

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 3 • O K T O B E R 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

Stane Srčič

Mojca Kerec

Tatjana Kogovšek Vidmar

Mateja Malešič

Zofija Vitkovič

Anamarija Zega

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 regularly abstracted in:

BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

Ali res lahko pride do pandemije ptičje gripe? Pandemija že obstaja, a le med ptičjimi vrstami, pri čemer so določene vrste prenašalci, določene pa tudi zbolijo. Zaradi velike sposobnosti mutacije dveh površinskih proteinov v kapsidi virusa H5N1 (H=hemaglutinin, N=nevraminidaza), obstaja določena verjetnost takšne spremembe, ki bi omogočala širitev virusa gripe od človeka do človeka. A verjetnost je relativno majhna. Vsaj trenutno. Do pandemije pa bo gotovo prišlo, vmes pa je lahko nekaj let ali tudi desetletje. Verjetno je pretirana brezglavost, ki smo ji priča, trenutno odveč. Vsakih nekaj desetletij pač pride do pandemije virusnih obolenj. S sodobno farmakoterapijo smo kos dobršnemu delu bolezenskih stanj, bolezenska znamenja vsaj omilimo, zato verjamem, da bomo tudi pri ptičji gripi prišli do rešitev. Verjetno v obliki aktivne imunizacije prebivalstva. O poteku bolezni in zdravljenju bo izšel obširen članek v naslednji, četrti številki Farmaceutskega vestnika, o cepljenju, kot možnemu načinu preventive, pa si lahko preberete novičko v rubriki »Novice iz sveta farmacije«. V tej številki predstavljamo dva izvirna znanstvena članka, ki prikazujeta del raziskav dveh raziskovalnih skupin na Fakulteti za farmacijo. Prvi članek nas seznanja z genetiko laktozne intolerance. Kakšen genotip za laktazo imamo Slovenci? Na kakšen način ga določimo? Preberite si v pričujoči preiskavi. Drug članek je tehnološko obarvan, vsebuje pa raziskavo s pomočjo inverzne plinske kromatografije, ki je redkost v srednji Evropi. Na Fakulteti za farmacijo smo ponosni, da aparaturu, predvsem pa večino upravljanja z njo, dobro poznamo. V preglednih člankih bomo brali o hitro se razvijajočem področju tkivnega inženirstva, o prehodu zdravil skozi placento in o ciljani dostavi zdravil z liposomi pri zdravljenju rakavih obolenj. Vsa našeta področja kažejo na veliko raznolikost, ki jih slovenska farmacija premore, kljub skromni finančni podpori za znanost in tehnologijo. Zanimiva je vzporednica, ki sama nakazuje pravo smer razvoja: države, ki veliko vlagajo v znanost in izobraževanje, prevzemajo vodilno vlogo v gospodarstvu. Le upamo lahko, da se bomo tudi iz takih podatkov kaj naučili.

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

Vsebina

Borut Štrukelj

Beseda odgovornega urednika

181

Originalni znanstveni članki - Scientific Articles

Nataša Karas Kuželički, Jana Lukač-Bajalo

Genetika laktozne intolerance odraslih in pogostost polimorfizma -13910C>T v slovenski populaciji

Genetics of adult-type lactose intolerance and frequency of -13910C>T polymorphism in Slovenian population

183

Odon Planinšek, Jernej Zadnik, Matjaž Kunaver, Marjan Bele, Stane Srčič

Določanje površinskih lastnosti vzorcev laktoze, pripravljene s sušenjem z razprševanjem, z liofilizacijo in z obarjanjem

Determination of surface properties of lactose samples prepared by spray-drying, lyophilization and precipitation

188

Pregledni članki - Review Articles

Saša Puhar, Matjaž Jeras

Predpisi za pripravke tkivnega inženirstva in za somatsko celično zdravljenje

Regulative for tissue engineered medical products and somatic cell therapy

194

Matej Avanzo, Alenka Šavc, Mojca Kerec Kos

Zdravila v nosečnosti I: Prenos učinkovin skozi placento

Drugs in pregnancy I: Drug transport across the placenta

198

Nina Kočevar, Julijana Kristl

Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi

Tumor-specific targeting of drugs by liposomes

202

Novice iz sveta farmacije

207

Osebne vesti

209

Genetika laktozne intolerance odraslih in pogostost polimorfizma -13910C>T v slovenski populaciji

Genetics of adult-type lactose intolerance and frequency of -13910C>T polymorphism in Slovenian population

Nataša Karas Kuželički, Jana Lukač-Bajalo

POVZETEK: Encim laktaza (EC 3.2.1.23) hidrolizira disaharid laktozo do galaktoze in glukoze. Normalno je aktivnost laktaze v otroštvu visoka, pri večini odraslih pa močno upade. Vendar pa nekatere osebe ohranijo visoko aktivnost laktaze tudi v odrasli dobi. Leta 2002 so odkrili polimorfizem -13910C>T, ki se 100-odstotno ujema z visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. CC homozigoti imajo nizko, TT homozigoti in TC heterozigoti pa visoko aktivnost laktaze v odrasli dobi. V slovenski populaciji ima 39 % oseb genotip CC, 61 % pa genotip CT ali TT. Največ je oseb z genotipom CT (51 %), najmanj pa homozigotnih TT oseb (10 %). Ujemanje med genotipom CC in znaki laktozne intolerance ni popolno. Pogostost znakov pri osebah z genotipom CC s starostjo narašča.

Ključne besede: laktoza, laktaza, laktozna intoleranca odraslih

ABSTRACT: Enzyme lactase (EC 3.2.1.23) hydrolyzes disaccharide lactose to galactose and glucose. Neonatally, lactase activity is high, but drastically decreases in most adults. However, some adults maintain high lactase activity. In 2002 -13910C>T polymorphism was discovered, which correlates well to high lactase activity in adults. CC homozygotes have low, while TT homozygotes and CT heterozygotes have high lactase activity in adulthood. In Slovenian population there are 39 % of CC homozygotes and 61 % of CT heterozygotes and TT homozygotes. The most frequent is CT (51 %) and the least frequent is TT genotype (10 %). Correlation between CC genotype and symptoms of lactose intolerance is only partial. Incidence of symptoms in CC genotype persons increases with age.

Key words: lactose, lactase, adult-type lactose intolerance

1 Uvod

1.1 Aktivnost encima laktaze je odvisna od starosti

Laktaza (EC 3.2.1.23) oz. s polnim imenom laktaza-florizin hidrolaza (LPH) (EC 3.2.1.23, 3.2.1.62) je encim, ki hidrolizira dve vrsti disaharidov. Disaharid laktozo hidrolizira v galaktozo in glukozo (β -galaktozidazna aktivnost), disaharid florizin pa v glukozo in floretin (β -glukozi-dazna aktivnost) (1, 2). Encim se pojavlja samo pri sesalcih, ne pa pri drugih vretenčarjih, saj je mleko, ki vsebuje velike količine laktoze, v obdobju po rojstvu pri sesalcih edini vir energije. Normalno imajo sesalci v otroštvu visoko aktivnost laktaze, ki pa pri odraslih sesalcih močno upade. Ta obrazec velja tudi za večino ljudi, vendar pa nekatere osebe ohranijo visoko aktivnost laktaze tudi v odrasli dobi.

Velik delež takih oseb so opazili v populacijah, ki se intenzivno ukvarjajo z živinorejo (Severna Evropa, Subsaharska Afrika) in je bila sposobnost prebavljanja mleka v odrasli dobi ključnega pomena za preživetje v obdobjih pomanjkanja drugih virov hrane (1, 2). Predvidevajo, da je do močnega pozitivnega izbora prišlo pred 5.000 do 10.000 leti (2, 3). Izraz laktozna intoleranca se uporablja za normalno znižanje laktazne aktivnosti pri odraslih, kar pa ni vzrokoslovno pravilno, saj gre za popolnoma normalno in celo prevladujoče stanje v globalni človeški populaciji. Bolj primerna bi bila uporaba izraza laktozna persistenca za oznako ohranitve visoke laktazne aktivnosti v odrasli dobi, saj le-to stanje nastane z mutacijo v normalnem genotipu. Kljub temu se danes ponavadi uporablja izraz laktozna intoleranca, ker so se raziskave laktaze začele v severni Evropi, kjer prevladuje visoka aktivnost laktaze pri odraslih (4).

Dolgo ni bilo jasno, kaj povzroči znižanje laktazne aktivnosti pri odraslih. Študije leta 1966 in 1967 so pokazale, da je aktivnost encima odvisna izključno od regulacije na genskem nivoju in da ni povezana s količino zaužite laktoze (4, 5). Vendar pa na izražanje znakov laktazne intolerance lahko vplivajo tudi dejavniki okolja, kot so črevesna flora posameznika, hormoni (tiroksin, kortizon), količina zaužite laktoze in subjektivno doživljanje znakov (5). Leta 1985 so dokazali, da pride do znižanja encimske aktivnosti pri odraslih zaradi zmanjšanja sinteze laktaze (4). V devetdesetih letih pa so dokazali, da je sinteza laktaze zmanjšana zaradi zmanjšane transkripcije gena za laktazo (4, 6).

Ugotovili so tudi, da HNF-1 (*hepatocyte nuclear factor 1*) stimulira transkripcijo gena za laktazo (7, 8). Pri prašičih se vezalno mesto HNF-1 nahaja v promotorski regiji gena LPH, pri človeku pa vezalnega mesta še niso našli. Predvidevajo, da bi se lahko nahajalo še bolj navzgor od promotorske regije gena LPH (9). S HNF-1 sproženo transkripcijo stimulira produkt gena HOXC11 (Homeo Box C11) (10). Ta gen je član družine HOX genov, ki poleg SOX in PAX genov spadajo med razvojne gene. Ti geni se močno izražajo v fetalnem razvoju in usmerjajo razvoj osebkov. HOXC11 se izraža v tankem črevesu, ledvicah in skeletnih mišicah. Njegovo izražanje je največje v fetalnem tkivu (11).

1.2 Laktazna intoleranca odraslih

Laktazna intoleranca odraslih je normalno znižanje aktivnosti laktaze v odrasli dobi na 5-10 % encimske aktivnosti v otroštvu. Znaki vključujejo drisko, bolečine v trebuhu, napenjanje in slabost po zaužitju večjih količin mleka. Do driske pride zaradi zastajanja nerazgrajene laktoze v črevesu. Laktoza zaradi svojega osmotskega učinka povzroči zadrževanje vode v črevesu, kar ima za posledico tekoče blato. Znaki se pojavijo v različnih populacijah pri različnih starostih, velike pa so tudi razlike med posamezniki. Tako se pri Afričanih in Azijcih znaki pojavijo že zgodaj v otroštvu (2-7 let), medtem ko se pri belcih ponavadi pojavijo v adolescenci. Pogostost laktazne intolerance je najvišja v Aziji, kjer doseže skoraj 100 %. Visoka je tudi pri večini Afričanov (50-80 %), izjema so nekatera živinorejska plemena v subsaharski Afriki. V Evropi niha pogostost od 2-5 % v Skandinaviji, do 70 % v južni Evropi. Večina laktazno intolerantnih oseb doživi znake po zaužitju 50 ali več gramov laktoze, vendar pa so pri nekaterih znaki odsotni tudi po zaužitju zelo velikih količin laktoze. Vzrok za

to je zaenkrat še neznan. Osebe z laktazno intoleranco lahko brez težav uživajo jogurt, kjer je laktoza že delno razgrajena s strani bakterijskih kultur. Tudi mleko z več maščobe naj bi povzročalo manj težav kot manj mastno mleko. Vzrok za to je daljše zadrževanje mastnega mleka v prebavnem traktu. Prebava mleka pri laktazno intolerantnih osebah se izboljša tudi, če mleko zaužijejo ob prisotnosti kaka-va ali trdne hrane, ki vsebuje veliko vlaknin (12).

1.3 Genetika laktazne intolerance odraslih

Genetika laktazne intolerance oz. laktazne persistence je dokaj zapletena, saj še vedno niso odkrili definitivne mutacije, ki je odgovorna za to stanje. Predvsem v zadnjih 2 letih pa je na tem področju prišlo do znatnega napredka.

Leta 1995 so v študiji Harvey et al. (13) odkrili 7 polimorfizmov v genu za laktazo ali v njegovi neposredni bližini, ki so kazali povezanost z visoko oz. nizko aktivnostjo laktaze pri odraslih. Ugotovili so, da se ti polimorfizmi vedno dedujejo skupaj oz. vezano, kar je pripeljalo do tvorbe sistema laktaznih haplotipov. V različnih kombinacijah so ti polimorfizmi tvorili 42 različnih haplotipov. Končni sistem haplotipov je postavil Hollox s sodelavci leta 2001 (14). Ugotovili so, da laktazni haplotip sestavlja 11 polimorfizmov, ki se nahajajo v genu LPH ali v njegovi neposredni bližini. Večinoma gre za substitucije enega baznega para z drugim, nekaj pa je delecij/insercij enega ali več baznih parov. Različne kombinacije teh 11 polimorfizmov tvorijo 42 haplotipov: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o in p. Najpogostejši haplotipi so A, B, C in U, ki so prisotni pri 45 %, 18 %, 15 % in 5 % svetovne populacije. Ostali haplotipi so zelo redki in imajo pogostost 2 % ali manj. Haplotip k so našli pri šimpanzih in naj bi bil izvorni haplotip iz katerega so z mutacijami in rekombinacijami nastali vsi ostali haplotipi. Preglednica 1 prikazuje sestavo 4 najpogostejših haplotipov A, B, C in U.

Haplotip A je povezan s persistence laktaze v odrasli dobi, vendar samo pri Evropejcih in ne pri Afričanih in Azijcih (14).

Haplotipi se različno porazdeljujejo pri različnih rasah in narodih (glej preglednico 2) (14).

Preglednica 1: Sestava najpogostejših haplotipov A, B, C in U

Table 1: The makeup of the most widespread haplotypes A, B, C and U

polimorfizem	C	A	C	TC	G	A	A8	C	G	T	TG
haplotip	-985 T	-946 G	-942 G	-942/3 ΔΔ	-875 A	-678 G	-552/ A9	485 int T	666 A	5579 C	6236/7 ΔΔ
A	C	A	C	TC	G	A	A9	C	G	C	TG
B	T	A	C	TC	G	A	A8	C	A	T	ΔΔ
C	C	A	C	TC	G	G	A8	C	G	T	TG
U	C	A	C	ΔΔ	G	A	A9	C	A	T	TG

Preglednica 2: Pogostost laktaznih haplotipov v različnih populacijah

Table 2: The frequency of lactase haplotypes in various populations

Haplotip	Severna Evropa	Južna Evropa	Indija	Rusija	Kitajska	Japonska	Bantu (Afrika)
A	86 %	36 %	44 %	44 %	47 %	37 %	10 %
B	6 %	32 %	22 %	21 %	10 %	10 %	0 %
C	3 %	12 %	23 %	15 %	9 %	15 %	31 %
U	0 %	0 %	0 %	1 %	17 %	24 %	7 %
persistenca laktaze	75 %	26 %	48 %	37 %	6 %	10 %	13 %

Haplotip A je najpogostejši v severni Evropi in je tudi prevladujoč haplotip v tej populaciji, kar se ujema z velikim deležem laktazno persistentnih oseb v tem delu sveta. V južni Evropi je haplotip A manj pogost, več pa je haplotipov B in C. To se ujema z veliko nižjim odstotkom oseb z visoko aktivnostjo laktaze kot v severni Evropi. Rusija in Indija kažeta podobno stanje kot Evropa, kar je razumljivo, saj gre za kavkazijske populacije. Haplotipa U pri kavkazijskih ni, je pa zelo pogost pri Azijcih, ki pa so skoraj 100 % laktozno intolerantni. Populacije v subsaharski Afriki so najbolj haplotipsko heterogene, kar kaže na to, da se je *Homo Sapiens* razvil v Afriki in se od tam v več valovih razselil v Evropo in Azijo. Za manjšo raznolikost haplotipov v neafriških populacijah je torej odgovoren genetski odmik. V severni Evropi pa naj bi z razvojem živinoreje pred 10.000 leti prišlo do močne pozitivne selekcije za A haplotip, ki je povezan z laktazno persistenco. Ker je A haplotip povezan s persistenco samo pri Evropejcih, pomeni, da je mutacija odgovorna za persistenco nastala šele po odselitvi *H. Sapiens* v Evropo. Iz preglednice 2 je tudi razvidno, da je v neevropskih populacijah velik delež oseb z A haplotipom laktozno intolerantnih. Vse to kaže na to, da opisani polimorfizmi ne morejo biti vzrok za persistenco laktaze v odrasli dobi, temveč so samo označevalski polimorfizmi, ki se pogosto dedujejo vezano z vzročno mutacijo (14).

Leta 2002 pa so odkrili polimorfizem -13910C>T, ki se 100-odstotno ujema s persistenco laktaze v odrasli dobi. Gre za spremembo C v T na mestu 13910 bp navzgor od iniciacijskega kodona ATG gena za laktazo. Alel C je povezan z nizko, alel T pa z visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. Tako imajo homozigoti CC laktozno intoleranco, homozigoti TT in heterozigoti CT pa laktazno persistenco (15). Homozigoti CC imajo približno 10 % aktivnosti laktaze homozigotov TT, heterozigoti CT imajo v povprečju nižje aktivnosti kot TT, vendar pa se aktivnosti za TT in CT prekrivajo. Aktivnosti laktaze za CC osebe so od 4 do 9 U/g, za CT od 13-49 U/g in za TT 18-87 U/g. Pri heterozigotih CT se alel T izraža 11,5-krat bolj kot alel C in predstavlja 92 % mRNA laktaze (16).

Polimorfizem -13910C>T se nahaja v 13. intronu gena MCM6 (*Minichromosome maintenance 6*), v regiji, ki kaže homologijo z LINE (*long interspersed nuclear element*). MCM6 se nahaja poleg gena LPH, njegov produkt je regulator celičnega cikla. MCM6 verjetno ni funkcionalno povezan z laktazo, gre le za prekrivanje regulatorne regije gena LPH s koncem transkripcijske regije MCM6 gena (17). -13910C>T vpliva na vezalno mesto transkripcijskega faktorja AP-2. Le-ta verjetno vpliva na razvojno-specifično regulacijo laktaze prek cis-transkripcijskega efekta. Natančen mehanizem delovanja še ni znan (2).

V študiji Poulter et al. iz leta 2003 (18) so ugotavljali ujemanje polimorfizma -13910C>T s haplotipi. Ugotovili so, da je pri vseh haplotipih

razen A na mestu -13910 vedno prisoten C, kar se ujema z ugotovitvijo, da so vsi haplotipi razen A povezani z laktozno intoleranco. Pri Evropejcih je bil pri haplotipu A na mestu -13910 v veliki večini primerov prisoten T, kar potrjuje povezanost haplotipa A z laktazno persistenco. Pri ostalih rasah pa je bil v večjem številu primerov na mestu -13910 v haplotipu A prisoten C, kar kaže na to, da haplotip A lahko povezujemo z laktazno persistenco samo pri Evropejcih, alel T pa je povezan s persistenco tudi pri drugih rasah (18). Iz tega sklepamo, da je določanje polimorfizma -13910C>T boljše diagnostično orodje kot določanje haplotipov. Videti je, da je -13910C>T nastal pozneje kot polimorfizmi, ki definirajo haplotip A in je odličen kandidat za vzročni polimorfizem za laktazno persistenco. Vendar pa so pred kratkim ugotovili, da navedeni polimorfizem verjetno ni odgovoren za laktazno persistenco v nekaterih živinorejskih plemenih v subsaharski Afriki, saj je v teh populacijah T alel zelo redek in ne more razložiti visokega deleža laktazno persistentnih oseb (19). Zato bi bilo treba preiskati širše območje navzgor od gena LPH.

Genotipizacija je najzanesljivejši način diagnostike laktozne intolerance, saj s to metodo lahko odkrijemo tudi tiste laktozno intolerantne osebe, ki nimajo znakov. Hkrati pa lahko izločimo osebe z drugimi boleznimi, ki povzročajo moteno delovanje disaharidaz. S tem preprečimo nepotrebno umaknitev mleka iz prehrane in omogočimo zdravljenje morebitnih resnih obolenj. Ker so polimorfizem -13910C>T, ki se pri Evropejcih popolnoma ujema z laktazno persistenco odkrili šele pred kratkim, pa se genotipizacije še ne uporablja za rutinsko diagnostiko, temveč samo v raziskovalne namene. Polimorfizem -13910C>T določimo s PCR in RFLP, lahko pa uporabimo tudi sekveniranje. V sledeči študiji smo prvič določili pogostost laktozne intolerance v slovenski populaciji z metodo genotipizacije.

2 Materiali in metode

2.1 Preiskovanci

V raziskavi je sodelovalo 172 zdravih prostovoljcev. Povprečna starost preiskovancev je bila 32,9 leta ± 9,6 let. Sestava po spolu je bila: 83 (48 %) žensk in 89 (52 %) moških.

Vsem preiskovancem je bilo odvzeto dvakrat po 3 ml krvi v sterilne epruvete, ki so vsebovale antikoagulant K-EDTA. Ob odvzemu krvi so preiskovanci izpolnili vprašalnik o uživanju mleka in mlečnih izdelkov ter o znakih laktozne intolerance. Vsi preiskovanci so podpisali obveščeni pristanek. Študijo je odobrila tudi Medicinska etična komisija Slovenije.

2.2 Materiali in metode

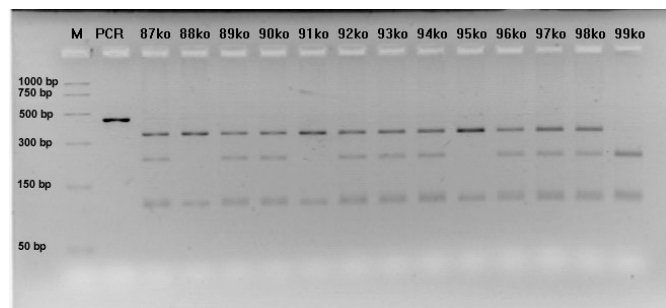
Za izolacijo DNK iz venske krvi smo uporabili FlexiGene DNA Kit (QIAGEN).

Polimorfizem -13910C>T smo določili s polimerazno verižno reakcijo (PCR) in z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Uspešnost PCR in rezultate restrikcije smo ovrednotili z agarozno gelsko elektroforezo.

PCR: V reakcijsko zmes za en vzorec s skupnim volumnom 25 µl smo dodali 14,9 µl vode, 2,5 µl 10 x PCR puфра (Perkin Elmer), 2,5 µl 2,5 mM raztopine dNTP (Perkin Elmer), 2 µl 25 mM raztopine MgCl₂ (Perkin Elmer), 1 µl 5 µM raztopine F oligonukleotidnega začetnika 5'-GGA TGC ACT GCT GTG ATG AG-3' (QIAGEN Operon GmbH), 1 µl 5 µM raztopine R oligonukleotidnega začetnika 5'-CCC ACT GAC CTA TCC TCG TG-3' (QIAGEN Operon GmbH), 0,1 µl raztopine DNK polimeraze AmpliTaq Gold™ (5 U/µl, Perkin Elmer) in 1 µl raztopine DNK. Pogoji PCR so bili: 1 x 95°C 12 minut, 36 x 94°C 30 sekund, 58,5°C 30 sekund in 72°C 1 minuta, 1 x 72°C 7 minut, 1 x 4°C vsaj 6 minut. Produkt PCR je bil 448 baznih parov dolg odsek DNK.

RFLP: V reakcijsko zmes za en vzorec s skupnim volumnom 15 µl smo dodali 8,60 µl vode, 1,5 µl restrikcijskega puфра NEBuffer 4 (50 Mm K-acetat, 20 mM Tris acetat, 10 mM Mg-acetat, 1 mM ditiotritol, pH = 7,9, New England Biolabs), 0,15 µl raztopine acetliranega govejega serumskega albumina (BSA) (100 µg/ml, New England Biolabs), 0,75 µl raztopine restrikcijskega encima *Bsm FI* (2 U/µl, New England Biolabs) in 4 µl raztopine produkta PCR. Zmes smo inkubirali v vodni kopeli čez noč na 65°C. Restrikcijski encim *Bsm FI* selektivno prepoznava zaporedje 5'...GGGAC(N)₁₀...3' v DNK in cepi DNK 10 baznih parov navzdol od prepoznavne sekvence, tako da nastanejo lepljivi konci. Zamenjava nukleotida C z nukleotidom T na mestu -13910 je uvedla novo dodatno mesto delovanja *Bsm FI*. Pri agarozni gelski elektroforezi restrikcijskih produktov sta pri homozigotih CC na gelu vidni dve lisi (351 in 97 bp), pri homozigotih TT pa naj bi bile vidne tri lise (253, 98 in 97 bp), vendar se na agarozni odseka 98 in 97 bp vidita kot ena lisa. Heterozigoti CT imajo torej 4 lise (351, 253, 98 in 97 bp), na agarozni pa so vidne 3 (slika 1). Genotip posameznika smo tako določili glede na prisotnost oz. odsotnost odsekov 351 bp in 253 bp.

Vprašalnik: Preiskovanci so izpolnili vprašalnik o prisotnosti oz. odsotnosti kliničnih znakov laktozne intolerance. Poleg tega so opisali pogostost uživanja mleka in nekaterih mlečnih izdelkov. Njihove odgovore smo sorazmerno točkovali, kjer bolj pogostem uživanju pripišemo večje število točk. Podatke smo obdelali s t-testom, upoštevajoč homogenost oz. nehomogenost variance.



3 Rezultati in razprava

V skupini zdravih preiskovancev je imelo 39 % oseb genotip CC, ki je povezan z nizko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. 61 % preiskovancev je imelo ohranjeno visoko aktivnost laktaze v odrasli dobi oz. genotip CT ali TT. Največ je bilo oseb z genotipom CT (51 %), najmanj pa homozigotnih TT oseb (10 %). Rezultati študije so prikazani v preglednici 3.

Polimorfizem -13910C>T se porazdeljuje po Hardy-Weinbergovem ravnotežju, $p = 0,699$ (χ^2 -test).

Preglednica 3: Pogostost genotipov CC, CT in TT, ter alelska frekvenca (AF) alelov C in T v zdravi slovenski populaciji

Table 3: The frequency of CC, CT and TT genotypes, and the allelic frequency (AF) of C and T alleles in the healthy Slovenian population

Genotip	Število oseb n = 172	Odstotek oseb
CC	67	39 %
CT	87	51 %
TT	18	10 %

Pogostost posameznih laktaznih genotipov v slovenski populaciji smo primerjali z rezultati drugih podobnih študij (preglednica 4).

Iz preglednice 4 je razvidno, da je delež laktozno intolerantnih oseb v slovenski populaciji višji kot v nekaterih severno in zahodno evropskih populacijah (Finska, Nemčija) ter nižji kot v populacijah afriškega izvora. Zelo nizek delež laktozno intolerantnih oseb so ugotovili pri belcih iz ameriške zvezne države Utah, kjer je večina prebivalcev skandinavskega izvora. Porazdelitev genotipov v slovenski populaciji je najbolj podobna porazdelitvi v finski in nemški populaciji, kjer prav tako prevladuje genotip CT, vendar je v slovenski populaciji CC genotip veliko bolj pogost kot genotip TT, v finski in nemški populaciji pa je ravno obratno. Delež oseb z visoko laktazno aktivnostjo (61 %) je v slovenski populaciji nižji kot v severni Evropi (75 %), vendar višji kot v južni Evropi (26 %) (14). Videti je, da je slovenska populacija po deležu oseb z visoko laktazno aktivnostjo bližje severni kot južni Evropi.

Odgovore preiskovancev o prisotnosti znakov laktozne intolerance smo primerjali z njihovim dejanskim LPH genotipom. Znaki so bili prisotni pri 10 % vseh preiskovancev. Od oseb, ki so trdile, da imajo znake laktozne intolerance, jih je dejansko imelo genotip CC le 63 %,

Slika 1: Agarozna gelska elektroforeza produktov RFLP pri določanju polimorfizma -13910C>T; Okrajšave: M = označevalec, PCR = nestringiran produkt PCR, 88ko, 91ko, 95ko = homozigoti CC, 87ko, 89ko, 90ko, 92ko, 93ko, 94ko, 96ko, 97ko, 98ko = heterozigoti CT, 99ko = homozigot TT.

Figure 1: Determination of 13910C>T polymorphism by RFLP and agarose gel electrophoresis; Abbreviations: M = uncut PCR product, 88ko, 91ko, 95ko = CC homozygotes, 87ko, 89ko, 90ko, 92ko, 93ko, 94ko, 96ko, 97ko, 98ko = CT heterozygotes, 99ko = TT homozygote.

Preglednica 4: Pogostost posameznih laktaznih genotipov v različnih populacijah (15)
Table 4: The frequency of lactase genotypes in various populations (15)

populacija	n	% CC oseb	% CT oseb	% TT oseb
Finska	938	18,1	47,5	34,3
USA (Utah)	92	7,6	35,9	56,5
Američani afriškega izvora	96	79,2	15,6	5,2
Nemčija	187	21,4	49,7	28,9
Slovenija	172	39	51	10

ostali pa so imeli genotip CT ali TT. Samo 16 % oseb z genotipom CC je imelo znake laktozne intolerance. Tudi 6 % CT in TT oseb je trdilo, da ima znake laktozne intolerance, vendar le-te verjetno lahko pripišemo kakim drugim stanjem s podobnimi znaki. χ^2 -test je pokazal, da je v skupini oseb z genotipom CC značilno več oseb z znaki laktozne intolerance kot v skupini z genotipom CT in TT, $p = 0,027$. Vendar pa dejstvo, da ujemanje med genotipom CC in znaki ni popolno nakazuje, da diagnostiranje laktozne intolerance samo na osnovi kliničnih znakov ni zanesljivo.

Dokazali smo tudi, da je izražanje znakov pri CC osebah odvisno tudi od starosti. Povprečna starost v skupini CC oseb z znaki je bila 37 ± 11 let, v skupini CC oseb brez znakov pa 31 ± 8 let, kar je t-test pokazal kot mejno značilno, $p = 0,056$. To pomeni, da pogostost znakov laktozne intolerance pri osebah z genotipom CC s starostjo narašča.

Osebe z genotipom CC in osebe z genotipom CT ali TT se med seboj ne razlikujejo po pogostosti uživanja mleka in mlečnih izdelkov. Ker pa je imelo le 16 % oseb z genotipom CC večje težave pri uživanju mleka, smo primerjali samo CC osebe z znaki in CT/TT osebe. Ugotovili smo, da je razlika v pogostosti uživanja polnomastnega in manj mastnega mleka med tema dvema skupinama večja (čeprav ne statistično značilna), kot če primerjamo vse CC osebe s CT/TT osebami. Poraba jogurta je bila v vseh navedenih skupinah podobna, saj prebava le-tega ni v toliki meri povezana z laktazo. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Pogostost uživanja mleka in jogurta pri osebah z različnimi genotipi in fenotipi

Table 5: The frequency of milk and yogurt consumption in subjects with different genotypes and phenotypes

	Polnomastno mleko	Mleko z manj maščobe	jogurt
CC osebe	6,7 ($p = 0,318$)	6,9 ($p = 0,165$)	10,6 ($p = 0,469$)
s simptomi			
Vse CC osebe	12,1 ($p = 0,910$)	12,9 ($p = 0,763$)	14,4 ($p = 0,678$)
CT in TT osebe	11,8	13,6	13,6

4 Sklep

Na osnovi rezultatov naše študije lahko sklepamo, da ima v zdravi slovenski populaciji 39 % oseb genotip CC, ki je povezan z nizko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi, 61 % pa ima ohranjeno visoko aktivnost laktaze v odrasli dobi oz. genotip CT ali TT. Največ je bilo

oseb z genotipom CT (51 %), najmanj pa homozigotnih TT oseb (10 %). Slovenska populacija je po deležu oseb z visoko laktazno aktivnostjo bližje severni kot južni Evropi. Ujemanje med genotipom CC in znaki laktozne intolerance ni popolno. Incidenca simptomov pri osebah z genotipom CC s starostjo narašča.

5 Literatura

- Swallow DM, Poulter M, Hollox EJ. Intolerance to lactose and other dietary sugars. *Drug Metabolism and Disposition* 2001; 29(4): 513-516.
- OMIM*603202. On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N et al. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1111-1120.
- OMIM#223100. On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- Montgomery RK, Büller HA, Rings EHHM et al. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *The FASEB Journal* 1991; 5: 2824-2832.
- Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998; 114: 1230-1236.
- Troelsen JT, Olsen J, Noren O et al. A novel intestinal trans-factor (NF-LPH1) interacts with the lactase-phlorizin hydrolase promoter and co-varies with the enzymatic activity. *J Biol Chem* 1992; 267(28): 20407-20411.
- Troelsen JT, Olsen J, Mitchelmore C et al. Two intestinal specific nuclear factors binding to the lactase-phlorizin hydrolase and sucrase-isomaltase promoters are functionally related oligomeric molecules. *FEBS Letters* 1994; 342: 297-301.
- Spodsberg N, Troelsen JT, Carlsson P et al. Transcriptional regulation of pig lactase-phlorizin hydrolase: Involvement of HNF-1 and FREAcs. *Gastroenterology* 1999; 116: 842-854.
- Mitchelmore C, Troelsen JT, Sjöström H et al. The HOXC11 homeodomain protein interacts with the lactase-phlorizin hydrolase promoter and stimulates HNF1 α -dependent transcription. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 13297-13306.
- OMIM*605559. On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- McBean LD, Miller GD. Allaying fears and fallacies about lactose intolerance. *Journal of the American Dietetic Association* 1998; 98(6): 671-676.
- Harvey CB, Pratt WS, Islam I et al. DNA polymorphisms in the lactase gene. *Eur J Hum Genet* 1995; 3: 27-41.
- Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M et al. Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 160-172.
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E et al. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature genetics* 2002; 30: 233-237.
- Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A et al. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003; 52: 647-652.
- Harvey CB, Wang Y, Darmoul D et al. Characterisation of a homologue of a yeast cell division cycle gene, MCM6, located adjacent to the 5' end of the lactase gene on chromosome 2q21. *FEBS Letters* 1996; 398: 135-140.
- Poulter M, Hollox E, Harvey CB et al. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 298-311.
- Mulcare CA, Weale ME, Jones AL et al. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13,9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13,9 kb T) does not predict or cause the lactose-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1102-1110.

Določanje površinskih lastnosti vzorcev laktoze, pripravljene s sušenjem z razprševanjem, z liofilizacijo in z obarjanjem

Determination of surface properties of lactose samples prepared by spray-drying, lyophilization and precipitation

Odon Planinšek, Jernej Zadnik, Matjaž Kunaver, Marjan Bele, Stane Srčič

POVZETEK: Farmacevtske učinkovine in pomožne snovi izoliramo iz raztopin z uporabo različnih postopkov, ki vplivajo na njihovo morfologijo in fizikalno-kemijske lastnosti. Za analizo in vrednotenje takšnih delcev uporabljamo različne metode, ki jih lahko delimo na tiste, kjer merimo in opazujemo celotni vzorec (diferenčna dinamična kalorimetrija, rentgenska praškovna analiza, kalorimetrija z raztapljanjem) ali samo njegovo površino (merjenje stičnega kota, gravimetrična sorpcija, inverzna plinska kromatografija).

Namen naše raziskave je bil pripraviti različne vzorce laktoze in jim z različnimi metodami proučiti površinske lastnosti. Vzorce laktoze smo pripravili iz vodnih raztopin s sušenjem z razprševanjem, z liofilizacijo in z vakuumskim sušenjem.

Razlike med vzorci smo dokazali z inverzno plinsko kromatografijo z merjenjem pri eni in več temperaturah. Ugotovili smo, da postopek priprave laktoze vpliva na površinske lastnosti vzorca (γ_s^D , K_A , K_D).

Potrdili smo, da je IGC primerna metoda za proučevanje majhnih razlik v površinskih lastnostih vzorcev laktoze.

Ključne besede: fizikalno-kemijske lastnosti, površinske lastnosti, inverzna plinska kromatografija, laktoza

ABSTRACT: Pharmaceutical powders are often isolated from solutions by procedures that influence their morphology and physico-chemical properties. Different methods can be used to characterize and evaluate dried powders. They can be divided into those where the bulk sample is analysed (differential scanning calorimetry, x-ray powder diffractometry, solution calorimetry) and those where only the surface of the sample is studied (contact angle measurements, gravimetric sorption, inverse gas chromatography).

The purpose of this research was to produce and characterize surfaces of different lactose samples. Spray drying, lyophilization and rota vacuuming were used for preparation of the samples.

Differences between samples were confirmed with inverse gas chromatography by measuring at only one and more temperatures. It was established that the method of sample preparation influences the surface properties of lactose (γ_s^D , K_A , K_D).

It was shown that inverse gas chromatography can be used successfully for detecting differences between surfaces of lactose samples.

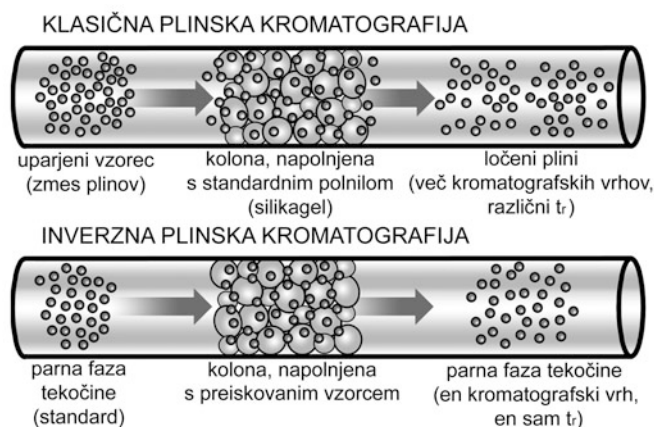
Key words: physico-chemical properties, surface properties, inverse gas chromatography, lactose

1 Uvod

Površinska energija trdnih snovi je lastnost, ki vpliva na medfazne interakcije (npr. trdno-trdno ali trdno-tekoče). Metoda, ki jo lahko uporabimo za njeno določitev, je tudi inverzna plinska kromatografija (IGC). Pri tej metodi je postopek merjenja obraten kot pri klasični plinski kromatografiji (slika 1). Kolono napolnimo s trdnim vzorcem (praškom) katerega lastnosti proučujemo in vanjo injiciramo parno fazo znanih tekočin. Retencija plina v koloni omogoča oceno lastnosti trdne površine. V farmaciji je bila metoda uspešno uporabljena za razlikovanje različnih proizvodnih serij učinkovin (1) in pomožnih snovi (2), proučevanje vpliva mletja na lastnosti površine praškov (3, 4, 5), proučevanje vpliva topila za kristalizacijo na lastnosti površine (6), razlikovanje optičnih oblik manitola (7), vpliva vlage na lastnosti površine itd. (8, 9).

Slika 1: Primerjava principov klasične plinske kromatografije in IGC

Figure 1: Comparison of conventional and inverse gas chromatography



Laktoza se lahko nahaja v dveh osnovnih kristalnih oblikah α in β ali v amorfni stanju. α -laktoza je lahko monohidrat ali brezvodna. Polimorfne oblike laktoze imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti kot so: hitrost raztapljanja, gostota in trdnost.

Sušenje z razprševanjem, vakuumsko sušenje in liofilizacija so metode s pomočjo katerih lahko izdelamo snovi v amorfni obliki oziroma spremenimo njihovo kristaliničnost. Amorfno stanje je v primerjavi s kristalnim nestabilno zato se snovi v tehnoloških procesih proizvodnje oziroma med shranjevanjem in uporabo zdravil različno obnašajo.

2 Materiali in metode

Materiali

Kot izhodni vzorec smo uporabili α -laktozo monohidrat (NF, 200 mesh, DMV International, Nizozemska). Metan (Messer, Slovenija) smo pri določanju retencijskih časov uporabljali kot standard, ki ne reagira. N-heksan, n-heptan (Kemika, Hrvaška), n-oktan, n-nonan, n-dekan (Ridel de Haën AG, Nemčija), aceton (Merck, Nemčija), kloroform, tetrahidrofur in etilacetat (Kemika, Hrvaška) smo uporabljali kot standarde za IGC-meritve.

Pridobivanje vzorcev laktoze

10-odstotno vodno raztopino laktoze smo sušili z razprševanjem v aparatu GPCG1 (Glatt, Nemčija). Uporabili smo naslednje pogoje sušenja: tlak zraka za razprševanje 1,5 barov, pretok tekočine 4 ml/min, pretok zraka skozi procesno komoro 2,5 m/s, vhodna temperatura 80 °C in izhodna temperatura 60 °C.

Liofilizirano laktozo smo izdelali s kapljanjem 10-odstotne vodne raztopine v posodo s tekočim dušikom in 48-urno liofilizacijo nastalih kroglic pri 20 mTorr in -35 °C.

Oborjeno laktozo smo izdelali z vakuumskim sušenjem 10-odstotne vodne raztopine z uporabo aparata IKA Labortechnik RV05-ST (Nemčija) pri tlaku 100 mbar in temperaturi vodne kopeli 95 °C.

Vse vzorce smo hranili nad silikagelom.

Termična analiza

Vzorce smo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (Pyris 1, Perkin-Elmer, ZDA). Temperaturo in konstanto grelca smo kalibrirali z uporabo indija. 5-8 mg vzorca smo natehtali in zaprli v aluminijast lonček in ga analizirali v temperaturnem območju 0-240 °C s hitrostjo 10 °C/min v dušikovi atmosferi (40 ml/min).

Rentgenska praškovna analiza

Vzorce smo analizirali z rentgenskim praškovnim difraktometrom (Philips PW 1710, Nizozemska).

Elektronska mikroskopija

Za določitev morfologije delcev smo uporabili vrstični elektronski mikroskop (JEOL T220, Nemčija).

Inverzna plinska kromatografija

Za analizo vzorcev smo uporabili prirejen plinski kromatograf 6890N (Agilent Technologies, ZDA). Kot nosilni plin smo uporabili helij s pretokom 7 ml/min pri temperaturah 30, 35, 40, 50 in 60 °C. Temperatura injektorja je bila 150 °C in detektorja 250 °C. Vzorce smo redčili s Chromosorbom W (Supelco, ZDA) v masnem razmerju 1:1 in jih s stresalnikom (VanKel, ZDA) stresli v stekleno kolono (dolžina 30 cm, notranji premer 3 mm). Pred merjenjem smo tako pripravljene vzorce prepilovali s helijem (pretok 7 ml/min, temperatura 30 °C) najmanj pet ur. Nato smo v kolono injicirali tako majhne množine parne faze tekočin, ki ustrezajo meji detekcije aparata, s čimer smo dosegli neskončno razredčenje. Na osnovi izmerjenega retencijskega časa smo z uporabo naslednje enačbe izračunali neto retencijski volumen V_n (10):

$$V_n = jF(t_r - t_0) \quad [1]$$

F = volumski pretok nosilnega plina,

t_r = retencijski čas injicirane kapljevine,

t_0 = retencijski čas kapljevine, ki ne vstopa v interakcije z vzorcem (metan),

j = korekcijski parameter, ki upošteva stisljivost nosilnega plina in ga izračunamo iz naslednje enačbe:

$$j = \frac{3(P_{in}/P_{out})^2 - 1}{2(P_{in}/P_{out})^3 - 1} \quad [2]$$

P_{in} = tlak v koloni

P_{out} = zunanji tlak

Pri tehniki neskončnega razredčenja lahko termodinamsko opišemo naslednje ravnotežje:

$$\Delta G_A = -RT \ln V_n + C \quad [3]$$

pri čemer je ΔG_A sprememba proste energije adsorpcije, R splošna plinska konstanta, T absolutna temperatura in C konstanta adsorpcije, ki je odvisna od izbranega referenčnega stanja.

Prosta energija adsorpcije kapljevine injicirane v kolono je vsota nepolarnega (D) in polarnega (SP) prispevka.

Kadar v kolono injiciramo alkanane je sprememba proste energije adsorpcije ΔG_A enaka le spremembi nepolarnega prispevka ΔG_A^D :

$$\Delta G_A = \Delta G_A^D = -RT \ln V_n + C \quad [4]$$

Po metodi, ki so jo razvili Schulz in sodelavci, lahko nepolarni del proste površinske energije trdne snovi γ_s^d izračunamo iz naslednje enačbe (10):

$$RT \ln V_n = 2N_A a \sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + C \quad [5]$$

kjer predstavljajo:

N_A = Avogadrovo število

a = površina adsorbirane molekule

γ_l^d = površinska napetost injiciranega alkana

γ_s^d = disperzijski del proste površinske energije preiskovane trdne snovi

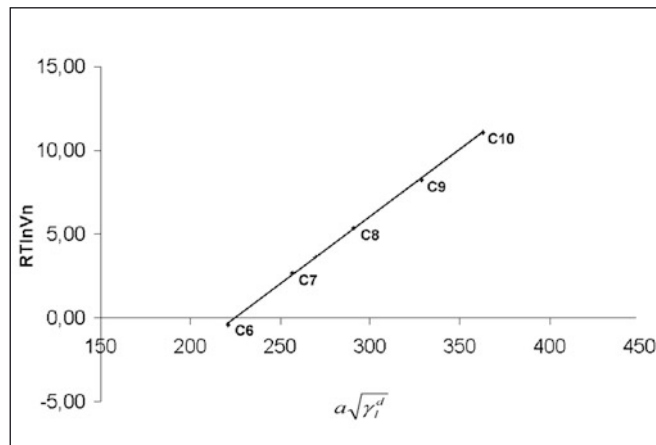
V kolono injiciramo alkanane z različno dolžino verige (heksan, heptan, oktan, nonan, dekan) in iz naklona ($2N_A a \sqrt{\gamma_s^d}$) premice v grafu $RT \ln V_n = f(a \sqrt{\gamma_l^d})$ določimo vrednost nepolarnega dela proste površinske energije (slika 2).

Polarne kapljevine vstopajo v interakcije s trdnimi površinami z nepolarnimi in polarnimi silami. Tako leži točka za polarno kapljevino v diagramu odvisnosti $RT \ln V_n$ od $a \sqrt{\gamma_l^d}$ nad premico, ki jo tvorijo alkanani. Na osnovi raziskav Draga (11, 12), Gutmana (13) in Fowkesa (14) opredeljujemo polarne interakcije kot Lewisove kislino-bazične ali kot elektron donor-elektron akceptor interakcije. Tako pride do polarnih interakcij le med kislino in bazo, ne pa med dvema kislinama ali bazama, kljub njihovim velikim polarnostim.

Po Gutmanu (13) in Riedlu in Fowkesu (15) lahko kapljevine opredelimo glede na akceptorsko (AN*) ali donorsko število (DN). Lastnosti kapljev, ki jih uporabljamo pri inverzni plinski kromatografiji so zbrane v preglednici 1.

Slika 2: Diagram linearne odvisnosti $RT \ln V_n$ od $a \sqrt{\gamma_l^d}$. Iz naklona premice določimo nepolarni del proste površinske energije γ_s^d

Figure 2: Schematic diagram showing the dependence of $RT \ln V_n$ on $a \sqrt{\gamma_l^d}$. The dispersive component of surface free energy γ_s^d can be obtained from the slope of the line



Preglednica 1: Površine molekul, površinske napetosti, elektron donorska in elektron akceptorska števila nekaterih kapljev

Table 1: Surface area, surface free energy, donor and acceptor numbers of some liquids

	a [Å²]	γ_l^d [mJ/m²]	DN [kJ/mol]	AN* [kJ/mol]
Heksan	51,5	18,4	0	0
Heptan	57,0	20,3	0	0
Oktan	63,0	21,3	0	0
Nonan	69,0	22,7	0	0
Dekan	75,0	23,4	0	0
Tetrahidrofuran	45,0	22,5	84,4	2,1
Kloroform	45,0	25,0	0	22,7
Aceton	42,5	16,5	71,4	10,5
Etilacetat	50,0	19,6	71,8	6,3

Pri določeni vrednosti $a \sqrt{\gamma_l^d}$ predstavlja razlika med točko, ki ustreza polarni kapljevine in referenčno premico za alkanane, specifični (polarni) del spremembe proste energije adsorpcije ΔG_A^{SP} . Iz krivulje odvisnosti ΔG_A^{SP} od temperature lahko izračunamo spremembo specifične proste entalpije ΔH_A^{SP} in spremembo specifične proste entropije adsorpcije ΔS_A^{SP} z uporabo naslednje enačbe:

$$\Delta G_A^{SP} = \Delta H_A^{SP} - T \cdot \Delta S_A^{SP} \quad [6]$$

Spremembo specifične proste entalpije adsorpcije uporabljamo za izračun kislih (K_A) in bazičnih (K_B) lastnosti trdnih površin:

$$\frac{\Delta H_A^{SP}}{AN^*} = K_D + K_A \cdot \frac{DN}{AN^*} \quad [7]$$

V literaturi pogosto srečamo poenostavljeno enačbo (neupoštevanje entropijskega člena), kjer je prosta entalpija adsorpcije zamenjana s prosto energijo adsorpcije, tako da lahko kisle in bazične lastnosti trdnih površin določimo le pri eni temperaturi:

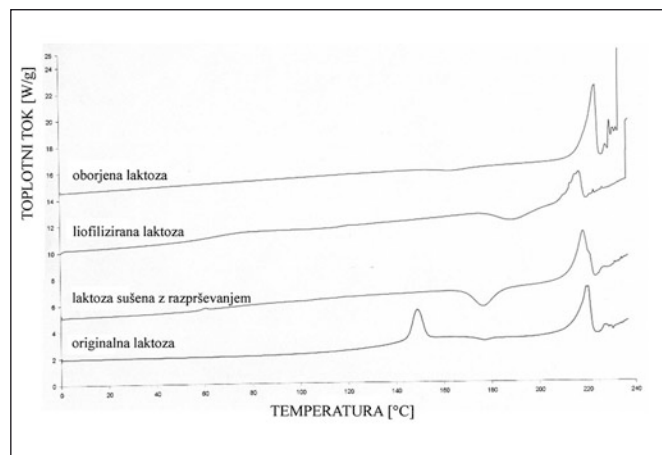
$$\frac{\Delta G_A^{SP}}{AN^*} = K_D + K_A \cdot \frac{DN}{AN^*} \quad [8]$$

3 Rezultati in razprava

Vzorci laktoze smo najprej analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC, slika 3). Originalna laktoza je monohidrat, saj je pri 145 °C prisoten dehidracijski vrh, ki mu pri 215 °C sledi taljenje α -laktoze. DSC-krivulji originalne laktoze, sušene z razprševanjem in liofilizirane laktoze vsebujeta rekristalizacijski vrh v območju 160-180 °C. Pri originalni laktozi je rekristalizacija komaj opazna in jo lahko pripišemo restrukturiranju kristala po odparitvi kristalno vezane vode, oziroma prisotnosti amorfnega dela. Pri laktozi, sušeni z razprševanjem in liofilizirani laktozi je entalpija rekristalizacije večja kot pri originalni laktozi in jo lahko pripišemo rekristalizaciji amorfnega dela vzorca, podobno kot je to storil Elamin s sodelavci prav tako na primeru laktoze (16). Pri obeh vzorcih rekristalizaciji sledi taljenje α -laktoze. DSC-krivulja oborjene laktoze kaže, da je v vzorcu zanemarljiv delež amorfnega dela. Tako pri laktozi, sušeni z razprševanjem, kot pri liofilizirani in oborjeni laktozi gre za brezvodne vzorce, saj DSC-krivulje ne vsebujejo dehidracijskega vrha.

Slika 3: DSC-krivulje originalne laktoze, laktoze, sušene z razprševanjem, liofilizirane in oborjene laktoze

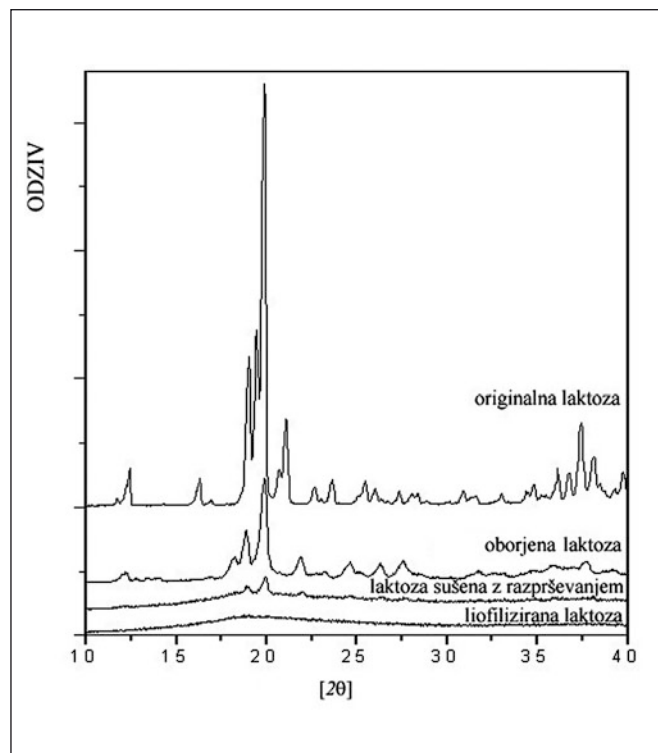
Figure 3: DSC curves of original, spray dried, lyophilized and precipitated lactose



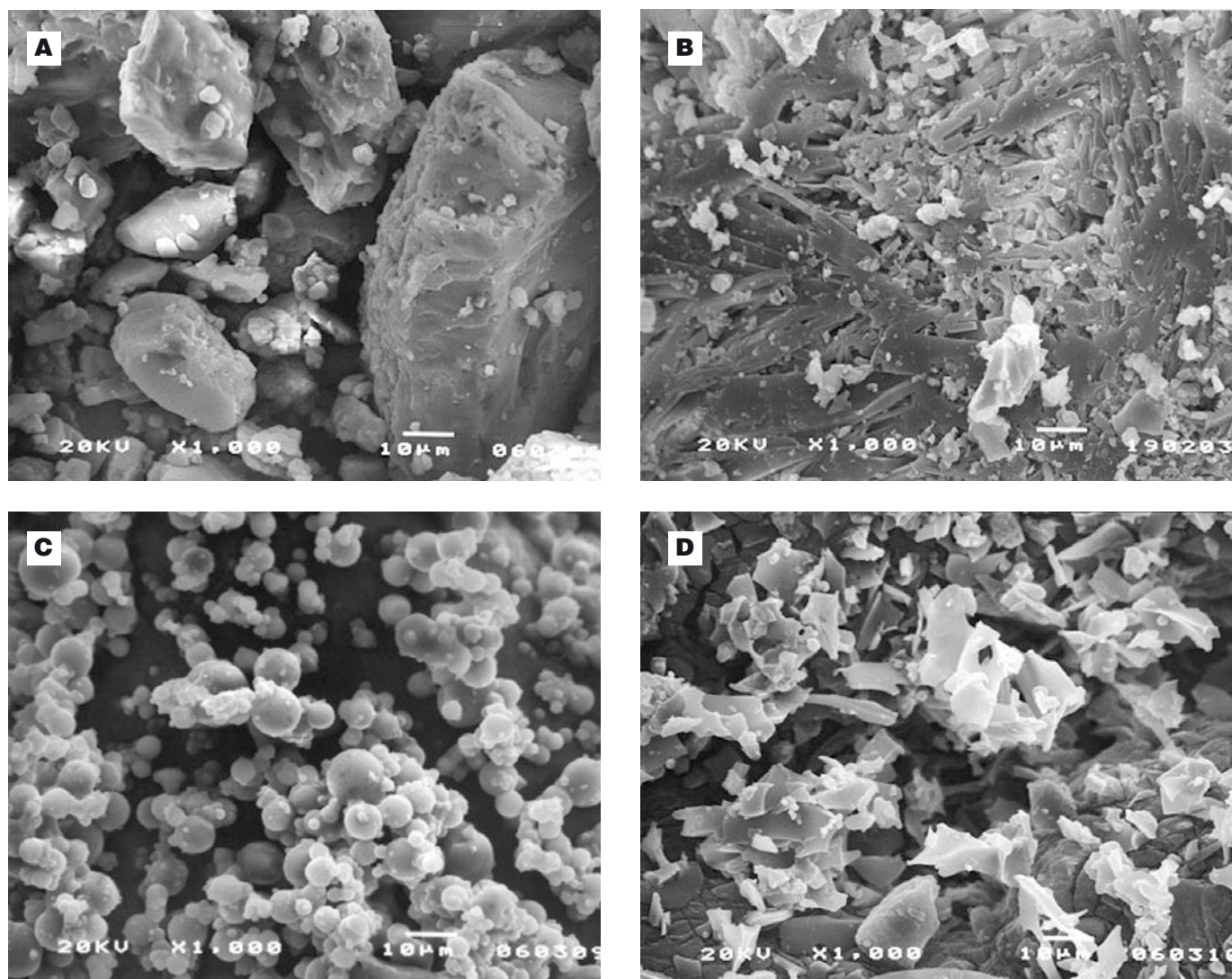
Stopnjo kristaliničnosti in prisotnost različnih kristalnih oblik v vzorcu smo proučevali tudi z rentgensko praškovno analizo (slika 4). Ugotovili smo, da se različno sušeni vzorci razlikujejo od originala. Uklonski maksimumi originalne laktoze pripadajo laktozi monohidratu (Powder Diffraction File: 27-1947) (17). Rezultat se ujema z DSC-analizo vzorca. V primeru oborjene laktoze uklonski maksimumi pripadajo brezvodni obliki laktoze (Powder Diffraction File: 39-1762) (17). Tudi pri laktozi, sušeni z razprševanjem, sklepamo, da je brezvodna, čeprav je ta vzorec pretežno amorfen in je intenziteta uklonskih maksimumov manjša kot pri oborjeni laktozi. Odsotnost vode v tem vzorcu smo potrdili tudi z DSC-analizo. Najbolj amorfnega je liofilizirana laktoza, manj laktoza, sušena z razprševanjem, in še manj oborjena laktoza. Originalna laktoza izkazuje med vsemi proučevanimi vzorci največjo kristaliničnost. Rezultat je pričakovan.

Slika 4: Difraktogrami originalne laktoze in vzorcev laktoze pridobljene s sušenjem

Figure 4: XRD patterns of original lactose and samples obtained after drying



Tudi morfologija delcev je odvisna od postopka izdelave vzorcev. Elektronsko mikroskopska slika originalne laktoze (slika 5) kaže prisotnost kristalov velikih 1-100 nm. Pri oborjeni laktozi so prisotni aglomerati. S sušenjem z razprševanjem so nastali delci sferičnega oblika, z liofilizacijo pa delci v obliki ploščic.



Slika 5: Elektronsko mikroskopske slike originalne (A), oborjene (B), sušene z razprševanjem (C) in liofilizirane (D) laktoze

Figure 5: SEM micrographs of original lactose (A), precipitated lactose (B), spray-dried lactose (C) and lyophilized lactose (D) samples

Po uspešnem razlikovanju vzorcev, z uporabo nekaterih standardnih metod za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti praškov, smo vzorce laktoze analizirali še z inverzno plinsko kromatografijo (IGC). Za vrednotenje površine vzorcev smo uporabili tri pristope. Najprej smo izračunali nepolarni del proste površinske energije z uporabo alkanov (C6-C10, preglednica 2). Ugotovili smo, da se vrednost glede na originalno laktozo pri oborjeni laktozi in laktozi, sušeni z razprševanjem, zniža, pri liofilizirani laktozi pa zviša. Vrednost nepolarnega dela proste površinske energije pri oborjeni laktozi in laktozi, sušeni z razprševanjem, znaša približno 33 mN/m^2 in ju s tem parametrom ne moremo razlikovati.

Za razlikovanje vzorcev smo kislinski (K_A) in bazični del (K_B) proste površinske energije najprej določili pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ z uporabo enačbe, kjer

ni upoštevan entropijski člen adsorpcije. Ta pristop je v farmacevtski literaturi najpogosteje uporabljan, saj je meritev kratka. Kljub temu, da je pristop termodinamsko nepravilen, so rezultati ponovljivi in pogosto uporabni za razlikovanje med vzorci, ki so si po večini izmerjenih fizikalno-kemijskih lastnostih podobni. K_A je za vse vzorce podoben, tako da razlikovanje vseh vzorcev na osnovi tega parametra ni možno (preglednica 2). Relativno majhne razlike med vzorci kažejo tudi vrednost K_B . Največjo bazičnost izkazuje originalna in laktoza, sušena z razprševanjem, najmanjšo pa liofilizirana laktoza.

Če za izračun K_A in K_B uporabimo ΔH , se le-te med vzorci razlikujejo signifikantno. Vrednost K_A je podobna le pri oborjeni in laktozi, sušeni z razprševanjem. Vrednosti K_B se najbolj razlikujejo. Najbolj bazična je laktoza, sušena z razprševanjem, najmanj pa oborjena laktoza.

Preglednica 2: Izračunani parametri proste površinske energije vzorcev laktoze

Table 2: Calculated surface free energy parameters of lactose samples

VZOREC	γ_s^d [mN/m ²]	K_A (pri 30 °C)	K_D (pri 30 °C)	K_A (iz ΔH)	K_D (iz ΔH)
Originalna laktoza	38.0 (0.9)	0.11 (0.01)	0.53 (0.02)	0.50 (0.04)	0.79 (0.09)
Oborjena laktoza	33.8 (0.1)	0.12 (0.01)	0.50 (0.03)	0.42 (0.03)	0.40 (0.08)
Laktoza, sušena z razprševanjem	32.3 (0.2)	0.10 (0.01)	0.54 (0.02)	0.40 (0.01)	1.24 (0.08)
Liofilizirana laktoza	42.3 (0.7)	0.08 (0.01)	0.47 (0.03)	0.19 (0.02)	0.71 (0.02)

4 Zaključek

Raziskava je pokazala, da lahko z uporabo inverzne plinske kromatografije uspešno razlikujemo med površinami vzorcev laktoze pripravljene z različnimi metodami sušenja. Rezultati so pokazali, da je potrebno za popolno razlikovanje vseh vzorcev meritve izvesti pri več temperaturah. Vzorci se razlikujejo tako v nepolarnih kot v specifičnih prispevkih proste površinske energije. Dodatno smo z DSC in rentgensko analizo ugotovili, da se vzorci razlikujejo tudi v tistih lastnostih, ki niso vezane samo na površino.

5 Literatura

- Ticehurst MD, Rowe RC, York P. Determination of the surface properties of two batches of salbutamol sulphate by inverse gas chromatography. *Int J Pharm* 1994; 111: 241-249.
- Ticehurst MD, York P, Rowe RC et al. Characterization of the surface properties of α -lactose monohydrate with inverse gas chromatography, used to detect batch variation. *Int J Pharm* 1996; 141: 93-99.
- Roberts RJ, Rowe RC, York P. The relationship between indentation hardness of organic solids and their molecular structure. *J Matter Sci* 1994; 29: 2289-2296.
- York P, Ticehurst MD, Osborn JC et al. Characterization of the surface energetics of milled DL propranolol hydrochloride using inverse gas chromatography and molecular modeling. *Int J Pharm* 1998; 174: 179-186.
- Trowbridge L, Grimsey IM, York P. Influence of milling on the surface properties of acetaminophen. *Pharm Sci* 1998; (Suppl) 1(1): 310.
- Storey RA. The nucleation, growth and solid state properties of particulate pharmaceuticals, PhD Thesis, 1997, UK, University of Bradford.
- Grimsey IM, Sunkersett MR, Osborn JC et al. Interpretation of the differences in the surface energetics of two optical forms of mannitol by inverse gas chromatography and molecular modeling. *Int J Pharm* 1999; 191: 43-50.
- Đorđević NM, Rohr M, Hintnerleitner M et al. Adsorption of water on cyclosporine A, from zero to finite coverage. *Int J Pharm* 1992; 81: 21-29.
- Sunkersett MR, Grimsey IM, Doughty SW et al. The changes in surface energetics with relative humidity of carbamazepine and paracetamol as measured by inverse gas chromatography. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13: 219-225.
- Shulz J, Lavielle L, Martin C. The role of the interface of carbon fiber epoxy composites. *J Adhesion* 1987; 23: 45-60.
- Drago RS, Vogel GC, Needham TE. A four parameter equation for predicting enthalpies of adduct formation. *J Am Chem Soc* 1971; 93: 6014-6026.
- Drago RS, Parr LB, Chamberlain CS. Solvent effects and their relationship to E and C equation. *J Am Chem Soc* 1977; 99(10): 3203-3209.
- Gutmann V. The donor acceptor approach to molecular interactions. Plenum press, New York 1982.
- Fowkes FM, Maruchi S. Surface acidity and basicity of polymers. *J Am Chem Soc* 1977; 173: 110-117.
- Riddle FL, Fowkes FM. Spectral shifts in acid base chemistry 1. Van der Waals contributions to acceptor numbers. *J Am Chem Soc* 1990; 112: 3259-3269.
- Elamin AA, Sebhatu T, Ahlneck C. The use of amorphous model substances to study mechanically activated materials in the solid state. *Int J Pharm* 1995; 119: 25-36.
- PDF-2 Powder Diffraction File Database, The International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA, USA. <http://www.icdd.com/>.

Predpisi za pripravke tkivnega inženirstva in za somatsko celično zdravljenje

Regulative for tissue engineered medical products and somatic cell therapy

Saša Puhar, Matjaž Jeras

Povzetek: Tkivno inženirstvo je novo, hitro se razvijajoče interdisciplinarno področje biotehnologije, ki se ukvarja z izdelavo klinično uporabnih celičnih, tkivnih in organotipskih kultur *in vitro*. Sem sodi tudi celično inženirstvo, ki predstavlja osnovo za somatsko celično zdravljenje s klinično uporabnimi pripravki iz celic, pridobljenimi iz tkiv človeškega izvora in gojenih *ex vivo*. Nenadzorovana uporaba človeških celic in tkiv lahko pri prejemniku povzroči bolezni in druge neželene učinke. Zato mora biti osnovni kriterij vrednotenja in nadzora pripravkov tkivnega inženirstva ocena tveganja njihove uporabe za bolnika – prejemnika. Prenos nalezljivih bolezni predstavlja nedvomno največjo nevarnost pri tovrstnem zdravljenju, poleg tega pa obstaja tudi tveganje zaradi okužb celičnih kultur ter izgube tkivno specifičnih lastnosti celic, do katerih lahko pride med njihovim gojenjem. Zaradi kompleksnosti pripravkov tkivnega inženirstva in razmeroma omejenih izkušenj pri njihovi klinični uporabi je nujna pravna ureditev področja, in sicer tako, da bo zagotovljena kar največja stopnja kakovosti, varnosti in učinkovitosti tovrstnega zdravljenja.

Ključne besede: tkivno inženirstvo, somatske celice, celične kulture, celično in tkivno zdravljenje.

Abstract: Tissue engineering is a new and rapidly developing interdisciplinary field of biotechnology, dealing with tissues and organs by applying viable cell-, tissue- and organotypic cultures prepared *in vitro*. Somatic cell therapy is a part of tissue engineering and it encompasses preparation of viable human cells, cultured *ex vivo* in a way to achieve sufficient number of cells suitable for the re-implantation into recipient. Beside wanted effect, the application of human cells and tissues may cause transferable diseases and other unwanted effects in the patient. Risk estimation for the recipient is therefore the main criteria for their application. Transmission of infectious diseases thus represents the major threat, along with possible contamination of cell cultures and the loss of specific cell characteristics occurring during their *in vitro* manipulation. Due to the complexity of tissue engineered medical products and the lack of clinical experience following their application it is necessary to thoroughly regulate this field in order to assure quality, safety and effectiveness.

Key words: tissue engineering, somatic cells, cell cultures, cell and tissue therapy.

1 Uvod

Vse bolj poglabljeno poznavanje patofizioloških mehanizmov bolezni na molekularni in biokemijski ravni ter intenziven razvoj biotehnologije sta privedla do novih pristopov k zdravljenju bolezni. Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, katerega cilji so obnovitev tkiv s pomočjo živih celic, ki jim lahko po potrebi dodamo tudi pomožne snovi in posamezne izbrane biomolekule (1, 2, 3). Žive tkivne nadomestke lahko uporabimo za obnovo, vzdrževanje ali izboljšanje funkcij posameznih tkiv in organov. Ti pripravki se razlikujejo od klasičnih zdravil ter drugih ustaljenih oblik zdravljenja v tem, da se za stalno vgradijo v telo in nato s svojimi specifičnimi lastnostmi vplivajo na zdravljenje oziroma lajšanje bolezni ter poškodb (3).

S tkivnoinženirskimi postopki pripravljamo avtologne¹ ter alogenske² tkivne in celične pripravke, ki lahko vsebujejo tako žive kot mrtve

celice, katerim po potrebi dodamo pomožne snovi (3). V najožjem pomenu tkivno inženirstvo ne obsega genskega zdravljenja, ksenogenskih³ pripravkov ter pripravkov iz celic, katerih biološke lastnosti so znatno spremenjene (le-te ureja zakonodaja o zdravilih za napredno zdravljenje) (4, 5).

Večina današnjih pripravkov tkivnega inženirstva sestoji iz dveh ključnih sestavin (6):

1. Celic, ki so lahko avtolognega ali alogenskega izvora. Teoretično bi lahko uporabljali različne vrste celic, a znanstvena in tehnološka dognanja tega za sedaj še ne omogočajo. Celice predstavljajo »glavno učinkovino«, njihove lastnosti pa so ključne za kakovost, učinkovitost in varnost končnih pripravkov.

2. Pomožnih snovi, pri čemer lahko uporabljamo tako naravne kot umetne biološko sprejemljive ter največkrat razgradljive, včasih pa

Saša Puhar, mag. farm., Educell d.o.o., Letališka c. 33, 1000 Ljubljana

dr. Matjaž Jeras, mag. farm., Center za tipizacijo tkiv, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

¹ avtologno: uporaba bolnikovih lastnih celic

² alogensko: uporaba človeških celic drugega dajalca

³ ksenogensko: uporaba živalskih celic

tudi nerazgradljive materiale. Najpogosteje uporabljamo polimere mlečne in poliglikolne kisline, estre hialuronske kisline, različne kolagene, alginat, hidroksiapatit ipd. Tovrstne pomožne snovi predstavljajo tridimenzionalno okolje, ki omogoča razrast celic ter pripravo tkiva *ex vivo*, poleg tega pa zagotavlja ustrezno trdnost končnih pripravkov, ki je potrebna za uspešno implantacijo. Interakcije med celicami in pomožnimi snovmi imajo lahko zelo velik vpliv na učinkovitost končne pripravke.

Glede na raznolikost pripravkov tkivnega inženirstva (različna tkiva, medceličnina, sporočilne molekule...) je tveganje pri njihovi uporabi različno. Najpomembnejše je povezano s prenosom nalezljivih bolezni, pa tudi s stopnjo biološke prenosljivosti ter s samo učinkovitostjo pripravkov (6).

Dodatno tveganje predstavlja tudi sam način priprave celic *ex vivo*, saj lahko pride do spremembe njihovih genotipskih in fenotipskih ter s tem bioloških lastnosti, kar je lahko posledica različnih načinov njihove osamitve, gojenja ali celo farmakološke obdelave (1, 7).

Glede na stopnjo tveganja pri klinični uporabi lahko pripravke tkivnega inženirstva delimo na dve skupini (6, 5):

1. Pripravki z nizko stopnjo tveganja: Sem uvrščamo pripravke iz avtolognih ali alogenskih celic oziroma tkiv človeškega izvora, katerih biološke lastnosti se z uporabljenimi postopki za njihovo pripravo *in vitro* niso znatno spremenile. Med takšne varne postopke uvrščamo rezanje tkiv, mehansko in encimsko osamitev celic, centrifugiranje, liofilizacijo, zamrzovanje ipd. Nasprotno pa lahko uporaba posameznih rastnih in diferenciacijskih dejavnikov ali ekstrakcija znotrajceličnih sestavin (mineralov, beljakovin) znatno vplivata na lastnosti celic in tkiv.

2. Pripravki z visoko stopnjo tveganja (t.i. zdravila za napredno zdravljenje): Sem uvrščamo pripravke iz človeških avtolognih ali alogenskih celic in tkiv, katerih biološke lastnosti so se med pripravo *ex vivo* znatno spremenile. Tipična primera sta namnožitev (proliferacija) in antigensko specifična aktivacija avtolognih imunsko zmožnih celic *ex vivo* (npr. za privzeto oziroma adoptivno imunsko zdravljenje) ter uporaba alogenskih celic, združenih z neceličnimi sestavinami (npr. mikrokapsule, intrinzični ogrodni nosilci, medicinski pripomočki). V to skupino sodijo tudi pripravki živalskega izvora oziroma ksenogene celice in tkiva.

2 Somatsko celično zdravljenje

Pri somatskem celičnem zdravljenju uporabljamo žive človeške avtologne ali alogenske ter živalske somatske celice, pripravljene *ex vivo*, in sicer za zdravljenje, preventivno ter diagnostično uporabo. Učinek je lahko lokalni ali sistemski (7, 8, 9).

Pripravke za somatsko celično zdravljenje pripravljamo iz živih somatskih celic, ki jih osamimo iz določenih tkiv in jih gojimo tako dolgo, da jih pripravimo v zadostnem številu, potrebnem za uspešno implantacijo. Celice lahko kombiniramo tudi z neceličnimi sestavinami in tako omogočimo zdravljenje v zelo kratkem času. (1, 7).

Prednosti somatskega celičnega zdravljenja so (6):

1. imunosupresija bolnika pri presaditvah avtolognih pripravkov ni potrebna;

2. dostopnost izhodnega tkiva je običajno lahka, poleg tega pa največkrat potrebujemo le majhen delček zdravega tkiva;

3. omogoča učinkovito nadomestitev funkcij poškodovanega organa ali tkiva;

4. zagotovljen dolgotrajen učinek v primerjavi s kronično uporabo klasičnih zdravil.

3 Kontrola kakovosti

Biološki pripravki so največkrat zelo kompleksni, zato njihove sestave pogosto ne moremo popolnoma opredeliti. Zaradi tega ne moremo vedno ugotoviti prisotnosti določenih načistot, pa tudi končna kontrola ni vedno učinkovita, zato jih pogosto opredelimo z nadzorom procesa priprave (postopki izdelave, oprema, prostori in osebje) (8, 10).

Sprva je predelava oziroma priprava celic *ex vivo* obsegala le njihovo shranjevanje v tekočem dušiku, postopek, ki so ga izvajali v transfuzijskih bolnišničnih centrih ali v ustreznih raziskovalnih laboratorijih. V tem obdobju sta bila standardizacija in nadzor postopkov predelave celic zelo omejena in popolnoma prepuščena izbiri izvajalcev. Danes lahko postopki predelave obsegajo več stopenj, npr. različne načine osamitve in selekcije celic, gojenje celic *ex vivo*, celično aktivacijo in diferenciacijo, gensko modificiranje ipd. Vse to pa znatno povečuje tveganje pri uporabi tovrstnih pripravkov in zato terja poostren nadzor priprave, validacijo uporabljenih postopkov ter ustrezno dokumentiranje (11).

3.1 Pomembni dejavniki, potrebni za razvoj in vrednotenje celičnih pripravkov

Ključni dejavniki pri razvoju in vrednotenju celičnih pripravkov so: izbira začetnega tkiva oziroma dajalcev, predelava celic *ex vivo* ter shranjevanje (1, 8, 12, 13, 14).

1. Izbor celic

Pri izboru celic so pomembni podatki o vrsti celic oziroma odvzetega tkiva, ki predstavlja njihov vir. Pri dajalcih (živih ali mrtvih) moramo opraviti vse potrebne medicinske preiskave, s pomočjo katerih lahko z veliko verjetnostjo predvidimo varnost tako zanje kot za prejemnike ter s tem tudi za uspeh posega.

2. Predelava in shranjevanje celic

Tkiva in celice moramo skladno s sprejetimi in odobrenimi postopki aseptično odvzeti in jih ustrezno označiti. Minimalne zahteve terjajo, da morajo oznake na vsebnikih nedvoumno označevati izvor biološkega vzorca (npr. »človeško tkivo«) ter vsebovati identifikacijsko kodo. Iz priložene dokumentacije in oznak vsebnika morajo biti razvidni tudi morebitni posebni pogoji ravnanja z vzorci.

Nadzor kakovosti uporabljenih materialov in postopkov predelave celic, validacija opreme oziroma celovit nadzor so ključnega pomena. Zagotoviti moramo, da bo ravnanje s celicami *in vitro* potekalo v takšnem okolju, ki bo onemogočalo možnost nastanka okužb.

Kadar želimo celične pripravke iz enega samega vira (dajalca) pripraviti večkrat, moramo vzpostaviti sistem tkivne banke za

somatske celice. Pri tem moramo upoštevati zahteve za običajne celične banke in voditi dokumentacijo o izvoru biološkega vzorca ter o opravljenih postopkih predelave celic.

3.2 Kontrola kakovosti celičnih pripravkov

Nadzor kakovosti celičnih pripravkov lahko smiselno razdelimo na štiri glavna področja (8):

1. preverjanje varnosti celičnih pripravkov (sterilnost, prisotnost mikoplazem, bakterijskih endotoksinov, virusov), ki nam zagotavlja, da le-ti ne vsebujejo zdravju škodljivih kontaminantov;
2. ugotavljanje čistosti oziroma identifikacije (število in živost celic, istovetenje celic – morfologija, zaostale nečistote...) nam zagotavlja, da celični pripravki ustrezajo specifikaciji na ovojnicini in da ne vsebujejo znanih nečistot;
3. ugotavljanje učinkovitosti (citotoksičnost, metabolna aktivnost...) nam zagotavlja vpogled v funkcionalno učinkovitost celičnih pripravkov;
4. ugotavljanje stabilnosti (funkcionalna aktivnost po določenem času) nam zagotavlja, da celični pripravki ohranijo svojo učinkovitost po določenem času shranjevanja pri določenih pogojih.

Zakonsko je trenutno obvezen le vhodni nadzor odvzetega tkiva na označevalce okužb zaradi preprečevanja širjenja nalezljivih boleznih (serološki postopki analize dajalca). Preostala kontrola kakovosti pa je prepuščena presoji posameznega proizvajalca, obstajajo pa določena priporočila zlasti glede končne kontrole kakovosti, vendar ni predpisov o vrstah analiznih metod, ki naj bi jih pri tem uporabljali (2).

Priporočila skupin za somatsko celično zdravljenje glede kontrole kakovosti (15, 16):

1. Vhodna kontrola kakovosti:
 - serološka analiza odvzetega tkiva (ugotavljanje okužbe z virusom hepatitisa B, hepatitisa C, HIV in s povzročiteljem sifilisa);
 - analiza mikrobne obremenitve vhodnega materiala.
2. Procesna kontrola kakovosti:
 - celični genotip (genotipizacija);
 - celična morfologija;
 - živost celic;
 - aseptičnost celotnega procesa ravnanja s celicami.
3. Končna kontrola kakovosti:
 - celična morfologija;
 - živost celic;
 - celični fenotip;
 - celični genotip;
 - mikrobna kontaminacija;
 - apirogenost (bakterijski endotoksini);
 - ostanki snovi, ki se uporabljajo v postopku proizvodnje (antibiotiki, DMSO, tripsin).

Celični pripravki imajo omejen rok uporabnosti, zato jih moramo uporabiti v zelo kratkem času po izdelavi, tako da pogosto končne kontrole ni mogoče izvesti v celoti. Pred uporabo tako izvedemo identifikacijo celic, ostala testiranja pa izvedemo naknadno in nam služijo kot potrditev ustreznosti procesa izdelave (8).

4 Pravni vidiki

Področje tkivnega inženirstva je v Evropi pravno še vedno razmeroma slabo urejeno in vse kaže, da bo za izdelavo in sprejem ustrezne zakonodaje potrebnih še kar nekaj let. Zaradi vse pogostejše klinične uporabe pripravkov tkivnega inženirstva in zelo intenzivnega razvoja tega področja je potrebno čim hitreje in kar najbolje opredeliti predvsem zahteve za kakovost (6).

Izkušnje zadnjih desetih let so pokazale, da največje tveganje predstavljajo prenos nalezljivih boleznih, biološka prenosljivost in učinkovitost, kar je številne države spodbudilo k hitrejšemu pravnem urejanju tega področja (6, 17).

V Evropski skupnosti posamezne države članice zelo različno urejajo področje tkivne tehnologije. Zakoni in pravilniki s področja darovanja organov in tkivnih bank so bili do sedaj sprejeti oziroma posodobljeni le v nekaterih članicah (6, 17). Junija 2002 je Svet Evrope sprejel odločitev, da pripravki iz tkiv človeškega izvora potrebujejo posebno direktivo, katera je bila sprejeta marca 2004 – Direktiva 2004/23/EC (2, 18).

V Sloveniji trenutno ni specifičnih zakonov in pravilnikov, ki bi obravnavali celične in tkivne pripravke, pripravljene *ex vivo*. Imamo pa sodoben Zakon o odvzemu in presaditvi delov človeškega telesa zaradi zdravljenja (Ur. l. 12/2000) ter pripadajoče pravilnike, ki urejajo način odvzema delov človeškega telesa, izbor in pridobivanje dajalcev ter varovanje osebnih podatkov, vodenje evidenc opravljenih odvzemov in presaditev, načine shranjevanja in prevoz delov človeškega telesa ter izmenjavo delov človeškega telesa z drugimi državami (Ur. l. 53/2002, 70/2003, 75/2003, 131/2003).

4.1 Kriteriji tveganja pri uporabi pripravkov tkivnega inženirstva

Glavni kriterij razvrščanja pripravkov tkivnega inženirstva je ocena tveganja za prejemnika (bolnika). Pripravke z nizko oceno tveganja, pri katerih biološke lastnosti celic niso bile znatno spremenjene med njihovo pripravo *ex vivo*, v celoti urejajo zakoni s področja presajanja organov, tkiv in celic (4, 19, 21).

Kadar pripravki vsebujejo celice z znatno spremenjenimi biološkimi lastnostmi, predstavljajo le-ti večje tveganje za prejemnika in zato sodijo pod okrilje zakonov s področja zdravil (zdravila za napredno zdravljenje) in medicinskih pripomočkov (5, 19, 21).

Na tveganje uporabe celičnih pripravkov pomembno vpliva tudi odnos med dajalcem in prejemnikom tkiva. Pri avtoloških pripravkih je dajalec in prejemnik ista oseba, to pa pomeni večjo stopnjo varnosti in zato so v tem primeru možne tudi določene izjeme. Tako lahko takšne pripravke uvrstimo med pripravke z nizko oceno tveganja tudi v primeru, ko imajo določene lastnosti, zaradi katerih bi jih sicer uvrstili v skupino pripravkov z večjim tveganjem (11).

5 Sklep

Vse pogostejša terapevtska uporaba človeških celic in tkiv terja čim prejšnjo vzpostavitev standardov kakovosti in varnosti z namenom, da bi učinkovito preprečili predvsem prenos nalezljivih bolezni, kar predstavlja največje tveganje pri tovrstnem načinu zdravljenja. Tveganju se lahko izognemo s skrbno oceno ustreznosti dajalcev ter z njihovim doslednim testiranjem v skladu z veljavnimi sodobnimi zahtevami in postopki. Hkrati moramo zagotoviti zanesljiv sistem sledljivosti človeških celic in tkiv vse od dajalca do končnega prejemnika. (2). Med samo predelavo celic predstavlja največjo nevarnost zagotovo kontaminacija celičnih kultur. Zato moramo obvezno preverjati morebitno navzkrižno kontaminacijo posameznih celičnih kultur ter seveda vrsto in identiteto povzročiteljev (20).

Vse intenzivnejša izmenjava tkiv med posameznimi državami in regijami terja tudi hitro vzpostavitev skupnih smernic za zagotavljanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Zakonodaja in ukrepi regulatornih organov morajo zagotoviti, da bodo imele človeške celice in tkiva, pripravljena v različnih področjih sveta primerljivo kakovost in varnost (2).

6 Literatura

1. Points to consider on manufacture and quality control of human somatic cell therapy medical products. EMEA 2001, London; CPMP/BWP/41450/98: 1-10.
2. Directive 2004/23/EC. Official Journal of the European Union, 2004; L102: 46-94.
3. Need for a legislative framework of Human tissue engineering and tissue-engineered products. European Commission 2002; Consultation document: 1-5.
4. Proposed Approach to regulation of cellular and tissue-based products. FDA, CBER 1997; 97N-0068: 1-37.
5. Directive 2003/63/EC. Official Journal of the European Union, 2003; L159: 46-94.
6. Tissue engineered medical products (TEMPs): A prelude to risk management. RIVM Report 605148 009, 2001: 1-57.
7. Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, Guidance for Industry. FDA, CBER 1998:1-27.
8. Guidance on application for products comprised of living autologous cells manipulated *ex vivo* and intended for structural repair or reconstruction. FDA, CBER 1996; 95N-0200: 1-10.
9. Directive 2001/83/EC, Annex 1, part IV. European Commission 2001; Working document 2002: 53-57.
10. Guidance concerning demonstration of comparability of human biological products, including therapeutic biotechnology-derived products. FDA, CBER, CDER 1996: 1-9.
11. Burger SR. Current regulatory issues in cell and tissue therapy. *Cytotherapy* 2003, Vol.5, No.4: 289-298.
12. Zakon o odvzemu in presaditvi delov človeškega telesa zaradi zdravljenja. Uradni list RS, Ljubljana; 12/00:1569-1572.
13. Pravilnik o načinu shranjevanja in prevoza delov človeškega telesa, namenjenih za presaditev. Uradni list RS, Ljubljana; 70/03:10825-10827.
14. Pravilnik o načinu varstva osebnih podatkov dajalcev in prejemnikov delov človeškega telesa zaradi zdravljenja. Uradni list RS, Ljubljana 2003; 75/03:11369-11370.
15. Guidance for the submission of chemistry, manufacturing, and controls information and establishment description for autologous somatic cell therapy products. FDA, CBER 1997; 95N-0200: 1-19.
16. Opinion on the state of the art concerning tissue engineering. European Commission 2001; SANCO/SCMPMD/2001/0006 Final: 1-15.
17. Warwick RM, Kearney JN. Safety of human tissues and cells for transplantation. *Future Strategies for tissue and organ replacement*. Imperial College Press 2002: 381-419.
18. Human Tissue and cell engineering products. European Commission; Commission's Consultation paper 2004: 1-12.
19. Smith DS. Understanding external controls over the commercial introduction of engineered human tissue. *Tissue engineering* 1999: Vol.26, No 4: 537-548.
20. Validation of procedures for processing of human tissue intended for transplantation. Guidance for industry. FDA, CBER 2002: 1-3.
21. Human tissue engineering and beyond: Proposal for a Community regulatory framework on advanced therapies. European Commission 2005; Consultation document: 1-15.

Zdravila v nosečnosti I: Prenos učinkovin skozi placento

Drugs in pregnancy I: Drug transport across the placenta

Matej Avanzo, Alenka Šavc, Mojca Kerec Kos

Povzetek: Placenta ali posteljica je visoko specializiran organ v nosečnosti, ki omogoča normalno rast in razvoj ploda. Predstavlja vez med materjo in plodom, hkrati pa deluje kot polprepustna membrana med njunima krvnima obtokoma. Skoraj vsaka učinkovina, ki je prisotna v krvnem obtoku matere, lahko skozi placento preide v krvni obtok ploda, vendar v različnem obsegu in različno hitro. Poznavanje mehanizmov prenosa učinkovin skozi placento pomaga pri odločitvah o odmerjanju zdravil nosečnicam z namenom zmanjšati izpostavljenost ploda potencialno toksičnim koncentracijam učinkovin. Po drugi strani je transplacentalni prenos učinkovin pomemben pri zagotovitvi terapevtskih koncentracij učinkovin v krvnem obtoku ploda.

Ključne besede: placenta, plod, placentalna membrana, prenos učinkovin

Abstract: Placenta is a highly specialized organ developed in pregnancy that supports normal growth and development of the fetus. It represents a connection between a mother and the fetus, but at the same time it acts as a semi permeable membrane between their blood circulations. Almost every active substance in maternal blood circulation can cross placenta and enter into fetal blood circulation, but in different extent and rate. The knowledge on mechanisms of active substance transfer across placenta enables making decisions about dosage regimes for pregnant women and minimizes fetal exposure to potentially toxic concentrations of active substances. On the other hand, the placental transfer of active substances into fetal blood circulation is decisive when therapeutic concentrations of the substances are necessary in fetal blood.

Keywords: placenta, fetus, placental membrane, drug transport

1 Uvod

Glavna naloga placente je prenos hranil in kisika iz krvnega obtoka matere v krvni obtok ploda ter odstranjevanje odpadnih produktov iz krvnega obtoka ploda. Placenta ima tudi pomembno vlogo pri sintezi hormonov, peptidov in steroidov, ki so ključni za uspešno nosečnost (1, 2, 3). Učinkovine, prisotne v materinem krvnem obtoku, lahko v različnem obsegu in različno hitro prehajajo placento. Nekatere učinkovine prehajajo placento hitro ter so prisotne v krvnem obtoku matere in ploda v signifikantnih koncentracijah (t.i. popolni prenos). Določene učinkovine ne prehajajo placente popolno, zato je njihova koncentracija večja v krvnem obtoku matere. Le omejeno število učinkovin doseže večjo koncentracijo v plodovem krvnem obtoku (4).

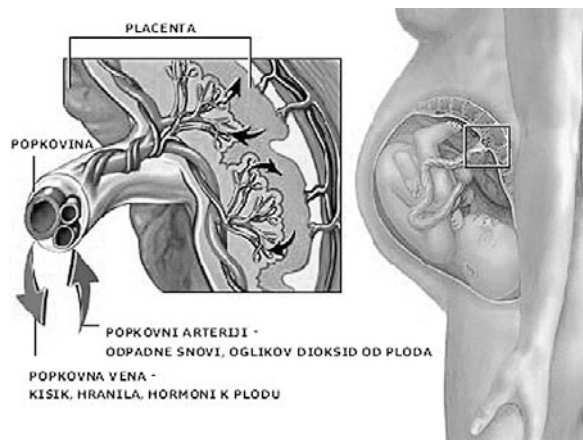
2 Anatomija placente

Placenta človeka je hemohorialni tip placente, pri kateri je tkivo ploda v direktnem stiku z materino krvjo (5). Placenta je sestavljena iz 20-40 osnovnih anatomskih enot, imenovanih kotiledoni, ki vsebujejo posamezne vaskularne enote - viluse. Vilus je razvejan pletež kapilar, skozi katerega prehajajo snovi iz materine krvi na plod in obratno. Materina kri priteče v kotiledone skozi arterije endometrija, kroži med razvejanimi vilusi in se vrne v materin krvožilni sistem po endometrijskih venah (3). Plodova kri priteče v placento skozi dve popkovni arteriji, ki preideta v arterije horionske plošče, arterije vilusov in kapi-

lare, ter se bogata s kisikom in drugimi snovmi vrne po popkovni veni v plod (slika 1) (5).

Slika 1: Lega placente v maternici. Preko placente se med materino in plodovo krvjo izmenjujejo hranila, odpadne snovi in plini (6).

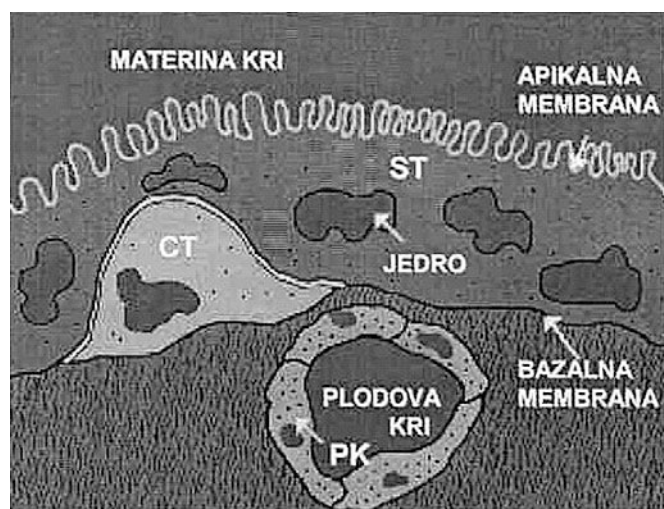
Figure 1: Location of the placenta in uterus. In the placenta nutrients, wastes, and gases are exchanged between the maternal and the fetal blood (6).



Kapilare vilusov, po katerih teče plodova kri, nudijo veliko površino, in tam se vrši glavni transplacentarni prenos med materjo (njena kri oblika viluse) in plodom (njegova kri teče po kapilarah vilusov). Na prečnem prerezu veje vilusa je vidna zgradba placentarne membrane (slika 2), ki predstavlja bariero za transplacentarni prenos. To sestavljajo sinciciotrofoblasti, citotrofoblasti in endotelij plodovih kapilar. Po približno 10. tednu nosečnosti se prepustnost placentarne membrane močno zveča predvsem kot posledica tanjšanja plasti sinciciotrofoblastov ter razpada citotrofoblastov (1).

Slika 2: Shematski prikaz placentarne membrane med krvjo matere in ploda. ST- sinciciotrofoblast; CT- citotrofoblast; PK - plodova kapilara (2).

Figure 2: Schematic presentation of placental membrane between maternal and fetal blood. ST-syncytiotrophoblast; CT- cytotrophoblast; PK - fetal capillary (2).



3 Mehanizem prenosa učinkovin

Učinkovine lahko prehajajo placento s pasivno difuzijo, olajšano difuzijo, aktivnim prenosom, fagocitozo in pinocitozo. Fagocitoza in pinocitoza nimata pomembnega vpliva pri prehodu učinkovin skozi placento, ker potekata prepočasi.

3.1 Pasivna difuzija

Pri pasivni difuziji poteka prenos učinkovin skozi placento v smeri koncentracijskega gradienta. Količina prenešene učinkovine je odvisna od koncentracije učinkovine v materinem obtoku, njenih fizikalno-kemijskih lastnosti in lastnosti placentarne membrane. Prenos hidrofilnih učinkovin je omejen s permeabilnostjo placente, medtem ko je pri lipofilnih učinkovinah ključnega pomena prekrvavljenost placente. Pasivna difuzija skozi placento je odvisna tudi od površine, kjer poteka prenos (3,4–12,6 m²), in debeline placentarne membrane (4–100 μm). Pri transplacentarnem prehodu ima pomembno vlogo tudi vezava učinkovin na plazemske proteine, saj učinkovine prehajajo membrano šele ob ločitvi od proteina. V nosečnosti lahko fiziološki ter nekateri patološki procesi spremenijo koncentracijo proteinov v plazmi (1, 4).

S pasivno difuzijo najlažje prehajajo lipofilne učinkovine z majhno molekulsko težo, ki so neionizirane. Molekule, ki imajo molekulsko

težo večjo od 500 Da, nepopolno prehajajo skozi placento, medtem ko molekule z molekulsko težo večjo od 1000 Da placente skoraj ne prehajajo. Večina učinkovin ima molekulsko težo manjšo od 500 Da. Pomemben faktor pri prehodu učinkovin skozi placento je tudi topnost v lipidih. V nasprotju s hidrofilnimi, lipofilne učinkovine hitreje prehajajo placento. Večina učinkovin je šibkih kislin ali baz in disociirajo pri fiziološkem pH. V ionizirani obliki učinkovine ne morejo prehajati membrane placente. V normalnih pogojih je pH krvi ploda za 0,1 enote nižji kot pri materi in ta majhna razlika nima pomembnega vpliva na ionizacijo učinkovine ter s tem na njen prehod skozi placento. V določenih primerih (npr. fizični napor) pa lahko pH plodove krvi znatno pade in posledica je zmanjšan prenos bazičnih učinkovin iz krvnega obtoka ploda v krvni obtok matere ter zvečanje koncentracije teh učinkovin v plodu (1, 4).

3.2 Olajšana difuzija

Olajšana difuzija poteka v smeri koncentracijskega gradienta ob prisotnosti prenašalca. Ta mehanizem naj bi bil pomemben za prenos ogljikovih hidratov, hormonov ter nukleozidov. Ima manjši pomen pri prenosu učinkovin skozi placento, saj je bila olajšana difuzija učinkovin v sinciciotrofoblaste opažena le pri cefaleksinu in glukokortikoidih (1, 4).

3.3 Aktivni prenos

Aktivni prenos skozi placento poteka ob hidrolizi ATP ali z energijo shranjeno v transmembranskem elektrokemijskem gradientu Na⁺, Cl⁻ in H⁺ ionov. Prenos poteka z ustreznimi prenašalci, ki se nahajajo na materini (apikalni) ali plodovi bazolateralni (bazalni) strani placentarne membrane in so odgovorni za prehod učinkovin v ali iz sinciciotrofoblasta (preglednica 1).

4 Presnova v placenti

Med prehodom skozi placento se učinkovina lahko tudi presnavlja, kar vpliva na količino učinkovine, ki se pojavi v plodovi krvi (1). Število encimov in njihova substratna specifičnost je v placenti v primerjavi z encimi jeter zelo omejena. Dozorela jetra ploda lahko presnavljajo substance boljše kakor placenta (5, 7). Med encimi faze I prevladujejo v placenti encimi citokrom P450 (CYP). Njihova ekspresija je v placenti regulirana drugače kakor v jetrih (1, 7). Vrsta in količina encima je odvisna od fiziološkega stanja matere in trajanja nosečnosti. V splošnem je ekspresija CYP največja v prvem trimesečju nosečnosti, ko je plod najbolj občutljiv na učinke teratogenov, CYP1A1 pa se npr. aktivira ob kajenju v prvem trimesečju nosečnosti (1). Izmed encimov metabolne faze II najdemo v placenti glutation-S-transferazo, ki je aktivna skozi celotno obdobje nosečnosti, epoksid hidrolazo in sulfoniltransferazo (1, 7).

5 Tehnike spremljanja prenosa skozi placento

Jemanje zdravil med nosečnostjo lahko deluje škodljivo na plod, zato so zelo pomembne raziskave prehoda učinkovin skozi placento. Ker so »in vivo« spkusni na nosečnicah zaradi potencialne nevarnosti za plod etično sporni, razen v primerih direktne koristi za plod, so razvili »in vitro« metode za proučevanje transplacentarnega prehoda spojin. Te metode odstranijo vprašanje etičnosti, s katerim se srečamo pri »in vivo« študijah na nosečnicah, a ne upoštevajo vseh fizioloških in

Preglednica 1: Pomembnejši placentarni prenašalci, njihova funkcija, lokalizacija in substrati (1).

Table 1: Major placental transporters, their function, localization and substrates (1).

AKTIVNI PRENAŠALEC	FIZIOLOŠKA FUNKCIJA V PLACENTI	LOKALIZACIJA V PLACENTI	SUBSTRATI
P-glikoprotein (PGP)	prenos hidrofobnih kationskih spojin od ploda do matere	apikalni sinciotrofoblast	digoksin, ciklosporin, sakvinavir, vinkristin, vinblastin, paklitaksel, deksametazon, terfenadin, loperamid ondansetron
Multidrug resistance protein 1 (MRP1)	prenos glutationa, sulfatov in konjugatov glukoronida od ploda do matere	kapilarne endotelijske celice, bazalni sinciotrofoblast	metotreksat, etopozid, vinkristin, vinblastin, cisplatin,
Multidrug resistance protein 2 (MRP2)	prenos glutationa, sulfatov in konjugatov glukoronida od ploda do matere	apikalni sinciotrofoblast	etopozid, cisplatin, ampicilin, doksorubicin, vinkristin, vinblastin, metotreksat,
Multidrug resistance protein 3 (MRP3)	prenos anionskih konjugatov od ploda do matere	kapilarne endotelijske celice, bazalni sinciotrofoblast	metotreksat, etopozid
Breast cancer resistant protein (BCRP)	neznana	verjetno apikalna membrana	topotekan, mitoksantron, doksorubicin
Serotoninski prenašalec (SERT) in noradrenalinski prenašalec (NET)	prenos serotonina in dopamina	apikalni sinciotrofoblast	amfetamini
Ekstraneuralni monoaminski prenašalec (OCT3)	prenos serotonina, dopamina, noradrenalina in histamina	verjetno bazalni sinciotrofoblast	amfetamini, cimetidin
Monokarboksilatni prenašalec (MCT)	prenos laktata in piruvata od ploda do matere	apikalni in verjetno tudi bazalni sinciotrofoblast	valprojska kislina
Dikarboksilatni prenašalec (NaDC3)	prenos sukcinata in α -ketoglutarata od matere do ploda	apikalni sinciotrofoblast	niso znani
Natrijev / multivitaminski prenašalec (SMVT)	prenos biotina in pantotenata od matere do ploda	apikalni sinciotrofoblast	karbamazepin

biokemičnih parametrov matere, ploda in placente. Pri teh metodah lahko preučujemo transplacentarni prenos snovi s pomočjo prečiščenih, po porodu pridobljenih placent. Za študij prenosa substance iz materine krvi v sinciotrofoblastne celice in za študij metabolizma v placenti se lahko uporabijo tudi rezine placente, secirano sinciotrofoblastno tkivo, membranski vezikli vilusov ali subcelične frakcije (mikrosomi) (1, 5). Za nekatere raziskave so bolj primerne tkivne in celične kulture, s katerimi lahko proučujejo vplive snovi na regulacijo receptorjev placente. Za ta namen se uporablja primarne trofoblastne kulture in trajne celične linije (BeWo, JAr, JEG) pridobljene iz človeškega horiokarcinoma (5).

Veliko podatkov o učinkih zdravil med nosečnostjo izhaja iz »in vivo« študij na živalih. Placentarni prenos se v teh študijah ugotavlja iz razmerja koncentracij učinkovine v plodovi in materini krvi ter s pomočjo očistkov mater/plod in plod/mater. Ti se izračunajo iz istočasno vzetih vzorcev krvi matere in ploda, vzete iz popkovnih žil takoj po porodu (5, 8). Druge dostopne informacije so še koncentracijsko razmerje tekočin plod/amnijska tekočina in mater/amnijska tekočina, iz vzorca placente po porodu pa še razmerja plod/placenta in mater/placenta (1). Omenjena razmerja kažejo na skladiščenje in kopičenje učinkovine v amnijski tekočini, kar nakazuje transplacentarni prenos učinkovine in plodovo eliminacijo v amnijsko tekočino (5). Zaradi anatomskih in funkcionalnih razlik med sesalskimi placentami rezultati teh študij pogosto niso direktno prenosljivi na človeka, a so v nekaterih primerih dobili dobro korelacijo med rezultati »in vitro« metod ter »in vivo« testi na primatih.

Pomemben vir informacij o varnosti uporabe zdravil med nosečnostjo so tudi poročila o neželenih učinkih pri posameznih nosečnicah (*case reports*). Problem pri teh poročilih je le, da je težko direktno povezati neko učinkovino z neželenim učinkom. Vendar če se za posamezno učinkovino pojavi več takšnih poročil, to nakazuje na njeno škodljivost za plod (9). Ameriška agencija za hrano in zdravila *Food and drug administration* (FDA) in pa Evropska agencija za zdravila *European Medicines Agency* (EMA) skušata uvesti tudi bolj organizirano poročanje neželenih učinkov pri nosečnicah in pa spodbujata industrijo k oblikovanju registrov nosečnic, kjer se identificira nosečnice, ki jemljejo določeno zdravilo in potem se pri njih opazuje izid nosečnosti (9, 10).

6 Uporaba zdravil v nosečnosti

Na splošno velja, da se v nosečnosti skušamo čim bolj izogniti zdravljenju z zdravili, vendar lahko noseče ženske akutno zbolijo (npr. dobijo pljučnico) ali pa imajo neko kronično obolenje (npr. astmo, hipertenzijo, epilepsijo, od inzulina odvisno sladkorno bolezen, motnjo delovanja ščitnice), ki lahko brez zdravljenja predstavlja preveliko tveganje za zdravje in v teh primerih je smiselna uporaba zdravil. V raziskavi (11), ki so jo izvedli v Franciji, Italiji, Veliki Britaniji in na Nizozemskem, so 1134 mater, ki so rodile zdrave otroke, vprašali o uporabi zdravil v prvem trimesečju nosečnosti. V povprečju je 36,2% mater v tem obdobju uporabilo vsaj eno zdravilo, brez upoštevanja vitaminov in mineralov. V večini primerov so bila zdravila namenjena akutnemu zdravljenju, najpogosteje pa so bila uporabljena zdravila za sistemsko zdravljenje bak-

terijskih infekcij ter antiemetiki. V Franciji pa so v raziskavi (12), ki je zajela 1000 nosečnic, ugotovili, da je 99% nosečnic v celotnem obdobju nosečnosti prejelo vsaj eno zdravilo na recept in v povprečju so zdravniki predpisali 13,6 zdravil na nosečnico. Upoštevali so vsa zdravila, ki se v Franciji lahko predpišejo na recept, tudi vitamine, minerale in homeopatske pripravke. Poraba zdravil je najmanjša v prvem trimesečju nosečnosti in narašča s starostjo nosečnice (10, 12).

7 Sklep

Placenta ni učinkovita bariera za zaščito ploda pred ksenobiotiki. Skoraj vse učinkovine prehajajo placento, vendar v zelo različnem obsegu in različno hitro. Tako rezultati »in vitro« metod kot tudi »in vivo« preizkušanj na živalih dajejo informacije o prehodu učinkovin skozi placento, vendar je to področje še vedno slabo raziskano in pridobljene informacije so pogosto težko prenosljive na človeka. Pomanjkanje

Preglednica 2: FDA razvrstitev učinkovin glede varnosti uporabe v nosečnosti (10).

Table 2: FDA drug classification regarding safety in pregnancy (10).

KATEGORIJA	DEFINICIJA
A	Kontrolirane študije pri nosečnicah niso dokazale povečane nevarnosti za abnormalnosti ploda.
B	Študije na živalih niso dokazale škodljivosti za plod, vendar kontrolirane raziskave na nosečnicah niso bile opravljene. ALI Študije na živalih so dokazale škodljivost za plod, vendar kontrolirane raziskave na nosečnicah škodljivosti za plod niso potrdile.
C	Študije na živalih so dokazale škodljivost za plod, kontrolirane raziskave na nosečnicah pa niso bile opravljene. ALI Študije na živalih in kontrolirane raziskave na nosečnicah niso bile opravljene.
D	Kontrolirane ali opazovalne študije na nosečnicah so potrdile škodljivost za plod, vendar lahko korist terapije pretehta potencialno nevarnost.
X	Kontrolirane ali opazovalne študije na živalih ali nosečnicah so potrdile škodljivost za plod. Uporaba učinkovin je kontraindicirana pri ženskah, ki so ali lahko postanejo noseče.

Zaradi pomanjkanja podatkov o varnosti uporabe zdravil med nosečnostjo, se nosečnicam navadno predpisujejo zdravila, ki so že daljše obdobje prisotna na tržišču in jih v tem času niso povezali z resnimi zapleti pri nosečnicah. Pojavlja se tudi problem pri odmerjanju zdravil. Fiziološke spremembe telesa, ki se pojavijo v posameznem trimesečju nosečnosti, vplivajo tudi na farmakokinetične procese. Nosečnice imajo povečan volumen plazme, kar vpliva na delovanje srca in ledvic. Posledično je povečana renalna eliminacija učinkovin. Zdravniki nosečnicam pogosto zmanjšajo odmerke zdravil, z namenom zaščititi plod, vendar lahko nosečnice potrebujejo celo večje odmerke zdravil (10).

Nekatere države razvrščajo učinkovine glede na njihovo varnost uporabe v nosečnosti. FDA deli učinkovine v pet skupin glede na njihovo sposobnost povzročanja poškodb ploda ter glede na vpliv na reprodukcijo in nosečnost (preglednica 2). Pri delitvi učinkovin v skupine gre za razmerje med koristjo in tveganjem terapije in tako ni nujno, da so učinkovine v skupini X bolj toksične kot učinkovine v skupini C ali D. Hormonski sistemski kontraceptivi sodijo v skupino X le zato, ker njihova uporaba v nosečnosti ni smiselna. Nekatere učinkovine pa so lahko v skupini C samo zato, ker študij na živali ni bilo opravljenih. FDA se zato zavzema za vpeljavo nove klasifikacije, ki bi črkovne kategorije zamenjal z bolj podrobnimi opisnimi informacijami, vključujoč podatke o vplivu učinkovin na plodnost in dojenje (10). Mednarodno se uporabljata še dva klasifikacijska sistema in sicer klasifikacijski sistem ADEC (*Australian Drug Evaluation Committee*) ter FASS klasifikacijski sistem (*Swedish Catalogue of Approved Drugs*). Oba sistema imata podobne črkovne kategorije kot FDA sistem, le da FASS sistem nima kategorije X. Od 236 učinkovin, ki jih najdemo v vseh treh klasifikacijskih sistemih, jih je le 26% razvrščenih v isto kategorijo. To omejuje uporabnost in zaupanje v klasifikacijske sisteme (13).

znanja otežuje varnejše in učinkovitejše zdravljenja nosečnice in/ali ploda. Ker za nobeno učinkovino ne moremo z zagotovostjo trditi, da je njena uporaba med nosečnostjo varna, se zdravila v nosečnosti jemljejo le v primerih, ko pričakovana korist opravičuje tveganje za plod.

8 Literatura

- Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43 (8): 487–514.
- Ganapathy V, Prasad PD, Ganapathy ME et al. Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 413–420.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B et al. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004; 114: 397–407.
- Pacifici GM, Nottoli R. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28 (3): 235–269.
- Sastry BVR. Techniques to study human placental transport. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 38: 17–39.
- Adam Health Encyclopedia.
- St-Pierre MV, Ugele B, Gambiling L et al. Mechanisms of drug transfer across the human placenta – A workshop report. *Placenta* 2002, 23, Supplement A. *Trophobl Res* 16: 159–164.
- Unadkat JD, Dahlin A, Vijay S. Placental drug transporters. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 125–131.
- Note for guidance on the exposure to medicinal products during pregnancy: need for post-authorisation data, EMEA, 2004
- Meadows M. Pregnancy and the drug dilemma. *FDA Consumer magazine* 2001; 35 (3) (<http://www.fda.gov/fdac/>)
- De Vigan C, De Walle HEK, Cordier S et al. Therapeutic drug use during pregnancy: A comparison in four European countries. *J Clin Epidemiol* 1999; 52 (10): 977–982.
- Lacroix I, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M et al. Prescription of drugs during pregnancy in France. *Lancet* 2000; 356: 1735–1736.
- Addis A, Sharabi S, Bonati M. Risk classification systems for drug use during pregnancy. *Drug Saf* 2000; 23 (3): 245–253.

Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi

Tumor-specific targeting of drugs by liposomes

Nina Kočevar, Julijana Kristl

POVZETEK: Liposomi so danes predmet intenzivnih raziskav na področju zdravljenja rakavih obolenj. Novejši liposomski sistemi omogočajo doseganje dobrih terapevtskih učinkov, ki so posledica zmanjšane toksičnosti zaradi omejenega porazdeljevanja učinkovin v zdrava tkiva in povečanega zadrževanja v tumorjih. Poleg tega predstavljajo tudi velik potencial v genski terapiji. V članku so predstavljene novejšje strategije oblikovanja liposomskih sistemov, s katerimi dosegamo selektivno kopičenje učinkovin v tumorskih celicah in nadzorovano sproščanje.

Ključne besede: liposomi, tumorske celice, ciljano dostavljanje, ciljano sproščanje, genska terapija

ABSTRACT: Liposomes have been studied extensively as drug carriers in cancer therapy. Advanced strategies can decrease toxicity and therefore enhance therapeutic effects through limited distribution to healthy tissues and selective accumulation at the diseased site. Liposomes also offer a promising potential in gene therapy. The article represents some novel developments in liposome-based drug delivery that enhance tumor-specific targeting and controlled drug release.

Key words: liposomes, tumor cells, targeted delivery, targeted release, gene therapy

1 Uvod

Odkrivanje novih učinkovitejših protitumornih učinkovin postaja vodilna smer razvoja farmacevtske znanosti in je posledica naraščajočega števila rakavih obolenj v svetovnem merilu. Obetavni citostatični učinkivi številnih novih molekul na celičnih kulturah so le začetek zahtevnih raziskav, ki pa se velikokrat končajo zaradi slabe terapevtske učinkovitosti oziroma hudih toksičnih učinkov kot posledice neselektivnega delovanja na zdrava tkiva.

Liposomi so danes predmet intenzivnega raziskovanja na področju razvoja novih farmacevtskih oblik za zdravljenje rakavih obolenj. Omogočajo doseganje optimalnih terapevtskih učinkov, ki so posledica podaljšane zadrževanja v centralnem krvnem obtoku, visoke stopnje kopičenja v tumorskem tkivu ter nadzorovanega sproščanja učinkovine s hitrim privzemom v rakave celice.

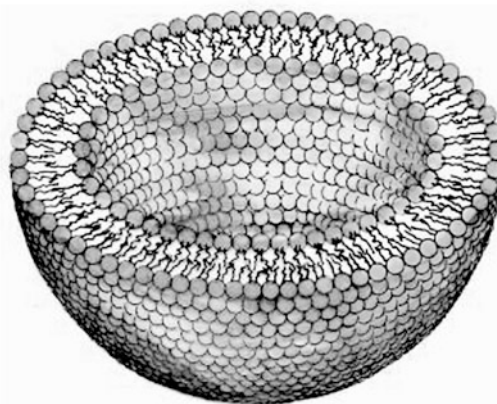
2 Značilnosti liposomov

Liposomi so mikroskopski lipidni vezikli velikosti od 20 nm do 4 μ m (slika 1). Sestavljeni so iz enega (enoslojni liposomi) ali več lipidnih dvoslojev, ki so urejeni koncentrično in vsebujejo enako število prostorov z vodo (večslojni liposomi). Manjši enoslojni liposomi dosegajo velikosti 20-100 nm, večji enoslojni 100-800 nm, večslojni pa 100-4000 nm. Debelina lipidnega dvosloja je 4 nm (1, 2).

Glavne sestavine membrane liposoma so fosfolipidi (slika 2) in holesterol, ki zmanjša prepustnost za hidrofilne molekule ter poveča stabilnost v prisotnosti bioloških tekočin, kot sta kri oziroma plazma (3).

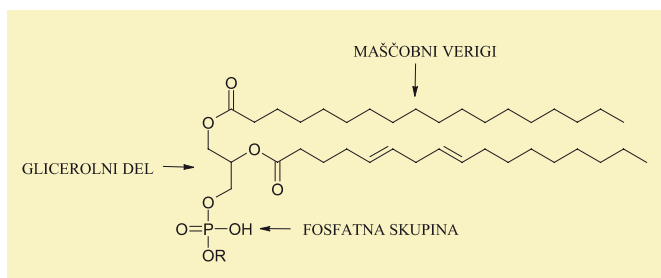
V liposome lahko vgrajujemo tako hidrofilne in amfifilne kot tudi lipofilne učinkovine (nizkomolekularne učinkovine, peptide, proteine, RNK, DNK). Hidrofilne se nahajajo v vodnem mediju v osrednjem delu liposoma in ob njegovi membrani. Amfifilne so razporejene ob membrani in se z lipofilnim delom vanjo delno vgradijo. Lipofilne učinkovine pa so popolnoma vključene v lipidni dvosloj (4).

Liposomi prihajajo v stik s celicami na štiri načine: z adsorpcijo na celično membrano, zlitjem in izmenjavo lipidnih komponent z njo ter endocitozo kot najpomembnejšo vrsto interakcij (slika 3) (2, 5).



Slika 1: Shematska predstavitev enoslojnega liposoma

Figure 1: Schematic representation of an unilamellar liposome



Slika 2: Molekula fosfolipida – najpogosteje uporabljane maščobne kisline so lavrinska, miristinska, oleinska, palmitinska in stearinska, alkoholi (R) pa etanolamin, glicerol in holin.

Figure 2: A phospholipid molecule – the most used fatty acids are lauryl, myristic, oleic, palmitic and stearic acid and alcohols (R) ethanolamine, glycerol and cholin.

3 Liposomi kot dostavni sistemi za protitumorske učinkovine

Osnovni pogoj za doseganje optimalnih terapevtskih učinkov je izpolnitev treh pomembnih zahtev: podaljšano zadrževanje liposomov v centralnem krvnem obtoku, visoka stopnja kopičenja v tumorskem tkivu ter kontrolirano sproščanje učinkovine s hitrim privzemom v rakave celice (6).

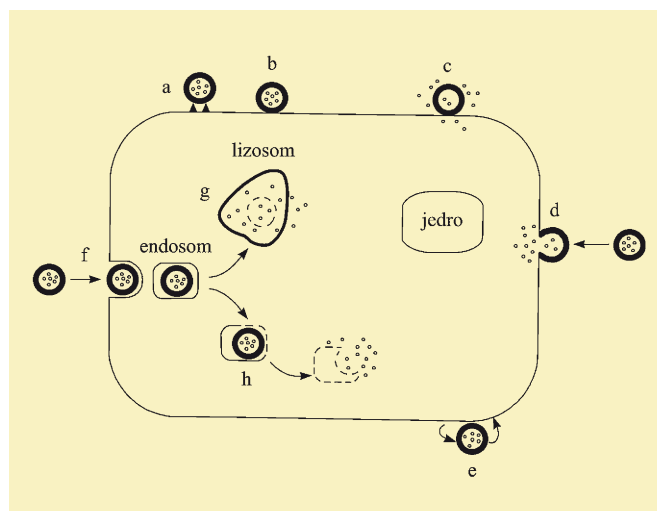
Razvoj liposomskih sistemov se je začel s prvo generacijo, ki jo predstavljajo strukturno najenostavnejši liposomi (slika 4, preglednica 1). Zanje je značilno, da jih retikuloendotelijski sistem zelo hitro odstrani iz krvi (6).

V drugo generacijo uvrščamo sterično stabilizirane sisteme, ki imajo membrano prekrito z molekulami hidrofilnega polietilenglikola (PEG; slika 5). Pegilirani lipidi s stopnjo polimerizacije od 30 do 120 navadno predstavljajo 5 molskih odstotkov lipidnega dela. Površina liposoma je zato močno hidratirana in zaščitena pred adsorpcijo na plazemske proteine in opsonizacijo. Razpolovni čas v krvi s tem podaljšamo tudi do 72 ur (6).

Preglednica 1: Razdelitev liposomov glede na zapletenost zgradbe lipidnega dvosloja, njihove funkcionalne in biološke lastnosti ter stopnja razvoja (6)

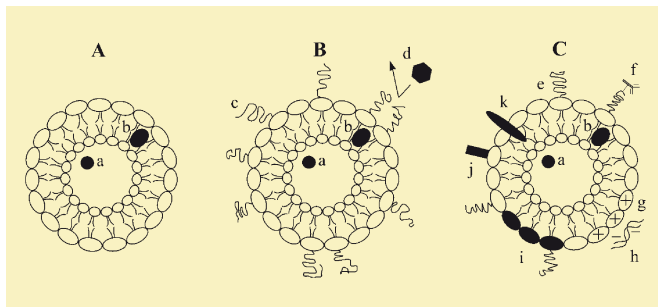
Table 1: Liposome classification according to their membrane complexity, functional and biological properties and stage of development (6)

	OPIS	PREDNOST	STOPNJA RAZVOJA
PRVA GENERACIJA	enostavni liposomi: naravni ali sintezni fosfolipidi	↓ toksičnost, ↑ učinkovitost pasivno akumuliranje v tumorju	odobrena pri FDA
DRUGA GENERACIJA	sterično stabilizirani liposomi: pegilirani lipidi	↑ $t_{1/2}$, izboljšano pasivno akumuliranje v tumorju	odobrena pri FDA
TRETJA GENERACIJA	sterično stabilizirani liposomi z ligandi za ciljano dostavo in kontrolirano sproščanje	↑ terapevtski indeks ciljana dostava, sproščanje	eksperimentalno



Slika 3: Vrste in posledice interakcij med liposomi in celicami: specifična (a) in nespecifična (b) adsorpcija na površino celice s posledično destabilizacijo membrane liposoma in mikropinocitozo sproščene učinkovine (c); zlitje s celično membrano (d) in sprostitvev učinkovine direktno v citoplazmo; izmenjava lipidnih molekul s celično membrano (e); specifična ali nespecifična endocitoza (f) in nastanek endosoma s posledično združitvijo z lizosomom in razgradnjo vsebine (g) ali z razpadom membrane endosoma (h) in sprostitvijo učinkovine v citoplazmo.

Figure 3: Liposome-cell interactions and their effects: specific (a) and non-specific (b) adsorption onto the cell surface with subsequent destabilization of liposome membrane and micropinocytosis of the released drug (c); fusion with the cell membrane (d) and drug release directly into the cytoplasm; exchange of lipid molecules with the cell membrane (e); specific or non-specific endocytosis (f) and the formation of an endosome with subsequent fusion with the lysosome and drug degradation (g) or with subsequent endosome membrane degradation (h) and drug release into the cytoplasm.



Slika 4: Shematska predstavitev enoslojnih liposomov z različno stopnjo kompleksnosti lipidnega dvosloja. **A:** Enostavni liposom z vgrajenima hidrofilno (a) in lipofilno učinkovino (b). **B:** Sterično stabilizirani liposom z molekulami PEG (c), ki ščitijo površino liposoma pred opsonizirajočimi proteini (d). **C:** Različno modificirani sterično stabilizirani liposom tretje generacije – veriga PEG (e), veriga PEG z ligandom za ciljano dostavo (f), kationski lipidi (g), ki omogočajo vgrajevanje DNK (h), fuzogeni lipidi (i), lipidni konjugati, ki omogočajo ciljano sproščanje učinkovine (j), fuzogeni virusni proteini (k).

Figure 4: Schematic representation of unilamellar liposomes with different degrees of membrane complexity. **A:** Plain liposome with incorporated hydrophilic (a) and lipophilic drug (b). **B:** Sterically stabilized liposome with PEG molecules (c), which protect the liposome from opsonizing proteins (d). **C:** Different modifications of sterically stabilized third generation liposome: PEG chain (e), PEG chain with targeting ligand (f), cationic lipids (g) which enable the incorporation of DNA (h), fusogenic lipids (i), lipid conjugates, which enable site-specific drug release (j), fusogenic viral proteins (k).

Predstavniki tretje generacije so prav tako sterično stabilizirani pegilirani liposomi, ki pa na svoji površini vsebujejo tudi informacijo za ciljano dostavo učinkovine v tumorsko tkivo oziroma ciljano sproščanje učinkovine. Prvi pristop temelji na pripenjanju ligandov, ki so sposobni prepoznati specifične tarčne molekule na tumorskih celicah, drugi pa na specifičnih dejavnikih, ki sprožijo sprostitve učinkovine. Kombinacija obeh omenjenih pristopov – dostava učinkovine na specifično mesto in sledeče sproščanje – značilno poveča koncentracijo učinkovine v tumorju in s tem biološko uporabnost (6, 7).

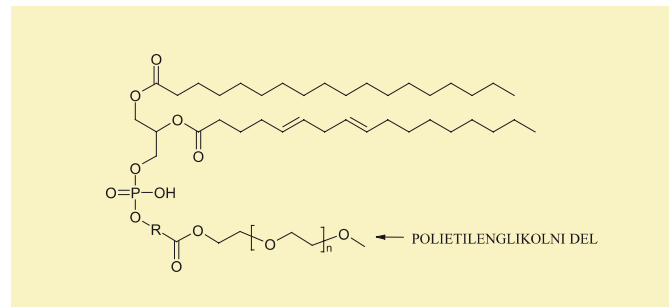
Dokazano je, da se liposomi v veliki meri kopičijo v tumorskem tkivu, kar je posledica dobro prepustnih žil in odsotnosti limfnega sistema (6). Velikost por žilnih sten v tumorskem tkivu se giblje v območju 100-780 nm, medtem ko znaša v normalnem ožilju manj kot 6 nm.

3.1 Ciljano dostavljanje

Povečano količino protitumorne učinkovine v rakavem tkivu lahko dosežemo s procesom ciljane dostave. Liposomi na svoji površini nosijo ligande (protitelesa ali njihove fragmente, proteine, glikoproteine, ogljikove hidrate), ki prepoznajo tarčni antigen ali receptor na membrani tumorske oziroma endotelijske neovaskularne celice (7, 8, 9).

3.1.1 Ciljanje s protitelesi

S protitelesi prekrute liposome imenujemo tudi imunoliposomi. Protitelesa lahko priprnemo direktno na polarni fosfolipidni del ali na



Slika 5: Molekula pegiliranega fosfolipida

Figure 5: A pegylated phospholipid molecule

končni del verige polietilenglikola. Slednji pristop daje ugodnejše rezultate, saj protitelo lažje doseže antigen.

Število na liposom pripetih protiteles odloča o stopnji vezave na tumorsko celico, poudariti pa je potrebno, da je hkrati sorazmerno z obsegom odstranjevanja veziklov z retikuloendotelijskim sistemom. Optimalno razmerje med dostavo učinkovine do tumorskega tkiva in še sprejemljivim povečanjem privzema v monocite in makrofage dosežemo z vezavo 10-30 molekul protiteles na liposom.

Primeri laboratorijskih raziskav s to vrsto liposomov na živalih dajejo dobre rezultate. Z imunoliposomi z monoklonskim protitelesom IgG 34A proti glikoproteinskemu receptorju gp112 na pulmonalnih endotelijskih celicah miši so tako ugotovili, da se že po 30 minutah več kot 50 % odmerka nahaja v pljučih (7).

V drugi študiji so uporabljali na pH občutljive liposome (3.2.1) z doksorubicinom, prekrute s protitelesi proti receptorju CD19 na limfomskih celicah B. Miši, ki so prejemale doksorubicin, so dosegale v primerjavi s kontrolno skupino značilno višje stopnje preživetja (9).

3.1.2 Ciljanje na integrinski receptor

Nekatere vrste integrinskih receptorjev ($\alpha v \beta 3$ in $\alpha 5 \beta 1$) so prekomerno izražene na neovaskularnih celicah tumorjev, ki nastajajo v procesu tumorske angiogeneze (10). Za vezavo peptidnega liganda na te integrine je ključnega pomena njegovo aminokislinsko zaporedje Arg-Gly-Asp (sekvenca RGD). Z liposomi, ki imajo na terminalnem polietilenglikolnem delu vezano zaporedje RGD, dosežemo značilno večjo protitumorno aktivnost (7).

3.1.3 Ciljanje na folatni receptor

Folna kislina je vitaminska substanca, ki jo celice transportirajo v svojo notranjost preko folatnega membranskega prenašalca ali folatnega receptorja; prvi se nahaja praktično v vseh normalnih celicah, drugi pa na endotelijskih celicah, aktiviranih makrofagih in rakavih celicah. Prekomerna ekspresija folatnega receptorja na hitro delečih se tumorskih celicah predstavlja mehanizem, ki ga izkoriščamo za ciljano dostavo liposomov do tumorja – prekrrijemo jih s folatnimi molekulami.

V eksperimentih *in vitro* na celičnih linijah HeLa in KB so uporabljali liposome z doksorubicinom, prekrute s folatom. Raziskovalci so dokazali značilno povečan privzem učinkovine, poleg tega pa so nakazali tudi možnost, da se s takšnim načinom dostave učinkovine izognemo rezistenci (7).

Omeniti moramo tudi naraščajoče zanimanje za nove specifične peptidne ligande, pridobljene z metodami bakteriofagnega prikaza. Gre za posebne proteine, ki so sposobni penetrirati v tumorske celice in v pogojih *in vivo* že dajejo zelo obetavne rezultate (11).

3.2 Ciljano sproščanje

Z liposomi, pri katerih akumuliranje v tumorju dosežemo le s ciljanim dostavljanjem, niso dosegli značilno boljše terapevtske učinkovitosti v primerjavi z enostavnimi pegiliranimi liposomi. Razlog leži v lizosomski razgradnji, do katere pride po vstopu liposoma v rakavo celico. Da bi se liposom razgradnji izognil, bi moral iz endosoma takoj difundirati oziroma hitro sprostiti učinkovino v citoplazmo.

Raziskovalci so razvili kar nekaj pristopov za doseganje ciljanega sproščanja v tumorskih tkivih, ki so predstavljeni v nadaljevanju (7).

3.2.1 S spremembo pH-ja povzročeno ciljano sproščanje

Prvotna ideja o razpadu v krvnem obtoku sicer stabilnih liposomov in sprostitvi učinkovine v metabolno aktivnem tumorskem tkivu (pH približno 6,5) ni dala želenih rezultatov. Priprava liposomov, ki bi prepoznali tako majhne razlike pH-ja, namreč s tehnološkega vidika ni izvedljiva. Raziskovalci so se zato osredotočili na zelo kislo okolje v endosomih in lizosomih, kjer pH pade pod 5. Liposomi, ki omogočajo tak pristop, imajo posebno sposobnost, da se ob spremembi pH-ja zlijejo z membrano endosoma ali lizosoma (fuzogeni liposomi). Učinkovina se pri tem sprosti v celično citoplazmo. V raziskovalnih krogih ta pristop v kombinaciji s ciljano dostavo štejejo za eno izmed najobetavnejših možnosti učinkovite protitumorne terapije.

3.2.2 S svetlobo povzročeno ciljano sproščanje

Fotosenzitivnost liposomov dosežemo z vgraditvijo fosfolipidnih molekul, ki po fotoekscitaciji z vidno ali UV-svetlobo izomerizirajo, razpadejo ali polimerizirajo. Ti procesi povzročijo spremembe v strukturi lipidne membrane (izomerizacija *cis-trans*, hidroliza ali premreženje lipidov), ki postane prepustna zaradi nastalih defektov in sprosti učinkovino. Te metode še vedno razvijajo le na eksperimentalnem nivoju in njihova učinkovitost *in vivo* ni dokazana. Veliko pomanjkljivost predstavlja tudi dejstvo, da predpostavljajo lokalizacijo tumorja, kar je v realnosti le redko primer, saj večina rakavih bolnikov umre zaradi metastazne razširitve bolezni.

3.2.3 S toploto povzročeno ciljano sproščanje

Tudi ta način je omejen na lokalizirane tumorje, ki morajo biti viru toplote dobro dostopni. Zaenkrat ga uporabljamo le za zdravljenje površinskih tumorjev, ki jih ne moremo odstraniti kirurško.

Nasprotno pa ta način v primerjavi z drugimi načini ciljanega sproščanja prinaša pomembne prednosti. Zaradi povišane temperature na mestu tumorja prihaja do kopičenja liposomov v tkivu, ki je posledica povečane prekrvavitve in povečane žilne permeabilnosti. Dokazano je celo, da je hipertermija že sama po sebi citotoksična.

Termosenzibilni liposomi morajo izkazovati dve pomembni lastnosti: fazni prehod mora biti le rahlo višji od fiziološke telesne temperature, hkrati pa mora obsegati zelo ozko temperaturno območje. Učinkovini s tem omogočimo, da se po spremembi integritete membrane ob temperaturi faznega prehoda hitro in popolnoma sprosti.

3.2.4 Z encimi povzročeno ciljano sproščanje

V rakavih tkivih je zaradi povečanega metabolizma večje izražanje določenih vrst encimov. To lastnost izkoriščamo pri pripravi liposomov, sestavljenih iz lipidnih konjugatov, ki so občutljivi na celične proteaze. Pod vplivom teh encimov pride do cepitve konjugatov, iz katerih nastanejo fuzogeni lipidi in povzročijo zlitje liposoma z membrano endogenega vezikla.

V literaturi najdemo še številne metode. Uporaba alkalne fosfataze temelji na vgraditvi fosfoholesterola v lipidni dvosloj, kar vodi do odcepitev fosfatne skupine iz holesterola in hitre destabilizacije liposoma. Fosfolipaza A₂ cepi fosfolipidne molekule, zaradi česar pride do razpada liposomov in sprostitve učinkovine. Proučujejo tudi primernost transglutaminaze, sfingomielinaze in fosfolipaze C.

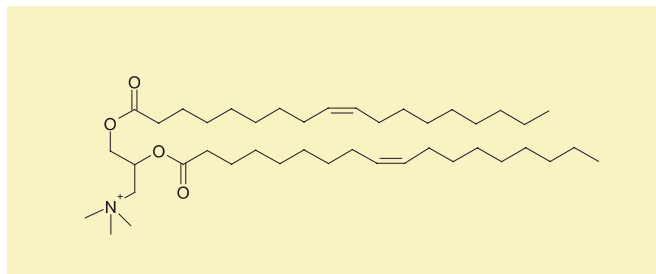
4 Liposomi v genski terapiji rakavih obolenj

Osnovni cilj genske terapije je uspešen vnos genskega materiala v tarčno tkivo. Genska terapija rakavih celic posega v procese ekspresije tumorskih supresorskih genov, ki inducirajo apoptozo, in onkogenov, ki sodelujejo pri proliferaciji. Z geni za citokine pa se vpleta tudi v procese imunskega sistema.

Sistemi za dostavo DNK do celic so biološki (virusni) in nebiološki (kationski polimeri, kationski peptidi in kationski lipidi). Liposomi iz kationskih lipidov z vgrajenim genetskim materialom se imenujejo tudi lipopleksi ali genosomi in so za razliko od klasičnih liposomov, katerih membrana je nevtralna ali negativna, pozitivno nabiti (12).

Tipičen primer kationskega lipida, ki ga pogosto uporabljamo, je DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilaminopropan; slika 6). V vodnem okolju se negativno nabita DNK najprej razporedi tik ob zunanji, pozitivno nabiti površini membrane liposoma. Zaradi elektrostatskih interakcij med molekulami DNK in lipidi začne nato prihajati do agregacije in zlivanja liposomov, pri čemer se DNK vgradi v njihovo notranjost. Liposomi, ki nastanejo, so večslojne oblike (12, 13).

Glavna omejitev uporabnosti liposomov iz kationskih lipidov je njihova toksičnost. Kot pozitivno nabiti delci inducirajo agregacijo fiziološko prisotnih makromolekul in celic v krvi (agregacija trombocitov, plazemskih proteinov), kar lahko povzroči hemolizo (2).



Slika 6: Molekula kationskega lipida DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilaminopropan)

Figure 6: The cationic lipid DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonio-propane).

Ena od uspešnejših smeri razvoja liposomov na področju dostave genov so virosomi. Gre za kationske liposome, ki imajo v membrano vgrajene ali nanjo pripete fuzogene proteine virusne ovojnice (14). Po vezavi virosomov na celico pride do fuzije z membrano in direktne sprostitve DNK v citoplazmo, s čimer se izognemo razgradnji učinkovine v endosomih in lizosomih. Zlitje z membrano se v primerjavi s klasičnimi liposomi iz kationskih lipidov konča veliko hitreje (15).

5 Sklep

Liposomi so danes eni izmed najbolj proučevanih dostavnih sistemov za zdravljenje rakavih obolenj. Na splošno niso toksični niti imunogeni in so kompatibilni s številnimi citostatiki. Ker je učinkovina ujeta v njihovi notranjosti, predstavljajo dobro zaščito pred kemijsko in metabolično razgradnjo po injiciranju v krvni obtok. Toksičnost je močno zmanjšana zaradi omejene porazdelitve citostatika v zdrava tkiva, učinkovitost pa je večja zaradi podaljšanega zadrževanja v tumorjih. Te lastnosti so posledica njihove kompleksnosti – tako na nivoju zgradbe kot mehanizmov za ciljno dostavo in ciljno sproščanje – ki se nenazadnje kaže v tehnoloških omejitvah. Te pa so eden od glavnih razlogov, da je danes za terapevtske namene registriranih le nekaj liposomskih pripravkov. Toda intenzivne raziskave so že prinesle obetaven napredek, ki ga dokazuje množica predkliničnih in kliničnih raziskav. Že v bližnji prihodnosti lahko zato na tržišču pričakujemo kar nekaj novih pripravkov iz liposomov.

6 Literatura

1. Bauer KH, Frömming KH, Führer C. Mikropartikel, Nanopartikel, Liposomen. In: Pharmazeutische Technologie, 5th ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1997: 354-360.
2. Lasic DD. Liposomes. In: Liposomes in Gene Delivery, Boca Raton: CRC Press LLC, 1997: 67-112.
3. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv* 1995; 70: 95-111.
4. El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. *Int J Pharm* 2005; 292: 179-185.
5. Torchillin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 145-160.
6. Mayer LD. Future developments in the selectivity of anticancer agents: Drug delivery and molecular strategies. *Cancer Metast Rev* 1998; 17: 211-218.
7. Andresen TL, Jensen SS, Jørgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res* 2005; 44: 68-97.
8. Simões S, Moreira JN, Fonseca C et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 947-965.
9. Sapra P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 439-462.
10. Xiong XB, Huang Y, Lu WL et al. Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic. *J Control Release* 2005 (v tisku).
11. Marcucci F, Lefoulon F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Disc Today* 2004; 9 (5): 219-228.
12. El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94: 1-14.
13. Zhdanov RI, Podobed OV, Vlassov VV. Cationic lipid-DNA complexes – lipoplexes – for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry* 2002; 58: 53-64.
14. Felnerova D, Viret JF, Glück R et al. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotech* 2004; 15: 518-529.
15. Kaneda Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 43: 197-205.

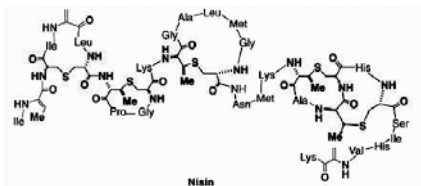
Novice iz sveta farmacije

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

Bakterije, ki proizvajajo nove antibiotike

Pripravila: Petra Slanc

Odpornost bakterij na antibiotike predstavlja v zadnjih desetletjih vedno bolj pereč problem. Odpornost se stopnjuje, kar ima za posledico, da so določeni sevi odporni do te mere, da so kljub zdravljenju lahko za človeka tudi usodni. Vedno večja je tudi pojavnost bolnišničnih sevov, za katere je na voljo vedno manj vrst antibiotikov, s katerimi je mogoče infekcije takšnega tipa uspešno zdraviti. Modelne molekule antibiotikov so navadno predstavljale spojine, ki so izvirale iz naravnega sveta gliv, pa tudi bakterij. Pri poskusih proizvodnje so raziskovalci poskušali bakterije, ki jih uporabljamo za proizvodnjo osnovnih skeletov molekul antibiotikov, genetsko spremeniti do te mere, da bi kemijsko polysintezo zamenjal proces izzvan v sami bakteriji in bi na ta način ciljno molekulo lahko pridobivali neposredno v fermentacijskem procesu. Kljub številnim poskusom je bila na omenjeni način pridobljena le peščica potencialnih antibiotikov med katerimi najdemo tudi razred lantibiotikov.



Lantibiotiki so bakteriocini, peptidi ali proteini, ki delujejo bakteriocidno na sorodne vrste bakterij. Bakteriocine delimo v tri razrede na podlagi njihove strukture. Prvi razred predstavljajo lantibiotiki, ki so po svoji strukturi toplotno odporni majhni peptidi, ki nastanejo s post-translacijsko modifikacijo le-teh, kar vodi v nastanek obročnega sistema zaradi reakcije med dehidroserinom in treoninom z sulfahidrilnimi skupinami cistina. Za lantibiotike je značilno, da v njihovi strukturi najdemo številne nekonvencionalne aminokisliline, ki nastanejo kot post-translacijske modifikaci-

je stranskih verig prekurzorjev proteinov ob njihovi sintezi na ribosomih. Predstavniki tipa A lantibiotikov je nisin, ki ga proizvaja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Mehanizem antibiotičnega delovanja nisina je tvorba por v membrani celice, kar ima za posledico povečano prepustnost membrane ter kolaps vitalnega ionskega gradienta in s tem izčrpanja celice, kar vodi do njenega uničenja.

Poleg lantibiotikov je pred nedavnim raziskovalcem uspelo premostiti ovire proizvodnje poliketidnih antibiotikov med katere uvrščamo eritromicin. Znanstveniki so iz različnih vrst bakterij vzeli genetski zapis za proteine, ki so odgovorni za potek biosinteze poliketidov, vse zapise pa so uspešno združili in jih integrirali v bakteriji *Escherichia coli*. Integracija genskega zapisa je predstavljala lažji del naloge, saj je omejujoči korak uspešne sinteze funkcionalno združevanje posameznih poliketidov. Proteini, ki so odgovorni za sintezo poliketidov, so zelo veliki, kar predstavlja glavno oviro združevanja. Napredek pri združevanju predstavlja uvedba dodatnega genskega zapisa, ki ima za posledico uvedbo dodatnega fragmenta na vsak protein, preko katerega se ti proteini lahko povežejo. Zaradi uvedbe teh fragmentov se posamezni proteini lahko med sabo povežejo kot lego kocke, pri tem pa nastanejo nove konformacijske oblike proteinov in novi poliketidi. Aktivnosti novih spojin še niso preverjali, vendar pa skupina, ki je razvila to novo, naravno kombinatorično knjižnico poliketidov pričakuje, da bodo nekatere kombinacije uporabne kot modelne spojine ali pa same kot take. Poleg antibiotičnega delovanja bo skupina preverila tudi njihovo protitumorno delovanje, saj so znani primeri, ki imajo naravni poliketidi tudi to lastnost.

Viri:

- Bauer R, Dicks LMT. (2005) *Int J Food Microbiol* 101: 201-216.
 Menzella HG et al. (2005) *Nature Biotech* 9: 1171-1176.
 Sherman HD. (2005) *Nature Biotech* 9: 1083-1084.

Nova cepiva s hitrim odgovorom - ali DNA predstavlja novo rešitev?

Pripravila: Petra Slanc

Vsako leto se populacije sveta srečujemo z različnimi epidemijami gripe. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO, angl. WHO) je sporočila, da je ptičja gripa potencialno še bolj smrtonosna kot SARS (*severe acute respiratory syndrome*), za posledicami katerega je do danes umrlo 774 ljudi. SZO je tudi potrdila, da je do osemindvajsetega junija 2005 za posledicami ptičje gripe umrlo že 54 ljudi. Virus ptičje gripe tipa A podtip H5N1 (hemaglutinin 5/neuraminidaza 1) je še posebej problematičen, saj je zanj značilno, da zelo hitro mutira in ima zmožnost uporabe genov virusov, ki okužujejo različne živalske vrste. V večini primerov je bilo dokazano, da je bila infekcija posledica prenosa virusa iz živali na človeka.

Kot odgovor na sporočilo SZO so Združene države Amerike pridobile 4 milijone odmerkov cepiva, Italija in Francija pričakuje ta 2 milijona, Velika Britanija (UK) pa je pred nedavnim naročila 14 milijonov odmerkov protivirusnega cepiva. Glede na podatke SZO letna proizvodnja cepiv znaša 300 milijonov odmerkov. Razlog pomanjkanja proizvodnih kapacitet predstavlja dejstvo, da na svetu danes proizvaja cepiva le pet glavnih proizvajalcev (*GlaxoSmithKline* – London, *Sanofi-Aventis/Pasteur* – Paris, *Merck* – Rahway, New Jersey, *Wyeth* – Madison, New Jersey in *Chiron* – Emeryville). Vzrok so vse strožje zahteve za pridobitev dovoljenja za trženje, nizek zaslužek glede na zaslužek, pridobljen z zdravili z visokim doprinosom, kot so na primer antilipemiki, ter dejstvo, da je trg za cepiva ocenjen zgolj na 2 % celotnega farmacevtskega trga. Poleg tržnih »omejitev« k manjšemu zanimanju proizvajalcev za cepiva prispeva tudi dejstvo, da je sama proizvodnja cepiv relativno dolgotrajna, zelo nezanesljiva, zahtevna in draga.

Trenutno cepiva proti gripi proizvajajo z uporabo kemično deaktiviranih virusov epidemičnega seva in drugega seva gripe, za katerega je značilno, da dobro raste znotraj kurjega jajca. Po določenem času jajca prešetajo in izločijo tista, v katerih je prišlo do uspešne rekombinacije obeh virusov, se le-ti v jajcih uspešno množijo ter proizvajajo uspešno zaščito proti epidemiološkemu sevu. Zaradi tega je proizvodnja relativno dolga, saj lahko traja mesece, preden pride do izpolnitve vseh treh zgoraj omenjenih pogojev. V primeru epidemije z H5N1 je ocenjeno, da takšna proizvodnja ne bi predstavljala uspešne zaščite, saj bi preteklo preveč časa in bi umrlo preveliko število ljudi, preden bi izdelali cepivo.

V iskanju novih rešitev za hitrejšo proizvodnjo cepiv poskušajo raziskovalci razviti tudi cepiva osnovana na plazmidni DNA (izven kromosomska krožna DNA). Razvoj same tehnologije proizvodnje DNA-cepiv je že na stopnji, ko potekajo klinične študije, zato predstavljajo cepiva na osnovi plazmidne DNA resen izbor. DNA-cepiva niso osnovana na vbrizganju antigenov (proteinov, ki izzovejo imunski odziv), ampak na dajanju genskega zapisa za njih. Genski zapis za antigene je integriran v plazmidno DNA, ki predstavlja vektor vnosa. DNA-cepiva nato vnesemo v organizem prav tako kot običajna cepiva. Po vbrizganju cepiva v celice, navadno kožne ali mišične dendritične celice, se plazmidna DNA v njih pomnoži neodvisno od kromosomske in uporabi celični aparat za proizvodnjo proteinov, ki so kodirani v njegovem zapisu. Fragmenti izraženega proteina se nato lahko vežejo na oba histokompatibilna kompleksa razreda I ali II. Tako nastali haptent predstavi izbrani antigen, kar ima za posledico imunski odziv na osnovi protiteles, kot tudi celični imunski odziv.

Prva uporaba plazmidnih DNA-cepiv izven poskusov v laboratorijih, je bilo cepljenje kalifornijskih kondorjev proti »West Nile« virusu z genskima zapisoma za prM in prE proteine. Celotna proizvodnja cepiv je bila narejena v mesecu dni. Seveda pa je najbolj pomembno vprašanje, ali je cepivo delovalo? Glede na podatke živalskega vrta v Los Angelesu niti eden od kondorjev ni imel neželenih učinkov, njihova krvna slika pa je pokazala zelo dober imunski odziv. Zelo spodbudno. Kljub številnim prednostim plazmidnih DNA-cepiv, pa so še vedno odprta določena vprašanja. Ta

vključujejo slabe rezultate testiranja na mišjih modelih, kjer so ta cepiva v določenih primerih izzvala zelo visoko stopnjo imunskega odziva. Dodatni pomisleki uporabe cepiv s plazmidi predstavlja tudi možnost tvorbe protiteles proti sami dvojni vijačnici, saj je znano, da lahko določeni motivi dvojne vijačnice izzovejo imunski odziv z aktivacijo celic T pomagalk. Ta vidik bo mogoče v prihodnje, ko bodo natančni mehanizmi tega delovanja bolj poznani, možno tudi uporabiti kot adjuvantno aktivacijo določenega tipa celic ali za spodbujanje določenega tipa imunske zaščite. Čeprav je glede cepiv s plazmidnimi DNA še veliko stvari nedorečenih, pa predstavljajo le-ta potencialno novo pot za »hitrejša« in prav tako učinkovita cepiva, ki bi v primeru velikih epidemij vsekakor lahko reševala življenja. Postaja namreč jasno, da je mogoče imunski odziv s plazmido izboljšati z vključitvijo genskega zapisa za različne imunostimulativne molekule.

Vir:

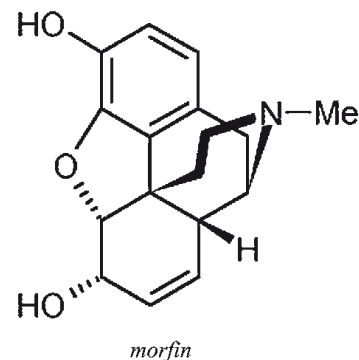
Forde GM. (2005) *Nature Biotech* 9: 1059-1062.

Ugodno delovanje morfina na potek Alzheimerjeve bolezni

Pripravil: Bojan Doljak

Alzheimerjeva bolezen je najbolj pogosta oblika demence pri starostnikih. Vzroki za bolezen, ki ima vedno močnejši vpliv na človekovo psiho, so še vedno neznan. Bolezen je dobila ime po nemškem zdravniku Aloisu Alzheimerju, ki je leta 1906 opisal spremembe možganskega tkiva pri duševni bolnici v obliki nenavadnih kepcev ter zamotanih vlaken, danes znanih kot amiloidne lehe oziroma neovfibrilarni vozli. Bolezen je neozdravljiva, kljub številnim poskusom zdravljenja do danes še ni na voljo nobene učinkovite terapije. Prva stopnja bolezni je vezana na poškodbe tistih delov možganov, ki so povezani s spoznavnimi funkcijami, predvsem so prizadete sposobnosti pomnjenja, učenja in razmišljanja. V Združenih državah Amerike je vsako leto prizadetih vsaj 4,5 milijonov prebivalcev, glede na napovedi, pa naj bi se do leta 2050 število bolnikov povzpelo kar na 11,3 do 60 milijonov.

Mehanizem bolezni še ni pojasnjen, znani pa so že nekateri dejavniki, ki so vpleteni v patologijo bolezni in katerih posledica naj bi bila degeneracija nevronov in odpoved nevroloških funkcij. Znano je, da se na živčnih vlaknih pojavijo lehe, ki vsebujejo



večje količine proteina, imenovanega β -amiloid. Ta protein se lahko kopiči v lehah več let preden se pojavijo prvi znaki bolezni. Potrjeno pa je bilo tudi, da je za njegovo kopičenje potrebna določena stopnja genetske predispozicije. Do nedavnega je bila v ospredju predvsem *nevrotoksična oz. amiloidna hipoteza*, po kateri naj bi bili vzrok razvoja bolezni nevrotoksični učinki β -amiloida na celice na nivoju celičnih membran. Danes pa vse bolj velja, da poškodbe živčevja ne morejo biti edini vzrok bolezni. Epidemiološke študije so namreč že pred leti potrdile, da igra pomembno vlogo tudi mikro-prekrvavitev v možganih. Znano je, da med dejavnike tveganja za Alzheimerjevo bolezen spadajo tista stanja, ki slabšajo stanje ožilja (npr. kajenje, sladkorna bolezen, ateroskleroza, atrialna fibrilacija srca in druge). Na podlagi teh raziskav je bila razvita alternativna *vaskularna hipoteza*, po kateri naj bi eden izmed glavnih posrednikov pri sproščanju gladkih mišič žilja, dušikov oksid (NO), vplival na krvni tlak in pretok krvi tudi v možganih. NO je med drugim pomemben tudi kot posrednik signala v živčnih končičih in živčnih stikih. Nastajanje NO iz naravnega prekurzorja, aminokislina L-arginina, regulira encim NO-sintaza. Množina sproščenega NO pa je odvisna od množine encima. Včasih se množina encima dodatno poveča in dodatno nastali NO začne delovati nevrotoksično. Drugače je, kadar je množina in aktivnost NO-sintaze normalna. V takšnih primerih nastali konstitutivni NO regulira nevrološke in endotelijske funkcije, sprošča steno žilja ter deluje zaščitno na nevrone.

V najnovejši študiji, ki so jo objavili oktobra letos, so na nevroblastomskih celicah (tumorskih celicah, odvzetih otrokom, ki so zboleli za nevroblastomom) ugotovili, da deluje morfin nevroprotektivno. Že nekaj let je sicer znano, da morfin deluje kot signalna molekula, saj po vezavi na določene opiatne receptorje $\mu 3$ sprosti NO, ki nadalje prenese signal v endoteljskih celicah, granulocitih in monocitih. Ni bilo pa znano, da NO zavira nastajanje β -amiloida. Po drugi strani tudi β -amiloid zavira nastajanje konstitutivnega NO, kar vodi do izgube nevrotransmitterske sposobnosti, zmanjšane prekrvavitve možganov in zmanjšane zaščitnega delovanja NO na živčevje. Morfin poveča množino NO in s tem potencira njegov učinek ter posredno zmanjšuje nastajanje β -amiloida.

Znanstveniki predvidevajo, da predstavlja prav morfin manjkajoči vezni člen, ki preko vpliva na metabolizem β -amiloida na molekularnem nivoju, smiselno povezuje do sedaj znano amiloidno in vaskularno hipotezo nastanka Alzheimerjeve bolezni. Študija je prav tako dokazala, da morfin preko regulacije izražanja dveh encimov (BACE-1 in BACE-2) deluje nevroprotektivno *ex vivo*. Naslednje študije znanstvenikov bodo usmerjene na dokazovanje njegove terapevtske uporabnosti za zdravljenje oziroma preprečevanje Alzheimerjeve bolezni *in vivo*. Pri tem pa bodo najbrž poskušali potencirati oziroma regulirati delovanje zlasti endogenega morfina, ki nastaja v centralnem živčnem sistemu.

Vir:

Pak T, Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB. *Med Sci Monit* 11: 357-366.

V prejšnji številki smo v rubriki Novice iz sveta farmacije naknadno opazili nekaj večjih napak, ki jih tokrat popravljamo:

Najbolj prodajana humana zdravila v letih 2002-2004

Preglednica 2. Lista najbolj prodajanih pripravkov z rekombinantnimi učinkovinami:

- namesto Araneps – **Aranesp**
- namesto a in a eritropoetin
- α in β **eritropoetin**
- namesto a in a interferon - α in β **interferon**

Rastni hormon proizvajata tudi Roche in Serono (v preglednici je ena črta odveč).

Lilijani Cilenšek, mag. farm. v slovo

23. marca 2005 smo se na izolskem pokopališču poslovili od dolgoletne sodelavke in kolegice Lilijane Cilenšek, roj. Stanič. V spominu nam bo ostala kot marljiva in skromna kolegica.



Stroke Ti je pomenila življenje in veselila si se vsakega napredka v farmaciji, a Tebi na žalost tudi stroka ni mogla več pomagati. S trdoživo naravo in voljo si se dolgo upirala boleznim, a prišel je trenutek, ko še tako pogumna nisi zmogla več.

Lilijana - Lili Cilenšek je bila rojena 7. maja 1937 v Kanalu ob Soči, kjer je živela do leta 1954, ko se je njena družina preselila v Izolo. V Kanalu ob Soči se je spominjajo kot izredno živahnega, marljivega in družabnega dekleta. Sodelovala je pri telovadnem društvu Partizan in se udeleževala atletskih tekmovanj, nič manj aktivna ni bila kot tabornica v taborniški organizaciji "Rod bistre Soče". V Kanalu je bilo ustanovljeno prvo žensko gasilsko društvo na Primorskem in kolegica Lili je vodila mladinsko desetino. Že

kot otrok se je vključila v dramski krožek, kasneje pa je sodelovala pri Prosvetnem društvu Kanal. Osnovno šolo in nižjo gimnazijo je obiskovala v Kanalu, višjo gimnazijo v Novi Gorici in Kopru, kjer je maturirala leta 1956.

Študij farmacije je začela v Ljubljani in nadaljevala v Zagrebu, kjer je leta 1963 diplomirala. Poročila se je še v študentskih letih 1961. Imela je dve hčerki; obe sta se zapisali glasbi. Po končanem študiju se je zaposlila v bolnišnični lekarni v Kopru, ki je delovala v zelo slabih pogojih. Kasneje se je bolnišnična lekarna preselila v Izolo in kolegica Lili si je prizadevala, da je lekarna dobila oddelek za izdelavo sterilnih pripravkov. Leta 1971 je zapustila bolnišnično lekarno in se zaposlila v Obalnih lekarnah Koper v enoti Izola. Kasneje je prevzela vodenje te lekarnice in na tem mestu ostala do konca leta 1999, ko se je upokojila. Ob grobu se je od nje poslovila njena dolgoletna sodelavka in prijateljica Marta Ambrožič z naslednjimi besedami:

»Bila si nam sodelavka in svetovalka hkrati, vedno pripravljena pomagati z nasveti ali z delom. In, kot da nisi dovolj poslušala težav drugih ljudi, smo ti še mi, tvoji sodelavci radi potožili o lastnih problemih. S svojim optimizmom si znala pripeljati probleme do uspešne rešitve. Z vsem srcem si bila predana stroki in delu. Spoštovala si starejše kolege, razveselila pa si se tudi vsakega mladega farmacevta. S svojim delom si jim bila za zgled. Velikokrat si ostala v lekarni in delala, druge pa si poslala na strokovna srečanja. Draga Lili, življenje se izteče kot reka in reka tvojega življenja se je iztekla na tako žalostno lep, z mandljevim cvetjem okrašen spomladanski dan.«

Marija Brenčič

Navodila avtorjem

Prispevke, ki so namenjeni objavi v Farmaceutskem vestniku, avtorji pošljejo na naslov **glavne urednice Farmaceutskega vestnika:**

dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana
tel: 00 386 1 476 95 00
e-naslov: andrijana.tivadar@ffa.uni-lj.si

Strokovne članke in druge prispevke objavljamo v slovenskem jeziku, po dogovoru z uredništvom tudi v angleškem.

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

Strokovni članki so recenzirani, kar pomeni, da bodo avtorji oddali najmanj dve verziji besedila: t. i. prvo verzijo, ki jo uredništvo pošlje najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno, in t. i. končno verzijo. Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmaceutskem vestniku je zagotovljena tajnost.

Prvo verzijo predstavljajo trije na papir natisnjeni izvodi prispevka, na katerih avtorji niso imenovani, slike in preglednice pa so vključene v besedilo, ter prispevek v elektronski obliki. Avtorji strokovnih člankov priložijo lastnoročno podpisan spremni dopis z naslednjimi podatki: naslov prispevka, imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi, imena in naslovi inštitucij, v katerih so zaposleni, telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe, in izjavo, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo, ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji. V primeru ponatisa slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje založbe, ki ima avtorske pravice. Rokopisi strokovnih člankov praviloma obsegajo največ 20.000 znakov, vključno s presledki, obseg prispevkov za rubriki zanimivosti iz stroke in iz družvenega življenja je lahko največ 6.000 znakov vključno s presledki. Prispevki za rubriko osebne vesti ne smejo presežati 3.000 znakov vključno s presledki. Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubilejih, smrti ali za posebne dosežke v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji prispevke skrajša ali objavi daljše prispevke.

Vsebina naj bo sistematično strukturno urejena in razdeljena na poglavja (izvirni raziskovalni članki naj imajo najmanj naslednja poglavja: Uvod, Materiali in metode, Rezultati in razprava), vsak prispevek pa mora imeti še Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed) in največ 5 ključnih besed v slovenskem in angleškem jeziku. Obvezni poglavji sta še Sklep in Literatura, takoj za povzetkom in ključnimi besedami pa naj bo še Kazalo vsebine. Besedilo (Times New Roman 12, razmik vrstice 1,5) naj bo obojestransko poravnano. Slike in preglednice morajo biti opremljene s pripadajočim besedilom v slovenskem in angleškem jeziku.

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

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

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

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

Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku), naslovi poglavij in podpoglavij naj bodo napisani krepko, vendar z malimi črkami (kakor v stavku).

V končni verziji morajo biti pod naslovom prispevka v slovenskem in angleškem jeziku napisana polna imena vseh avtorjev brez nazivov. Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni, je potrebno navesti ločeno na prvi strani. Elektronska in natisnjena verzija morata biti identični.

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

Prvi avtor prejme 10 separatnih kopij članka in en izvod Farmaceutskega vestnika brezplačno.