili prvi raziskovalni deli na področju socialne farmacije v Sloveniji. S tem je dokazala, da je to področje v raziskovalnem smislu povsem primerljivo z ostalimi področji znanstvene farmacije, razlika je edino v izboru metodološkega instrumentarija, ko je potrebno poleg naravoslovno-biomedicinskih metod poseči tudi po metodah, ki so uveljavljene v družboslovnem raziskovanju. Dolga leta je v okviru univerzitetnega študija farmacija vodila izbirni predmet Socialna farmacija ter sodelovala pri izvedbi podiplomskih predmetov na tem področju. Lahko rečemo, da je s svojo pedagoško in znanstveno ekspertizo bistveno prispevala k postavitvi temeljev današnje Katedre za socialno farmacijo na ljubljanski Fakulteti za farmacijo. V zadnjem obdobju svoje profesionalne kariere je delovala v Lekarniški zbornici Slovenije, kjer je bila zadolžena za programe strokovnega izobraževanja in specializacij. To je bilo odgovorno delo, ker ima LZS za te aktivnosti javna pooblastila, ki so zvezana z veliko odgovornostjo v relaciji do države in seveda



Podelitev odličja za leto 2011

tudi do stroke. Tudi to delo je opravljala na svoj značilno prijazen, a učinkovit način.

Odprtost, širina in komunikativnost so ji omogočili dostop do pomembnih povezav, tudi mednarodnih, preko katerih se je učila in popularizirala slovensko lekarništvo. Nikoli ni bila na tako odgovornih delovnih mestih, da bi lahko s pozicije moči udejanjila svoje zamisli in vedenja. Zato je uspeh njenega dela še toliko bolj pomemben.

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj je predlog občnega zbora Sekcije farmacevtov javnih lekarn po poglobljeni diskusiji soglasno sprejel ter sklenil, da ga predloži Izvršnemu odboru SFD v sprejem. Tudi Izvršni odbor SFD je predlog Odbora skrbno proučil in ga soglasno podprl. S tem je bil sprejet sklep, da se dr. Darji Frankič podeli najvišje društveno priznanje, t.j. Minařikovo odličje.



Zahvala Darje Frankič, prejemnice odličja za leto 2011



Predsednik strokovno-organizacijskega odbora, Borut Štrukelj (na desni) in gostje prireditve



Marko Hatlak, na harmoniki in Karmen Pečar, na violončelu, sta s svojim programom stopnjevala razpoloženje in navdušila publiko



Prejemniki priznanj in gostje so z zanimanjem spremljali kulturni program na odru Tartinijevega gledališča

Novosti iz sveta farmacije

Vse večje sodelovanje regulatornih organov

dr. Petra Slanc Može, mag. farm.

Evropska agencija za zdravila, EMA in Ameriška FDA sta vpeljali novo področje vzajemnih izmenjav mnenj. Poleg zdravil, ki so že na seznamu:

- zdravila za zdravljenje rakavih obolenj,
- »orphan« zdravila – zdravila sirota,
- zdravila za uporabo pri otrocih,
- zdravila, ki so osnovana na osnovi krvi.

So nanj uvrstili tudi biološko podobna zdravila.

Novo področje bo omogočilo agencijama, da povečata nivo izmenjave mnenj in s tem povečata stopnjo usklajenih odločitev v primeru obravnavanih tem. Omenjeno sodelovanje je še eno od zadnjih namer obeh Agencij za katero sta se odločili leta 2003. Stopnja interakcije med EMA in FDA se je od takrat znatno povečala. Mesečno se trenutno obe agenciji usklajujeta na več kot 55 nivojih. V poročilu, ki zajema redna in *ad-hoc* povezovanja, je poudarjena tesna raven sodelovanja med agencijama, vključno z izmenjavo osebja, rednih obiskov osebja, usklajevanja komunikacije na vprašanja in izmenjavo informacij o temah skupnega interesa.

Vir: EMA – NEWS: *European Medicines Agency and US Food and Drug Administration set up biosimilar 'cluster' and publish first report on interactions – 26/06/2011*

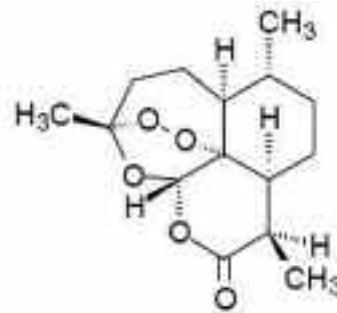
Nova kombinacija za zdravljenje malarije, ki jo namerava odobriti EMA

dr. Petra Slanc Može, mag. farm.

EMA je priporočila odobritev novega zdravila za zdravljenje malarije – Eurartesim, ki predstavlja kombinacijo dihidroartemizina z piperakinfosfatom. Omenjena kombinacij je namenjena zdravljenju infekcije s *Plasmodium falciparum* pri odraslih, otrocih in dojenčkih starih 6 mesecev ali težjih več kot 5 kg.

Za malarijo je po zadnjih podatkih WHO v letu 2009 umrlo skoraj 800000 ljudi med njimi največ afriških otrok. Bolezen je prisotna v več kot 100 državah sveta in ogroža več kot polovico svetovne populacije.

P. falciparum, parazit, ki je odgovoren za večino smrtnih tipov malarije je postal odporen na večino konvencionalnih oblik zdravljenja. Novo upanje v preteklem desetletju predstavljajo zdravila, ki vsebujejo artemizin (Slika 1).



Zgoraj omenjeno novo zdravilo je bilo klinično testirano v Afriki in Aziji in predstavlja zelo potrebno alternativo pri zdravljenju malarije.

V EU je EMA priporočila odobritev kombinacije kot zdravilo sirota zaradi omejenega števila prizadetih v regiji. Kljub temu, da malarija predstavlja grožnjo velikega števila svetovnega prebivalstva pa je incidenca v EU približno 1 na 33000 ljudi.

Vir: EMA – NEWS: *European Medicines Agency recommends new malaria treatment for approval – 24/06/2011*

Navodila avtorjem

Spodnja poglavja podajajo pomembne informacije za avtorje. Priporočamo, da si avtorji vzamejo čas in preberejo navodila preden prispevek pošljejo v uredništvo Farmacevskega vestnika.

Strokovne članke in druge prispevke objavljamo v slovenskem, po dogovoru z uredništvom pa tudi v angleškem jeziku. Vsi poslani rokopisi morajo biti jezikovno in slogovno neoporečni. Uporabljena terminologija mora biti ustrezna, s poslušom za uveljavljanje ustreznih strokovnih izrazov v slovenskem jeziku. **Navajanje zaščitene imen zdravil in drugih izdelkov ali imen proizvajalcev je nedopustno.** Dovoljeno je le v poglavju *Materiali in metode*, izjemoma pa še v primeru, če se objavi popoln seznam vseh na tržišču dostopnih izdelkov.

Strokovni članki so recenzirani. Uredništvo pošlje vsak strokovni članek najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno. Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmacevskem vestniku je zagotovljena tajnost.

Sprejem prispevka v uredništvo

Prispevek je sprejet v uredništvo, kadar v uredništvo poleg rokopisa, v elektronski obliki vloga vsebuje tudi:

1 Spremni dopis:

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni,
- telefonska številka in elektronski naslov kontaktne osebe.

2 Izjavo:

Lastnoročno podpisana izjava, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo, ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji. V primeru ponatisa slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje založbe, ki ima avtorske pravice.

Prva verzija rokopisa

Prav verzija rokopisa je poslana v uredništvo v elektronski obliki v kateri:

- avtorji niso imenovani,
- slike in preglednice so vključene v besedilo,
- obsega največ **20.000** znakov, vključno s presledki.

1 Oblika rokopisa

Naslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak naslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

Podnaslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak podnaslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

Besedilo rokopisa

Times New Roman 12 pt, navadno, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

2 Vsebina rokopisa

Rokopis naj bo sistematično strukturno urejen in razdeljen na poglavja.

Izvirni znanstveni članki naj imajo najmanj naslednja poglavja:

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Uvod,
- Materiali in metode,
- Rezultati in razprava,
- Sklep,
- Literatura.

Pregledni članki pa

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Poglavja in podpoglavja, ki si smiselno sledijo,
- Sklep,
- Literatura.

Vsako trditev

je potrebno potrditi z literaturnim virom, zaporedno številko literaturnega vira pa navesti na koncu trditve, v oklepaju pred piko. Če je referenc več, so številke ločene z vejicami in presledki, npr. (1, 3, 8). Na koncu prispevka naj bo navedenih največ 30 literaturnih virov, po vrstnem redu, kot se pojavljajo v besedilu.

3 Slike, preglednice in grafikoni

Slike preglednice in grafikoni morajo biti opremljene s pripadajočim besedilom v slovenskem in angleškem jeziku.

3.1 Slike

Slike naj merijo v širino in višino največ 18 cm. Dimenzijsko naj se slika čimbolj približa dejanski velikosti v tiskani verziji. Velikost besedila na sliki pa je lahko med 8 in 12 pt. (*opomba*: največkrat v tisku naletimo na velikost črk 10 pt).

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika_1, slika_2, itd).

Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk!

Vsaka slika mora biti ustrezno označena z zaporedno številko slike in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor lastnik slike. Pripadajoče besedilo se mora navajati pod sliko.

Primer:



Slika 1. Logo Slovenskega Farmacevtskega društva (1).

Figure 1. Logo of Slovenian Pharmaceutical Society (1).

Objava slik je v črno-beli tehniki, kar naj avtorji upoštevajo pri pripravi slik. Objava barvnih slik je možna samo v primeru, da avtor zagotovi pokritje dodatnih stroškov barvnega tiska.

3.2 Preglednice

Vsaka preglednica mora biti ustrezno označena z zaporedno številko preglednice in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor preglednico pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad preglednico.

Primer:

Preglednica 1. Število objav v Farmacevtskem vestniku v letu 2009 (1).

Table 1. Number of publication in Journal of Pharmaceutical Society in 2009 (1).

Tip objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

3.3 Grafikoni

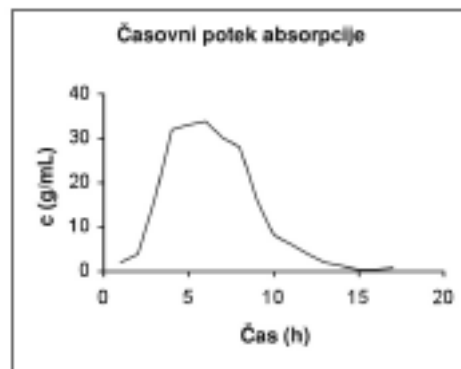
Vsaka grafikon mora biti ustrezno označen z zaporedno številko grafikona in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bil povzet, razen v primeru kadar je avtor grafikona pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad grafikonom.

Grafikoni iz Excela naj bodo uvoženi v besedilo kot »enhance metafile« z velikostjo teksta med 8 in 12 pt. Velikost pa naj ne presega v širino in višino 18 cm.

Primer:

Grafikon 1. Časovni potek absorpcije (1).

Graph 1. The time-course of absorption (1).

**4 Poimenovanja in okrajšave**

Poimenovanja in okrajšave je potrebno navajati skladno IUPAC, IUBMB in HUGO. Terminologijo izrazov pa tudi skladno s uveljavljenimi slovenskimi terminološkimi izrazi ter skladno s Formularium Slovenicum in SBD terminološkim slovarjem.

5 Primer navajanja literature

1. Obreza A. Vanadij v živem organizmu in farmaciji. Farm Vestn 2003; 54: 713–718.
2. Danesh A, Chen X, Davies MC et al. The discrimination of drug polymorphic forms from single crystals using atomic force microscopy. Pharm Res 2000; 17 (7): 887–890.
3. Doekler E. Cellulose derivatives. In: Peppas NA, Langer RS. Advances in polymer science 107; Biopolymers I. Springer-Verlag, 1993: 200–262.

4. Slovensko Farmacevtsko Društvo. <http://www.sfd.si/>. Dostop: 10-12-2008. (avtor spletne strani. Naslov prispevka. Spletni naslov. Dostopano: datum dostopa.)

Končna verzija prispevka

Avtor strokovnega članka prejme po opravljenem recenzijem postopku obvestilo o sprejemu članka oz. navodila glede potrebnih popravkih. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva upošteval in najkasneje dva tedna po prejetju recenzij poslal popravljen prispevek v elektronski obliki na naslov glavne urednice.

Končna verzija rokopisa

- 1 Naslovna stran prispevka (prva stran rokopisa) mora vsebovati:
 - Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
 - Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni
 - Korespondenčnega avtorja z njegovimi kontakti

- 2 Rokopis (druga stran rokopisa) naj v nadaljevanju vsebuje:
 - Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
 - Imena in priimke vseh avtorjev *brez z nazivov, imen in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni*, v pravilnem vrstnem redu
 - Poglavlja rokopisa v vrstnem redu in obliki kot je navedeno zgoraj v katerih so razporejene slike, preglednice in grafikoni.

3 Spremljajoče slike

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu

(slika_1, slika_2, itd). Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk.

Ostali prispevki

Prispevki za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja imajo praviloma lahko največ 6.000 znakov (vključno s presledki). Prispevki za rubriko osebne vesti ne smejo presežati 3.000 znakov (vključno s presledki). Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubilejih, smrti ali za posebne dosežke v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v elektronski obliki korespondenčni avtorji pošljejo na naslov:

Uredništvo Farmacevtskega vestnika

Slovensko farmacevtsko društvo

Dunajska 184 A, 1000 Ljubljana

T.: 01 569 26 01, Fax: 01 569 26 02

e-pošta:

glavna urednica: urednica-fv@sfd.si

tajništvo: tajnistvo-fv@sfd.si

Korekture

Krtačne odtise prispevka je avtor dolžan natančno pregledati in označiti nujne popravke (tiskarske škrate), s katerimi ne sme posegati v vsebino prispevka. Korekture pošlje avtor v treh delovnih dneh izključno elektronski obliki na zgoraj navedeni naslov.

Prvi avtor prejme tri izvode Farmacevtskega vestnika brezplačno. Članki so objavljeni tudi na spletnem mestu v pdf obliki.

5. simpozij Homeopatske sekcije

Sobota 8. oktober 2011
Fakulteta za farmacijo v Ljubljani

GRŠKA VITHOULKASOVA ŠOLA HOMEOPATIJE

Dr. Vangelis Zafiriou, Grčija

Dodatne informacije in prijava: www.sfd.si

