

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 2 • J U L I J 2 0 0 5 • L E T N I K 5 6

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

Boštjan Debeljak

Darja Frankič

Mirjana Gašperlin

Mojca Kerec

Mateja Malešič

Robert Pišek

Magda Zimic

Naslov uredništva / Adress of the Editorial Office:

Farmaceutski vestnik, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana,

telefon/phone: 386 1 476 95 00

Farmaceutski vestnik izdaja Slovensko farmacevtsko društvo,

Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja štirikrat letno.

Letna naročnina je 15.000 SIT, za člane SFD je vključena v članarino.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Avtor fotografije na naslovnici, Silvo Koder

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 2900 izvodov

Letnik 2005 sofinancira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS

Farmaceutski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published quarterly by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 15.000 SIT other countries US\$ 100.

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

Spoštovana bralka, cenjeni bralec!

Kljub poletju, ko običajno posežemo po lahkotnejšemu branju, ponuja druga številka FV obilo zanimivih strokovnih člankov in novic iz sveta farmacije. Tako se lahko seznanimo z uporabo primarnih celičnih linij hepatocitov pri preiskovanju delovanja novih zdravilnih učinkovin, predvsem z vidika metabolizma. V zadnjem desetletju postaja čedalje bolj jasno, da se metabolizem zdravilnih učinkovin v telesu razlikuje od posameznika do posameznika. Prej ali slej bomo zaradi racionalizacije morali poseči po individualiziranemu odmerjanju in zdravljenju, zato so študije, ki razjasnjujejo molekularne mehanizme delovanja in razgradnje zdravil, še kako potrebne in zaželjene. Nekako v istem smislu je napisan tudi članek o določanju mutagenega potenciala snovi na celični liniji mišjega limfoma. Tudi na področju malignomov in raka, sproženega z mutageni, spoznavamo, da z zdravili današnjega časa podaljšujemo predvsem starost, žal pa ne tudi mladosti. Zaradi tega je človeški organizem toliko dalj časa izpostavljen vsem mogočim mutagenom, kar lahko vodi do razvoja malignih obolenj. Z drugimi besedami, človeštvo v povprečju ni nič bolj bolno, kot nekoč, le drugi bolezenski znaki se izrazijo, v odvisnosti od daljše življenjske dobe posameznikov.

Prav tako si lahko preberemo o encimih in hormonih, ki sodelujejo pri nastanku porfirinov, pomembnih za laboratorijsko diagnostiko in obnem v »novičkah« izverno, da je minilo 100 let od uvedbe besede hormon. Novice iz sveta farmacije prav tako prinašajo pregled najbolj prodajanih humanih zdravil v obdobju 2002 do 2004. Na področju sinteznih zdravil prednjačijo statini, kar le potrjuje zgoraj navedena dejstva o zdravilih, ki podaljšujejo zrelo starostno obdobje, med rekombinantnimi zdravili pa je daleč najboljše prodajano zdravilo eritropoetin. Ali je švedski monopol prodaje zdravil v nasprotju z evropskih pravom in proti uvajanju svobodne konkurence? Pri branju tega članka boste nehote naredili primerjavo s stanjem v Sloveniji. Ali je zato smotno, da odpiramo vrata pri prodaji zdravil brez recepta tudi nestrokovnjakom? Novi predlog Zakona o zdravilih, ki je ravnokar v javni obravnavi, se temu nezadržno približuje. Ali nismo le farmacevti »gospodarji zdravil«? Koliko več odstotkov neželenih učinkov bo, z zdravstvenega in ekonomskega vidika, zaradi sprejetja za stroko nedorečenih pravil in smernic? Berimo, razmislimo in ukrepajmo. Tudi zato smo farmacevti.

*Odgovorni urednik
prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.*

Vsebina

Borut Štrukelj Beseda odgovornega urednika	101
<hr/> <i>Pregledni članki – Review Articles</i> <hr/>	
Tina Batista Napotnik, Irena Mlinarič-Raščan Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil <i>The use of primary hepatocyte cultures in drug discovery and development</i>	103
Stane Srčič (doktorska disertacija Mile Božič) Obvladovanje kakovosti in uspešnosti v farmacevtski proizvodnji z uporabo modela poslovne odličnosti	108
Branka Rozman, Saša Baumgartner, Mirjana Gašperlin Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemi <i>Interactions between xanthan and locust bean gum in water systems</i>	109
Andreja Plaper Določanje mutagenega potenciala snovi na celični liniji mišjega limfoma <i>The mouse lymphoma mutagenicity assay (MLA)</i>	115
Janez Mravljak, Barbara B. Byrne Habič, Slavko Pečar Dušikov oksid III: zaviralci prekomernega nastajanja <i>Nitric oxide III: inhibitors of excessive formation</i>	120
Stane Srčič (doktorska disertacija Roka Dreua) Izdelava pelet z različnimi granulacijskimi tekočinami in upliv hidrodinamskih razmer v Wursterjevi komori na učinkovitost filmskega oblaganja	124
Ljuba Krnjak, Milan Skitek Pomembnost porfirinov v laboratorijski diagnostiki <i>Importance of porphyrins in laboratory diagnostics</i>	125
<hr/> <i>Strokovni članki – Professional Articles</i> <hr/>	
Janja Bedrač Švedski monopol prodaje zdravil nasproten evropskemu pravu – kaj pa slovenska ureditev?	131
Zanimivosti iz stroke	133
Martina Cvelbar Poročilo s srečanj uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev Novice iz sveta farmacije	
<hr/> <i>Iz društvenega življenja</i> <hr/>	
Jelka Dolinar: Simpozij ob 30. skupščini SFD 137 Silvo Koder: Poročilo z 10. kongresa Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov(EAHP) Tajda Gala Miharija: Poročilo z generalne skupščine Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov (EAHP) Julijana Kristi: Poročilo o 1st PharmSciFair & Exhibition Marija Brenčič: Izlet seniorjev v Furlanijo Julijsko krajino Zdenko Taušič: Farmacevtsko-botanična ekskurzija na Slavnik	137

Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil

The use of primary hepatocyte cultures in drug discovery and development

Tina Batista Napotnik, Irena Mlinarič-Raščan

POVZETEK: Celične kulture jetrnih celic (hepatocitov) uporabljamo v predkliničnih študijah novih zdravilnih učinkovin kot vmesni člen med biokemičnimi in *in vivo* poskusi. *In vitro* modeli so enostavni, dajo hitre rezultate v strogo nadzorovanih pogojih, omogočajo dobro ponovljivost in lahko kvantifikacijo. Tako dobimo številne informacije o molekularnem mehanizmu, biotransformaciji, farmakokinetiki in toksičnosti preiskovanih snovi ter zmanjšamo število žrtvovanih živali in prostovoljcev v kliničnih testiranjih. Z uporabo primarnih človeških hepatocitov lahko ugotavljamo tudi dejavnike starosti, spola in okolja ter individualne razlike v odzivanju na učinkovine. Ker so primarni človeški hepatociti težko dostopni, celice različnih darovalcev shranjujemo z zamrzovanjem. Hepatocitne celične linije imajo sposobnost delitve celic in so tako na voljo v neomejenem številu, vendar pa so fenotipske lastnosti slabše izražene kot v primarnih hepatocitih, zato je treba biti pazljiv pri interpretaciji rezultatov.

KLJUČNE BESEDE: jetra, hepatocit, celična kultura, celična linija, predklinične študije

ABSTRACT: Cultured hepatocytes are used in preclinical studies of drugs as a link between biochemical and *in vivo* assays. The *in vitro* models are simple, with quick acquisition of data in a highly controlled environment. The data can easily be quantified and reproduced. Primary hepatic cultures are suitable for investigating molecular mechanisms, the biotransformation, the pharmacokinetics and the toxicity of novel compounds, therefore the number of laboratory animals and volunteers in clinical trials can be reduced. Primary human hepatocytes are used to study the effects of age, sex and environment factors, and the interindividual variability in response to drugs. Human hepatocytes are very scarce thus the cells derived from the different donors are cryopreserved. Hepatic cell lines are immortalized and therefore available at a large number of cells, but the expression of hepatic functions is lower than in primary hepatocytes so the prediction to *in vivo* data is always prone to some degree of uncertainty.

KEY WORDS: liver, hepatocyte, cell culture, cell line, preclinical studies

1 Uvod

Odkrivanje in optimizacija novih zdravilnih učinkovin zahteva hitre in ponovljive teste. V predkliničnih študijah se je tako pojavila nova stopnja testiranja – uporaba *in vitro* modelov (1).

Biotransformacija ksenobiotikov ima posledično terapevtske ali pa toksične učinke. Proces biotransformacije sicer poteka v različnih tkivih, vendar so jetra najaktivnejši organ pri določanju usode ksenobiotikov. Z razvojem metod izolacije in kultivacije parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) je mogoče v strogo nadzorovanih *in vitro* pogojih ugotavljati mehanizme učinkovanja in biotransformacije snovi na celičnem in molekularnem nivoju (2).

Med *in vitro* modele jeter štejemo očiščene jetrne frakcije in enoenčimske sisteme, izolirane jetrne celice in hepatocitne celične kulture, jetrne rezine, pretočne sisteme celotnih izoliranih jeter in računalniške modele. Prednosti in slabosti *in vitro* modelov jeter so zbrane v preglednici 1. Najpogosteje uporabljamo izolirane in kultivirane hepatocite (1, 3, 4), ki delujejo kot vmesni člen med biokemičnimi in *in vivo* poskusi. Čeprav *in vitro* modeli ne morejo v celoti nadomestiti *in vivo* poskusov, imajo pred njimi številne prednosti. Modele hitro postavimo, mogoče jih je avtomatizirati, dajo hitre rezultate, pogoje lahko strogo nadzorujemo, omogočajo dobro ponovljivost in lahko kvantifikacijo, so ekonomični. Izločimo tudi živčne dejavnike ter

dejavnike krvnega obtoka. Tako dobimo številne koristne informacije o delovanju, biotransformaciji, farmakokinetiki in toksičnosti preiskovanih snovi. Zmanjšamo tudi število žrtvovanih živali in prostovoljcev v kliničnih testiranjih ter lažje določimo primerno živalsko vrsto za *in vivo* testiranja. Vse to pa omogoči racionaliziracijo in pospešitev selekcije testiranih potencialnih farmakoloških molekul (1, 3, 4).

2 Primarni hepatociti

2.1 Izolirani hepatociti

V 50. in 60. letih prejšnjega stoletja, v času bliskovitega razvoja celičnih kultur, so poskušali izolirati tudi glodalske jetrne celice in sicer z mehanskim delovanjem na jetrno tkivo. Metode so bile neuspešne, ker so hepatociti v tkivu trdno speti s stičnimi kompleksi (5). Šele encimatske tehnike so dale vzpodbudne rezultate: z *in situ* perfuzijo jeter z raztopino kolagenaze so učinkovito izolirali tudi do 50 % celic podganjih jeter (6). Metodo so kasneje izpopolnjevali in danes izoliramo hepatocite z dvostopenjsko *in situ* perfuzijo jeter: jetra najprej perfundiramo s pufrom, ki vsebuje kelator EGTA, ki odstrani kalcijeve ione in tako razbije od kalcija odvisne medcelične povezave in sicer poruši strukturo kadherinov. Sledi perfuzija z raztopino kolagenaze, ki razgradi zunajcelični matriks v nekaj minutah (7). Metoda je bila prirejena tudi za druge živali pa tudi za človeka (8, 9, 10).

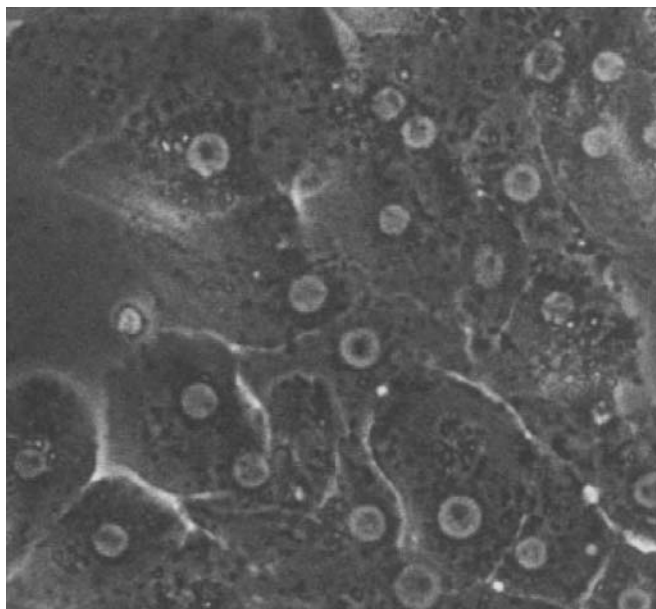
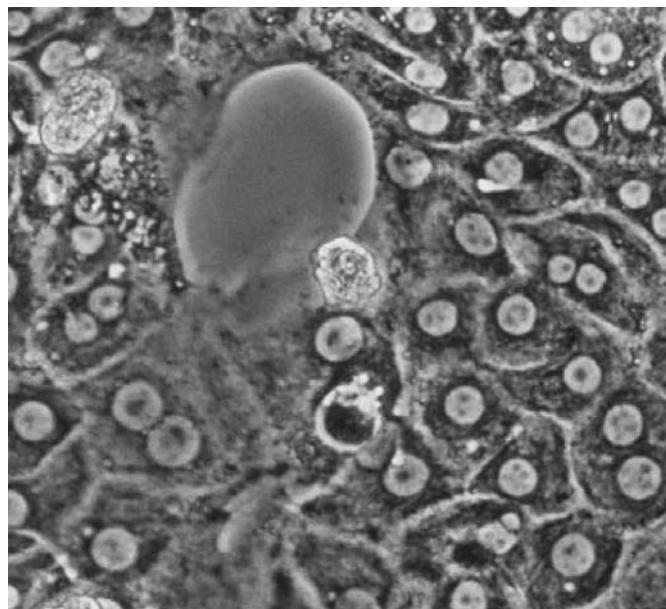
Izolirani hepatociti v suspenziji obdržijo večino metabolnih funkcij, sistem je tehnično nezahteven in omogoča dostop preiskovanih molekul do vseh celic. Slabost modela je kratkotrajna uporaba, saj celice lahko uporabljamo za preiskave le 2-4 ure, nato prične aktivnost jetrnih encimov in viabilnost celic močno upadati (3, 4).

2.2 Primarna kultura jetrnih celic

Za daljše raziskave moramo hepatocite gojiti v celični kulturi. S centrifugiranjem pri nizkem številu obratov (50 g) odstranimo neparenhimatske celice (endotelne, Kupfferjeve, stelatne celice in celice NK), v suspenziji ostanejo le hepatociti, ki vršijo veliko večino jetrnih funkcij (11). Hepatociti rastejo pritrjeni na podlago v posodicah, prevlečenih s kolagenom, v gojišču William's z 10 % telečjega seruma pri 37 °C in 5 % CO₂/95 % zraka (6). Celice po nasaditvi v posodice potrebujejo nekaj časa, da si opomorejo od šoka zaradi izolacije, zato pričnemo s poskusi najmanj 24 ur po nasaditvi (12). Celice se v kulturi ne delijo, zato jih nasadimo v visoki koncentraciji, da dosežejo konfluentnost – se staknejo med seboj (3) (slika 1).

Celice v kulturi zadržijo veliko večino jetrnih funkcij, kot jih vršijo *in vivo*: presnavljajo ogljikove hidrate, sečnino, lipide, žolčne kisline, sintetizirajo plazemske proteine, se odzivajo na hormone in vršijo biotransformacijo oziroma razstrupljanje snovi z encimi I. in II. stopnje in so zato primeren model za raziskave številnih bioloških učinkovin (2). Tako lahko ugotovljamo mehanizme delovanja preiskovanih snovi v različnih koncentracijah (3). Ker so kulture enostavnejši sistem od organizmov, lažje preučujemo interakcije med zdravili (13, 14).

Encimi biotransformacije v kultiviranih jetrnih celicah so aktivni, zato lahko z njimi ugotovljamo presnovo potencialnih zdravil (3, 15). To je za razvoj učinkovine zelo pomembna stopnja, saj presnova učinkovine vpliva na očistek in odstranjevanje zdravila iz telesa, klinično učinkovitost, individualne farmakokinetične razlike, različno koncentracijo na tarčnem mestu in toksičnost zdravila (2). Ugotovili so, da se večina snovi v kulturi podobno presnavlja kot *in vivo* – glavne presnovke najdemo v obeh sistemih, pogoste pa so razlike v



Slika 1: Fazno-kontrastna mikrofografija primarnih hepatocitov v kulturi. Levo: podganji hepatociti, desno: človeški hepatociti. 200-kratna povečava, merilo: 25 μm (35).

Figure 1: Phase-contrast micrograph of primary cultured hepatocytes. Left: rat hepatocytes, right: human hepatocytes. 200x magnification, bar: 25 μm (35).

Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil

Preglednica 1: In vitro modeli jeter, njihove prednosti in slabosti. Povzeto po: 1, 3, 4.

Table 1: In vitro liver models, their advantages and disadvantages. Summarized from: 1, 3, 4.

Model	Prednosti	Slabosti
Celične frakcije (mikrosomi, mitohondriji) in enoenzimski sistemi	Molekularni mehanizmi, izolirani encimski sistemi	Odsotnost citosolnih encimov, kratkotrajnost
Izolirane jetrne celice v suspenziji	Funkcije podobne <i>in vivo</i> celicam, tehnično nezahteven, lahka dostopnost preiskovanih molekul do vseh celic, možnost krioprezerviranja, medvrstne raziskave	Kratkotrajnost (2-4 ure), ni žolčnih kanalčkov
Primarne kulture hepatocitov	Funkcije ohranjene več dni, raziskava procesov biotransformacije, medvrstne raziskave	Pod standardnimi pogoji omejeno trajanje (nekaj dni), fenotipične spremembe, ni celičnih delitev
Hepatične celične linije	Neomejeno število (nesmrtno – se delijo), številne jetrne funkcije ohranjene	Jetrne funkcije manj izražene kot v normalnih hepatocitih, nekatere celo odsotne
Jetrne rezine	Ohranjena lobularna struktura, dostopni humani vzorci	Kratkotrajnost (do 10 ur), celice niso enakomerno funkcionalne, zbiranje žolča ni mogoče
Pretočni sistemi celotnih izoliranih jeter	Podobno <i>in vivo</i> stanju, 3D struktura, funkcionalni žolčni kanalčki, mogoče zbiranje žolča, kinetične študije	Tehnično zahteven model, kratkotrajnost (nekaj ur), preiskovanje več snovi ni možno, človeški organi niso dostopni
Računalniški modeli	zmanjšamo število prostovoljcev in poskusnih živali	Ne moremo predvideti vseh okoliščin poskusa

količini posameznih produktov (13, 14, 17). Podobno kot *in vivo* lahko tudi v kulturi z induktorji in inhibitorji spreminjamo aktivnost citokromov P450. Tako ugotavljamo, kako preiskovane snovi vplivajo na presnovo drugih ksenobiotikov (15, 16). V kultiviranih hepatocitih se ohranijo tudi encimi II. stopnje biotransformacije, ki vršijo konjugacijo različnih skupin na izhodne produkte redoks reakcij I. stopnje biotransformacije (2).

Problem potencialnih zdravil so običajno nepredvideni stranski učinki, ki so toksični za različna tkiva in organe. Najpogostejša tarča so običajno jetra, saj hepatotoksičnost velikokrat povzročijo produkti biotransformacije (1, 3). Biotransformacija je običajno detoksifikacijski proces, včasih pa presnovki zdravil postanejo bolj toksični kot osnovna učinkovina, npr. številni intermedijati so elektrofilni in nepovratno alkilirajo celične makromolekule, kar vodi v poškodbe tkiva (1, 2). S pomočjo različnih kvalitativnih in kvantitativnih metod lahko s hepatocitnimi kulturami ugotavljamo toksične vplive preiskovanih snovi na delovanje jetrnih celic (sintezo DNA in proteinov, na homeostazo kalcija, znotrajcelični K^+ , vsebnost ATP in AMP, nivo glutationa, glukoneogenezo, ureagenezo, sintezo holesterola in lipoproteinov, sintezo in sekrecijo albumina, serumske encime, transport konjugiranih žolčnih kislin in bilirubina, membranski transport, iztekanje citosolnih encimov ob poškodbi membrane), spremembe morfologije celic (na citoskelet, celični volumen, celično membrano), genotoksičnost (poškodbe DNA, formacija adduktov z DNA, spremembe popravljanih mehanizmov), celično smrt (nekrozo, apoptozo) (1, 3). Kulture so tudi zelo uporabne za določanje kemoprotektivnih sredstev, ki jetra oziroma organizem zaščitijo pred škodljivimi vplivi učinkovin (16).

Kot vse metode imajo tudi primarne kulture jetrnih celic svoje slabosti. Največja je ta, da izražanje specifičnih jetrnih funkcij s časom upada, kar vodi v fenotipske spremembe hepatocitov in v dediferenciacijo (3). Tudi aktivnosti encimov družine citokromov P450 (CYP450) v primarnih hepatocitih s časom upadajo. Vzrok je v zmanjšanem prepisu CYP mRNA, zato je v celicah vse manj encimov in celotna CYP450 aktivnost v celici upade (2, 15).

Na ohranjanje specifičnih jetrnih funkcij vplivajo štiri skupine dejavnikov: topni dejavniki gojišča, zunajcelični matriks, interakcije med celicami in dejavniki replikacije (2). S spreminjanjem teh dejavnikov so razvili tehnike gojenja hepatocitov, ki vzdržujejo funkcionalnost dlje časa. Zelo uspešno je gojenje hepatocitov v kokulturi, torej skupaj z drugo vrsto celic, npr. linijskimi epitelnimi, strelatnimi in drugimi neparenhimskimi jetrnimi ter celo nehepatičnimi celicami (18). Te celice sproščajo v kulturo snovi, ki omogočijo okolje, ki bolje posnema pogoje *in vivo*, zato hepatociti aktivneje vršijo specifične funkcije. Drugi način je tridimenzionalna kultura v obliki kolagenskega sendviča ali sferoidov, ki lahko vsebujejo tudi druge celice. V teh kulturah hepatociti zadržijo tridimenzionalno kuboidalno obliko, kar vpliva tudi na izražanje jetrnih funkcij (19). Med celicami nastanejo celo žolčni kanalčki (12).

2.3 Primarna kultura človeških jetrnih celic

Najpogosteje uporabljamo podganje hepatocite, saj je njihova izolacija in kultivacija najlažje izvedljiva in podganja jetra so relativno lahko dostopna. Napovedovanje učinkov biološko aktivnih snovi na človeka na osnovi raziskav na poskusnih živali pa je zaradi medvrstnih razlik vedno pod-

vrženo določenemu tveganju. Zato so za preučevanje potencialnih zdravilnih učinkovin primernejši hepatociti humanega izvora. Pridobimo jih lahko s perfuzijo celih ali dela jeter darovalcev organov, iz ostankov terapevtskih hepatektomij ali manjših kirurških biopsij (2). Perfuzija je prav tako dvostopenjska, uporabljamo kolagenazo, lahko pa tudi druge encime (npr. dispazo, liberazo), metode pa so precej uspešne, saj je viabilnost celic nad 85 % (2) (slika 1).

Tudi človeški hepatociti v kulturi zadržijo večino jetrnih funkcij. So celo bolj stabilni kot glodalski, saj svojo diferenciranost ohranjajo dlje časa (nekaj tednov) (17). Za daljšo funkcionalnost pa jih moramo tako kot živalske gojiti v ko-kulturah ali tridimenzionalnih kulturah (19).

Primarni človeški hepatociti veljajo danes za zlati standard preučevanja metabolizma človeških jeter. Primerni so za raziskave biotransformacije zdravil (prek CYP450 in encimov II. stopnje), saj obstaja dobra povezava metabolizma *in vitro*/*in vivo* (13, 17). Ksenobiotiki se v človeških jetrih v I. stopnji biotransformacije pretvarjajo predvsem s citokromom P450 3A4, pa tudi z 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6 in 2E1, ti pa so v kultiviranih celicah dobro izraženi (2). Njihova aktivnost tudi v človeških hepatocitih upada s časom. Nekateri CYP450 encimi (CYP3A4, CYP2C9 in CYP 2D6) po 72-96 urah kulture aktivnost obnovijo, drugi (CYP1A2, CYP2E1) pa ne (2). To je tudi razlog, da imajo transformirane spojine podobne metabolne profile kot *in vivo*, razlikujejo pa se kvantitativno (13, 14, 17). Drugi razlog za kvantitativne razlike je sistemski: *in vivo* se učinkovina lahko slabo absorbira ali pa se veže na molekule v drugih tkivih, torej ne doseže jeter v tolikšni koncentraciji kot jetrne celice v kulturi (20).

Primarne človeške hepatocite v kulturi uporabljamo tudi za študije molekularnih mehanizmov, toksičnosti, biokinetike in interakcije med zdravili. Ugotavljamo lahko dejavnike starosti, spola in okolja (13, 14). Pomembni so pri ugotavljanju individualnih razlik v odzivanju na učinkovine, saj obstaja veliko genetskih polimorfizmov genov, ki se izražajo v jetrih (21, 22). Največje razlike so opazne v družini citokromov P450, kar lahko precej vpliva na presnovo snovi in tako na potek zdravljenja (13, 22). Preučujemo lahko tudi idiosinkratično (nenačrtovano) hepatotoksičnost, pri kateri so prizadeti le redki posamezniki, verjetno pa je povezana z neobičajno presnovo ali imunoalergijskim fenomenom (3, 23).

V metabolizmu vsake snovi lahko obstajajo kvalitativne ali kvantitativne razlike med živalskimi vrstami in človekom. S primerjavo učinkov na celice različnega izvora lahko določimo živalski model, ki bo deloval podobno kot človeške celice, torej je najprimernejši za nadaljnje raziskave (13).

2.4 Zamrzovanje hepatocitov

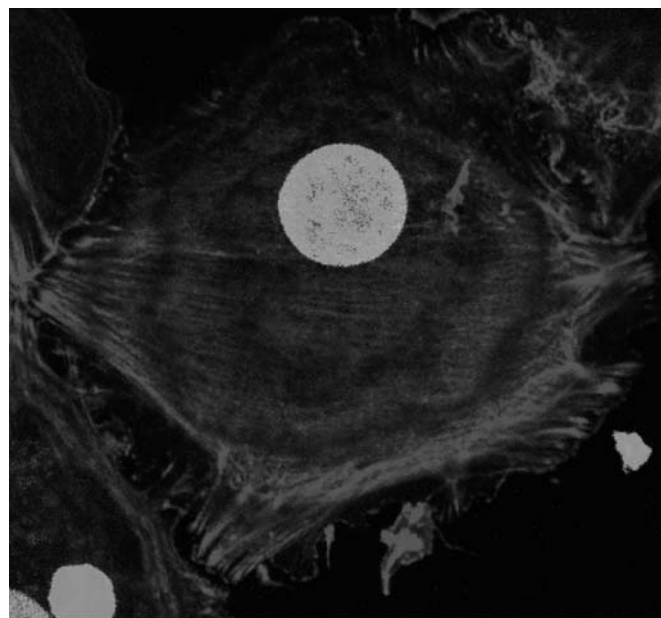
Največji problem pri vzpostavitvi primarne kulture človeških hepatocitov je legalna in etična omejenost dostopa do človeških celic. Potrebna je tudi vsakokratna izolacija svežih celic, ker je kultura kratkotrajna in se celice v njej ne delijo. Pri vsaki izolaciji dobimo veliko število celic, ki jih običajno sproti ne moremo porabiti, zato je priporočljivo celice shraniti. Z metodo zamrzovanja je to možno. Kritični elementi za uspešno zamrzovanje hepatocitov so protokol zamrzovanja, izbira krioprotektivnega sredstva in odstranitev mrtvih celic po odmrzovanju. Izolirane hepatocite v suspenziji moramo zamrzniti v krioprotektivnem sredstvu, običajno je to 10 % DMSO, z nadzorovano hitrostjo zamrzovanja (-1,9 °C/min od +4 do -30 °C ter -30 °C/min od -30 °C do -150 °C) (8, 9). Celice nato prenesemo v tekoči dušik, kjer jih lahko obdržimo tudi več let. Odmrzovanje pa mora potekati čim hitreje, v vodni kopeli na 37 °C, hitro tudi odstranimo DMSO (8, 9).

Proces zamrzovanja in odtajanja celic sicer zmanjša njihovo viabilnost, predvsem zaradi poškodb celične membrane, vpliva na membranski transport in sintezo proteinov (24). Vendar pa so z izboljševanjem metode dosegli, da po odmrzovanju celice vršijo svoje funkcije skoraj v enaki meri kot sveže izolirane (25). Torej je zamrzovanje priporočljivo za vzpostavljanje banke hepatocitov, izoliranih iz različnih pacientov ali živalskih vrst, ki so primerni za raziskave. To nam omogoča ugotavljati individualne razlike v enem samem poskusu.

3 Celične linije

Alternativa težko dostopnim primarnim hepatocitom so jetrne celične linije. Njihova prednost je v tem, da se delijo in so zato na voljo v neomejenem številu. Hepatocitne linije so pridobili na več načinov: 1.) iz primarnih tumorjev jeter [humani liniji Hep G2 (26) in Mz-Hep-1 (27), podganja H4IIE (28)], 2.) SV40-transformirani normalni primarni hepatociti [humani liniji THLE-2 in THLE-3 (29)], 3.) iz embrionalnih jetrnih celic [mišja linija BNL CL.2 (30)], 4.) iz TGF- α transgenih miši [linija AML12 (31)] in 5.) s fuzijo dveh različnih tipov celic [hibrid fibroblastov in hepatomskih celic WIF12-1 (32)].

Slabost hepatocitnih linij je v tem, da so fenotipske lastnosti jetrnih celic slabše izražene, zato se lahko na ksenobiotike odzivajo drugače kot primarni hepatociti. V raziskavah največkrat uporabljamo linijo Hep G2, ki izvira iz hepatocelularnega karcinoma (26). To je precej



Slika 2: Laserska konfokalna fluorescenčna mikrografija primarnega človeškega hepatocita, 3 ure po dodatku 50 nM mikrocinista-LR. Aktinski filamenti (rdeče) začenejo potovati proti središču celice, jedro se krči. Aktinski filamenti so označeni z rodamin faloidinom (rdeče), jedro pa s Sytox Green (zeleno). Merilo: 5 μ m (34, 35).

Figure 2: Laser-scanning confocal fluorescent micrograph of primary human hepatocyte, the cells were treated with 50 nM microcystin-LR for 3 hours. Actin filaments (shown in red) start to move towards the center of the cell, the nucleus condense. Actin filaments are stained with rhodamine-phalloidin (red) and nuclei with Sytox Green (green). Bar: 5 μ m (34, 35).

stabilna celična linija, ki izraža 96 % genov primarnih hepatocitov in vrši številne jetrne funkcije (23, 26).

Vrši tudi številne procese biotransformacije I in II stopnje, vendar v manjši meri kot primarni hepatociti (23). Aktivnost citokromov P450 v celicah je precej nižja kot v primarnih, CYP 2E1 je celo nezaznaven. Vzrok je manjše prepisovanje mRNA, kar je posledica nižjega nivoja transkripcijskih faktorjev v hepatičnih linijah (15). Zaradi odsotnosti CYP 2E1 in alkoholdehidrogenaze je linija Hep G2 odporna proti citotoksičnim in lipogenim učinkom etanola (23). Celice Hep G2 so idealen model za študije mitohondrijske toksičnosti zaradi velikega števila mitohondrijev in mitohondrijske DNA (33).

Hepatične linije uporabljajo v številnih študijah, vendar se moramo ves čas zavedati, da drugačne aktivnosti encimov v linijah lahko privedejo do razlik v odgovoru na preiskovano učinkovino, zato je potrebna pazljivost pri interpretaciji rezultatov (23).

4 Primer uporabe hepatocitov v toksikologiji

Primarni hepatociti v kulturi so zelo primerni za študij toksičnih vplivov na celičnem in biokemičnem nivoju. Primer uporabe je ugotavljanje učinkov mikrocistinov (cianobakterijskih hepatotoksinov) na obliko celic, citoskelet in jedra, sprožanje apoptoze in aktivnost citokroma P450 1A. Ugotovili smo, da mikrocistini v primarnih podganjih in človeških hepatocitih povzročajo skrdčenje in brstenje celic, prerazporeditev aktinskih filamentov v središče celice, kar je posledica sprožitve apoptoze. Uporabljali smo laserski konfokalni mikroskop, kjer smo opazovali fluorescenčno označene hepatocite (slika 2). Pri tem se aktivirajo kaspaze, vendar je vzorec aktivacije kaspaz pri podganjih in človeških hepatocitih drugačen. Človeški hepatociti so tudi bolj občutljivi na delovanje mikrocistinov, kar moramo upoštevati pri napovedovanju rezultatov z živalskih modelov na človeka. Uporaba hepatocitov več pacientov pa nam je omogočila ugotavljanje razlik med posamezniki (34, 35).

5 Zaključek

Celične kulture ne morejo nadomestiti raziskav na živalih in prsto-voljcih, dajo pa nam veliko koristnih informacij o presnovi zdravil na celičnem in molekularnem nivoju. Z uporabo kultur v predkliničnih študijah delujemo etično, saj zmanjšamo število poskusnih živali in prostovoljcev v kliničnih poskusih, in gospodarno, ker zmanjšamo število napačnih odločitev v razvoju zdravil. Za doseganje čim boljših rezultatov pa bo še naprej potrebno izboljševati hepatocitne kulture, predvsem v smeri čim boljšega posnemanja *in vivo* celice, ter razviti hepatično celično linijo z visoko izraženimi jetrnimi funkcijami.

6 Zahvala

Delo s primarnimi podganjami in človeškimi hepatociti je bilo opravljeno na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Dušana Šuputa, ter v laboratoriju INSERM v Antibesu v Franciji pod mentorstvom prof. dr. Rogerja Rahmanija. Obema se iskreno zahvaljujem.

7 Literatura

1. Davila JC, Rodriguez RJ, Melchert RB et al. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 63-96.
2. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV et al. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2003; 4: 292-312.
3. Guillouzo A, Morel F, Langouët S et al. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. *J Hepatol* 1997; 26: 73-80.
4. Cross DM, Bayliss MK. A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metab Rev* 2000; 32: 219-240.
5. Berry MN, Simpson FO. Fine structure of cells isolated from adult mouse liver. *J Biol Chem* 1962; 15: 9.
6. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
7. Williams GM, Bermudez E, Scaramuzzino D. Rat hepatocyte primary cell cultures III: Improved dissociation and attachment techniques and the enhancement of survival by culture medium. *In Vitro* 1977; 13: 809-817.
8. de Sousa G, Dou M, Barbe D et al. Freshly isolated or cryopreserved human hepatocytes in primary culture: Influence of drug metabolism on hepatotoxicity. *Toxic in Vitro* 1991; 5: 483-486.
9. Dou M, de Sousa G, Lacarelle B et al. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology* 1992; 29: 454-469.
10. Freshney RI. *Liver. In: Culture of animal cells. A manual of basic technique*, 4th ed. New York: Chichester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto: Wiley-Liss, 2000: 357-358.
11. Quistorff B, Dich J, Grunnet N. Preparation of isolated rat liver hepatocytes. In: Pollard JW, Walker JM. *Animal cell culture*. Clifton, New Jersey: Humana press, 1990; 151-160.
12. Puviani AC, Ottolenghi C, Tassinari B et al. An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential use of isolated liver cells. *Comp Biochem Physiol, Part A* 1998; 121: 99-109.
13. Rahmani R, de Sousa G, Marre F et al. Potential of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes in drug research and development. In: Rogiers V, Sonck W, Shepherd E et al. *Human cells in *in vitro* pharmacotoxicology. Present status within Europe*. Brussel: Vub press, 1993: 117-138.
14. de Sousa G, Florence N, Valles B et al. Relationships between *in vitro* and *in vivo* biotransformation of drugs in humans and animals: pharmacotoxicological consequences. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11: 147-153.
15. Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 2002; 32: 505-520.
16. Guillouzo A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 511-532.
17. Guillouzo A, Morel F, Fardel O et al. Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 1993; 82: 209-219.
18. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML et al. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999; 13: 1883-1900.
19. Chen HL, Wu HL, Fon CC et al. Long-term culture of hepatocytes from human adults. *J Biomed Sci* 1998; 5:435-440
20. Fautrel A, Chesné C, Guillouzo A et al. A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat hepatocytes: tentative correlation between *in vitro* toxicities and *in vivo* data. *ATLA* 1993; 21: 281-284.
21. Miller III, MC, Mohrenweiser, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Tox Lett* 2001; 120: 269-280
22. Ingelman-Sundberg M. Genetic variability and susceptibility and response to toxicants. *Tox Lett* 2001, 120: 259-268.
23. Harris AJ, Dial SL, Casciano DA. Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. *Mutat Res* 2004; 549: 79-99.
24. De Loecker P, Fuller BJ, Gruwez et al. The effects of cryopreservation on membrane integrity, membrane transport, and protein synthesis in rat hepatocytes. *Cryobiology* 1990; 27: 143-152.
25. Son JH, Kim KH, Nam YK et al. Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte. *Biotechnol Lett* 2004; 26:829-833.
26. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209: 497-499.
27. Dippold WG, Dienes HP, Knuth A et al. Hepatocellular carcinoma after thorotrast exposure: establishment of a new cell line (Mz-Hep-1). *Hepatology* 1985; 5: 1112-1119.
28. Rau MA, Whitaker J, Freedman JH et al. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 137: 335-42.
29. Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT et al. Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 5123-7.
30. Patek PQ, Collins JL, Cohn M. Transformed cell lines susceptible or resistant to *in vivo* surveillance against tumorigenesis. *Nature* 1978; 276: 510-511.
31. Wu JC, Merlino G, Fausto N. Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 674-8.
32. Cassio D, Hamon-Benais C, Guerin M et al. Hybrid cell lines constitute a potential reservoir of polarized cells: isolation and study of highly differentiated hepatoma-derived hybrid cells able to form functional bile canaliculi *in vitro*. *J Cell Biol* 1991; 115: 1397-408.
33. Pinti M, Troiano L, Nasi M et al. Hepatoma HepG2 cells as a model for *in vitro* studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? *J Biol Regul Homeost Agents*. 2003; 17: 166-171.
34. Batista T, de Sousa G, Šuput JS, Rahmani R, Šuput D. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat Toxicol* 2003; 65: 85-91.
35. Batista Napotnik T. Vpliv mikrocistina-LR na primarne človeške hepatocite in keratinocite. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2004.

Obvladovanje kakovosti in uspešnosti v farmacevtski proizvodnji z uporabo modela poslovne odličnosti

Stane Srčič (doktorska disertacija Mile Božič)

Predložena doktorska disertacija obravnava področje farmacevtske kakovosti in uspešnosti poslovanja farmacevtskega podjetja v okviru zakonodajnih predpisov in konkurenčnih pritiskov globalnega farmacevtskega trženja. V svojem pristopu kandidatka preizkuša in uvaja standardizirani model poslovanja, tj. model odličnosti Evropske fundacije za vodenje kakovosti, kot primer celovitega pristopa za sistem obvladovanja farmacevtske kakovosti. Pri tem izhaja iz teoretsko poglobljene primerjalne analize Dobre proizvodne prakse (GMP) in splošne ravni standardov sistema vodenja kakovosti ISO (Mednarodne organizacije za standardizacijo) ter raziše vzroke in pogoje za doseganje uspešnosti s teoretičnim razglabljanjem pomena osebne in timske kakovosti ter ustvarjalnega vodenja.

V teoretskem delu postavlja tezo, da ni mogoče pričakovati bistvenih izboljšav kakovosti izdelkov, storitev in procesov le s parcialnim razumevanjem in vodenjem kakovosti izven okvira in možnosti, ki jih daje kontekst vodenja celotnega poslovanja.

Meni, da so šibkosti veljavne farmacevtske zakonodaje prisotne, kar utemeljuje tudi s tem, da so ugotovitve ekspertne skupine ICH (Mednarodne konference za harmonizacijo) za harmonizacijo farmacevtske kakovosti šele v letu 2003 postavile področje sistemov kakovosti, farmacevtskega razvoja in obvladovanja tveganja kot novo temo svojega delovanja.

V izhodišču disertacije doktorandka ugotavlja, da je položaj farmacevtskega podjetja pri zagotavljanju kakovosti in uspešnosti v primerjavi z drugimi panogami precej specifičen, saj so vplivi posrednih odjemalcev, t.j. vlade, zdravnikov in farmacevtov, neprimerno močnejši, kot vpliv uporabnikov, t.j. bolnikov, ki ne morejo prosto odločati o izbiri zdravila.

S statistično obdelavo je preverila verjetnost in stopnjo korelacije med posameznimi dejavniki in rezultati uspešnosti ter identificirala področja, ki so najbolj šibka in potrebna korektivov.

Iz pridobljenih podatkov pri zaporednih izvedbah samoocene v štiriletnem obdobju je potrdila zelo močne povezave in soodvisnost pri posameznih dejavnikih in poslovnem rezultatu. Najmočnejši vpliv na rezultate poslovanja je ugotovila za naslednje dejavnike: vodenje,

kadri in procesi. Na osnovi teh empiričnih ugotovitev je predlagala nova izhodišča za vodenje in obvladovanje kakovosti.

Kot temelje uspešnega vodenja farmacevtske kakovosti na zakonodajni in podjetniški ravni je izpostavila:

1. etično vodenje in ravnanje celotnega osebja,
2. standardiziran poslovni model,
3. ustvarjalno vodenje.

Obvladovanje tehnične kakovosti postaja samoumeven pogoj za doseganje poslovne uspešnosti. Kompleksnost zahtev za proizvodnjo zdravil sili vodstvo v bolj transparente in sistematične pristope, ki integrirajo principe in sistem vodenja kakovosti v sistem vodenja poslovanja. Z razvojem sistema kakovosti v farmacevtski praksi je v svojem delu pokazala sistematičen in praktičen primer uporabe modela poslovne odličnosti

Najmočnejši dokazani vpliv na rezultate poslovanja je spoznala v kakovostnem in ustvarjalnem vodenju, ki bi v bodoče zagotavljalo podjetju obstanek in vzdržno rast na globalnem trgu.

Dokazana možnost uporabe modela odličnosti v farmacevtski industriji in povezanih zakonodajnih institucijah potrjuje nove možnosti razvoja in bolj zanesljivega obvladovanja tega področja v smislu povečevanja kakovosti, učinkovitosti in varnosti v proizvodnji zdravil. Nakazani vzrodi za sistematično izboljševanje osebne in timske kakovosti ter ustvarjalnega vodenja pa prispevajo k temeljnim smernicam za razvoj ustvarjalnega potenciala zaposlenih.

Dr. Mila Božič, mag. farm., je zagovorjala doktorsko disertacijo 19. januarja 2005, na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Mentor: prof. dr. Stane Srčič, Fakulteta za farmacijo

Somentor: prof. dr. Ivan Svetlik, Fakulteta za družbene vede v Ljubljani

Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih

Interactions between xanthan and locust bean gum in water systems

Branka Rozman, Saša Baumgartner, Mirjana Gašperlin

POVZETEK: Ksantan (xan) in semensko sluz rožičevca (lbg) uvrščamo med naravne polisaharide. Xan je anionski bakterijski eksopolisaharid, lbg pa predstavnik neionogenih rastlinskih β -1,4 galaktomananov. Kombinacijo omenjenih polimerov (xlb) v farmaciji uporabljamo predvsem za izdelavo ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem. Rezultati vrednotenja vodnih sistemov posameznega polimera oz. njune zmesi z oscilacijsko reometrijo kažejo, da tvori xan šibke gele, lbg koloidne vodne disperzije, njuna zmes pa močne gele. Obstaja več različnih teorij o sinergizmu med tema dvema polimeroma, ki privede do tvorbe čvrstih trodimenzionalnih struktur v vodi. Z analizo rezultatov reološkega in termičnega proučevanja strukture mešanih gelov lahko predpostavimo mehanizem nastanka mešanih gelov in s tem posredno predvidimo obnašanje zmesi xan in lbg v različnih farmacevtskih oblikah.

KLJUČNE BESEDE: ksantan, semenska sluz rožičevca, polisaharidi, reologija, mikrokolorimetija

ABSTRACT: Xanthan (xan) and locust bean gum (lbg) are classified as natural polysaccharides. Xan is an anionic polymer, produced by bacteria, and lbg belongs to a family of non-ionogenic plant β -1,4 galactomannans. The mixture of xan and lbg (xlb) is used as an effective excipient for sustained-release formulations. Addition of non-gelling lbg to xan, which forms weak gels in water, leads to formation of strong gels. There are many theories about the synergism between these two substances, which results in formation of coherent 3 D structures in water. Rheology and microcalorimetry are most frequently used methods for structural investigation of xlb water dispersions. These results enable the hypothetical network model formation, which allows prediction of behaviour of xlb mixtures in different dosage forms.

KEY WORDS: xanthan, locust bean gum, polysaccharides, rheology, microcalorimetry

1 Uvod

Ogljikovi hidrati so najbolj razširjene naravne organske spojine. Predstavljajo več kot 90 % suhe biomase. Poleg razširjenosti so njihove glavne prednosti pridobivanje iz obnovljivih virov, netoksičnost, možnost vplivanja na strukturo s kemičnimi in biokemičnimi postopki ter ugodna cena. Večina ogljikovih hidratov se nahaja v obliki polisaharidov (1).

Heterogeni polisaharidi so polisaharidi, sestavljeni iz več različnih monosaharidov. Mednje uvrščamo sluzi, gumije in pektine. V vodi tvorijo polimerne koloidne raztopine (sole ali gele). Med gumije prištevamo rastlinske in bakterijske polisaharidne eksudate, med sluzi pa polisaharide, ki sestavljajo celične stene alg. Pri višjih rastlinah se sluzi nahajajo znotraj celice, kjer vežejo vodo ali predstavljajo rezervno hrano (2).

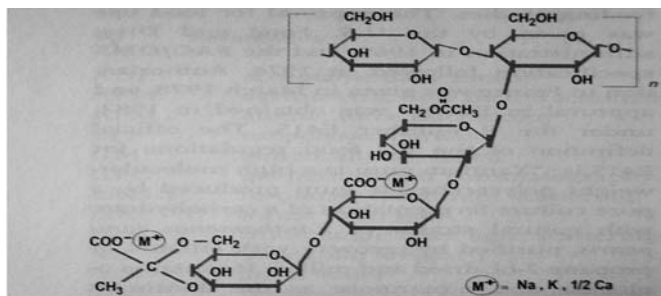
Številni polisaharidi tvorijo gele. Gel sestavlja trdna tridimenzionalna makromolekularna mreža, v katero se ujame voda. Premreženje je posledica asociacije verig ali dela verig polimera. Z večanjem števila in jakosti povezav med verigami narašča jakost gela. Ko postane organiziranost polimera prevelika, pride do obarjanja. V grobem lahko polisaharide glede na obnašanje v vodi razdelimo v tri skupine:

- dolge, homogene, linearne molekule so asociirane v trdna vlakna (npr. celuloza)
- heterogeni polimeri brez pravih zaporedja monosaharidov so v vodi dispergirani in tvorijo viskozne raztopine (npr. semenska sluz rožičevca)
- polimeri, ki imajo med pravilno zaporedje vrinjene nepravilne odseke, v vodi gelirajo (npr. ksantan, karagen) (3, 4).

2 Ksantan

Ksantan (ang. *xanthan*, okrajšano *xan*) je bakterijski eksopolisaharid, izoliran iz *Xanthomonas campestris*, bakterije, ki je povzročitelj številnih bolezni pri rastlinah, za človeka pa ni patogena. *Xanthomonas* ne tvori spor, vendar je zaradi *xan*, ki jo obdaja v obliki kapsule, zelo odporna na visoke temperature in vplive svetlobe (5).

Xan je heteropolisaharid, sestavljen iz D-glukoze, D-manoze in D-glukuronske kisline. Glukoze, povezane z β -1,4 vezmi, tvorijo osnovni skelet, ki je na vsaki drugi glukozi substituiran s trisaharidno stransko verigo. Nespremenljiv del ponavljajoče se stranske verige predstavlja β -D-manozil-(1,4)- β -D-glukuronil-(1,2)- α -D-manoza. Na terminalno manozo je lahko na mestu 4 ali 6 pripet piruvat. Manozo, pripeta na osnovno verigo, je običajno acetilirana na mestu 6 (slika 1).



Slika 1. Primarna struktura ksantana (5).

Figure 1. Primary structure of xanthan gum (5).

Količina ter mesto acetiliranih delov in piruvične kisline sta odvisna od seva bakterije, iz katere je *xan* izoliran. Običajno je na trgu dostopen v obliki kalijeve ali natrijeve soli (5).

V vodnih sistemih je *xan* kemijsko stabilen v širokem temperaturnem intervalu (10 - 90°C) in pH območju (pH 3 - 12). Pri višjih pH vrednostih medija poteče delna deacetilacija stranskih verig. Prisotnost encimov in soli ne zmanjša njegove stabilnosti. *Xan* je anionski polimer, zato praviloma ni združljiv s kationskimi površinsko aktivnimi snovmi, polimeri ali konzervansi (5, 6).

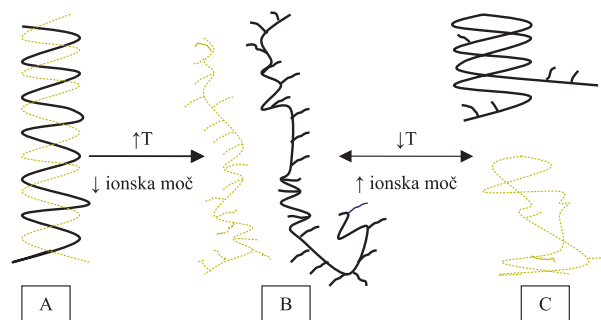
Pogoji pridobivanja *xan* vplivajo tudi na njegovo sekundarno strukturo. Molekula se pri sobni temperaturi v trdnem stanju in v mediju z visoko ionsko močjo praviloma nahaja v nativni oz. urejeni konformaciji. Obstaja več modelov nativne konformacije, vendar večina novejših člankov podpira idejo dvojne vijačnice, v katero sta povezani dve verigi *xan* (slika 2A). Naboji na stranskih verigah so nevtralizirani, zato ni prisotnih elektrostatskih odbojnih sil med stranskimi verigami. Posledično se stranske verige tesno prilegajo osnovni verigi. Študije strukture z mikroskopijo na atomsko silo so pokazale, da se med seboj z nekovalentnimi vezmi (vodikove vezi, elektrostatske interakcije in sterični vplivi) povezujejo deli verig, ki imajo stranske verige močno substituirane s piruvično kislino (5, 7).

Povišanje temperature ali znižanje ionske moči privede do denaturacije molekule. Prevladajo odbojne elektrostatske sile med negativno nabitimi stranskimi verigami. Stranske verige se ne prilegajo več na osnovno verigo, ampak segajo z nje. Povezave med deli dveh verig z visokim deležem piruvata niso več možne. Dvojna vijačnica se začne razpirati in pri določeni temperaturi povsem razpade (slika 2B). S

pomočjo masne spektroskopije so dokazali, da je molekulska masa denaturiranega *xan* za polovico manjša od molekulske mase *xan* v nativni konformaciji, kar potrjuje razpad vijačnice, sestavljene iz dveh verig. Prehod iz nativnega v denaturirano stanje je ireverzibilen (5, 7).

Ob ohlajanju oz. višanju ionske moči poteče ponovna tvorba dvojne vijačnice, vendar jo tokrat tvori ena sama molekula *xan*. Ta struktura je v primerjavi z nativno konformacijo bistveno manj popolna, saj ostane veliko zavojev ali delov verig, ki prosto segajo z osnovne strukture. Taki obliki pravimo renaturirana konformacija (slika 2C). Struktura je bila potrjena z rentgensko difrakcijo (5). Druge študije, ravno tako podprte z rezultati rentgenske difrakcije, navajajo, da je renaturiran *ksantan* v obliki enojne, desnosučne vijačnice. Prehod iz denaturirane v renaturirano obliko je reverzibilen (5, 7).

Zaključimo lahko, da so v renaturiranem stanju prevladujoče intramolekularne interakcije, oblika vijačnice pa je najverjetneje odvisna od izhodnega vzorca, ki ga uporabljamo. S spreminjanjem pogojev fermentacije in čiščenja praviloma ne vplivamo na primarno strukturo *xan*, ki je precej konstantna, pač pa na njegovo sekundarno strukturo (najbolj vplivata ionska moč in temperatura fermentacijske brozge) (5, 7, 8).



Slika 2. Sekundarna struktura ksantana: A-nativna (urejena) konformacija, B-denaturirana oblika, C-renaturirana oblika.

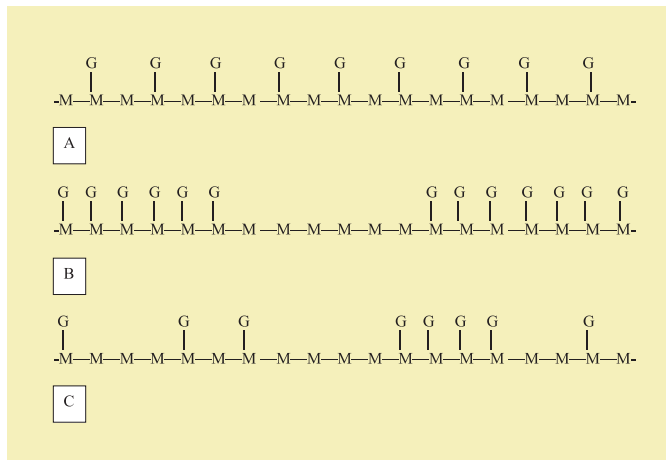
Figure 2. Secondary structure of xanthan gum: A-native (ordered) conformation, B-denatured conformation, C-renatured conformation.

V farmaciji je *xan* emulgator in zgoščevalo v peroralnih in dermalnih farmacevtskih oblikah. Izkoriščamo torej predvsem lastnosti vodnih sistemov *xan*, čeprav je *xan* sam ali v kompleksu z želatino uporabljan tudi za izdelavo ogrodnih tablet in mikrokapsul s prirejenim sproščanjem. Zaradi bioadhezivnih lastnosti je *xan* lahko sestavina nadomestkov za slino. Liofilizate sistemov s *xan* uporabljamo za izdelavo oralnih tablet s hitrim sproščanjem (9,10, 11, 12, 13).

3 Semenska sluz rožičevca

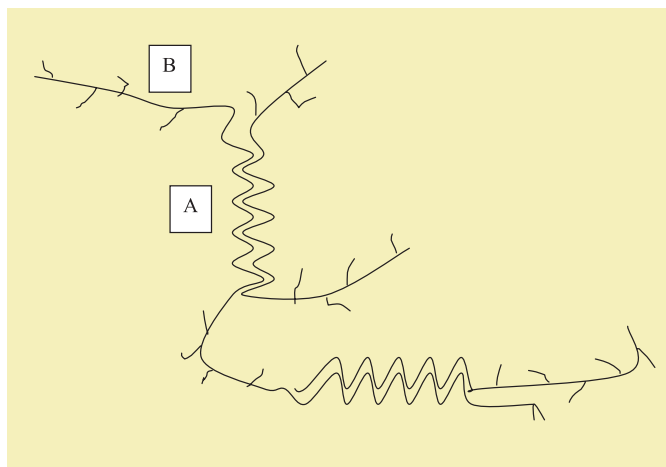
Semensko sluz rožičevca (ang. *locust bean gum*, *carob bean gum*, *carob flour*, *St. John's bread*; okrajšano *lbg*) pridobivamo iz endosperma zrelih semen zimzelenega sredozemskega drevesa rožičevca (*Ceratonia siliqua*). Predstavlja rezervno hrano, ki jo seme porablja med kalitvijo. Druga biološka vloga *lbg* je zadrževanje vode v semenu, s čimer preprečuje izsušitev semena, hkrati pa ustvarja ustrezno okolje za kalitev (14).

Kemijsko gledano je lbg galaktomanan. Kot pove že ime, so galaktomanani polisaharidi, zgrajeni iz manoze in galaktoze. 1000 - 1500 linearnih poli- β -1,4-manopiranoz tvori ogrodje, na katero so v primeru semenske sluzi rožičevca brez pravega reda pripete α -1,6-D-galaktopiranoze. Na posameznih odsekih manozne verige so lahko galaktoze pravilno razporejene na vsaki drugi manozni (slika 3A), blokovno razporejene (slika 3B), možna pa je tudi naključna razporeditev (slika 3C). Tako v trdnem stanju kot v raztopini se nahajajo v obliki togih, trakovom podobnih struktur (10).



Slika 3. Primarna struktura semenske sluzi rožičevca: A-pravilna razporeditev, B-blokovna razporeditev, C-naključna razporeditev. M-manoza, G-galaktoza (10).

Figure 3. Primary structure of locust bean gum: A-regular distribution, B-blockwise distribution, C-random distribution. M-mannose, G-galactose (10).



Slika 4. Shematski prikaz orientacije verig galaktomanana v vodi: A - agregirane nesubstituirane manoze, B - solvatirane substituirane manoze, ki tvorijo amorfna področja

Figure 4. Schematic structure of galactomannan in water: A - aggregated unsubstituted mannose chains, B - solvated substituted mannose chains that form amorphous regions.

Galaktomanani iz semenskih sluzi različnih rastlin se med seboj razlikujejo po razporeditvi galaktoz na manoznem skeletu in razmerju med obema monosaharidoma, ki močno vpliva na topnost. Če so manozne verige nesubstituirane, se približajo druga drugi in tvorijo supramolekularne strukture, ki so lahko solvatirane le na površju. Notranji deli ostanejo povsem nedostopni molekulam topila. Rezultat je slaba topnost spojine.

Pri galaktomananih galaktoze predstavljajo stranske verige, zaradi katerih se molekule ne morejo tesno približati druga drugi. Nastanejo amorfnе regije, v katere zlahka prodre topilo. Galaktomanani tako nabrekajo in se počasi raztapljajo. Večja substituiranost osnovne verige oziroma nižje razmerje manozna/galaktoza pomeni torej večjo topnost galaktomanana (slika 4).

Lbg, pri katerem je razmerje manozna : galaktoza 3,20 : 5,75, je eden slabše topnih galaktomananov, saj se ga v vodi pri sobni temperaturi raztoplja le 10 % (14, 15).

Galaktomanani so nevtralni polisaharidi brez ionskih lastnosti. Pri sobni temperaturi in nizki vlažnosti so kemijsko stabilni, pri visokih temperaturah in ekstremnih pH vrednostih pa so podvrženi oksidativni depolimerizaciji. V vodnih raztopinah brez dodatka antioksidanta delno razpadejo že po nekaj dneh, kar zaznamo kot padec viskoznosti raztopine. Viskoznost je tako parameter, s katerim lahko določamo kakovost lbg. Na trgu so prisotne različne oblike lbg, od moke, pridobljene z mletjem celih semen, do visoko prečiščenega izdelka, ki vsebuje manj kot 2 % nečistot. Glavna pomanjkljivost neprečiščenega lbg je manjša stabilnost zaradi delovanja endogenih encimov (14). Vodne koloidne raztopine lbg povečajo viskoznost sistemov. Pri izdelavi tablet se lbg uporablja kot vezivo (5, 6, 14).

4 Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih

Xan tvori v vodnih sistemih šibke gele, lbg pa koloidne polimerne raztopine. Ob dispergiranju xan v vodi se med seboj najverjetneje povezujejo vijačnice v nativni konformaciji in tvorijo gelsko rešetko. Poleg nativne oblike naj bi bili v vodi prisotni tudi denaturirani deli vijačnic, ki omogočajo solvatacijo le-te (5, 10). Interakcije med molekulami lbg v vodi so šibke, saj se med seboj povezujejo le nesubstituirani deli manoznih verig. Substituirana in nesubstituirana območja molekule lbg so naključno razporejena, zato je intermolekularno povezovanje oteženo. Nastane koloidna polimerna raztopina (5, 10).

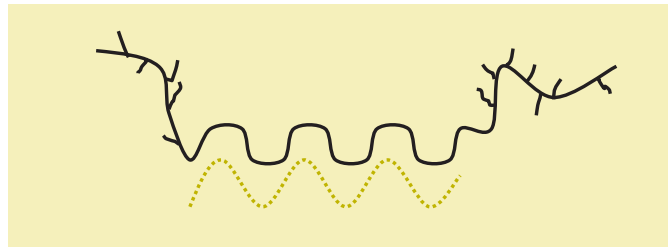
Dispergiranje zmesi xlbjg v vodi privede do nastanka čvrste trodimenzionalne gelske strukture, kar so prvi raziskovalci opazili že v zgodnjih 70-ih letih. Domnevali so, da je sinergizem posledica t.i. »izključitvenega učinka«, pogosto opaženega pri zmesih polimerov. Nezdržljivost obeh polimerov naj bi namreč pripeljala do nastanka področij, v katerih bi bile prisotne le molekule enega polimera, s čimer bi se njegova koncentracija lokalno zvišala in bi gel nastal hitreje (15).

Novejše teorije razlagajo sinergistično tvorbo mešanega gela s prisotnostjo ustreznega razmerja dveh področij, ki sta sestavljeni iz:

- dolgih, strukturno in konformacijsko pravilnih odsekov polimernih verig, ki zagotavljajo medmolekulske povezave

- neasociiranih, konformacijsko nepravilnih delov molekul, ki so vrinjeni med pravilne odseke in služijo za solvatacijo polimera.

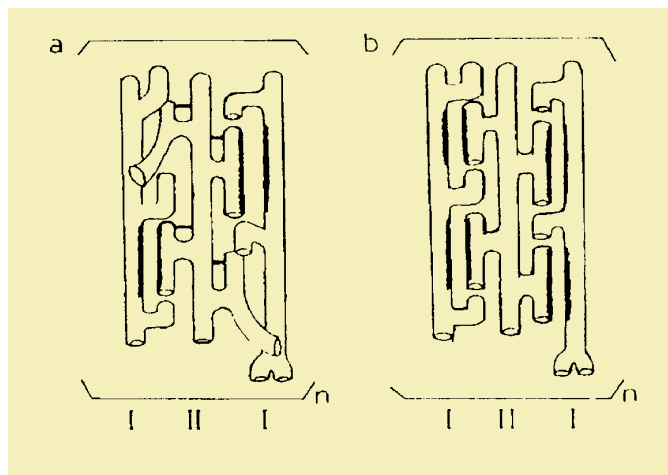
Strukturno pravilne dele tvorijo molekule xan z nesubstituiranimi deli verige lbg, nepravilne pa prispeva lbg (substituirane regije) (slika 5) (5, 15, 17, 18, 19, 20).



Slika 5. Shematski prikaz molekularnih interakcij ksantana (črtkana črta) s semensko sluzjo rožičevca (polna črta).

Figure 5. Schematic presentation of molecular interaction between xanthan (broken line) and locust bean gum (ful line).

Dea in sodelavci (15) so na podlagi reološkega vrednotenja sistemov xlbz predvidevali, da se molekule xan v nativni konformaciji (ki je bila po njihovem mnenju dvojna vijačnica, sestavljena iz ene verige xan) povezujejo z nesubstituiranimi deli verig lbg, s katerimi tvorijo visoko specifične interakcije. Narava teh visoko specifičnih interakcij ni poznana, na njihovo prisotnost pa so sklepali, ker zmes lbg z nekaterimi drugimi bakterijskimi eksopolisaharidi iz vrst *Arthrobacter* ni tvorila gela in je bil tudi sinergizem med xan in guar gumijem oz. mananom iz gomolja *Amorphophallus konjac* (rastlinskima galaktomananoma) slabo izražen (15).



Slika 6. Shematski prikaz možnih molekularnih interakcij ksantana (I) s semensko sluzjo rožičevca (II): a-nespremenjen xan, b-deacetilirani xan (21).

Figure 6. Schematic presentation of possible molecular interaction between xanthan (I) and locust bean gum (II): a-unmodified xan, b-deacetylated xan (21).

Skupina japonskih znanstvenikov je z reološkim proučevanjem jakosti mešanih gelov xlbz z različno stopnjo acetiliranosti xan nadalje razvijala teorijo Dea in sodelavcev. Dokazali so, da je nastal močnejši gel, če je imel xan manjši delež acetiliranih stranskih verig. Acetilni ostanke namreč pripomorejo k boljšemu povezovanju molekul xan med seboj, istočasno pa otežujejo povezovanje z molekulami lbg (slika 6). Povezovanje med xan in lbg je podobno medmolekulskega povezovanju pri sistemu encim – substrat, saj so za interakcije potrebne točno določene konformacije molekul (21).

Ko se je kot model nativne konformacije xan uveljavila dvojna vijačnica, sestavljena iz dveh molekul xan, so se mnjenja raziskovalcev o strukturi, ki tvori medmolekulske povezave z lbg, razdelila. Nekateri avtorji dokazujejo, da so pri tvorbi mešanih struktur udeležene molekule xan v nativni konformaciji, drugi pa da so to denaturirane molekule (5,16-19). Novejše raziskave nakazujejo možnost, da za nastanek mešanega gela ni pomembna le sekundarna struktura xan, ampak tudi prisotnost drugih snovi, npr. proteinov in nekaterih organskih nečistot nepolarnega značaja, preko katerih se molekule polisaharidov povezujejo med seboj (8, 22).

Zmes polimerov xan in lbg (xlbz), se že vrsto let uporablja v prehrabeni industriji, v zadnjem času pa srečujemo to kombinacijo tudi v farmaciji, zlasti pri oblikovanju ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem. V vodnem mediju polimera nabrekata in sinergistično tvorita gelski sloj okoli tablete, ki zadržuje sproščanje učinkovine. Mešani xlbz gel je tudi nosilni sistem za učinkovine za rektalno aplikacijo (5 15, 17-20).

5 Vrednotenje vodnih sistemov polisaharidov

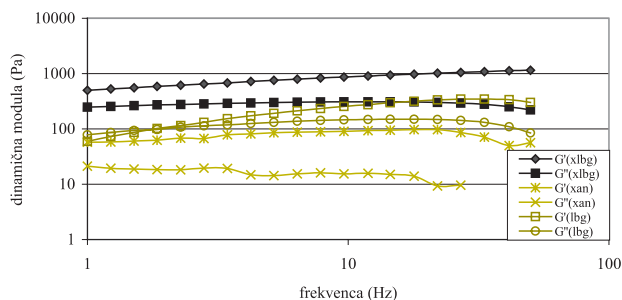
Vodne sisteme polisaharidov lahko vrednotimo z različnimi tehnikami: rotacijsko in oscilacijsko reometrijo, nuklearno magnetno resonanco (NMR), cirkularnim dihroizmom, diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), mikrokalorimetrijo, mikroskopijo na atomsko silo (AFM), idr. Z oscilacijskim merjenjem dinamične viskoznosti in viskoelastičnih modulov določamo jakost povezav med molekulami polimerov, z rotacijsko reometrijo pa opazujemo razpad struktur pod vplivom različno velikih strižnih sil. S pomočjo NMR lahko zelo uspešno proučujemo molekulske konformacije polisaharidnih polimerov v vodnih sistemih. Rezultati meritev cirkularnega dihroizma nam podajajo informacije o spremembah geometrijskega okolja določenih funkcionalnih skupin, ki absorbirajo svetlobo v izbranem valovnem območju. Z DSC preučujemo termično obnašanje polisaharidov. AFM posnetki vodnih disperzij polisaharidov omogočajo boljše poznavanje interakcij med polimeri ter med polimeri in topilom (8, 15, 23). Strukturna analiza ogljikovih hidratov je izjemno kompleksna in zahteva kombinacijo fizikalnih (spektroskopske tehnike) in kemijskih metod (hidrolize, delne hidrolize, tvorba derivatov, kontrolirana razgradnja...) (4).

Za rutinsko pridobivanje osnovnih podatkov o vodnih sistemih polisaharidov najpogosteje uporabljamo različne reološke tehnike in mikrokalorimetrijo.

Oscilacijska reometrija

Z oscilacijsko reometrijo pridobimo podatke o strukturiranosti in jakosti nastalih gelov. Z naraščanjem števila in moči interakcij med molekulami polimerov se namreč večajo vrednosti dinamičnih mod-

ulov, dobljenih z oscilacijskim merjenjem v linearnem viskoelastičnem območju sistema. To je območje, v katerem ne pride do porušitve strukture sistema, deformacija in hitrost deformacije pa sta tako majhni, da lahko zveze med napetostjo in deformacijo zapišemo s pomočjo linearnih diferencialnih enačb s konstantnimi koeficienti – dinamičnimi (viskoelastičnimi) moduli, ki predstavljajo zapis linearne viskoelastičnega območja (24). Vodne sisteme polisaharidov običajno opišemo s frekvenčno odvisnostjo elastičnega (G') in viskoznega (G'') modula (slika 7). Elastični modul je merilo elastičnega obnašanja sistema in karakterizira njegovo upiranje preoblikovanju. Podaja količino energije, ki jo sistem reverzibilno shrani in uporabi za vrnitev v prvotno stanje. Viskozni modul opisuje viskozno obnašanje sistema in predstavlja tisto količino energije, ki jo sistem ireverzibilno odda okolici, zato je zanj izgubljena in je ne more uporabiti za kompenziranje deformacije (24).



Slika 7. Frekvenčna odvisnost dinamičnih modulov 2-% vodne disperzije xlbG (razmerje xan: lbg = 1 : 1), xan in lbg. Priprava vzorca: v prečiščeni vodi s temperaturo 85 °C.

Pogoji merjenja: amplituda deformacije: 0,1, temperatura merjenja: 37 °C. Figure 7. Dynamic modulus as a function of frequency shown for 2-% water dispersions of xlbG (ratio xan: lbg = 1 : 1), xan and lbg. Preparation of a sample: in purified water at 85 °C.

Experimental conditions: strain: 0,1, temperature: 37 °C

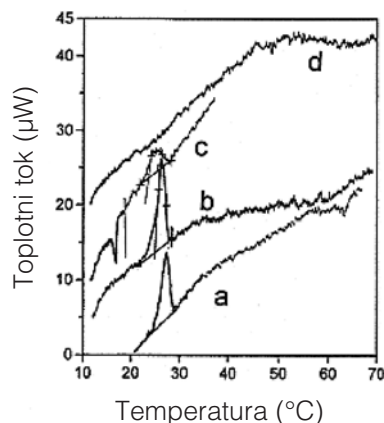
Slika 7 prikazuje 2-% vodni sistem xan, lbg in njune zmesi. Majhna frekvenčna odvisnost obeh modulov ter večje vrednosti G' od G'' v celotnem frekvenčnem območju nakazuje nastanek gela (slika 7 – xan in xlbG). Za sisteme, ki jih opredelimo kot gele, velja, da višji vrednosti dinamičnih modulov pomenita večjo strukturiranost le-teh. Iz slike 7 lahko torej ugotovimo, da tvori zmes xlbG močnejši gel kot sam xan pri istih pogojih.

V primeru, da sta G' in G'' v celotnem frekvenčnem območju odvisna od frekvence, vzorec ni gel, ampak koloidna raztopina polimera (slika 7 – lbg). Pomemben podatek pri vrednotenju gelov je frekvenca, pri kateri se modula prekrizata – t. i. točka križanja (*crossover point*). Pri frekvencah, nižjih od le-te, je viskozni modul višji od elastičnega, pri višjih frekvencah pa je elastični modul višji od viskoznega (primer: 2-% lbg na sliki 7). Pri šibkeje strukturiranih sistemih se točka križanja pojavlja pri višjih frekvencah (7).

Z analizo vpliva lastnosti izhodnih polimerov in medija ter priprave vzorca na strukturiranost vodnih disperzij xlbG lahko predpostavimo mehanizem nastanka mešanih gelov na molekularnem nivoju (5, 7, 15, 16, 17, 19, 20).

Mikrokalorimetrija

Pri mikrokalorimetriji merimo toplotni tok v ali iz vzorca pri nadzorovanem segrevanju. Končni rezultat analize je termogram, tj. temperaturna odvisnost razlik toplotnih tokov vzorca in reference. Z analizo termograma pridobimo podatke o temperaturi, pri kateri pride do sprememb in entalpiji nastale spremembe (25). S slike 8 je razvidno, da se s spreminjanjem razmerja med xan in lbg ter medija, v katerem je bil gel pripravljen, spreminjata tako temperatura kot entalpija eksotermnih vrhov (26). S primerjavo termogramov so ugotovili, da se z višanjem koncentracije elektrolita pri istem razmerju med polimero-ma zmanjšuje entalpija eksotermnega vrha, ker se manjša delež denaturiranega xan. Entalpija vrha naj bi namreč predstavljala energijo, sproščeno ob prehodu denaturirane oblike xan v renaturirano. V primeru d (slika 8) na termogramu niso zaznali vrha, saj se je ves denaturiran xan vezal z lbg (26).



Slika 8. Termogrami zmesi xan ($c = 1$ g/l) in lbg ($c = 0,3$ g/l), dobljeni z ohlajanjem sistema s hitrostjo 0,5 °C/min v: a - prečiščeni vodi, b – 5 mM NaCl, c - 100 mM NaCl in d - zmesi xan ($c = 1$ g/l) in lbg ($c = 0,5$ g/l) v 5 mM NaCl (26).

Figure 8. Thermograms of xan ($c = 1$ g/l) mixed with lbg ($c = 0,3$ g/l) during cooling (0,5 °C/min) in: a - water, b – 5 mM NaCl, c - 100 mM NaCl or d - with lbg ($c = 0,5$ g/l) in 5 mM NaCl (26).

6 Zaključek

V farmaciji izkoriščamo zmes polimerov xan in lbg predvsem za izdelavo tablet s prirejenim sproščanjem. Na podlagi poznavanja lastnosti xan in lbg ter predvidevanja mehanizma tvorbe mešanega xlbG gela na osnovi izsledkov mikrokalorimetrije in reometrije lahko napovemo strukturiranost xlbG gela v izbranem mediju in s tem posredno obnašanje in/ali učinek zmesi obeh polisaharidov v različnih farmacevtskih oblikah. Z omenjenima metodoma spremljamo vpliv sekundarne strukture obeh polisaharidov na jakost gelov, rezultati novejših, bolj občutljivih tehnik pa nakazujejo na to, da je tvorba mešanih gelov na molekularnem nivoju bolj zapletena, saj naj bi na gelsko strukturo vplivale tudi potencialno prisotne organske nečistote.

7 Literatura

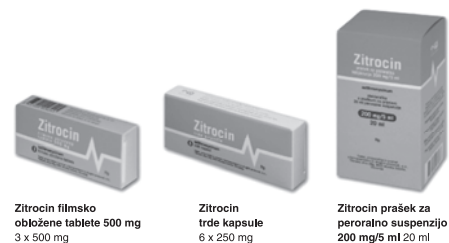
- Zohuriaan MJ, Shokrolahi F. Thermal studies on natural and modified gums. Poly test 2004; 23: 575-579.
- Umek A. Farmakognozija - študijsko gradivo. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2002: 21-26.
- Tišler M. Organska kemija. 3rd ed. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1991: 365-368
- Gunnar S. Drugs of natural origin. 47th ed. Stockholm: Apotekarsocieten, 1999: 35-43.
- Born K, Langerdorff V, Boulenger P. Xanthan. In: Polysaccharides I Polysaccharides from prokaryotes. Ed. Vandemene EJ, De Baets S, Steinbuechel A. Weinheim: Wiley – VCH Verlag, 2002: 259-290.
- Friedler HP. Encyclopedia of excipients: for pharmaceuticals, cosmetics and related areas. 5th Ed., Aulendorf: ECV, 2002: 123,124, 691-693.
- Rochefort EW, Middleman S. Rheology of Xanthan gum: Salt, Temperature, and Strain Effects In Oscillatory and Steady Shear Experiments. Journal of Rheology, 1987; 31: 337-369. 8. Capron I, Alexandre S, Muller G. An atomic force microscopy study of the molecular organisation of xanthan. Polymer 1998; 23: 5225-5730.
- Ruissen ALA, van der Reijden WA, van't Hof W et al. Evaluation of the use of xanthan as vehicle for cationic antifungal peptides. J Control Release 1999; 60: 49-56
- Talukdar MM, Kinget R. swelling and drug release behaviour of xan gum matrix tablets. Int J Pharm 1994; 120: 63-72.
- Corveleyn S, Remon JP. Formulation and production of rapidly disintegrating tablets by lyophilisation using hydrochlorothiazide as a model drug. Int J Pharm 1997; 152: 215-225.
- Lii CY, Liaw SC, Ali VMF et al. Xanthan gum-gelatin complexes. Eur Polymer J 2002; 38: 1377-1381.
- Corveleyn S, Remon JP. Bioavailability of hydrochlorothiazide: conventional versus freeze-dried tablets. Int J Pharm 1998; 173: 149-155.
- Dierckx S, Dewettinck K. Seed gums. In: Polysaccharides II Polysaccharides from eukaryotes. Ed. Vandemene EJ, De Baets S, Steinbuechel A. Weinheim: Wiley – VCH Verlag, 2002: 321-343.
- Dea CM, Morris ER, Rees DA et al. Association of like and unlike polysaccharides: Mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. Carbohydr Res 1977; 57: 249-279.
- Copetti G, Grassi M, Lapasin R et al. Synergistic gelation of xanthan gum with locust bean gum: a rheological investigation. Glycoconjugate journal 1997; 14: 951-961.
- Zhan DF, Ridout MJ, Brownsny GJ et al. Xanthan-locust bean interactions and gelation Carbohydr Poly 1993; 21: 53-58.
- Watanabe K, Yakou S, Takayama K et al. Rectal absorption and mucosal irritation of rectal gels containing buprenorphine hydrochloride prepared with water-soluble dietary fibers, xanthan gum and locust bean gum. J Control Release 1996; 38: 29-37.
- Pai VB, Khan SA. Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. Carbohydr Poly 2002; 49: 207-216.
- Lundin L, Hemansson AM. Supramolecular aspects of xanthan-locust bean gum gels based on rheology and electron microscopy. Carbohydr Poly 1995; 26: 129-140.
- Tako M, Nakamura S. D-Mannose-specific interaction between xanthan and D-galacto-D-mannan. Agric Biol Chem 1986; 48: 2995-3000.
- Schorsch C, Garnier C, Doublier JL. Microscopy of xanthan/galactomannan mixtures. Carbohydr Poly 1996; 28: 319-323.
- Gells and Jellies In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Volume 7. 7th ed. Ed. Swarbrick J, Boylan BC. New York, Hong Kong, Basel: Dekker M., 1992: 415-424.
- Žumer M, Zupančič Valant A, Florjančič U et al. Seminar iz aplikativne reologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko inženirstvo, Katedra za kemijsko inženirstvo, 1997: 7-13, 20-22, 30-41.
- Planišek O, Zajc N, Srčič S.: Uporaba diferencialne dinamične kalorimetrije v farmaciji. Farm vestn 2001; 52: 173-185.
- Goycolea FM, Milas M, Rinaudo M. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. Int J Biol Macromolecules 2001; 29: 181-192.



Na listi medsebojno zamenljivih zdravil

Zitrocin azitromicin

- tridnevno odmerjanje azitromicina za desetdnevno zdravljenje okužb dihal odraslih in otrok
- azitromicin ima najmanj interakcij med makrolidi
- zanesljivo sodelovanje bolnikov pri zdravljenju



Zitrocin filmsko obložene tablete 500 mg 3 x 500 mg

Zitrocin trde kapsule 6 x 250 mg

Zitrocin prašek za peroralno suspenzijo 200 mg/5 ml 20 ml

Meloxan meloksikam

Varno nesteroidno protivnetno zdravilo za zdravljenje revmatoidnega artritisa, osteoartrtoze in ankilozirajočega spondilitisa:

- selektiven zaviralec COX-2
- odmerjanje enkrat na dan



Meloxan 7,5 mg 20 tablet

Meloxan 15 mg 20 tablet

Za podrobnejše informacije smo vam na voljo: **Galex d. d.**, Tišinska ulica 29 g, Murska Sobota, telefon 02 521 35 10, telefaks 02 521 35 20, e-pošta info@galex.si, spletna stran www.galex.si

Določanje mutagenega potenciala snovi na celični liniji mišjega limfoma

The mouse lymphoma mutagenicity assay (MLA)

Andreja Plaper

POVZETEK: V vsakdanjem življenju smo izpostavljeni številnim kemikalijam, ki na naš organizem delujejo z različno mero škodljivosti. Ena od toksičnih potencialov kemikalij je genotoksičnost. V prispevku je opisana ena od metod, s pomočjo katere prikažemo in ovrednotimo genetske poškodbe na sesalski celični liniji mišjega limfoma L5178Y $tk^{+/-}$ (klon 3.7.2C). Celična linija je heterozigotna na *Tk1* lokusu timidinske kinaze kromosoma 11. Mutacija v tem predelu kromosoma in inaktivacija tk^{+} alela povzroči izgubo aktivnosti tega encima in s tem pridobitev rezistence na tri-fluorotimidin (TFT). Tako lahko mutante $tk^{-/-}$ ločimo od nemutiranih celic. Mutirane celice, ki rastejo v selektivnem gojišču s TFT, kvantificiramo po določenem času, v katerem izrazijo svojo novo fenotipsko lastnost. Namen in cilj metode je prikazati potencial testne substance, da inducira mutacije na lokusu $tk^{+}tk^{-}$. Metoda je ena od testov mutagenosti, ki jih regulatorne organizacije uvrščajo v standardno skupino testov za določanje genotoksičnega potenciala zdravilnih učinkovin, ki morajo biti izvedeni pred registracijo.

Ključne besede: mutagenost, celice mišjega limfoma, L5178Y, rezistenca na TFT.

SUMMARY: In everyday life we are exposed to many chemicals which express different toxic potential to our organism. One of them is genotoxicity. In this paper, one of the methods which help to determine the genotoxic potential of chemicals is described. The method is mutagenicity assay on mouse lymphoma cell line (L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C), heterozygous at the thymidine kinase locus (*Tk1*) on chromosome 11. Mutation on this part of the chromosome and inactivation of the tk^{+} allele induces trifluorothymidine (TFT) resistance, and $tk^{-/-}$ mutants can be selected in a background of $tk^{+/-}$ non-mutant cells. Mutant cells, grown in the media containing the selective substance TFT, are quantified after a certain period of time, during which the cells express the new phenotypic characteristic. The purpose and aim of the test method is a demonstration of the test material potential to induce forward mutations at the $tk^{+}tk^{-}$ locus. The method is one of the mutagenicity tests included in the standard test battery for genotoxicity by regulatory agencies, and is obligatory for marketing authorisation of pharmaceuticals.

Keywords: mutagenicity, mouse lymphoma cells, L5178Y, TFT resistance;

OKRAJŠAVE: TFT, tri-fluorotimidin; ATCC, American type culture collection; ICH, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use - Mednarodna konferenca za harmonizacijo tehničnih zahtev za registracijo farmacevtskih učinkovin za humano uporabo; TK, timidinska kinaza; OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj; DMSO, dimetil sulfoksid; R₀P, gojišče RPMI 1640 z antibiotikom, natrijevim karbonatom in pluronikom F68; R₅P, gojišče R₀P s 5-odstotnim konjskim serumom; R₁₀P, gojišče R₀P z 10-odstotnim konjskim serumom; CM (cloning medium), gojišče za kloniranje; R₂₀P z 20-odstotnim konjskim serumom, natrijevim piruvatom in antimikotiki; THGM, timidin, hipoksantin, glicin metotreksat.; THG, timidin, hipoksantin, glicin; TMP, timidin monofosfat; UKEMS, United Kingdom Environmental Mutagen Society.

1 Uvod

Mutageni potencial neke snovi pomeni zmožnost indukcije dedne spremembe genetskega materiala v celici ali organizmu. Mutacija lahko vključuje en sam gen ali pa skupino genov. Genotoksičnost je širši pojem. Razumemo ga kot zmožnost interakcije kemikalije z DNA ali s celičnim aparatom, ki je vključen v razmnoževanje genoma (npr. topoizomeraze, delitveno vreteno). Za odobritev uporabe različnih kemikalij in proizvodov (pesticidov, kozmetičnih preparatov, prehrabnih izdelkov in farmacevtikov) regulatorne agencije zahtevajo različne skupine genotoksičnih testov. Kadar ocenjujemo mutagenost oz. genotoksičnost kemikalije, moramo upoštevati različne končne

učinke takega delovanja: točkaste mutacije na molekuli DNA, spremembe v številu (poliplodija, aneuplodija) ali strukturi kromosomov (klastogeneza). Zato seveda preskušanje genotoksičnega potenciala učinkovine z enim testom ne zadošča. Kombinacija primernih testov zagotavlja varno uporabo določenih kemikalij za ljudi. Med strožje zakonodajne predpise gotovo sodijo smernice za varno uporabo zdravilnih učinkovin. Primer predpisane skupine testov za testiranje genotoksičnosti farmacevtikov vsebuje tri postopke. Prvi je *in vitro* test povratnih mutacij na bakterijah (*Salmonella sp.* ali *Escherichia sp.*), za katerega se je izkazalo, da zazna odgovarjajoče genetske spremembe za večino genotoksičnih glodalskih karcinogenov (1). Druga, tudi *in vitro* metoda, je določanje genskih poškodb na celicah mišjega lim-

foma (MLA - *mouse lymphoma assay*) ali alternativno, test za citogenetsko vrednotenje kromosomskih poškodb. Ena ali druga metoda je obvezna v predpisani skupini. Testi na sesalskih celicah zaznajo poškodbe na DNA, ki jih na bakterijskih celicah ne moremo zaznati (klastogeni učinki, kromosomske aberacije). Postopki na sesalskih celicah so pomembno dopolnilo predvsem za tiste snovi, ki imajo negativen rezultat na bakterijskem testu za določanje mutagenosti. Obvezen v predpisani skupini genotoksičnih testov je tudi eden od *in vivo* testov. Ta namreč zagotovi model, v katerem so vključeni dodatni faktorji, ki vplivajo na genotoksično aktivnost spojin. Ti faktorji so absorpcija, distribucija, metabolizem in izločanje snovi. Za ta namen je primeren *in vivo* test za zasledovanje kromosomskih poškodb na glodalskih hematopoietičnih celicah, ki je lahko analiza kromosomskih aberacij na celicah kostnega mozga ali analiza mikronukleusov v kostnem mozgu ali eritrocitih periferne krvi. Šele kombinacija naštetih *in vitro* in *in vivo* metod zagotavlja končno oceno varnosti uporabe neke snovi za človeka.

Namen prispevka je prikazati eno od metod, ki so predpisane v obvezni skupini testov za določanje genotoksičnega potenciala kemikalij - metodo določanja genskih mutacij na celicah mišjega limfoma (MLA). Metoda je validirana in se vrsto let uporablja za preizkušanje mnogih kemikalij (2-7). Testiranje mutacij na specifičnem lokusu sesalskih celic *in vitro* lahko uporabljamo za prikaz in kvantifikacijo genetskih poškodb. V prispevku so podani: status metode, zakonodajne zahteve, protokol za izvedbo metode in kriteriji za analizo in evalvacijo rezultatov.

1.1 Zgodovina nastanka mutirane celične linije

Od leta 1964 so znanstveniki v kulturah sesalskih celic inducirali mutacije, med drugim z namenom, da bi pripravili celične linije, na katerih bi bilo mogoče opazovati mutageni potencial kemikalij (8, 9). Heterozigotni sistem timidinske kinaze, kjer je tk^+ lokus mutiran v tk^- lokus, je leta 1972 opisal Clive s sodelavci (10) in temelji na celični liniji mišjega limfoma, ki jo je osnoval Fisher leta 1958 (11). Bolj natančen opis testa je Clive s sodelavci objavil leta 1975 (11). Obstajata dve metodi za izvajanje testa: pomnoževanje (kloniranje) celic v mehkem agarju in novejša, suspenzijska metoda, ki jo izvajamo v mikrotitrskih ploščicah (14).

1.2 Genetska osnova testa

V MLA uporabljamo celično linijo mišjega limfoma L5178Y $TK^{+/-}$ (klon 3.7.2C), ki je heterozigotna v lokusu timidinske kinaze ($Tk1$) na kromosomu 11. Celice z aktivno timidinsko kinazo (TK) reagirajo na citostatične in citotoksične učinke trifluorotimidina (TFT), tako da odmrejo. Povratne mutacije aktivnega gena TK povzročijo izgubo aktivnosti tega encima in s tem pridobitev rezistence na TFT. Mutirane celice torej lahko rastejo v prisotnosti TFT, medtem ko normalne celice ne morejo. Mutante kvantificiramo po določenem času, v katerem izrazijo novo fenotipsko lastnost tako, da jih razmnožujemo v gojišču, ki mu dodamo selektivno substanco TFT (10, 11, 12).

1.3 Zakonodajne zahteve

Vrednotenje genotoksičnega potenciala neke snovi, ki ga zahtevajo mednarodne regulatorne agencije, je določeno v različnih dokumen-

tih. Za registracijo farmacevtskih učinkovin moramo upoštevati zahteve in navodila Organizacije za ekonomsko sodelovanje in razvoj (OECD) (15) in Mednarodne konference za harmonizacijo tehničnih zahtev za registracijo farmacevtskih učinkovin za humano uporabo (ICH). ICH je v okviru svojih navodil izdala dve poglavji, ki določata izbor metod za določanje genotoksičnosti in navodila za izvajanja teh metod: S2A – Navodilo za specifične vidike veljavnih genotoksičnih testov za farmacevte (16) in S2B – Standardna skupina testov za določanje genotoksičnosti (17). OECD določa pravila izvajanja metode MLA v poglavju 476 (15).

2 Postopek

2.1 Celice

Za MLA uporabljamo celice mišjega limfoma, klon L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C, ki ga lahko kupimo v zbirki ATCC (CRL-9518) ali zbirki Jane Cole, UK. Celice uvrščamo v varnostni razred 1 (biosafety level: 1), kar pomeni, da je delo s celicami varno z upoštevanjem običajnih pravil ravnanja z biološkim materialom v laboratoriju. Celice rastejo v suspenzijski kulturi z generacijskim časom 11 ur. Imajo stabilno število diploidnih kromosomov (11).

2.2 Metabolična aktivacija

Navodila OECD zahtevajo izvajanje MLA v prisotnosti in odsotnosti metabolične aktivacije. Za metabolično aktivacijo uporabljamo encime, ki jih pridobimo iz podganjih jeter, induciranih z znanimi induktorji citokromov P450 (Na-fenobarbiton, β -naftoflavon ali aroclor 1254). Pripravimo postmitohondrijsko frakcijo sesalskih jeter (S9), ki jo v končnem testnem vzorcu dodamo od 1 % do 10 %. S9 je na voljo komercialno (Molecular Toxicology, Boone, NC, USA) ali jo pripravimo sami po postopku, ki ga je opisal Ames s sodelavci (18).

2.3 Gojišča in pogoji za vzgojo celic

Za gojenje celic uporabljamo gojišče RPMI 1640 z glutaminom (0,3 g/l) brez natrijevega karbonata, ki ga dodajamo naknadno do 0,11 % (R_0P). Za različne namene v poskusu dodajamo toplotno inaktiviran konjski serum: 5 % v gojišče, v katerem celicam dodajamo testno substanco (R_5P), 10 % v gojišče za gojenje celic ($R_{10}P$) in 20 % v gojišče za pomnoževanje celic (CM). Obvezno dodajamo tudi pluronik F68 (0,5 %), ki zagotavlja suspenzijsko rast celic (6) in antibiotik. Gojišču za razmnoževanje celic poleg 20 % seruma dodamo tudi antimikotik in Na-piruvat (1,9 mM).

Selektivno gojišče

V testu uporabljamo dve selektivni gojišči: gojišče za razmnoževanje celic z dodatkom TFT (tri fluoro timidin), ki zagotavlja kvantifikacijo in karakterizacijo mutant $TK^{-/-}$, in THGM, očiščevalno gojišče, ki odstrani spontane mutante in optimizira občutljivost metode. Sestava THGM je naslednja: timidin (0,03 %), hipoksantin (0,05 %), glicin (0,075 %), metotretsat (10 μ g/ml).

2.4 Odstranjevanje spontanih mutant

Heterozigotne celice tk^+tk^- v suspenziji spontano mutirajo v tk^-tk^- z mutacijsko frekvenco 2×10^{-6} mutacij na generacijo (12, 13). Homozigotne mutante moramo pred poskusom odstraniti.

Odstranitev spontanah tk⁻ mutant omogoča metoda s posebnim gojiščem THGM. Gojišče vsebuje metotreksat, ki inhibira timidilato sintazo odvisno od folata in s tem sintezo timidin monofosfata. Celice so zato prisiljene uporabljati zunajcelični timidin, ki pa ga mora fosforilirati timidinska kinaza. Homozigotne mutante TK⁻ ne morejo fosforilirati eksogenega timidina in odmrejo zaradi pomanjkanja TMP. Drugi dve sestavini gojišča sta hipoksantin in timidin, ki ju dodamo zato, da nadomestimo blokado metabolizma folata in posredno sintezo purinov. Glicin dodamo kot vir metilnih skupin (13). Celice rastejo v gojišču THGM 24 ur, nato jih speremo in resuspendiramo v THG (THGM brez metotreksata). Očiščene celice uporabimo za eksperiment, preostanek zavržemo.

3 Določanje mutagenosti

3.1 Topnost testnega materiala

Topnost testne substance preizkusimo v različnih topilih. Za topne substance je najvišja koncentracija, ki jo izberemo, odvisna od toksičnosti le-te, vendar ne sme presegati koncentracije 5 mg/ml. Organska topila naj ne bi presegala 1 % skupnega volumna vzorca.

3.2 Testiranje toksičnosti substance

Odmerki učinkovine za testiranje mutagenosti morajo segati do toksičnih koncentracij. Najvišje uporabljene koncentracije dovoljujejo preživetje v območju od 10-20 % glede na vzporedne kontrole, ki vsebujejo le topilo. Pred testom mutageneze določimo toksični potencial substance z mešanico S9 in brez nje. Za test uporabimo nasičeno raztopino substance in še 8 razredčitev. Celice izpostavimo substanci tako, kot je določeno v testu mutagenosti, le da v tem primeru ne delamo v duplikatu. Po tretiranju določimo gostoto celic s hemocitometrom, prilagodimo koncentracijo do 8 celic/ml in po 0,2 ml zasejemo na 2 mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami. Kulture inkubiramo 9 dni na 37 °C v 5-% CO₂ atmosferi.

Število negativnih vdolbin po 9 dneh in gostota celic, ki jo določimo po tretiranju s substanco, služita za izračun relativnega preživetja (RS - relative survival)) za vsako celično kulturo na dan 0.

3.3 Test mutagenosti

Naredimo dva popolna testa mutagenosti v prisotnosti in odsotnosti mešanice S9. Vse kulture, ki jih izpostavimo testni substanci, pozitivnim in negativnim kontrolam, tretiramo v duplikatu.

V prvem poskusu izberemo 6 koncentracij. Najvišja koncentracija za prvo testiranje je tista, ki inducira skoraj 100-% smrtnost celic. Dodatne koncentracije izberemo z namenom, da bi dobili rezultate za kritične toksične koncentracije, tj. v območju od 10-20 % preživetja. Za netoksične substance najvišja koncentracija navadno ne presega 5 mg/ml. Za drugi poskus lahko koncentracije spremenimo, tako da dosežemo ustrezen nivo toksičnosti.

3.3.1 Pozitivna in negativna kontrola

Negativna kontrola so celične kulture, ki jih obdelamo popolnoma enako kot kulture v testu, le da namesto substance dodajamo topilo, v katerem raztapljamo preizkušane.

Kot pozitivno kontrolo lahko uporabimo različne mutagene. Pozitivna kontrola, ki potrebuje metabolično aktivacijo z mešanico S9, je za indukcijo malih in velikih kolonij običajno 3-metilkolantren (3-MC topen v DMSO). Končna koncentracija v celični kulturi je 2,5 µg/ml. Mutagena kemikalija, ki ne potrebuje metabolične aktivacije, je za indukcijo velikih kolonij, etilmetan sulfonat (EMS), katerega končna koncentracija v kulturi je 250 µg/ml. Za indukcijo malih kolonij pa uporabljamo metilmetan sulfonat do končne koncentracije 15 µg/ml.

3.3.2 Tretiranje kultur

V gojišču, ki ga uporabljamo ob tretiranju, zmanjšamo nivo seruma do 5 %, ker previsoka količina seruma lahko zabriše učinek nekaterih mutagenov (12). Za vsako pozitivno in negativno kontrolo ter vsako testno koncentracijo pripravimo po dve centrifugirki. V vsak par centrifugirk dodamo odgovarjajočo količino gojišča, celice do koncentracije 6×10^5 celic/ml, mešanico S9 oz. gojišče, pozitivno kontrolo oz. topilo ali eno od koncentracij preizkušanca. Vse epruvete inkubiramo na rolerju 4 ure pri 37 °C. Odvzamemo majhen vzorec celic (~0,2 ml) iz vsake kulture in določimo število celic (število celic dneva 0). Celice nato speremo z 20 ml gojišča R₁₀P in resuspendiramo v R₁₀P do gostote ~ 3×10^5 celic/ml. Del kultur razredčimo v gojišču CM do koncentracije 8 celic/ml. V vsako vdolbino na ploščici zasejemo po 200 µl razredčene kulture. Inkubiramo v CO₂ inkubatorju 9 dni. Relativno preživetje določimo na enak način, kakor je opisano pri testiranju toksičnosti.

Naslednji dan celice ponovno preštejemo (število celic na dan 1) in jih razredčimo tako, da imajo gostoto ~ 3×10^5 celic/ml. Kulture damo nato nazaj v inkubator, kjer jih pustimo še en dan.

Tretji dan (dan 2) celice spet preštejemo. Vse pozitivne in negativne kontrole ter tiste kulture, ki so bile izpostavljene štirim najvišjim koncentracijam testne substance in imajo najmanj 3×10^5 celic/ml, izberemo za izražanje genetskih poškodb.

3.3.3 Izražanje genetskih poškodb

Učinkovitost kloniranja

Vsako kulturo razredčimo v gojišču za pomnoževanje celic (CM) do 8 celic/ml. Po 200 µl kulture odpipetiramo na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami.

Selekcija mutant

Selekcijo mutant izvedemo tako, da h gojišču CM dodamo TFT (3 µg/ml). Celice resuspendiramo v selekcijskem gojišču (1×10^4 celic/ml) in razdelimo po 200 µl na mikrotitrski ploščice s 96 vdolbinami.

Vse plošče inkubiramo pri 37°C v atmosferi 5 % CO₂, 95 % zraka (v/v), dokler se kolonije popolnoma ne razvijejo (9 dni za določanje učinkovitosti kloniranja in 12 dni za selekcijo mutant). Po končanem poskusu pregledamo plošče pod lupo z osvetljeno podlago. Na ploščah poskusa učinkovitosti kloniranja (iz dneva 2) po devetih dneh preštejemo prazne jamice. Izračunamo učinkovitost kloniranja (*cloning efficiency*-CE_{nemutante}).

Na ploščah poskusa selekcije mutant po 12 dneh preštejemo vdolbine, ki imajo male kolonije, in vdolbine, ki vsebujejo velike kolonije. Izračunamo število praznih vdolbin. Molekularna osnova za velike in male kolonije še ni povsem razjasnjena. Ena hipoteza predpostavlja gen, ki kontrolira celično rast in naj bi bil blizu Tk1 gena (19).

Poškodba kromosoma v tem delu naj bi vodila do upočasnjene rasti celice. Ugotovili so, da pri malih kolonijah dejansko prihaja do kromosomskih aberacij in nastajanja mikronukleusov z večjo frekvenco kot pri velikih kolonijah (20, 21). Avtorji so zaključili, da določitev števila malih kolonij lahko nakazuje obseg klastogenosti testirane substance poleg mutagenosti, ki jo pokažejo velike kolonije.

Iz podatkov, ki jih dobimo iz plošče poskusa selekcije mutant, določimo razmerje med malimi in velikimi kolonijami in učinkovitost kloniranja za mutante ($CE_{mutante}$). Iz razmerja ($CE_{mutante}$) / ($CE_{nemutante}$) izračunamo mutacijsko frakcijo.

3.3.4 Izračuni

IZRAČUN RELATIVNEGA PREŽIVETJA

Učinkovitost kloniranja (CE-cloning efficiency)

Iz razmerja med praznimi in polnimi jamicami izračunamo učinkovitost kloniranja (CE) po naslednji formuli (22):

$P(o)$ = prazne jamice/vse jamice

$CE = -\ln(P(o))$ /število celic na jamico

Faktor celičnega štetja (CCF – cell count factor)

Na začetku eksperimentiranja je gostota celic 3×10^5 celic/ml. Vsako odstopanje od te gostote na koncu eksperimentiranja izračunamo tako, da število celic v individualni kulturi, ki smo jo tretirali, delimo s povprečjem števila celic v kontrolnih kulturah:

CCF = individualna vrednost gostote celic po tretiranju /srednja vrednost gostote celic, tretiranih s topilom

Preživetje

Preživetje (**S – survival**) izrazimo kot zmnožek učinkovitosti kloniranja (CE) s faktorjem celičnega štetja CCF:

$S = CE \times CCF$

Relativno preživetje

Relativno preživetje (RS) je izraženo kot razmerje med vrednostjo preživetja (S) individualne kulture in povprečno vrednostjo preživetja (S) kontrolnih kultur.

$RS = S$ individualne kulture/ povprečna vrednost S kontrolnih kultur.

RELATIVNA SUSPENZIJSKA RAST (RSG – relative suspension growth)

Pri testiranju toksičnosti določimo tudi relativno suspenzijsko rast, to je zmožnost kulture, da se namnoži v dveh dneh do gostote 3×10^5 celic/ml:

Izračun za totalno suspenzijsko rast je:

(število celic dneva 1 /končna koncentracija dneva 0) x (število celic dneva 2 /končna koncentracija dneva 1)

% RSG (relativna suspenzijska rast) = ((vrednost suspenzijske rasti individualne kulture) / (vrednost suspenzijske rasti za povprečje kontrolnih kultur)) x 100.

OCENA PREŽIVETJA CELIC

Priporočeno izhodišče za oceno preživetja pri poskusu na mikrotitrskih ploščah je relativno preživetje v dnevu 0. Relativno preživetje v dnevu 0 predstavlja učinkovitost kloniranja kulture takoj

po tretiranju. Izračun je prilagojen tako, da upošteva izgubo celic zaradi toksičnosti med tretiranjem (22).

Izračun relativnega preživetja izvedemo po naslednjem postopku:

Na ploščah za poskus učinkovitosti kloniranja preštejemo prazne jamice. Iz teh podatkov izračunamo učinkovitost kloniranja (CE), faktor celičnega štetja (CCF), preživetje (S) in relativno preživetje (RS) po formulah točke 3.3.4.

Iz podatkov števila celic v posamezni kulturi ob upoštevanju dnevnih razredčitev izračunamo totalno suspenzijsko rast in relativno suspenzijsko rast (RGS) po formulah točke 3.3.4.

OCENA MUTACIJSKIH FRAKCIJ

Mutacijsko frakcijo določimo tako, da izračunamo razmerje med učinkovitostjo kloniranja mutant (CE_{mutant}) in učinkovitostjo kloniranja nemutant ($CE_{nemutant}$).

Učinkovitost kloniranja nemutant ($CE_{nemutant}$) izračunamo iz števila praznih jamic, ki jih dobimo iz plošče poskusa učinkovitosti kloniranja dneva 2 po formuli iz točke 3.4.4. Upoštevam število zasejanih celic (1,6 celic/ jamico).

Učinkovitost kloniranja za mutante (CE_{mutant}) izračunamo iz števila praznih jamic, ki jih dobimo iz plošče poskusa selekcije mutant po enaki formuli kot zgoraj. Upoštevam, da smo na teh ploščah zasejali 2000 celic na jamico.

Mutacijsko frakcijo izračunamo iz razmerja mutacij med kulturo, ki smo jo gojili v selektivnem gojišču, in kulturo, ki smo jo gojili v neselektivnem gojišču.

Mutacijska frakcija = $CE_{mutant} / CE_{nemutant}$

Vsako mutacijsko frakcijo izrazimo glede na 10^6 živih celic.

Frakcija velikosti kolonij

Za vsako kulturo določimo razmerje med številom malih in velikih kolonij.

4 Analiza in interpretacija rezultatov

4.1 Statistična analiza

Statistično značilno frekvenco mutacij določimo v skladu z navodili UKEMS (23). Logaritem frekvence mutacij kontrole primerjamo z logaritmom frekvence mutacij vsake testirane koncentracije z Dunnettovim testom. Iz podatkov, ki smo jih pridobili s testiranjem, z utežno regresijo preverimo linearni trend mutacijske frekvence. Test za linearni trend je »enorepi«, negativnega trenda ne upoštevamo. Ta test potrebuje izračun faktorja heterogenosti, da dobimo modificirano oceno variance.

4.2 Kriteriji za veljaven poskus

Poskus je veljaven, če dosežemo kriterije, ki se ujemajo z navodili UKEMS (21) in sklepi Portlandskega delovnega srečanja (24).

Doseči moramo naslednje kriterije:

1. Frekvenca mutacij negativne kontrole (topilo) mora doseči vrednosti, ki so znotraj normalnega območja (nad 60 mutant na 10^6

celic, vendar ne trikrat več od srednje vrednosti zgodovinskih okvirov (23, 24).

2. Vsaj ena koncentracija vsake pozitivne kontrole mora izzvati statistično značilno povečanje frekvence mutacij
3. Učinkovitost kloniranja negativnih kontrol iz eksperimentov mutagenosti mora biti v okviru med 60 in 140 % na dan 0 in med 70 in 130 % na dan 2 (23, 24).
4. Ne smejo se pojavljati tehnični problemi, kot je npr. kontaminacija, prevelika toksičnost, spremembe ozmolarnosti ali pH.

4.3 Kriteriji za vrednotenje rezultatov

Preizkušanece nemo kot mutagen, če so izpolnjeni naslednji kriteriji:

1. če je poskus veljaven (točka 4.2);
2. če je frekvenca mutacij ene ali več testiranih koncentracij statistično večja od negativne kontrole ($p < 0,05$);
3. če analiza linearnega trenda pokaže od doze odvisno povečanje frekvence mutacij.

5 Sklep

Kriteriji za mutagenost, ki jo določimo s tem testom, so enaki za vse kemikalije. Končna ocena o varnosti je odvisna od rezultatov ostalih testov in namena uporabe snovi. Pri zagotavljanju varne uporabe farmacevtikov je potrebno pred prvim preizkušanjem zdravilne učinkovine na človeka narediti *in vitro* teste za vrednotenje mutacij in kromosomskih poškodb. Standardna skupina predpisanih testov (omenjena v uvodu prispevka) mora biti narejena pred začetkom II. stopnje kliničnega preskušanja zdravila. Opisana metoda je torej eno od pomembnih orodij farmacevtske industrije za zagotavljanje varne uporabe zdravilnih učinkovin.

6 Literatura

1. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 1975; 347-64).
2. McGregor DB, Martin R, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay to Coded Chemicals. I: Results for Nine Compounds. *Environ Mutag* 1987; 9: 143-160.
3. McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay II: 18 Coded Chemicals. *Environ Molec Mutag* 1988; 11: 91-118.
4. McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Riach C, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay III: 72 Coded Chemicals. *Environ Molec Mutag* 1988; 12:85-154.
5. McGregor DB, Brown A, Howgate S, McBride D P, Riach CG, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay V: 27 Coded Environ Molec Mutag 1991; 17: 196-219.
6. McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Riach C, Shepherd W, Caspary WJ. Responses of the L5178Y Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay: V. Gases and Vapors. *Environ Molec Mutag* 1991;17: 122-29.
7. Clive D, Johnson KO, Spector JF, Batson AG, Brown MM. Validation and Characterization of the L5178Y/TK± mouse lymphoma mutagen assay system. *Mut Res* 1979; 59(1): 61-108.
8. Ficher, GA and Sartorelli AC. Development, Maintenance and Assay of Drug Resistance. *Methods in Medical Research* 1964; 10: 247-62.
9. Kao FT and Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proceedures of National Academy of Science USA* 1968; 60: 1275-81.
10. Clive D, Flamm WG, Machesko MR, Bernheim NJ. A Mutational Assay System Using the Tymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res* 1972;16: 77-87.
11. Fisher GA. Studies of The Culture of Leukemia Cells *In vitro* *Ann Ny Acad Sci* 1958; 76: 673-80.
12. Clive D, Spector JFS. Laboratory Procedure for Assessing Specific Locus Mutations at the TK Locus in Cultured L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mut Res* 1975;31: 17-29.
13. Clive D, Caspary W, Kirby PE, Krehl R, MOore M, Mayo J, Oberly TJ. Guide for Performing the Mouse Lymphoma Assay for Mammalian Cell Mutagenicity. *Mut Res* 1987; 189: 143-156.
14. Cole J, Arlett CF, Green MHL, Lowe J Muriel W. A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mut Res* 1983; 111: 371-386.
15. OECD guidelines for testing of chemicals; Section 4, Subpart 476; OECD, 1997.
16. ICH Topic S2A; Harmonised Tripartite Guideline CPM/ICH/141/95, approved September 1995 Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals; ICH 1995.
17. ICH Topic S2B: Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals for Humane Use. Step 4 Guideline, Brussels; ICH 1997.
18. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut Res* 1983;113: 173-215.
19. Liechty MC, Scalzi JM, Sims KR, Crosby H, Spencer DL, Davis LM, Caspary WJ and Hoizer JC. Analysis of large and small colony L5178Y tk⁻/tk⁻ mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis* 1998; 13: 461-474.
20. Hozier J, Sawyer J, Moore M, Howard B, Clive D. Cytogenetic analysis of the L5178Y tk⁻/tk⁻ mouse lymphoma mutagenesis assay system. *Mutat Res* 1981; 84: 169-181.
21. Blazak WF, os FJ, Rudd CJ, Caspary WJ. Chromosome analysis of small and large L5178Y mouse lymphoma cell colonies from mutagen-treated and control cultures. *Mutat Res* 1989; 224: 197-208.
22. Clements J. The Mouse Lymphoma Assay. 2000. *Mut Res* 455: 97-110.
23. Robinson WD, Green MHL, Cole J, Garner RC, Healy MJR, Gatehouse D, 1989; Statistical evaluation of bacterial/ mammalian fluctuation tests. V Statistical Evaluation of mutagenicity test data (Edited by Kirkland DJ) Cambridge University Press, pp 102-140.
24. Clive D, Bolcsfoldi G, Clements J, Cole M, Honma J, Majeska M, Moore L, Muller B, Myher T, Oberly M, Oudelkhim MC, Rudd C, Shimada H, Sofuni T, Thybaud V, Vilcox P. Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland Oregon, May7, 1994; *Environ Mol Mutagen* 1995; 25: 165-168.

Dušikov oksid III: zaviralci prekomernega nastajanja

Nitric oxide III: inhibitors of excessive formation

Janez Mravljak, Barbara B. Byrne Habič, Slavko Pečar

POVZETEK: Dušikov oksid lahko zaradi svoje radikalske narave pri povišanih koncentracijah povzroči številna obolenja in poškodbe tkiva na mestu prekomernega nastanka. NO sintaze – družina encimov, ki katalizirajo pretvorbo arginina do NO in citrulina, so pomembne terapevtske tarče, tako na nivoju vezave substrata in kofaktorjev, kakor tudi na nivoju genske ekspresije. Velik izziv za načrtovanje in razvoj novih zdravil predstavljajo izoformno selektivni inhibitorji NO sintaz.

Ključne besede: dušikov oksid, zaviralci NO sintaze, analogi L-arginina.

ABSTRACT: Due to its radical nature nitric oxide can cause many illness and injuries of tissue by elevated concentrations at the site of its excessive formation. NO synthases – family of enzymes that catalyze conversion of arginine to NO and citrulline, are important therapeutic targets at the level of binding of substrate and cofactors as well as at the level of gene expression. Isophormically selective inhibitors of NO synthases represent considerable challenges for drug development.

Key words: nitric oxide, inhibitors of NO synthase, analogues of L-arginine.

1 Uvod

V prvem strokovnem članku o dušikovem oksidu (1) smo predstavili kemizem in radikalsko naravo dušikovega oksida (NO) v organizmu, v drugem strokovnem članku (2) pa smo podrobneje obravnavali njegove biološke učinke in učinkovine, ki sproščajo NO v *in vivo* pogojih. V tem prispevku pa bomo predstavili prijemališča in razvoj nekaterih selektivnih inhibitorjev NO sintaz (NOS) kot potencialnih zdravilnih učinkovin pri preprečevanju in zdravljenju obolenj oziroma poškodb povezanih s prekomernim nastajanjem NO.

Družina NOS obsega pri sesalcih tri izoformne oblike, ki so jih poimenovali po lastnostih oziroma tipu celic v katerih so jih prvič opisali: endotelijska NOS (eNOS), nevronska NOS (nNOS) in inducibilna NOS (iNOS) (3). Fiziološka vloga NO je določena predvsem z izoformno obliko NOS, ki ga tvori; lahko nastopa kot medcelični mediator ali kot citotoksični agens v imunskem sistemu. S prekomerno tvorbo NO v določenih okoliščinah pa lahko NOS povzročijo poškodbe tkiva pri številnih obolenjih. V teh primerih bi lahko dosegli terapevtsko ugodne učinke s selektivno inhibicijo iNOS in nNOS, medtem ko je dolgotrajna inhibicija eNOS vsekakor škodljiva.

2 Zaviranje prekomernega nastajanja NO

Povečana lokalna koncentracija NO ob hkratni prisotnosti drugih reaktivnih kisikovih in dušikovih vrsti dokazano povzroči okvare v vsakem tkivu (1, 3). Prekomerno izražanje iNOS so opazili pri modelih sep-

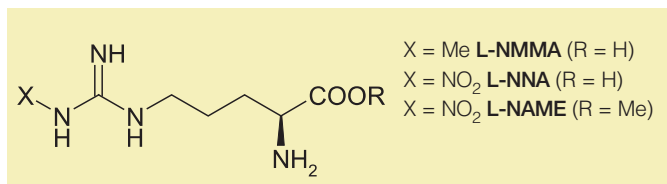
tičnega šoka, pri vseh vnetjih, astmi in v možganih po ishemiji ali travmi. V številnih nevrodegenerativnih obolenjih kot so Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza, Parkinsonova bolezen ter pri avtoimunih obolenjih (celiakija, artritis) ima iNOS pomembno vlogo (4). Žal iNOS ni edini vzrok za porast NO. Opisali so tudi prekomerno aktivnost nNOS. Dokazali so, da se z N-metil-D-aspartatom (NMDA) inducirana neurotoksičnost zmanjša ob sočasni uporabi zaviralcev NOS in da so pri miših z okvarjeno nNOS poškodbe zaradi kapi blažje (5). Znano je, da NO sintaze lahko v nekaterih okoliščinah tvorijo tudi superoksidni radikal, neodvisno od tvorbe NO. Za nNOS ugotavljajo, da najlažje tvori superoksidni radikal, ko sta koncentraciji tetrahidrobiopterina (kofaktor) ali arginina (substrat) nizki, pa tudi ob prisotnosti zaviralcev podobnim argininu (6). Z omejitvijo prekomernega nastajanja NO lahko pričakujemo določene terapevtske učinke. Glavni problemi so specifičnost zaviranja samo določenega tipa NOS v določenih tkivih, še zlasti so terapevtsko zanimivi zaviralci iNOS in nNOS. Njihov razvoj je v središču današnjih raziskav. Po mehanizmu delovanja so zaviralci NOS:

- analogi arginina,
- zaviralci dimerizacije NOS,
- zaviralci kofaktorjev NOS in
- zaviralci, ki delujejo po drugih mehanizmih.

2. 1 Zaviralci podobni L-argininu

L-arginin (L-Arg) v visokih koncentracijah (nad 100 μM) zavira eNOS. Učinek je posledica njegove vezave na alosterično mesto NOS in s tem ovirana vezave L-Arg na aktivno mesto encima. Prvi znani zavi-

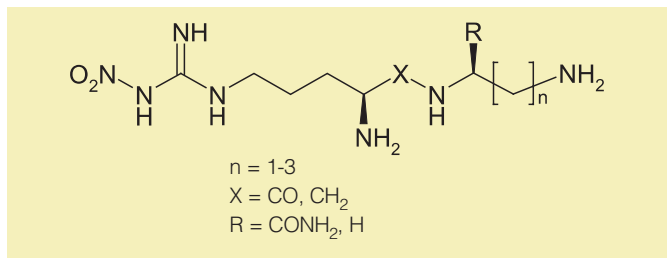
ralci so bili preprosti analogi L-Arg, npr.: N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginin (L-NNA) in njegov metilni ester (L-NAME) (7, 8, 9) (slika 1). Čeprav so si spojine strukturno podobne, zavirajo NOS na različne načine.



Slika 1: Prvi opisani zaviralci NOS: N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginin (L-NNA) in njegov metilni ester (L-NAME).

Figure 1: First known inhibitors of NOS: N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) and its methyl ester (L-NAME).

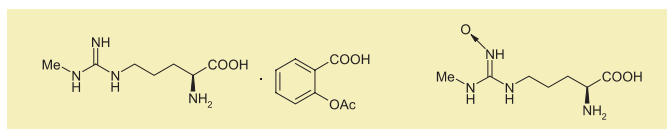
L-NMMA, ki je izoformno nespecifičen inhibitor, uporaben v raziskovalne namene, pretvori encim v *N*-hidroksi-*N*-metil-L-arginin. Pri tem nastane H_2O_2 , ki ireverzibilno okvari encim. V majhnih odmerkih ima L-NMMA ugodne učinke pri terapiji septičnega šoka, glavobola ter astme. Zmanjša tudi vnetje kože, povzročene z ultravijolično svetlobo (3, 6). L-NNA pa spremeni konformacijo aktivnega mesta NOS in prepreči vezavo L-Arg. Tovrstni zaviralci se vežejo na NOS počasi in počasi tudi disociirajo (10). Po vzoru *N*-nitroarginina (L-NNA) so pripravili analoge, ki so selektivni inhibitorji nNOS (11, 12) (slika 2).



Slika 2: Peptidni in neamidni analogi L-NNA kot selektivni inhibitorji nNOS.

Figure 2: Peptide and nonamide analogues of L-NNA as selective inhibitors of nNOS.

Sol L-NMMA in acetilsalicilne kisline (slika 3) je kombinacija dveh neselektivnih inhibitorjev encimov: NOS in ciklooksigenaze. V kliničnih testiranjih (6) jo preizkušajo za zdravljenje revmatoidnega artritisa, kardiovaskularnih motenj in motenj v cerebralni cirkulaciji.

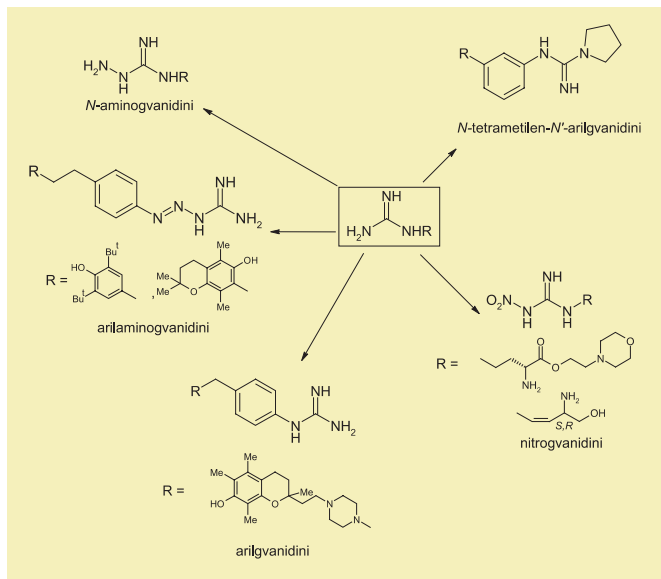


Slika 3: Sol L-NMMA in acetilsalicilne kisline in *N*-oksid L-NMMA.

Figure 3: Salt of L-NMMA and acetylsalicylic acid and *N*-oxide of L-NMMA.

Ugotovili so da z majhnimi spremembami v argininskem delu povečamo selektivnost bodisi v smeri iNOS ali nNOS. *N*-oksid L-NMMA (slika 3) je učinkovit zaviralec iNOS, ki zavre tvorbo NO po stimulaciji z lipopolisaharidi. Zamenjava metilne skupine pri L-NMMA s propilno (*N*-propil-L-Arg) ali ciklopropilno (*N*-ciklopropil-L-Arg) pa da selektivnejši nNOS zaviralec (6).

Številni analogi arginina, citrulina, tiocitrulina in njihovih derivatov so pretežno kompetitivni zaviralci nNOS. Te spojine preprečijo tudi tvorbo reaktivnih kisikovih spojin in bi bile lahko uporabne proti hipotenziji, žveplo vsebujoči derivati pa pri terapiji artritisa, migrene in postoperativnega ileusa (3, 6).



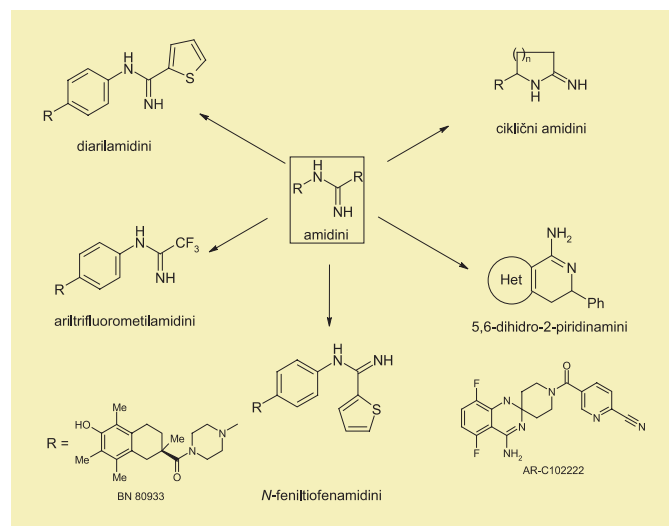
Slika 4: Derivati gvanidina kot zaviralci NOS

Figure 4: Guanidine derivatives as NOS inhibitors

Med arilaminogvanidini in arilgvanidini (slika 4) so našli selektivne zaviralce iNOS, ki bi bili uporabni za zdravljenje septičnega šoka, hipotenzije, revmatoidnega artritisa, ulceroznega kolitisa in od insulinske odvisnega diabetesa (3, 6). Zanimiv je poskus združitve antioksidanta (derivat vitamina E) in zaviralca NOS (Slika 4, arilgvanidinski derivat) v eno molekulo, ki istočasno zavira lipidno peroksidacijo in nastajanje NO s približno enako učinkovitostjo (13). Za derivate *N*-tetrametilen-*N'*-arilgvanidinov so ugotovili, da bi bili lahko kot selektivni zaviralci nNOS (14, 15) (Slika 4) učinkoviti pri terapiji nevrodegenerativnih bolezni, izboljšanju krčenja želodca in pri vnetnih obolenjih. Proučujejo tudi uporabnost nitrogvanidinov, ki so zaviralci nNOS in iNOS pri zdravljenju kardiovaskularnih bolezni, motnjah cerebralne cirkulacije, aterosklerozi, diabetesu in sepsi.

Za amidine (slika 5) so ugotovili, da so selektivni zaviralci nNOS. Med njimi iščejo učinkovine za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (6).

Tudi med *S*-substituiranimi izotiosečinami so učinkoviti inhibitorji NOS (3, 6, 16) (Slika 6). Podobno kot L-NMMA, te spojine poškodujejo okolico hema NOS in tako preprečijo interakcijo encima s sub-

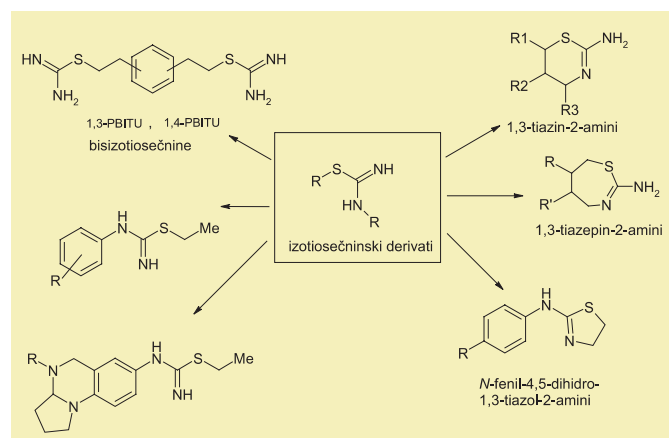


Slika 5: Derivati amidina
Figure 5: Amidine derivatives

stratom. S-alkil izotiosečnine so učinkovitejši zaviralci, kot derivati arginina. Zaradi žveplovega atoma, ki ima veliko afiniteto do hema je S-metilizotiosečnina 500 krat učinkovitejši zaviralec iNOS, kot N-metil-L-arginin. Med S-alkil izotiosečninami so tudi selektivni inhibitorji nNOS, ki imajo terapevtski potencial pri zmanjševanju poškodb nevronov ob možganski kapi in drugih nevrodegenerativnih obolenjih. Bis-izotiosečnine (1,3-PBITU, 1,4-PBITU; slika 6) kot prvi selektivni zaviralci iNOS, so zaradi nizke biološke uporabnosti in toksičnosti (vpliva na Na^+/K^+ ATPazo) neuporabni.

S študijem vezave ligandov na NOS so prišli do treh značilnosti, ki jih mora imeti izoformno selektivni zaviralec (3, 16):

-na ogrodju mora biti gvanidinska, amidinska ali (tio)sečninska skupina, ki lahko tvori vodikovo vez z glutamatno stransko verigo v aktivnem mestu NOS. Prisotnost manjše hidrofobne skupine (alkilna ali tienilna) je ugodna, ker omogoča dodatno hidrofobno interakcijo;

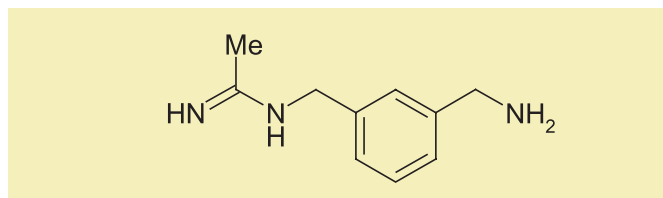


Slika 6: Izotiosečninski derivati
Figure 6: Isothiourea derivatives.

-zaviralec mora imeti funkcionalno skupino, ki zagotavlja izoformno selektivnost z možnostjo tvorbe primerne vzorca vodikovih vezi. S to skupino izkoriščamo razlike v aminokislinah med posameznimi izoformami v kanalu, po katerem pride substrat do aktivnega mesta;

-zaviralec mora imeti distančnik med obema deloma, ki je primerno dolg in gibljiv, da doseže izoformno specifična področja.

Kljub veliki podobnosti arginin vezavnih mest pri izoencimih NOS so razvili visoko selektivne inhibitorje. Naj omenimo 1400W (slika 7), ki je 10000 krat selektivnejši pri zaviranju iNOS kot eNOS in 30 krat selektivnejši glede na nNOS (3, 6, 17). Kljub ugodni učinkovitosti in selektivnosti pa je 1400W preveč toksična spojina, da bi jo uporabljali.



Slika 7: Kemična struktura 1400W
Figure 7: Chemical structure of 1400W

2. 2 Zaviralci dimerizacije NOS

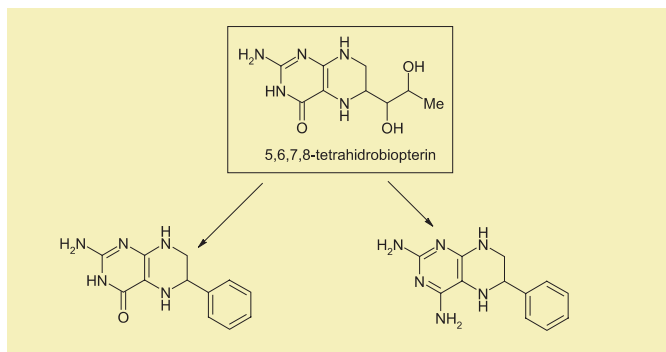
Vse izoformne oblike NOS postanejo katalitično aktivne šele, ko dimerizirata dve podenoti encima (3). Na nastajanje NO vplivamo tudi tako, da oviramo nastanek aktivnega dimera NOS iz monomernih enot. Opisani so derivati imidazolov, ki ob vezavi na hem v monomeru iNOS motijo eno od vijačnic monomera tako, da spremenijo strukturo vezavnega mesta za arginin (18). Inhibitor-monomer kompleks tako ne more tvoriti niti arginin- niti tetrahydrobiopterin vezavnega mesta. Opisane lastnosti imajo tudi protiglivične učinkovine: klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, ki poleg tega preprečujejo vezavo kalmomodulina na iNOS. Kot zanimivi so se izkazali pirimidinimidazoli, med 2-aminopiridini pa so že našli številne relativno selektivne iNOS in nNOS inhibitorje (6).

2. 3 Zaviralci kofaktorjev NOS

Za encimsko aktivnost NOS so potrebni kofaktorji (6R)-5,6,7,8,-tetrahydrobiopterin (BH_4), flavinadenin dinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), železov protoporfirin IX (hem) in kalmodulin, ki se vežejo na svoja vezavna mesta na aktiviranem dimeru NOS (3). Zaviralci vezave flavina in kalmomodulina so že dolgo znani, toda zaradi nezmožnosti doseganja selektivnosti so neuporabni. Večjo pozornost posvečajo snovem, ki zavirajo vezavo tetrahydrobiopterina. Kofaktor (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin maksimalno aktivira vse tri NOS in stabilizira kvarterno strukturo encima. S pomočjo 3D-modela postavljenega s poznavanjem kvantitativnega odnosa med strukturo in delovanjem (3D-QSAR) so določili strukturne zahteve za zaviranje nNOS: 4-okso- in 4-aminopteridini (slika 8) zavirajo nNOS desetkrat selektivneje kot ostale NOS (19).

2. 4 Drugi zaviralci

Našli so tudi endogene peptide in proteine, ki se vežejo na izoforme NOS in zavirajo njihovo aktivnost (3). nNOS inhibira 89 aminokislinski dolgi protein, imenovan protein inhibitor NOS (PIN), ki se veže na N-termi-



Slika 8: 4-okso- in 4-aminopteridinski inhibitor izpeljana iz strukture kofaktorja 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina

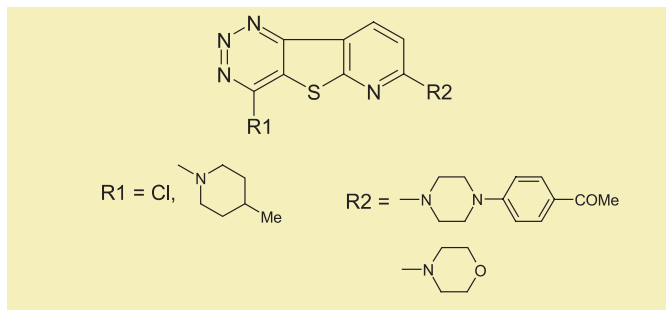
Figure 8: 4-oxo- and 4-aminopteridine inhibitors derived from the structure of cofactor 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine

nalni konec encima. Odkrili so tudi druge inhibitorne domene na eNOS in nNOS, ki bi lahko bile tarčna mesta za selektivno inhibicijo. Tako *in vivo* aplikacija ogrodne domene kaveolina-1 inhibira eNOS aktivnost, kar potrjuje, da utegne biti ta pristop uporaben.

V literaturi je opisanih veliko učinkovin (tako endogenega kot ekso-genega izvora), ki vplivajo na ekspresijo inducibilne NO sintaze (iNOS) (20). Del učinka uveljavljenih glukokortikoidov, je posledica zaviranja transkripcije gena za iNOS. Obetajoča učinkovina, ki je v fazi kliničnega testiranja, je analog heptapeptida α -melanocite stimulirajočega hormona (6, 21). Ta analog zavira izražanje številnih ključnih citokinov, kot so interleukini -1 β , -6 in -10 in TNF- α , kakor tudi iNOS. Poznani so tudi piridotienotriazinski derivati, ki nespecifično zavirajo izražanje iNOS in ciklooksigenaz (COX-1 in COX-2), vendar še ni povsem jasno, ali bo mogoče doseči selektivno zaviranje transkripcije gena za iNOS (6). Podobno ni jasno, ali bo možno doseči povečanje ekspresije gena za eNOS. (Slika 9)

3 Sklep

Poleg znanih donorjev dušikovega oksida, ki jih že vrsto let uspešno uporabljamo v terapiji in katerih delovanje so pojasnili z odkritjem vloge NO v telesu, raziskovalci iščejo in preizkušajo nove zdravilne učinkovine, z drugačnimi mehanizmi sproščanja NO, ki bi lahko delo-



Slika 9: Piridotienotriazinski derivati kot nespecifični zaviralci ekspresije iNOS in ciklooksigenaz.

Figure 9: Pyridothienotriazine derivatives as nonspecific inhibitors of iNOS and cyclooxygenases expression.

vale na želena tarčna mesta in učinkovine, ki bi uravnemale nastajanje NO. Dejstvo, da ima NO v mnogih patofizioloških procesih večplastno vlogo, otežuje odkritje zaviralcev iNOS in nNOS, ki bi učinkovito posegli v uravnavanje nastajanja NO in s tem v doseganje želenega učinka brez neugodnih posledic. V prednosti bodo učinkovine, ki bodo tkivno selektivne ter specifične za posamezno izomorfno obliko NOS, pri čemer pa je že sedaj znano, da je primernejša delna inhibicija sintaze NO od popolne.

Glede na vpletenost NO v številne procese v telesu, je pred raziskovalci velik izziv pri načrtovanju takih učinkovin, ki bodo uravnemale le določene procese, zato verjetno ne moremo pričakovati kmalu velikih preobratov na tem področju. Velik napredek bo, če bo uspelo dostavljati izbran zaviralec določene izomorfne oblike NOS v določeno tkivo. V tem primeru pa lahko pričakujemo velike spremembe pri mnogih obolenjih, ki jih danes nemočno opazujemo.

4 Literatura

- Byrne Habič B, Mravljak J, Pečar S. Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost in nastajanje NO v organizmu. *Farm Vestn* 2004; 55: 283-291.
- Mravljak J, Byrne Habič B, Pečar S. Dušikov oksid I: biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO. *Farm Vestn* 2005; 56: 11-16.
- Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why?. *Drug Discov Today* 2002; 1: 939-950.
- Hobbs A J, Higgs A, Moncada S. Inhibition of Nitric Oxide Synthase as a Potential Therapeutic Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:191-220.
- Bird D C, Bujas-Bobanovic M, Robertson H A et al. Lack of phencyclidine-induced effects in mice with reduced neuronal nitric oxide synthase. *Psychopharmacology* 2001; 155: 299-309.
- Granik V G, Grigor'ev N B. Nitric oxide synthase inhibitors: biology and chemistry. *Russ Chem Bull* 2002; 51: 1973-1995.
- Peterlin-Masic L, Kikelj D. Arginine mimetics. *Tetrahedron* 2001; 57 (33): 7073-7105.
- Moore W M, Webber R K, Jerome G M et al. L-N^G-(1-Iminoethyl)lysine: A Selective Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem* 1994; 37: 3886-3888.
- Babu B R, Griffith O W. N^G-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. *J Biol Chem* 1998; 273 (15): 8882-8889.
- Wolfe M M. Future Trends in the Development of Safer Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am J Med* 1998; 105 (5A): 44S-52S.
- Huang H, Martásek P, Roman L J et al. Synthesis and Evaluation of Peptidomimetics as Selective Inhibitors and Active Site Probes of Nitric Oxide Synthases. *J Med Chem* 2000; 43: 2938-2945.
- Hallinan E A, Tsymbalov S, Dorn C R et al. Synthesis and Biological Characterization of L-N^G-(1-Iminoethyl)lysine 5-Tetrazole-amide, a Prodrug of a Selective iNOS Inhibitor. *J Med Chem* 2002; 45: 1686-1689.
- Chabrier P E, Auguet M, Spinnnewyn B et al. BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: A promising neuroprotective strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10824-10829.
- Beaton H, Hamley P, Nicholls D J et al. 3,4-Dihydro-1-isoquinolinamines: A Novel Class of Nitric Oxide Synthase Inhibitors with a Range of Isoform Selectivity and Potency. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 1023-1026.
- Beaton H, Boughton-Smith N, Hamley P et al. Tienopyridines: Nitric Oxide Synthase Inhibitors with Potent In Vivo Activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 1027-1030.
- Raman C S, Li H, Martásek P et al. Implications for Isoform-selective Inhibitor Design Derived from the Binding Mode of Bulky Isothioureas to the Heme Domain of Endothelial Nitric-oxide Synthase. *J Biol Chem* 2001; 276: 26486-26491.
- Garvey E P, Oplinger J A, Purfine E S et al. 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase *in Vitro* and *in Vivo*. *J Biol Chem* 1997; 272: 4959-4963.
- Wolff D J, Datto G A, Samatovicz R A. The Dual Mode of Inhibition of Calmodulin-dependent Nitric-oxide Synthase by Antifungal Imidazole Agents. *J Biol Chem* 1993; 268: 9430-9436.
- Matter H, Kotsionis P, Klingler O et al. Structural Requirements for Inhibition of the Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS-I): 3D-QSAR Analysis of 4-Oxo- and 4- Amino- Pteridine-Based Inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45: 2923-2941.
- Rao K M K. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Env Heal B* 2000; 3(1): 27-58.
- Annual Drug Data Report series. Ed J R Prous, Prous Science, S A, Barcelona-Philadelphia 1998, 20: 45.

Izdelava pelet z različnimi granulacijskimi tekočinami in vpliv hidrodinamskih razmer v Wursterjevi komori na učinkovitost filmskega oblaganja

Stane Srčič (doktorska disertacija Roka Dreua)

Mladi raziskovalec Rok Dreua je na Fakulteti za farmacijo izdelal in zagovarjal doktorsko disertacijo z naslovom Izdelava pelet z različnimi granulacijskimi tekočinami in vpliv hidrodinamskih razmer v Wursterjevi komori na učinkovitost filmskega oblaganja. Razumevanje fizikalnih procesov, ki potekajo in so prisotni med delci trdne snovi ter tekočino, je bistveno pri nadzoru tehnološkega procesa in izdelovanju farmacevtske oblike. Cilj doktorskega dela je bil določiti vpliv granulacijske tekočine na lastnosti pelet ter poiskati ustrezno teoretično razlago oz. fizikalno količino, ki bi opisovala spremembe lastnosti pelet preko razlik v lastnostih uporabljenih granulacijskih tekočin. Vpeljali smo zmnožek površinske napetosti (γ_L), dielektrične konstante granulacijske tekočine (ϵ_R) in kosinusa stičnega kota granulacijske tekočine s trdnimi snovmi pelete ($\cos(\Theta)$) z namenom razlage mehanizma nastanka razlik v lastnostih pelet. Produkt $\gamma_L \cdot \cos(\Theta) \cdot \epsilon_R$ smo vpeljali, ker menimo, da obstaja fizikalno ozadje, ki omogoča razlago vpeljanega zmnožka kot sorazmernostnega faktorja s seštevkom sil zgoščitve aglomerata med sušenjem in sil, ki zgoščitvi aglomerata nasprotujejo. Pelete smo izdelali s tehnologijo iztiskanja in krogljičenja ob uporabi vode, etanola in vodno/etanolnih mešanic kot granulacijskih tekočin. Vrednotenje izdelanih pelet je pokazalo, da natezna trdnost in čas razpadnosti pelet naraščata z naraščanjem vrednosti vpeljanega zmnožka $\gamma_L \cdot \cos(\Theta) \cdot \epsilon_R$, medtem ko se obrabnost, povprečni premer por in poroznost pelet zmanjšujejo. Obstoj korelacij med predlaganim zmnožkom in lastnostmi pelet kaže na to, da granulacijska tekočina vpliva na končne mehanske in strukturne lastnosti pelet prek vpliva na velikost sil zgoščitve in sil, ki zgoščitvi med procesom sušenja aglomerata nasprotujejo. Hkrati pa poznavanje vrednosti predlaganega zmnožka nakazuje možnost napovedovanja mehanskih lastnosti pelet.

Poznavanje, razumevanje in obvladovanje postopka oblaganja z Wursterjevo procesno komoro nam omogoča zagotavljanje zveznih, enakomernih in ponovljivih filmskih oblog. Namen dela je pokazati povezavo med enakomernostjo in kakovostjo filmske obloge pelet ter povprečnim volumskim deležem pelet v področju razmejitvenega valja Wursterjeve komore in s tem eksperimentalno potrditi pomen volumskega deleža pelet. V ta namen smo obložili vzorce pelet pri

različnih masnih tokovih zraka in različnih velikostih reže med distribucijsko ploščo in razmejitvenim valjem. RSD-je debelin filmske obloge smo določili prek posredne metode določanja raztrosa debeline filmske obloge z določanjem koncentracije barvila v filmski oblogi. Z vgradnjo lopute v procesno komoro smo določili volumske deleže pelet v področju razmejitvenega valja, in sicer pri različnih masnih tokovih zraka in velikostih reže. Z množenjem volumskega deleža pelet in lokalne hitrosti pelet, ki smo jo določili s snemanjem s hitro kamero, smo dobili relativno merilo masnega toka pelet. Ugotovili smo, da je masni tok pelet pri določenem masnem toku zraka skozi komoro skoraj konstanten oziroma neodvisen od velikosti reže med razmejitvenim valjem in distribucijsko ploščo. Primerjava med merilom za masni tok pelet ter RSD-je debeline obloge ni pokazala povezave, medtem ko se RSD debeline filmske obloge linearno povečuje z večanjem volumskega deleža pelet v področju oblaganja (ϵ_S) kot posledica učinka medsebojnega senčenja, vendar le za eksperimente oblaganja s podobnimi velikostmi rež med razmejitvenim valjem in distribucijsko ploščo (20, 25 mm).

Z namenom razumevanja rezultatov in želje po nadomestitvi eksperimentov smo pričeli z razvojem CFD simulacije gibanja delcev v Wursterjevi komori. S Pitotovo cevjo smo pomerili hitrostne profile zraka znotraj razmejitvenega valja Wursterjeve komore ter izračunali masne tokove zraka. S CFD orodjem Fluent 6.1 smo razvili simulacijo gibanja toka zraka skozi Wursterjevo komoro ob odsotnosti pelet. Na podlagi primerjave eksperimentalnih vrednosti masnih tokov zraka skozi razmejitveni valj s simulacijskimi vrednostmi lahko trdimo, da simulacija ob načrtani računski mreži, izbranem standardnem k-e turbulentnem modulu ter predpisanih robnih pogojih daje ustrezne rezultate. Dobljeni rezultati predstavljajo trdno osnovo za nadaljnji razvoj simulacije.

Dr. Rok Dreua, mag. farm., je zagovarjal doktorsko disertacijo 7. januarja 2005 na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Mentor: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm., Fakulteta za farmacijo

Somentor: prof. dr. Iztok Žun, univ.dipl.inž.str., Fakulteta za strojništvo

Pomembnost porfirinov v laboratorijski diagnostiki

Importance of porphyrins in laboratory diagnostics

Ljuba Krnjak, Milan Skitek

POVZETEK: Porfirini so ciklični tetrapiroli, derivati osnovnega tetrapirrol porfina. So vmesni presnovni produkti v biosintezi hema. Sintetizirajo se v vseh celicah sesalcev. Pri zdravem človeku se v manjših količinah izločajo iz organizma z blatom in urinom. Poznamo tri glavne vrste porfirinov: uroporfirin, koproporfirin in protoporfirin. Bolezni, ki se pojavljajo v zvezi z njimi, so dedne ali pridobljene motnje v biosintezi hema. Za boljše razumevanje jih razdelimo v eritropoetične ali hepatične oblike, glede na primarni položaj pomanjkanja encima. Za klinični dokaz hepatičnih porfirij so ponavadi pomembni sekundarni dejavniki kot: zdravila, hormoni, prehrana, alkohol, določene halogenske hidrokarbonske mešanice in poškodbe jeter. Pri akutnih hepatičnih porfirijah je nujno takojšnje diagnosticiranje in zdravljenje.

Ključne besede: porfirini, porfirija, porfinurija, porfirinemija.

ABSTRACT: Porphyrins are cyclic tetrapyrroles which can be considered as derivatives of the parent tetrapyrrole. They are synthesized in all mammalian cells. They excrete of the health human body in small quantities through excrement and urinous. In humans, there are three major porphyrins: uroporphyrin, coproporphyrin and protopotphyrin. Porphyrias are hereditary or acquired disorders of heme biosynthesis. For practical reasons, they are classified into erythropoietic or hepatic forms according to the primary site of enzyme deficiency. For the clinical manifestation of hepatic porphyrias secondary factors are usually of importance, e.g. drugs, hormones, nutrition, alcohol, certain halogenated hydrocarbon compounds, hepatic lesions. Acute hepatic porphyrias have to give rise to medical emergencies and require intensive care treatment.

Key words: porphyrins, porphyrias, porphyuremia, porphyrinemia

1 Uvod

Porfirije spadajo v skupino redkih bolezni. Pojavljajo se po vsem svetu. Povezane so s podedovanimi in pridobljenimi motnjami v biosintezi hema. Primarne ali podedovane bolezni v porfirinskem metabolizmu so relativno redke, pogostejše so nekatere sekundarne ali pridobljene motnje. Laboratorijska diagnostika porfirinskih bolezni je v osnovi povezana z analitiko porfirinov in porfirinskih intermediatov. Vedno bolj postajajo pomembni analizni postopki, ki omogočajo spremljanje koncentracij metabolitov, značilnih za porfirinske motnje.

2 Zgradba in vrste porfirinov

Porfirini so ciklični tetrapiroli, derivati osnovnega tetrapirrol porfina. V derivatih porfina so β -vodikovi atomi popolnoma ali delno substituirani z različnimi stranskimi verigami, kot so: alkil, hidroksialkil, vinil, karbonil ali karboksilna skupina. Različni porfirini so razvrščeni glede na vrsto stranskih verig. V skladu s tem razlikujemo naslednje porfirine: protoporfirin, koproporfirin, etioporfirin, mezoporfirin in uroporfirin. Vsi naravni protoporfirini vsebujejo dve različni stranski verigi vsakega pirolovega obroča. Torej so pri dveh različnih verigah možne štiri izomere. Protoporfirin se v naravi nahaja le kot izomer številka IX in ker je opredeljen kot derivat koproporfirina III, se lahko imenuje tudi

protoporfirin III. Protoporfirin IX je v obliki hema in hemoglobina, mioglobina in v večini citokromov. Porfirini kompleksirajo številne kovinske ione in tvorijo metaloporfirine. Porfirinogeni, ki so intermediiati v sintezi porfirinov predstavljajo porfirine, v katerih sta dva dušika v pirolnih obročih in vsi metilenski ogljiki hidroženirani. Vsi biološki metaloporfirini se na enak način sintetizirajo do stopnje protoporfirina IX (1).

3 Biosinteza porfirinov in hema

Ime »porfirin« je grškega izvora in izhaja iz besede »porphyrin«. Rastopine porfirinov so temno rdeče do škrlatno obarvane. V strukturi tetrapirolovega obroča so prisotne številne konjugirane dvojne vezi. Porfirini in hem se sintetizirajo v vseh celicah sesalcev. Aktivnost biosinteze je najbolj pomembna v kostnem mozgu in jetrih. Niz reakcij vodi do sinteze hema, ki se začne s sukcinil koecimom A in glicinom ter konča z vključitvijo Fe^{2+} iona v molekulo protoporfirina IX (Slika 1) (2). Pri sintezi hema sodeluje osem encimov, štiri v mitohondrijih in štiri v citosolu. Predlagana imena encimov so bila objavljena leta 1992 v soglasju s komisijo za nomenklaturu "The International Union of Biochemistry" (Mednarodno združenje za biokemijo). Sprejeta imena encimov so preprečila zamenjave z do tedaj uporabljenimi imeni. Imena encimov so navedena v preglednici 2 (3).

Sintaza aminolevulinse kisline EC 2.3.1.36

V prvi reakciji biosinteze hema nastane aminolevulinška kislina (ALA). Sintetizira se v mitohondrijih z encimom sintazo aminolevulinse kisline iz glicina in sukcinil koencima A v prisotnosti piridoksalfosfata. Aktivnost encima sintaze aminolevulinse kisline uravnava hitrost celotne sinteze hema, vendar je njena aktivnost manjša od aktivnosti ostalih encimov sistema (4).

Sintaza porfobilinogena EC 4.2.1.24

Drugi encim v biosintezi hema je encim sintaza porfobilinogena, ki katalizira nastanek porfobilinogena iz dveh molekul ALA. ALA nastaja v mitohondrijskem matriksu in se premika v citosol, kjer deluje. Zmanjšana aktivnost sintaze porfobilinogena je zelo redka motnja. Bolezen se deduje avtosomno recesivno. Pri homozigotih je aktivnost encima zmanjšana za več kot 95 %. V literaturi najdemo opisanih šest takšnih primerov. Oseba, ki je heterozigotna za mutacijo, ne zbolí, je zgolj prenašalka. Heterozigoti so povezani s prirojenimi porfirinskimi motnjami. Oblike motenj so blage, včasih nezaznavne (fenotipsko, biokemijsko) ali pa so klinično spregledane. Povzročitelji motenj so lahko zunanji dejavniki, na primer svinec. Laboratorijska ugotovitev o znižani aktivnosti sintaze porfobilinogena pokaže zvišano koncentracijo ALA z normalno koncentracijo porfobilinogena (5).

Hidroksimetilbilan sintaza EC 4.3.1.8

Tretji encim v biosintezi hema je hidroksimetilbilan sintaza, ki katalizira sintezo štirih molekul porfobilinogena v hidroksimetilbilan (6). Akutna intermitentna porfirija se pojavi pri posamezniku, kjer je aktivnost hidroksimetilbilan sintaze v eritrocitih 50 % ali manj. Bolezen je avtosomno recesivna. Za pojav teh obolenj je potrebna mutacija na obeh alelih genskega lokusa. Incidenca v svetu je približno 5 do 10 primerov na 100 000 prebivalcev. Več kot 90 % posameznikov z mutiranim genom nikoli ne zbolí (7).

Uroporfirinogen III sintaza EC 4.2.1.75

Četrty encim v biosintezi hema je uroporfirinogen III sintaza. Ta katalizira pretvorbo hidroksimetilbilana v uroporfirinogen. Pri homozigotih je aktivnost encima nizka. Heterozigoti pri tem niso prizadeti. Motnja se izraža z močno fotoobčutljivostjo in temno rdečo barvo urina v neonatalnem obdobju (8). Zobje in kosti fluorescirajo. Ko bolezen napreduje, zajame še druge dele telesa, na primer prste in nos, ki so izpostavljeni sončnim žarkom. Smrt najpogosteje nastopi že v zgodnjem otroštvu. Nastop bolezní v kasnejšem življenjskem obdobju vodi v kopičenje porfirinov, ki ni vedno povezano z značilno fotoobčutljivostjo. Pri bolnikih so opazne brazgotine in deformacije rok, prstov, nosu in ušes. Laboratorijske preiskave pokažejo zvišano izločanje porfirinov v urinu, tudi do 20-krat več kot je normalno. To je redka avtosomno recesivna motnja, ki se pojavlja kot kongenitalna eritropoetična porfirija ali Güntherjeva bolezen (4).

Uroporfirinogen dekarboksilaza EC 4.1.1.37

V peti stopnji biosinteze hema se uroporfirinogen dekarboksilira v koproporfirinogen. Porfirija kutanea tarda je najbolj prepoznavna porfirija z incidenco 1 primer na 25 000. Pojavlja se kot dedna ali pridobljena bolezen. Porfirija kutanea tarda je avtosomno dominantno dedna bolezen in ima 50 % zmanjšano aktivnost encima v jetrih in eritrocitih. Nasprotno je pri pridobljeni porfiriji kutanea tarda za 50 % zmanjšana aktivnost encima le v jetrih, v eritrocitih pa je aktivnost encima normalna. Pri bolnikih se pojavi značilna prizadetost kože in

jetet. Laboratorijski rezultati pokažejo zvišane vrednosti uroporfirinov in koproporfirinov v urinu (9). Hepatoeritropoetična porfirija je zelo redka dedna bolezen, pri kateri aktivnost encima ponavadi za 5 do 10 % odstopa od normalne aktivnosti (4).

Koproporfirinogen oksidaza EC 1.3.3.3

Koproporfirinogen oksidaza je šesti encim, ki sodeluje v biosintezi hema. Nahaja se na notranji strani membrane mitohondrija. Mehanizmi za transport reaktantov in produkta skozi mitohondrijske membrane niso pojasnjeni.

Hereditarna koproporfirija je akutna hepatična porfirija, ki se izraža kot akutna nevrološka porfirija ali porfirija s fotoobčutljivostjo ali pa kot oboje hkrati (v približno 30% primerov). Bolezen se deduje avtosomno dominantno s prirojeno encimsko okvaro koproporfirinogen oksidaze. Laboratorijske preiskave pokažejo zvišanje koproporfirina III v blatu in urinu. V akutnih stanjih bolezní so zvišane vrednosti porfobilinogena in ALA v urinu. Bolniki so občutljivi na sončno svetlobo zaradi kopičenja porfirinov v koži (10).

Protoporfirinogen oksidaza EC 1.3.3.4

Sedmi encim v biosintezi hema je encim protoporfirinogen oksidaza v membrani mitohondrijev. Ta oksidira protoporfirinogen v protoporfirin IX. Protoporfirin IX nastaja z encimsko oksidacijo kot edini porfirin v biosintezi hema. Ostali porfirini nastajajo z neencimsko oksidacijo in predstavljajo ireverzibilno pot v biosintezi hema.

Porfirija variegata se lahko pojavi kot akutna nevrološka porfirija ali porfirija z močno fotoobčutljivostjo ali kot oboje hkrati (v približno 30 % primerov). Bolezen je dominantno dedna. Laboratorijski rezultati pokažejo trajno zvišanje porfirinov in koproporfirinov v blatu. Akutni napadi bolezní so povezani z zvišanimi vrednostmi ALA, porfobilinogena, koproporfirinov in uroporfirinov v urinu. Bolniki so močno občutljivi na sončno svetlobo in mehanske poškodbe (4).

Ferohelataza EC 4.99.1.2

Zadnja faza v biosintezi hema je vgrajevanje Fe^{2+} v protoporfirin IX. To reakcijo katalizira encim ferohelataza na notranji membrani mitohondrija. Tako nastane hem. Ferohelataza je specifična za Fe^{2+} in preprečuje vezavo Fe^{3+} v molekulo porfirina. Za vezavo tekmujejo kovinski ioni z valenco 2+. Na primer: Zn^{2+} je v visokih koncentracijah prisoten ob nastajanju rdečih krvnih celic in neposredno tekmuje z Fe^{2+} za encimski vstop v protoporfirin IX. Nastali cinkov protoporfirin (ZPP) je posredni pokazatelj razpoložljivosti železa pri dozorevanju eritroblasta. Porast zvišanih koncentracij ZPP pri različnih pridobljenih motnjah je povezan z motnjami v metabolizmu železa, kar povzroča pomanjkanje železa in anemije pri kroničnih boleznih. Zvišane koncentracije aluminija pri dializnih bolnikih ali zastupitev s svincem prav tako povzročijo zvišanje ZPP z motnjo v metabolizmu železa (11).

Aktivnost encima ferohelataze pri eritropoetični protoporfiriji znaša 50 %. Zvišane so koncentracije protoporfirina v krvi, žolču in blatu. Presežek protoporfirina se nalaga v koži, posledica je občutljivost kože na sončno svetlobo že v otroštvu. Bolezen preide v kronično fazo kot solarni ekcem. Za zdravljenje bolnikov je potrebna primerna zaščita pred soncem in β karoteni, ki zmanjšujejo fotoobčutljivost (12).

4 Nadzor biosinteze hema

V sintezo hema je vključenih osem encimov, ki delujejo v tesni medsebojni povezavi. Genetski material, ki določa njihovo sintezo, je nameščen na različnih kromosomih. Gena za sintazo aminolevulinske kisline in hidroksimetilbilan sintazo kontrolirata sintezo hema.

Sintaza aminolevulinske kisline ima dva izoencima: eritroidnega in neeritroidnega. Eritroidni gen je bil izoliran na X kromosomu, neeritroidni gen pa na kromosomu 3. V neeritroidnih tkivih je za normalno delovanje, na primer mitohondrijskih citohromov, potrebna nizka koncentracija hema. Neeritroidni izoenzim se sintetizira na prostih poliribosomih v obliki predhodnika. Predhodnik se naprej preoblikuje v zrel encim preko translokacije v mitohondrijih predvsem s cepitvijo N-terminalnega konca predhodnika. Dokazano je, da hem inhibira prenos predhodnika sintaze aminolevulinske kisline v mitohondrijih, kar predstavlja pomembno kontrolno točko, saj se sintaza aminolevulinske kisline v citoplazmi hitro razgrajuje. V nasprotju z drugimi celicami mora razvijajoči se eritroblast akumulirati visoke koncentracije hema za nastanek hemoglobina.

Hidroksimetilbilan sintaza ima tudi dve encimski obliki: eritroidno in neeritroidno, vendar se v nasprotju z sintazo aminolevulinske kisline te oblike razvijajo iz istega gena. Bolj kot sintaza aminolevulinske kisline deluje hidroksimetilbilan sintaza v dozorevajočem eritrocitu kot kontrola za sintezo hema in omogoča akumulacijo hema v eritrocitih. Humani gen je sestavljen iz 15 eksonov s preko 10 kilobaznih parov v DNA. Prisotna sta dva promotorja, ki povzročita dve različni obliki sporočilne mRNA: eritroidne in neeritroidne. Vodilni promotor je aktiven v vseh celicah in inducira transkripcijo daljše neeritroidne mRNA, ki povzroči nastanek izoencima, sestavljenega iz 361 aminokislin. Nevodilni promotor pa je aktiven samo v eritroidnem tkivu in povzroči nastanek mRNA, ki je krajša za sekvenco prvega eksona. Primarna struktura eritroidnega encima je zgrajena iz 344 aminokislin in je identična strukturi neeritroidnega izoencima, razen v odsotnosti 17 aminokislin na amino terminalnem koncu. Okvara v prvem eksonu hidroksimetilbilan sintaznega gena lahko povzroči normalno koncentracijo encima v razvijajočem eritrocitu in zmanjšano koncentracijo v drugih tkivih. Približno 5 % bolnikov z akutno prehodno porfirijo ima normalne koncentracije hidroksimetilbilan sintaze v eritrocitih (13).

5 Motnje v biosintezi porfirinov

Izraz »porfirija« je leta 1911 opisal Günther (14). Porfirinske motnje so bile pred preučitvijo biosinteze hema opredeljene s kliničnimi značilnostmi. Porfirije so tudi razvrščene glede na vrsto tkiva, to je, ali gre za hepatično ali eritropoetično tkivo. Na splošno porfirinske motnje delimo na primarne ali podedovane in sekundarne ali pridobljene motnje. Pridobljene motnje so veliko pogostejše kot podedovana stanja. Laboratorijska podpora pri diagnostiki porfirinskih motenj je v določanju zvišanih porfirinov in porfirinskih intermediatov. Dodatne informacije dobimo z merjenjem aktivnosti posameznega encima, ki sodeluje v biosintezi hema in s testiranjem genske osnove. Danes je molekularna biologija vse bolj uveljavljeno diagnostično orodje za preučevanje porfirij (15).

Primarne ali podedovane porfirinske motnje

Metabolne abnormalnosti v primarnih porfirinskih motnjah so rezultat podedovanih sprememb v genih, ki kodirajo specifične encime v

biosintezi hema. Primarne porfirinske motnje lahko razdelimo v dve večji skupini: 1) nevrološke in/ali psihiatrične oblike porfirij, ki se pogosto pojavljajo v akutnem stanju in 2) oblike, povezane s fotoobčutljivostjo (16,). Ta razvrstitev je pomembna za diagnostiko bolezni. Simptomi nevroloških porfirij so na primer povezani z zvišanjem predhodnikov porfirinov, porfobilinogena in ALA. Simptomi fotoobčutljivosti so povezani z akumulacijo porfirinov. Če se porfirini povišano izločajo v urinu, gre za porfirinurijo, če pa je zvišana njihova koncentracija v eritrocitih gre za porfirinemijo. Znane porfirije so: kongenitalna eritropoetična porfirija (KEP), eritropoetična porfirija (EPP), hepatoeritropoetična porfirija (HEP), akutna intermitentna porfirija (AIP), hereditarne koproporfirija (HK), porfirija variegata (PV) in porfirija kutanea tarda (PKT). Vse te bolezni so podedovane, z izjemo PKT, ki je lahko podedovana ali pridobljena zaradi podedovane in/ali pridobljene okvare encima uroporfirinogen dekarboksilaze.

Sekundarne ali pridobljene porfirinske motnje

Nastajajo pod vplivom zunanjih dejavnikov kot so: zastrupitve s težkimi kovinami (najbolj pogosta je zastrupitev s svincem), alkoholom, pri anemijah, levkemijah, infekcijah, boleznih jeter in pri Hodgkinovi bolezni. Zvišano koncentracijo porfirinov zasledimo v urinu in blatu (17).

6 Analizni postopki

6.1 Določanje predhodnikov porfirinov

Porfobilinogen in ALA sta dobro topna v vodi, se koncentrirata v urinu in ju zato v kliničnih laboratorijih določamo skoraj izključno v urinu. Postopki določanja porfobilinogena in ALA najpogosteje temeljijo na barvni reakciji z Ehrlichovim aldehydним reagentom in kislom raztopino paradimetilaminobenzaldehida (DMAB). Porfobilinogen reagira z Ehrlichovim reagentom, pri čemer nastane obarvan produkt najpogosteje rožnato rdeče ali škrlatne barve. Danes uporabljamo več različnih modifikacij Ehrlichovega reagenta, ki se med seboj razlikujejo po koncentraciji DMAB ter vrsti in koncentraciji kisline.

6.1.1 Določanje porfobilinogena v urinu

Za meritve porfobilinogena je pomembno, da ločimo med kvalitativnimi presejalnimi testi kot so Watson-Schwartzov (18) in Hoeschev test (19) in kvantitativnimi določanji. Presejalni testi so relativno slabo občutljivi in pogosto lažno pozitivni, oziroma lažno negativni. Presejalni testi se v glavnem uporabljajo v primeru nujnih določitev, ki pa jih moramo kasneje potrditi s kvantitativno metodo. Referenčne vrednosti porfobilinogena v naključnem vzorcu urina so pod 2,0 mg/L (8,8 $\mu\text{mol/L}$), v 24-urnem vzorcu pa pod 3,4 mg/d (15 $\mu\text{mol/d}$). Pri nevroloških ali psihiatričnih porfirijah zasledimo tudi do 10-kratno zvišanje vrednosti porfobilinogena v urinu od zgoraj referenčne meje. Danes so na tržišču že dostopni reagenti za porfobilinogen presejalne teste, v katere je vključen anionski izmenjevalec, ki loči porfobilinogen od drugih interferenčnih substanc. Pri tem dobimo bolj zanesljive rezultate. Najpogostejša metoda za kvantitativno določitev porfobilinogena je postopek z ionskim izmenjevalcem. Bolj občutljive metode pa so osnovane na HPLC metodi (20).

6.1.2 Določanje ALA v urinu

Pri odkrivanju akutnih nevroloških porfirij določamo ALA skupaj s porfobilinogenom. Porfobilinogen in ALA sta zvišana pri akutnih porfirijah,

pri tem ALA nekoliko manj. ALA je pomembna še pri ovrednotenju zelo redke porfirije zaradi zmanjšane aktivnosti porfobilinogen sintaze. Postopki za določanje ALA so podobni tistim za določanje porfobilinogena. Na razpolago imamo postopke z ionskimi izmenjevalci in alternativne fotometrične metode za hitre teste. Postopki običajno zahtevajo dodatno reakcijo z reagentom, kot je acetilaceton, ki konvertira ALA v pirolni derivat, ki nato povzroči nastanek značilne barve z Erlichovim reagentom. Problem interferenc je tu še večji kakor pri porfobilinogenu. Zvišane koncentracije ALA povzročijo tako akutna kot kronična izpostavljenost etanolu (21) in svincu (17). Pri določanju ALA je pomembno tudi shranjevanje vzorca do analize. Urine lahko shranjemo pri 4°C v temi do 14 dni brez izgub aktivnosti ALA. Medtem ko je porfobilinogen bolj stabilen pri pH vrednosti 8 do 9, je ALA bolj stabilna pri pH vrednosti 3 do 4. Pri bolj kislem pH pa se njena stabilnost zmanjša. Referenčna vrednost ALA v naključnem vzorcu urina je pod 4,5 mg/L (34 μmol/L) in v 24-urnem urinu pod 7,5 mg/d (57 μmol/d).

6.2 Določanje porfirinov

Večina porfirinskih spojin močno absorbira pri valovni dolžini 400 nm, kar imenujemo Soretov pas. Vzbujanje s Soretovim pasom proizvaja karakteristično fluorescenco v oranžno rdečem območju pri valovni dolžini 550 do 650 nm. Intenziteta fluorescence je odvisna od pH in je bolj intenzivna v kislinskih raztopinah. Fluorescenco omogoča detekcijo porfirinov tudi v nanomolarnih koncentracijah. Kvantitativna metoda za indentifikacijo porfirinov je HPLC s fluorescenčnim detektorjem. Priprava ustreznih kalibratorjev predstavlja problem zaradi nizke topnosti porfirinov, težnje po dimerizaciji in tvorbe drugih oblik agregatov v vodnih raztopinah. Nove tehnike, kot so kapilarna elektroforeza (22) in masna spektrometrija (23), bodo imele pomembno vlogo v prihodnosti pri določanju porfirinov.

6.2.1 Določanje porfirinov v urinu

V laboratorijih porfirine v urinu običajno določajo s presejalnimi testi, ki jim sledijo kvantitativne metode v primeru pozitivnih vzorcev (24). V nekaterih laboratorijih določajo porfirine v urinu neposredno s kvantitativno metodo.

Referenčne vrednosti so:

uroporfirin ≤3,9 (3,5-5,7) μmol/mol kreatinina ali ≤37 (32-63) nmol/dan in koproporfirin ≤22 (19-34) μmol/mol kreatinina ali ≤221 (195-320) nmol/dan.

V literaturi je objavljeno veliko število različnih postopkov uporabe HPLC za določanje porfirinov v urinu (25).

6.2.2 Določanje porfirinov v krvi

Koncentracija porfirinov v serumu in plazmi je zelo pomembna pri diagnostiki različnih porfirinskih motenj. Referenčna vrednost za celotne porfirine v serumu je pod 15 nmol/L. Najvišja koncentracija porfirina v polni krvi in eritrocitih je ZPP, ki ga ne najdemo v serumu in plazmi, razen ob prisotnosti hemolize. ZPP nastane v dozorevaločem eritrocitu, če je zmanjšana koncentracija razpoložljivega železa. ZPP v polni krvi se v kliničnih laboratorijih določa s fluorometrijo in z bolj dolgotrajnimi ekstrakcijskimi metodami. Referenčna vrednost ZPP v polni krvi in eritrocitih je 30 do 70 μmol/mol hema. Za določanje prostih ali s kovino kompleksiranih protoporfirinov v polni krvi obstajajo različni HPLC postopki (26).

6.2.3 Druge tehnike za določanje porfirinov v krvi

Zvišano vsebnost porfirinov v eritrocitih lahko določimo neposredno z uporabo fluorescenčne mikroskopije in razmazih periferne krvi (27). Ta postopek se uporablja kot presejalni test za odkrivanje eritropoetične porfirije. Vsebnost porfirinov v eritrocitni populaciji prav tako lahko določimo s pretočno citometrijo, saj je porazdelitev fluorescentnih eritrocitov drugačna pri protoporfiriji v primerjavi z normalnimi vzorci (28).

6.2.4 Določanje porfirinov v blatu

Analiza porfirinov v blatu se uporablja za diferencialno diagnostiko akutnih nevroloških porfirij, čeprav rezultati niso vedno jasni. Najbolj pomembna porfirina v diagnostiki porfirinskih motenj sta koproporfirin in protoporfirin (29).

Referenčne vrednosti so:

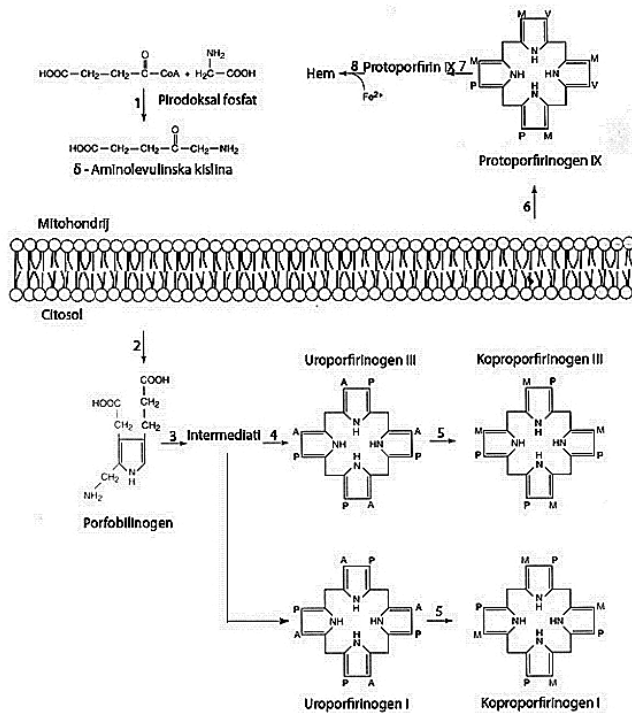
koproporfirin pod 200 μg/dan (<306 nmol/dan) ali <45 nmol/g suhe teže in

protoporfirin pod 1500 μg/dan (<2670 nmol/d) ali <150 nmol/g suhe teže.

Določanje uroporfirina je lažje in bolj ustrezno v vzorcih urina, kjer ne poteka razgradnja z bakterijami. V diagnostične namene je določanje porfirinov v žolču, ki ga dobimo z duodenalno aspiracijo bolj primereno kakor v blatu, pri čemer pa problem predstavlja pridobitev vzorca. V blatu poteka bakterijska razgradnja, kar pogosto lahko privede do napačne diagnoze porfirinskih motenj.

6.3 Določanje encimov, ki sodelujejo v sintezi hema

Podedovane porfirinske motnje so povezane z zmanjšano aktivnostjo (aktivnost je 50 % ali manj) določenega encima. Z encimskimi testi



Preglednica 1: Pregled encimov v biosintezi porfirinov in hema (3).
Table 1: Overview the Enzymes of Porphyrin and Heme Biosynthesis (3).

ENCIMI (Ostala imena encimov)	Dedne bolezni	Zvišani intermedijati
1. Sintaza aminolevulinske kisline (Sintaza aminolevulinske kisline)	Ni	
2. Sintaza porfobilinogena (Aminolevulinska dehidraza) (Aminolevulinska dehidrataza) (Aminolevulinska hidrolaza)	Porfirije	Aminolevulinska kislina
3. Hidroksimetilbilan sintaza (Porfobilinogen deaminaza) (Uroporfirinogen I sintaza)	AIP	Porfobilinogen Aminolevulinska kislina
4. Uroporfirinogen III sintaza (Uroporfirinogen kosintaza) (Uroporfirinogen izomeraza)	KEP	
5. Uroporfirinogen dekarboksilaza	PKT in HEP	Uroporfirin, Porfirini
6. Koproporfirinogen oksidaza	HK	Porfobilinogen, Koproporfirin
7. Protoporfirinogen oksidaza	VP	Porfobilinogen, Protoporfirin
8. Ferohelataza (Hem sintaza) (Hem sintetaza) (Protohem ferolijaza)	EPP	Protoporfirin

Legenda: EPP eritropoetična protoporfirija, KEP kongenitalna eritropoetična porfirija, AIP akutna intermitentna porfirija, HK hereditarna koproporfirija, VP variegata porfirija, PKT porfirija kutanea tarda, HEP hepatoeritropoetična porfirija, PKT porfirija kutanea tarda (V oklepajih so uporabljena imena encimov do leta 1992).

lahko identificiramo tiste encime, pri katerih obstaja večje tveganje za podedovane motnje. Tehnične težave, povezane z encimskimi testi bodo delno odpravljene šele, ko bomo v kliničnih laboratorijih začeli rutinsko izvajati teste na genski osnovi. Primer je porfirija variegata, ki je povezana z znižano aktivnostjo protoporfirinogen oksidaze in ferohelataze. Tako je verjetno zaradi dejstva, da se ti encimi nahajajo v kompleksu v mitohondrijih in nestabilnost enega vpliva tudi na drugega. Z drugimi besedami: določitev znižanja encimske aktivnosti še ne pomeni, da smo odkrili vzrok zmanjšanja, saj je to lahko sekundarna posledica podedovanim motnjam (15). Večina nosilcev okvarjenih encimov, kot sta hidroksimetilbilan sintaza in uroporfirinogen dekarboksilaza nikoli ne razvijejo bolezni zaradi njihove znižane encimske aktivnosti (7). Z razvojem molekularne biologije na področju diagnostike monogenih in poligenih bolezni, ki se ukvarja z ugotavljanjem mutacij na enem ali obeh alelih genskega lokusa na avtosomnih kromosomih, se izboljšuje diagnostika in zdravljenje dednih porfirinskih motenj.

7 Sklep

Pogostnost porfirij v Sloveniji je približno enaka kot v ostalih državah po svetu. V zadnjih desetih letih je tehnični napredek na področju molekularne biologije bistveno pripomogel k diagnozi mnogih podedovanih porfirinskih motenj. V svetu se že v mnogih kliničnih laboratorijih, inštitutih in na fakultetah ukvarjajo z molekularno diagnostiko monogenih in poligenih bolezni. Laboratorijska diagnostika dednih porfirij z encimsko okvaro ostaja odprto vprašanje v prihodnosti.

Testiranje pridobljenih porfirinskih motenj se premalo uporablja. Zunanji dejavniki lahko bistveno in funkcionalno spremenijo biosintezo hema in lahko služijo kot značilni pokazatelji toksičnih vzrokov obravnavanih bolezni. Za specifičnega bolnika je ključen izbor primernih laboratorijskih testov za vrednotenje porfirinskih bolezni. Posebno mesto zavzemajo nujni primeri akutnih porfirij, pri katerih je potrebna kakovostna in učinkovita laboratorijska podpora za pravilno diagnozo porfirinskih bolezni in primerno zdravljenje.

8 Literatura

1. Scott T, Eagles M. In: Concise Encyclopedia Biochemistry Second Edition. Berlin-New York 1988: 470-473.
2. Thomas M. Devlin. Biochemistry with clinical correlations. In: William M. Awad, Jr. Iron and heme metabolism, Fifth Edition. New York 2002: 1063-1071.
3. Tipton KF. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. Eur J Biochem 1994; 1:1-5.
4. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th edition. New York: McGraw-Hill 1995: 2103-51.
5. Dyer J, Garrick DP, Pye A. Plumboporphyria (ALAD deficiency) in lead worker: A scenario for potential diagnostic confusion. British Journal of Industrial Medicine 1993; 50:1119-1121.
6. Warren MJ, Scott AI. Tetrapyrrole assembly and modification into the ligands of biologically functional cofactors. Trends Biochem. Sci 1990; 15:486-491.
7. Kushner JP. Laboratory diagnosis of the porphyrias. N. Engl. J. Med 1991;324:1432-1434.
8. Pollock SS, Rosenthal MS. Images in clinical medicine: Diagnosis of porphyria. N.Engl. J. Med 1994; 330:114.
9. McManus JF, Begley CG, Ratnaike S. Complex pattern of alternative splicing in the normal uroporphyrinogen decarboxylase gene: Implications for diagnosis of familial porphyria cutanea tarda. Clin. Chem 1994; 40:1884-1889.
10. Woods JS, Miller HD. Quantitative measurement of porphyrins in biological tissues and evaluation of tissue porphyrins during toxicant exposures. Fundam. Appl. Toxicol 1993; 21:291-297.
11. Zachee P, Boogaerts MA, Lins RL, et al. Erythropoietin, aluminum, and anaemia in patients on haemodialysis. Lancet 1990; 335:1038-1039.
12. Takeda Y, Sawada H, Tashima M, et al. Erythropoietic protoporphyria without cutaneous photosensitivity and with ringed sideroblasts in an atomic bomb survivor. Lancet 1996; 347:395-396.
13. Hindmarsh JT. Enzyme heterogeneity in the porphyrias. Clin. Biochem 1990; 23: 371-374.
14. Rimington C. Was Hippocrates the first to describe a case of porphyria? Int. J. Biochem 1993; 25:1351-1352.
15. Schreiber WE. Acute intermittent porphyria laboratory diagnosis by molecular methods. Clin. Lab. Med 1995; 15:943-956.
16. Tefferi A, Solberg LA, Ellefson RD. Porphyrias: Clinical evaluation and interpretation of laboratory tests. Mayo Clin. Proc 1994; 69:289-290.
17. Labbe RF. Lead poisoning mechanisms. Clin. Chem 1990; 36:1870-1871.
18. Watson CJ, Taddeini L, Bossenmaier I. Present status of the Ehrlich aldehyde reaction for urinary porphobilinogen. Jama 1964; 190:501.
19. Lamon J, With TK, Redeker AG. The Hoesch test: Bedside screening for urinary porphobilinogen in patients with suspected porphyria. Clin. Chem 1974; 20:1438-1440.
20. Jamani A, Pudek M, Schreiber WE. Liquid-chromatographic assay of urinary porphobilinogen. Clin. Chem 1989; 35:471-475.
21. Sieg I, Doss MO, Kandels H et al. Effect of alcohol on β -aminolevulinic acid dehydratase and porphyrin metabolism in man. Clin. Chim. Acta 1991; 202:211-218.
22. Wu N, Li, B, Sweedler J. V. Recent developments in porphyrin separations using capillary electrophoresis with native fluorescence detection. J. Liquid Chromatogr 1994; 17:1917-1927.
23. Luo J. Analysis of urinary and faecal porphyrin excretion patterns in human porphyrias by fast atom bombardment mass spectrometry. J. Pharm. Anal 1997;15:1289-1294.
24. Buttery JE, Chamberlain BR, Gee D et al. Total porphyrin and coproporphyrin and uroporphyrin fractions in urine measured by second-derivative spectroscopy. Clin. Chem 1995; 41:103-106.
25. Zuijderhoudt FM, Koehorst SG, Kluitenberg WE et al. On accuracy and precision of a HPLC method for measurement of urine porphyrin concentrations. Clin Chem Lab Med 2000; 38:227-230.
26. Sato H, Ido K, Kimura K. Simultaneous separation and quantitation of free and metal-chelated protoporphyrins in blood by dimensional HPLC. Clin. Chem 1994; 40:1239-1244.
27. Todd DJ, Nesbitt GS, Lavery TD et al. Erythropoietic protoporphyria: The problem of a suitable screening test. Acta Derm. Venereol (Stockh) 1990; 70:347-350.
28. Schleiffenbaum BE, Minder EI, Mohr P et al. Cytofluorometry as a diagnosis of protoporphyria. Gastroenterology 1992; 102:1044-1048.
29. Zuijderhoudt FM, Kamphuis JS, Kluitenberg WE et al. Precision and accuracy of a HPLC method for measurement of fecal porphyrin concentrations. Clin Chem Lab Med 2002; 40:1036-1039

Švedski monopol prodaje zdravil nasproten evropskemu pravu - kaj pa slovenska ureditev?

Janja Bedrač

Nedavno je Sodišče ES razglasilo švedski monopol nad prodajo zdravil na drobno za nasproten načelom notranjega trga Evropske unije. Pri tem je postavilo nekatera pomembna pravna pravila, ki jih morajo upoštevati tudi države članice pri presoji skladnosti njihovih nacionalnih ureditev na področju trgovine z zdravili.

Na Švedskem lahko na podlagi Zakona o trgovini z zdravili (1996:1152 om handel med läkemedel m.m.) trgovino zdravil na drobno brez recepta in na recept izvajajo le država ali pravne osebe, na katere ima država prevladujoč vpliv. Zakon določa izjemo od tega pravila glede trgovine na drobno določenih zdravil bolnišnicam, zdravnikom in veterinarjem - tako trgovino lahko namreč izvajajo drugi dobavitelji, če imajo dovoljenje za trgovino na debelo. Za kršitev tega zakona je predvideno kaznovanje z globo ali z zaporno kaznijo dveh let ali več.

Od leta 1970 je bila prodaja zdravil na drobno na Švedskem zaupana družbi pod državno kontrolo Apoteket, ki je uživala prodajni monopol. Apoteket je švedska družba z omejeno odgovornostjo v glavnem z neprofitno podlago, katere upravo sestavljajo politiki in državni uradniki; švedska vlada pa ima v tej družbi dvotretjinski večinski delež njenega kapitala.

Apoteket ne uvaža zdravil sam, ampak mu jih dobavljajo bodisi neposredno proizvajalci na Švedskem bodisi grosista Kronans Droghandel in Tamro, ki delujeta zgolj kot logistična centra za dostavo zdravil Apoteketu. Slednji razpolaga s približno 800 lekarnami, ki jih ima v lasti in jih sam vodi. Lokacijo teh lekarn je določil Apoteket v tesnem sodelovanju z občinskimi organi in z organi s področja zdravstva. V ruralnih območjih Apoteket uporablja približno 970 farmacevtskih agentov, ki jih nadzoruje. Zaloge farmacevtskih zastopnikov so v lasti Apoteketa, njihov izbor pa določa regionalni direktor le-tega skupaj z lokalnimi zdravstvenimi službami. Nazadnje je tudi Apoteket po telefonu prodajal zdravila brez recepta.

Primer je prišel pred Sodišče Evropske skupnosti (odslej Sodišče ES) po tem, ko so švedski organi začeli **kazenski postopek zoper g. Hannerja** kot direktorja švedske družbe Bringwell International AB, katere delni lastniki so Norvežani in delni Švedji. Ta družba je med 30. majem in 27. julijem 2001 na trg dala dvanajst embalaž za obliže in nikotinske žvečilne gumije (ti proizvodi se po švedskem zakonu štejejo za zdravila brez recepta) in s tem kršila švedsko ureditev, ki trgo-

ni na drobno pridržuje zdravila v Apoteketu. V svojo obrambo je g. Hanner pred švedskim sodiščem zatrjeval, da ta ureditev ustvarja državni monopol, ki je v nasprotju z 28., 31. in 43. členom Pogodbe o ES (PES). Ker so se nacionalnemu sodniku postavljala vprašanja glede skladnosti navedene švedske ureditve s pravom Skupnosti, je zaprosil Sodišče ES za pojasnila.

31. člen PES od držav članic zahteva, da prilagodijo državne monopole ekonomske narave, tako da zagotovijo odpravo diskriminacije med državljani držav članic, in sicer tako kar zadeva pogoje naročanja blaga kot njihove prodaje.

31. člen PES je uvrščen med določila, ki zagotavljajo prost pretok blaga. Njegov temeljni namen je državam članicam preprečiti uporabo njihovih ekonomskih monopolov za protekcionistične namene in s tem oblikovanje ovir prostemu pretoku blaga, ki jih druga določila PES specifično prepovedujejo. 31. člen PES torej predstavlja specifično določilo, katerega namen je odpraviti ovire prostemu pretoku blaga, ki izhajajo iz ravnanja državnih monopolov.

Glede na predpostavke navedenega določila sta g. Hanner in Evropska komisija pred Sodiščem ES trdila, da je švedska ureditev prodaje državni diskriminatorni monopol, ki je v nasprotju s členom 31 ES. V podporo svojim stališčem je Komisija trdila, da opisana ureditev prodaje zdravil lahko ogrozi trgovino zdravil iz drugih držav članic glede na trgovino nacionalnih zdravil in je torej lahko diskriminatorna. Sistem izbire zdravil brez recepta naj ne bi bil pregleden, naj ne bi predvideval obrazložitve v primeru zavrnitve in naj se nad njim ne bi izvajal neodvisen nadzor. Prodajno omrežje naj bi v velikem delu temeljilo na farmacevtskih zastopnikih, katerih niti število niti položaj naj ne bi bila podvržena objektivnim merilom ali možnostim nadzora.

Švedska vlada je nasprotno navedla več trditvev, ki utemeljujejo, da ureditev prodaje zdravil ni državni diskriminatorni monopol, ki bi bil v nasprotju z 31. členom PES. To je argumentirala z dejstvom, da je bil izbor zdravil na recept odvisen bistveno od dejavnikov, na katera Apoteket ni imel nobenega vpliva, torej od dejstva, ali je zdravilo subvencionirano ali ne, in od izbire zdravnika, ki predpiše zdravilo. Enako naj bi izbor zdravil brez recepta temeljil na objektivnem merilu strogo tržne narave, torej na predvidljivi oceni povpraševanja. Poleg tega naj bi moral Apoteket dobaviti vsako zahtevano zdravilo in naj bi v praksi s centralnim in informatiziranim registrom proizvodov, odobrenih kot

zdravila za prodajo na Švedskem, to izvršil v štirindvajsetih urah. Za vsak nov proizvod, ki je odobren kot zdravilo, naj bi vsem lekarnam poslal brošure s podatki. Sicer pa naj bi proizvajalci z oglaševanjem za zdravila brez recepta svobodno vplivali na povpraševanje potrošnikov in na odločitve izbire Apoteketa.

Sodba Sodišča ES

Sodišče ES je svojo presojo začelo s poudarkom, da se določba 31. člena PES uporablja za državne monopole tržne narave in to za vse organe, s katerimi država članica pravno ali dejansko, neposredno ali posredno nadzoruje, določa ali občutno vpliva na uvoz ali izvoz med državami članicami. Na tej osnovi je Sodišče ES zaključilo, da opisana švedska ureditev prodaje pomeni državni monopol tržne narave. V bistvu Apoteket opravlja tržno dejavnost, torej prodajo zdravil na drobno, ki ji jo omenjeni švedski zakon izključno pridržuje. Še več, švedska vlada ne ugovarja temu, da Apoteket glede te dejavnosti nadzoruje država zaradi svoje večinske udeležbe v kapitalu te družbe in v strukturi njenega upravljanja.

31. člen PES sicer ne zahteva popolne ukinitve državnih monopolov tržne narave, vendar pa določa tako prilagajanje, da se glede pogojev nabave in trženja odpravi vsakršna diskriminacije med državljani držav članic. Namen 31. člena PES je v bistvu uskladiti možnost držav članic, da ohranijo določene monopole tržne narave kot sredstva za doseganje ciljev javnega interesa z zahtevami vzpostavitve in delovanja skupnega trga. Njegov cilj je odpravljanje ovir za prosti pretok blaga z izjemo omejevalnih učinkov glede menjav, ki niso povezane z obstojem zadevnih. Na tej osnovi je glede monopolov prodaje Sodišče presodilo, da **niso sprejemljivi monopoli, ki delujejo tako, da je trgovina blaga iz drugih držav članic pravno ali dejansko zastopljena glede na trgovino nacionalnega blaga.**

Naloga Sodišča ES je bila preučiti, ali način ureditve in delovanja zadevnega državnega monopola lahko zapostavlja zdravila iz drugih držav članic in ali v praksi ta monopol zapostavlja taka zdravila. Pri tem je Sodišče ES sklicujoč se na preteklo sodno prakso poudarilo, da mora sistem izbire monopola prodaje temeljiti na neodvisnih merilih izvora proizvodov in mora biti pregleden, tako da določa obveznost obrazložitve odločitev in neodvisni postopek nadzora. Nato mora biti njegovo omrežje prodaje organizirano tako, da število krajev prodaje ni omejeno na to, da se škoduje oskrbi; končno pa morajo biti ukrepi trženja in oglaševanja istega monopola nepristranski in neodvisni od izvora proizvodov in se morajo uporabljati za spoznavanje potrošnikov z novimi.

Sodišče ES pa je v predmetnem primeru ugotovilo, da švedska ureditev (sporazum med švedsko vlado in Apoteketom) ne določa niti načrta nakupa niti sistema „ponudb“, v okviru katerih naj bi bili proizvajalci, katerih proizvodi niso izbrani, upravičeni do obvestila obrazložitve odločitve o izboru. Prav tako ne predpisuje možnosti ugovora tej odločitvi pred organom neodvisnega nadzora. Nasprotno je po tem dogovoru videti, da ima Apoteket načeloma proste roke pri izbiri po svoji volji. To dejstvo je zadostovalo za ugotovitev, da način ureditve in delovanja Apoteketa in natančneje njegovega sistema izbora zdravil lahko neugodno vpliva na trgovino z zdravili iz drugih držav članic glede na trgovino švedskih zdravil. Tako se državni monopol ne vodi tako, da izključni vsakršno diskriminacijo zoper zdravila iz drugih držav članic in posledično krši 31. člen PES.

V drugem delu sodbe se je Sodišče ES ukvarjalo z vprašanjem, ali je mogoče predstavljeno ureditev vendarle opravičiti z določenimi utemeljenimi razlogi. Pri opravičevanju državnih monopolov je potrebno upoštevati drugi odstavek 86. člena PES, ki določa:

»Podjetja, pooblaščená za opravljanje storitev splošnega gospodarskega pomena, oziroma podjetja, ki imajo značaj dohodkovnega monopola, ravnajo po pravilih iz te pogodbe, zlasti po pravilih o konkurenci, kolikor uporaba takšnih pravil pravno ali dejansko ne ovira izvajanja posebnih nalog, ki so jim dodeljene. Razvoj trgovine ne sme biti prizadet v takšnem obsegu, ki bi bil v nasprotju z interesi Skupnosti.«

Glede tega iz sodne prakse Sodišča izhaja, da se člen 86(2) ES lahko navaja v utemeljitev, če država članica dodeli podjetju za upravljanje s storitvami v splošnem gospodarskem interesu izključne pravice, ki so v nasprotju s členom 31(1) ES, **če se izpolnitev posebne naloge, ki mu je bila dodeljena, lahko zagotovi le z dodelitvijo teh pravic in toliko, da razvoj menjave ni ogrožen tako, da bi bil v nasprotju z interesom Skupnosti.** Opravičilo švedske ureditve je Sodišče ES kratko zavrnilo meneč, da brez sistema izbora, ki naj bi izključil vsakršno diskriminacijo zdravil iz drugih držav članic, sporna ureditev prodaje zdravil ni opravičljiva.

Na tej osnovi je Sodišče ES zaključilo, da švedski državni monopol nad prodajo zdravil na drobno nasprotuje pravu ES.

Ali iz tega izhaja tudi pouk za Slovenijo?

Švedska ureditev prodaje zdravil na drobno je zelo specifična. Vendar pa tudi v Sloveniji najdemo področja, na katera bi lahko aplicirali pravna pravila Sodišča ES v navedenem primeru. V tem okviru bi želeli izpostaviti področje imunoprofilakse in kemoprofilakse.

V Sloveniji se imunoprofilaksa in kemoprofilaksa izvajata na osnovi predpisanih programov za posamezne skupine prebivalcev. Cepljenje izvajajo zdravniki v zdravstvenih zavodih in zasebni zdravniki, pa tudi Inštitut RS za varovanje zdravja, delo vseh pa usklajujejo območni koordinatorji na Zavodih za zdravstveno varstvo in nacionalni koordinatorski Inštitut za varovanje zdravja.

V skladu z vsakoletnim programom imunoprofilakse in kemoprofilakse, ki ga izda minister za zdravje, se le-ti izvajata izključno s preparati, ki jih za območje Republike Slovenije nabavlja, skrbi za kontrolo njihove kakovosti, centralno shranjuje in distribuira Inštitut RS za varovanje zdravja.

Ekskluzivna pravica Inštituta za varovanje zdravja do nabave in distribucije cepiv in drugih zdravil, namenjenih imunoprofilaksi in kemoprofilaksi, nasprotuje ustavno zajamčeni pravici do svobodne gospodarske pobude in predstavlja obliko pravno zavarovanega državnega monopola. Monopol Inštituta za varovanje zdravja namreč zasebnopravnim subjektom preprečuje, da bi opravljali dejavnost nabave in distribucije imunoloških zdravil, s čimer je na tem področju odpravljen konkurenca.

Ne glede na posebnosti, so zdravila, vključno z imunološkimi zdravili, blago, za katerega je v okvirih Evropske unije predviden prost pretok, distribucija zdravil pa predstavlja dejavnost, za katero je po

slovenskem nacionalnem in po pravu ES potrebno zagotoviti svobodno konkurenco.

Sodba Sodišča ES v švedskem primeru ter analiza starejše sodne prakse Sodišča ES s področja državnih monopolov dokazujeta, da ekskluzivna pravica nabave in distribucije imunoloških zdravil, ki je s podzakonskimi predpisi podeljena Inštitutu za varovanje zdravja RS, ni zakonita – ne samo z vidika slovenskega notranjega prava glede na pomanjkanje zadostnih pooblastil v zakonskih predpisih – ampak tudi z vidika prava ES. Ekskluzivna pravica prodaje nujno vključuje centralizacijo vsega naročanja predmeta prodaje. **Subjekt, kakršen je IVZ, ki ima monopolno pravico prodaje določenega proizvoda, predstavlja ne samo edinega prodajalca tega proizvoda v Sloveniji, ampak je tudi edini slovenski naročnik tega proizvoda.** Proizvajalci in prodajalci na debelo se lahko namreč obrnejo samo na IVZ, da bi si zagotovili prodajo določenih imunoloških zdravil odjemalcem na slovenskem trgu. Kar je pri tem moteče za Sodišče ES, je dejstvo, da

lahko nacionalni prodajni monopolist, tako kot uvozni monopolist, sam določa, kateri proizvodi bodo plasirani na trg zadevne države članice. S tem pa je monopolist tudi v položaju določanja stopnje uvoza iz drugih držav članic, na enak način kot imetnik ekskluzivne uvozne pravice. Vse navedeno velja za IVZ, ki ima pravico neodvisno odločiti (čeprav v sodelovanju z zdravstvenim strokovnim svetom), katera imunološka zdravila bo prodajal svojim odjemalcem in bodo posledično imela dostop na slovenski trg.

Pri tem poudarjamo, da pri omejevanju ekskluzivnih pravic javno-pravnih subjektov, ki so pogosto podeljene pod krinko javnega interesa, nacionalno in evropsko pravo izpostavljata tudi drugi vidik javnega interesa, ki je v koristih, ki jih svobodna konkurenca predstavlja za **potrošnike** (in nacionalne zavode zdravstvenega zavarovanja). Ta interes je namreč *ratio* večine pravnih pravil proti ekskluzivnim pravicam na gospodarskih področjih, kakršno je trženje imunoloških zdravil.

Zanimivosti iz stroke

Poročilo z 9. srečanja uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev in Poročilo s Satelitskega simpozija ob 10-letnici ustanovitve mreže uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev

Martina Cvelbar

Letošnje srečanje uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev je potekalo ob deseti obletnici ustanovitve mreže uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev (*Official Medicine Control Laboratory Network – OMCL Network*).

Mreža uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev je v obdobju desetih let vzpostavila pomembne mehanizme kontrole kakovosti zdravil v evropskem prostoru. V letu 1998 je vzpostavila postopek poenotene kontrole in sproščanja krvnih izdelkov in cepiv v Evropski uniji in Evropskem gospodarskem prostoru (*Official Control Authority Batch Release Procedure – postopek OCABR*). Postopek je bil v zadnjih letih uspešno dopolnjen s postopkom poenotene kontrole in sproščanja imunoloških zdravil za uporabo v veterinarski medicini.

V l. 1999 je EMEA v sodelovanju z EDQM in nacionalnimi pristojnimi organi za zdravila izdelala postopek za vzorčenje in testiranje zdravil, ki so pridobila dovoljenje za promet po centraliziranem postopku registracije (*Centrally Authorised Products Programme – CAP Programme*). Tudi program CAP je odprt za sodelovanje le za članice Evropske unije in Evropskega gospodarskega prostora.

Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil Ljubljana kot uradni kontrolni laboratorij za kontrolo kakovosti zdravil za uporabo v humani medicini sodeluje v mreži od ustanovitve dalje. Z vstopom Republike Slovenije v Evropsko unijo 1. maja 2004 pa se je aktivno vključil tudi v postopek OCABR in program CAP.

Mreža uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev preverja usposobljenost laboratorijev s študijami preverjanja usposobljenosti laboratorijev (*Proficiency Testing Studies*). V desetletnem obdobju je *OMCL Network* organiziral več kot petdeset tovrstnih študij.

Mreža uradnih kontrolnih laboratorijev je izdelala vodila za izgradnjo sistema zagotavljanja kakovosti v preskusnih laboratorijih za analizo preskušanje zdravil, ki temeljijo na mednarodnem standardu SIST EN ISO/IEC 17025. Vodila z novo sprejetimi dokumenti *OMCL Network* vsako leto izpopolnjuje z novo sprejetimi dokumenti kakovosti. Del dokumentov sistema zagotavljanja kakovosti je sprejela tudi Evropska akreditacija (EA).

V evropskem pravnem redu je sedaj vloga kontrole kakovosti zdravil v prometu in urad-

nih kontrolnih laboratorijev opredeljena in formalizirana z direktivo 2004/27/EC (dopolnjuje direktivo 2001/83/EC – zdravila za uporabo v humani medicini) in direktivo 2004/28/EC (dopolnjuje direktivo 2001/82/EC – zdravila za uporabo v veterinarski medicini).

V svetovni organ mreže OCABR evropskih uradnih kontrolnih laboratorijev (Ad-GEON) je bila letos prvič s štiriletnim mandatom izvoljena tudi predstavnica slovenskega uradnega kontrolnega laboratorija, dr. Martina Cvelbar.

Letos je ob letnem srečanju uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev prvič od obstoja mreže potekal tudi simpozij, odprt širši strokovni javnosti, predvsem farmacevtski industriji. Na simpoziju so bile predstavljene dejavnosti Evropskega direktorata za kakovost zdravil, povezane z mrežo uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev. Na okrogli mizi, ki je sledila predstavitvam, je farmacevtska industrija lahko izrazila pričakovanja glede prihodnjega razvoja dejavnosti *OMCL Network*.

Novice iz sveta farmacije

Urejšajo: dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.; Petra Slanc, mag. farm.; dr. Bojan Doljak, mag. farm.; prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Stoletnica hormonov

Pripravila: Petra Slanc



Junija bo poteklo sto let od prve omembe besede hormon. Ernest Henry Starling, profesor fiziologije v University College v Londonu, je prvič leta 1905 uporabil besedo hormon za »snovi, ki predstavljajo kemične prenašalce med celicami in celotnim krvožiljem ter lahko koordinirajo aktivnost in rast različnih delov telesa«, v svojem predavanju o vplivih izločkov trebušne slinavke na gastrointestinalni trakt. Tedaj ugledni profesor je leta 1915 prav tako opredelil aktivnosti srca, ki ga danes poznamo pod imenom Frank-Starlingov zakon srca.

Beseda hormon izvira iz grške besed *horman*, ki pomeni vzpodbuditi. Ideja o kemičnih prenašalcih je obstajala že pred Starlingom. V svojih raziskavah sta Nemeč Arnold Adolphe Berthold in Francoz Claude Bernard v sredini devetnajstega stoletja predvidevala, da mora obstajati nekakšna komunikacija med organi. Kasneje pa so številni zdravniki uporabljali izvlečke iz živalskih endokrinih žlez za zdravljenje motenj v delovanju ščitnice, nadledvične žleze in trebušne slinavke. V času prve omembe hormonov, ko se o hormonih ni vedelo praktično nič, pa vse do danes, sto let kasneje, je znanost naredila

velik korak naprej. Vse od razumevanja delovanja pa do kontracepcije, *in vitro* fertilizacije, pa tudi do proizvodnje humanih rekombinantnih hormonov. Danes vemo, da hormoni koordinirajo in se vključujejo v metabolne in razvojne procese v različnih celicah in da se njihovo delovanje lahko sproži tudi kot odgovor na odzive iz okolja. Hormonov pa ne najdemo le v živalskem svetu. Zanimivo je, da nekatere nevrotransmiterje najdemo tudi kot signalne molekule v rastlinah (serotonin) in »primitivnih« organizmih, kar ne dvomno kaže na različno vlogo tekom revolucije.

Prav zanimivo je, kako se zgodovina ponavlja, kako opredelitev in poimenovanje določenih pojmov za sabo potegne razvoj in raziskovanje, samo pomislimo na besede, kot so: »radioaktivnost«, »kromosom«, »antibiotik«, »apoptoza« in seveda »molekularna biologija«. Nihče ni mogel predvideti razvoja, ki smo mu bili priča zadnjih sto let, morda pa se bodo čez sto let spomnili na izjavo Nielsa Bohra, ki je dejal, da je najtežje napovedovanje, še posebno tisto o prihodnosti.

Viri:

EMBO reports 6

Najbolj prodajana humana zdravila v letih 2002-2004

Pripravila: Petra Slanc

V junijski izdaji revije *Drug Discovery Today* je bila objavljena preglednica najbolj prodajanih zdravil v letih od 2002 do 2004. V študijo so bili vključeni podatki različnih podatkovnih baz (IMS – »zlati standard«, Datamonitor, Script, Prous, Reuters in IBM), kot tudi objave proizvajalcev na njihovih spletnih straneh.

Glede na podatke podatkovne baze IMS naj bi celotna svetovna prodaja v letu 2004 znašala 550 milijard dolarjev, 55 milijard naj bi odpadlo na pripravke z rekombinantnimi učinkovinami ter 62 milijard na generike. V članku je tudi izrecno poudarjeno, da ni

nujno da se podatki podatkovne baze IMS in podatki proizvajalcev ujemajo, zato podatke med sabo ne gre primerjati. Razlike so posledica vzorčenja podatkov podatkovne baze IMS. IMS zbira podatke na podlagi prodaje v posameznih državah v okviru podatkov vedrogerij, posameznih farmacevtov in nacionalnih projektov. Za določene države teh podatkov ne dobivajo, kar je eden glavnih razlogov zgoraj omenjenih razlik. Kljub temu pa je potrebno poudariti, da navadno prispevek takšnih držav bistveno ne vpliva na celotno potrošnjo, saj kar več kot 86 % celotne prodaje odpade na Severni del Amerike, Japonsko in Evropo. Po drugi strani pa na razlike lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so menjalni tečajji, vzporedni uvozi, reklamacije ipd. Primerjalne analize so pokazale tudi, da IMS v določenih primerih lahko preceni svoje ocene tudi za več kot 1 milijardo dolarjev, kot je to v primeru pripravkov Lipitora (atrovastatin) in Nexiuma (esomeprazol).

Pripravki z rekombinantnimi učinkovinami so v preteklem letu predstavljali kar 10 % celotne svetovne prodaje, pripravki v preglednici 2 pa so doprinesli kar 68 % prodaje. Do sedaj je na trgu 197 pripravkov z rekombinantnimi učinkovinami in nadaljnjih 800 v razvoju, od tega jih kar 100 čaka le še na registracijo in dovoljenje za trženje.

Zelo visoki stroški pripravkov z rekombinantnimi učinkovinami in dejstvo, da bo v kratkem potekla patentna zaščita prvi generaciji tovrstnih pripravkov, odpira novo pot in možnost biogenerikom (*biogenerics*, *biosimilars*). Kljub zelo močnem nasprotovanju originatorjev se tako v ZDA kot tudi v EU oblikujejo načini same registracije biogenerikov, kar bo vsekakor botrovalo k nižjim cenam pripravkov z rekombinantnimi učinkovinami.

Glede na podatke naj bi v naslednjih petih letih potekla patentna zaščita 35 učinkovinam, ki doprinesejo na ameriškem trgu 82 milijard dolarjev letno, to pa naj bi povzročilo izgubo trga originatorjev, v najboljšem 25 % in 40 % v najslabšem primeru, v korist generikov. Poleg tega pa naj bi se v svetovnem merilu v naslednjih letih okreplil tudi delež Japonske farmacevtske industrije.

Preglednica 1. Lista 15 najbolj prodajanih zdravil v letu 2004.

Najbolj prodajana zdravila v letih 2002-2004

pripravek	proizvajalec	prodaja v letu 2002 (milijarde dolarjev)		prodaja v letu 2003 (milijarde dolarjev)		prodaja v letu 2004 (milijarde dolarjev)	
		proizvajalec	IMS	proizvajalec	IMS	proizvajalec	IMS
Lipitor (atrovastatin)	Pfizer	7,90	8,60	9,23	10,3	10,86	12,0
Zocor (simvastatin)	Merck	5,60	6,20	5,01	6,10	5,20	5,90
Plavix (klopidogrel)	BMS in SA	3,10	-	4,20	3,70	5,20	5,50
Advair (flutikason; salmetrol)	GSK	2,00	-	3,60	-	4,50	4,70
Norvasc (amlodipin)	Pfizer	3,80	4,00	4,33	4,50	4,46	4,80
Zyprexa (olanzepin)	Eli-Lilly	3,60	4,00	4,27	4,80	4,42	4,80
Paxil (paroksetin)	GSK	1,90	-	3,00	3,90	3,90	3,90
Nexium (esomeprazol)	AstaZenica	1,97	-	3,30	3,80	3,88	4,80
Zoloft (sertralin)	Pfizer	2,74	-	3,10	3,40	3,36	-
Celebrex (celekoksib)	Pfizer	3,00	-	1,90	2,50	3,30	-
Effexor (venlafaksin)	Wyeth	2,00	-	2,70	-	3,30	3,70
Prevacid (lansoprazol)	Takeda in Abbott	3,70	3,60	3,30	4,00	3,10	3,80
Diovan (valsartan)	Novartis	1,66	-	2,50	-	3,10	-
Fosamax (alendronat)	Merck	2,20	-	2,50	-	3,10	-
Risperdal (risperidon)	J&J	2,10	-	2,50	-	3,00	-

okrajšave: BMS – Bristol-Myers Squibb, SA – Sanofi-Avensis, GSK – GlaxoSmithKline, J&J – Johnson and Johnson, - -podatki niso na voljo

Preglednica 2. Lista najbolj prodajanih pripravkov z rekombinantnimi učinkovinami.

Najbolj prodajani pripravki z rekombinantnimi učinkovinami v letih 2002-2004

pripravek	Proizvajalec (-i)	prodaja v letu 2002 (milijarde dolarjev)	prodaja v letu 2003 (milijarde dolarjev)	prodaja v letu 2004 (milijarde dolarjev)
Araneps, Epogen, Epogin, Procrit in NeoRecormon (α in α – eritropoetin)	Amgen, Kirin, J&J, Roche in Sankyo	8,60	10,30	11,80
Avonex, Betaseron, Pegasys, PEG Intron in Refib (α in α – interferon)	Biogen IDEC, Chiron, Roche, Schering AG, Schering Plough, Serono	5,60	5,20	6,80
Humalin, Humalog in Novulin (humani insulin)	Eli-Lilly in Novo Nordisk	4,20	4,60	5,60
Neulasta in Neupogen (G-CSF)	Amgen, Roche in Schering	1,5	2,70	3,00
Rituxan (rituksimab)	Roche	1,1	2,20	2,80
Enbrel (etanercept)	Amgen in Wyeth	0,80	1,30	2,60
Remicade (infliksimab)	J&J	1,30	1,70	2,10
Humatrope, Neutropin, Protopin in Saizen (humani rastni hormon)	Akzo Nobel, Biogen IDEC, Eli-Lilly, Novo Nordisk, Roche in Serono	1,20	1,60	1,80
Herceptin (trastuzumab)	Roch	0,80	1,00	1,80
Synagis (palivizumab)	MedImmune	0,67	0,85	0,85

okrajšave: J&J – Johnson and Johnson

Viri:

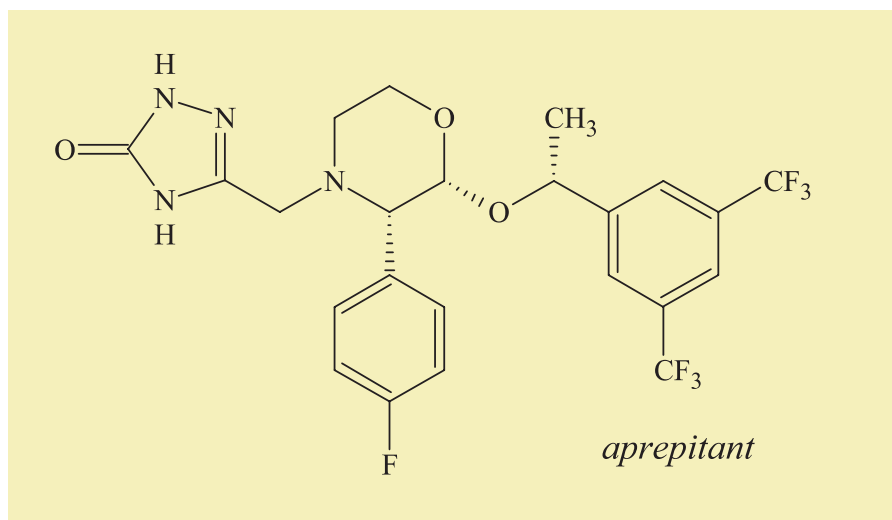
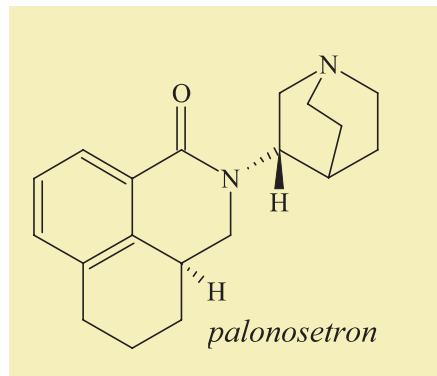
Drug Discovery Today 10 (2005): 739-742
 Express Pharma Pulse 5 2004
 (<http://www.expresspharmapulse.com/20040205/editorial02.shtml>)
 Express Pharma Pulse 29 2004
 (<http://www.expresspharmapulse.com/20040129/oped01.shtml>)
www.ims-global.com/insight/insight.htm
www.datamonitor.com
www.reutersbusinessinsight.com/content/rbhc0091.pdf

Novi antiemetiki za zdravljenje slabosti in bruhanja pri kemoterapiji

Pripravila: Petra Slanc

Slabost in bruhanje sta med bolniki, ki se zdravijo z različnimi oblikami kemoterapije ali pa z njo začenejo, dva najbolj neprijetna neželena učinka. Nenadzorovano bruhanje vsekakor zmanjša kvaliteto življenja bolnika in je lahko vzrok tudi slabšega sodelovanja bolnika pri zdravljenju. Poskusi zmanjševanja oziroma preprečevanja slabosti in bruhanja, ki sta posledici zdravljenja z določenimi kemotropeptiki, so stari že več kot 40 let, vendar pa je vidnejši napredek vezan na zadnjih 15 let. V letu 1990 je bil razvit prvi selektivni antagonist 5-hidroksitriptamin receptorjev tipa 3 (5-HT3). Leta 1995 pa je bilo pokazano tudi ugodno delovanje sočasnega jemanja kortikosteroidov. Kljub napredku pa je potrebno poudariti, da se pri številnih bolnikih še vedno pojavljata tako slabost, kot tudi bruhanje ob samem zdravljenju.

Med najnovejšimi učinkovinami, ki so na voljo na trgu, predstavlja *palonosetron* že drugo



generacijo antagonistov 5-HT3 receptorjev. Prva generacija antagonistov 5-HT3 receptorjev (ondansetron, dolasetron, granisetron in tropisetron) se uporablja predvsem pri zdravljenjih, ki povzročajo srednje močno akutno emezo (slabost in bruhanje se pojavita v 24 urah po kemoterapiji). V primeru zakasnjene emeze, pa je njihova učinkovitost nižja. Palonosetron se razlikuje od do sedaj dosegljivih antagonistov 5-HT3 receptorjev prav v dolžini delovanja, saj je njegov razpolovni čas 40 h, in v kar 30-krat večji afiniteti do receptorjev. V dosedanjih kliničnih študijah so bolniki palonosetron zelo dobro prenašali, kot glavna neželena učinka sta se pojavljala glavobol (10 %) in zaprtje (5 %). Nadaljnje študije so usmerjene v sočasno jemanje palonosetrona s kortikosteroidi, ki se uporabljajo v profilaksi emeze pri srednjih in visokih emetogenih oblikah kemoterapije.

V proces nastanka slabosti in bruhanja so vpleteni številni procesi. Do nedavnega so ta proces povezovali s tremi tipi neurotransmitrskih povezav oziroma receptorjev, in sicer z D2, 5-HT3 in kanabiodnimi receptorji tipa 1. Leta 2003 pa se je pojavila tudi prva učinkovina, ki deluje kot antagonist substance P na NK-1 receptorjih. *Aprepitant*, pravkar registriran tudi v Sloveniji, je selektivni zaviralec NK-1 receptorjev. Uporablja se predvsem za zaviranje slabosti in bruhanja v primeru visoko emetogenih oblik kemoterapije. Poleg samega jemanja aprepitanta potekajo študije tudi o učinkih sočasnega jemanja aprepitanta z antagonistom 5-HT3 in deksometazonom. Glede na dosedanje rezultate naj bi se tovrstni režim zdravljenja uporabljal predvsem za nadzor slabosti in

bruhanja pri daljšem zdravljenju oziroma pri ponavljajočem zdravljenju v več krogih. Kljub očitnemu napredku pri preprečevanju slabosti in bruhanja, povzročenima s strani kemoterapije, bo potrebno opraviti še številne klinične študije, ki bodo odgovorile na mnoga vprašanja, kot so na primer režim jemanja ter sočasna uporaba drugih antiemetikov.

Viri:

Nature clinical practice 2, 2005: 196-201
<http://www.emend.com/emend/shared/documents/pi.pdf>
<http://www.aloxi.com/images/downloads/pi.pdf>

Simpozij ob 30. skupščini SFD

12. - 14. maj 2005, Portorož

Jelka Dolinar

Prvi dan tradicionalnega simpozija Slovenskega farmacevtskega društva ob redni letni skupščini je bil letos namenjen temi o pomenu farmacevtskih informacijskih centrov. Predstavljene so bile izkušnje iz Velike Britanije in vizija delovanja takega centra v Sloveniji. Farmakoterapevtska tema, ki je potekala v petek cel dan, je obravnavala problematiko zdravljenja starostnikov. Simpozija se je udeležilo preko 300 članov Društva in drugih strokovnjakov.

Delegati 30. skupščine so potrdili poročilo predsednika Društva o delu, poročilo o poslovanju in poročilo nadzornega odbora. Poročevalci so izpostavili pomen društva pri organizaciji različnih oblik izobraževanj članov tako doma kot v tujini. Razveseljuje ugotovitev, da se je s tem zelo povečal pretok informacij in prenos novih spoznanj v prakso. Udeleženci kongresov posredujejo informacije bodisi s predavanji v podružnicah ali pa s pisnimi prispevki, kar utemeljuje številno udeležbo na različnih strokovnih prireditvah doma in v tujini.

Posebna pozornost je bila namenjena porabi letne članarine Društva. Delež članarine se v strukturi prihodkov niža, čeprav število članov rahlo narašča. Konec leta 2004 je imelo Društvo 2751 članov. Dejstvo je, da Društvo samo s članarino ne bi zmoglo nuditi članom vseh realiziranih programov. Člani se lahko udeležijo različnih družabnih srečanj, za katera samo izjemoma prispevajo minimalni znesek (smučarsko tekmovanje, Martinovanje, športne igre), brezplačna je udeležba na strokovnih predavanjih po podružnicah in sekcijah. Tudi udeležba na drugih strokovnih srečanjih, kongresih in delavnicah doma in v tujini, ki jo financira Društvo svojim članom s podporo sponzorjev in ni dohodninsko obremenjena, predstavlja ugodnost, ki jo imajo samo člani Društva. Od članarine pripada 30 % podružnicam, 10 % sekcijam, preostali del članarine pa matično društvo nameni sofinanciranju Farmacevtskega vestnika. Veliko novost in za člane veliko ugodnost predstavljajo tudi storitve Farmacevtskega informacijskega centra, ki je svoje delo začel maja 2005. Članom SFD, ki bodo iskali odgovore na strokovna vprašanja, bo Center preko medrežja nudil brezplačne informacije. Delegati so potrdili višino društvene članarine za leto 2005:

zaposleni farmacevti	7.000 SIT
tehniki	5.500 SIT
seniorji in študenti	3.500 SIT
vpisnina	1.000 SIT

Poslovni rezultat društva v letu 2004 je bil zelo dober in ga bo Društvo namenilo za izvedbo načrtovanih aktivnosti, ki nimajo druge materialne podlage, med drugim za izvajanje storitev informacijskega centra, ki bodo namenjene tudi promocijskim aktivnostim, da bi zagotovili večjo prepoznavnost farmacevtske stroke in njeno vrednotenje.

Delegati 30. skupščine so potrdili spremembo temeljnega akta društva, ki jo je predlagal izvršni odbor glede mandatov organov Društva.

S to spremembo ohranimo dveletne mandate, povečamo pa število njihovih ponovitev. Doslej so Pravila dopuščala možnost ene ponovne izvolitve, po novem bodo člani lahko isto funkcijo opravljali 4 zaporedne mandate oziroma 8 let skupaj. 30. skupščina društva je sprejela tudi splošni Pravilnik o delovanju podružnic in sekcij društva.

Že aprila pa je izvršni odbor potrdil Pravilnik o izplačilih fizičnim osebam, v katerem je Društvo natančno opredelilo sistem izplačil potnih stroškov fizičnim osebam, financiranje izobraževanja članov društva na drugih prireditvah doma in v tujini ter izplačila honorarjev in nagrad.

Delegati 30. skupščine so izvolili nove organe društva za obdobje 2005 - 2007.

IZVRŠNI ODBOR SFD

Predsednik društva

Matjaž Jeras

Podružnica, Sekcija

Podružnica - Celjska
 Podružnica - Dolenjska
 Podružnica - Gorenjska
 Podružnica - Ljubljanska
 Podružnica - Mariborska
 Podružnica - Pomurska
 Podružnica - Posavska
 Podružnica - Primorska
 Podružnica - Zasavska
 Lekarniška zbornica Slovenije
 Homeopatska sekcija
 Sekcija bolnišničnih farmacevtov
 Sekcija farmacevtskih tehnologov
 Sekcija farmacevtskih tehnikov
 Sekcija farmacevtskih znanosti
 Sekcija kliničnih farmacevtov
 Sekcija farmacevtov javnih lekarn
 Sekcija seniorjev
 Sekcija študentov
 Sekcija za farmacevtsko kemijo
 Regulatorna sekcija

Mirjam Hočevar Korošec
 Marjan Balkovec
 Tina Bukovec Kosmač
 Gašper Marc
 Matejka Kumperščak - Duh
 Marija Balažič
 Ana Dolinšek Weiss
 Andrej Fister
 Tjaša Abram
 Andreja Čufar
 Linda Čičigoj
 član bo javljen naknadno
 Saša Baumgartner
 Zdenko Taušič
 Julijana Kristl
 član bo javljen naknadno
 Lidija Pavlovič
 Marija Brenčič
 Nada Čebren Lipovec
 Lucija Peterlin Mašič
 Simona Cencelj



Prejemniki društvenih priznanj v letu 2005 (z desne predsednik Društva M. Jeras, N. Bernat, M. Klanjšček, B. Korpar, D. Obersnel, I. Malešič, L. Pavlovič, Z. Taušič, A. Tušar, predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj S. Primožič)

Nadzorni odbor

Janez Kerč
Lili Grosek
Jasna Majdič

Disciplinsko sodišče

Jana Fortuna
Nada Jazbec
Aleš Krbavčič

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj

Aleš Mrhar
Nada Ajdišek
Mila Božič
Lovro Dermota
Martina Klanjšček
Silva Smolej
Slavko Rataj

Izdajateljski svet

Mojca Kerec
Tatjana Kogovšek Vidmar
Mateja Malešič
Stane Srčič
Zofija Vitkovič
Anamarija Zega
Magda Zimic

Odgovorni urednik Farmacevtskega vestnika

Borut Štrukelj

Odgovorni urednik Farmakona

Aleš Mlinarič

Izvršni odbor je na 30. skupščini podelil naslednja društvena priznanja:

Minařikovo odličje

doc. dr. Ivanu Malešiču

Minařikova priznanja

mag. Nadi Bernat, mag. farm.
Martini Klanjšček, mag. farm.
Brigiti Korpar, mag. farm.

Dalji Obersnel, mag. farm., spec.
Lidiji Pavlovič, mag. farm.
Zdenku Taušiču
Anici Tušar, mag. farm.

Utemeljitev za Minařikovo odličje

Doc. dr. Ivan Malešič je s svojim delom močno zaznamoval pedagoško, znanstveno-raziskovalno in strokovno dejavnost na področju klinične biokemije.

Pretežni del delovne dobe je preživel v diagnostičnem laboratoriju splošne bolnice na Ptuj, kjer si je veskozi prizadeval za razvoj diagnostične laboratorijske službe v regiji.

Svoje delo je namenil tudi vzgoji in izobraževanju kadrov, kjer je od leta 1978 deloval kot docent na katedri za klinično biokemijo na dodiplomski in podiplomski ravni. O dosežkih pri znanstveno-raziskovalnem delu priča 78 objav v domačih in tujih strokovnih revijah, od tega je objavil kar 8 izvirnih raziskovalnih člankov, 4 članke vabljenih predavanj ter članke in povzetke, s katerimi je sodeloval na znanstvenih sestankih in konferencah doma in v tujini.

Več mandatov je bil član uredniškega odbora Farmacevtskega vestnika in prvi predsednik strokovne revije Jugoslovanska medicinska biokemija. V okviru Društva medicinskih biokemikov Jugoslavije so mu zaupali številne odgovorne funkcije. Zelo aktivno je sodeloval tudi na mednarodnem nivoju: pri



Predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj prof. dr. Stanislav Primožič in predsednik Društva doc. dr. Matjaž Jeras sta podelila Minařikovo odličje doc. dr. Ivanu Malešiču

mednarodni zvezi za klinično kemijo je bil član odbora izvedencev za učinke zdravil v klinični kemiji, bil je pridružen član komiteja za spremljanje koncentracij zdravil v krvi. Kot član strokovnih odborov je veliko prispeval k uspešni organizaciji strokovnih sestankov.

Delo doc. Malešiča poznajo in cenijo strokovnjaki v Sloveniji in tujini, o čemer pričajo številne objave, vabljeni predavanja in članstvo v uredniških odborih strokovnih revij. Navezal je stike s sorodnimi inštitucijami v tujini in doma. Prek znastveno-raziskovalnih nalog, s predavanji, delom v organih Slovenskega farmacevtskega društva in Slovenskega združenja za klinično kemijo, je poskrbel za implementacijo svojega znanja in izkušenj v laboratorijsko medicino in s tem veliko prispeval k njenemu razvoju.

Za dosežke na raziskovalnem področju in za zasluge za razvoj slovenske farmacije podeljuje izvršni odbor doc dr. Ivanu Malešiču Minařikovo odličje.

Utemeljitev za Minařikova priznanja

Strokovno delo magistre **Nade Bernat** je bilo vedno odmevno in priznано zlasti v Pomurski regiji. S posebno zavzetostjo si je prizadevala za ustrezno vrednotenje farmacevtskega dela v družbi. Za njeno predano delo za Sekcijo bolnišničnih farmacevtov ji izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.

Magistra **Martina Klanjšček** ima izredne zasluge za popularizacijo farmacevtske stroke na Primorskem in še posebej v Posočju. Naredila je izjemo v pravilu, da so lekarne razvite samo tam, kjer gospodarske razmere to omogočajo. Za njeno publicistično delo, zavzeto mentorsko delo in pomemben prispevek pri uveljavljanju lekarniške farmacije, podeljuje izvršni odbor magistri **Martini Klanjšček** Minařikovo priznanje.

Motiviranost za delo in komukativnost so usmerjali magistro **Brigito Korpar** pri vodenju Mariborske podružnice. Profesionalnost in sposobnost koordiniranja so ji omogočili izvedbo številnih strokovnih in družabnih srečanj na regijskem in nacionalnem nivoju. Za njeno predano delo ji izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.

Magistra **Dalja Obersnel** je s svojim delom veliko prispevala k ugledu bolnišnične lekarne. Med prvimi v Sloveniji je zaključila specializacijo iz farmacevtske tehnologije, mnoge generacije tehnikov in farmacevtov



Vabljeni gostje in prejemniki društvenih priznanj v prvi vrsti Tartinijevega gledališča v Piranu

se je spominjajo kot predane in dosledne mentorice. Za njen prispevek k bogatitvi bolnišnične farmacije ji izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.

Za zavzeto strokovno in raziskovalno delo na področju lekarniške farmacije, ki ga je večkrat predstavila v obliki vabljenih predavanj in posterjev na kongresih doma in v tujini ter za njen prispevek k razvoju Sekcije farmacevtov javnih lekarn podeljuje izvršni odbor Minařikovo priznanje magistri **Lidiji Pavlovič**.

Velika delovna vnema, kreativnost in posluh za stroko so lastnosti, ki odlikujejo **Zdenka**

Taušiča. Vseskozi si prizadeva za sodelovanje vseh poklicev znotraj zdravstvenega teama in ustrezno umestitev farmacevtskega tehnika v njem ter njegov strokovni in osebni razvoj. Za zavzeto delo mu izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.

Magistra **Anica Tušar** že dolga leta aktivno deluje v Primorski podružnici, v kateri je uspela povezati različne regijske interese pri doseganju strokovnih ciljev. Za njeno predanost stroki ji izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.



Vabljeni gostje na slavnostni podelitvi društvenih priznanj (tretji z leve, predsednik strokovno-organizacijskega odbora prof. dr. Aleš Mrhar)

Poročilo z 10. kongresa Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov (EAHP)

Silvo Koder

Deseti kongres EAHP se je letos odvijal v Palexpo kongresnem centru v Lizboni, od 16. do 18. marca 2005. Ob 10. jubileju so organizatorji na kratko predstavili v sliki in besedi vseh devet dosedanjih kongresov.

Predsednik organizacijskega odbora Nizozemec prof. Arnold G. Vulto je v uvodnem nagovoru ob otvoritvi posebej pozdravil novi članici Latvijo in Estonijo ter zaželel dobrodoščilo Poljski, Litvi, Cipru in Malti, ki se bodo priključile Združenju letos.

Predsednica EAHP, Francozinja Jacqueline Surugue je orisala delo združenja v času svojega predsedovanja, ko si je prizadevala za prepoznavnost bolnišničnega farmacevta – specialista in njegovo umestitev v sistem varne uporabe zdravil v bolnišnicah vseh držav EU, s čimer je prepričala tudi evropski parlament.

Na letošnji razstavi, ki je spremljala kongres, je sodelovalo kar 41 različnih proizvajalcev zdravil, opreme za avtomatizacijo distribucije zdravil, individualno odmerjanje, za popolno parenteralno prehrano in opreme za pripravo citostatikov.

Vzdolž razstavnih prostorov je potekala poster sekcija.

Na kongresu je bila velika pozornost namenjena farmakoekonomiki. Ključno predavanje na to temo je imel dr. Vassilis Kontozamanis iz Grčije, ki je poročal o povračilih stroškov zdravljena s strani države. Poudaril je pomen restrikcij in strokovnih priporočil pri predpisovanju, pri čemer bi morala vsaka država uravnotežiti novosti na farmacevtskem trgu in koristnost le-teh za skupnost.

Praktične izkušnje sta predstavila dr. Kramer iz Nemčije in dr. Jenzer iz Švice.

Dr. Kramer je predstavil formularium njihove bolnišnice z listo zdravil, ki jo lahko predpisujejo v njihovi bolnišnici in je v pisni in elektronski obliki dostopna vsem zdravnikom v bolnišnici. Formularium pripravljata »Pharmacy and Therapeutics Committee«, ki mu običajno predseduje farmacevt. Preden uvrstijo neko zdravilo na listo, natančno pregledajo podatke o zdravilu v neodvisnih virih, možne stranske učinke, interakcije primerjajo z analognimi zdravili iz te indikacijske skupine, komlianco, hkrati ugotavljajo možnost zamenjave z generičnimi zdravili, ocenijo kvaliteto proizvajalca v primeru generične zamenjave. Generična zamenjava poteka na prvem nivoju, na drugem nivoju poteka zamenjava s podobnim zdravilom.

Zdravnik ima vedno možnost izbire dražjega zdravila, vendar mora to zahtevo pisno utemeljiti in posredovati v potrditev komisiji.

Dr. Jenzer iz Švice je predstavil farmakoekonomsko študijo o porabi medicinskega potrošnega materiala, ki so jo izvajali na primeru oskrbe rane. Prikazal je vpliv farmacevta v klinični praksi na zniževanje stroškov.

V okviru seminarja s področja farmakoekonomike je dr. Louis Niessen iz Rotterdama govoril o nujnosti farmakoekonomskih priporočil, ki naj bi jih imela vsaka ustanova. Enostavno zmanjšanje stroškov je moč doseči z zmanjšanjem celotnega proračuna, vendar s tem ukrepom močno prizadenejo kakovost storitve. Drugi model je t.i. »cost effectiveness«, ki ga uporablja večina držav. Pri tem je ključni problem cenovna meja za še dovolj dobro zdravilo glede na resnost bolezni. Učinkovitost modela pogosto zavisi od deleža sredstev, ki jih država namenja za zdravila.

Precej pozornosti je bilo na kongresu namenjene zdravljenju onkoloških bolnikov, saj je v onkologiji poraba zdravil najbolj v porastu, tako finančno kot količinsko.

EAHP si prizadeva oblikovati smernice glede generične zamenjave zdravil za zdravljenje novotvorb. Za mnoge države je generična zamenjava zdravil edina možnost, ki jim omogoča zdravljenje po zadnji doktrini. Druge države dobijo s tem možnost, da lahko preizkušajo vsa nova zdravila, ki so na razpolago na področju onkologije.

Profesor Mike Allwood je poudaril pomen stabilnosti onkoloških pripravkov, ki jo lahko zagotovijo edino bolnišnični farmacevti z ustrezno pripravo in distribucijo pripravka. Opozoril je tudi na problem farmakogenomike, ki jo množično uvajajo v onkološko prakso, kljub temu, da se včasih več kot 30 procentov bolnikov ne odzove na zdravljene. Zdravljenje bi lahko racionalizirali tako, da bi potekalo ciljano na podlagi izsledkov genetskih analiz tumorjev.

Poročilo z generalne skupščine Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov (EAHP)

Tajda Gala Miharija

Generalna skupščina EAHP je bila v Parizu od 9. do 12. junija 2005. Prvi dan so bila na skupščini predstavljena poročila članov odbora in poročila o aktivnostih v zvezi s projekti, ki tečejo v okviru EAHP ter poročila delegacij držav članic EAHP; drugi dan je bil namenjen strokovni temi, delo pa je potekalo v delovnih skupinah.

Projekti EAHP:

1. Kongresna dejavnost

Kongres EAHP 2005 je potekal v Lizboni na Portugalskem z glavno temo: *Bolnišnična farmacija in ekonomija*. Leta 2006 bo kongres v Genevi v Švici z glavno temo *Kakovost in varnost zdravljenja*.

Glavna predavanja so izdali na zgoščenki, ki so jo prejeli vsi člani EAHP skupaj z glasilom EJHP.

2. Publicistična dejavnost EAHP

EAHP izdaja uradno glasilo že 10 let. Glasilo prejemajo vsi člani nacionalnih združenj bolnišničnih farmacevtov, ki so včlanjena v EAHP. Zadnja 4 leta je časopis izhajal v treh jezikih: angleščini, nemščini in francoščini, od letos dalje bo izhajal samo v angleščini.

Slovenija se je v letu 2004 predstavila v poglavju Focus Slovenia, v jubilejni številki EJHP pa so bili objavljeni rezultati raziskave iz leta 2004 o izobraževalnih programih za kadre v bolnišničnih lekarnah po Evropi, ki jo je vodila slovenska predstavnica v odboru EAHP.

Časopis EJHP se z letošnjim letom deli v dva dela: EJHP Practice in EJHP Science, vsak bo izšel 6 krat letno. EJHP Science ima v mednarodnem odboru tudi slovensko predstavnico, prof. dr. Mirjano Gašperlin, mag.farm.

3. Raziskave EAHP 2005

EAHP že tretjič izvaja raziskovalni projekt. Pri slednjem je sodelovala tudi Slovenija. V projekt

je vključenih 28 evropskih držav in prvič poteka elektronsko. Vprašalnik vsebuje 90 vprašanj s področja bolnišnične farmacije. Zbiranje odgovorov bo zaključeno 31. oktobra 2005.

Za izvedbo raziskave, ki obsega elektronsko distribucijo vprašalnikov in statistično obdelavo podatkov, je EAHP sklenilo pogodbo s slovenskim podjetjem.

4. Spletna stran

Prenovljena spletna stran EAHP bo omogočala: prijavo za kongres in plačilo kotizacije, nakup knjig, izpolnjevanje vprašalnika raziskave EAHP 2005 ter povezavo z drugimi sorodnimi organizacijami.

Strokovna tema je obravnavala *Varnost bolnika*. Za varnost zdravljenja bi moral biti v vsaki bolnišnici vzpostavljen sistem, ki bi temeljil na skupinskem delu teama: zdravnik - medicinska sestra - bolnišnični farmacevt. Bolnišnični farmacevt bi imel pomembno vlogo pri zagotavljanju večje varnosti zdravljenja in zmanjšanju napak pri zdravljenju z zdravili. S prof. Arnoldom Vultom iz Nizozemske sva predstavila rezultate raziskave o varnosti bolnišničnega zdravljenja (EAHP Survey: Patient Safety, maj 2005), ki sem jo izvedla v 25 evropskih državah. Prikazala je aktivnosti bolnišničnih farmacevtov pri zagotavljanju varnega zdravljenja in pri evidentiranju napak. Raziskava je pokazala tudi sistem in oblike izobraževanja o varnosti zdravljenja z zdravili v različnih evropskih državah. Posebej sem poročala o raziskavi, ki jo je pod okriljem Ministrstva za zdravje RS izvedla Komisija za zdravila iz Kliničnega centra v Ljubljani v vseh slovenskih bolnišnicah.

Sporočilo Evropske komisije generalni skupščini, ki ga je posredoval dr. Fernand Sauer, direktor javnega zdravja in zaščite

potrošnika pri Evropski komisiji, da je varnost bolnika prva skrb zdravstvenih delavcev, usmerja vse aktivnosti bolnišničnih farmacevtov k vzpostavljanju in zagotavljanju pogojev za varno zdravljenje z zdravili v bolnišnicah.

Cilj EAHP je vključiti v evropsko organizacijo vse evropske države članice Sveta Evrope. Slovenija je članica že od leta 1996, za nami so vstopile še Češka in Hrvaška, leta 2004 Latvija in Estonija, v letu 2005 pa Poljska in Litva.

Po novem statutu predstavljajo upravni odbor Združenja, poleg predsednika in podpredsednika, še direktorji področij za znanost in raziskovanje, za strokovna področja, za organizacijo, za finance in za zunanje zadeve. Slovenija ima v odboru od leta 2000 svojo predstavnico s funkcijo direktorice za strokovno področje.

Fondacija EAHP je bila ustanovljena leta 2002 z namenom pospeševati strokovni razvoj držav članic, ki na področju bolnišnične farmacije še ne dosegajo ravni stroke razvitejših zahodnoevropskih držav. Fondacija bo v bodoče pokrovitelj in organizator mednarodnih učnih delavnic za posamezna področja bolnišnične farmacije z namenom izobraževanja bolnišničnih farmacevtov centralne in vzhodne Evrope ter vezni člen med evropskimi državami pri izmenjavah za pridobivanje izkušenj v praksi v pomembnejših evropskih bolnišnicah oziroma bolnišničnih lekarnah. Glavni projekt Fondacije EAHP pa je priprava standardov za posamezna področja bolnišnične farmacije.

Tajda Gala Miharija, mag. farm., spec. (predstavnica Sekcije bolnišničnih farmacevtov pri SFD v upravnem odboru EAHP, direktorica za strokovno področje EAHP)

Poročilo o 1st PharmSciFair & Exhibition

Julijana Kristl

1st PharmSciFair (Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition) je organiziralo 26 različnih strokovnih združenj iz trinajstih evropskih držav, med katerimi je bilo tudi Slovensko farmacevtsko društvo. Simpozij, ki je potekal v Nici od 12. do 17. junija 2005, se je pričel v nedeljo z otvoritvijo in predstavitvijo posameznih organizatorjev. SFD je bilo prikazano izvrstno!

Med vabljenimi predavatelji velja izpostaviti Nobelovega nagrajenca iz leta 2002 prof. dr. Kurta Wüthricha iz ETH v Zürichu ter predstavnika iz DG Research European Commission. Simpozij je potekal v šestih ali

sedmih sekcijah hkrati iz različnih področij farmacevtskih znanosti v obliki vabljenih predavanj, kratkih ustnih predstavitev in posterjev. Simpozija se je udeležilo več kot 1000 raziskovalcev in znanstvenikov v glavnem iz evropskega prostora. Predavanja udeležencev so bila iz vseh področij farmacevtskih znanosti na visoki znanstveni ravni, predvsem pa s poudarkom na novostih, ki jih uvajajo v vsakdanje raziskovalno in razvojno delo. Zanimiva je bila tudi razstava različnih proizvajalcev, predvsem manjše tehnološke opreme, analiznih naprav in znanstvene literature. Med razstavljalci so bili tudi eksperti za široko

področje farmacevtskih dejavnosti, ki so ponujali celovite rešitve določenih projektov.

Iz Slovenije je bilo prijavljenih 14 udeležencev. Na 1st PharmSciFair smo predstavili naše raziskovalno delo z 12 prispevki (ustno in s plakati), bili moderatorji treh sekcij in se neposredno pogovarjali ter izmenjali izkušnje z raziskovalci renomiranih inštitutov in tovarn.

Glede na številne čestitke po dveh predavanjih in velik interes za vsebino naših posterjev ocenjujemo, da je bila predstavitev raziskovalnega dela raziskovalcev iz Slovenije izredno uspešna.

Izlet seniorjev v Furlanijo Julijsko krajino

Brenčič Marija

Seniorska sekcija pri SFD je organizirala tridnevni izlet na Goriško in v Furlanijo - Julijsko krajino. Spoznali smo zgodovino krajev, ki so bili nekoč sestavni deli avstroogrške monarhije, z Rapalsko pogodbo leta 1920 pa so jih priključili Italiji.

Oglede smo začeli v Vipavskem Križu, kjer je živel in pridigal Janez Svetokriški s pravim imenom Tobia Lionelli. Njegov skoraj 3000 strani obsegajoč zbornik pridig, ki je izšel v 5 knjigah, je shranjen v znamenitem kapucinskem samostanu. Samostan, ki je bil ustanovljen z namenom širjenja krščanstva kot protiutež protestantizma, se ponaša z bogato knjižnico in samostansko cerkvijo, ki se je ohranila do današnjih dni. Grad z obzidjem je žal samo delno obnovljen. Tudi Primož Trubar je obiskal Vipavski Križ in na mestu, kjer je pridigal, stoji spominska plošča.



Na Stari gori nad Čedadom

Pot nas je vodila dalje na Kostanjevico pri Novi Gorici, ki jo domačini poznajo pod imenom Kapela. Leta 1985 je bilo celotno območje Kostanjevice razglašeno za umetnostni in arhitekturni spomenik. Obsega cerkev in frančiškanski samostan z bogato škrabčevo knjižnico, ki so jo leta 2004 odprli tudi za javnost. Knjižnica nosi ime po patru Stanislavu Škrabcu (1844 -1918), največjem slovenskem jezikoslovcu - slovenistu 19. stoletja, ki je na Kostanjevici živel nad štirideset let. Knjižnica ima nad 10.000 knjig, med njimi predstavljajo posebno dragocenost okrog 30 inkunabul ter Bohoričeva slovnica iz leta 1584 *Arcticae horule (Zimske urice)* z avtorjevim lastnoročnim posvetilom. Grobnica Burbonov, ki leži v prostorih pod cerkvijo, daje temu spomeniku dodatno zgodovinsko vrednost. Že deset let deluje na Kostanjevici Don Pierinova komuna za zdravljenje odvisnikov od drog.



Pred najstarejšo hišo v Čedadu

Dan smo zaključili v Solkanu z ogledom solkanskih mostov - kamnitega železniškega mostu iz leta 1906, ki se ponaša z najdaljšim kamnitim lokom v Evropi ter betonskega mostu iz leta 1986, po katerem teče ozimska cesta, ki povezuje Gorico z Goriškimi Brdi.

Naslednji dan nas je pot vodila po Italiji. V Sredipolju (Redipuglia) smo si ogledali največji italijanski spomenik 1. svetovne vojne, na katerem je pokopanih 100.000 padlih vojakov. Razprostira se na meji med kraško planoto in Furlansko nižino. Na 22-tih terasah so pokopani znani vojaki (40.000), v kapeli pa sta urejeni dve kostnici z neznanimi padlimi vojakovi (60.000), muzej in maketa bojišča. Povzpeli smo se tudi do ene od pomembnejših točk frontne črte v 1. svetovni vojni, vzpetine Sveti Mihael in si ogledali podzemne vojaške rove.

Vožnja z ladjico do romarske cerkve na otočku Barbana v bližini letoviškega kraja Gradež je bilo posebno doživetje.

Dan smo zaključili z ogledom znamenite bazilike v Ogleju (Aquila). Mesto so ustanovili Rimljani leta 181 pr. n. št. kot vojaško naselbino. Tolminski zgodovinar Simon Rutar v svoji knjigi: *Poknežena grofija Goriška in Gradiščanska* (1893) navaja, da so iz Ogleja, ki je bil pomembno trgovsko in vojaško središče, rimske legije izvajale kontrolo nad mesti, ki so jih osvojile vse do Donave. V času rimskega cesarja Avgusta je mesto doživelo

svoj največji razcvet in je imelo okrog 200.000 prebivalcev. Prve stavbe, namenjene bogoslužju, so bile zgrajene v začetku 4. stoletja, ko se je tu pojavilo krščanstvo. V letih od 167 do 169 je v Ogleju deloval tudi rimski zdravnik in farmacevt Galenos. Prišel je na prošnjo rimskih cesarjev Verusa in Aureliusa, da bi pomagal zatreti epidemijo kuge. Kasneje so Huni in druga plemena mesto popolnoma uničili. Sedanja bazilika je bila zgrajena na zemljišču, kjer je nekoč stala južna bogoslužna dvorana, le da so temelje zgradili precej višje kot so bili prvotni. Leta 1031 je oglejski patriarh Popo dal zgraditi zvonik, ki stoji še danes. Ob vstopu v baziliko nas prevzame ogromna mozaična preproga (37 m x 20 m), ki se je ohranila iz 4. stoletja. Debela plast blata in gramoza, ki je prekrivala mozaik, ga je ščitila celih 1600 let.

Naporen in zanimiv dan smo zaključili z ogledom igralnice Perla.

Tretji dan smo se ponovno odpeljali v Furlanijo in obiskali upravno in kulturno središče Benečije, mesto Čedad (Cividale).

Tu je potekala stara trgovska pot, kjer je na stičišču Nadiških dolin nastalo trgovsko središče venetsko - ilirskega izvora. Področje so v 3. stoletju zavzeli Kelti, kasneje so se na oblasti zvrstili Rimljani, Langobardi, frankovsko-germanska oblast, celih 350 let je bila posvetna in cerkvena oblast v rokah oglejskih patriarhov, od 15. do

18. stoletja so krajem vladali Benečani, pod katerimi so prebivalci Nadiške doline imeli precejšnjo avtonomijo.

Po različnih virih so se v teh krajih med 6. in 7. stoletjem pojavili Slovenci, ki so prišli na Goriško čez Kranjsko, v severnem delu čez Predel. Silili so proti Italiji, a Langobardi so jim branili vhod in so jih potiskali nazaj. Kljub temu se je veliko Slovencev naselilo zlasti po hribovith predelih v okolici Čedada in v nižinskem delu ob reki Taljamento. V 7. stoletju so se južni Slovani, kasneje Slovenci, umikali pred Obri. Naseljevanje naj bi se nadaljevalo vse do 10. stoletja na pobudo samih patriarhov, ker so hoteli ponovno naseliti izpraznjene dele, da bi tako zavarovali in utrdili obrambo Nadiške doline. Izseljevanje ljudi iz teh krajev je potekala že od 15. stoletja dalje in je doseglo svoj višek po 1. svetovni vojni, v času gospodarske krize in zaradi fašističnega pritiska na Slovence.

Čedad kot trgovski in kulturni center s številnimi dobro ohranjenimi zgradbami iz časov beneške republike, je vreden ogleda. Ob obisku Čedada smo se sprehodili čez Nadižo po hudičevem mostu, od koder je prekrasen pogled na najstarejši del mesta, ki ga krasijo stare kamnite stavbe, med katerimi najstarejša izvira iz 13. stoletja.

Pot nas je vodila naprej na Staro goro, k Marijini cerkvi, največjemu romarskemu svetišču beneških Slovencev, h kateremu so verniki romali že v 13. stoletju. Izlet smo popestrili z degustacijo vin v zaselku Jazbine.

Številni slavni umetniki so bili gostje na gradu Devin, ki smo si ga izbrali za zadnjo izletniško točko, od koder smo se potem odpravili domov. Gotovo je vsak udeleženelec odnesel s seboj veliko lepih vtisov iz pokrajine, ki je tekom stoletij doživljala velike politične spremembe.

Farmaceutsko-botanična ekskurzija na Slavnik

Zdenko Taušič

Sekcija farmacevtskih tehnikov pri SFD je 11. junija v sodelovanju s Farmedico d.o.o. organizirala farmacevtsko-botanično ekskurzijo na Slavnik, ki jo je vodil prof. dr. Samo Kreft.

Ekskurzije se je udeležilo 50 članov Sekcije iz različnih delov Slovenije. Z avtobusom smo



Prof. dr. Kreft razlaga značilnosti vegetacije na Slavniku

se pripeljali do nadmorske višine 518 m v kraško vasico Podgorje, ki leži v zavetrju, stisnjena ob vznožju Slavnika. Kraškoistrska arhitektura, z značilnimi hišami iz belega kamna daje vasi značilen kraški videz. Iz vasi vodi na Slavnik več poti. Naša skupina se je odpravila po položni poti proti pobočju Slavnika, ki je s svojimi 1028 m nadmorske višine zadnji tisočak na poti iz notranjosti Slovenije proti morju. Do vrha Slavnika smo morali premagati 500 m višinske razlike. Vreme nam je bilo naklonjeno in ne prevroče. Do vrha je poldruga ura hoda, zaradi spoznavanja tamkajšnjih rastlin pa smo potrebovali dobro uro več.

Spodnji del Slavnika je poraščen z redkim gozdom črnega gabra, travnato pobočje pa se ponaša z zelo raznoliko in bogato floro, s katero nas je seznanil prof. dr. Kreft. Spoznali

smo veliko rastlin, njihovih imen in izvedeli mnogo o njihovi uporabi. Med njimi so se nam posebej vtisnile v spomin: medenika (*Melittis melissophyllum*), navadni kokoševec (*Vincetoxicum hirundinaria*), cipresasti mleček (*Euphorbia cyparissias*), rumeni podraščec (*Aristolochia lutea*)... Zgornje del Slavnika je zelo položen, zato so ga okoliški kmetje kmalu posekali in se danes uporablja kot senožet. Na pobočju pod vrhom se odpre čudovit pogled proti morju, na Piranski in Tržaški zaliv ter Istro. Ta del pobočja daje vtis, da gre za skrbno urejen cvetlični vrt. Tu smo lahko občudovali navadno potoniko (*Paenonia officinalis*), jagodasto hrušico (*Muscari botryoides*), bledorumeni ušivec (*Pedicularis friderici-augusti*), gorskega kosmatinca (*Pulsatilla montana*), trebušasti švišč (*Gentiana utriculosa*)... Vmes smo opazili

tudi veliko zdravnih rastlin: košutnik, materino dušico, vinsko rutico, šentjanževko, baldrijan, glog... V koči smo se malo odpočili, potem pa se vrnilo po položnejši poti proti Kozini. Pot je bila precej daljša, vendar smo kljub utrujenosti uživali v naravi. Strokovna ekskurzija je bila zelo dobrodošla za osvežitev našega znanja iz botanike in farmakognozije. Na zanimiv in sproščen način nam je to znanje posredoval prof. dr. Kreft, ki nas je spremljal.

Izlet smo zaključili s popoldanskim kosilom v gostilni Mahnič, kjer smo ob prijetnem klepetu že kovali načrte za prihodnje leto. Polni navdušenja smo se s predstavniki Farmedice d.o.o. in direktorjem g. Robertom Terčeljem že dogovorili, da bodo naša srečanja postala tradicionalna.



Udeleženske ekskurzije med predavanjem v naravi