

# Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 5 • N O V E M B E R 2 0 0 8 • L E T N I K 5 9

## Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

## Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

## Glavna urednica

Andrijana Tivadar

## Uredniški odbor

Tajda Gala Miharija  
Stanko Gobec  
Katja Gombač Aver  
Iztok Grabnar  
Janja Marc  
Franc Vrečer

## Izdajateljski svet

Stane Srčič  
Simona Cencelj  
Boštjan Debelak  
Mirjana Gašperlin  
Lili Grosek  
Mirjam Hočevar Korošec  
Anamarija Zega

Naslov uredništva / Adress 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\$.

Avtor fotografije na naslovnici, Maj Klemenčič

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.200 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 2008 sofinancira**

**Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.**

## UVODNIK

*Izobraževati ali raziskovati? To je večna dilema vseh raziskovalcev, ki so sočasno tudi pedagoški delavci na najvišjem, univerzitetnem nivoju. Že sama postavitev prejšnje povedi nakazuje na to, da morajo učitelji in asistenti, na tako zahtevnem področju, kot je farmacevtska veda in znanost, intenzivno raziskovati, da lahko uspešno izobražujejo. Samo nekdo, ki je aktivno udeležen v raziskovalnem delu, bo uspel razložiti procese in mehanizme delovanja, sinteze, nastanka, tudi tistim, ki jim je izobraževanje namenjeno. In tako se rezultati bazične znanosti lahko izrazijo v aplikaciji, ali pa pridobijo izobraževalno noto. Dolžnost vseh nas pa je, da sprejemamo in podpremo znanja, ki jih na ta, najtežji, a najboljši način neprestano pridobivajo raziskovalci. Ne glede na trenutno politično usmeritev sveta še vedno velja Marxovo načelo, da ne morejo vsi le trgovati, kupovati in preprodajati, nekdo mora tudi proizvajati. In znanje proizvajajo raziskovalci, brez katerih ne bi bilo niti izobraževanja, torej prenosa znanja.*

*Številka Farmaceutskega vestnika, ki je pred vami, zrcali del trenutnega raziskovalnega dela na področju farmacije v Sloveniji. V članku o lesnih gobah dr. Janeš opisuje arzenal novih potencialnih antimikrobnih učinkovin, ki jih carstvo gliv skriva in jih je potrebno »le« odkriti. Zanimiv je zgodovinski prispevek doc. dr. Obreze o uporabi anorganskih arzenovih spojin v terapiji, kakor tudi prispevek prof. dr. Sama Krefta o zdravlilih v alternativni medicini. V zadnjih dveh letih je podiplomski študent Rade Injac objavil kopico vrhunskih raziskovalnih člankov v uglednih svetovnih publikacijah o protektivnem delovanju fulerena, kar je tudi vsebina preglednega članka. Na koncu pa si sledijo trije članki s področja izboljšave sinteznih ali bioloških zdravilnih učinkovin oziroma optimizacije prenosa na mesto delovanja, predvsem z uporabo bio- in nanotehnologije. Preberite, tudi tako boste del znanstvenoizobraževalnega procesa, ki je pomemben za izpopolnjevanje znanja vsakega farmacevta.*

*Prof. dr. Borut Štrukelj*

## *Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles*

---

**Damjan Janeš**

Odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin v lesnih glivah

*Discovery of new antimicrobial compounds in wood-colonising fungi*

**239**

**Aleš Obreza**

Zgodovina uporabe anorganskih arzenovih spojin v terapiji

*History of use of inorganic arsenic compounds in therapy*

**245**

**Samo Kreft**

Zdravila v alternativni medicini

*Medicinal products in alternative medicine*

**251**

**Rade Injac, Nina Kočevar, Borut Štrukelj**

Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  kot potencialna učinkovina

*Fullerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  as a potential drug*

**257**

**Alenka Zvonar, Mirjana Gašperlin, Julijana Kristl**

Samo(mikro)emulgirajoči sistemi - alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin

*Self(micro)emulsifying systems - alternative approach for improving bioavailability of lipophilic drugs*

**263**

**Nina Kočevar, Samo Kreft**

Aciliranje peptidov in proteinov z derivati maščobnih kislin

*Peptide and protein fatty acylation*

**269**

## *Znanstveni raziskovalni članki – Scientific research articles*

---

**Andrej Dolenc, Julijana Kristl**

Razvoj polielektrolitne nanoobloge na mikrodeltih učinkovine

*Development of polyelectrolyte nanocoating on drug microparticles*

**273**

## *Zanimivosti iz stroke*

---

Novice iz sveta farmacije

**278**

Poročilo s 63. svetovnega kongresa Liga Medicorum Homeopathica Internationalis (LMHI) v Belgiji

**279**

## *Osebne vesti*

---

V spomin

**281**

# Odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin v lesnih glivah

## Discovery of new antimicrobial compounds in wood-colonising fungi

Damjan Janeš

**Povzetek:** Človeštvo se v 21. stoletju sooča z odpornostjo patogenih mikroorganizmov na nekoč zelo uspešne protimikrobne učinkovine. Odporni sevi ogrožajo življenja bolnikov, še posebej tistih z oslabiljenim imunskim sistemom. Za uspešno terapijo je nujen konstanten razvoj novih protimikrobnih učinkovin, saj so dosedanje izkušnje pokazale, da so zaradi pojava vedno novih odpornih sevov tudi najnovejše učinkovine uspešne v časovno zelo omejenem obdobju. Zelo pomemben pristop k razvoju novih protimikrobnih učinkovin je iskanje spojin vodnic z reševanjem različnih organizmov. Glive so zaradi svojega raznolikega metabolizma zanimiv vir učinkovin, vendar lesnih gliv kot virov protimikrobnih učinkovin še niso intenzivno sistemsko raziskovali. Članek podaja pregled dosedanjih študij protimikrobnega delovanja lesnih gliv.

**Ključne besede:** protimikrobne učinkovine, lesne glive, odpornost mikroorganizmov

**Abstract:** In the 21<sup>st</sup> century mankind faces with the resistance of pathogenic microorganisms to recently successful antimicrobial compounds. Resistant strains endanger lives especially of patients with impaired immune system. There is constant need for development of new antimicrobial compounds because even the latest antimicrobial compounds are successful for a limited period of time. To combat that, different approaches are necessary, among them screening various organisms for antimicrobial activity is very important. Due to their diverse metabolic pathways, fungi are very interesting source of antimicrobial compounds, but wood-colonising fungi have not been extensively and systematically studied so far. This article reviews antimicrobial investigations of wood-colonising fungi.

**Keywords:** antimicrobial compounds, wood-colonising fungi, microbial resistance

## 1 Kratka zgodovina protimikrobnih učinkovin

Narava je že tisočletja vir zdravilnih učinkovin. Mnogo spojin, ki jih danes uporabljamo v terapevtske namene, so raziskovalci izolirali iz naravnih virov, pri tem pa so velikokrat sledili izkušnjam tradicionalne medicine. Že stari Grki so uporabljali praprot (*Aspidium* sp.) kot antihelmintik, podobno kot Azteki metliko (*Chenopodium* sp.). Antični hindujci so zdravili gobavost s čolmugro (*Hydnocarpus* sp.). Stoletja so ljudje uporabljali različne plesni za zdravljenje okuženih ran (1).

Zgodovina racionalne kemoterapije se je začela leta 1906, ko je Ehrlich razvil in poimenoval kemoterapijo na osnovi opazovanj selektivne toksičnosti anilinskih barvil za bakterije. Temu je sledilo odkritje antimalarikov pamakina in mepakrina in nato sulfonamidov. Domagkove sistematične študije sulfonamidov in njegovi dramatični uspehi pri zdravljenju sepse, pljučnice in meningitisa so povzročili revolucijo v znanosti in medicini (1). V prejšnjem stoletju pa so najpomembnejšo vlogo pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin odigrali mikroorganizmi, ki sintetizirajo antibiotike. Flemingovo odkritje penicilina v čopičasti plesni - *Penicillium notatum* (*Penicillium chrysogenum*) leta 1929 in prva širša terapevtska uporaba

omenjenega antibiotika v 40. letih prejšnjega stoletja sta začela novo obdobje medicine, t.i. »zlati dobo antibiotikov«. Izjemen uspeh penicilina je sprožil intenzivno iskanje bioaktivnih učinkovin v naravnih virih. Rezultati dolgoletnih raziskav gliv so danes spojine, ki sodijo med najpomembnejše izdelke farmacevtske industrije: protibakterijske učinkovine kot so penicilini iz *Penicillium* sp., cefalosporini iz *Cephalosporium acremonium*, aminoglikozidi, tetraciklini in poliketidi iz *Streptomyces* sp. ter antihelmintiki in učinkovine proti parazitom, npr. ivermektini iz *Streptomyces* sp. (2).

## 2 Odpornost mikrobov proti protimikrobnim učinkovinom

Nedvomno so bili odkrivanje, razvoj in klinične študije novih protimikrobnih učinkovin, ki so močno zaznamovali medicino 20. stoletja, uspešni koraki v boju z mikrobi, vendar se v 21. stoletju človeštvo sooča z zelo veliko težavo, z odpornostjo patogenih mikroorganizmov na nekoč zelo uspešne protimikrobne učinkovine (3). Odpornost je neizogiben odgovor evolucije na uporabo protimikrobnih učinkovin. Že v prvih letih uporabe penicilina se je pojavil velik delež odpornih sevov *Staphylococcus aureus*. Temu so sledile tudi druge vrste bakterij, ki so zaradi uporabe novih in novih

antibiotikov razvile odpornost proti večini le-teh. V začetku je farmacevtska industrija z velikim številom novih antibiotikov še lahko sledila pojavu odpornosti, v zadnjih dveh desetletjih pa so razvili zelo malo novih protimikrobnih učinkovin. Med mikroorganizme, ki imajo izraženo odpornost proti večini antibiotikov ter povzročajo resne okužbe, uvrščamo: na meticilin odporne seve *Staphylococcus aureus* (MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), na vankomicin odporne seve enterokokov (VRE - Vancomycin-resistant Enterococci), na penicilin odporne seve pnevmokokov ter po Gramu negativne bakterije, kot so *Escherichia coli*, *Klebsiella* in *Enterobacter* sp. in *Pseudomonas aeruginosa* (4). Odpornost se ne pojavlja samo pri bakterijah, temveč tudi pri glivah, virusih in parazitih (5). Izbor učinkovin proti parazitom ni dovolj velik, da bi lahko uspešno zdravili protozojske, parazitske infekcije kot so malarija, lešmanioza, tripanosomoza in filarioza, čeprav verjetno vsako leto terjajo več življenj kot katerakoli druga skupina infekcijskih bolezni (6).

Za uspešno zdravljenje je nujen konstanten razvoj novih protimikrobnih učinkovin, saj so dosedanje izkušnje pokazale, da so zaradi pojava vedno novih odpornih sevov tudi najnovejše učinkovine uspešne v časovno zelo omejenem obdobju. Odpornost se slej kot prej razvije proti vsaki učinkovini, zato moramo nujno uporabiti druge pristope, še posebej pri zdravljenju infektivnih bolezni v bolnišnicah (7). V zdravljenje lahko posegamo z uvajanjem novih analogov dosedanjih učinkovin, z uporabo kombinacij različnih učinkovin, z novimi pristopi k zdravljenju ter z uporabo novih spojin, ki imajo drugačen mehanizem delovanja (8), predvsem pa je nujno, da omejimo pojavnost in širitev odpornih sevov, da bomo lahko še pravočasno odkrili in razvili nove protimikrobne učinkovine (9).

### 3 Preizkušanje protimikrobnih učinkovin in vitro

Posamezni bakterijski sevi so različno občutljivi na protimikrobne učinkovine, zato so takšni podatki zelo pomembni pri zdravljenju in iskanju novih protimikrobnih učinkovin. Za preizkušanje občutljivosti danes največkrat uporabljamo disk-difuzijski, agar-dilucijski in bujon-dilucijski test.

Disk-difuzijski test uporabljamo za kvalitativno ali semikvantitativno oceno občutljivosti določenega bakterijskega seva na protimikrobne učinkovine. Pri tej metodi merimo premer inhibicijskega območja okoli diska, prepojenega z raztopino učinkovine, po inkubaciji na agarju, ki je premazan s suspenzijo izbranega bakterijskega seva.

Za kvantitativno vrednotenje občutljivosti uporabljamo agar-dilucijski ali bujon-dilucijski test. Pri tej metodi pripravimo serijo redčitev protimikrobne učinkovine v agarju ali bujonu in po inkubaciji opazujemo bakterijske kolonije na agarju ali zamotnitev tekočega gojišča zaradi rasti bakterij. Najnižja koncentracija učinkovine v agarju ali bujonu, ki prepreči rast bakterij je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Bujon-dilucijsko metodo je možno tudi avtomatizirati, pri čemer motnost gojišča ovrednotimo denzitometrično (10).

Bujon-dilucijski test je možno izvesti tudi v zelo majhnem volumnu (100 µL). Tako imenovani mikrodilucijski test je danes standardna referenčna metoda za preizkušanje občutljivosti aerobnih bakterij na

protimikrobne učinkovine. S to metodo lahko kvantitativno opredelimo *in vitro* učinkovitost spojine na izbranem bakterijskem sevu (11). Metodo uporabljamo kot zanesljivo orodje za odkrivanje protimikrobnih učinkovin z novim kemizmom in kar je zelo pomembno, test lahko prilagodimo za preizkušanje ekstraktov (12).

Druga zanimiva metoda za preizkušanje protibakterijske učinkovitosti spojin in ekstraktov je test z morsko, bioluminiscentno bakterijo *Vibrio fischeri* (Beijerinck) Lehm. & Neumann. Test temelji na pojavu, da vsako zaviranje celičnega metabolizma zmanjša tvorbo svetlobe, ki jo bakterija v normalnih pogojih emitira. Ta pojav lahko izkoristimo za kvalitativno in kvantitativno proučevanje učinkov različnih spojin. Metodo z bakterijo *Vibrio fischeri* sicer intenzivno uporabljajo za preizkušanje toksičnosti različnih spojin, saj so dokazali, da so celice teh bakterij dovzetne za toksične učinke določenih spojin podobno kot sesalske celice. Povsem nova pa je uporaba *Vibrio fischeri*-bioluminiscentnega testa za reševanje ekstraktov lesnih gliv s ciljem iskanja protibakterijskega delovanja (13).

### 4 Lesne glive

Večino gliv uvrščamo v samostojno kraljestvo gliv (Fungi), ki poleg živali (Animalia), rastlin (Plantae), protoktistov (Protoctista), kamor sodijo alge in evglenoidi ter prokariotov (Monomera ali Prokaryotae) tvorijo sistem petih kraljestev. Glive razvrščamo v pet razredov, vendar pa so iz stališča lesnih gliv pomembne predvsem naslednji trije:

- Ascomycotina (zaprtotrosnice),
- Basidiomycotina (prostotrosnice) in
- Deuteromycotina ali Fungi imperfecti (nepopolne glive).

Leta 1983 so ocenili, da je bilo odkritih 64000 vrst gliv, v letu 1995 se je število poznanih vrst povzpelo na 72000. Letno odkrijejo približno 700 novih vrst, verjetno pa je število poznanih vrst le majhen delež vseh vrst organizmov, saj so intenzivno proučevali le maloštevilne regije in življenjska okolja. Glede na to, da poznamo približno 270000 vrst cvetnic, ocenjujejo, da utegne biti število vrst gliv okoli 1600000 (14, 15).

Glive so na prvi pogled zelo podobne rastlinam, saj se ne gibljejo in črpajo hranila iz okolja. Kljub svoji podobnosti z rastlinami pa se od njih v ključnih pogledih razlikujejo. Glive so evkariotski, heterotrofni, absorptivni organizmi, ki razvijajo difuzno, razvejano tubularno telo in se razmnožujejo s pomočjo spor. Za njih je značilno da:

- so brez klorofila,
- glavna skeletna snov celičnih sten je hitin,
- zalogo hrane predstavlja glikogen,
- način prehranjevanja je heterotrofen (lizotrofija) in
- se prehranjujejo na tri načine (kot zajedavci, gniloživke ali pa so simbionti) (14, 15).

Glive so sestavljene iz prehranjevalnega in razmnoževalnega dela. Prehranjevalni del sestavljajo neorganiziran splet nitk ali hif, ki pa tvorijo micelij ali podgobje. Celice hif izločajo encime, s katerimi glive razkrajajo les, nato pa posrkajo vase produkte, ki jih potrebujejo za

rast in razmnoževanje. Skozi podgobje glive črpajo hrano in vodo ter se širijo na še neokužen les. Na rast in razvoj gliv vplivajo vlaga, temperatura, svetloba, hrana, zrak in vrednost pH (16).

Lesne glive povzročajo v lesu številne kemijske in fizikalne spremembe, ki se kažejo v razkroju lesa (trohnenje), zaradi česar les izgublja naravne lastnosti. Okužba lesa z glivami se najprej pokaže v spremembi naravne barve lesa. Na osnovi določenih značilnih poškodb lesa lahko določimo skupine gliv, ki te spremembe povzročajo. Delimo jih na:

- glive povzročiteljice rjave ali destruktivne trohnobe,
- glive povzročiteljice bele ali korozivne trohnobe in piravosti,
- glive mehke trohnobe,
- modrivke in
- glive plesni, povzročiteljice površinskih sprememb barv.

Glive, ki povzročajo rjavo trohnobo, označujemo za prave razkrojevalke lesa in spadajo v pododdelek Basidiomycotina. Pogosteje okužijo les iglavcev kot listavcev, kjer razgrajujejo celulozo in hemicelulozo, medtem ko ostane lignin skoraj nerazkrojen. Les, zaradi presežka oksidiranega lignina, postane rdečkasto rjave do temno rjave barve. Glive, ki povzročajo belo trohnobo, so sposobne razgradnje lignina. Zaradi tega les postaja vse svetlejši in se začne vlaknasto cepiti. Na mikromorfološki in kemijski stopnji bi lahko ločili glive povzročiteljice bele trohnobe ter glive povzročiteljice tako imenovane »sočasne trohnobe«. Glive bele trohnobe razgradijo najprej lignin in hemicelulozo, medtem ko povzročiteljice sočasne trohnobe hkrati v enakem obsegu razgradijo lignin, hemicelulozo in celulozo. Glive povzročiteljice bele trohnobe pogosteje okužijo les listavcev kot iglavcev.

Glive, povzročiteljice mehke trohnobe, sodijo v skupino zaprtotrosnic (Ascomycotini) in skupino nepopolnih gliv (Fungi imperfecti). Hranijo se predvsem s celulozo in hemicelulozo, lahko pa tudi z ligninom. Okužba se pojavi, kadar zaradi različnih dejavnikov (previsoke vlažnosti, slabih zračnih pogojev) okužba bolj aktivnih in tekmovalnih gliv iz skupine Basidiomycotini ni mogoča. Površina okuženega lesa je mehka in izrazito temne barve (kadar je les moker). Pri suhem lesu se pojavijo podobne razpoke kot pri rjavi trohnobi, le da so bolj plitke; notranjost lesa ostane nepoškodovana.

Glive modrivke povzročajo globinsko obarvanje beljave iglavcev (smreka, bor) in listavcev (topol, breza, lipa). Trosi gliv modrivk se razvijejo, le če padejo direktno na beljavo ali če jih določeni insekti (predvsem podlubniki) vnesejo v les. Modrivke se hranijo s škrobom, beljakovinami in sladkorji, zato ne vplivajo na mehanske lastnosti lesa. Plesni povzročajo le površinsko obarvanje lesa v najrazličnejših barvah (črna, modra, zelena, rdeča, rožnata in siva). Značilna je tudi oblika in globina obarvanih madežev. Obarvanja, ki nastanejo zaradi plesni, so največkrat neenakomerno pikčasta, pegasta ali razporejena v madežih. Le redko se zgodi, da bi bila obarvana celotna površina lesa. Plesni ne predstavljajo velike ekonomske škode, saj je les tudi po njihovi okužbi še vedno uporaben. Z brušenjem ali skobljanjem lesa lahko madeže delno ali v celoti odstranimo (16).

## 5 Dosedanje študije protimikrobnega delovanja

Glive so zaradi svojega raznolikega metabolizma zanimiv vir protimikrobnih učinkovin, vendar so lesne glive slabo raziskane. Edino sistemsko študijo, v kateri so preverjali protibakterijsko delovanje 72 vrst omenjenih gliv, so naredili z uporabo bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* (13). Rezultate omenjene študije so potrdili z referenčnim mikrodilucijskim testom (17, 18). Pregled rezultatov dosedanjih študij protimikrobnega delovanja lesnih gliv podaja **preglednica 1**, strukturne formule izoliranih učinkovin pa so na **sliki 1**.

Med aktivnimi sekundarni metaboliti lesnih gliv so protibakterijske, protivirusne in protiglivne učinkovine z zelo raznovrstnimi strukturami in spektrom delovanja. Protibakterijsko delujoče spojine so:

- *seskviterpeni*  
hirsutinska kislina in  
komplikatinska kislina ter  
koriolin;
- *steroidne spojine*  
lanostanoidni derivati iz vrste *Fomitopsis pinicola*,  
steroli iz vrste *Ganoderma applanatum* in  
favolon, neobičajni ergosteron s *cis* položajem obroča B in C;  
ganomicin A in B, hidrokinona s farnezično stransko verigo;  
beauvericin, nenavadni ciklični oligoamid/ester;  
merulinska kislina A, B in C poliketidnega izvora;
- *hlapni alkoholi*,
- *aldehidi*,
- *ketoni in kisline iz vrste Pleurotus ostreatus*;
- *cinabarin*,
- *rdeče obarvani fenoksazinon*;
- *poliacetilenske spojine iz vrste Serpula lacrymans*;
- *rumeno obarvane fenolne spojine*  
kserokominska in  
variegatinska kislina ter  
variegatorubin;
- *aromatski acetilenovi derivati*  
frustulozin in  
frustulozinol, aromatska acetilenova derivata.

Učinkovin filtrata kulture, ekstraktov plodišča vrste *Lentinula edodes* (19) ter ekstraktov plodišča vrste *Phellinus linteus* (20) in *Ganoderma lucidum* še niso odkrili (21, 22).

## 6 Zaključek

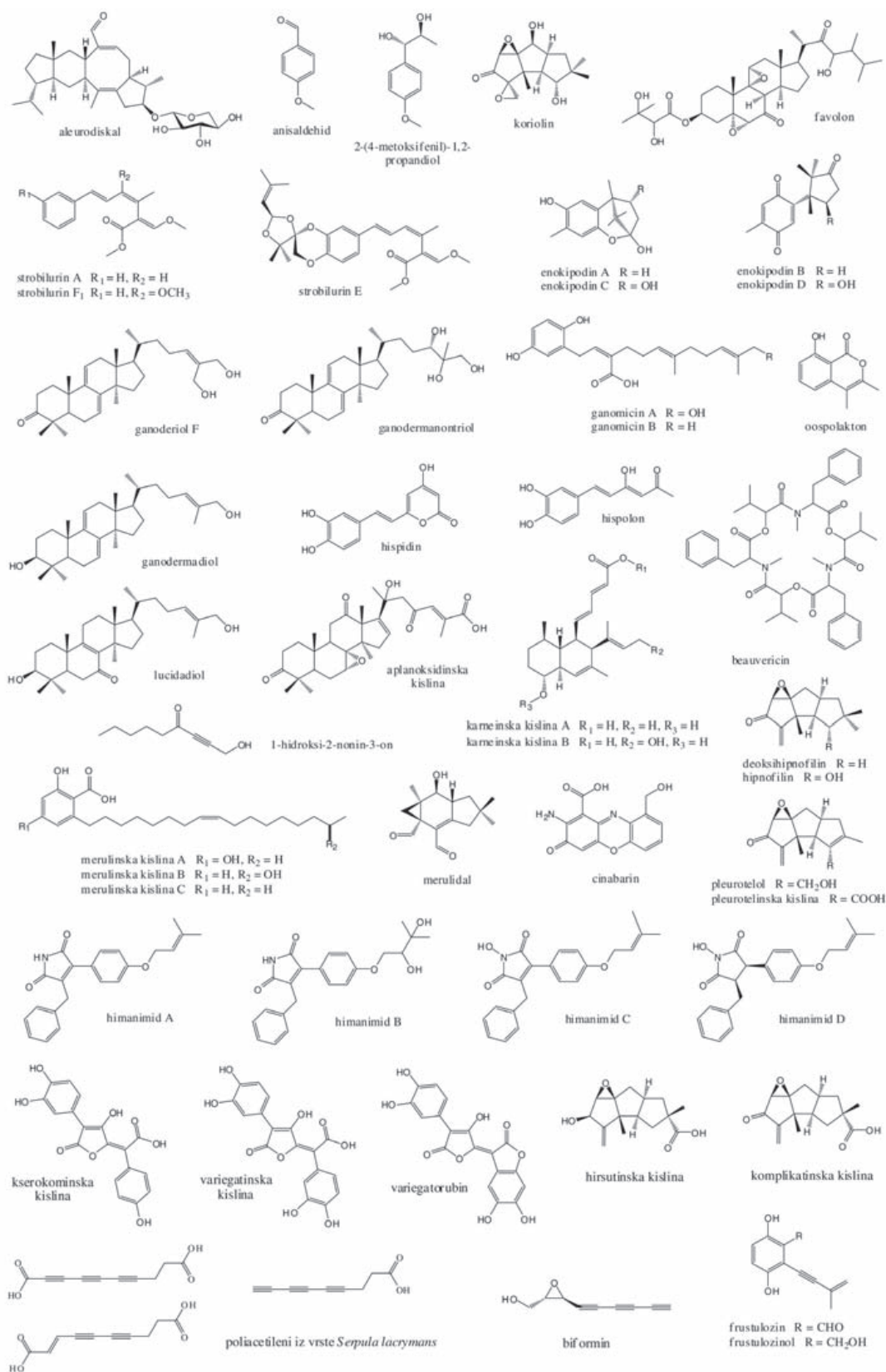
V današnjem času, ko odporni mikroorganizmi ogrožajo zdravje človeka, je iskanje novih virov in razvoj novih protimikrobnih učinkovin izrednega pomena. Lesne glive so obetaven vir novih učinkovin ali spojin vodnic, saj so že dosedanje raziskave pokazale raznovrstnost in veliko protimikrobno učinkovitost njihovih sekundarnih metabolitov. Nedvomno bodo rezultati sodobnih raziskav tudi številne terapevtsko uporabne učinkovine.

## Pregledni znanstveni članki - Review Scientific Articles

Preglednica 1: Dosedanje študije protibakterijskega, protiglivnega in protivirusnega delovanja lesnih gliv.  
Table 1: Overview of studies of antibacterial, antifungal and antiviral activity of wood-colonising fungi.

IME GLIVE	UČINKOVINA/FRAKCIJA EKSTRAKTA	REFERENCA
<b>Protibakterijsko delovanje</b>		
<i>Coriolus consors</i>	koriolin	19
<i>Favolaschia</i> sp.	favolon	19
<i>Flammulina velutipes</i>	enokipodin A, B, C in D	23
<i>Fomitopsis pinicola</i>	lanostanoidni derivati	19
<i>Ganoderma applanatum</i>	steroli	19
<i>Ganoderma lucidum</i>	lipofilni ekstrakti	21
<i>Ganoderma lucidum</i>	vodni ekstrakt	22
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	ganomicin A in B	19
<i>Hypoxylon carneum</i>	karneinska kislina A in B	24
<i>Laetiporus sulphureus</i>	beauvericin	19
<i>Lentinus edodes</i>	filtrat kulture	25
<i>Lentinus edodes</i>	kloroformski, etilacetatni in vodni ekstrakti plodišča	26
<i>Lentinus crinitus</i>	deoksihipnofilin in hipnofilin	19
<i>Merulius tremellosus</i>	merulinska kislina A, B in C	19
<i>Phellinus linteus</i>	metanolni ekstrakt plodišča in njegove frakcije	20
<i>Pholiota adiposa</i>	metanolni ekstrakt plodišča	27
<i>Pleurotellus hypnophilus</i>	pleurotelol in pleurotelinska kislina	19
<i>Pleurotus ostreatus</i>	hlapne spojine: alkoholi, aldehidi, ketoni in kisline	28
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	12 kDa ribonukleaza	29
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	cinabarin	19
<i>Serpula himantoides</i>	himanimid A, B, C in D	30
<i>Serpula lacrymans</i>	poliacetileni, kserokominska in variegatinska kislina, variegatorubin	30, 31, 32
<i>Stereum complicatum</i>	hirsutinska in komplikatinska kislina	19
<i>Stereum frustulosum</i>	frustulozin in frustulozinol	19
<i>Trichaptum biforme</i>	biformin	19
<b>Protiglavno delovanje</b>		
<i>Aleurodiscus mirabilis</i>	aleurodiskal	19
<i>Bjerkandera adusta</i>	anisaldehyd, 2-(4-metoksifenil)propan-1,2-diol	19
<i>Filoboletus</i> sp.	strobilurin A, E in F1 in njihovi derivati	19
<i>Flammulina velutipes</i>	enokipodin A, B, C in D	23
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	oospolakton	19
<i>Hypoxylon carneum</i>	karneinska kislina A in B	24
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	1-hidroksi-2-nonin-3-on	19
<i>Lentinus crinitus</i>	deoksihipnofilin in hipnofilin	19
<i>Merulius tremellosus</i>	merulidal	19
<i>Pholiota adiposa</i>	metanolni ekstrakt plodišča	27
<i>Pleurotellus hypnophilus</i>	pleurotelol in pleurotelinska kislina	19
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	anisaldehyd, 2-(4-metoksifenil)propan-1,2-diol	19
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	12 kDa ribonukleaza	29
<i>Serpula himantoides</i>	himanimid A, B, C in D	31
<i>Trichaptum biforme</i>	biformin	19
<b>Protivirusno delovanje</b>		
<i>Fomes fomentarius</i>	filtrat kulture	19
<i>Fomitella supina</i>	vodni ekstrakt	19
<i>Ganoderma applanatum</i>	vodni ekstrakt	19
<i>Ganoderma lucidum</i>	ganoderiol F in ganodermanontriol	19
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	ganodermediol, lucidadiol in aplanoksidinska kislina	19
<i>Inonotus hispidus</i>	hispolon in hispidin	19
<i>Inonotus obliquus</i>	vodotopni lignini	19
<i>Phellinus rhabarbarinus</i>	vodni ekstrakt	19
<i>Trametes cubensis</i>	vodni ekstrakt	19
<i>Trametes versicolor</i>	polisaharidne frakcije	19
<i>Trichaptum perrottotti</i>	vodni ekstrakt	19





Slika 1:  
Strukturne formule protibakterijskih, protiglivnih in protivirusnih učinkovin iz lesnih gliv (19-32).

Figure 1:  
Molecular structures of antibacterial, antifungal and antiviral compounds from wood-colonising fungi (19-32).

## 7 Literatura

1. Farrington M. Chemotherapy of infections. In: Clinical Pharmacology, 9<sup>th</sup> ed. Bennett PN & Brown MJ, Churchill Livingstone, Edinburgh 2003: 201—213.
2. Cragg GM, Newman DJ. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology* 2001; 39 (Suppl.): 8—17.
3. Thomson CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, Labischinski H. Antibacterial research and development in the 21st Century – an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 445—450.
4. French GL. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57 (10): 1514—1527.
5. Levy SB. Antibiotic resistance—the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57 (10): 1446—1450.
6. Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect* 2003; 5 (6): 535—544.
7. van der Waaij D, Nord CE. Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16 (3): 191—197.
8. Silver LL, Bostian KA. Discovery and Development of New Antibiotics: the Problem of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (3): 377—383.
9. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 452—456.
10. Chambers HF. Antimicrobial Agents: General Considerations. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10<sup>th</sup> ed. Hardman JG & Limbird LE (Eds.), McGraw-Hill, New York, NY, 2001: 1143—1170.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7-A6*, 6<sup>th</sup> ed. 20 (2), NCCLS, Wayne, PA, 2003: 14—16.
12. Zgoda JR, Porter JR. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharmaceutical Biology* 2001; 39 (3): 221—225.
13. Berden Zrimec M, Zrimec A, Slanc P, Kac J, Kreft S. Screening for antibacterial activity in 72 species of wood-colonizing fungi by the *Vibrio fischeri* bioluminescence method. *J Basic Microbiol* 2004; 44 (5): 407—412.
14. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. The Fungi as a Major Group of organisms. In: *The Fungi*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, San Diego, CA, 2001: 1—9.
15. Kendrick B. Kingdoms, Classification and Biodiversity. In: *The Fifth Kingdom*, 3<sup>rd</sup> ed., Focus publishing, Newburyport, MA, 2000: 1—8.
16. Podlesnik B. Učinkovitost pripravkov na osnovi bora in etanolamina na lesne glive. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, 2007.
17. Janeš D. Raziskave gliv kot virov novih protimikrobnih učinkovin. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, 2007.
18. Janeš D, Umek A, Kreft S. Evaluation of antibacterial activity of extracts of five species of wood-colonizing fungi. *J Basic Microbiol* 2006; 46 (3): 203—207.
19. Zjawiony JK. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *J Nat Prod* 2004; 67: 300—310.
20. Hur J-M, Yang C-H, Han S-H, Lee S-H, You Y-O, Park J-C, Kim K-J. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2004; 75 (6): 603—605.
21. Ofodile LN, Uma NU, Kokubun T, Grayer RJ, Ogundipe OT, Simmonds MS. Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytother Res* 2005; 19 (4): 310—313.
22. Yoon SY, Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Arch Pharm Res* 1994; 17 (6): 438—442.
23. Ishikawa NK, Fukushi Y, Yamaji K, Tahara S, Takahashi K (2001). Antimicrobial Cuparene-Type Sesquiterpenes, Enokipodins C and D, from a Mycelial Culture of *Flammulina velutipes*. *J Nat Prod* 64, 932—934.
24. Quang DN, Stadler M, Fournier J, Asakawa Y. Carneic Acids A and B, Chemotaxonomically significant Antimicrobial Agents from the Xylariaceous Ascomycete *Hypoxylon carneum*. *J Nat Prod* 2006; 69: 1198—1202.
25. Hatvani N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17 (1): 71—74.
26. Hirasawa M, Shouji N, Neta T, Fukushima K, Takada K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11 (2): 151—157.
27. Dulger B. Antimicrobial activity of the macrofungus *Pholiota adiposa*. *Fitoterapia* 2004; 75 (3—4): 395—397.
28. Garcia MJ, Estarron-Espinosa M, Ogura T. Volatile Compounds Secreted by the Oyster Mushroom (*Pleurotus osteratus*) and Their Antibacterial Activities. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4049—4052.
29. Ngai PHK, Ng TB. A ribonuclease with antimicrobial, antimutagenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides* 2004; 25 (1): 11—17.
30. Aqueveque P, Anke T, Sterner O. The Himanimides, New Bioactive Compounds from *Serpula himantoides* (Fr.) Karst. *Z Naturforsch* 2002; 57c: 257—262.
31. Farrell IW, Keeping JW, Pellatt MG, Thaller V. Natural acetylenes. Part XLI. Polyacetylenes from fungal fruiting bodies. *J Chem Soc Perk T* 1 1973; 22: 2642—2643.
32. Hearn MTW, Jones ERH, Pellatt MG, Thaller V, Turner JL. Natural acetylenes. Part XLII. Novel C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub> polyacetylenes from fungal cultures. *J Chem Soc Perk T* 1 1973; 22: 2785—2788.



# Zgodovina uporabe anorganskih arzenovih spojin v terapiji

## History of use of inorganic arsenic compounds in therapy

Aleš Obreza

**Povzetek:** Anorganske arzenove spojine spremljajo človeka od najstarejših časov. Nekoč so predstavljale najpogosteje uporabljene strupe, po drugi strani pa so bile tisočletja nepogrešljive v terapiji. Prve resnejše študije segajo v čas grško-rimske civilizacije, ko jih je Hipokrat priporočil za zdravljenje rakavih obolenj. Zasledimo jih tudi v delih njegovih naslednikov Dioskorida, Plinija starejšega in Galena. Antično znanje se je ohranilo s pomočjo Arabcev in se preko njih počasi vrnilo v srednjeveško Evropo. Paracelsus predstavlja začetek nove dobe v zdravljenju infekcijskih bolezni z uporabo arzenovih spojin, ki je v prejšnjem stoletju privedla do odkritja neosalvarzana. Thomas Fowler je konec 18. stoletja rešil še problem slabe vodotopnosti arzenovega(III) oksida in s tem sprožil zlato dobo arzenovih spojin, ki so jih dve stoletji uporabljali praktično za vse možne indikacije. Po krajšem zatonu se z registracijo Trisenox-a zopet vračajo na lekarniške pulte.

**Ključne besede:** arzen, zgodovina farmacije, terapija, Thomas Fowler

**Abstract:** Inorganic arsenic compounds have been the companions of our species from the dawn of the history. They were the most commonly used poisons, but also indispensable in the therapy through millennia. First serious studies date to the Greco-Roman civilization, when Hippocrates suggested their use in the therapy of malignant diseases. They are also mentioned in the works of his successors Dioscoridus, Pliny the Elder and Galenus. The antique knowledge was collected and edited by Arabs and slowly returned to the medieval Europe. Paracelsus marked the beginning of a new era in the therapy of infectious diseases with arsenic compounds, a path that led to the discovery of neosalvarsan in the previous century. At the end of the 18<sup>th</sup> century Thomas Fowler successfully solved the problem of low water solubility of arsenic(III) oxide and triggered the golden age of arsenic compounds in the medicine. During next two centuries they were used for practically all indications. After short decline they returned to the pharmacies again due to the approval of Trisenox.

**Keywords:** arsenic, history of pharmacy, therapy, Thomas Fowler

## 1 Uvod

»Če bi bil sprejet zakon, ki bi zdravnikom dovoljeval uporabo le dveh zdravil, bi izbral arzen in opij. Z njima lahko ozdravimo več bolezni, kot s katerima koli drugima zdraviloma v farmakopeji«, je leta 1883 v Luisiani, ZDA, zapisal dr. I. L. Crawcour (1). Citat kaže na izjemen pomen, ki so ga imele arzenove spojine v terapiji tistega časa, in je hkrati odsev njihove večtisočletne uporabe na najrazličnejših področjih. Z njimi so se poleg zdravnikov in lekarnarjev srečevali tudi izdelovalci barvil, steklarskih izdelkov, alkimisti, zlatarji in seveda zastrupljevalci. Beli arzenik (Arsenicum album, arzenov(III) oksid,  $As_2O_3$ ) je bil najpogosteje uporabljen in najbolj priljubljen strup vse do leta 1836, ko je bil vpeljan Marshov test, s katerim lahko dokažemo sledove prisotnega arzena v trupu še nekaj let po pokopu. Zgodbe o Locusti, ki je Neronu (54-68) pomagala, da se je znebil svojih nasprotnikov, spletke na dvoru renesančnih Borgijcev in ostale zgodovinske drame predstavljajo še dandanes zanimivo branje, vendar presega obseg tega članka (2). Prav tako bom v prispevku le na kratko predstavil mehanizme terapevtskega in toksičnega delovanja arzenovih spojin. Rdeča nit članka je zgodovinski pregled

njihove uporabe v terapiji, ki se zanimivo ni končala z uvedbo modernih zdravilnih učinkovin v 20. stoletju. Leta 2000 je namreč FDA izdala dovoljenje za promet zdravilu Trisenox, ki vsebuje kot učinkovino arzenov(III) oksid, za zdravljenje akutne promielocitne levkemije v primerih, ko ostale učinkovine niso učinkovite. Dve leti kasneje so zdravilo registrirali tudi pri EMEA (3).

Arzen je v naravi prisoten v več kot dvesto mineralih, v glavnem so to arzenati(V), arzenati(III), sulfidi, oksidi, nekaj pa je tudi arzenidov in elementnega arzena. Najpogostejši je arzenopirit ( $FeAsS$ ), ki je glavna ruda za pridobivanje arzena, poleg njega pa izkoriščamo še rumeni avripigment ( $As_2S_3$ ), rdeči realgar ( $As_4S_4$ ) in beli arzenolit ( $As_2O_3$ ). V zemeljski skorji je v povprečju 5 ppm arzena, v površinskih sladkih vodah in morjih pa je vsebnost približno tisočkrat manjša. Dnevni vnos znaša pri odraslem človeku 20–50  $\mu g$ /dan, pri čemer večino predstavljajo organoarzenove spojine, s pitno vodo pa vnesemo v organizem do 10  $\mu g$ /dan arzena (4). Farmakološko delovanje anorganskih arzenovih spojin je v glavnem posledica interakcij trivalentnega arzena s sulfhidrilnimi skupinami raznih proteinov, vendar je tudi uporaba petvalentnega arzena nevarna, saj lahko v

organizmu obliki prehajata ena v drugo. Zaradi nespecifičnega delovanja lahko zastupitev prizadene vse celice v organizmu, zato arzen štejemo med protoplazemske strupe. Znaki akutne zastupitve so bruhanje, diareja z izgubo vode in elektrolitov, krči skeletne miškulature, odpoved ledvic, hipotenzija, šok in smrt. Pri kronični zastupitvi pride do hiperpigmentacije kože, keratoze, anoreksije, poškodbe jeter, anemij in perifernih nevropatij. Arzenove spojine so tudi dokazano kancerogene (zlasti kožni rak) (3).

## 2 Obdobje do renesanse

Najstarejše zanesljive omembe anorganskih arzenovih spojin segajo v začetek 1. tisočletja pred našim štetjem na indijski podcelini. Minerala avripigment in realgar sta omenjena v delu Sušruta-samhita, ki jo pripisujejo na pol legendarnemu indijskemu zdravilcu Sušruti (okrog 850 pr.n.š.). Celotno delo sestavlja šest poglavij, kjer so predstavljeni temelji tradicionalne, na Ajurvedi in Atharvavedi temelječe indijske medicine. V petem poglavju, namenjenemu rastlinskim in mineralnim strupom, sta opisana oba arzenova minerala, ki ju uvršča med najbolj toksične minerale in priporoča veliko previdnost pri uporabi. Toksičnosti arzenovih spojin so se zavedali tudi Kitajci, vendar so avripigment, realgar in kasneje tudi arzenov(III) oksid uporabljali za zdravljenje psoriaze in raznih infekcij, ki se izražajo tudi v spremembah na koži (gobavost, sifilis). Pri tem so se ravnali po principu, da lahko določeno toksično substanco uporabijo za zdravljenje bolezni, povzročenih z nekim drugim strupom. Dejanskih vzrokov infekcijskih bolezni stari Kitajci niso poznali, čeprav so prav oni že pred dobrimi 2000 leti uporabljali določene postopke za preprečitev širjenja okužb. Oblačila, ki so jih nosili bolniki, so nekaj časa pustili na prostem, nakar so vanje zavijali zdrave ljudi. Poleg tega so tudi kraste pacientov, obolelih za npr. črnimi kozami, strli v prah, dodali malce avripigmenta in jih nato vpihnili v nosnice zdravih ljudi. Omenjena postopka lahko štejemo za primitivni obliki vakcinacije. Sun Simiao je v 7. stoletju uporabljal arzenove spojine za zdravljenje malarije, kar je bilo skoraj tisoč let pred Paracelzom. Kitajci so bili verjetno tudi prvi, ki so arzenove spojine uporabljali za devitalizacijo zob (5, 6). Arzenove spojine so verjetno uporabljali tudi prebivalci Mezopotamije in Egipta, vendar zapisov o tem do sedaj še niso odkrili.

Za evropski prostor so bistveno pomembnejši antični avtorji, med katerimi je na prvem mestu potrebno omeniti Hipokrata (okrog 460-370 pr.n.š.), oziroma avtorje zbirke približno sedemdesetih del, ki jih uvrščamo v Corpus Hippocraticum. V delu, ki je v glavnem posvečeno celjenju ran (7), sta prvič uporabljena izraza *karkinos* in *karkinoma*, kakor so imenovali vidne spremembe tkiva, ki se širijo v zdravo tkivo podobno kot rakove kleščče. V prvo skupino so uvrstili številne otekline in razjede, ki se same od sebe ne ozdravijo. V tem primeru ne gre vedno za karcinome, kot jih razumemo danes, saj so mednje prišteli tudi hemoroide. Med *karkinoma* lahko zasledimo tudi nekatera rakava obolenja, kot na primer rak na dojki, rak na maternici in kožni rak, vendar je natančna identifikacija posameznih obolenj, ki jih je Hipokrat opisal, danes zelo težavna. Arzenova minerala je v kombinacijami z drugimi zdravili rastlinskega in mineralnega izvora (teloh, brin, kačnik, svinčeve in bakrove spojine) priporočil za terapijo gnojnih ran in pri počasi napredujočih *karkinoma*. Asklepiades (okrog

125-40 pr.n.š.) ju je uporabljal tudi za zdravljenje revmatskih obolenj (7, 8).

Najobširnejši sintezi antičnega znanja o zdravilih predstavljata deli Dioskorida (1.stoletje) »De Materia medica« (9) in Plinija starejšega (23-79) »Historia naturalis« (10). Dioskorid je bil prvi, ki je omenil hude bolečine v prebavnem traktu po peroralnem vnosu arzenovih spojin. Opisa za avripigment (Arsenikon pri Dioskuridu in Arrhenicium pri Pliniju) sta pri obeh avtorjih praktično identična, kar kaže na dejstvo, da sta verjetno uporabljala isti starejši vir, ki se do danes ni ohranil. Ločita tri vrste minerala, ki se med seboj razlikujejo po kvaliteti, kar je verjetno posledica razlik v čistoti. Najkvalitetnejši avripigment iz okolice Dardanel naj bi imel jedke lastnosti in izrazilo adstringentno delovanje. Zaradi tega sta priporočala njegovo uporabo v mazilih za depilacijo (skupaj s kalcijevim hidroksidom) in za odstranjevanje raznih kožnih izrastkov. Podoben opis in način uporabe zasledimo tudi pri Galenu (129-?), ki je bil stoletje kasneje osebni zdravnik cesarjev Marka Avrelija (161-180) in Komoda (180-192) (11). Realgar (sandaracha) je imel že v tistih časih zelo široko uporabo. Pomagal naj bi pri ugrizu steklih živali, v kombinaciji z medom naj bi zmehčal grlo in prispeval k bolj čistemu in harmoničnemu glasu, ob dodatku kadila naj bi bil odlično zdravilo za astmatike, lajšal pa naj bi tudi kašelj. Plinij ga je priporočal tudi dermalno z vinom kot sredstvo proti plešavosti in kot pomembno sestavino pripravkov za oko, morda zaradi takrat še neznanega protimikrobnega delovanja (9, 10).

Z zatonom antike so v Evropi nastopila stoletja, ko se je vse do ustanovitve salernitanske šole v 11. stoletju počasi izgubljalo tudi grško-rimsko vedenje o zdravilstvu. Za ohranjanje tradicije se lahko zahvalimo le Bizancu in kasneje Arabcem, ki so zavzeli vzhodne in južne obale Mediterana ter prodrli globoko v Francijo. Alkimist Jabir ibn Hajjan (Geber; 8. stoletje), ki se je v glavnem ukvarjal s poskusi pretvorbe neplemenitih kovin v zlato in srebro (odkritje zlatotopke), je s sublimacijo avripigmenta z morskjo soljo pripravil čisti arzenov(III) oksid, ki so ga v Evropi poimenovali Arsenicum album. Medtem ko se je Geber usmeril v glavnem v alkimijo, je bil al-Razi (Rhazes; okrog 865-925) vodja bolnišnice v Bagdadu. Ohranil se je njegov predpis za pripravo kapljic za oči z antiseptičnim delovanjem, ki vsebujejo dram (1 dram ustreza 3.888 g) avripigmenta in po dva drama mire, žafrana in kadila, znanega pod imenom *Olibanum*. Sledil mu je Ali ibn Sina (Avicenna; 980-1036), ki so ga zaradi obširnega dela Kanon medicine poimenovali tudi kralj zdravnikov. V 49. poglavju druge knjige omenja tri takrat znane anorganske arzenove spojine in jih poimenuje po barvi ali po njihovem nahajališču: beli arzenik, kraljevski rumeni pigment in prašek iz rudnika (arab. *rahj al ghar*). Njihova uporaba je pri njem identična kot pri antičnih avtorjih (12) in so jo preko pripadnikov salernitanske šole prenesli v evropski visoki srednji vek.

Arzenove spojine v Evropi tistega časa niso dosegle takšne priljubljenosti kot med Arabci, čeprav je v 15. stoletju Saladinus Asculanus uvrstil beli arzenik med snovi, ki naj bodo vedno na zalogo v lekarni. Medtem ko sta avripigment in realgar izgubila svoj pomen, se je uporaba arzenovega(III) oksida v kriminalne namene tako razširila, da je postal poklic preskuševalca hrane na srednjeveških in renesančnih dvorih eden izmed najbolj iskanih in hkrati najbolj tveganih. Uporabo v farmaciji so v glavnem omejili na terapijo infekcijskih bolezni, razširila pa se je zlasti po domnevnih uspehih Guy de Chauliaca v 14. stoletju. Osebni zdravnik avignonskih papežev je

uporabljal beli arzenik v času epidemije bubonske kuge (1347-1350), vendar je bila za njegove uspehe verjetno zaslužnejša karantena, s katero so bili najvišji predstavniki cerkve ločeni od avignonskega meščanstva, ki je zaradi epidemije močno trpelo. Kljub temu se je novica o peroralni uporabi belega arzenika razširila zlasti po današnji Franciji in Italiji, ljudje pa so ga v času epidemij začeli nositi okrog vratu kot amulet. Učinkovina svoje vloge v terapiji kuge ni opravila, vendar pa je dolgoročno vendarle prispevala k zmanjšanju pogostosti in jakosti epidemij. Z arzenovimi spojinami so namreč zastupljali podgane, ki so znani prenašalci pri bubonski kugi, in zmanjšali njihovo število. Omenjeni dejavnik je poleg napredka na področju higijene in večje splošne odpornosti evropskega prebivalstva bistveno vplival na to, da so odslej epidemije prizadele le bolj ali manj omejena področja stare celine, zmanjšala pa se je tudi smrtnost (11, 13).

### 3 Od renesanse do razsvetljenstva

Preporod znanosti in umetnosti v Evropi ob koncu 15. in v 16. stoletju sovпада tudi z dobo velikih geografskih odkritij, ki so omogočila stike z do tedaj neznanimi civilizacijami. Iz novih dežel so prihajale eksotične dobrine, med njimi tudi zdravilne rastline, ki so v naslednjih stoletjih pomembno vplivale na razvoj farmacije. Negativna plat odkritij pa je bil v prvi vrsti prenos bolezni, ki so zdesetkale domorodno prebivalstvo nove celine. Transport seveda ni bil zgolj enosmeren, saj se je v Evropi ravno v tem času pojavila bolezen, ki je zaznamovala sledeča stoletja, sifilis. Večina prebivalstva je verjela, da je nadloga božja kazen zaradi nemoralnega življenja, to mišljenje pa je dodatno podkrepilo dejstvo, da so bili pripravki, ki so jih uporabljali v terapiji, neučinkoviti. Z boleznijo se je ukvarjal tudi začetnik moderne farmacije in medicine, zdravnik, lekarnar in alkimist Phillip von Hohenheim, bolj znan kot Paracelsus (1493-1541). V nasprotju s tedaj veljavnimi načeli je poleg zdravil rastlinskega izvora priporočal tudi uporabo natančno odmerjenih količin mineralnih snovi. V terapijo sifilisa je vpeljal živosrebrove spojine in arzenov(III) oksid ter s tem postavil temelje zdravljenja infekcijskih bolezni do odkritja modernih kemoterapevtikov in antibiotikov. Arzenov(III) oksid, ki ga je natančno proučeval tudi z alkimističnega vidika, je priporočal tudi pri zdravljenju vročičnih stanj, predvsem pri malariji, in za razne bolezni, za katere danes vemo, da jih povzročajo protozoji (14). V naslednjih dveh stoletjih se je uporaba arzenovega(III) oksida razširila in so ga predpisovali v najrazličnejše namene (antianemik, holagog, spazmolitik, sedativ, tonik...). Rosinus Lentilius (1657-1733), zdravnik Württemberskega volilnega kneza, ga je priporočal za zdravljenje malarije in mu je pripisoval boljše lastnosti kot skorji kininovca. Kot slabost je poleg toksičnosti omenil le relativno slabo topnost spojine v vodi, ki je bila problematična zlasti pri notranji uporabi. Z obema težavama so se ukvarjali številni zdravniki in lekarnarji tistega časa. V zahodni Evropi je bilo ob koncu 18. stoletja v obtoku približno šestdeset različnih pripravkov, v katerih so bile tudi razne arzenove spojine. Med farmacevtskimi oblikami so prevladovale pilule (Aikenove pilule, ki so jih uporabljali kot tonik) in vodne raztopine (de Valaginovala mineralna raztopina, ki je vsebovala arzenov(III) oksid raztopljen v razredčeni klorovodikovi kislini) (1, 14).

### 4 Thomas Fowler in zlata doba anorganskih arzenovih spojin

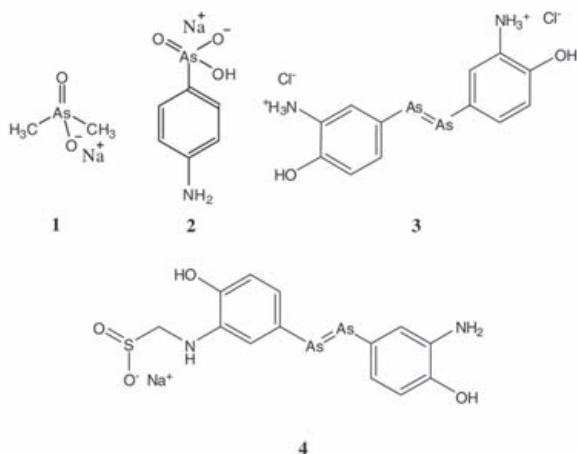
Težave, povezane z vodotopnostjo, je uspešno rešil zdravnik in lekarnar Thomas Fowler (1736-1801), ki je leta 1786 z uporabo kalijevega karbonata pripravil kalijev arzenat(III) in ga pod imenom Liquor mineralis priporočil za zdravljenje intermitentne vročice. Klasični pripravek je vseboval 1% vodno raztopino kalijevega arzenata(III), dodal pa mu je tudi tinkture sivke, vendar zgolj zato, da je bil pripravek podoben zdravilu. Znan je bil tudi kot Kali arsenicosum, Kali arseniatum, Liquor arsenicalis Fowleri in Liquor potassae et arsenitis ter je opisan v Londonski farmakopeji iz leta 1809. Priporočen režim odmerjanja je bil 12 kapljic raztopine trikrat na dan, kar je v osmih dneh, kolikor naj bi trajala terapija, znašalo približno 110 mg arzenovega(III) oksida (15). Fowlerjeva raztopina je v nekaj letih zamenjala ostale pripravke in postala skorajda univerzalno zdravilo za vse bolezni. Predpisovali so jo za revmatična obolenja, astmo, epilepsijo, lajšanje histeričnih napadov pri ženskah, dispepsijo, vodenico, infekcijske bolezni in rakave bolezni, če naštejemo le najpogostejše indikacije. Večina zdravnikov tistega časa se je kljub pogosto neuspešnemu zdravljenju trmasto oklepala arzenovih spojin in vztrajala pri predpisovanju Fowlerjeve raztopine v kombinacijah z najrazličnejšimi zdravilnimi učinkovinami in zlasti z rastlinskimi izvlečki. Od tod izvira tudi ime »terapevtska mula« za arzen, ki so ga pogosto uporabljali v tistem času. Med zagovorniki uporabe arzenovih spojin sta se v začetku 19. stoletja pojavili dve struji. Večina je sledila Škotu G. N. Hillu, ki je priporočal uporabo nizkih odmerkov Fowlerjeve raztopine (do 10 kapljic na dan) za zdravljenje širokega spektra obolenj. Pri tem je bilo potrebno natančno spremljati pojave prvih znakov zastrupitve. V primeru močnejših bolečin v prebavnem traktu, žeje in slabosti je zahteval takojšnjo prekinitvev terapije. V drugo skupino so sodili pristaši tako imenovanega herojskega zdravljenja. Po njihovem mnenju je bilo zdravljenje po navodilih dr. Hilla podobno homeopatiji, ki se je v tistem času močno razširila v Evropi (16, 17) in jo je večina zdravnikov ocenjevala kot mazaštvo. Predlagali so uporabo bistveno višjih odmerkov (50-150 kapljic na dan), terapija pa naj bi trajala od nekaj dni do nekaj tednov. Najbolj znan predstavnik te smeri je bil zagotovo zdravnik, raziskovalec Afrike in misijonar dr. David Livingstone (1813-1873), ki je pripravek uporabljal v terapiji spalne bolezni (18).

19. stoletje predstavlja tudi čas, ko so se pojavili tudi prvi dvomi o upravičenosti zdravljenja z arzenovimi spojinami in prve resnejše študije o zastrupitvah. Tako naj bi v petdesetih letih 19. stoletja med 262 bolniki, ki so jih v Edinburgu zdravili s Fowlerjevo raztopino, opazili 21 primerov kožnega raka, pri kar 106 pacientih pa je prišlo do hiperkeratoze (18, 19). S tem so se v omenjenem obdobju pojavili prvi znaki konca zlate dobe, vendar se je arzen le počasi umikal iz uporabe. O tem zgovorno priča citat na začetku prispevka. Prijubljenost nekaterih učinkovin in pripravkov potrjuje tudi dejstvo, da so arzenov(III) oksid še v letu 1911 priporočali za zdravljenje astme, psorizae in ekcemov, v raznih farmakopejah pa ga lahko v obliki Fowlerjeve raztopine zasledimo do konca 2. svetovne vojne (3, 16). Predpis za pripravo Fowlerjeve raztopine po Ph.J. II. je prof. Bohinc vključil v svoje delo Galenska farmacija in v njem podrobno razložil kemizem posameznih arzenovih spojin (20). Prof. Tomić iz Zagreba pa je za arzenov(III) oksid, jodid in avripigment navedel tudi

ustrezne odmerke (do 10 mg dnevno) in najpogostejše farmacevtske oblike (zdravilno mazilo, pilule) (21).

## 5 Zaključek?

Nagel razvoj organske kemije v drugi polovici 19. stoletja je privedel tudi do sinteze prvih organoarzenovih spojin. Natrijev kakodilat (**1**) in natrijev 4-aminofenilarzonat(V) (**2**) sta imela približno dvajsetkrat manjšo toksičnost kot arzenov(III) oksid, uporabljali pa ju zlasti za zdravljenje tripanosomioze. Paul Erlich je nadaljeval z raziskavami in v letih pred 1. svetovno vojno se je na tržišču pojavil salvarzan (**3**), učinkovito sredstvo za terapijo sifilisa. Skupaj z vodotopnim analogom neosalvarzanom (**4**) so ga uporabljali do konca 40-ih let prejšnjega stoletja, ko so arzenove spojine tudi v terapiji bakterijskih boleznih nadomestili antibiotiki in moderni kemoterapevtiki. Že prej je postalo jasno, da za druge indikacije ne obstaja racionalna osnova. Arzenove spojine so ostale na obrobju in so jih še nekaj časa uporabljali za zdravljenje boleznih, povzročenih z evkariontskimi paraziti. V farmaciji je zadnjih petdeset let prevladovalo mnenje, da so zanimive le s historičnega vidika. Ali se morda po registraciji arzenovega trioksida ponovno vračajo?



Slika 1: Strukture nekaterih organoarzenovih spojin.

Figure 1: Structures of some organoarsenic compounds.

## 6 Dodatek

Ob koncu zgodovinskega pregleda uporabe anorganskih arzenovih spojin lahko omenim še zanimivost, ki ni neposredno povezana s farmacijo, vendar so o njej pogosto poročali v časopisnih člankih (22). V naši neposredni bližini so v prejšnjih stoletjih poznali primere tako imenovanih uživalcev arzena. Kmetje v okolici Gradca na Štajerskem so že od 17. stoletja dalje svojim konjem v krmo dodajali arzenov(III) oksid, misleč, da lahko na ta način izboljšajo njihove fizične sposobnosti. Poleg tega naj bi imeli ti konji svetlejšo in bolj bleščečo dlako, zato so se kupcem zdeli mlajši in so na trgu dosegali višje cene (23). Sčasoma so začeli arzenov(III) oksid in avripigment uživati tudi kmetje, sprva v zelo nizkih odmerkih (nekaj mg), ki pa so jih postopoma zviševali. Zabeleženi so primeri, ko je prostovoljec pred zbranimi pričami na konferenci zdravnikov in naravoslovcev v Gradcu

1860 brez posledic zaužil 300 mg snovi, ki so jo predhodno analizirali z Marshevim testom. Omenjena količina bistveno presega  $LD_{50}$ , testiraneec pa naj bi jo zaužil v povprečju osemkrat na mesec. Uživalci arzenovih spojin so za svoje početje navedli več razlogov. Zaužita snov naj bi jih varovala pred nalezljivimi boleznimi, olajšala dihanje pri hujših fizičnih naporih (alpinizem), izboljšala naj bi prebavo, povečala pogum in spolno moč. Pojav sta preganjali tako cerkvena (zaradi praznoverja; uživanje je bilo tesno povezano z luninim ciklom), kot posvetna sodna oblast zaradi številnih kriminalnih dejanj, kjer so se povzročitelji izgovarjali na uživanje arzenovih spojin (22, 24, 25).

Kmalu so se pojavili prvi dvomi o uživanju arzenovih spojin, saj je bil pojav v nasprotju z znanjem na področju toksikologije. Večina kritikov je sumila, da so kmetje uživali neko relativno netoksično substanco (npr. cinkov oksid), vendar so analizni testi vedno potrdili prisotnost arzena v vzorcih. Možno je tudi, da je bil v vzorcu dejansko prisoten arzen, vendar so bile njegove spojine razredčene z drugimi snovmi. Zadnja možnost je vzpostavitev tolerance, saj so večkrat zabeležili, da so imeli kronični uživalci arzenovih spojin po prenehanju jemanja pogosto hude težave zlasti v gastrointestinalnem traktu, pogosto se je hitra prekinitev jemanja končala tudi s smrtjo (24, 25). Zanimivo je, da so beli arzenik uporabljale tudi dame na viktorijanskem dvoru, misleč, da redna uporaba polepša njihovo polt in obrazne poteze (24).

## 7 Literatura

- Haller JS. Therapeutic mule: The use of arsenic in the nineteenth century *Materia medica*. *Pharm Hist* 1975; 17: 87-100.
- Cilliers L, Retief FP. Poisons, poisoning and the drug trade in ancient Rome. *Akroterion* 2000; 45: 88-100.
- Miller WH, Schipper HM, Lee JS, et al. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002; 62: 3893-3903.
- Mandal BK, Suzuki Kt. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 2002; 56: 201-235.
- Shen Z, Chen G, Ni J, et al. Use of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997, 89, 3354-3360.
- Evens AM, Tallman MS, Gartenhaus RB. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present and future. *Leukemia Res* 2004, 28, 891-900.
- Hippocrates. *Peri Helkon* (On ulcers). 1-17.
- Weiss L. Early concepts of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2000, 19, 205-217.
- Dioscorides P. *De Materia medica*. V, 121-122.
- Plinius G. *Historia naturalis* (Natural history). XXXIV, 55-56.
- Bechet PE. Arsenic. History of its use in dermatology. *Arch Derm Syph* 1931, 23, p. 110-117.
- Avicenna. *Canon medicinae*. II, 49.
- Konkola K. More than a coincidence? The arrival of arsenic and the disappearance of plague in early modern Europe. *J Hist Med Allied Sci* 1992, 47, 186-209.
- Lockhart WT, Atkinson JR. Administration of arsenic in syphilis. *Can Med Assoc J* 1919, 9, 129-135.
- Antman KH. Introduction: The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy. *Oncologist* 2001, 6, 1-2.



16. Scheindlin S. The duplicitous nature of inorganic arsenic. Mol Interv 2005, 2, 60-64.
17. Obreza A. Kratka zgodovina homeopatije. V Marinko P: Stokovno posvetovanje ob predstavitvi prvega dopolnila k drugi izdaji Formulariuma Slovenicuma (FS 2.1), Ljubljana 2006, 43-48.
18. Berman A. The Heroic Approach in Nineteenth-Century Therapeutics. Bull Amer Soc Hosp Pharm 1954, 11, 320-327.
19. Haller JS. American medicine in transition. University of Illinois Press, 452 strani, Chicago, 1981, 90-98.
20. Bohinc P. Galenska farmacija (Farmacevtska tehnologija I). 2. izdaja, Združenje študentov farmacije, Ljubljana, 1969, 486-488.
21. Tomić D. Terapijske doze i oblici lijekova. Školska knjiga, Zagreb, 1961, 44.
22. The Yew York Times: The arsenic eaters. 8. november 1854, 7; Arsenic-eaters. 16. oktober 1875, 4; Arsenic eaters. 26. julij 1885, 9; The arsenic eaters of Styria. 8. september 1889, 7.
23. Janeš D, Drlja M. Tudi konji so jedli arzen, mar ne? Farm Vestn 2003, 54, 57.
24. Gontijo B. Arsenic - a historical review. An Bras Dermatol 2005, 80, 91-95.
25. Przygoda G, Feldmann J, Cullen WR. The arsenic eaters of Styria: a different picture of people who were chronically exposed to arsenic. Appl Organometal Chem 2001, 15, 457-462.

# odgovorni ljudem


*Sledimo poslanstvu Creda  
in z inovativnimi zdravili  
ustvarjamo boljšo prihodnost.*



## JANSSEN-CILAG

farmacevtski del *Johnson & Johnson* d.o.o.





**VARČEVANJE ZA STAROST**  
pri Kapitalski družbi

*Kdo pravi, da leta pobirajo davek?*



*Z lastnim varčevanjem za starost pri Kapitalski družbi dobite kar dvoje: aktivno starost z lepo rento in možnost uveljavljanja davčne olajšave!*

*Individualne premije so za leto 2008 poleg olajšave za vzdrževane družinske člane sploh edina davčna olajšava, ki jo lahko uveljavljate.*

*Kdo torej pravi, da se investiranje v starost ne spleča?*



KAPITALSKA DRUŽBA

080 2345

[www.kapitalska-druzba.si](http://www.kapitalska-druzba.si)

# Zdravila v alternativni medicini

## Medicinal products in alternative medicine

Samo Kreft

**Povzetek:** Alternativna medicina je v zadnjem času vse bolj priljubljena za zdravljenje, pa tudi vse bolj priljubljena tema pogovorov od kavarniškega do akademskega nivoja. V lanskem letu je bil sprejet Zakon o zdravilstvu, ki je dejavnosti dal pravni okvir; prav tako v lanskem letu pa smo na Fakulteti za farmacijo začeli z izvajanjem izbirnega predmeta Zdravila v alternativni medicini, tako da smo s tem dejavnosti dali akademsko noto. V prispevku bom naredil kratek pregled celotnega področja in opozoril na nekaj manj znanih dejstev. Problematizirati želim ostro mejo med alternativno in uradno medicino oz. prikazati, da je meja med njima široka, nejasna ter da je odvisna od časa, geografske lege in kulture.

**Ključne besede:** zdravilstvo, alternativna medicina, znanstveni dokaz,

**Abstract:** Alternative medicine is becoming more and more popular in therapy, and also as a topic for academic discussions and small talk. Last year a Slovene legislation on alternative medicine was adopted which gave a legal framework to this activity, and the Faculty of pharmacy in Ljubljana introduced a new elective course on "Medicinal products in alternative medicine", which gave an academic note. This article will give an overview on the area of alternative medicine, including some less known facts. The sharp border between the alternative medicine and official medicine will be questioned and many borderline examples will be presented.

**Key words:** alternative medicine, complementary and alternative medicine, scientific evidence

## Definicije

Alternativna medicina (zdravilstvo) je bila v osnutku zakona o zdravilstvu definirana kot dejavnost, ki jo opravljajo zdravniki za izboljšanje zdravja in kakovosti življenja uporabnika storitev, in ne temelji na spoznanjih medicinske vede (1). V končni sprejeti verziji zakona so iz definicije črtali »kakovost življenja« ter zadnji del stavka: »in ne temelji na spoznanjih medicinske vede« (2).

Po definiciji v predlogu zakona je bila meja med medicino in zdravilstvom vsaj teoretično jasna in ostra: znanstvena dokazanost. Definicija iz končne verzije zakona je precej manj jasna. Sprašujem se, ali ta zakon omogoča, da se nek zdravnik proglasi za zdravilca in se še naprej ukvarja z uradno medicino (sicer brez koncesije), s tem pa se izogibe določbam Zakona o zdravniški službi.

Znanstveno dokazanost kot mejo med medicino in zdravilstvom uporabljajo tudi drugi avtorji:

- »Medicinske metode so tiste, katerih učinek je **znanstveno dokazan**, ostalo je alternativna medicina«
- Alternativna medicina ni bila znanstveno preverjena in njeni zagovorniki **zanikajo** potrebo po takšnem testiranju« (3).
- »Alternativna medicina so metode, ki se jih **ne da** testirati, ki odklanjajo testiranje ali večkrat padejo na testih. Ko metodi dokažemo učinkovitost v ustrezno kontroliranih dvojno slepih študijah, metoda preneha biti alternativna« (Richard Dawkins (citat po ref. 4)).

- »Bistveno za današnjo medicino je, da temelji na rabi metod, ki so znanstveno preizkušene ali pa vsaj **izhajajo iz znanstveno preverljivih načel** in bioloških dejstev« (5).

Če pozorno beremo zgornje definicije, opazimo majhne a pomembne razlike. Razen prve, vse definicije vsebujejo neko mehčalno varovalko, ki omogoča, da tudi v uradni medicini ni vse znanstveno dokazano. V praksi je »znanstvena« meja še manj jasna, saj so interpretacije znanstvene dokazanosti različne. O tem več v naslednjem poglavju.

Glede na definirano nedokazanost alternativne medicine je svojevrstni paradoks tudi naslov revije »*Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*«, ki jo izdaja ugledna založba Oxford Journals (6).

V izogib težavam z znanstveno dokazanostjo, nekateri mejo med zdravilstvom in medicino postavljajo bolj umetno, vendar bolj jasno:

- »medicina je tisto, kar učijo na medicinskih fakultetah v ZDA in Veliki Britaniji, vse ostalo je zdravilstvo« (7)
- »nekonvencionalna terapija so tisti medicinski posegi ki jih ne poučujejo na večini medicinskih fakultet ali niso splošno dostopna v bolnišnicah v ZDA« (8, 9).

Tudi ta definicija ima pomanjkljivosti, saj zapostavlja medicinske fakultete v drugih državah, pa tudi učni program na vseh fakultetah ni enak. Po podatkih ankete med 125 medicinskimi fakultetami v ZDA, jih metode alternativne medicine poučuje kar 64% (10). Med evropskimi

medicinskimi fakultetami jih te metode poučuje 40 %, med drugimi evropskimi fakultetami s področja zdravstva pa 72 % (11).

Ameriški državni zdravstveni inštitut (NIH) definira alternativno medicino z besedami: "Nepovezana skupina neortodoksnih postopkov. Te postopke pogosto utemeljujejo na način, ki ne ustreza običajnim biomedicinskim razlagam". Ameriška National Library of Medicine pravi, da so to: "neortodoksni sistemi zdravljenja, ki nimajo zadovoljive znanstvene razlage za njihovo učinkovitost". Ti definiciji sta manj jasni, saj ne povesta, kateri so ortodoksni postopki.

### Kaj je to znanstveni dokaz

Odgovor na to vprašanje se je skozi zgodovino spreminjal. Stari Grki so si za zgled znanstvenega dokazovanja vzeli matematiko. Dokaz je moral biti popolnoma nedvoumen logični sklep (za razliko od današnje znanosti, ko hipotezo sprejmemo, če obstaja manj kot 5 % verjetnost, da hipoteza ne drži). Temelj, iz katerega so izpeljevali znanstveni dokaz so bile »splošne resnice« (npr.: "vse težke stvari padajo navzdol", "vsi ljudje so umrljivi"). Eksperimentiranja in opazovanja niso cenili, ker je opazovanje nezanesljivo, eksperimentiranje pa je lahko zakrilo "notranjo naravo stvari", ki je predmet raziskovanja.

V podobnem duhu je še René Descartes (1596-1650) gradil sistem znanja, ne da bi upošteval zaznave, ker so te nezanesljive, in namesto tega prisegal samo na metodo dedukcije (»Mislím torej sem«). V svojem delu *Meditationes de Prima Philosophia* (1641) je zapisal: »Zakoni Narave, ki se s časom in prostorom ne spreminjajo vladajo vsem sestavnim delom Narave. Ti zakoni so popolnoma racionalni in jih lahko izpeljemo z logičnim sklepanjem s pomočjo jezika matematike. Zato torej ni nobene potrebe, da bi te zakone eksperimentalno preverjali.«

Renesančni znanstveniki, ki so se srečali s potrebo po eksperimentiranju, so se spopadali s težavo nezanesljivosti in pristranosti eksperimentov in opazovanj na različne, z današnjega stališča prav nenavadne načine. Galileo Galilei (1564-1642) navaja, da je eksperiment s spuščanjem kroglic ponovil večkrat in vedno se je eksperiment ujemal s teorijo (konkretnih meritev pa ne navaja). Nekateri drugi (npr. Blaise Pascal) so eksperimente izvajali pred uglednimi pričami; eksperiment je bil še posebno zanesljiv, če mu je prisostvoval župan.

Blaise Pascal (1623 – 1662) je prvi formuliral znanstveno metodo: Za dokaz znanstvene hipoteze ni dovolj, da se vsa opažanja skladajo s hipotezo, obratno pa lahko ugotovimo njeno nepravilnost, če je eno samo opažanje v nasprotju z njo (pismo Estiennu Noelu, 1648).

Pascal je bil tudi eden prvih, ki se je zavedal pomena neodvisne ponovitve eksperimenta. Pri eksperimentih s spreminjanjem zračnega tlaka z višino je iz Pariza pisal svojemu zetu v Auvergne in ga prosil, da je po njegovih navodilih ponovil eksperiment.

Danes velja, da je znanstveni dokaz eksperiment ali opažanje, ki je dokumentirano in opisano na tak način, da ga lahko drugi znanstveniki ponovijo. Če se le da, mora biti opazovanje pri znanstvenem dokazu kvantificirano (izmerjeno, prešteto), in izvedeno na najmanj dveh skupinah, ki ju primerjamo (kontrolna skupina).

Rezultati morajo biti statistično obdelani in verjetnost, da bi se skupini razlikovali le po naključju, mora biti manj kot 5 %.

Kaj je to znanstveni dokaz, je torej bolj ali manj jasno. Težje pa je vprašanje, koliko in kakšne znanstvene dokaze moramo pridobiti, da neko hipotezo privzamemo oz. zavrnemo. Tukaj znanost oz. stroke namesto enotnega odgovora ponuja mrežo različnih doktrin za potrjevanje različnih hipotez. Kako potrdimo hipotezo, da neka populacija rastlin predstavlja novo vrsto, ki do sedaj še ni bila znana? Lahko bi uporabili biološko definicijo vrste in bi preverili ali se osebkí nove vrste uspešno plodijo z osebki do sedaj znanih vrst. Tak način preverjanja hipoteze pa je dolgotrajen in se v praksi redko uporablja. Kot dokaz zadošča opis, po katerih lastnostih se te rastline razlikujejo od najbolj podobnih do sedaj znanih vrst. Obstajajo pisana in nepisana pravila, ki določajo, kolikšne morajo biti te razlike in kako morajo biti dokumentirane. V primeru, da po pomoti potrdimo napačno hipotezo, se to lahko brez škode popravi tudi čez 30 ali več let.

V primeru potrjevanja varnosti zdravil prav tako obstaja vrsta pravil, ki določajo kakšne teste moramo izvesti, kako, v kakšnih primerih in na koliko in katerih živalih (akutna in kronična toksičnost, kancerogenost in genotoksičnost, *in vitro*, *in vivo*, na glodalcih in na ne-glodalcih...) (12). Pravila zagotavljajo kar največjo kakovost znanstvenega dokaza. Kljub vestno izvedenim vsem zahtevanim raziskavam, se še vedno lahko zgodi, da potrdimo hipotezo o varnosti, ki ne drži in se nevarnost zdravila za specifično populacijo lahko pokaže šele pri redni uporabi (13).

Standard za dokazovanje učinkovitosti zdravil so prospektivne (vnaprej načrtovane), dvojno slepe, s placebom kontrolirane, randomizirane klinične raziskave. Natančno so na več kot 50 straneh te zahteve opisane v pravilih o Dobri klinični praksi (14). Zahteve so nekoliko različne za različna indikacijska področja (15).

### So dvojno slepe raziskave edini dokaz sodobne (z dokazi podprte) medicine?

Odgovor na zgornje vprašanje ni težak: seveda ne. Na nekaterih področjih medicine, tovrstnih študij ni mogoče izvesti ali pa je njihova izvedba zapletena in draga, in v takih primerih se medicina zadovolji z bistveno nižjo ravniyo dokazov.

V kirurgiji na primer so le malo kateri posegi utemeljeni s prospektivnimi, randomiziranimi, dvojno slepimi raziskavami. Izvajanje placebo operacij je seveda etično sporno, ni pa nesprijemljivo (16). Ena prvih je bila opravljena že leta 1929 (17). Pomanjkanje drugih tipov prospektivnih randomiziranih raziskav kirurških posegov (npr. primerjava dveh vrst posegov) je posledica visoke cene in odsotnosti zainteresiranega financerja. V odsotnosti višje ravni dokazov, se z dokazi podprta medicina zadovolji z nerandomiziranimi ali celo retrospektivnimi študijami (18, 19).

Prav tako so redke dvojno slepe, s placebom kontrolirane, randomizirane klinične študije učinkovitosti fizioterapevtskih metod, nefarmakoloških psihiatričnih metod, dietetike... Kljub temu nihče ne zanika, da so vsa ta področja del sodobne medicine.

Znanost in stroka sta za vsak primer posebej določili, kakšna vrsta dokaza je potrebna, pri čemer se upošteva poleg znanstvenih kriterijev tudi možne posledice napačno potrjene hipoteze, tehnična in finančna izvedljivost ter etična načela (ni sprejemljivo, da bi učinkovitost zdravila proti raku v klinični raziskavi primerjali s placebom).

Pojavi pa se vprašanje, kdo naj določa zgoraj omenjene kriterije in kolikšno vlogo pri tem sme imeti denar?

Tudi Evropska zakonodaja (20), predvideva več možnosti za dokazovanje učinkovitosti zdravil: »Na splošno se klinična preskušanja izvajajo kot kontrolirana klinična preskušanja in če je mogoče, kot randomizirana, vsak drug načrt je treba utemeljiti«. Dopusča tudi izjemne primere: »vlagatelj lahko prikaže, da ... obsežnih informacij ni mogoče predložiti zaradi trenutnega stanja znanstvenih dognanj, ali bi bilo zbiranje tovrstnih informacij v nasprotju s splošno sprejetimi načeli medicinske etike«. Dodatna izjema so tradicionalna zdravila: »Dolga tradicija zdravila zmanjša potrebo po kliničnih študijah, če je učinkovitost zdravila verjetna na podlagi dolgoletne uporabe in izkušenj«. Za homeopatska zdravila velja: »Dokaz o terapevtski učinkovitosti se ne zahteva za homeopatska zdravila« (20).

Možnih je torej več različnih dokazov, kar pa ne pomeni, da je primeren kar vsak dokaz. Večkrat se je že zgodilo, da so izvajalci in zagovorniki alternativne medicine pristali na znanstveno preverjanje svojih metod in si sami naredili program raziskav. Raziskave so bile ne prvi pogled povsem znanstvene, podrobnejši pregled pa je pokazal, da gre za t.im. »kargo kult znanost«.

## Kargo kult znanost

V antropologiji izraz »kargo kult« označuje skupino verstev, ki so se pojavila na Pacifiških otokih po koncu druge svetovne vojne. Med vojno so vojaki na teh otokih postavili letalska oporišča in lokalnim prebivalcem, delili hrano, oblačila in druge izdelke. Domačini so si razlagali, da so ti izdelki (kargo) božja darila. Bele ljudi so imeli za

božje posrednike. Po koncu vojne so vojaki odšli in daril za domačine ni bilo več. Domačini so sklepali, da morajo sedaj bogove sami nekako prepričati, da bodo še vedno pošiljali tovor. S tem namenom so oponašali početje belih ljudi. Zgradili so letališčem podobne objekte, z nadzornimi stolpi in leseno imitacijo elektronske opreme. Pri verskem obredu so prižigali ognje ob »letališki stezi«, domačin v nadzornem stolpu pa je z lesenimi »slušalkami« na glavi, v lesen »mikrofon« izrekal molitve.

S stališča domačinov, je bil obred povsem enak, kot takrat, ko so ga izvajali belci, vendar letal z božjimi darovi vseeno ni bilo.

Pojem »kargo kult znanost« je leta 1974 uvedel nobelovec za fiziko Richard P. Feynman (21). Z njim je označil raziskave, ki so na prvi pogled prav take, kot morajo biti znanstvene raziskave, pa vendarle njihovi rezultati nimajo znanstvene vrednosti. Za znanstvenike izgleda meja med »kargo kult znanostjo« in pravo znanostjo ponavadi dokaj jasna, kljub temu pa včasih razlike ni prav enostavno formulirati.

## Različni izrazi

Za dejavnost, o kateri je govora v tem članku, se uporablja veliko različnih izrazov z enakim ali podobnim pomenom. Največ se uporablja izraz **alternativna medicina**, ki se uporablja v dveh pomenih. V širšem pomenu je to sinonim za **zdravilstvo**, kot ga definira predlog zakona, v ožjem pomenu pa je alternativna medicina del zdravilstva, ki se po temeljnih principih tako razlikuje od medicine, da se z medicino izključuje. Pacient se ne more vzporedno zdraviti z medicinskimi metodami in z metodami alternativne medicine.

**Komplementarna medicina** je drugi del zdravilstva, ki ga lahko kombiniramo oz. dopolnjujemo z medicinskimi metodami zdravljenja. Poslovenjena verzija tega izraza je **dopolnilna medicina**.

Pri **integrativni medicini** gre povezovanje med zdravilstvom in medicino še korak dlje. Zdravnik in zdravilec pri integrativni medicini sodelujeta, ali pa sta celo oba zajeta v isti osebi (npr. pri antropozofski medicini).

Tabela 1: Pogostost rabe izrazov s katerimi poimenujemo zdravilstvo<sup>a</sup>

Izraz	Google – slovensko	Google – angleška različica izraza	Nova beseda – Korpus slovenskega jezika
zdravilstvo	18.200	b	173
alternativna medicina	304.000	15.400.000	50
komplementarna medicina	1.140	1.140.000	10
dopolnilna medicina	32	c	0
komplementarna in alternativna medicina	406	1.110.000	1
alternativna in komplementarna medicina	44	311.000	3
tradicionalna medicina	23.800	1.300.000	25
ljudska medicina	271	980.000	5
nekonvencionalna medicina	65	2.310	0

a Tabela je bila narejena z iskanjem po Korpusu slovenskega jezika (28) in spletnem iskalniku Google (29) na dan 14.6.2007. Uporabljeni angleški izrazi so bili: alternative medicine, complementary medicine, complementary and alternative medicine, alternative and complementary medicine, traditional medicine, folk medicine, nonconventional medicine. Pomen posamezne rabe ni bil analiziran.

b izraz zdravilstvo nima ustreznega dobesednega prevoda v angleščino

c angleški izraz je enak kot pri komplementarni medicini



Uporablja se tudi izraz **komplementarna in alternativna medicina** (complementary and alternative medicine (CAM)), s čemer se izognemo nejasnosti v zvezi z ožjim in širšim pomenom izraza alternativna medicina. Nekoliko redkejša je uporaba iste kombinacije v obratnem vrstnem redu, torej **alternativna in komplementarna medicina**.

V uporabi je tudi izraz **nekonvencionalna medicina** (v dobesednem prevodu neustaljena, nedogovorjena) ter izraza **ljudska medicina in tradicionalna medicina**. Slednjega uporablja v nekaterih svojih dokumentih tudi WHO (22), presenetljivo pa ga nekateri uporabljajo v obratnem pomenu, torej kot sinonim za (uradno) medicino (23).

Izraz **zdravilstvo**, za katerega se je odločil tudi zakonodajalec, je lep kratek star slovenski izraz, ki pa ima prav zaradi dolgoletne rabe v slovenščini tudi slabosti. Beseda se namreč uporablja v več pomenih, med drugim tudi v pomenu (uradne) medicine (24, 25), ter v slabšalnem pomenu.

Prednost tega izraza je, da ne vsebuje besede medicina. Medicina je namreč veda (26), veda pa je dejavnost, ki si prizadeva metodično priti do sistematično izpeljanih, urejenih in dokazljivih spoznanj (27). Izraz alternativna medicina, bi bil lahko narobe razumljen, da gre za vrsto medicine.

Glede terminologije je precej izviren Zakon o zdravstveni dejavnosti, ki v 59. členu uporablja izraz **dopolnilne tradicionalne in alternativne oblike diagnostike, zdravljenja in rehabilitacije**.

Slabšalni izrazi za zdravilstvo so padarstvo, mazaštvo, ranocelništvo in šarlatanstvo. Isti izrazi se uporabljajo tudi kot slabšalni izrazi za nekvalitetno izvedene storitve (uradne) medicine.

## Razdelitev zdravilstva

Zdravilske metode lahko razdelimo glede na način s katerim skušajo vplivati na človeka. Tak način je uporabljen tudi v zakonu o zdravilstvu:

- Biološko utemeljene metode, kjer se z uporabo živil, zdravilnih zelišč, mikronutrientov preprečujejo bolezni in zdravi.
- Manipulativne metode, kjer se z premikanjem delov telesa preprečujejo bolezni in zdravi.
- Duhovno utemeljene metode, ki krepijo sposobnost duha, da vpliva na delovanje telesa.
- Energetsko utemeljene metode so metode vplivanja z biopoljem in delovanjem na biopolje.

Zgornja razdelitev temelji na načinu s katerim med zdravljenjem zdravilec vpliva na telo.

Metod, ki so namenjene samo diagnostiki (iridologija, uporaba nihal) zato ne moremo uvrstiti v nobeno izmed zgoraj naštetih skupin.

Poleg zdravilskih metod, poznamo tudi zdravilske sisteme. Zdravilski sistem je organiziran sistem, ki zajema teoretične podlage, izobraževanje, usposabljanje in izvajanje (npr. tradicionalna kitajska medicina, homeopatija, Ajurveda, naturopatija, Antropozofska medicina).

Za farmacevte so najbolj zanimive biološko utemeljene metode, pri katerih v telo vnašamo snovi. Te so npr:

- **apiterapija** - zdravljenje s čebeljimi izdelki (medom, cvetnim prahom, propolisom, voskom, matičnim mlečkom in čebeljim strupom)
- **aromaterapija** - zdravljenje z vonjavami
- **cvetno zdravljenje** (Bachove kapljice) - zdravljenje z razredčenimi izvlečki rastlin
- **gemoterapija** - uporaba rastlinskih popkov
- **hrustanec morskega psa** - uporaba tega zdravila z zdravljenjem raka
- **kadila** (moksa) -
- **koloidno srebro** -
- **makrobiotika** -
- **megavitaminska (ortomolekularna) terapija** - zdravljenje z visokimi odmerki vitaminov
- **spagirija** - uporaba združenih izvlečkov rastlin pripravljenih po več postopkih
- **stradanje (post)** -
- **urinoterapija** - zdravljenje z urinom
- **zeliščarstvo** - uporaba zdravilnih rastlin, ki nimajo dokazane učinkovitosti

Biološko utemeljene metode so vključene tudi v mnoge zdravilske sisteme:

- **ajurveda** - tradicionalno indijsko zdravilstvo
- **antropozofska medicina** -
- **holistična medicina** - celostni princip zdravljenja
- **homeopatija** - zdravljenje z močno razredčenimi zdravili
- **kampo** - tradicionalna japonska medicina
- **naturopatija** - izkoriščanje naravne sposobnosti zdravljenja
- **šamanizem** - sibirski tradicionalna medicina
- **tradicionalna kitajska medicina** -
- **unani** - tradicionalna arabska medicina
- **Kneipova terapija**

## Nevarnosti pri uporabi zdravilstva

Nevarnosti pri uporabi zdravilstva so lahko direktne (strupenost) ali posredne (zamujena terapija).

Direktna poškodba zaradi zdravilskega postopka ali sredstva je lahko npr. poškodba pri nestrokovni manipulaciji telesa ali zastrupitev z neustrezno izdelanimi rastlinskimi pripravkom.



Znan je primer 100 žensk, ki so se v letih 1990 do 1992 zastupile s Kitajskimi tradicionalnimi rastlinskimi pripravki, ki so vsebovali rastline z aristolohijsko kislino. Pri 70 izmed njih je prišlo do popolne odpovedi ledvic (30). Kljub prepovedi rastlin z aristolohijsko kislino, je ta strupena snov še vedno prisotna kar v 13 % izdelkov Tradicionalne kitajske medicine na evropskem tržišču (31). Ti izdelki nimajo statusa zdravila in imajo temu primerno neurejen nadzor.

Pogoste so tudi namerne ali nenamerne primesi težkih kovin v zdravilskih izdelkih. V nedavni raziskavi so povišane vrednosti svinca, živega srebra ali arzena našli v 20 % ajurvedskih izdelkov (32). Trije izdelki od 70 so vsebovali več kot 2 % živega srebra, kar jasno kaže, da je bila ta snov namerno dodana. S takimi zdravili prihaja do hudih zastrupitev (33). V zdravilskih pripravkih so našli celo citostatike (34).

V zadnjem letu je prišlo do večjega števila poškodb jeter pri ljudeh, ki so uporabljali izdelke blagovne znamke Herbalife (35 – 38).

Zaradi zdravljenja pri zdravilcu lahko bolnik odlaša z obiskom pri zdravniku in s tem zamudi priložnost za pravočasno medicinsko oskrbo. V tem času se lahko bolezen razvije do težje obvladljive faze. Iz slovenskega prostora je znan primer zdravnice **Darje Eržen** (ZD Kranj), ki ji obtožnica očita da je pacientu svetovala pred odhodom v Afriko homeopatske kapljice za zaščito pred malarijo. Ko je že obolel za malarijo, pa mu je dala nov homeopatski pripravek in vztrajala pri homeopatiji, čeprav se njegovo stanje ni izboljšalo. Obtožnica ji tako očita, da je zaradi njenega ravnanja novembra 1996 umrl. Zdravnica je izgubila licenco, marca letos je bila obsojena na osem mesecev pogojne zaporne kazni s preizkusno dobo dveh let (prvič je bila na enako kazen obsojena že leta 2002, vendar se je na sodbo pritožila).

Drug znan primer je zdravilka **Aiping Wang**, ki je v dvorani kina Šiška v Ljubljani zdravila z metodo shenqi. Leta 1992 so trije izmed njenih pacientov, zaradi njenih seans opustili inzulinsko terapijo sladkorne bolezni. Končali v bolnišnici, kjer so jih komaj rešili. Višje sodišče jo je oprostilo obtožbe treh kaznivih dejanj posebno hude telesne poškodbe.

## Prednosti pri uporabi zdravilstva

Fiziološki in drugi direktni učinki zdravilstva na telo po definiciji niso dokazani. Nedvomno pa imajo zdravilske metode placebo učinek. Ta je prisoten, znan in dokazan tudi pri medicinskih metodah zdravljenja, vendar pa je lahko pri zdravilskih metodah še posebno izrazit. Placebo učinek je namreč odvisen od bolnikove volje, samozavesti, vere in zaupanja. Vse to se običajno bolj izrazito razvije tekom zdravilskega postopka, pri katerem poteka bolj osebni dialog.

O tem, kako odnos do bolnika in protokol obravnave bolnika pri zdravilstvu oz. v konvencionalni medicini vpliva na potek zdravljenja, ne moremo ugotavljati s slepimi raziskavami. Lahko pa o tem sklepamo iz primerjav, kot so jo npr. naredili na Inštitutu za uporabno epistemologijo in medicinsko metodologijo iz Freiburga, in je pokazala, da je imelo pri 1000 bolnikih z akutnimi respiratornimi in ušesnimi infekcijami antropozofsko zdravljenje boljši izid, z manj zapleti, večjim zadovoljstvom bolnika in ob manjši uporabi antibiotikov kot konvencionalni pristop (39). Raziskava res ni bila ne slepa, ne randomizirana (bolniki so se sami odločali med konvencionalnim in alternativnim zdravljenjem).

## Pogostost uporabe zdravilstva

V ZDA uporablja zdravilstvo 36 % odraslih, če pa k zdravilstvu štejemo tudi molitev za zdravje, ga uporablja kar 62 % ljudi (40). Druga raziskava je pokazala, da v enem letu uporablja alternativno medicino 36 % Američanov, vsaj enkrat v življenju pa 50 % (ta raziskava vključevala tudi jogo, meditacijo, vse zdravilne rastline in celo Atkinsonovo dieto (41). Odstotek ljudi, ki v posameznem letu uporabi alternativno zdravljenje, so na Danskem ocenili na 10%, 33% na Finskem, 49% v Avstraliji in 15 % v Kanadi (42). Razlike med državami so deloma tudi posledica različnih definicij. V ZDA pri nekaterih statistikah med zdravilstvo uvrščajo tudi prehranska dopolnila, med ta pa tudi sodobno fitoterapijo (znanstveno utemeljeno zdravljenje z zdravilnimi rastlinami).

## Zaključek

Medicina uporablja za zdravljenje velik spekter metod, ki so vse znanstveno utemeljene, znanstveni dokazi pa so zelo različni, od najboljših, do precej slabših. Učinek nekaterih metod (predvsem zdravil) je nedvoumno dokazan z več prospektivnimi, dvojno slepimi, s placebom kontroliranimi randomiziranimi kliničnimi raziskavami; učinek drugih metod pa je utemeljen le s teoretično fiziološko razlago. Na spodnjem koncu te palete dokazov, se k medicini prilaga (oz. se po kvaliteti dokazov z njo deloma prekriva) zdravilstvo. Tudi zdravilstvo je heterogena skupina metod, od takih, pri katerih se učinek precej jasno nakazuje (vendar po neki subjektivni presoji dokazi še niso dovolj močni); preko takih, ki imajo učinek dokazano enak (močnemu) placebo; do takih, ki so dokazano škodljive, ali celo namerna prevara.

## Reference

1. Predlog zakona o zdravilstvu, [http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/aktualno/javna\\_razprava/zakon\\_o\\_zdravilstvu/Zakon\\_o\\_zdravilstvu\\_20.9.2006.pdf](http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/aktualno/javna_razprava/zakon_o_zdravilstvu/Zakon_o_zdravilstvu_20.9.2006.pdf)
2. Zakon o zdravilstvu, Uradni list RS 94/2007 z dne 16. 10. 2007 (<http://www.uradni-list.si/1/ulonline.jsp?urlid=200794&dhid=92007>).
3. Angell M, Kassirer JP. Alternative medicine--the risks of untested and unregulated remedies. *N Engl J Med.* 1998; 339: 839-41.
4. Wikipedia: Complementary and alternative medicine: [http://en.wikipedia.org/wiki/Complementary\\_and\\_alternative\\_medicine](http://en.wikipedia.org/wiki/Complementary_and_alternative_medicine)
5. Trontelj J. Stališče Državne komisije za medicinsko etiko o zdravilstvu. *ISIS* 1998; št.4; <http://www.mf.uni-lj.si/isis/isis98-04/html/zakomisijo23.html>
6. <http://ecam.oxfordjournals.org/>
7. Merriam-Webster online: <http://www.m-w.com/dictionary/alternative+medicine>, vpogled 16 April 2007
8. Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Delbanco TL. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. *N Engl J Med.* 1993; 328: 246-52.
9. Eisenberg DM, Kessler RC, Van Rompay MI, Kaptchuk TJ, Wilkey SA, Appel S, Davis RB. Perceptions about complemen-

- tary therapies relative to conventional therapies among adults who use both: results from a national survey. *Ann Intern Med.* 2001;135: 344-51.
10. Wetzel MS, Eisenberg DM, Kaptchuk TJ. Courses involving complementary and alternative medicine at US medical schools. *JAMA.* 1998; 280(9): 784-7.
  11. Barberis L, de Toni E, Schiavone M, Zicca A, Ghio R. Unconventional medicine teaching at the Universities of the European Union. *J Altern Complement Med.* 2001; 7: 337-343.
  12. ICH. Safety topics; <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>
  13. EMEA: European Medicines Agency recommends withdrawal of marketing authorisations for cough medicines containing clobutinol; Doc. Ref. EMEA/480863/2007; London, 18 October 2007.
  14. ICH. Guideline For Good Clinical Practice; <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA482.pdf>
  15. EMEA: Note For Guidance On Clinical Investigation of Medicinal products In The Treatment of Depression; CPMP/EWP/518/97, Rev. 1; London, 25 April 2002.
  16. Hung M. Placebo Surgery Gains Wider Acceptance. *N Engl J Med.* 2001; 344:710-719.
  17. Cobb LA, Thomas GI, Dillard DH, et al: An evaluation of internal mammary artery ligation by a double-blind technic. *N Engl J Med* 1959; 260: 1115.
  18. Transfeldt EE, Mehdod AA. Evidence-based medicine analysis of isthmio spondylolisthesis treatment including reduction versus fusion in situ for high-grade slips. *Spine.* 2007; 32(19 Suppl): S126-129.
  19. Mulpuri K, Perdios A, Reilly CW. Evidence-based medicine analysis of all pedicle screw constructs in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2007; 32(19 Suppl): S109-114.
  20. DIREKTIVA 2001/83/ES EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 6. novembra 2001 o zakoniku Skupnosti o zdravilih za uporabo v humani medicini z amandmaji.
  21. Dolenc S. Kargo kult znanost, Kvarkadabra; <http://www.kvarkadabra.net/article.php/Kargo-kult-znanost>
  22. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine; WHO Geneva 2000.
  23. Horvat M. Nemedicinsko zdravilstvo. *ISIS* 1997; št. 10
  24. Slovar slovenskega knjižnega jezika: zdravilstvo, DZS
  25. Erjavec F. Živalske podobe. poved 588 v sobesedilu.
  26. Slovar slovenskega knjižnega jezika: medicina, DZS
  27. Slovar slovenskega knjižnega jezika: veda, DZS
  28. Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša ZRC SAZU, Laboratorij za korpus slovenskega jezika, [http://bos.zrc-sazu.si/s\\_beseda.html](http://bos.zrc-sazu.si/s_beseda.html)
  29. Spletni iskalnik Google, <http://www.google.si/>
  30. FDA. Letter to Health Professionals Regarding Safety Concerns Related to the Use of Botanical Products Containing Aristolochic Acid; <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/ds-botl3.html>
  31. Martena MJ, van der Wielen JC, van de Laak LF, Konings EJ, de Groot HN, Rietjens IM. Enforcement of the ban on aristolochic acids in Chinese traditional herbal preparations on the Dutch market. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 263-275.
  32. Saper RB, Kales SN, Paquin J, Burns MJ, Eisenberg DM, Davis RB, Phillips RS. Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. *JAMA.* 2004 Dec 15; 292(23):2868-73.
  33. Garnier R, Poupon J. Lead poisoning from traditional Indian medicines. *Presse Med.* 2006; 35(7-8): 1177-80.
  34. Au AM, Ko R, Boo FO, Hsu R, Perez G, Yang Z. Screening methods for drugs and heavy metals in Chinese patent medicines. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2000; 65: 112-119.
  35. Schoepfer AM, Engel A, Fattinger K, Marbet UA, Criblez D, Reichen J, Zimmermann A, Oneta CM. Herbal does not mean innocuous: ten cases of severe hepatotoxicity associated with dietary supplements from Herbalife products. *J Hepatol.* 2007; 47: 521-526.
  36. Stickel F. Slimming at all costs: Herbalife-induced liver injury. *J Hepatol.* 2007; 47: 444-446.
  37. Elinav E, Pinsker G, Safadi R, Pappo O, Bromberg M, Anis E, Keinan-Boker L, Broide E, Ackerman Z, Kaluski DN, Lev B, Shouval D. Association between consumption of Herbalife nutritional supplements and acute hepatotoxicity. *J Hepatol.* 2007; 47: 514-520.
  38. Duque JM, Ferreiro J, Salgueiro E, Manso G. Hepatotoxicity associated with the consumption of herbal slimming products. *Med Clin (Barc).* 2007; 128(6): 238-239.
  39. Hamre HJ, Fischer M, Heger M, Riley D, Haidvogel M, Baars E, Bristol E, Evans M, Schwarz R, Kiene H. Anthroposophic vs. conventional therapy of acute respiratory and ear infections: a prospective outcomes study. *Wien Klin Wochenschr.* 2005; 117: 256-68.
  40. The Merck Manual online. Complementary and Alternative Medicine (CAM)-Introduction, vpogled 8 junij 2007
  41. Barnes, P. M.; Powell-Griner, E.; McFann, K.; Nahin, R. L. Complementary and Alternative Medicine Use Among Adults: United States, 2002, National Center for Health Statistics; <http://nccam.nih.gov/news/report.pdf>
  42. Eisenberg et al. UPORABA ALTERNATIVNE MEDICINE V ZDA *JAMA* 1998; 280: 1569-1575.

# Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ kot potencialna učinkovina

## Fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ as a potential drug

Rade Injac, Nina Kočevar, Borut Štrukelj

**Povzetek:** Fulereni predstavljajo relativno novo skupino spojin, za katere je značilna sferična prostorska ureditev, zgrajeni pa so izključno iz ogljikovih atomov. Od njihovega odkritja leta 1985 intenzivno raziskujejo fizikalne in kemijske lastnosti ter biološko uporabnost fulerenov in njihovih derivatov. V *in vitro* in *in vivo* modelih so se kot potencialni antioksidanti v bioloških sistemih pokazali polihidroksilirani fulerenovi derivati,  $C_{60}$ -fulerenoli ( $C_{60}(OH)_n$ ,  $n = 2-28$ ). V članku predstavljamo pregled do sedaj objavljenih raziskav o biološki aktivnosti fulerenov s posebnim poudarkom na najbolj proučenem fulerenolu  $C_{60}(OH)_{24}$ .

**Ključne besede:** fulereni, fulerenoli, antioksidanti

**Abstract:** Fullerenes are a relatively new group of compounds and represent a class of sphere-shaped molecules made exclusively of carbon atoms. Since their discovery in 1985, many aspects of both fullerene and its analogues have been intensively studied to reveal their physical and chemical reactivity, as well as potential use in biological systems. Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that polyhydroxylated fullerene derivatives, fullerenols ( $C_{60}(OH)_n$ ,  $n = 2-28$ ), can be potential antioxidative agents in biological systems. The article represents a review of published investigations of fullerenes' biological activities with special emphasis on the most examined fullereneol  $C_{60}(OH)_{24}$ .

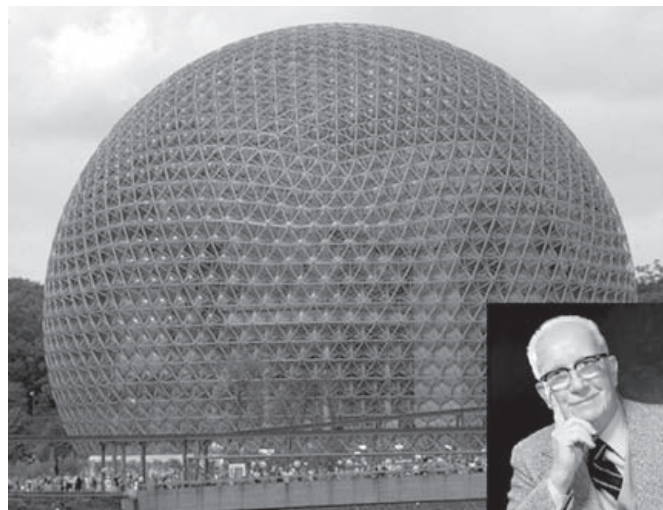
**Keywords:** fullerene, fullerenols, antioxidants

## 1 Uvod

Fulereni ali klastične oblike ogljika so novoodkrita, tretja alotropska modifikacija ogljika. Ime so dobili po arhitektu Buckminsterju Fullerju, ki je pri projektiranju Geodezijskega doma v Montrealu v konstrukcijo kupole ameriškega paviljona EXPO 1967 vklopil heksagonske in pentagonske strukture (slika 1). Leta 1996 so Robert F. Curl, Harold W. Kroto in Richard E. Smalley prejeli Nobelovo nagrado s področja kemije za odkritje in rešitev strukture najbolj znanega predstavnika fulerenov, molekule  $C_{60}$  (1).

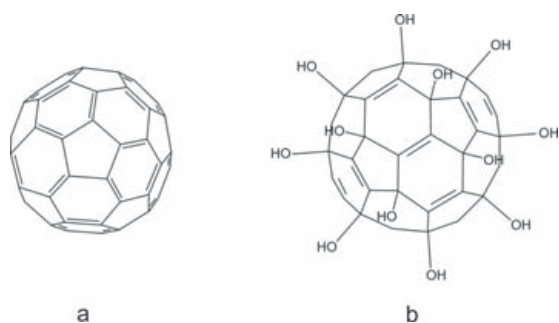
Vsak fuleren je sestavljen iz  $2 \times (10 + M)$  ogljikovih atomov ( $M \geq 0$ ) s konstantnim številom 12 pentagonov. Fuleren  $C_{60}$  ali [5,6]-fuleren-60- $I_h$  ima simetrijo priskekanega ikozaedra z osjo simetrije pete vrste (7).

Fuleren  $C_{60}$  je v nasprotju z diamantom in grafitom kemijsko zelo reaktiven (2, 3). Z modifikacijo fulerena  $C_{60}$  so dobili številne vodotopne biološko aktivne molekule, med katerimi so se kot najbolj zanimivi v *in vitro* in *in vivo* raziskavah pokazali polihidroksilirani fulerenovi derivati,  $C_{60}$ -fulerenoli ( $C_{60}(OH)_n$ ,  $n = 2-28$ ). V dosedanjih raziskavah na kemijskih in bioloških modelnih sistemih so pokazali izredno visoko antioksidativno aktivnost (4-6). Zgradbi fulerena  $C_{60}$  in fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  sta prikazani na sliki 2.



Slika 1: Arhitekt Buckminster Fuller, v ozadju kupola za ameriški paviljon EXPO 1967 v Montrealu

Figure 1: Architect Buckminster Fuller and his construction of American pavilion EXPO 1967 in Montreal

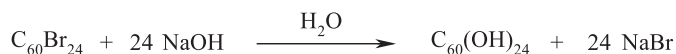


Slika 2: Zgradbi fulerena  $C_{60}$  (a) in fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  (b)

Figure 2: Structures of fullerene  $C_{60}$  (a) and fullerol  $C_{60}(OH)_{24}$  (b)

## 2 Sinteza fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$

Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  sintetiziramo po originalnem postopku (8):



Čeprav postopek ni preveč zahteven, je pridobivanje produkta s stopnjo čistote nad 95 odstotkov zelo težavno. Sinteza poteka v naslednjih korakih: 150 mg  $C_{60}Br_{24}$  zmešamo s 5 mL 0,1 M raztopine NaOH. Ob sprotneem zniževanju pH z dodajanjem 0,1 M HCl do pH 4,5 mešamo raztopino 30 minut pri sobni temperaturi. Raztopino nato uparimo do suhega pod znižanim tlakom pri 40 °C. Reakcijsko zmes spiramo trikrat s 25 mL metanola in dvakrat s 25 mL vodne raztopine etanola (1 : 1; v/v). Na koncu speremo fulerenol s 50 mL prečiščene vode in nato sušimo pri 50 °C (8).

## 3 Lastnosti fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$

Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  je rjava, amorfna, higroskopna praškasta spojina. V vodi je zmerno topen (do 10 mg/mL). Stabilen je pri dnevni svetlobi in sobni temperaturi. S kovinskimi ioni tvori rjavo oborino. V kislem je stabilen, v alkalnem pa je prisoten v ionizirani obliki,  $C_{60}(OH)_{24-n}(ONa)_n$ . Vodna raztopina je rjave barve in ne daje značilnih vrhov v

UV/VIS spektru. Krivulja termostabilnosti kaže, da je spojina zelo odporna na visoke temperature (po 24 urah pri 150 °C več kot 80 odstotkov spojine ostane nespremenjene).

Točk tališča, vrelišča, vnetljivosti in sublimacije še niso določili, prav tako ne eksplozivnosti in gostote spojine. Obstoječi podatki o toksičnih učinkih obsegajo dražeče delovanje na očesno in nosno sluznico, v nekaterih primerih tudi na kožo. Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  je zelo lahko vnetljiva spojina, ki reagira z oksidanti, halogeni in kisljinami. Hidroksilne skupine v molekuli fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  imajo značaj terciarnih alkoholnih skupin (4, 8, 9). Shranjevati ga moramo stran od izvorov kuhinjskega plina, ognja in spojin, ki izkazujejo fizikalno-kemijsko inkopatibilnost (8, 9). Na trgu so trenutno dostopni polihidroksilirani derivati fulerena  $C_{60}(OH)_n$  z različnim deležem  $C_{60}(OH)_{24}$ . Proizvajalci so Nano-C (ZDA), Alfa Aesar (Nemčija) in Mer Corporation (ZDA).

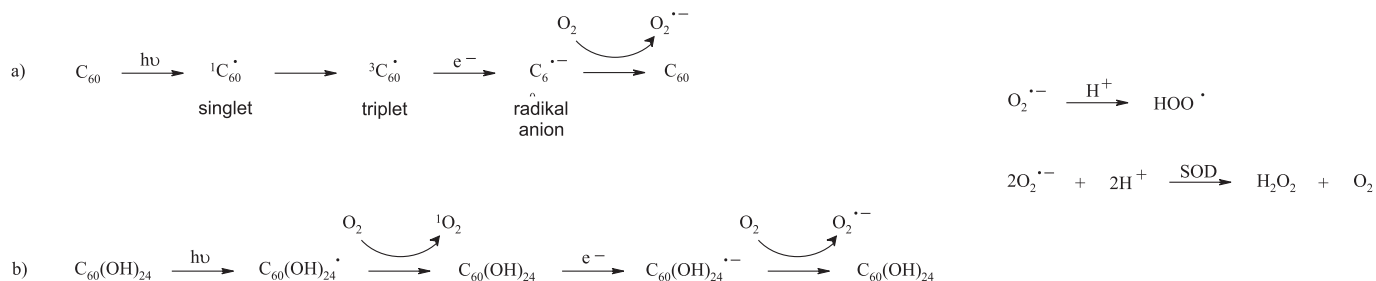
## 4 Biološko aktivni derivati fulerena

Čeprav so agregati fulerena  $C_{60}$  pokazali izjemno toksičnost v poskusih na človeških celicah, je toksičnost polihidroksiliranih derivatov izrazito manjša. Toksičnost je posledica nastanka superoksidnih radikalov in posledične poškodbe celične membrane (9).

Kot je prikazano v sistemu reakcij na sliki 3, je nastanek kisikovih radikalov posledica fotoekscitacije molekule  $C_{60}$  (10, 11, 12). Primarno nastaneta singletni kisik in superoksidni anion, ki povzročita nastanek vodikovega peroksida in hidroperoksidnega radikala.

Singletni kisik ( $^1O_2$ ) je visokoreaktivna elektrofilna neradikalaska molekula in selektivni oksidant. Zaradi velike reaktivnosti ga v atmosferi praktično ni, nastaja pa v nekaterih kemijskih reakcijah in fotokemično iz tripletnega kisika ( $^3O_2$ ). V zelo kratkem času ( $10^{-6}$  s) reagira z večino organskih spojin, ki so v celici: s spojinami, ki imajo z elektroni bogate dvojne vezi in tudi z lahko oksidirajočimi funkcionalnimi skupinami, kot so v sulfidih (R-S-R), fenolih in anilinih (13).  $^1O_2$  povzroča fragmentacijo verige DNK in ga lahko uporabljamo za oksidativno uničenje bakterij (11).

Onesnaženi fulerenški derivati imajo citotoksični učinek, predvsem kadar čas tripletnega stanja traja več kot 100  $\mu$ s, kar povzroči fragmentacijo DNK in poškodbe celične membrane (14).



Slika 3: Fotoekscitacija molekul  $C_{60}$  (a) in  $C_{60}(OH)_{24}$  (b) ter nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti; SOD – superoksid dismutaza (10, 11, 12)

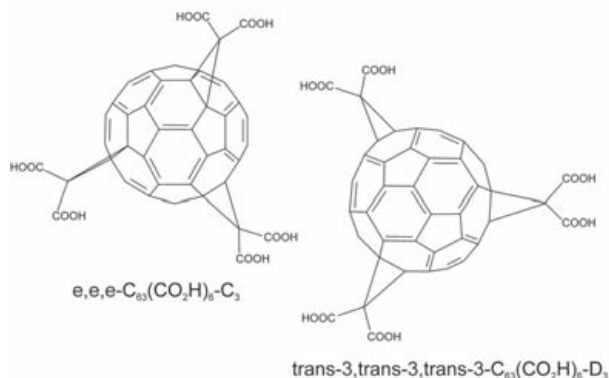
Figure 3: Photoexcitation of  $C_{60}$  (a) and  $C_{60}(OH)_{24}$  (b) molecules and formation of reactive oxygen species; SOD – superoxide dismutase (10, 11, 12)



Ko se fuleren veže na molekulo DNK v pufrski raztopini, nastanejo agregati. Na podlagi tega lahko domnevamo, da bi z uvedbo ustreznih funkcionalnih skupin v molekulo fulerena dobili strukture, ki bi lahko vplivale na DNK znotraj celice, kar nakazuje na potencialno uporabo derivatov v genskem zdravljenju (15).

Pri vezavi polarnih skupin (-OH,  $-NH_2$ , -NHR, -COOH, -OCCOR, -NHCOR itd.) na molekulo fulerena dobimo derivate, ki so v vodi bolj topni kot lipofilna molekula  $C_{60}$  (8). Fulerenoli, polihidroksilirani derivati fulerena ( $C_{60}(OH)_n$ ), so se pokazali kot odlične spojine za odstranjevanje radikalov. Antioksidativno aktivnost fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  so potrdili na kemijskem modelnem sistemu. Predpostavljeni mehanizmi delovanja vključujejo inaktivacijo hidroksilnega ( $OH^*$ ) in superoksidnega radikala ( $O_2^{\bullet}$ ) ter dušikovega oksida ( $NO^*$ ) (16, 17).

C3-karboksifulereni (*tris* in *bis* derivati; slika 4) imajo antioksidativno vlogo v dopaminergičnih delih možganov, kjer pride v patoloških razmerah do nastanka oksidativnega stresa zaradi povečane koncentracije ionov železa. S tem se odpirajo možnosti za uporabo vodotopnih derivatov fulerena v zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, kot sta Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen. Potrdili so, da lahko z injiciranjem C3-karboksifulerena zmanjšamo poškodbe, ki nastanejo na dopaminskih receptorjih po vnosu železa v intrastrialni del bazalnih ganglijev. Visok delež ionov železa v bazalnih ganglijih je vzrok za oksidativne poškodbe pri Parkinsonovi bolezni (19).



Slika 4: Zgradba karboksifulerena s parnimi karboksilnimi skupinami na površini  $C_{60}$ . Izomera prikazujeta C3 in D3 simetrijo (18).

Figure 4: Structure of carboxyfullerene with the paired carboxyl groups on the  $C_{60}$  sphere. The two isomers shown are in C3 and D3 symmetry.

C3-karboksifulereni imajo zaščitne učinke na periferne krvne mononuklearne celice. Z delnim vgrajevanjem v membrano mitohondrijev lahko preprečijo celično smrt, ki naj bi bila posledica vpliva 2-deoksi-D-riboze, dejavnika tumorske nekroze  $TNF-\alpha$  in cikloheksimida (20).

Inhibitorni vpliv fulerenovega derivata dimalonke kisline na relaksacijo aorte poskusnega kunca, ki je posledica vazodilatornega učinka dušikovega oksida, lahko pojasnimo z nastajanjem superoksida in posledično nevtralizacijo dušikovega oksida s superoksidnim anionom. Ob prisotnosti encima superoksid-

dismutaze je ta učinek prikrit. Enak učinek so opisali pri derivatih monomalonke kisline (21).

Poleg tega so C3-karboksifulereni dobri blokatorji virusne replikacije, vplivajo pa tudi na vzdrževanje ionske homeostaze v celicah (22, 23).

Mehanizem antioksidativnega učinka fulerenola temelji na katalitičnem vplivu v zaključni stopnji radikalskih reakcij oziroma na radikalsko-adicijskih reakcijah hidroksilnega radikala na dvojne vezi fulerenola, pri čemer nastanejo derivati  $C_{60}(OH)_n$  ( $n > 24$ ).

## 5 Biološka aktivnost $C_{60}(OH)_{24}$

V molekuli fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  so najbolj reaktivne dvojne vezi, ki povezujejo posamezne pentagonske strukture. Reaktivni radikali, ki so prisotni v biološkem sistemu, se po vnosu fulerenola vežejo na njegovo površino, vendar ta vezava ni kovalentna (8). Interakcija med hidroksilnim radikalom in fulerenolom temelji na radikalski adiciji hidroksilnega radikala ( $OH^*$ )<sub>2n</sub> na olefinske dvojne vezi fulerenolovega ogrodja do proizvoda  $C_{60}(OH)_{24} + (OH^*)_{2n}$  ( $n = 1-12$ ). Drugi možni mehanizem je, da fulerenol odda svoj vodik radikal  $OH^*$ , pri tem pa nastane stabilni radikal  $C_{60}(OH)_{23}O^*$  (24).

Natrijev nitroprusid je donor dušikovega oksida (NO), ki ga fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  zelo uspešno lovi. Raztopina natrijevega nitroprusida odpušča NO pod vplivom vidne svetlobe pri sobni temperaturi ali v temi pri temperaturi 34 °C, kar je podobno razmeram v biološkem sistemu. Učinkovitost fulerenola kot lovca NO lahko sledimo preko nitritov, ki nastanejo z oksidacijo NO. Redukcija nitrita v raztopinah je odvisna od odmerka  $C_{60}(OH)_{24}$  (25).

Na mišjem gladkomišičnem tkivu so naredili primerjalno analizo antioksidativnih učinkov fulerenola in vitamina C. Fulerenol je na dveh celičnih linijah izkazoval večjo učinkovitost kot vitamin C (26). Na miših so določili tudi akutno toksičnost fulerenola po intraperitonealnem vnosu, in sicer znaša  $LD_{50}$  1,2 g/kg (27).

V *in vitro* raziskavah s človeškimi in z živalskimi celicami različnih linij (eritrolevkemije, Burkitovega limfoma, adenokarcinoma dojke, fibroblasta pri miših, nefrona hrčka) so ugotovili antiproliferativno aktivnost fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$ . Molekula fulerenola v nanomolskih koncentracijah v prvih 48 urah inhibira rast vseh naštetih tumorskih celičnih linij, razen linije Burkitovega limfoma. Inhibicija te vrste je zelo nizka. Inhibicija rasti je reverzibilna, saj so celice po 48 urah rasti v mediju primerljive s kontrolnimi vzorci (28).

Železo iz sistema  $Fe^{2+}$ /askorbat spodbudi lipidno peroksidacijo v spermatozoidih sesalcev in pri tem poškoduje nanasičene maščobne kisline v membrani, kar povzroči nastanek oksidativnega stresa v epididimisu in testisih ter nastanek neplodnosti. Indijska strokovna skupina Murugana in sodelavcev je prva potrdila, da fulerenol  $C_{60}(OH)_n$  (predvsem  $C_{60}(OH)_{18}$ ) preprečuje z železom induciran oksidativni stres. V raziskavah so uporabljali spermo koze (*in vitro*), kar je prvi znanstveni podatek o vplivu fulerenola na reproduktivna tkiva (29).

V raziskavi na celicah človeške eritrolevkemije K-562, obdelanih s fulerenolom  $C_{60}(OH)_{24}$ , so proučevali sposobnost sinteze DNK, mitotsko aktivnost in celični cikel. Sintezo in mitotsko fazo celičnega cikla so ocenili na podlagi mitotskega in proliferacijskega indeksa.



Preglednica 1

Tkivo	Dnevi po obsevanju	Aplikacija (mg/kg i.p.)					
		Brez		F (100)		A (300)	
		D	V	D	V	D	V
Tanko črevo	7	3	3	1	1	1	1
	28	5	5	2	1	4	2
Vranica	7	3	3	1	1	2	2
	28	5	5	3	2	5	4
Jetra	7	3	3	2	2	1	1
	28	5	5	3	4	2	3
Ledvice	7	3	3	2	2	1	1
	28	4	5	3	3	2	2
Srce	7	3	3	1	1	0	0
	28	4	4	2	3	1	1
Pljuča	7	3	2	1	1	2	2
	28	5	4	2	2	4	3

Preglednica 1: Vpliv fulerenola (F) in amifostina (A) na degenerativne (D) in vaskularne (V) poškodbe tkiva pri podganah, izpostavljenih rentgenskemu sevanju (7 Gy). Degenerativne spremembe: 0 ni poškodbe; 1 posamezne celice z granulami v citoplazmi, normalno jedro, rahlo povečane; 2 >50 % celic z redkimi vakuolami v citoplazmi in nukleoplazmi; 3 vse celice s številnimi vakuolami v citoplazmi in nukleoplazmi, piknotično jedro; 4 plazmaliza in karioliza, infiltracija polimorfonuklearnih celic, fagocitoza mrtvih celic; 5 aktivacija in proliferacija fibroblastov, nastanek vezivnega tkiva. Vaskularne spremembe: 0 ni poškodbe, 1 blaga dilatacija, ni sprememb v žilni steni; 2 izrazita dilatacija, staza, hiperemija, edem; 3 transmuralno pretrganje do 50 % žil, kopičenje polimorfonuklearnih celic; 4 popolna izguba bazalne membrane in endotelija pri >50 % žil; 5 huda krvavitev.

Table 1: Influence of fullereneol (F) and amifostine (A) on tissue damage score for degenerative (D) and vascular (V) changes in X-irradiated rats (7 Gy). Degenerative changes: 0 no damage; 1 single cells with small cytoplasmic granules, normal nucleus, slightly enlarged; 2 >50% cells with mild vacuolisation of cytoplasm and nucleoplasm; 3 All cells with pronounced vacuolisation of cytoplasm and nucleoplasm, pycnotic nucleus; 4 plasmolysis and caryolysis, infiltration of polymorphonuclear cells, phagocytosis of dead cells; 5 activation and proliferation of fibroblasts, production of connective tissue. Vascular changes: 0 no damage; 1 mild dilatation, no changes in blood vessel wall; 2 strong vasodilatation, stasis, hyperaemia, oedema; 3 transmural rupture of up to 50% of blood vessels, accumulation of polymorphonuclear cells; 4 complete loss of the basal membrane and endothelium of >50% blood vessels; 5 strong haemorrhage.

Mitotski indeks celic, obdelanih s fulerenolom, je manjši kot pri kontrolnih celicah. Ta rezultat potrjuje prejšnje hipoteze, da  $C_{60}(OH)_{24}$  inhibira nastanek delitvenega vretena in mikrotubulov, in sicer ne glede na čas inkubacije celic s fulerenolom. Mitotski indeks (MI) ocenjujemo na osnovi razmerja:

$$MI = [\text{število celic v mitozih}] / [\text{skupno število celic}]$$

Molekula  $C_{60}(OH)_{24}$  torej spreminja celični cikel celic K-562, saj vpliva na sintezo in mitotsko fazo cikla.  $C_{60}(OH)_{24}$  ima večjo citostatično kot pa citotoksično aktivnost na celični liniji humane eritrolevkemije K-562, kar potrjuje tudi visoka stopnja preživelih celic, ki so bile obdelane s fulerenolom (30).

Fulerenol v *in vitro* razmerah na človeških limfocitih periferne krvi ni pokazal genotoksičnosti v razponu koncentracij od 1 do  $10^3 \mu\text{g/mL}$  (31). V preliminarnih *in vivo* raziskavah na miših je pokazal zadovoljivo radioprotekcijo v odmerku 100 mg/kg, danem intraperitonealno 30 minut pred obsevanjem (31). Opravljena je bila tudi raziskava na podganah, v kateri so primerjali učinkovitost radioprotekcije fulerenola (100 mg/kg) z učinkovitostjo klasičnega radioprotektiva amifostina

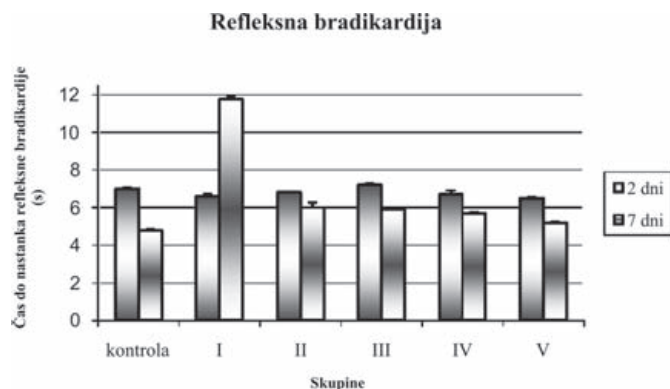
(300 mg/kg), ki so ju injicirali intraperitonealno 30 minut pred obsevanjem (32). Rezultate histopatološke analize tkiv različnih organov (pljuč, srca, jeter, ledvic, tankega črevesa in vranice) prikazuje preglednica 1.

## 6 Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ kot potencialni kardioprotektiv pri zdravljenju malignih neoplazem z doksorubicinom

Doksorubicin je antraciklinski antibiotik z zelo široko uporabo v onkologiji, saj izkazuje širok spekter protitumorske aktivnosti. Najpomembnejše indikacije za njegovo uporabo so limfomi, akutne levkemije in solidni tumorji, kot so karcinom dojke, drobnocelični pljučni karcinom, karcinomi sečnega mehurja, ščitnice in želodca, sarkomi mehkih tkiv in osteogeni sarkomi, nevroblastomi in Wilmsov tumor (33). Vendar pa njegovo učinkovitost omejujejo mielosupresija in okvare gastrointestinalnega trakta, zlasti pa kardiotoksičnost. Ta je odvisna od odmerka in je kumulativna, pojavi pa se lahko v akutni,

subakutni ali kronični obliki (34, 35). Kardiotoksičnost doksorubicina je ireverzibilna in rezistentna na zdravljenje. Zmanjšanje odmerka doksorubicina izboljša prenašanje zdravila, vendar pa značilno zmanjša njegovo protitumorsko aktivnost. Zaradi tega bi odkritje učinkovitega in dobro prenosljivega kardioprotektiva pomenilo pomemben premik v zdravljenju onkoloških bolnikov, pri katerih je indicirana uporaba doksorubicina.

Na podlagi znanih kardioprotektivnih lastnosti fulerenola v *in vitro* sistemih potekajo intenzivne predklinične raziskave, s katerimi poskušamo ugotoviti, ali ima fulerenol potencial pri zaščiti pred kardiotoksičnostjo doksorubicina, ali je ta učinek odvisen od odmerka in ali bolniki sam fulerenol v uporabljenih odmerkih dobro prenašajo. Poleg tega proučevanje antioksidativnih mehanizmov fulerenola *in vivo* prispeva k boljšemu poznavanju njegovega farmakološkega profila, o čemer zaenkrat obstaja zelo malo znanstvenih podatkov. Objavljeni rezultati kažejo vpliv samega fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  in fulerenola, injiciranega 30 minut pred doksorubicinom (8 mg/kg; i.v.), na utrip in tkivo miokarda pri zdravih podganah Wistar (obeh spolov, mase 180-250 g). V poskusu so bile živali razdeljene v šest skupin: kontrolno, obdelano z doksorubicinom (I), obdelano s fulerenolom (50 mg/kg) in z doksorubicinom (II), obdelano s fulerenolom (100 mg/kg) in z doksorubicinom (III), obdelano s fulerenolom (200 mg/kg) in z doksorubicinom (IV) ter obdelano samo s fulerenolom (100 mg/kg) (V) (36). Kot prikazujejo rezultati na sliki 5, doksorubicin po sedmih dneh izrazito poveča čas do nastanka refleksne bradikardije. Te toksične spremembe na miokardu pa se značilno zmanjšajo po injiciranju fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$ .



Slika 5: Vpliv fulerenola na z doksorubicinom inducirane spremembe v kardiovaskularnem refleksu med infuzijo adrenalina pri podganah

Figure 5: Influence of fullereneol on doxorubicin-induced changes in cardiovascular reflex during adrenalin infusion in rats

Kardioprotektivne lastnosti fulerenola smo proučevali tudi v raziskavi na Sprague-Dawleyevih podganah z malignimi neoplazmami, kjer smo določali učinke na aktivnost serumskih encimov (kreatin-kinaze, laktat-dehidrogenaze  $\alpha$ -hidroksibutirat-dehidrogenaze), pokazatelje oksidativnega stresa v srcu (malondialdehida, glutaciona, glutation disulfida, glutation-peroksidaze, superoksid-dizmutaze, katalaze, glutation-reduktaze in celotni antioksidativni status) ter patohistološke

spremembe srčnega tkiva (37). Doksorubicin je tudi v tem primeru povzročil močne oksidativne poškodbe tkiva, ki so se izrazile v značilno povišanih vrednostih encimov. Po intraperitonealnem vnosu fulerenola, injiciranega 30 minut pred doksorubicinom, pa so vrednosti ostale primerljive s kontrolno skupino.

## 7 Sklep

Fulerenoli so v kemijskih in bioloških modelnih sistemih v dosedanjih raziskavah pokazali izredno visoko antioksidativno aktivnost. Preventivna uporaba fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  bi lahko pomembno zmanjšala kardiotoksične in hepatotoksične učinke doksorubicina pri zdravljenju malignih tumorjev. Poleg tega se kaže potencialna uporaba fulerenola in drugih derivatov fulerena tudi na področju nevrodegenerativnih bolezni (Parkinsonove in Alzheimerjeve) in bolezni na reproduktivnih tkivih, obetavne pa so tudi njegove citostatične in radioprotektivne lastnosti.

## 8 Literatura

- Kroto H, Heath J, O'Brien S et al.  $C_{60}$ : Buckminsterfullerene. Nature 1985; 318: 162-163.
- Hirsch A. The Chemistry of the Fullerenes. New York: Wiley; 1993.
- Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Eklund PC. Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. San Diego: Academic Press; 1996: 292-325.
- Chaing LY, Lu FJ, Lin JT. Free radical scavenging activity of water soluble fullerenols. J Chem Soc Chem Commun 1995; 24 (12): 1283-1284.
- Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP et al. Buckminsterfullerene Free Radical Scavengers reduce Exitotoxic and Apoptotic Death of Cultured Cortical Neurons. Neurobiol Dis 1996; 3 (2): 129-135.
- Tagmatarchis N, Shinohara H. Fullerenes in Medicinal Chemistry and their Biological Applications. Mini-Rev Med Chem 2001; 1 (4): 339-348.
- Kroto HW, Alaff W, Balm SP.  $C_{60}$ : Buckminsterfullerene. Chem Rev 1991; 91 (6): 1213-1235.
- Djordjević A. Biological Active Derivatives of fullerene  $C_{60}$ . Zadužbina Andrejević Beograd, 2002.
- Sayes CM, Fortner DJ, Guo W et al. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. Nano Lett 2004; 4 (10): 1881-1887.
- Foot CS. Top Curr Chem 1997; 169: 347-363.
- Pickering KD, Wiesner MR. Fullerol-Sensitized Production of ROS in Aqueous Solution. Environ Sci Technol 2005; 39 (5): 1359-1365.
- Lee J, Fortner JD, Hughes JB et al. Photochemical production of reactive oxygen species by  $C_{60}$  in the aqueous phase during UV irradiation. Environ Sci Technol 2007; 41 (7): 2529-2535.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related „reactive species“. In: Free radicals in Biology and Medicine, 3. izdaja, Oxford University Press: Oxford 1999, 36-104.
- Irie K, Nakamura Y, Ohigashi H et al. Photocytotoxicity of water-soluble fullerene derivatives. Biosci Biotech Biochem 1996; 60 (8): 1359-1361.

15. Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency and malignant solid tumors. In: Wolff JA. Gene Therapeutics, Birkhäuser: Boston 1994, 263-280.
16. Mirkov S, Djordjevic A, Andric N et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerene,  $C_{60}(OH)_{24}$ . Nitric Oxide-Biol Ch 2004; 11 (2): 201-207.
17. Djordjevic A, Canadanovic-Brunet J, Vojinovic-Miloradov M et al. Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullerene  $C_{60}(OH)_{24}$ . Oxi Comm 2005; 27 (1): 213-218.
18. Fumelli C, Marconi A, Salvioli S et al. Carboxyfullerenes protect human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis. J Invest Dermatol 2000; 115 (5): 835-841.
19. Lin AM, Chyi BY, Wang SD et al. Carboxyfullerene prevents iron-induced oxidative stress in rat brain. J Neurochem 1999; 72 (4): 1634-1640.
20. Monti D, Moretti L, Salvioli S et al. C60 Carboxyfullerene Exerts a Protective Activity against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Biochem Biophys Research Comm 2000; 277 (3): 711-717.
21. Sato M, Matsuo K, Kiriya H et al. Inhibitory effects of fullerene derivative, dimalonate  $C_{60}$ , in nitric oxide-induced relaxation of rabbit aorta. Eur J Pharm 1997; 327 (2-3): 175-181.
22. Kostelnikova RA, Kostelnikov IA, Bogdanov GN et al. Membranotropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene  $C_{60}$ . FEBS Lett 1996; 389 (2): 111-114.
23. Friedman SH, DeCamp DL, Sijbesma RP et al. Inhibition of HIVp by fullerene derivatives: Model building studies and experimental verification. J Am Chem Soc 1993; 115 (15): 6506-6509.
24. Djordjevic A, Bogdanovic G, Dobric S. Fullerenes in Biomedicine. J BUON 2006; 11 (4): 391-404.
25. Mirkov S. Magistrska teza. Medicinska fakulteta. Novi Sad 2001.
26. Lu LH, Lee YT, Chen CW et al. The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fullerene, polyhydroxylated C60, on vascular smooth muscle cells. Brit J Pharmacol 1998; 123 (6): 1097-1102.
27. Ueng TH, Kang JJ, Wang HW et al. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerene, a polyhydroxylated fullerene  $C_{60}$ . Toxicol Lett 1997; 19 (1): 29-37.
28. Bogdanović G, Vojinović-Miloradov M, Kojić V et al. World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences '99, 59<sup>th</sup> International Congress of FIP, Barcelona, Spain 1999. Abstract book P-081, 55.
29. Murugan MA, Gangadharan B, Mathur PP. Antioxidative effect of fullerene on goat epididymal spermatozoa. Asian J Androl 2002; 4 (2): 149-152.
30. Jakimov D, Bogdanović G, Baltić M et al. Water-soluble fullerene  $C_{60}(OH)_{24}$  modulates growth and proliferation of K562 human erythroleukemia cell line. Advances in Simulation, Systems Theory and Systems Engineering, Skiathos, Greece, 2002. Abstract and manuscript book pp. 117-122.
31. Trajković S, Dobrić S, Djordjević A et al. Radioprotective efficiency of fullerene in irradiation mice. Mater Sci Forum 2005; 494: 549-553.
32. Trajković S, Dobrić S, Jačević V et al. Tissue-protective effects of fullerene  $C_{60}(OH)_{24}$  and amifostine in irradiated rats. Colloids Surf B Biointerfaces 2007; 58 (1): 39-43.
33. De Vita TV, Hellman JRS, Rosenberg AS. Cancer principles and practice of oncology, Philadelphia: Lippincott-Raven 1997: 375-512.
34. Abraham R, Basser RL, Green MD. A risk-benefit assessment of tetracycline antibiotics in antineoplastic therapy. Drug Saf 1996; 15 (6): 406-429.
35. Hoeckman K, Van der Vijgh WJF, Vermorker JB. Clinical and preclinical modulation of chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer. Drugs 1999; 50: 133-156.
36. Djordjević-Milić V, Djordjević A, Dobrić S et al. Influence of fullerene  $C_{60}(OH)_{24}$  on doxorubicin induced cardiotoxicity in rats. Mater Sci Forum 2006; 518: 525-529.
37. Injac R, Perše , Boskovic M et al. Cardioprotective Effects of Fullerene  $C_{60}OH_{24}$  on a Single Dose Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats With Malignant Neoplasm. Technol Cancer Res Treat 2008; 7 (1): 15-26.

# Samo(mikro)emulgirajoči sistemi - alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin

## Self(micro)emulsifying systems - alternative approach for improving bioavailability of lipophilic drugs

Alenka Zvonar, Mirjana Gašperlin, Julijana Kristl

**Povzetek:** Po novejših ocenah je skoraj 40 % potencialnih novih učinkovin izločenih iz nadaljnega razvoja zaradi slabih biofarmaceutskih lastnosti. Pri reševanju tega problema se poslužujemo tudi mikro- in nanotehnologije ter vgradnje teh učinkovin v lipidne nosilne sisteme z namenom izboljšanja njihove vodotopnosti. V zadnjih letih tudi zaradi enostavne proizvodnje veliko pozornosti posvečamo samo(mikro)emulgirajočim sistemom (S(M)ES), ki so po definiciji izotropne zmesi lipidov, površinsko aktivne snovi (PAS), enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo (mikro)emulzije tipa O/V. Ker je proces samoemulgiranja specifičen za točno določene kombinacije in razmerje med lipidom in PAS ter koncentracijo PAS, je mogoče docela izkoristiti prednosti S(M)ES le ob premišljenem izboru posameznih sestavin sistema ter poznavanju njihovega vpliva na njegove biofarmaceutske lastnosti. V tem članku so predstavljene posamezne sestavine S(M)ES, njegova usoda po peroralnem vnosu ter možni vplivi dostavnega sistema na absorpcijo vgrajenih učinkovin.

**Ključne besede:** Samo(mikro)emulgirajoči sistemi, mikroemulzije, biološka uporabnost, lipofilne učinkovine

**Abstract:** According to recent estimates, nearly 40 % of new active pharmaceutical substances are rejected from research and development due to poor biopharmaceutical properties. A novel approach to encounter this problem are micro- and nanotechnology, together with incorporation of these substances in lipid based drug delivery systems to improve the solubility of those drugs. Due to ease of production there has been an increased interest in self(micro)emulsifying systems (S(M)ES) in recent years. According to the definition they are isotropic mixtures of oil, a surfactant, and possibly one or more hydrophilic solvents or co-surfactants, which form fine oil-in-water (micro)emulsions spontaneously when exposed to aqueous media under gentle agitation. The self-emulsification process is specific to the oil/surfactant pair, the surfactant concentration and oil/surfactant ratio, thus the advantages of S(M)ES could only be taken entirely if its components are selected thoughtfully and their influence on biopharmaceutical properties of the system is taken into concern. The present article reviews the composition of S(M)ES, its behaviour after oral application and the possible influence on the absorption of incorporated drugs.

**Key words:** Self-(micro)emulsifying systems, microemulsions, bioavailability, lipophilic drugs.

## 1 Uvod

Razvoj učinkovitih peroralnih farmacevtskih oblik je ključen za trženjski uspeh novih zdravilnih učinkovin, saj je predvsem pri kroničnih obolenjih peroralno zdravljenje še vedno najbolj priljubljeno. Farmacevtska industrija se v zadnjih letih sooča z odkritjem novih slabo vodotopnih zdravilnih učinkovin z dobro permeabilnostjo, ki jih po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo med učinkovine razreda II [1]. Vnos slednjih v obliki klasičnih trdnih farmacevtskih oblik je pogosto povezan z nizko in/ali visoko variabilno biološko uporabnostjo (BU), ki jo rešujejo na različne načine. Topnost učinkovine v prebavnem traktu lahko povečamo z njeno kemijsko in fizikalno spremembo ali razvojem ustrezne farmacevtske oblike. Če

se osredotočimo na slednje, je eden izmed pristopov za peroralno uporabo slabo vodotopnih učinkovin priprava učinkovine v raztopljeni obliki ter polnjenje v kapsule. S tem se izognemo fazi raztapljanja učinkovin v prebavnem traktu, ki v veliki meri prispeva k neustrezni BU učinkovin razreda II. Ob tem se moramo zavedati, da lahko pride po dispergiranju v prebavnem traktu predvsem pri uporabi hidrofilnih topil tudi do obarjanja predhodno raztopljenih učinkovin. Iskanje vedno boljših rešitev je vodilo do lipidnih nosilnih sistemov, pri katerih je verjetnost obarjanja manjša, saj učinkovine z ustreznim porazdelitvenim koeficientom večinoma ostanejo raztopljene v lipidnih kapljicah tudi po dispergiranju sistema v vodnem mediju prebavnega trakta [2]. BU nekaterih učinkovin lahko torej izboljšamo z vgradnjo le-



teh v lipidne nosilne sisteme, med katere uvrščamo tudi klasične makro-, mikro- in nanoemulzije. V prednosti so zlasti slednje, saj so termodinamsko stabilne, izkazujejo dobre solubilizacijske sposobnosti in pospešujejo absorpcijo številnih učinkovin [3]. Ker pa vsebujejo vodo, je njihovo polnjenje v želatinske ali druge hidrofilne kapsule težavno oz. nemogoče. Temu problemu se lahko izognemo z brezvodnimi S(M)ES, za katere je značilno, da tvorijo (mikro)emulzijo pri fizioloških pogojih in situ že pod vplivom peristaltičnega gibanja želodca in črevesja [4].

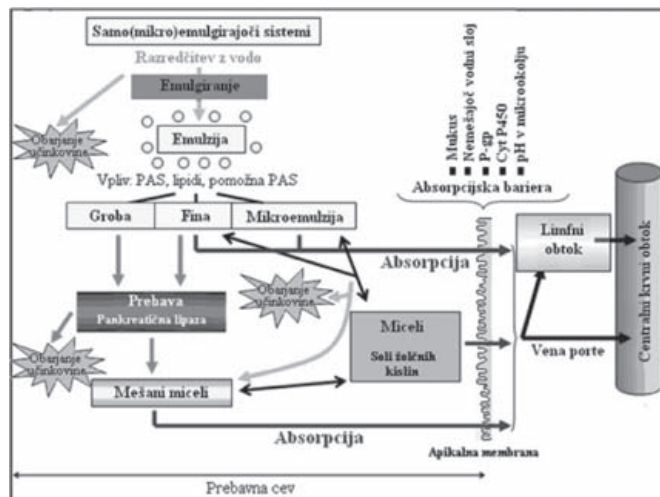
## 2 Samo(mikro)emulgirajoči sistemi

Zanimanje za lipidne dostavne sisteme se je močno povečalo po komercialnem uspehu zdravil Sandimmune Neoral™-a (ciklosporin A), Fortovase®-a (sakvinavir), Norvir®-a (ritonavir) in Agenerase®-a (amprenavir). Veliko pozornosti namenjajo S(M)ES, ki so po definiciji izotropne zmesi lipidov, PAS, enega ali več hidrofilnih topil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem ob rahlem mešanju hitro in spontano tvorijo (mikro)emulzije tipa O/V [1]. Medtem ko nastanejo iz samoemulgirajočih sistemov po redčenju emulzije z velikostjo kapljic med 100 in 300 nm, je velikost kapljic mikroemulzij, ki nastanejo iz SMES, manjša od 100 oz 50 nm, porazdelitev njihove velikosti pa ozka [5]. V S(M)ES vgrajena učinkovina po vnosu hitro zapusti želodec in se v obliki drobnih kapljic porazdeli po prebavnem traktu. Učinkovina je v nastali emulziji raztopljena, zato se izognemo procesu raztapljanja, katerega hitrost je omejujoči dejavnik za absorpcijo učinkovin razreda 2 [6]. S(M)ES naj bi imeli kar nekaj prednosti pred lipidnimi raztopinami. Na primeru ciklosporina so ugotovili, da daje sistem s PAS enakomernjšo ter ponovljivejšo BU [7]. Z vgradnjo v S(M)ES so izboljšali BU tudi L-365-260, WIN 54954, Ro 15-0778, ontazolasta, halofantrina, danazola, simvastatina, karvediola, itrakonazola, paklitaksela in silimarina [8-13].

### 2.1. Sestava S(M)ES

Proces samo(mikro)emulgiranja je specifičen za točno določene kombinacije in razmerje med lipidi in PAS ter koncentracijo PAS, zato imajo le sistemi s točno določeno vsebnostjo osnovnih sestavin zadovoljiv samo(mikro)emulgirajoči učinek [5]. Načrtovanje mikroemulzij oz. S(M)ES tako zajema izbor ustrezne kombinacije oljne in vodne faze, ki se morata zadovoljivo mešati z zmesjo PAS in pomožne PAS. Zaradi čim boljše fiziološke sprejemljivosti je zaželeno, da je koncentracija PAS v sistemu čim nižja. Pri izbiri ustrezne PAS je

zato bistvenega pomembna njena sposobnost, da že pri čim nižjih koncentracijah ustrezno zniža medfazno napetost in tako omogoči nastanek mikroemulzije. Za določitev optimalnega razmerje med posameznimi komponentami sistema in sistematični študij nastalih mikroemulzij je potrebno izdelati fazni diagram, iz katerega je razvidno območje njihovega nastanka. Za izbor optimalnega sistema je prav tako pomembno, da že v fazi predformulacijskih raziskav pridobimo širok nabor podatkov o fizikalno-kemijskih in biofarmaceutskih lastnostih učinkovine. Pri načrtovanju ustreznega lipidnega dostavnega sistema za izbrano učinkovino si pomagamo tudi z biofarmaceutskim klasifikacijskim sistemom (preglednica 1) [1, 4].



Slika 1: Shematski prikaz usode S(M)ES po peroralnem vnosu in možni vplivi sistema na absorpcijo vgrajenih učinkovin (povzeto po [17]).

Figure 1: Schematic presentation of S(M)ES behavior after oral application and possible influence of the system on the absorption of incorporated drugs (adapted from [17]).

#### 2.1.1 Lipidi

Lipidi predstavljajo eno izmed najpomembnejših sestavin S(M)ES. Za izdelavo slednjih so primerni različni nasičeni trigliceridi z dolgimi in srednje dolgimi verigami. Zaradi ustreznih sposobnosti raztapljanja in samo(mikro)emulgiranja najpogosteje posegamo po polysintezni lipidi. Zelo primerni so trigliceridi s srednje dolgimi verigami (sdv-

Preglednica 1: Potencialni mikroemulzijski sistemi za peroralen vnos učinkovin z ozirom na topnost in permabilnost.

Table 1: Potential microemulsion systems for oral drug delivery based on aqueous solubility and membrane permeability considerations.

Topnost v vodi	Permeabilnost membrane	Primeren mikroemulzijski sistem	Pričakovane prednosti pri dostavi učinkovin
Visoka	Visoka	V/O	Stabilizacija in zaščita pred kemijsko in encimsko hidrolizo
Visoka	Nizka	V/O	Stabilizacija in zaščita pred kemijsko in encimsko hidrolizo, povečana biološka uporabnost <sup>b</sup>
Nizka	Visoka	S(M)ES, O/V	Izboljšana topnost in raztapljanje, povečana biološka uporabnost <sup>b</sup>
Nizka	Nizka	S(M)ES, O/V	Izboljšana topnost in raztapljanje, povečana biološka uporabnost <sup>b</sup>

<sup>b</sup> povečana hitrost in/ali obseg absorpcije / <sup>b</sup> increased rate and/or extent of absorption

TG), ki jih pridobivajo iz kokosovega olja. Slednji so s strani FDA sprejeti kot varni in so primerni za pripravo mikroemulzij z različno sestavo, zaradi vsebnosti mono-, di- in tri-gliceridov pa izboljšajo tudi absorpcijo vgrajene učinkovine. Po literaturnih podatkih se sdv-TG pogosteje uporabljajo kot trigliceridi z dolgimi verigami (dv-TG), saj imajo v splošnem boljšo sposobnost raztapljanja in samoemulgiranja, njihova kemijska čistost in odsotnost dvojnih vezi pa omogočata tudi boljšo kemično stabilnost njih samih in tudi vgrajenih učinkovin [8]. Vendar ne smemo posploševati, saj na izbor lipida pomembno vpliva tudi želena pot absorpcije vgrajene učinkovine (v limfni oz. v portalni krvni obtok), ki je prav tako odvisna od molekulske mase lipida. Kot smo že omenili, se v novejših S(M)ES uporabljajo predvsem novi polysintezni derivati sdv-TG, ki jih lahko opišemo kot amfifilne spojine z lastnostmi PAS. Primer le-teh so poliglikolizirani gliceridi, ki jih pridobivamo z delnim preestanjem (alkoholizo) rastlinskih olj s polietilen glikolom ali zaestrenjem maščobnih kislin s polietilen glikolom in glicerolom. Na tržišču jih najdemo pod zaščitenimi imeni Gelucire®, Labrafil® in drugi. V literaturi pogosto zasledimo tudi dodatek tokoferola, tokotrienolov ter njihovih derivatov [2].

## 2.1.2. Površinsko aktivne snovi

Za uporabo v mikroemulzijskih sistemih mora izbrana PAS močno znižati medfazno napetost, obogočati gibljivost emulgatorskega filma na medfazni površini ter imeti ustrezno HLB vrednost. Za izdelavo S(M)ES priporočajo predvsem neionske PAS z relativno visokimi HLB vrednostmi. Običajno uporabljajo glikolizirane etoksilirane gliceride ter polisorbate (predvsem polioksietilen-(20)-sorbitanmonooleat). Odločujoči dejavnik pri izbiri PAS je varnost, zato imajo prednost naravni emulgatorji, katerih sposobnost samoemulgiranja je sicer omejena, a veljajo za varnejše kot sintezni. Zaradi neodvisnosti od pH vrednosti in ionske moči ter predvsem zaradi manjše toksičnosti so primernejše neionske PAS, čeprav lahko tudi slednje povzročijo zmerne reverzibilne spremembe v permeabilnosti črevesne stene. Za izdelavo učinkovitih S(M)ES je potrebna optimalna zmes emulgatorjev z nizkimi in visokimi HLB vrednostmi v koncentraciji med 30 in 60 %. Zaradi zmanjšanja draženja prebavnega trakta pa je pomembno, da izberemo čim nižje še ustrezne koncentracije. Pri izbiri PAS moramo upoštevati tudi morebitno toksičnost razpadnih produktov.

Vsebnost PAS z relativno visoko HLB vrednostjo vpliva na proces samo(mikro)emulgiranja, saj omogoča hiter nastanek (mikro)emulzije tipa o/v in dobro porazdelitev le-te po prebavnemu traktu. PAS povečajo tudi topnost hidrofobnih učinkovin in tako vplivajo na učinkovitost absorpcije, saj preprečujejo obarjanje učinkovine v lumnu GIT ter podaljšajo čas, ko je učinkovina v raztopljenem stanju [5, 2].

## 2.1.3. Sotopila

Z namenom, da bi povečali topnost učinkovine in hidrofилnega emulgatorja v lipidni podlagi dodajamo v S(M)ES sotopila. Primerna topila za peroralen vnos so npr. etanol, propilen glikol in polietilen glikol. Ker uporaba slednjih poveča zahtevnost proizvodnega procesa in zaradi morebitnih težav povezanih s porazdeljevanjem sotopila iz S(M)ES v ovojino, razvijajo sisteme brez alkoholov in drugih hlapnih topil. V nekaterih mikroemulzijskih sistemih imajo sotopila tudi vlogo koemulgatorja [5, 3].

## 2.1.4. S(M)ES in učinkovina

Učinkovitost vgradnje učinkovin v S(M)ES je običajno specifična za določen sistem in je odvisna od relativne topnosti učinkovine v

posameznih komponentah sistema ter njene fizikalno-kemijske kompatibilnosti s sistemom. Za lažjo predstavbo o tem, v kakšnih količinah lahko vgrajujemo učinkovine v omenjene sisteme, naj navedemo primer, da so v formulacijo s S(M)ES vgradili 10 % celecoxiba, medtem ko je bila največja dosežena topnost v lipidu le 0,7 % [14]. Prisotna učinkovina v večini primerov vpliva na proces samoemulgiranja, saj se spremeni optimalno razmerje med sestavinami S(M)ES. Do spremembe v učinkovitosti S(M)ES lahko pride zaradi tvorbe kompleksov med molekulami učinkovine in nekaterimi komponentami sistema ter penetracije učinkovine in monosloj PAS na medfazi. V razvoju optimalnega S(M)ES je potrebno že v predformulacijskih raziskavah določiti topnost učinkovin v posameznih komponentah, ter izdelati fazne diagrame za posamezne sisteme. Iz slednjih je moč odčitati območje nastanka (mikro)emulzije in morebiten vpliv učinkovine na le-tega [5, 3].

## 2.2. Mehanizem samo(mikro)emulgiranja

Samo(mikro)emulgiranje je spontan proces, med katerim iz S(M)ES v stiku z vodnim medijem nastane (mikro)emulzija tipa o/v. Natančen mehanizem samo(mikro)emulgiranja zaenkrat še ni popolnoma poznan. Predlagana je razlaga, po kateri samo(mikro)emulgiranje poteče, kadar je sprememba entropije zaradi dispergiranja večja od energije, ki je potrebna za povečanje površine ob dispergiranju. Prosta energija je v tem primeru negativna oz. zelo nizko pozitivna, zato (mikro)emulzija nastane spontano oz. že ob rahlem mešanju [2, 5].

V procesu samo(mikro)emulgiranja imata velik pomen zelo nizka medfazna napetost olje/voda in prekinitvev medfaze, ki je posledica penetracije vode v oljno fazo oz. sotopila iz S(M)ES v vodno fazo. Po mnenju Wachery-ja in sodelavcev se po dodatku mešanice olje/neionski emulgator v vodo vzpostavi medfaza med oljem in kontinuirano vodno fazo. V nadaljevanju molekule vode prehajajo skozi medfazo v oljno fazo, kjer jih PAS solubilizirajo znotraj micelov. Ko je v bližini medfaze dosežena maksimalna solubilizacijska kapaciteta, vodi nadaljnje prehajanje vode do nastanka dispergiranih tekočih kristalov. Postopoma celotno medfazo predstavlja plast tekočih kristalov, kar olajša in pospeši nadaljnje prehajanje vode skozi medfazo. V kombinaciji z rahlim mešanjem slednje vodi do porušanja medfaze in tvorbe oljnih kapljic, ki jih obdaja plast tekočih kristalov. Po literaturnih virih naj bi bila zahtevnost emulgiranja povezana ravno z zmogljivostjo penetracije vodne faze v različne strukture tekočih kristalov oz. gele, ki se tvorijo na površini kapljic (mikro)emulzije. Le-ti naj bi bili tudi vzrok za veliko fizikalno stabilnost nastale (mikro)emulzije [6, 15, 16].

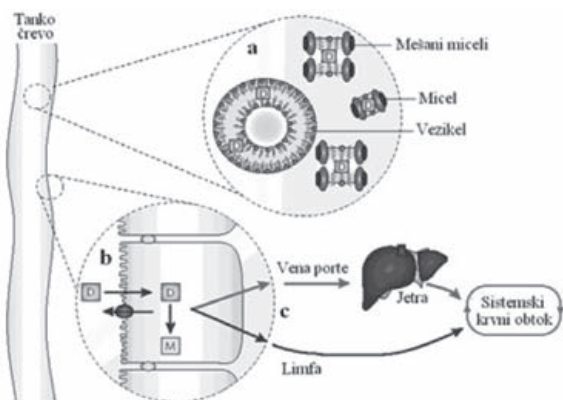
## 3 Vpliv S(M)ES na povečanje peroralne absorpcije

Učinkovina, vgrajena v S(M)ES, je pri prehodu skozi GIT ves čas raztopljen v drobnih oljnih kapljicah ali pa se nahaja v mešanih micelih. Absorpcija je odvisna od več dejavnikov, predvsem od vrste lipidov in razmerja med njimi ter emulgatorjem, koncentracije emulgatorja ter velikosti in naboja kapljic. Usoda S(M)ES po peroralnem vnosu in možni vplivi sistema na absorpcijo vgrajenih učinkovin so shematsko prikazani na sliki 1 [2].

## 3.2. Vpliv lipidov

Vpliv lipidov na BU peroralno vnesenih učinkovin je posledica več zapletenih mehanizmov, ki lahko spremenijo biofarmaceutske

lastnosti učinkovin, kot so hitrost raztapljanja, topnost v prebavnih sokovih, zaščita učinkovin pred kemijsko in encimsko razgradnjo ter tvorba lipoproteinov, ki pospešujejo limfatični transport močno lipofilnih učinkovin (slika 2). Profil absorpcije in porazdeljevanje med limfo in krvjo sta odvisna od dolžine verig maščobnih kislin v trigliceridih, stopnje njihove nasičenosti ter količine vnesenega lipida. Kratko- in srednje dolgo verižne maščobne kisline (z manj kot 12 C atomi) se tako preko portalnega krvnega obtoka transportirajo direktno v centralni krvni obtok ter se le v nizkem obsegu vgradijo v hilomikrone. V procesu absorpcije dolgo verižnih MK in monogliceridov pa v intestinalnih celicah najprej poteče preestrenje do trigliceridov in vgraditev v hilomikrone, ki nato vstopijo v limfni obtok in od tam preko prsne mezgovnice v sistemski krvni obtok. Z izbiro ustreznih lipidne podlage lahko torej vplivamo na obseg absorpcije vgrajene učinkovine tako v limfni obtok (s stimulacijo nastanka lipoproteinov) kot v portalni krvni obtok; tako sočasno vplivamo tudi na obseg metabolizma prvega prehoda, saj intestinalni limfni obtok obide jetra [18].



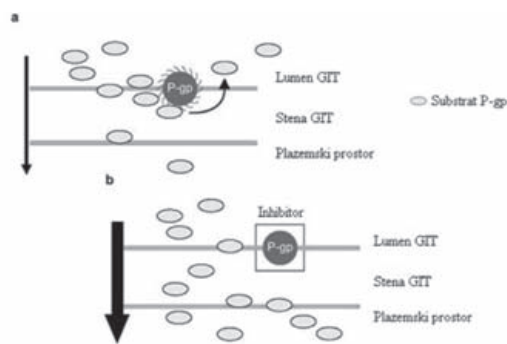
Slika 2: Možni vplivi lipidov in lipidnih podlag na absorpcijo učinkovin. Lipidi lahko vplivajo na absorpcijo učinkovin na tri načine: (a) povečajo solubilizacijo učinkovine v črevesu z vplivom na sestavo in lastnosti npr. veziklov, mešanih micelov in micelov; (b) interagirajo s prenašalnimi in metabolnimi procesi na nivoju enterocitov, kar lahko spremeni privzem učinkovine, efluks ter nastanek in porazdeljevanje metabolitov znotraj enterocita; (c) spremenijo pot transporta učinkovine v sistemski krvni obtok (portalna vena/limfni obtok), (povzeto po [18]).

Figure 2: Potential effect of lipids and lipidic excipients on drug absorption. Lipids can affect drug absorption in three ways: (a) by enhancing drug (D) solubilization in the intestinal milieu through alterations to the composition and character of, vesicles, mixed micelles and micelles; (b) by interacting with enterocyte-based transport and metabolic processes, thereby potentially changing drug uptake, efflux, disposition and the formation of metabolites (M) within the enterocyte; (c) by altering the pathway (portal vein versus intestinal lymphatic system) of drug transport to the systemic circulation (adapted from [18]).

O vplivu vrste lipidne podlage na BU učinkovine odloča narava le-te [8]. Na primeru halofantrina [19] in danazola [20] so ugotovili, da SMES s dv-TG (dv-SMES) izraziteje izboljša BU učinkovine kot SMES s sdv-TG (sdv-SMES). Avtorji so zato sklepali, da je kapaciteta solubilizacije nekaterih lipofilnih učinkovin v sdv-TG nižja kot v dv-TG. Ker pa v omenjenih študijah niso primerjali S(M)ES z enakim razmerjem med lipidom, PAS in pomožno PAS, je direktna primerjava vprašljiva. V novejši raziskavi so M. Grove in sodelavci pri proučevanju vpliva lipidne podlage na BU seokalcitola pri podganah zato primerjali sistema, ki sta se razlikovala le po vrsti lipida, in določili približno enako BU tako pri vgradnji učinkovine v sdv-SMES kot v dv-SMES [8]. Na osnovi omenjenih raziskav lahko sklepamo, da je predvsem od lastnosti učinkovine odvisno ali bo izboljšanje njene BU večje v primeru vgradnje v formulacijo s sdv-TG ali dv-TG. Nekega splošnega zaključka o odvisnosti BU vgrajenih učinkovin od vrste lipidne podlage v formulaciji zato ni mogoče potegniti.

### 3.3. Vpliv površinsko aktivnih snovi

PAS v S(M)ES lahko izboljšajo BU vgrajenih učinkovin po več mehanizmi: (1) povečanje topnosti učinkovin, (2) povečanje permeabilnosti skozi epitelij prebavnega trakta, (3) vpliv na tesne stike ter (4) inhibicija P-gp in/ali CytP450 [21]. PAS povečajo permeabilnost učinkovin z delovanjem na lipidni dvosloj epiteljskih celic, ki skupaj z nemešajočim vodnim slojem predstavlja oviro za difuzijo učinkovin. PAS se porazdelijo v lipidni dvosloj celičnih membran in porušijo njegovo urejenost ter tako povečajo permeabilnost učinkovin. Z amfifilno naravo PAS sta povezani tudi povečana topnost in hitrosti raztapljanja vgrajenih učinkovin. PAS lahko tudi reverzibilno odprejo tesne stike [22, 23].



Slika 3: Vpliv inhibicije P-glikoproteina (P-gp) na absorpcijo učinkovin. (a) P-gp črpa spojine iz celice skozi apikalno membrano v intestinalni lumen in tako zavira absorpcijo substratov P-gp. Pod vplivom P-gp se skozi apikalno membrano eliminirajo tudi njegovi substrati, ki vstopijo v celico skozi bazolateralno membrano (iz plazme). (b) Učinek inhibicije P-gp na obseg absorpcije substratov P-gp.

Figure 3: Influence of P-glycoprotein (P-gp) inhibition on the absorption of drugs. (a) P-gp actively transports its substrates from the cell interior through the apical membrane back into the intestinal lumen and limits their absorption. Also substrates entering the cell through the basolateral membrane (from plasma) undergoes P-gp mediated efflux. (b) Increased absorption of P-gp substrates due to P-gp mediated efflux inhibition.

Preglednica 2: Inhibitorji P-gp: lipidi in polimeri

Table 2: P-gp inhibitors: lipids and polymers

A) Lipidi / površinsko aktivne snovi
Estri glicerola in PEG z oktanojsko (C8) in dekanajojsko kislino (C10): Cremophor, Solutol HS-15, Labrasol, Softigen 767, Aconnon E
Estri saharoze: saharoza monolavrat
Polisorbati: Tween 80, Tween 20
Estri s tokoferolom: -tokoferil-PEG-1000-sukcinat (TPGS)
B) Polimeri
Blok kopolimeri Pluronic (poloxamer-i): poli-(etilenoksid)/poli-(propilenoksid) blok kopolimeri
Amfifilni diblok kopolimeri: Metokspolietilen glikol-block-polikaprolakton (MePEG-b-PCL)

Z uporabo S(M)ES tako poskušajo izboljšati zelo slabo BU paklitaksela, enega izmed najmočnejših kemoterapevtikov, ki je zelo lipofilan in netopen v večini farmacevtsko sprejemljivih sestavin, sočasno pa je tudi substrat za P-gp in citokrom P450. Paklitaksel je na tržišču prisoten le v obliki farmacevtskih oblik za i.v. vnos, zato potekajo obsežne raziskave o možnosti peroralnega vnosa. Spodbudne rezultate so dosegli s sočasnim vnosom S(M)ES z inhibitorji P-gp (TPGS in Cremophor® /  $\alpha$ -tokoferol) in ciklosporina, ki je tudi močan inhibitor P-gp. Če je bil pri omenjenih raziskavah ugoden rezultat odvisen od sočasnega vnosa ciklosporina, pa slednje ne velja v naslednjem primeru, kjer so podganam sočasno vnesli Cremophor-etalno raztopino  $^{14}$ C-paklitaksela ter TPGS. Avtorji omenjene raziskave ne vedo, ali je vzrok za izboljšanje BU povečana topnost učinkovine ali kak drug mehanizem, zato so potrebne še nadaljnje raziskave [13, 25, 26].

Z vgradnjo v S(M)ES in posledično povečanjem topnosti so uspešno povečali BU Ciklosporina A, ki je na tržišču prisoten pod zaščitenim imenom Sandimmun Neoral® [5]. Vendar je priporočljivo, da smo pri izbiri in uporabi PAS previdni, saj lahko v literaturi zasledimo tudi primere, ko se je BU vgrajene učinkovine znižala zaradi prevelike koncentracije PAS [5]. Slednje se je potrdilo tudi v primeru danazola, kjer je povišanje koncentracije PAS (Cremophor® EL) in sotopila na račun oljne faze najverjetneje zmanjšalo solubilizacijsko kapaciteto sistema v prebavnem traktu in posledično tudi BU danazola. Možen vzrok za slabo solubilizacijsko kapaciteto Cremophor® EL-a bi lahko bila hidroliza le-tega v prisotnosti pankreatične lipaze; slednje je predmet raziskav, ki še potekajo [24]. Rezultati slednjih bi lahko pomembno doprinesli k poznavanju mehanizma interakcij neionskih PAS s prebavnimi produkti lipidov (mešani miceli) in morebitnega vpliva prebave s pankreatično lipazo na njihovo solubilizacijsko kapaciteto, o katerih je zaenkrat znanega še malo.

### 3.4 Vpliv PAS na inhibicijo P-glikoproteina

Vzroka za nizko BU peroralno vnesenih slabo topnih učinkovin sta predvsem slaba vodotopnost ter s P-glikoproteini (P-gp) posredovan efluks učinkovin [5]. BU učinkovin, ki so substrati za P-gp, je možno izboljšati tako, da v formulacijo vključimo tudi inhibitor P-gp oz. le-tega vnesemo sočasno z zdravilom (slika 3). Zaželeno je, da se kot inhibitorji P-gp uporabljajo farmakološko neaktivne spojine; to so lahko pomožne snovi, ki so splošno priznane kot varne ter drugi

datki (npr. hrana). Nekaj inhibitorjev P-gp je navedenih v preglednici 2 [25].

## 4 Trdne farmacevtske oblike s S(M)ES

Zaradi tekočega agregatnega stanja so S(M)ES največkrat v obliki tekočih farmacevtskih oblik (FO) ali pa jih polnijo v želatinske kapsule. Z vgradnjo S(M)ES v trdno farmacevtsko obliko dobimo sistem, ki združuje prednosti lipidnih dostavnih sistemov in trdnih farmacevtskih oblik, hkrati pa se izognemo nekaterim pomanjkljivostim tekočih. Ker je polnjenje v mehke želatinske kapsule povezano z visokimi stroški proizvodnje, iščejo nove pristope za vnos S(M)ES v obliki trdnih farmacevtskih oblik. S(M)ES so tako že uspešno vgradili v pelete, mikrokapsule s takojšnjim sproščanjem ter tablete in pelete z nadzorovanim sproščanjem [27-30].

## 5 Sklep

Iz literature je razvidno, da S(M)ES omogočajo statistično zanesljivo izboljšanje BU slabo vodotopnih in/ali permeabilnih učinkovin, zato se kar samo postavlja vprašanje, zakaj so kljub očitnim prednostim in velikemu interesu na tržišču le 4 izdelki s S(M)ES? Vzroki za neizkoriščenost potenciala omenjenega tehnološkega pristopa niso popolnoma jasni, verjetno pa je slednje odsev pomanjkanja hitrih analizičnih metod in omejenega poznavanja parametrov, ki vplivajo na obnašanje teh formulacij *in vivo*, ter malo literaturnih podatkov o študijah na ljudeh. Na zapostavljenost S(M)ES pomembno vplivata tudi visoka vsebnost PAS v teh sistemih ter dejstvo, da po redčenju z vodo nastanejo stabilne mikroemulzije le pri določenem deležu vode. Prihodnost S(M)ES je zato verjetno odvisna od pravilne izbire varnih pomožnih snovi, ki bi zagotavljale zadostno solubilizacijo učinkovine že pri nizki vsebnosti PAS in sotopil in bi hkrati inhibirale P-gp. Izbrane sestavine morajo zagotoviti nastanek koloidne disperzije med redčenjem S(M)ES v lumnu prebavnega trakta in preprečiti obarjanje vgrajene učinkovine. In kakšne so posledice, če se učinkovina kljub vsemu obori? Po mnenju nekaterih raziskovalcev, ki so proučevali absorpcijo učinkovin iz mikroemulzij, je slednja tudi po prekomernem redčenju mikroemulzij boljša, kot po vnosu trdnih farmacevtskih oblik, saj se vgrajena učinkovina v teh pogojih obori v obliki zelo drobnih delcev [31]. Ali slednje velja tudi za S(M)ES ostaja zaenkrat še predmet raziskav. Dejstvo pa je, da so se S(M)ES že večkrat izkazali



kot primerni nosilni sistemi za lipofilne učinkovine in predstavljajo obetajočo alternativo za peroralen vnos le-teh.

### 6 Literatura

1. G.L. Amidon, V.P. Lennernas, A. Shah. Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995; 12: 413-420.
2. C.W. Pouton. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11, Suppl. 2: S93-S98.
3. P. Spiclin, M. Homar, A. Zupancic-Valant, M. Gasperlin. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. *Int J. Pharm* 2003; 256: 65-73.
4. P.P. Constantinides. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res* 1995; 12: 1561-72.
5. G.R. Neslihan, S. Benita. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 173-182.
6. C.W. Pouton. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Delivery Rev* 1997; 25: 47-58.
7. E.A. Mueller, J.M. Kovarik, J.B. van Bree et al. Influence of fat-rich meal on the pharmacokinetics of a new oral formulations of cyclosporine in a crossover comparison with the market formulation. *Pharm Res* 1994; 11: 151-155.
8. M. Grove, A. Müllertz, J.L. Nielsen et al. Bioavailability of seocalcitol II: development and characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral administration containing medium and long chain triglycerides. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28: 233-242.
9. L. Wei, P. Sun, S. Nie et al. Preparation and evaluation of SEDDS and SMEDDS containing carvediol. *Drug Dev Ind Pharm* 2005; 31: 785, 794.
10. J.Y. Hong, J.K. Kim, J.S. Park et al. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *J Controlled Release* 2006; 110: 332-338.
11. B.K. Kang, J.S. Lee, S.K. Chon et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int J Pharm* 2004; 274: 65-73.
12. J.S. Woo, T.S. Kim, J.H. Park et al. Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Arch Pharm Res* 2007; 30 (1): 82-89.
13. S. Yang, R.N. Gursoy, G. Lambert et al. Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharm Res* 2004; 21 (2): 261-270.
14. N. Subramanian, S. Ray, S.K. Ghosal et al. Formulation design of self-microemulsifying drug delivery systems for improved oral bioavailability of celecoxib. *Biol Pharm Bull* 2004; 27 (12): 1993-1999.
15. M.J. Rang, C.A. Miller. Spontaneous emulsification of oils containing hydrocarbons, non-ionic surfactant, and oleyl alcohol. *J Colloids Interface Sci* 1999; 209: 179-92.
16. C. Raffournier, P. Saulnier, F. Boury et al. Oil/water "hand-bag like structures": how interfacial rheology can help to understand their formation? *J Drug Del Sci Tech* 2005; 15(1): 3-9.
17. J.S. Garrigue. Les systemes autoemulsionnants pour l'administration orale de principes actifs lipophiles: influence de la formulation sur les aspects biopharmaceutiques. These Faculte de pharmacie de Chatenay-Malabry, de l'Universite de Paris de XI 2002.
18. C.J.H. Porter, N.L. Trevaskis, W.N. Charman. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews/Drug discovery* 2007; 6: 231-248.
19. S.M. Khoo, A.J. Humberstone, C.J. Porter. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *Int J Pharm* 1998; 167: 155-164.
20. C.J.H. Porter, A.M. Kaukonen, B.J. Boyd et al. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium-chain lipid-based microemulsion formulation. *Pharm Res* 2004; 21 (8): 1405-1412.
21. T.R. Kommuru, B. Gurley, M.A. Khan et al. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm* 2001; 212: 233-246.
22. W. Wu, Y. Wang, L. Que. Enhanced bioavailability of silimarin by self-microemulsifying drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 63: 288-294.
23. A. Spornath, A. Aserin. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 128-130: 47-64.
24. J.F. Cuiñé, W.N. Charman, C.W. Pouton. Increasing the proportional content of surfactant (Cremophor ER) relative to lipid in self-emulsifying lipid-based formulations of danazol reduces oral bioavailability in beagle dogs. *Pharm Res* 2007; 24 (4): 748-757.
25. P.P. Constantinides, K.M. Wasan. Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. *J Pharm Sci* 2007; 96 (2): 235-248.
26. P. Gao, B.D. Rush, W.P. Pfund et al. Development of supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci* 2003; 92: 2395-407.
27. C. Tuleu, M. Newton, J. Rose et al. Comparative bioavailability study in dogs of a self-emulsifying formulation of progesterone presented in a pellet and liquid form compared with an aqueous suspension of progesterone. *J Pharm Sci* 2004; 93 (6): 1495-1502.
28. M. Homar, D. Šuligoj, M. Gašperlin. Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method. *J Microencapsulation* 2007; 24 (1): 72 - 81.
29. S. Nazzal, M.A. Khan. Controlled drug release of a self-emulsifying formulation from a tablet dosage form: stability assessment and optimization of some processing parameters. *Int J Pharm* 2006; 315: 110-121.
30. M. Serraton, M. Newton, A. Booth et al. Controlled drug release from pellets containing water-insoluble drugs dissolved in a self-emulsifying system. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 65: 94-98.
31. Rosoff, Specialized Pharmaceutical Emulsions, In: *Pharmaceutical Dosage Forms, Disperse Systems*, vol. 1, Lieberman et al. eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 1988, pp. 245-283, 1988.



# Aciliranje peptidov in proteinov z derivati maščobnih kislin

## Peptide and protein fatty acylation

Nina Kočevar, Samo Kreft

**Povzetek:** Povečanje lipofilnosti hidrofilnih peptidov in proteinov z metodami aciliranja predstavlja enega od osnovnih pristopov za izboljšanje prehoda bioloških membran in s tem povečanje biološke uporabnosti. V reakciji aciliranja z derivati maščobnih kislin na reaktivne aminokislinske skupine peptidov in proteinov kovalentno vežemo lipofilne verige derivatov maščobnih kislin. Članek podaja pregled kemijskih metod aciliranja, na kratko pa je predstavljen tudi pomen aciliranih peptidov in proteinov, tako z biološkega kot s farmakološkega vidika.

**Gljučne besede:** aciliranje, peptidi, prepustnost membrane, proteini

**Abstract:** Fatty acylation represents one of the basic methods for increasing membrane permeability of hydrophilic peptides and proteins for the increase of their bioavailability. In the fatty acylation reaction, lipophilic chains of the fatty acid derivatives are covalently attached to reactive aminoacid residues of peptides and proteins. The article represents a review of chemical fatty acylation methods. Additionally, the importance of fatty acylated peptides and proteins is discussed in its biological as well as pharmacological aspect.

**Key words:** fatty acylation, membrane permeability, peptides, proteins

### 1 Uvod

Peptidi in proteini so biološke makromolekule, ki so bistvenega pomena za usklajeno potekanje biokemijskih procesov v človeškem organizmu. Sprememba v njihovi funkciji ali porušenje njihovega fiziološkega ravnovesja sta lahko vzroka za številne patološke procese in bolezni.

Po drugi strani so peptidi in proteini tudi skupina biološko aktivnih spojin, ki predstavljajo velik potencial kot zdravilne učinkovine. Njihova terapevtska uporaba je danes še močno omejena (vnašamo jih predvsem parenteralno) zaradi neobstoynosti pri različnih fizioloških pH-jih, hitre encimske razgradnje in kratkega razpolovnega časa, potencialne imunogenosti ter slabega prehajanja bioloških membran kot posledice hidrofilitnosti (1).

Pomembnejši pristopi za izboljšanje prehajanja membran in s tem povečanje biološke uporabnosti temeljijo na:

- podaljšanju časa zadrževanja na mestu absorpcije z mukoadhezivnimi farmacevtskimi oblikami,
- povečanju prepustnosti s pospeševalci absorpcije, z iontoforezo ali vključevanjem peptidov in proteinov v liposome ali nanodelce in
- povečanju lipofilnosti s kemijskimi modifikacijami peptidov in proteinov (2).

Prva spoznanja o lipidno-proteinskih konjugatih segajo v leto 1951, ko sta raziskovalca Folch in Lees v možganskem tkivu odkrila do takrat neznane spojine in jih poimenovala proteolipidi (3). Znanstveno delo

na tem področju je dobilo v naslednjih desetletjih intenzivne razsežnosti, pri čemer je močno napredovalo tudi znanje o aciliranju peptidov in proteinov z maščobnimi kislinami. Gre za biokemijski proces, značilen za vse evkarionske celice, ki se odvija kot kotranslacijska ali posttranslacijska sprememba (4). Ker je maščobnokislinska veriga na peptid oziroma protein vezana preko amidne, estrske ali tioestrške vezi, poznamo tri vrste aciliranja – *N*-aciliranje, *O*-aciliranje, ki je najmanj pogosto, in *S*-aciliranje (5) (slika 1). Med reakcije *N*-aciliranja uvrščamo *N*-mirstoiliranje, ki pomeni kovalentno vezavo 14 ogljikovih atomov dolge nasičene miristinske verige na *N*-končni glicin (6) ali  $\epsilon$ -amino skupino lizina (7), ter *N*-palmitoiliranje, ki pomeni kovalentno vezavo 16 ogljikovih atomov dolge nasičene palmitinske verige na *N*-končni glicin (6) ali aminsko skupino *N*-končnega cisteina (8). *S*-aciliranje najpogosteje pomeni *S*-palmitoiliranje, zato v literaturi izraza navadno kar enačijo. Gre za reverzibilno (proces je dinamičen, saj *in vivo* poteka tudi encimsko deaciliranje) kovalentno povezavo med palmitinsko verigo in tiolno skupino cisteina (6). *O*-aciliranje srečamo le v redkih primerih, poteče pa na serinski skupini (9, 10).

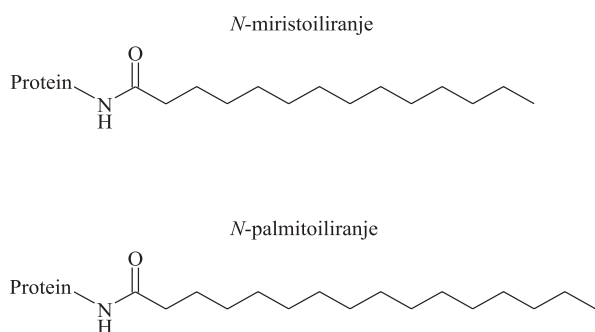
### 2 Aciliranje peptidov in proteinov

Eden izmed pristopov, ki jih uporabljamo za kemijsko modificiranje peptidov in proteinov, so metode aciliranja z reaktivnimi derivati maščobnih kislin. Gre za reakcije, s katerimi na reaktivne aminokislinske skupine peptidov in proteinov kovalentno priprimo

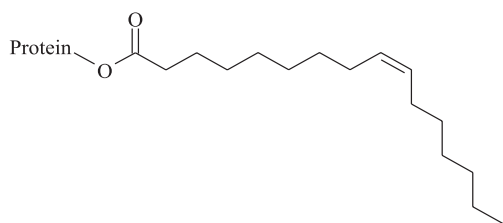
lipofilne verige derivatov maščobnih kislin. Tako modificirani peptidi in proteini imajo zaradi povečane lipofilnosti izrazito izboljšane transportne lastnosti, hkrati pa v veliki meri ohranijo svojo aktivnost (11-14). Kot so pokazale raziskave z acilirano ribonukleazo A, lahko zadostuje že ena sama palmitinska (11) oziroma stearinska (15) veriga, da izrazito povečamo prehod krvno-možganske pregrade.

Potencialna mesta aciliranja so s površine molekule peptida oziroma proteina izstopajoče reaktivne aminokislinske skupine – aminska, hidroksilna in tiolna. Po reakciji tako nastanejo amidna, estrska in tioestrska vez (slika 1), od katerih je prva najstabilnejša. V splošnem je zato najbolj zaželen potek reakcije v smeri selektivnega nastanka *N*-aciliranega produkta.

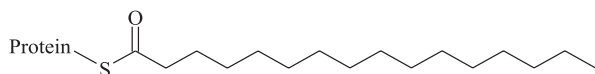
a) *N*-aciliranje



b) *O*-aciliranje



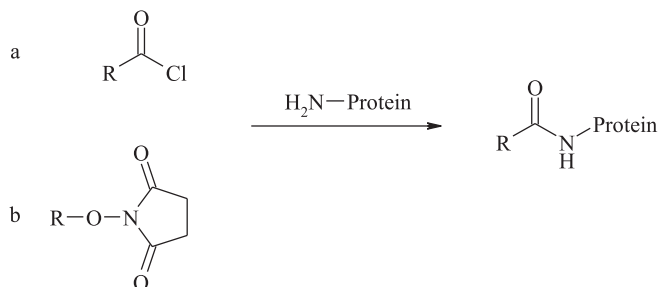
c) *S*-palmitoiliranje



Slika 1: Vrste aciliranja in vrste kemijskih vezi, ki nastanejo v reakciji: (a) *N*-aciliranje z miristinsko in s palmitinsko verigo in amidna vez, (b) *O*-aciliranje s palmitoleinsko (*cis*-9-heksadecenojsko) verigo in estrska vez ter (c) *S*-palmitoiliranje s palmitinsko verigo in tioestrska vez.

Figure 1: Types of fatty acylation and types of chemical bonds formed in the reaction: (a) *N*-acylation with myristic and palmitic chain and amide bond, (b) *O*-acylation with palmitoleic (*cis*-9-hexadecenoic acid) and ester bond, and (c) *S*-palmitoylation with palmitic chain and thioester bond.

Derivati maščobnih kislin, s katerimi najpogosteje izvajamo reakcije aciliranja, so lipofilni kislinski kloridi in hidrofilnejši *N*-hidroksisukcinimidni estri maščobnih kislin (slika 2). Maščobne kisline naj bi imele od 8 do 18 ogljikovih atomov dolge verige (oktanojska, dekanajojska, lavrinska, miristinska, palmitinska in stearinska kislina), pri čemer v splošnem velja, da imajo boljše transportne lastnosti proteini, modificirani z daljšimi maščobnimi verigami.



Slika 2: Shematski prikaz reakcije aciliranja s kislinskim kloridom (a) in z *N*-hidroksisukcinimidnim estrom maščobne kisline (b), ki poteče na amski skupini proteina.

Figure 2: Schematic representation of fatty acylation reaction using fatty acyl chloride (a) and *N*-hydroxysuccinimide ester of a fatty acid (b), which utilizes the protein's amino group.

Prva posebnost reakcij aciliranja izvira iz fizikalne narave peptidov oziroma proteinov ter reagentov za aciliranje. Te spojine namreč v istem mediju – vodnem, ki raztaplja peptid oziroma protein, ter organskem, ki raztaplja reagent za aciliranje – niso topne. V reakcijski zmesi moramo zato zagotoviti še prisotnost tretjega dejavnika, kot je na primer površinsko aktivna snov. Tej težavi se lahko izognemo z uporabo vodotopnih derivatov *N*-hidroksisukcinimidnih estrov maščobnih kislin, vendar pa moramo le-te pripraviti sami, saj komercialno niso dostopni, poleg tega pa je njihova uporaba vezana na specifične lastnosti peptida oziroma proteina, kot je na primer prisotnost tiolne skupine (12). Drugo pomembno omejitev predstavlja dejstvo, da peptidov in proteinov ne smemo neposredno izpostavljati večini organskih topil, saj lahko zaradi denaturiranja izgubijo svojo biološko aktivnost (2).

V splošnem sta se tako izoblikovala dva načina izvedbe reakcij aciliranja z derivati maščobnih kislin: aciliranje v organskem in aciliranje v vodnem mediju.

## 2.1 Aciliranje v organskem mediju

Prvo metodo so razvili za *O*- in *S*-palmitoiliranje peptidov (4). Temelji na relativno preprosti reakcijski shemi, po kateri reagent za aciliranje (kislinski klorid) dodamo neposredno organskemu topilu (trifluoroocetni kislini), v katerem je raztopljen peptid. Zaradi kislega medija ne pride do reakcije na amskih skupinah, ki so popolnoma protonirane; taka reakcija lahko poteče šele po nekaj urah do dnevih. Metoda je primerna za aciliranje manjših hidrofobnih peptidov.

Drugi pristop je zasnovan na reakciji, ki poteka v kompleksnejšem reverzno micelnem sistemu. V organskem topilu (na primer 2,2,4-trimetilpentanu) s pomočjo površinsko aktivne snovi (Aerosol OT) dispergiramo bazično raztopino peptida oziroma proteina (16). Pri

tem nastanejo reverzni miceli, v katerih vodno notranjost so vgrajeni peptidi oziroma proteini. Reagent za aciliranje (kislinski klorid), ki ga nato dodamo zunanji organski fazi, kontrolirano prehaja monosloj površinsko aktivne snovi in vstopa v reakcijo z aminskimi skupinami na peptidu oziroma proteinu. Metoda je še posebej uporabna, kadar želimo preprečiti agregacijo posameznih molekul peptida oziroma proteina, do katere lahko v večjem obsegu pride v vodnih raztopinah, in pa kadar v procesu aciliranja nastanejo močno lipofilni produkti.

## 2.2 Aciliranje v vodnem mediju

Te metode so z vidika neobstoynosti hidrofilnih peptidov in proteinov v relativno agresivnih organskih topilih za izvajanje aciliranja najprimernejše.

Prvi pristop predstavlja aciliranje z *N*-hidroksisukcinimidnimi estri maščobnih kislin. Reakcija obsega dve stopnji – v prvi pripravimo *N*-hidroksisukcinimidni ester, v drugi pa izvedemo reakcijo s peptidom ali proteinom. Tako najprej reagirata maščobna kislina (na primer palmitinska kislina) in *N*-hidroksisukcinimid, pri čemer moramo uporabiti tudi aktivator dicikloheksilkarbodiimid (slika 3). Nastali aktivni ester (*N*-hidroksisukcinimidni ester palmitinske kisline) nato dodamo pufrni raztopini peptida ali proteina (17).

Razvili so tudi nekaj zanimivih modifikacij te metode, od katerih uspešno uporabljajo aciliranje s popolnoma vodotopnim derivatom palmitinske kisline. Pri tej reakciji pride do nastanka reverzibilne disulfidne vezi med tiolno skupino na proteinu in reagentom za aciliranje (palmitoilnim derivatom *L*-cisteinil-2-piridildisulfida) (12).

Druga metoda vključuje pripravo micelarne disperzije reagenta za aciliranje. V prvi stopnji bazični pufrni raztopini površinsko aktivne snovi (na primer natrijevega holata) dodamo lipofilni reagent za aciliranje (kislinski klorid). Po sonificiranju nastane micelarna disperzija reagenta za aciliranje, ki jo dodamo raztopini peptida oziroma proteina (18). Reagent za aciliranje je torej ujet v micelih homogeno porazdeljene notranje faze in enakomerno prehaja do peptida oziroma proteina.

Preprosto modifikacijo te metode predstavlja aciliranje z *in situ* pripravljeno disperzijo palmitoilklorida v vodni raztopini acetonitrila

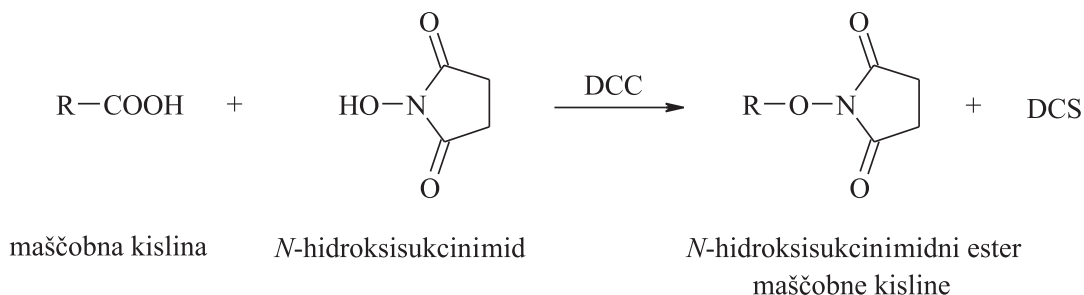
(19). Reakcijo izvedemo tako, da kislinski klorid raztopimo v 100-odstotnem acetonitrilu in ga dodamo bazični pufrni raztopini proteina, pri čemer vsebuje končna reakcijska zmes do 30 odstotkov acetonitrila v vodi. Pri tej koncentraciji acetonitrila večina proteinov še ne denaturira. Palmitoilklorid je v taki raztopini ravno dovolj topen za uspešen potek reakcije, preostanek, ki se obori, pa na koncu odstranimo s centrifugiranjem (19).

Kemijske reakcije aciliranja so v splošnem slabo selektivne, saj lahko reagent za aciliranje reagira z različnimi reaktivnimi aminokislinskimi skupinami hkrati (z aminsko, s hidroksilno in tiolno), poleg tega pa lahko dobimo tudi zmes monoaciliranih, diaciliranih, triaciliranih molekul itd. Ker ima želeni biološki učinek pogosto le ena vrsta molekul, je izjemnega pomena, da razvijemo dobre analzne metode za karakterizacijo nastalih heterogenih produktov, kot sta na primer tekočinska kromatografija in masna spektroskopija.

## 3 Pomen aciliranja

Aciliranje proteinov z maščobnimi kislinami izrazito poveča njihove lipofilne lastnosti ter posledično spremeni tudi njihovo fiziološko vlogo. Acilirani proteini opravljajo v organizmu številne in zelo raznolike naloge. Izmed najbolj raziskanih lahko izpostavimo vezavo oziroma interakcije s celičnimi membranami, razmeščanje do celičnih organelov in drugih struktur znotraj celice, signaliziranje ter vpliv na interakcije z drugimi proteini (20, 21).

Z vidika terapevtske uporabe moramo kot prvo pomembno značilnost aciliranih peptidov in proteinov izpostaviti izboljšanje prehodnosti bioloških membran zaradi povečane lipofilnosti (11, 12, 17, 19, 22). V raziskavah so dobro proučili tudi vplive na farmakokinetične lastnosti. Dokazali so, da lahko z aciliranjem podaljšamo razpolovni čas hemoglobina (23) in inzulina (24), saj pride do povečane vezave na albumin. Čeprav z aciliranjem povzročimo strukturne spremembe peptidnih in proteinskih molekul, pa s tem ne povečamo njihove imunogenosti. Celu nasprotno – dokazali so, da lahko z aciliranjem imunogenost znižamo in tako značilno zmanjšamo nastanek protiteles (25). To je pravzaprav razumljivo, saj so maščobne kisline v organizmu normalno prisotne in jih imunski sistem ne prepozna kot



Slika 3: Shematski prikaz priprave *N*-hidroksisukcinimidnega estra maščobne kisline. V reakciji po aktivaciji z dicikloheksilkarbodiimidom (DCC) reagirata maščobna kislina in *N*-hidroksisukcinimid. Nastaneta *N*-hidroksisukcinimidni ester maščobne kisline in dicikloheksilurea (DCS), ki jo odfiltriramo.

Figure 3: Schematic representation of preparation of *N*-hydroxysuccinimide ester of a fatty acid. In the reaction, a fatty acid and *N*-hydroxysuccinimide react after activation with dicyclohexylcarbodiimide (DCC). *N*-hydroxysuccinimide ester of the fatty acid and dicyclohexylurea (DCS), which is filtered out, are formed.

tujke.

Najbolj znan acilirani protein, ki ga uporabljamo v terapevtske namene, je inzulin detemir. Na njegovo lizinsko skupino je vezana 14 ogljikovih atomov dolga veriga miristinske kisline. Posledica te spremembe je združevanje molekul v heksamerne in diheksamerne strukture na mestu injiciranja (podkožno), kar upočasni absorpcijo v krvni obtok, poleg tega pa pride tudi do značilno povečane vezave na albumin (tako tkivni kot plazemski). Omenjeni učinki se odražajo v podaljšanem in bolj enakomernem plazemskem profilu (26).

## 4 Sklep

Aciliranje peptidov in proteinov z derivati maščobnih kislin je obetavna kemijska metoda, s katero lahko močno izboljšamo njihove farmakološke lastnosti. Čeprav je ta pristop relativno enostaven s sinteznega vidika, pa ne moremo mimo dejstva, da so reakcije v splošnem slabo selektivne in zato vodijo do nastanka heterogenih produktov. To nakazuje pomen natančne karakterizacije oziroma uporabe kompleksnih analiznih metod, ki so zelo zahtevne. Vendar pa omenjena problematika predstavlja drugo plat zgodbe, ki presega okvire tega članka.

## 5 Literatura

1. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 298–306.
2. Šegula M, Vrečer F. Nove farmacevtske oblike za peroralno dostavo peptidov in proteinov. *Farm Vestn* 2003; 54: 25–35.
3. Folch J, Lees M. Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J Biol Chem* 1951; 191: 807–817.
4. Yousefi-Salakdeh E, Johansson J, Strömberg R. A method for S- and O- palmitoylation of peptides: synthesis of pulmonary surfactant protein-C models. *Biochem J* 1999; 343: 557–562.
5. Sachon E, Nielsen PF, Jensen ON. Characterization of N-palmitoylated human growth hormone by in situ liquid-liquid extraction and MALDI tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007; 42: 724–734.
6. Linder ME, Deschenes RJ. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 2003; 42: 4311–4320.
7. Stevenson FT, Bursten SL, Locksley RM, Lovett DH. Myristyl acylation of the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues. *J Exp Med* 1992; 176: 1053–1062.
8. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998; 273: 14037–14045.
9. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656–660.
10. Takada R, Satomi Y, Kurata T et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 2006; 11: 791–801.
11. Chopineau J, Robert S, Fénart L et al. Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Control Release* 1998; 56: 231–237.
12. Ekrami HM, Kennedy AR, Shen W-C. Water-soluble fatty acid derivatives as acylating agents for reversible lipidization of polypeptides. *FEBS Lett* 1995; 371: 283–286.
13. Kabanov AV, Levashov AV, Alakhov VY et al. Fatty acylation of proteins for translocation across cell membranes. *Biomed Sci* 1990; 1: 33–36.
14. Martins MBF, Jorge JCS, Cruz MEM. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* 1990; 72: 671–675.
15. Chopineau J, Robert S, Fénart L et al. Physicochemical characterization and in vitro interaction with brain capillary endothelial cells of artificially monoacylated ribonucleases A. *Lett Pept Sci* 1997; 4:313–321.
16. Robert S, Domurado D, Thomas D et al. Fatty acid acylation of RNase A using reversed micelles as microreactors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 447–454.
17. Foldvari M, Attah-Poku S, Hu J et al. Palmitoyl derivatives of interferon alpha: potential for cutaneous delivery. *J Pharm Sci* 1998; 87:1203–1208.
18. Martins MBF, Jorge JCS, Cruz MEM. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* 1990;72: 671–675.
19. Kocevar N, Obermajer N, Strukelj B et al. Improved acylation method enables efficient delivery of functional palmitoylated cystatin into epithelial cells. *Chem Biol Drug Des* 2007; 69: 124–131.
20. Resh MD. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 584–590.
21. Nadolski MJ, Linder ME. Protein lipidation. *FEBS J* 2007; 274: 5202–5210.
22. Slepnev VI, Phalente L, Labrousse H et al. Fatty acid acylated peroxidase as a model for the study of interactions of hydrophobically-modified proteins with mammalian cells. *Bioconjug Chem* 1995; 6: 608–615.
23. Fowler SA, Andracki M, Hurst G et al. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 27–42.
24. Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I et al. Effect of fatty acids and selected drugs on the albumin binding of a long-acting, acylated insulin analogue. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1365–1368.
25. Shi Q, Domurado M, Domurado D. Effect of protein chemical hydrophobization on antiglycose oxidase immunoglobulin production in mouse. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76: 278–285.
26. Havelund S, Plum A, Ribbel U et al. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res* 2004; 21: 1498–1504.

# Razvoj polielektrolitne nanoobloge na mikrodelcih učinkovine

## Development of polyelectrolyte nanocoating on drug microparticles

Andrej Dolenc, Julijana Kristl

**Povzetek:** Nanooblaganje omogoča izdelavo obloge z debelino od nekaj deset do nekaj sto nanometrov. Nanooblogo na mikrodelcih ibuprofena smo izdelali z metodo nanoplastenja (plast na plast nanooblaganje), ki temelji na izmenični elektrostatski adsorpciji nasprotno nabitih polielektrolitov. Deset- do tridesetplastno nanooblogo smo izdelali z zaporedno izmenično adsorpcijo hitosana in alginata. Z merjenjem zeta potenciala delcev smo potrdili nanos posamezne polimerne plasti, obstoj izredno tanke plastne obloge pa po končanem postopku še s posnetki optičnega in vrstičnega elektronskega mikroskopa. Takšne polielektrolitne obloge lahko uporabimo za spreminjanje površinskih lastnosti snovi, kot so izboljšanje stika površine z biološkim materialom, biokompatibilnost ter kontrolirano raztapljanje.

**Gljučne besede:** ultratanka obloga, metoda nanoplastenja (plast na plast), nanooblaganje, polielektrolit, hitosan, alginat

**Abstract:** Nanolayering can be used to produce a coating with thickness in a range of few tens to hundreds nanometers. Ibuprofen microparticles were used as cores for ultrathin coating produced using a layer-by-layer nanoassembly technique based on electrostatic adsorption of oppositely charged polyelectrolytes. 10- to 30-layered nanocoatings were made by alternating adsorption of chitosan and alginate. Each addition of the oppositely charged polyelectrolyte layer was confirmed by measuring its zeta potential. Optical and scanning electron microscopy were used to ascertain the presence of polyelectrolyte nanocoating. Such coatings can be used to change surface properties to give, for example, better contact with biologic material, higher biocompatibility and controlled dissolution.

**Key words:** ultrathin film, layer-by-layer nanoassembly, nanocoating, polyelectrolyte, chitosan, alginate

## 1 Uvod

Biokompatibilni polimeri imajo veliko vlogo v sodobnem oblikovanju zdravil in številnih medicinskih pripomočkov. Dobro desetletje jih uporabljajo tudi za izdelavo nanooblog, ki so najmanj 1000-krat tanjše kot že dolgo znane filmske obloge. Novejša metoda za izdelavo nanooblog je nanoplastenje (plast na plast nanooblaganje), ki temelji na zaporedni adsorpciji nasprotno nabitih polimerov na določeno nabito površino. Metodo je leta 1991 uvedel Decher s sodelavci (1). Vsak korak vodi do tvorbe nove plasti in inverzije naboja. Rezultat je obloga, sestavljena iz več plasti, stabiliziranih z močnimi elektrostatskimi vezmi (slika 1). Debelino obloge lahko s tovrstnim oblaganjem kontroliramo v območju nekaj nanometrov (2-6).

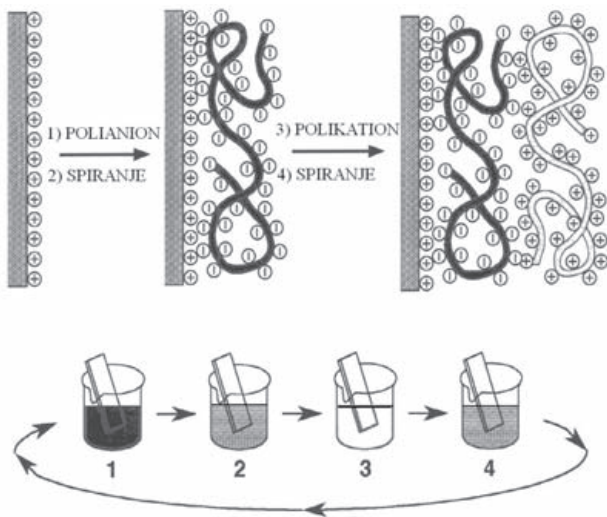
Za tvorbo nanoobloge so najprimernejši polielektroliti, ki se elektrostatsko vežejo na oblaganec. Prvi sloj se veže neposredno na njegovo površino, zato mora le-ta imeti določen naboj. Pri oblagancu z manjšo sposobnostjo tvorjenja elektrostatskih interakcij se pri prvih nanosih ojača površinska funkcionalnost. Na površino se veže plast polielektrolita, ki ima več skupin za vezavo naslednje plasti (2-5).

Nanooblaganje izvedemo tako, da površino oblaganca izmenično izpostavimo raztopinam nasprotno nabitih polielektrolitov (slika 1). Koncentracija polielektrolitov v raztopinah običajno znaša nekaj mg/ml in je velikokrat precej večja, kot je potrebna za samo oblaganje, vendar s takšno dosežemo hitrejšo prekritje celotne površine. Po določenem času, ki je potreben, da se na površino veže polielektrolitni sloj (običajno 10 do 30 min), oblaganec dva- ali trikrat speremo s prečiščeno vodo, da odstranimo nevezane ter šibko vezane polielektrolitne molekule, ki bi bile moteče ob dodatku nasprotno nabitega polielektrolita. Očiščeno površino nato izpostavimo raztopini nasprotno nabitega polielektrolita ter jo po preteku inkubacije ravno tako speremo s prečiščeno vodo. Cikel ponavljamo tako dolgo, da dobimo oblogo z želenim številom polielektrolitnih plasti na površini, ki jo oblagamo (7, 8, 9).

V dobrem desetletju po uvedbi te metode so za oblaganje uporabljali več različnih snovi. Največ raziskav so opravili s polistirensulfonatom, polialilamin kloridom, poliakrilno kislino, polidimetildialilamonijevim kloridom ter polietileniminom. Materiali za farmacevtske namene



morajo biti biokompatibilni, poleg tega pa je zaželeno, da so tudi biorazgradljivi. Med primerne polimere za oblaganje uvrščamo kationske in anionske polielektrolite. Primeri kationskih so: hitosan, želatina in poli-D-lizin, anionskih pa: karboksimetilceluloza, dekstran sulfat in alginat (2, 5). Obstaja pa tudi možnost uporabe drugih naravnih polimerov z nabojem (npr. ksantan) (10), ter polimerov, ki jih uporabljajo za izdelavo t. i. inteligentnih hidrogelov (za pH, temperaturo, glukozo ali proteine občutljivi polimeri) (11). Spojine naravnega izvora imajo prednost pred sintezni zaradi lahke dostopnosti, nizke cene in relativno majhne toksičnosti. Poleg tega jih lahko na različne načine modificiramo, da dobimo želene lastnosti (12).



Slika 1: Shematski prikaz nanoplastenja s polielektroliti. Površino za oblaganje izmenično izpostavljamo raztopinam polianionov (1) in polikationov (3), vmes pa spiramo s prečiščeno vodo (2, 4) (prirejeno po 7)

Figure 1: Schematic illustration of layer-by-layer nanocoating with polyelectrolytes. The substrate to be coated is dipped alternately in solutions of polymers with negative (1) and positive charges (3) with intermediate washing cycles (2, 4) (edited from 7).

Nanoobloga prispeva h končni prostornini in masi oblaganca običajno le minimalno, medtem ko zaradi spremenjenih površinskih lastnosti lahko močno vpliva na obnašanje v organizmu (28). Sprva so oblagali predvsem večje in ravne površine, sčasoma pa so tovrstno oblaganje razširili tudi na površine drugačnih oblik. Z enakomerno in stabilno oblogo so obložili vsadke, delce učinkovine, celice ipd. Razvoj odpira številne možnosti za oblikovanje obloge z zelo specifičnimi lastnostmi, kar širi območje njihove uporabnosti.

Vsadke so najpogosteje oblagali, da bi izboljšali njihovo biokompatibilnost, saj so pogosto izdelani iz snovi s sicer ustreznimi mehanskimi lastnostmi (trdnostjo, elastičnostjo ipd.), toda telo jih lahko zavrne zaradi neprimernih površinskih lastnosti. Tako so obložili vsadke iz titana (13, 14, 15), silikona (2) ali polietilentereftalata (16, 17, 18, 19) in znotrajžilne žične opornice (16, 20, 21). Raziskujejo tudi nanooblaganje kostnih vsadkov z oblogo, v katero so vključili več učinkovin (protivnetne in protibolečinske učinkovine, antibiotike ter

rastne faktorje), ki se sproščajo v določenem časovnem zaporedju in tako omogočajo, da telo najbolj optimalno sprejme vsadek.

S to metodo je mogoče izdelati tudi prazne mikrokapsule z debelino ovojnice v nanometrskem območju in jih napolniti z različnimi zdravilnimi učinkovinami ter tako zagotoviti zaščito vsebine in njeno prirejeno sproščanje (6). Na ta način so izdelali bioadhezivne oblike za oko s ciprofloksacinom. Delce Ca-fosfata ter eritrocite so uporabili kot jedra, na katera so nanесли 10-plastno nanooblogo, sestavljeno iz polialilamin klorida ter alginata. Nato so obložene delce inkubirali v 10 % raztopini ciprofloksacin klorida in pod določenimi pogoji odstranili jedra. Ugotovili so, da se je učinkovina v zadostni meri zadržala v polielektrolitni oblogi oz. mikrokapsuli. Nato so z *in vivo* poskusi na zajcih dokazali, da bi jih lahko uporabili kot varen in učinkovit sistem s podaljšanim sproščanjem za dostavo učinkovine na oko (22). V drugem primeru so na jedra Zn-oksida nanесли nanooblogo, za katero so poleg anionskih polielektrolitov (dekstran sulfata, polistirensulfata) kot kationsko plast uporabili pozitivno nabit aminoglikozidni antibiotik tobraminsulfat. Tudi v tem primeru so odstranili jedra in ugotovili, da bi tudi ta sistem lahko uporabili za kontrolirano dostavo učinkovine na oko (23).

Izjemno tanke polielektrolitne nanoobloge na delcih farmacevtskih učinkovin je mogoče uporabiti podobno kot klasične obloge za uravnavanje sproščanja, zaščito učinkovine, ciljno dostavo ipd. S polielektrolitno večplastno oblogo so tako dosegli zadržano sproščanje mikrododelcev fluoresceina, ibuprofena ter furosemda. Ravnanje z učinkovinami v obliki delcev mikrometrskih velikosti je dokaj enostavno, saj jih lahko spiramo na filtru ali enostavno ločimo od disperznega medija s centrifugiranjem (2-6, 8, 22).

V primerjavi s tradicionalnimi metodami za oblaganje učinkovin, ima metoda nanoplastenja s polielektroliti naslednje prednosti:

- debelino obloge in premer mikro- oziroma nanokapsule je mogoče izdelati z natančnostjo nekaj nanometrov;
- obloga je lahko sestavljena iz več različnih snovi, vanjo pa lahko vključimo tudi polimere, lipide, encime, DNK, nanodelce idr.;
- obložiti je mogoče delce s premerom, primernim za intravensko dajanje;
- s pripenjanjem specifičnih ligandov lahko dosežemo ciljno dostavljanje obloženih delcev;
- za oblaganje uporabimo zelo malo pomožnih snovi (3, 13, 20, 24, 25).

Namen našega raziskovalnega dela je bil pridobiti izkušnje o metodi nanoplastenja (plast na plast nanooblaganja) ter po tej metodi obložiti mikrododelce ibuprofena s polielektrolitoma hitosanom in alginatom. Proces nanoplastenja smo nadzorovali z merjenjem naboja delcev, nastanek obloge pa smo dokazali tudi s posnetki optičnega ter vrstičnega elektronskega mikroskopa.

## 2 Materiali in metode

### 2.1 Materiali

Ibuprofen (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija) je bel kristaliničen prašek ali v obliki brezbarvnih kristalov. V vodi je praktično netopen, dobro topen pa je v acetonu, metanolu in metilen kloridu. Topi se tudi v razredčenih raztopinah alkalijskih hidroksidov in

karbonatov. Topnost ibuprofena v vodi je 56 mg/l, v 0,1 M HCl pa približno 36 mg/l. Ibuprofen spada v razred nesteroidnih protivnetnih učinkovin, po klasifikaciji BCS pa ga uvrščamo v razred II, kamor spadajo učinkovine s slabo topnostjo in dobro permeabilnostjo (26).

Za izdelavo obloge smo uporabili natrijev alginat (Sigma, Nemčija) ter hitosan (Fluka Chemie GmbH), oba nizke viskoznosti. Hitosan je polisaharid, sestavljen iz kopolimerov glukozamina in N-acetilglukozamina, in ga pridobivajo z deacetiliranjem hitina. Je kationski poliamin z veliko gostoto naboja pri pH manj kot 6,5. Stopnja deacetilacije hitosana je večja od 80 %. Pristotnost številnih amino skupin omogoča, da se elektrostatsko poveže z anionskimi skupinami (27). Alginska kislina je linearen polimer, sestavljen iz dveh uronskih kislin:  $\alpha$ -L-guluronske (G) in  $\beta$ -D-manuronske kisline (M). Alginati monovalentnih kationov ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) so topni v vodi in v njej tvorijo viskozno koloidno raztopino s psevdoplastičnimi lastnostmi (28).

## 2.2 Postopek nanooblaganja delcev ibuprofena

Nanooblaganje smo izvedli tako, da smo 1 g delcev ibuprofena suspendirali v 40 ml raztopine polielektrolitov s koncentracijo 2 mg/ml, in sicer hitosan v 0,3 % očetni kislini, alginat pa v prečiščeni vodi. Nanooblaganje smo zaradi negativnega naboja delcev začeli z raztopino hitosana. Suspenzijo smo rahlo stresali 15 minut, da so se polielektrolitne molekule elektrostatsko vezale na površino delcev. Nato smo delce od disperznega medija ločili s 5-minutnim centrifugiranjem pri 4000 obratih/min. Disperzni medij nad usedlino smo previdno odstranili ter delce dvakrat redispergirali v prečiščeni vodi, da smo lahko odstranili nevezane ter šibko vezane polielektrolitne molekule. Po dvakratnem spiranju delcev s prečiščeno vodo smo jih redispergirali v raztopini polielektrolita z nabojem, nasprotnim od naboja zadnje plasti. Za vsak nanos plasti polielektrolita smo delce redispergirali v sveže pripravljene raztopine, saj smo tako zagotovili zadostno koncentracijo polielektrolita. Postopek smo ponavljali toliko časa, da smo dobili nanooblogo sestavljeno iz zelenega števila plasti.

## 2.3 Vrednotenje nanooblaganja delcev ibuprofena

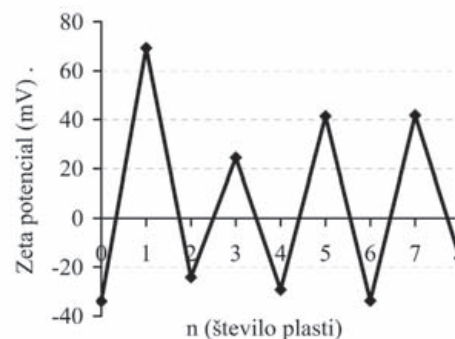
Naboj delcev ibuprofena smo določili z aparatom Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Naboj smo vedno določili po dvakratnem spiranju delcev s prečiščeno vodo, da nevezane oz. šibko vezane polielektrolitne molekule ne bi motile meritev.

Nanoobloge na površini delcev ibuprofena smo določili tudi s posnetki optičnega mikroskopa (Olympus BX 50F4; Olympus optical Co. Ltd, Tokyo, Japonska) in vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija). Pred analizo z optičnim mikroskopom smo delce omočili z vodo in jih pokrili s krovnim steklom. Na zeleni povečavi smo na stik krovnege in objektnege stekla dodali kapljico 1 M raztopine natrijevega hidroksida, ki je difundiral pod krovno stekelce in povzročil raztapljanje delcev ibuprofena. Delce, ki se v alkalnem mediju raztapljajo, smo posneli pred in med raztapljanjem ter po raztopitvi, ne da bi premikali vidno polje.

## 3 Rezultati in razprava

Delce ibuprofena smo obložili z deset- do tridesetplastno polielektrolitno nanooblogo (HIT/ALG). Ker molekulska struktura ibuprofena vsebuje karboksilno skupino, je bila površina delcev v medijih, v katerih smo izvajali oblaganje, negativno nabita. Tako smo za tvorbo prve plasti nanoobloge uporabili hitosan, ki je pozitivno nabit. Za tvorbo druge plasti smo uporabili alginat, za tretjo zopet hitosan, za četrto alginat ter tako izmenično nadaljevali do zelenega števila plasti. Pogoj za uspešno oblaganje je tudi lastnost, da se delci v medijih z raztopljenimi polielektroliti ne raztapljajo.

Naboj neobloženih delcev ibuprofena je bil -34 mV. Naboj po nanosu prve plasti hitosana je bil 69 mV, po nanosu druge plasti (alginata) pa -24 mV (slika 2). Naboj na površini je sovpadal z nabojem zadnjega uporabljenega polielektrolita (pozitiven je bil, če je bila zadnja plast hitosanska, oz. negativen, če je bila alginatna), zato smo zeta potencial določili le po nanosu prvih osem plasti polielektrolitov (slika 2).



Slika 2: Zeta potencial obloženih mikrodelcev ibuprofena s hitosanom (1, 3, 5 in 7) oziroma alginatom (2, 4, 6 in 8) kot zadnjo plastjo polielektrolitne obloge

Figure 2: Zeta potential of nanocoated ibuprofen microparticles with chitosan (1, 3, 5 and 7) and alginate (2, 4, 6 and 8) as outstanding polyelectrolyte layers.

Naboj na površini je bil največji po nanosu prve plasti hitosana. Ker je bil naboj neobloženih delcev ibuprofena dokaj majhen (-34 mV) se je verjetno le manjši delež naboja prve plasti hitosanskih molekul porabil za nevtralizacijo naboja na površini, preostali del pa izrazil kot pozitiven naboj na površini. Ob vezavi plasti alginatnih molekul se je del naboja porabila za nevtralizacijo naboja hitosanske plasti, zato površina alginatne plasti ni bila tako negativno nabita. Po nanosu začetnih plasti pa so postala nihanja v naboju bolj enakomerna. Dobljeni rezultati kažejo podoben trend, kot so jih objavili raziskovalci v literaturi, seveda pa so absolutne vrednosti naboja odvisne od uporabljenih materialov.

Na posnetkih obloženih delcev ibuprofena z optičnim mikroskopom nismo opazili razlik na površini delcev, saj je obloga zelo tanka, povečava pa sorazmerno majhna za ugotavljanje površinskih razlik (slika 3a). Po dodatku 1 M natrijevega hidroksida na rob krovnege stekla so se mikrodelci ibuprofena začeli raztapljati, ostala pa je polielektrolitna obloga (slika 3b, 3c). NaOH smo uporabili, ker je ibuprofen dobro topen v alkalnem, slabo pa v vodi oz. v kislem

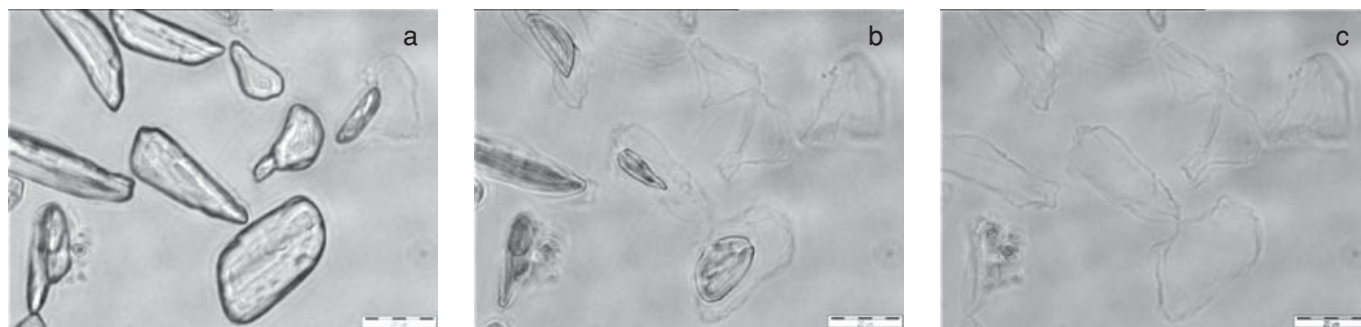
mediju. Že med samim raztapljanjem jeder (slika 3b), predvsem po njihovi popolni raztopitvi, smo opazili ovojnice oziroma obloge okrog mikrodolcev ibuprofena, ki so ostale vidne tudi po raztopitvi jedra in so zadržale obliko mikrodolcev (slika 3c). V nekaterih primerih smo opazili skrčenje obloge. Potrdili smo, da je obloga stabilna in se ne raztaplja niti v bazičnem mediju. Obloga je ravno tako stabilna v kislem kot nevtralnem mediju, saj smo v obeh izvajali oblaganje.

Posnetki neobloženih in obloženih delcev ibuprofena z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) so prikazani na sliki 4(a-c). Debeline obloge iz SEM posnetkov je težko natančno določiti, vidno pa je, da je obloga res izjemno tanka. Iz posnetkov smo ocenili, da je tridesetplastna nanobloga debela 100-200 nm, kar je v skladu z literaturnimi podatki, kjer avtorji navajajo, da je debelina ene plasti 2 do 6 nm, odvisna pa je od uporabljenih polimerov (3, 15, 21, 22). Na posnetkih obloženih delcev smo opazili luknjasto površino (slika 4b, 4c). Sklepamo, da pred SEM slikanjem površina ni bila poškodovana,

saj se je število poškodb večalo med daljšim opazovanjem vzorca s SEM mikroskopom. Očitno tako tanke obloge ne prenesejo dolgotrajnejše izpostavljenosti elektronom v tovrstnem mikroskopu. Opazili smo, da je poškodb pri 10-plastni oblogi več (slika 4b) ter se pojavljajo hitreje kot pri 30-plastni (slika 4c), kar je ravno tako posledica tanjše obloge.

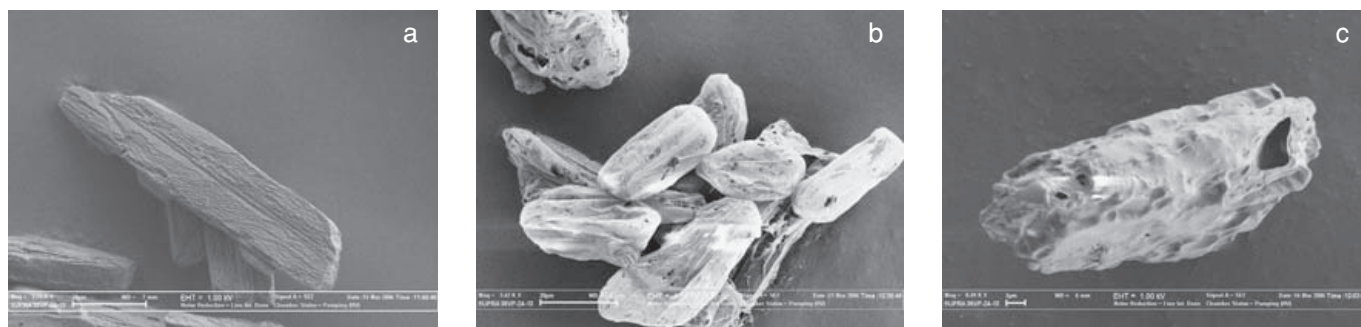
## 4 Sklep

Nanoplastenje (plast na plast nanooblaganje) s polielektroliti je metoda, s katero lahko izdelamo zelo tanko oblogo na površinah različnih velikosti in oblik. Za izdelavo obloge sta potrebni dve polimerni spojini z nasprotnim nabojem, ki se izmenično vežeta na površino, ki jo oblagamo. Postopek nanooblaganja lahko spremljamo z vmesnim določanjem zeta potenciala na površini delcev, po končanem oblaganju pa s posnetki optičnega in vrstičnega



Slika 3 (a-c): Posnetki obloženih delcev ibuprofena z 20-plastno polielektrolitno oblogo z optičnim mikroskopom. Na sliki **a** vidimo delce ibuprofena z 20-plastno nanooblogo pred začetkom raztapljanja v 1 M NaOH. Slika **b** prikazuje že delno raztopljene delce, kjer so že vidne tudi polielektrolitne obloge, na sliki **c** pa so delci ibuprofena že popolnoma raztopljeni in je vidna samo še polielektrolitna obloga, ki je ohranila obliko in velikost delcev. Merilo na posnetku predstavlja 20  $\mu\text{m}$ .

Figure 3 (a-c): Optical microscope images of ibuprofen particles with 20 polyelectrolyte layers. **a** Ibuprofen before dissolution in 1 M sodium hydroxide solution. **b** Partially dissolved particles with a visible residue of polyelectrolyte coating. **c** Ibuprofen particles totally dissolved leaving only the polyelectrolyte multilayer. The polyelectrolyte multilayer kept the size and the shape of the particles. Size bar represents 20  $\mu\text{m}$ .



Slika 4 (a-c): SEM posnetki neobloženih delcev ibuprofena (a) ter delcev, obloženih z 10 ((HIT/ALG)5) (b) oziroma 30 plastmi polielektrolitov ((HIT/ALG)15) (c). Merilo predstavlja 20  $\mu\text{m}$  (a, b) oz. 2  $\mu\text{m}$  (c).

Figure 4 (a-c): SEM images of (a) uncoated ibuprofen particles, (b) particles coated with 10 polyelectrolyte layers ((HIT/ALG)5), or (c) 30 polyelectrolyte layers ((HIT/ALG)15) (c). Size bars represent 20  $\mu\text{m}$  (a, b) and 2  $\mu\text{m}$  (c).

elektronskega mikroskopa določimo obliko, debelino, homogenost in stabilnost.

Nanooblaganje mikrodelcev ali večjih površin ni posebno zahteven postopek. Zahtevnejše je oblaganje nanodelcev, predvsem zaradi njihovega ločevanja od disperznega medija in stabilnosti tovrstnih sistemov. Oblaganje nanodelcev za parenteralno dajanje zaradi povečanja biokompatibilnosti ter za ciljano dostavo učinkovine pa pomeni poseben izziv za raziskovanje v prihodnosti.

## 5 Literatura

1. Decher G, Hong JD. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol Chem, Macromol Symp*, 1991; 46: 321-327.
2. Ai H, Meng H, Ichinose I in sod. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J Neurosci Meth*, 2003; 128: 1-8.
3. Ai H, Jones SA, de Villiers MM in sod. Nano – encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug delivery. *J Contr Rel*, 2003; 86: 59-68.
4. Qiu X, Loporatti S, Donath E in sod. Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir*, 2001; 17: 5375-5380.
5. Antipov AA, Sukhorukov GB, Donath E in sod. Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules. *J Phys Chem B*, 2001; 105: 2281-2284.
6. Homar M, Kristl J. Nanooblaganje – možnosti in prednosti. V: *Nanotehnologija v farmaciji*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2004; p. 65-79.
7. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 1997; 277: 1232-1237.
8. Moya S, Donath E, Sukhorukov GB in sod. Lipid coating on polyelectrolyte surface modified colloidal particles and polyelectrolyte capsules. *Macromolecules*, 2000; 33: 4538-4544.
9. Zahr AS, de Villiers M, Pishko MV. Encapsulation of drug nanoparticles in self-assembled macromolecular nanoshells. *Langmuir*, 2005; 21: 403-410.
10. Baumgartner S, Pavli M, Kristl J. Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008; 69 (2): 698-707.
11. Abramović Z, Kristl J. Inteligentni hidrogeli za dostavo zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn*, 2004; 55: 555-563.
12. Bhardwaj TR, Kanwar M, Lal R in sod. Natural gums and modified natural gums as sustained – release carriers. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000; 26 (10): 1025-1038.
13. van den Beucken JJJP, Vos MRJ, Thune PC in sod. Fabrication, characterization and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes. *Biomaterials*, 2006; 27: 691-701.
14. Cai K, Rechtenbach A, Hao J in sod. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*, 2005; 26: 5960-71.
15. Schultz P, Vautier D, Richert L in sod. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, -MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials*, 2005; 26: 2621-30.
16. Dolenc A, Homar M, Gašperlin M, Kristl J. Z nanooblaganjem do izboljšanja biokompatibilnosti vsadkov. *Med Razgl*, 2006; 45: 411-420.
17. Fu J, Ji J, Yuan W in sod. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*, 2005; 26: 6684-6692.
18. Boura C, Menu P, Payan E in sod. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003; 24: 3521-30.
19. Liu Y, He T, Gao C. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005; 46: 117-26.
20. Thierry B, Winnik F M, Merhi Y in sod. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromol*, 2003; 4: 1564-1571.
21. Yang SY, Seo JY. Cellular interactions on nano-structured polyelectrolyte multilayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2008; 313-314: 526-529.
22. Bhadra D, Gupta G, Bhadra S in sod. Multicomposite ultrathin capsules for sustained ocular delivery of ciprofloxacin hydrochloride. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2004; 7(2): 241-251.
23. Khopade AJ, Arulsudar N, Khopade SA in sod. Ultrathin antibiotic walled microcapsules. *Biomacromolecules*, 2005; 6: 229-234.
24. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials*, 2008; Vol 29: 1207-1215.
25. Liu L, Chen Z, Yang S in sod. A novel inhibition biosensor constructed by layer-by-layer technique based on biospecific affinity for the determination of sulfide. *Sensors and Actuators B*, 2008; 129: 218-224.
26. Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int J Pharm*, 2006; 312: 179-186.
27. Kristl J, Šmid-Korbar J, Štruc E in sod. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *Int J Pharm*, 1993; 99: 13-19.
28. Rowe RC, Sheskey JP, Weller JP in sod. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 4th edition, 2003: 16-18, 132-135.



# Novice iz sveta farmacije

dr. Andrijana Tivadar, dr. Petra Slanc Može, Marjetka Smolej, dr. Bojan Doljak, prof. dr. Borut Štrukelj

## Ali nesteroidni antirevmatiki zmanjšajo tveganje za nastanek raka dojk?

Bojan Doljak

Glede na zaključke meta-analize 38 kliničnih študij, v katerih je sodelovalo več kot pol tretji milijon bolnic, je odgovor na naslovno vprašanje pritrديلen. Največja tovrstna študija do sedaj je namreč potrdila, da nesteroidni antirevmatiki signifikantno zmanjšajo tveganje za nastanek raka dojk. Nesteroidni antirevmatiki kot skupina tveganje zmanjšajo za 12 %, posebej pa sta izpostavljeni učinkovini acetilsalicilna kislina (13 %) ter ibuprofen (21 %).

Do sedaj ni bilo enotnega mnenja glede zaščitnih učinkov nesteroidnih antirevmatikov. Znano je sicer, da nesteroidni antirevmatiki zmanjšajo tveganje za nastanek kolorektalnega raka, medtem ko so si podatki glede tveganja za nastanek raka dojk nasprotujoči. Izsledki te meta-analize se sicer skladajo z izsledki nekaterih manjših meta-analiz, vendar rezultati posameznih kliničnih študij niso bili vedno konsistentni. Razlog tiči verjetno v mehanizmu delovanja nesteroidnih antirevmatikov, preko katerega delujejo zaščitno pred rakom dojk, npr. različna izraženost ciklooksigenaze 2 v nekaterih normalnih in rakavih tkivih. Pri tem je vsekakor pomembna tudi selektivnost nesteroidnih antirevmatikov, zlasti koksibov, ki jo izkazujejo do ciklooksigenaze 1 in ciklooksigenaze 2.

Rezultati najnovejše študije še ne pomenijo, da bi za zmanjševanje tveganja bilo priporočljivo jemanje teh zdravil kot samostojne indikacije. Resni neželeni učinki, kot so krvavitve v gastrointestinalnem traktu, so dovolj velik razlog za to, da uporaba nesteroidnih antirevmatikov (samo) za preventivo raka dojk ni priporočljiva. Pri bolnicah, ki jemljejo nesteroidne antirevmatike za lajšanje drugih težav, pa je tveganje najverjetneje res manjše.

**Vir:** Journal of the National Cancer Institute, 7. oktober 2008.

## Vprašljiva učinkovitost rimonabanta

Borut Štrukelj

Zdravilo z zdravilno učinkovino rimonabant je registrirano v Evropski skupnosti od junija 2006. Rimonabant je antagonist kanabinoidnih receptorjev. Deluje tako, da blokira specifično vrsto receptorjev, in sicer kanabinoidne receptorje tipa 1. Ti receptorji se nahajajo v živčnem sistemu in so del sistema, ki ga telo uporablja za nadzor vnosa hrane. Receptorji se nahajajo tudi v adipocitih. Zdravilo je izkazalo učinkovitost pri zmanjšanju telesne mase pri bolnikih s čezmerno telesno maso, pri katerih obstajajo dodatni dejavniki tveganja, kot so diabetes tipa 2 ali dislipidemija. Neželeni učinki, ki so bili med študijami najpogostejše opaženi, so bili navzeja in okužbe zgornjih dihal. Zdravilo lahko poveča tveganje za depresijo in pri majhnem številu bolnikov povzroči samomorilne misli. V obsežni klinični raziskavi, ki je zaobjemala čez 7000 bolnikov s prekomerno telesno maso, so ugotovili, da se po enoletnem jemanju rimonabanta v povprečju telesna masa zmanjša za 4,9 kg. Prvotno so sicer učinkovino razvijali kot pomoč proti odvajanju kajenja, a so bili rezultati kliničnih raziskav neznačilni v primerjavi s placebo skupino, zato so nadaljevali raziskave v smeri razvoja učinkovine za pomoč pri zmanjševanju prekomerne telesne mase. Po skrbnem pregledu spremljanja neželenih učinkov, ki jih povzroča rimonabant, so ugotovili, da je pogostost psihiatričnih težav, ki vključuje depresivna stanja, pri bolnikih, ki so jemali rimonabant, skoraj dvakrat večja, kot pri kontrolni skupini. Na osnovi tega in glede na relativno majhno zmanjšanje telesne mase skozi daljši čas, se je EMEA na oktobrski seji (20.–23. oktober 2008) odločila predlagati previdnost pri predpisovanju. Bolniki, ki jemljejo rimonabant, naj se posvetujejo z zdravnikom ali farmaceutom, ki bo na osnovi rezultatov odločil, ali z zdravljenjem nadaljevati ali ne.

**Vir:** EMEA Latest Press Release/ 22.10.2008



# Poročilo s 63. svetovnega kongresa Liga Medicorum Homeopathica Internationalis (LMHI) v Belgiji.

## Report from 63th Liga Medicorum Homeopathica Internationalis (LMHI) in Belgium

Maruša Hribar

63. svetovni kongres (LMHI) je potekal v Oostendu v Belgiji med 20. in 24. majem 2008. Konferenca je zbrala na enem mestu strokovnjakinje in strokovnjake s področja medicine, farmacije in homeopatije. Letošnja tema je bila: »Homeopatija, z dokazi podkrepjene študije- več kot dvojno slepe študije!«. Kot je navedel v predgovoru predsednik kongresa Michel Van Wassenhoven je Belgija v preteklosti že organizirala homeopatske kongrese (leta 1856, 1913, 1953 in leta 1972). Ta kongres je prejel prvič podporo Nacionalnega fonda za znanstvene raziskave v Belgiji, prav tako je prvič sprejeta uradna medicinska akreditacija za homeopatski kongres. Na kongresu so sodelovali znanstveniki in znanstvenice iz 40-ih držav. Navajam nekaj izvlečkov posameznih predstavitev.

Čeprav se Evropa geopolitično združuje, je vseeno med državami članicami precejšnja razlika kar zadeva homeopatijo in tudi sicer implementacijo komplementarnih oblik zdravljenja v državne in zasebne prakse zdravljenja. Pomemben predavatelj kongresa je bil vsekakor Ton Nikolai, predsednik Evropskega homeopatskega komiteja (*ECH - European Homeopathy Comitee*). Predstavil je najnovejše podatke o razvoju in integraciji komplementarne medicine v evropske sisteme zdravljenja. Ta proces je dozorel za predstavitev političnim krogom, saj kar 65% prebivalc in prebivalcev v Evropi posega po različnih oblikah komplementarnega zdravljenja. Zato bo potrebno tudi nadaljnje financiranje raziskav učinkov takšnega zdravljenja ter ustrezna zakonska regulativa, ki upošteva specifičnost takšnih procesov zdravljenja. Nikolai je posredoval tudi podatek, da se je v zadnjem letu 150.000 splošnih zdravnikov in zdravnic v EU odločilo dopolniti način biomedicinskega zdravljenja z dodatno komplementarno metodo (najpogostejše so akupunktura, homeopatija ter antropozofska medicina oziroma naturopatija). Ker gre za v praksi zdravljenja za dvosmerni odnos med tistim/tisto, ki zdravi in tistim/tisto, ki sprejema napotke, so odjemalci in odjemalke izrazili nezadovoljstvo z neučinkovitostjo in toksičnostjo nekaterih procesov konvencionalnega zdravljenja, ter predvsem pomakanjem časa za obravnavo pacientov kot celostnih osebnosti. Nikolai je poudaril, da komplementarni načini zdravljenja vključujejo iskanje optimalnega

stanja človeka na različnih nivojih (telesno, mentalno, emocionalno, socialno, duhovno) in ne le sanacijo določenega simptoma. S tem namenom so v EU pripravili program za odjemalce in odjemalke komplementarnih praks, ki bo potekal od 2008 do 2013.

Ugledni homeopat Christian Boiron, ki je hkrati tudi ustanovitelj in predsednik Boironovih laboratorijev se je dotaknil področja same homeopatije, ki na slovenskih tleh nima stoletne tradicije kot na primer v Belgiji (z več kot 200 letno tradicijo v homeopatiji), Franciji, Angliji ali Nemčiji, ZDA, Argentini ali Indiji. Kajti v tem času so se po svetu razvili različni pristopi in načini znotraj same homeopatije. Poudaril je ključen pomen nadaljnjih raziskav ne glede na različne šole homeopatije za temeljno razumevanje tega načina zdravljenja pri strokovnih in splošnih javnostih. Kot je poudarila še direktorica Boironovih laboratorijev Marie Bordet so možni različni načini raziskovanja homeopatije: temeljne raziskave, ki pomagajo razumeti in razlagati zakaj visoko-stopenjske razredčitve učinkujejo; klinične raziskave, ki ugotavljajo terapevtske učinke homeopatskih pripravkov ter farmako-epidemiološke raziskave, ki prikazujejo vpliv na javno zdravstvo in vpliv homeopatskih zdravil na stroške zdravljenja.

Profesor Louis Rey je predstavil vpogled v fizikalne lastnosti ultra visokih razredčitev. Klasičen očitek znanosti je namreč bil, da visoko stopenjske razredčitve niso učinkovite. To vsekakor predstavlja izziv sodobni fiziki, ki je napredovala v svojih specifičnih raziskovalnih metodah. Posebnost so namreč molekule vode, ki v svoji tekoči obliki tvorijo dimere, oligomere in celo najkompleksnejše polimere zaradi zmožnosti gradnje vodikovih vezi. Torej voda v tekočem stanju ni homogena tekočina ampak dinamičen skupek aktivnih oligomerov, polimerov in skupkov v konstantnem gibanju in v stalni odvisnosti od temperature, tlaka ter magnetnega in električnega polja. Tako s postopkom izjemne razredčitve postane prav struktura tista, ki določa spojino. Nuklearna paramagnetna resonanca je prva tehnična naprava, ki kaže, da imajo ultra visoke razredčitve posebno strukturo, ki je specifična glede na izvorno substanco iz katere je bila pripravljena. Kalorimetrija in električna konduktivnost sta te izsledke

potrdila, kakor tudi nizko temperaturna termolumiscenca, ki je pokazala enake zaključke.

Navajam prevod povzetka predavanja dr. Petra Fisher-ja, direktorja kliničnega oddelka Kraljeve homeopatske bolnice v Londonu (*Royal London Homoeopathic Hospital*) in osebnega zdravnika britanske kraljice z naslovom »Raziskave v homeopatiji: Kdo jih potrebuje?«. Kajti v zadnjem času so se pojavljali pomisleki, da homeopatija odteguje sredstva za konvencionalna zdravljenja. Njegov namen je bil predvsem predstaviti znanstvene dokaze o homeopatiji in podati nadaljnja priporočila v zvezi z raziskavami.

Raziskava je namreč metoda za odgovor na vprašanja, seveda je odvisno kdo to vprašanje zastavlja (zdravniki konvencionalne medicine, nekateri skeptični znanstveniki, plačniki npr. zavarovalnice...). Vsi štirje obširni pregledi randomiziranih kontroliranih raziskav (RKR) homeopatije kažejo na ugotovitev, da se homeopatija verjetno razlikuje od placeba. Sistematični pregledi RKR s specifičnim fokusom na področja medicine, ki so se pozitivno odzivala na homeopatijo v 10-ih primerih, neodločno v 8-ih in negativno v 5-ih. Prezentacija Shanga in sodelujočih, objavljena v *Lancet-u* leta 2005 je vključevala meta-analizo, vendar ni pomenila sistematičnega pregleda. 134 RKR je bilo objavljenih v strokovni literaturi do konca leta 2007. V smislu statistično relevantnih raziskav, so bili pozitivni učinki homeopatije potrjeni v 59 poizkusih (44% odstotkov vseh), negativni rezultati v 8 (6%), medtem, ko je bilo 67(50%) neodločenih. Klinični dokazi potrjujejo učinkovitost homeopatije v primeru alergij in vnetju zgornjih respiratornih poti, otroške diareje, zdravljenju influence, migrene, osteoartritisa in drugih revmatskih obolenj, post-operativni ileus, sezonsko pogojenem alergičnem rinitisu. Kontrolirane, nenaključne raziskave, stroškovno učinkovite in opazovalne študije univerzalno potrjujejo da večina pacientov in pacientk poroča o

kliničnem izboljšanju s terapijo homeopatskega zdravljenja. Kar nam sporoča, da integracija homeopatskega zdravljenja v primarnem medicinskem zdravljenju ustvarja boljše rezultate s približno enakimi stroški. Številni pacienti in pacientke uporabljajo homeopatijo zaradi nezaželenih učinkov pri drugih zdravljenjih. Poglavitni dvom v homeopatiji je uporaba visokih razredčin, vključujoč ultra-molekularne razredčine. Avogadrova konstanta, število delcev (atomov ali molekul) v molu substance je v rangu  $10^{23}$ . V homeopatski terminologiji  $10^{23}$  pomeni 23 X oziroma razredčitev 12 C. Homeopatska zdravila, ki so razredčena nad 12 C teoretično ne vsebujejo materialne sledi izvorne substance.

Z dokazi fizika potrjuje specifične strukturne modifikacije vode, ki je bila inducirana skozi homeopatski proces priprave, za katero je možno, da shranjuje informacije.

Homeopatija se pogosto uporablja, pa vendar so raziskave, kljub njeni opazni pozitivni učinkovitosti, malo številčne. Kaže se tudi verjetna pozitivna učinkovitost homeopatskih zdravil pri astmi, predmenstrualnih težavah, za sindrom hiperaktivnosti (ADHD), pri sindromu kronične utrujenosti, post-partum krvavitvah, sepsi, stomatitisu, in simptomih, ki se pojavijo pri zdravljenju radio in kemoterapije.

*Hkrati vas obveščamo, da Homeopatska Sekcija pri Slovenskem farmacevtskem društvu v okviru mednarodnega izobraževanja napoveduje prihod priznane strokovnjakinje s področja homeopatije Dr. Dominique Cado Leclercq, ki bo predavala v okviru francoskega centra za izobraževanje in razvoj homeopatije (CEDH). Tema predavanja bo homeopatski pristop zdravljenja psihičnih težav. Predavanje bo potekalo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, v soboto 22 novembra 2008. Več informacij: spletna stran Sekcije za homeopatijo ali e-pošta: marusa.hribar@email.si*

# V spomin Mag. STANISLAVI ČERNE, roj. Odar, mag. farm. specialistka medicinske biokemije

29. 10. 1937 - 29. 5. 2008



Sredina novembra, kratek dan. V uri, ko se je neprijazno popolde začelo prevešati v večer, je na prehodu za pešce mlad voznik zbil žensko, ki je ravno prišla z radovljiške pošte. S hudimi poškodbami glave so jo prepeljali v bolnišnico na Jesenice. Suhi časopisni zaznamek.... A izkazalo se je, da je bila ponesrečenka Stanka, »naša magistra«, nekaterim sošolka in študijska kolegica, drugim poklicna sodelavka v zdravstvu,

predstojnica pa prijateljica, žena in mati, vse s predanostjo in s sposobnostjo vživljati se v sočloveka!

Začel se je njen boj za ozdravitev po hudih, zahrbtnih posledicah nesreče. Kako smo bili veseli, ko se je po dobrem mesecu prebudila iz kome! Med ležanjem v bolniški postelji, mučnem za njenega dejavnega duha, si je zelo želela obiskov in se je z nami, ki smo prihajali k njej, rada pogovarjala. Občudovali smo njeno potrpežljivost in ljubeznivost. Nekaj časa je zdravljenje napredovalo, nato se je začelo zapletati. Ona in mi pa smo še vedno upali. Vendar nas je v trenutku, ko tega nismo pričakovali, spokojno zapustila. Od prvega junija tega leta počiva ob svojem sinu na radovljiškem pokopališču.

Magistrin rod ima korenine v Bohinju, grob pokojnih staršev je redno obiskovala v Bohinjski Bistrici. Sama je bila rojena na Jesenicah. Po gimnaziji v rodnem mestu je 1957 pričela študirati farmacijo, prva dva letnika na tedaj še nepopolnem farmacevtskem oddelku Prirodoslovno - matematične fakultete v Ljubljani, v tretjem letniku je bila prisiljena nadaljevati študij na Farmaceutski fakulteti v Zagrebu. Proti koncu študija se je že usmerila v medicinsko biokemijo. Po diplomu januarja 1963 v Zagrebu se je prvega februarja zaposlila kot vodja tedaj priročnega laboratorija v Splošni bolnišnici Jesenice. Med vso svojo delovno dobo je v tej ustanovi vodila laboratorijsko dejavnost. Strokovni izpit je opravila v Ljubljani 1965. Dovoljeno ji je bilo začeti specializacijo iz medicinske biokemije v drugi generaciji specializantov. Po predavanjih, pripravljenih za to skupino, je 22. novembra 1972 opravila specialistični izpit.

Poročila se je 1966 in podarila življenje dvema sinovoma. Čez nekaj let je družina pognala nove bivanjske korenine v Radovljici.

Preden je magistra Stanka prišla v jeseniško bolnišnico, je laboratorij spadal pod interni oddelek; vodil in nadzoroval ga je predstojnik tega bolniškega oddelka. Za laboratorij je bil na voljo samo en prostor. V njem so delale priučene bolničarke, posvečale so se le hematološkim in urinskim ter redkim biokemičnim preiskavam. Večino biokemičnih

določitev so naročati v Ljubljani - v poslanem biološkem materialu. Z nastavitvijo magistre Stanke Odar se je stanje pričelo izboljševati. Laboratorij je postal samostojna enota, in ko so čez čas pridobili še dve sobi, so bili tudi delavci v njem manj utesnjeni. Prihajati so začeli šolani tehniki. Magistra je vestno bedela nad tem, da so analizne metode izboljševali in vpeljevali nove; s pospešenim uvajanjem biokemičnih analiz so postajali vse manj odvisni od drugih laboratorijev. Okrog leta 1970 so se preimenovali v centralni laboratorij. Nato je bolnišnica pričela zidati novo stavbo in v gradbene načrte zajela tudi nov, moderen laboratorij s sodobnim, prostornim tlorisom. Preselitev iz dotedanjih nekaj prostorov v novozgrajeno laboratorijsko enoto 8. avgusta 1980 je olajšala delo ter omogočila razvoj in strokovno širjenje, žal pa ob preselitvi še ni bilo denarja za sodobne aparature. Ob hitrem naraščanju števila in vrst preiskav, ki mu s tedanjim večinoma ročnim delom niso mogli več zadovoljivo slediti, je bilo treba priskrbeti polavtomatske in avtomatske biokemične in hematološke analizatorje. V bolnišnici je bilo želja vedno več kot možnosti, zato je bilo treba iskati sponzorje. V laboratoriju so začeli nakupovati potrebne sodobne analizatorje od leta 1985 naprej.

Ob pestrem vsakdanu na delovnem mestu pa ob reševanju težav, ki so zahtevale več časa in daljnosežnejši pogled naprej, je magistra Černe še našla čas, da je na srednji zdravstveni šoli na Jesenicah 10 let poučevala mikrobiologijo (vse do leta 1982). Vpisala se je tudi na podiplomski študij iz medicinske biokemije. Magistrirala je na farmacevtski fakulteti v Ljubljani 22. oktobra 1991 s temo Primerjalna analiza nivojev kortizola in beta endorfina v serumu pred obremenitvijo in po obremenitvi človeškega organizma s psihofizičnim stresom. Magistra je tudi nenehno skrbela za nove strokovne moči, za poglobljanje znanja pri sodelavcih ter za njihovo napredovanje.

Upokojila se je prvega avgusta 1994. Nato je pogumno začela postavljati na noge manjši zasebni laboratorij; to je zdravstvena zakonodaja takrat že dovoljevala. Načrtovala je določevanja nekaterih encimov, hormonov, zdravil in drugih snovi v telesnih tekočinah z imunokemijskimi tehnikami po postopku suhe kemije; za to potrebni analizator so imeli takrat le redki laboratoriji v Sloveniji. Magistra je z vztrajnostjo premagala birokratske ovire in pričela z zamišljenimi preiskavami. Čez kratek čas je morala zaradi denacionalizacije izseliti laboratorij iz stavbe na Bledu; preselila ga je v Radovljico. Na koncu leta 1996 je v njeno življenje zasekala tragična smrt drugorojenca. Od takrat je živela le za svojo družino.

Ena pomembnejših stvari v poklicnem življenju magistre Černe je bilo njeno dolgoletno članstvo v Slovenskem farmacevtskem društvu (SFD). Kmalu po prihodu v bolnišnico na Jesenice je vstopila v sekcijo, t.j. kasnejše Združenje medicinskih biokemikov pri takratnem farmacevtskem društvu. Povezanost s kolegi iz iste stroke ji je pomenila močno oporo. Iz predavanj uglednih medicinskih biokemikov na strokovnih srečanjih so črpali napotke, v pogovorih

pred in po teh sestankih so si izmenjevali izkušnje. Tako so lažje premagovali težave in sprejemali odločitve v stroki. Dvakrat zapored je bila magistra izvoljena v odbor sekcije medicinskih biokemikov farmacevtskega društva: v mandatu od maja 1977 do novembra 1979 kot članica (poverili so ji pisanje zapisnikov sej odbora in letnih občnih zborov), nato do oktobra 1981 kot blagajničarka Združenja. Pred praznovanjem 20-letnice ustanovitve sekcije medicinskih biokemikov pri Farmacevtskem društvu Slovenije je leta 1981 sodelovala v odboru za proslavo tega jubileja.

Od takrat še maloštevilnih specialistov medicinske biokemije na Gorenjskem je bila magistra proti koncu 1977 imenovana v prvi strokovni kolegij kliničnih in biokemičnih laboratorijev republike Slovenije. Članstvo v tem republiškem telesu se ji je izteklo leta 1987.

Naj dodamo še spomin na nepozaben dan, ki smo ga kolegi preživeli z magistro Stanko Černe pred triindvajsetimi leti v jeseniški bolnišnici ter na prostem sredi lepot gorenjskih ravnin pod mogočnim Stolom. Obujamo ga, da bi mlajšim kolegom odstrli tančico, ki jo je čez osebnost pokojne kolegice spletel čas.

Odbor Združenja medicinskih biokemikov pri SFD je sklenil, da se bodo njegovi člani iz vse Slovenije zbrali 19. junija 1985 na strokovnem sestanku zunaj Ljubljane - na Gorenjskem. Največ dela za odmevno srečanje je kot gostiteljica domačinka prevzela in opravila magistra Černe sama, v bolnišnici in zunaj nje. Odločila se je, da bo poskrbela za dopolnitev in popestritev dneva: po strokovnih temah iz klinične biokemije naj bi se udeležencem približale tudi kulturnozgodovinske vrednote dela Gorenjske, kamor smo bili povabljeni. Tako smo dopoldne v jeseniški bolnišnici najprej delavno zasedali člani že omenjenega republiškega strokovnega kolegija pod vodstvom prof. dr. Nika Jesenovca. Popoldne je v bolnišnični dvorani stekel program za člane Združenja z osrednjim predavanjem prof. dr. Jane Lukač Bajalo; predstavila je svojo pred kratkim zagovarjano magistrsko nalogo. Po sestanku je sledila ne le izbrana pogostitev, ampak so nas povabili še v Vrbo, kraj »svet'ga Marka«. V Prešernovi

rojni hiši so okoliški kulturni delavci imeli za nas poseben umetniški nastop. Pospremljeni smo bili tudi po poti kulturne dediščine do osnovne šole v Zabreznici; dohod obrobajo bronasti portreti zaslužnih mož s tega koščka Gorenjske - Prešerna, Čopa, Finžgarja, Jalna in Antona Janše. Magistra Stanka je z vso zavzetostjo uredila, da smo se srečali tudi s pionirjema medicinske biokemije pri nas, z zakoncema Žemva. Magistra Marija in doktor Miha Žemva sta se, kot navadno v tem času, mudila v svoji počitniški hišici na Bledu. Iskrenega povabila magistre Černe na Jesenice in v Vrbo res nista mogla zavrniti; tako sta z obiskom veselo presenetila svoje nekdanje kolege in učence ter s svojo pripovedjo dodala družabnemu delu novo vrednoto.

Ta zgodnjepoletni dan nam je ostal v posebnem spominu. Potem ko smo resno opravili strokovne naloge, je gostiteljica s sodelavci nevsiljivo zaposlila naše misli in čustva z nizanem dogodkov in z zanimivostmi z drugih področij. S tem se je pritisk poklicnih dolžnosti na nas prijetno zrahljal, paleta zaznav se je bogatila, spet smo znali občudovati pisane travnike okrog Vrbe, oči so radovedno raziskovale proti vrhovom gora, počutili smo se prešerno.

Mi, ki nam je življenje kot poseben dar naklonilo poklicno in prijateljsko povezanost z magistro Stanko Černe, jo bomo zelo pogrešali. Slutiti je dala, da zbrano in brez posebnega napora združuje v sebi skrb za potrebne vsakdanje dobrine, intelektualne sposobnosti za strokovno delo, da zna najti uteho v naravi, da se plemeniti ob umetnosti, da spoštuje vse dobro, kar so dosegli rodovi pred nami.

Pri zadnjem slovesu od pokojnice smo zaman pričakovali omembo njene študijske in poklicne poti. Podpisani se zato posebej zahvaljujemo uredništvu Farmaceutskega vestnika, da nama je omogočilo popraviti ta dolg in vsaj v pisni obliki razgrniti prispevek magistre Černe h klinični biokemiji v jeseniški bolnišnici in širše. Misel in pero je vodil spomin na notranjo lepoto njene osebnosti, zato se ni čuditi, da sva se pri pisanju nehote zazrli nekoliko globlje.

*Ivica Avberšek-Lužnik, Marta Kramberger*



Vljudno vabljeni na strokovno srečanje:

# Nevarnosti ponarejenih zdravil

*Kako jih prepoznati in se jim uspešno izogniti*

- Lani so na mejah Evropske Unije zasegli 4,6 milijarde škatlic ponarejenih zdravil.
- Ponarejevalci zdravil vsako leto zaslužijo več kot 40 milijonov evrov.
- Na Afriškem in Azijskem tržišču je 60 odstotkov zdravil, ki so na voljo, ponarejenih.
- Svetovna zdravstvena organizacija opozarja, da je polovica zdravil, ki so dostopna na internetu, vprašljive kakovosti.
- V enem letu se je promet s ponarejenimi zdravili povečal za 384 odstotkov.
- Število ponaredkov vsako leto nevarno narašča, vzporedno z njimi tudi primeri zastrupitev, obolenj in celo smrti.

Slovenski in tuji strokovnjaki bodo v **četrtek, 27. novembra ob 18. uri, v hotelu Lev** spregovorili o razsežnostih ponarejenih zdravil, regulatornih vidikih in najpogostejših primerih ponarejanja.

Veselimo se vašega obiska!

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



izr. prof. dr. Stanislav Gobec  
dekan Fakultete za farmacijo



Barbara Kosler, mag.farm.  
direktorica podružnice



## Navodila avtorjem

**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 zaščitenih 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, kar pomeni, da bodo avtorji oddali najmanj dve verziji besedila:

- prvo verzijo, ki jo uredništvo pošlje najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno in
- končno verzijo.

Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmaceutskem vestniku je zagotovljena tajnost.

### Prva verzija

Predstavljajo jo:

- trije, na papir natisnjeni izvodi prispevka, na katerih avtorji niso imenovani, slike in preglednice pa so vključene v besedilo, ter
- prispevek v elektronski obliki.

Avtorji strokovnih člankov priložijo lastnoročno podpisano spremeni dopis z naslednjimi podatki:

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi inštitucij, v katerih so zaposleni,
- telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe ter
- izjavo, 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. Rokopisi strokovnih člankov lahko obsegajo največ **20.000** znakov, vključno s presledki, obseg prispevkov za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja je 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.

### Vsebina

naj bo sistematično strukturno urejena in **razdeljena na poglavja**. Izvirni raziskovalni članki naj imajo najmanj naslednja poglavja:

- Uvod,
- Materiali in metode,
- Rezultati in razprava,
- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed) in največ 5 ključnih besed v slovenskem in angleškem jeziku
- poglavje Sklep
- poglavje Literatura
- Kazalo vsebine, takoj za povzetkom in ključnimi besedami.

### Besedilo

(Times New Roman 12, razmik vrstice 1,5) naj bo obojestransko poravnano.

### Slike in preglednice

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

### 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.

### 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.

### Končna verzija

Avtor strokovnega članka prejme po opravljenem recenzijem postopku najmanj dve strokovni oceni in navodila glede sprejetja v objavo in potrebnih popravkov. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva upošteval in **najkasneje dva tedna po prejetju recenzij** poslal popravljen prispevek v elektronski obliki ter eno natisnjeno verzijo besedila na naslov glavne urednice.

### Slike

morajo biti shranjene v ustreznem slikovnem formatu (zaželeno v jpg, bmp), tudi v natisnjeni verziji je potrebno slikovni material priložiti ločeno od besedila, oštevilčeno in označeno s pripadajočimi podnapisi. Fotografije morajo biti posnete z visoko ločljivostjo, najmanj 250 do 300 dpi, v enakih velikostih, kot jih avtor želi objaviti oz. prilagojene obliki revije.

### Naslov prispevka

(v slovenskem in angleškem jeziku) in **naslovi** poglavij in podpoglavij naj bodo napisani krepko, vendar z malimi črkami (kakor v stavku). V končni verziji morajo biti pod naslovom prispevka v slovenskem in angleškem jeziku napisana **polna imena vseh avtorjev** brez nazivov. Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni, je potrebno navesti ločeno na prvi strani. Elektronska in natisnjena verzija morata biti identični.

### Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v pisni in elektronski obliki avtorji **pošljejo na naslov:**

**dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.**  
glavna urednica Farmaceutskega vestnika  
Tacenska 133 A, 1000 Ljubljana  
e-pošta: [andrijana.tivadar@telemach.net](mailto:andrijana.tivadar@telemach.net)

### 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 na zgoraj navedi naslov.

**Prvi avtor prejme** tri izvode Farmaceutskega vestnika brezplačno. Članki so objavljeni tudi na spletni strani: [www.sfd.si](http://www.sfd.si) v pdf obliki.