

Farmaceutski vestnik 1

Š T 1 . M A R E C 2 0 1 0 . L E T N I K 6 1

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA



Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovnica za prodajo zdravil z najširšo ponudbo izdelkov za humano in veterinarsko medicino v Sloveniji. Odlikujejo nas hitrost, varnost in zanesljivost. Svoje delo opravljamo srčno in predano. Prav zaradi tega nam zaupajo številne lekarnice in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

Zavedamo se, da nam prihodnost ponuja nešteto izzivov. Premagamo jih lahko z nenehnim izpopolnjevanjem. S kakovostnimi storitvami in s široko izbiro zdravil ter drugih izdelkov bomo zaupanje svojih kupcev opravičevali tudi v prihodnjem.

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si



Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 1 • M A R E C 2 0 1 0 • L E T N I K 6 1

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Petra Slanc Može

Uredniški odbor

Janja Marc

Lucija Peterlin Mašič

Alenka Rutar Pariš

Andrijana Tivadar

Jurij Trontelj

Matjaž Tuš

Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mirjana Gašperlin

Mojca Prah Klemenčič

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

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

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in:

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

UVODNIK

18. marca 2010 smo slovenske farmacevte in farmacevti zopet praznovali: Slovensko farmacevtsko društvo je prišlo v zrela leta. Kako je potekala proslava ob šestdesetletnici ustanovitve, si poglejte v Farmaceutskem vestniku.

Marca leta 2000 je Ameriško združenje javnih lekarn, skupaj z Ameriškim združenjem za klinično farmacijo izdalo strateško publikacijo s pomenljivim naslovom: »Bela knjiga o prihodnosti farmacije«. V publikaciji, ki je bila predstavljena širom po strokovnem svetu, opisujejo naslednje desetletje (torej od leta 2000 do leta 2010) kot prihodnost za premik farmacije od zdravila k bolniku, saj naj bi bil zaradi hitrega razvoja spremljajoče informacijske tehnologije in novih pristopov v farmaciji in medicini, farmacevt porinjen v ospredje oziroma postal komplementaren zdravniku. Edini pogoj, da bi to dosegli, je visoka usposobljenost farmacevtov, zato sta natančno pred desetimi leti obe združenji pozivali k skladnemu sistemu osnovnega in dodatnega izobraževanja farmacevtov. Končni cilj, ki so ga zapisali najuglednejši člani obeh združenj, naj bi bil visoko izobražen farmacevt, sposoben komplementarnega predpisovanja zdravil, na osnovi podane zdravnikove diagnoze. In kje smo danes, v svetu in Sloveniji? Kolegi v ZDA realno ugotavljajo, da so bili cilji pred desetletjem sicer dobro zastavljeni, a je deset let za dosego cilja prekratka doba. V Sloveniji pa ugotavljamo, da smo pri razvoju farmacije v povezavi z neposrednim stikom z bolnikom, še vedno v sekundarnem planu, pri čemer upada zaupanje bolnikov do farmacije, saj so priče neprestanih in novih afer. Kaj se mora spremeniti, da bomo dosegli vsaj prvo stopničko k končnem cilju? Žal se vedno bolj obnašamo po reku, ki je v zadnjem času zopet aktualen: »Vlada ostaja. Če ne moremo spremeniti vladarja, zamenjajmo ljudstvo«. Bomo torej zamenjali bolnike? Ali pa odgovorno pristopili k izgradnji visokostrokovnega farmacevta, ki bo imel dovolj kompetenc, časa in znanja za dosego ciljev »bele knjige«? Odločitev je v naših rokah.

V tekoči številki Farmaceutskega vestnika lahko preberemo članek o fotodinamičnem zdravljenju tumorjev z nastankom reaktivnih kisikovih radikalov, ki delujejo neposredno ali posredno na tumor. Temu sledita dva pripevka kolegov farmacevtskih tehnologov, in sicer o mikrobiološki kakovosti farmacevtskih izdelkov in o novem tehnološkem postopku pridobivanja kokristalov zdravilne učinkovine in ene od pomožnih snovi, ki omogočajo optimiranje fizikalnokemijskih lastnosti končnega zdravilnega pripravka. Kolegica Martina Hrast in izr.prof.dr. Aleš Obreza sta pripravila pregled vloge silicijevih spojin v živih organizmih, zadnji prispevek pa nas popelje v sodobno pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva, kar je gotovo eno od področij, ki zadevajo sodobno farmacijo in medicino.

*Prof.dr. Borut Štrukelj
Odgovorni urednik*

Vsebina

60. obletnica Slovenskega farmacevtskega društva

3

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Matija Rojnik, Janko Kos

Fotodinamično zdravljenje raka
Photodynamic therapy of cancer

9

Nina Kočevar, Maja Čemažar, Gregor Serša

Gensko zdravljenje raka
Cancer gene therapy

14

Meta Resnik, Janez Kerč

Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov
Microbiological quality of pharmaceutical products

23

Borut Kovačič, Odon Planinšek, Franc Vrečer

Kokristali zdravilnih učinkovin
Co-crystals of active pharmaceutical ingredients

30

Martina Hrast, Aleš Obreza

Vloga silicijevih spojin v živih organizmih
The role of silicon compounds in living organisms

37

Ariana Barlič, Krešimir Božikov

Matične celice iz maščobnega tkiva in njihova uporaba
Stem cells from adipose tissue and their use

42

60. obletnica Slovenskega farmacevtskega društva

Jelka Dolinar

Plečnikova dvorana Hotela Mons v Ljubljani je bila v četrtek, 18. marca 2010 zvečer premajhna za vse, ki so se želeli udeležiti praznovanja 60. obletnice Slovenskega farmacevtskega društva. Društvo je praznovalo ta jubilej v razcvetu pomladne svežine, meseca marca, tri dni pred koledarsko pomladjo. To ni naključje. Je simbol stroke, ki se izredno hitro razvija, da lahko pomaga človeku, h kateremu je usmerjena.

Ob jubilejih se spominjamo tistih, ki so najbolj zaznamovali nek čas, ki so zaslužni za razvoj in uspehe. Kot izraz spoštovanja in v zahvalo za dolgoletno sodelovanje je izvršni odbor Društva ob praznovanju jubileja poklonil članom koncert glasbene skupine EROIKA. Trije izjemni vokalisti, zbrani v tercetu Eroika Matjaž Robavs (bariton), Aljaž Farasin (tenor) in Metod Žunec (tenor) so klasično izobraženi in šolani pevci, ki so navdušili okoli 630 udeležencev praznovanja.



Zadnje desetletje zgodovine Društva so na prireditvi opisali predsedniki, ki so v tem obdobju vodili Slovensko farmacevtsko društvo (na sliki spodaj). Magistra Andreja Čufar je predstavila dejavnost društva v prvih letih tega desetletja, dr. Matjaž Jeras obdobje od 2003 do 2007, medtem ko se je dr. Gašper Marc dotaknil tudi prihodnosti. Njihove govore v celoti objavljamo.



Za sproščeno vzdušje je poskrbel voditelj praznovanja, gledališki igralec, Gašper Tič.



Strokovni interes na eni strani in družabni na drugi, so glavna motivacija, da člani ostajajo zvesti Društvu ali se odločijo za članstvo. Materialna podpora vseh farmacevtskih ustanov, ki so razumele ta interes, je omogočila delovanje in razvoj društva v preteklosti. Za razumevanje se vsem iskreno zahvaljujemo. Posebna zahvala pa gre vsem sponzorjem, ki so podprli slavnostno prireditev ob 60. obletnici:



član skupine Sandoz



Praznovanje 60-letnice so podprli tudi

Kemofarmacija, Salus, Bayer HealthCare, Berlin-Chemie, Medias Int., Pfizer, Farmadent, Grünenthal, Janssen-Cilag.

SFD od 2001 do 2003



Preselitev v lasne prostore

Slovenci smo znani po tem, da nismo radi najemniki, ampak si želimo imeti svoje lastno stanovanje ali hišo. Po statističnih podatkih tako v Sloveniji v primerjavi z drugimi evropskimi državami največji delež prebivalstva

živi v lastnih stanovanjskih kapacitetah. Ni torej čudno, da smo si farmacevti želeli imeti svoj lasten »dom« tudi za naše Društvo. 24 let je trajalo od ideje za nakup lastnih prostorov do njene realizacije. V tem desetletju Društvo prvič v svoji zgodovini deluje v lastnih prostorih. Materialno osnovo, ki je omogočila nakup, je Društvo ustvarilo s svojimi projekti. Pomemben delež, ki je zlasti omogočil dokončanje projekta, pa smo prispevali člani Društva z donacijami. Prostovoljno smo prispevali 3,4 % vrednosti prostorov. Največji med donatorji je bil pokojni prof. Dušan Karba, prvi in dolgoletni predsednik SFD, ki je tudi prerezal trak ob otvoritvi novih prostorov, 1. oktobra 2001. Z novimi prostori so se pogoji za delo Društva bistveno izboljšali.

Mednarodna dejavnost

SFD je danes mednarodno prepoznavna strokovna organizacija, zlasti na področju farmacevtskih znanosti, kjer delovanje poteka v tesnem sodelovanju s Fakulteto za farmacijo. Vpetost v mednarodno okolje omogoča številnim strokovnjakom, da predstavijo svoje dosežke mednarodni strokovni javnosti, izboljša se izmenjava mnenj in pretok informacij, na ta način pa se je vzpostavilo tudi sodelovanje z uveljavljenimi raziskovalnimi ustanovami iz tujine.

Mejnik v organizaciji društvenih strokovnih prireditvev predstavlja mednarodna konferenca Evropskega društva kliničnih farmacevtov o farmacevtski skrbi za bolnike po odpustu iz bolnišnice, ki jo je SFD organiziralo maja 2002 pod vodstvom prof. dr. Stanislava Primožiča in z veliko podporo prof. dr. Franca Kozjeka. Z organizacijskega vidika je bila konferenca izjemno zahtevna. Tistega leta je društvo vse ostale aktivnosti podredilo organizaciji te konference. Celo tradicionalni majski simpozij se je leta 2002 preselil v jesenski čas na Pohorje. Pridobljene izkušnje pa so bile zelo dragocene in so v celoti odtehtale vložene napore. Konferenca je tudi spodbudila organizacijo učnih delavnic, prvič že jeseni istega leta v sklopu simpozija o protokolih za samozdravljenje.

Nasploh je bil začetek tega tisočletja za mednarodno dejavnost društva zelo pomemben. Poleg prej omenjene konference je maja 2003 v Portorožu potekal še kongres Evropskega združenja študentov farmacije – EPSA; septembra 2003 v Ljubljani pa pod okriljem Evropske federacije farmacevtskih znanosti – EUFEPS 5. Centralnoevropski simpozij iz farmacevtske tehnologije in biotehnologije, katerega pripravo je vodil prof. dr. Aleš Mrhar.

Založništvo in promocija stroke

Neprekinjeno, že 61. leto izdaja Društvo svoje glasilo Farmaceutski vestnik, ki ga prejemajo vsi člani društva. Od leta 1998 skrbi za vsebino odgovorni urednik prof. dr. Borut Štrukelj.

Samozdravljenje je eno izmed področji, na katerih farmacevti lahko zelo suvereno nastopamo in je kot tako izrednega pomena tudi za promocijo poklica farmacevta. Ta pomen je prepoznalo tudi SFD, ki je spomladi 2001 na Brdu pri Kranju organiziralo posvet o samozdravljenju. Ob tem velja posebej izpostaviti zbornik, ki so ga ob posvetu pripravili farmacevti in v katerem je predstavljena celotna simptomatika, za katero je takratna zakonodaja predvidela možnost samozdravljenja. Leto kasneje so bili na simpoziju ob redni letni skupščini predstavljeni in objavljeni v Farmaceutskem vestniku protokoli za samozdravljenje nekaterih simptomov, ki jih je kasneje verificirala tudi Lekarniška zbornica Slovenije.

Področje zakonodaje

Po dolgih in v javnosti zelo odmevnih razpravah, je državni zbor junija 2003 končno potrdil Pravilnik o razvrščanju, predpisovanju in izdajanju zdravil za uporabo v humani medicini, ki je po zaslugi uspešnega lobiranja lekarniških farmacevtov na čelu z LZS, vpeljal določilo o zamenljivih zdravilih.

Družabni dogodki

Poseben pečat dajejo Društvo družabni dogodki. Veliko jih organizirajo podružnice. Leta 1996 je Mariborska podružnica prvič organizirala FarmaSki, leto pozneje je Celjska podružnica pripravila teniški turnir, iz katerega so se kasneje razvile športne igre. Zelo razgiban družabni program realizira seniorska sekcija, sledi ji sekcija farmacevtskih tehnikov, nekaj družabnega programa je vključeno v programe strokovnih srečanj SFD.

Eden izmed družabnih dogodkov, pomembnih za celotno društvo, je bil farmacevtski ples. Ta je leta 2001 potekal v Celju in leta 2004 v Ljubljani, kasneje pa je ta družabna dejavnost Društva zamrla. Kdo ve, zakaj? Morda pa se farmacevti raje udeležujemo tistih plesov, na katerih drugi plešejo tako, kot mi godelmo!?

Asist. mag. Andreja Čufar, mag. farm. spec.

Rosnih šestdeset let SFD - obdobje od 2003 do 2007

Drage kolegice in kolegi, spoštovani gostje!

Obstoj in delovanje SFD sta, ne glede na letnico, ki jo danes obeležujemo nekako brezčasna, v vsakem časovnem preseku mlada, polna življenske energije, usmerjena v prihodnost na temelju dosežkov in izkušenj preteklosti ter seveda ključno in usodno odvisna od aktivnosti njegovih članov. Društvo omogoča kar najširše združevanje interesov, in sicer znotraj posameznih podružnic, ki delujejo regionalno, kot tudi v obliki različnih strokovno profiliranih sekcij. Člani SFD zastopajo celo paleto strokovnih in poslovnih aktivnosti farmacevtov, kar je izjemno bogastvo naše stroke. Ta širina je posledica interdisciplinarnosti pridobljenega znanja, tako tistega v okviru zahtevnega in visoko kakovostnega študija kakor tudi tistega, ki ga pridobimo kasneje, ko delujemo in se strokovno uveljavljamo ter kalimo na najrazličnejših delovnih mestih. S tem, ko se člani SFD izkazujemo na zelo različnih področjih, se krepija prepoznavnost in ugled farmacevtov kot pomembnih zdravstvenih delavcev, uglednih strokovnjakov, razvojnikov in znanstvenikov ter nenazadnje tudi uspešnih menedžerjev. Stroka, ki je sposobna pokrivati tako široka in raznolika področja je živa, propulzivna, optimistična, ponosna na dosežke preteklosti in sedanjosti, obenem pa tudi kritična do zamujenih in ne v celoti doseženih ciljev ter trdno usmerjena v prihodnost, z vsemi izzivi, ki jih ta prinaša. Danes smo se zbrali tukaj zato, da še enkrat več obeležimo te vrednote in izrazimo našo neomajno zavezo, da bomo s skupnimi močmi tudi vnaprej skrbeli zanje.

Imel sem čast, da sem bil na čelu SFD dva mandata, in sicer od leta 2003 do leta 2007. S tem sem prevzel dosežke in usmeritve svojih uglednih predhodnikov, poleg tega pa tudi veliko odgovornost. Zame je bila to izjemna osebna izkušnja, ki me je še bolj zavezala stroki in me povezala s številnimi kolegicami in kolegi, s katerimi še naprej gojim in razvijam pristne prijateljske in strokovne vezi. Prav je, da ob tej slavnostni priložnosti izpostavim nekaj najpomembnejših mejnikov in dosežkov, ki smo jih v tem obdobju dosegli skupaj:

Tako smo leta 2004 poskrbeli za zunanjo revizijo poslovanja SFD in skladno z izsledki spremenili in dopolnili vse društvene akte.

Leta 2003 je Sekcija farmacevtov javnih lekarn pričela z izvajanjem svojih rednih letnih simpozijev, dve leti kasneje pa ob tem organizirala

še Dan lekarn, in sicer septembra, takrat, ko godujeta zavetnika zdravstva, Sv. Kozma in Damijan. Dan lekarn je postal tradicionalen, zelo prepoznaven in odmeven dogodek v širši javnosti, ki ga vedno spremlja tudi priprava poljudnih strokovnih brošur z aktualnimi vsebinami. Kot tak predstavlja izjemno priložnost za promocijo naše stroke.

Pomemben mejnik predstavlja ustanovitev Farmacevtskega informacijskega centra (FIC), ki sega v leto 2005. Gre za obsežen in zahteven projekt, ki poleg nudenja vrhunskih strokovnih informacij in obveščanja o novostih, ponuja tudi možnost izmenjave mnenj in izkušenj, seveda vse v elektronski obliki.

Glede na to, da je med ustaljenimi družabnimi prireditvami nekako ugasnil interes za farmacevtski ples, smo se leta 2004 odločili za organizacijo nove oblike druženja – martinovanja, kar je bilo med člani društva izjemno dobro sprejeto.

Seveda bi lahko z naštevanjem dosežkov na številnih področjih delovanja SFD, od organizacije in izvedbe domačih in mednarodnih strokovnih in znanstvenih prireditev, periodičnega in drugega založništva, delovanja podružnic in sekcij ter družabnih in športnih prireditev, nadaljeval, vendar pa bi za to potreboval veliko preveč časa. Ob tem se moram iskreno zahvaliti vsem tistim prizadevnim kolegicam in kolegom, članicam in članom SFD, ki ste vložili svoj dragoceni prosti čas in trud za to, da smo lahko uresničili tako številne in raznolike naloge. Tega pa prav gotovo ne bi zmogli brez generalne sekretarke SFD, Jelke Dolinar, mag. farm., ki s svojo izjemno skrbnostjo, natančnostjo, strokovnostjo, organizacijskimi sposobnostmi, predvsem pa z neizčrpano energijo skrbi za to, da smo pri načrtovanju in izvedbi projektov tako zelo uspešni.

Za zaključek pa samo še nekaj misli. Imamo res veliko srečo, da lahko opravljamo tako plemenit poklic. Bodimo ponosni nanj, aktivni, kritični, a tudi optimistični, predvsem pa povezani in enotni.

Vsem iskreno želim, da bi današnji dogodek izkoristili za prijateljsko druženje, izmenjavo izkušenj in načrtovanje novih podvigov.

Zahvaljujem se vam za vašo pozornost.

doc.dr. Matjaž Jeras, mag.farm.



Praznovanja se je udeležila večina nekdanjih predsednikov Društva. Na sliki nekateri od njih (z leve): Roman Dobrovoljc, Tajda Gala Miharija, Franc Kozjek, Danica Ilc, Stanislav Primožič, Matjaž Jeras, generalna sekretarka SFD Jelka Dolinar, Franc Vrečer, Ivanka Morosini, Jože Gorenc.

Rosnih šestdeset let SFD - obdobje od 2007 do danes



Drage kolegice, dragi kolegi!

Vesel in ponosen in ganjen sem, da vas lahko nagovorim ob tej svečani priložnosti. Ganjen, ker ste se tako prijazno odzvali vabilu v tako velikem številu – mislim, da še nihče od mojih predhodnikov ni imel priložnosti, da bi spregovoril tako številni občinstvu. Ta močan odziv najlepše ilustrira mesto, ki ga ima društvo v naši

stroki in pove več kot katerekoli besede. Ponosen sem, ker sem na čelu tako močne in razvejane organizacije, ki so jo oblikovali in zaznamovali ljudje, ki so znali prisluhniti duhu časa in prepoznati razvojne možnosti.

Moja predhodnika v društvu in tule na odru, mag. Čufarjeva in dr. Jeras sta na zanimiv način predstavila dogodke, ki so v zadnjem desetletju društvo najbolj zaznamovali. Sam sem, kot aktualni predsednik v nekoliko drugačnem položaju. Aktivni predsednik je tisti, ki se ukvarja s tekočim delovanjem in načrti za prihodnost. Pa kljub temu bi se ob taki priložnosti kot je nočoj, za kratek čas ozrl tudi v preteklost.

Moje predhodnice in predhodniki so opravili veliko delo! Občudujem njihovo vztrajnost in prizadevnost, ko so marsikaj ustvarili iz nič, ko so delovali v razmerah, ki so bile mnogo slabše, kot pa jih imamo mi danes, pa so morali pogosto in prepogosto dokazovati in prepričevati, da ta družba potrebuje kvalitetno lekarništvo, da je v tej družbi potrebno spodbujati razvoj farmacevtske industrije, predvsem pa, da je nujno razvijati šolo, ki bo omogočala razvoj stroke. Zato gresta nočoj moja zahvala in spoštovanje vsem tistim, ki so in ki ste društvo v vseh teh dolgih letih gradili in nam zapustili ne le bogato dediščino, pač pa tudi na široko odprta vrata v prihodnost!

Danes postavlja čas pred nas povsem drugačne izzive: močni smo, uspešni in perspektivni. Kdo v tej državi piše zgodbe o uspehu, če ne farmacija in kje lahko vidimo prihodnost, če ne na področju zdravja? Kljub globalizacijskim spremembam, izrazito nenaklonjenim manjšim in politično manj pomembnim okoljem - kar žal Slovenija je - imamo uspešno in napredno farmacevtsko industrijo, ki se je učinkovito izognila pred časom modni črnobeli poenostavitvi na inovativni in generični del; imamo učinkovito verigo veleddrogerij in ne enim, ne drugim v zadnjih dvajsetih letih res ni bilo prihranjenega nič od tega, kar je bistveno spremenilo podobo naše države, pa tudi svetovnega gospodarstva. Imamo razvejano in razvito lekarniško mrežo, ki kljub nekaterim težavam in nerešenim vprašanjem odlično opravlja svoje poslanstvo - bolje kot v številnih razvitih državah.

Seveda nam marsikaj, kar se dogaja v naši družbi, ni všeč. Še več, veliko je dogodkov, ki nam povzročajo skrb. Vendar po drugi strani prav to dokazuje pomembnost naše stroke. Uspešnost prinaša s seboj tudi večjo izpostavljenost in na področju farmacije se bodo v prihodnosti stikali zelo različni interesi in kresala zelo različna mnenja. Živimo v svetu, ki se spreminja hitreje kot kdajkoli prej. Pa ne le po tehnološki plati, napredek farmacije in medicine močno spreminja družbo, njeno strukturo in življenski slog ljudi. Skrb za zdravje, bolezen in zdravljenje postajajo javna zadeva in eden izmed najbolj izraženih interesov. Družba

pričakuje, da bo farmacija v klinično prakso vpeljala nova in uspešnejša zdravila. Farmacevti pa dobro vemo, da družba potrebuje še mnogo več. Skrb za zdravje in zdravljenje se razvijata v zelo kompleksen proces, ki zahteva sodelovanje številnih strokovnjakov, predvsem pa sodelovanje bolnika. Še nikoli ni bila uspešnost zdravljenja tako zelo odvisna od sodelovanja bolnika, za kar pa potrebuje obsežno in kvalitetno podporo. Na tem področju je vloga lekarniškega farmacevta nezamenljiva! Lekarna je tista ključna točka, kjer sistem stoji ali pade. Lekarna je mesto, kjer se srečujejo gospodarstvo, ekonomski interesi in javna služba. Zato je ključni element kvalitetnega sistema, ki lahko zadosti potrebam uporabnikov, strokovna neodvisnost lekarniškega farmacevta. Čeprav jo vsi ves čas poudarjamo in se z njo strinjajo tudi vsi deležniki, pa kljub temu ni samoumevna. To je področje, ki zahteva stalno angažiranost, stalno poudarjanje, transparentnost in glasnost. Prav to pa so ključne usmeritve našega društva. Če smo bili v preteklosti predvsem strokovna organizacija, postajamo v vse večji meri institut civilne družbe. Obračamo se navzven, odpiramo se k drugim strokam in tudi k splošni javnosti.

Postajamo torej družbena organizacija, ki deluje v interesu tistih, ki zdravstvene storitve potrebujejo. S svojim znanjem, s svojo sposobnostjo in zmoglostjo njihova pričakovanja in potrebe vsekakor lahko izpolnimo. Prav znanje in smelost, da ga uporabimo, sta tista elementa, ki ju moramo najbolj negovati. Na začetku tega prispevka sem omenil, da sem vesel in ponosen. Ponosen na preteklost in opravljeno delo, vesel pa prihodnosti. Vesel sem, ker lahko delujem na področju, ki ne le, da družbi veliko daje, ampak tudi veliko obeta v prihodnje! Lepo je delovati v stroki, ki je kljub tisočletni tradiciji tako mlada! In zahvala za mladost, smelost, odločnost gre v veliki meri šoli, ki jo imamo, Fakulteti za farmacijo. Le-ta se razvija v eno najuspešnejših članic Univerze in se hitro približuje skupini najkvalitetnejših evropskih farmacevtskih šol. Visoko jo ocenjujejo študenti in, kar je najpomembnejše, farmacija je postal študij izbora v skupini najuspešnejših dijakov, ki lahko izpolnijo vpisne pogoje. V srednjih šolah velja, da je študij namenjen sposobnim, ambicioznim in delavnim dijakom. Kar je tudi najtrdnjša garancija za bodočnost naše stroke!

Na poti, ki nas čaka v prihodnosti, so številne prepreke. Moje prepričanje je, da to niso problemi, pač pa izzivi, ki jih pred nas postavlja razvoj. Pogosto se postavlja vprašanje, kje so meje naše dejavnosti. Pred časom so mi ga zastavili tudi študenti, zanimala jih je njihova bodočnost v stroki. Ni meja, izzivov nam ne bo zmanjkalo in prepričan sem, da mladih kolegic in kolegov, ki so se z njimi pripravljene spoprijeti, tudi ne! Prav gotovo bodo moji nasledniki čez desetletja, ob podobnih priložnostih kot je ta nočoj, to lahko samo potrdili.

Je pa društvo namenjeno tudi sistemu najzlahotnejšemu, kar pomeni ta beseda: druženju! In naj bo nočojšnji večer namenjen prevsem temu, ki nas še posebej bogati. Veseli me, da nam ga ob vseh strokovnih vprašanjih in raznolikosti uspe ohranjati in naj bo to tudi eden od izzivov v prihodnje!

Omenjal sem glasnost, kot eno izmed naših vodil v bodočnosti. Zato se mi zdi lepo, da je tudi ta večer v znamenju - ne toliko strokovne glasnosti, kot ubranih glasov. Zato prepuščam oter tistim, ki imajo veliko bolj blago zvoneče glasove kot jaz, vam pa zaželim prijeten večer!

Dr. Gašper Marc, mag. farm.



Roman Dobrovoljc, predsednik SFD v obdobju 1981-1983 in Franc Kozjek, predsednik SFD v obdobju 1969-71 in 1977-79.



Najbolj ugledni udeleženci praznovanja prorektorica Univerze v Ljubljani, Julijana Kristl, generalni direktor Krke, Jože Colarič, ki je častni član Slovenskega farmacevtskega društva ter dekan Fakultete za farmacijo Stanko Gobec.



Tajda Gala Miharija, predsednica v obdobju 1995-97, ki jo v nasledil Franc Vrečer.



Kolektiv SFD, vodja pisarne Natalija Gerbič in generalna sekretarka Jelka Dolinar v družbi s predsednikom SFD.



Dolgoletni glavni urednik Farmacevtskega vestnika Aleš Krbavčič v pogovoru s Tanjo Zorec.



Direktor podjetja Medis Tone Strnad in direktorica sektorja za zdravila Martina Brank.



Danica Ilc (v sredini), predsednica SFD v letih 1989-1991 v družbi s člani Gorenjske podružnice – Franc Kozjek, Stanislav Primožič, Breda Kosirnik, in direktorica Gorenjskih lekarn Romana Rakovec.



Člani Pomurske podružnice so se na praznovanje pripeljali skupaj z avtobusom. V Monsu so se srečali s Pomurci iz Ljubljane, dekanom Fakultete za farmacijo in farmacevtsko inšpektorico Andrijano Tivadar.



Predsednik uprave Leka Vojmir Urlep v pogovoru s prorektorico Univerze v Ljubljani Julijano Kristl in direktorjem Kemofarmacije Davorinom Pohercem



Praznovanja povežejo farmacevte javnih lekarn, bolnišnične farmacevte in zasebnike.



Veselo razpoloženje v avli, Samo Kreft, Matjaž Tuš in predsednik Zdravniškega društva Maribor.



Miha Lavrič in Bojan Bitenc iz Salusa.

Fotodinamično zdravljenje raka

Photodynamic therapy of cancer

Matija Rojnik, Janko Kos

Povzetek: Fotodinamično zdravljenje (FDZ) je način zdravljenja, pri katerem uporabljamo vidno ali bližnjo IR svetlobo, s katero aktiviramo fotoobčutljivo spojino (FS) ob prisotnosti kisika. S FDZ zdravimo različne bolezni, tudi rak. Kombinacija FS, vidne svetlobe in kisika povzroči nastanek citotoksičnih reaktivnih kisikovih vrst, ki neposredno ali posredno delujejo na tumor. Po dodatku FS obsevamo obolelo mesto s svetlobo, praviloma z valovno dolžino nad 600 nm. Zaradi omejene globine prodiranja svetlobe je FDZ najbolj primerna za zdravljenje kožnih tumorjev, medtem ko je zdravljenje drugih vrst raka odvisno od uporabe optičnih vlaken, s katerimi lahko obsevamo notranje tumorje. Selektivno kopičenje FS v tumorskih celicah dosežemo z vezavo specifičnih ligandov, kot so protitelesa, na FS ali pa na dostavne sisteme, v katere predhodno vgradimo FS.

Ključne besede: fotodinamično zdravljenje, fotoobčutljive spojine, rak, dostavni sistemi

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is a treatment using visible or near IR light for activation of the photosensitizer in the presence of oxygen. It is used in therapy of various diseases including cancer. In PDT a combination of a photosensitising drug, visible light and oxygen causes a production of cytotoxic reactive oxygen species that have direct or indirect effect on tumour tissue. After administration of a photosensitizer we expose the diseased tissue to a light usually of a wavelength above 600 nm. Due to the low penetration of the light with this wavelength, PDT is appropriate for the therapy of skin tumours, while the therapy of other tumours depends on the optic fibres used for light delivery. Selective concentration of photosensitizers in tumour cells can be achieved by coupling of ligands, such as antibodies on the photosensitiser or on specific delivery systems loaded by the photosensitizer.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizer, cancer, delivery systems

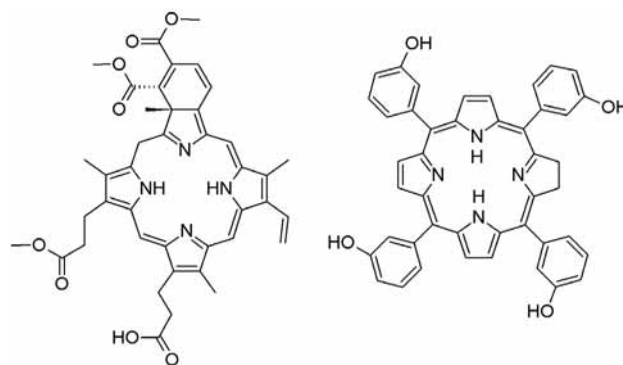
1 Uvod

V začetku 20. stoletja so za zdravljenje raka prvič začeli uporabljati spojine, ki ob obsevanju s svetlobo primernih valovnih dolžin povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih vrst, kar ima toksične učinke na tumorsko tkivo. Temu pravimo fotodinamično zdravljenje (FDZ) in danes predstavlja uveljavljeno metodo zdravljenja rakavih in drugih obolenj.

FDZ se je v zadnjih treh desetletjih izkazalo kot učinkovito pri zdravljenju zgodnjih stopenj pljučnega raka, raka požiralnika, raka mehurja, raka vratu in glave, najbolj primerno pa je za zdravljenje kožnega raka. FDZ lahko uporabljamo tudi pri zdravljenju nekaterih boleznih oči, kože in na mestih, kjer poteka lokalno vnetje (revmatoidni artritis) ali okužba (dentalne okužbe) (1,2).

Prvo zdravilo, ki je bilo leta 1993 registrirano s strani Ameriške agencije za hrano in zdravila za uporabo v FDZ, je bil natrijev porfimer, ki se uporablja za zdravljenje raka mehurja in je trenutno najbolj uporabljena FS. Vendar je ta spojina slabo selektivna za rakavo tkivo in ima zaradi dolgega zadrževanja v organizmu pogoste neželene učinke, predvsem občutljivost kože na svetlobo. Druga generacija FS, katere predstavnik je verteporfin (slika 1), ima izboljšano selektivnost za rakavo tkivo in se hitreje izloča. Poleg omenjenih so danes v klinični uporabi še natrijev porfimer za zdravljenje pljučnega raka in različnih

rakov prebavnega trakta, temoporfin (slika 1), ki ima v Evropski uniji in na Japonskem dovoljenje za promet pri zdravljenju raka glave in vratu, idr. Za zdravljenje kožnih bolezni se uporablja aminolevulinska kislina (ALK), katere mehanizem delovanja se razlikuje od ostalih FS in bo predstavljen v nadaljevanju. Trenutno po svetu poteka preko 200 kliničnih raziskav, ki vključujejo uporabo FDZ (1, 2, 4).



Slika 1: FS z dovoljenjem za promet v Evropski uniji: verteporfin (levo) in temoporfin (desno) (3).

Figure 1: Photosensitizers with marketing authorisation in European Union: verteporfin (left) and temoporfin (right) (3).

2 Mehanizem delovanja

Fotodinamična aktivnost FS je osnovana na fotooksidativnih reakcijah, ki izzovejo biokemijske in morfološke reakcije v tarčnih tkivih. FS najprej vnesemo, ponavadi intravensko, v primerni formulaciji. Po določenem času, ko se spojina nakopiči v tarčnem tkivu, sledi obsevanje obolelega tkiva z lasersko svetlobo primernih valovnih dolžin. Fotoobčutljive spojine, ki so danes v uporabi, ponavadi obsevamo s svetlobo valovnih dolžin nad 600 nm. FS absorbira svetlobo in preide v vzbujeno stanje, v katerem povzroči tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti preko prenosa elektronov ali energije, pri čemer nastanejo radikali in superoksidi ali pa singletni kisik. Slednji naj bi bil odgovoren za večino citotoksičnih učinkov, ki izhajajo iz FDZ (5, 6).

Odziv na FDZ je odvisen od uporabljene FS, farmacevtske formulacije, pogojev obsevanja, oksigenacije tkiva in od tipa celic. Singletni kisik deluje na zelo kratkih razdaljah, zato je lokalizacija FS v tkivih in celicah ključnega pomena za uspešno zdravljenje. FS so zelo hidrofobne, zato se ponavadi nalagajo v organelih z membranami (mitohondriji, lizosomi, Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum), kjer pride do primarne poškodbe. Celice se odzovejo s spremembo izražanja proteinov, začno proizvajati stresne proteine, da bi omejile škodo, če pa so poškodbe preobsežne, pride do apoptoze ali nekroze celic. Lokalizacija FS v mitohondrijih in endoplazemskem retikulumu ponavadi vodi v apoptozo, medtem ko lokalizacija v plazemski membrani ali lizosomih zavira oziroma prepreči apoptozo.

Na tkivnem nivoju obstajata dva mehanizma uničenja tumorja (slika 2):

- *posredni*, kjer pride do poškodb tumorskega žilja in medceličnega matriksa, kar vodi v hipoksijo, ki je razlog za smrt tumorskih celic;
- *neposredni*, kjer pride do delovanja FS v samih tumorskih celicah.

Po poškodbi žilja v tumorsko tkivo vdrejo limfociti, makrofagi in druge celice imunskega sistema, ki sprožijo vnetje, to pa lahko pripomore k dolgoročni uspešnosti FDZ (7, 8).

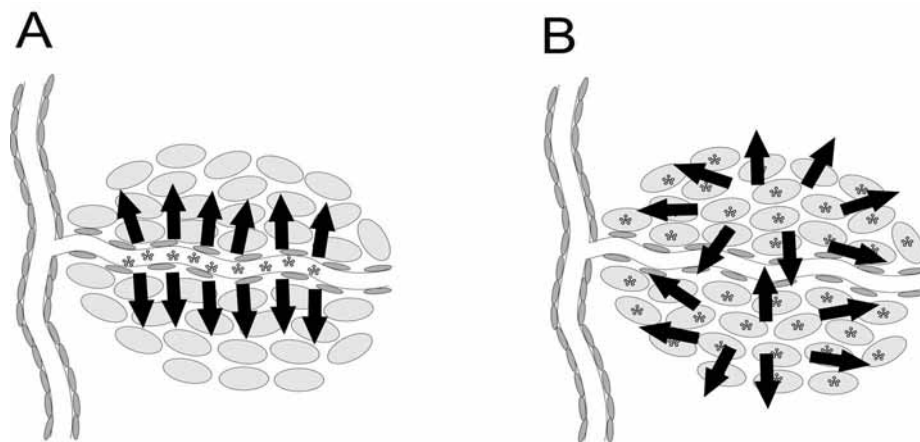
S fluorescenčno mikroskopijo je bil verteporfin lokaliziran v tumorskem žilju po 15 minutah, v tumorskih celicah pa šele po treh urah po vnosu, kar bi lahko izkoristili za načrtno uničenje posamzenih delov tumorja.

Učinkovitost zdravljenja lahko povečamo, če hkrati s FDZ izvajamo še dodatno zdravljenje, ki zmanjša neželene učinke ali pa ustvari pogoje, v katerih je tumor bolj dovzeten za FDZ. Pomembna spremljevalka FDZ je hipoksija, ki nastane zaradi povečane porabe kisika in zaradi poškodb tumorskega ožilja. Hipoksija je eden glavnih spodbujajočih dejavnikov za angiogenezo, ki jo narekuje žilni endotelijski rastni dejavnik. V več raziskavah je bilo odkrito povečano izločanje žilnega endotelijskega rastnega dejavnika po FDZ, s čimer so raziskovalci povezovali tvorjenje metastaz in posledično slabši rezultat zdravljenja. V eni od raziskav je bil živalim takoj po FDZ dan inhibitor žilnega endotelijskega rastnega dejavnika, kar je imelo za posledico bolj učinkovito FDZ, poleg tega pa se je zmanjšalo tudi število metastaz.

Pred nekaj leti je bila odkrita povezava med povečano celično diferenciacijo in učinkovitostjo FDZ. Značilno za tumorske celice je da bolj proliferirajo, so pa manj diferencirane. Z dodatkom učinkovin kot sta vitamin D in metotreksat, vzpodbudimo diferenciacijo v tumorskih celicah, kar ima za posledico povečanje njihove dovzetnosti za protitumorsko zdravljenje. Pokazalo se je, da vnos metotreksata pred dodatkom FS poveča kopičenje le-te v tumorskih celicah, poleg tega pa tudi izniči efekt povečanega števila metastaz zaradi izločanja žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (1).

FS imajo več absorpcijskih vrhov, njihova pomembna lastnost pa je lastna fluorescenca. Ta lastnost je pomembna za diagnostiko, saj lahko s FS ne le zdravimo, ampak s posebnimi kamerami tudi zaznamo tumorsko tkivo, če se spojina specifično kopiči v tumorskih celicah. Takemu načinu diagnosticiranja pravimo fotodinamična diagnostika (FDD). Veliko kliničnih raziskav z uporabo FDD je bilo opravljenih na bolnikih z rakom mehurja. Po intravezikalnem vnosu ALK ali njenega heksilnega estra se v tumorjih mehurja specifično poveča tvorba protoporfirina IX (PpIX), ki ga je mogoče zaznati s fluorescenčno endoskopijo. V kliničnih raziskavah je bilo pokazano, da je FDD veliko bolj občutljiva v primerjavi s trenutno uveljavljenimi metodami za odkrivanje tumorjev mehurja (9, 10).

V preglednici 1 so prikazane spojine, ki se že uporabljajo v FDT ali pa jih preiskujejo v kliničnih študijah. Spojine, ki so odebline, so registrirane s strani Ameriške agencije za hrano in zdravila ali Evropske agencije za zdravila za uporabo v Združenih državah Amerike oz. članicah Evropske unije (3, 11, 12).



Slika 2: Posredno (A) in neposredno (B) delovanje FDZ na tumor.

Figure 2: Indirect (A) and direct (B) effect of PDT on tumour tissue.

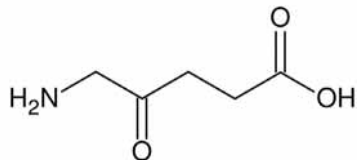
Preglednica 1: Spojine, ki se uporabljajo v klinični praksi oz. v kliničnih raziskavah za FDZ (3, 11, 12).

Table 1: Compounds used in clinical practice and clinical trials for PDT (3, 11, 12).

Spojina	Uporaba
5-aminolevulinska kislina	karcinom bazalnih celic, aktinska keratoza
Metilaminolevulinska kislina	karcinom bazalnih celic, aktinska keratoza
Metoksalen	luskavica
Natrijev porfimer	rak pljuči in požiralnika
Natrijev talaporfin	kolorektalni rak in rak jeter
Lutecijev moteksafin	rak prostate, neoplazme materničnega vratu
Silicijev ftalocianin	kožni rak, rak vratu in glave, rak dojke
Temoporfin	rak glave in vratu
Verteporfin	mokra oblika starostne okvare rumene pege, bolezenska kratkovidnost

3 FS za topikalno uporabo

Za topikalno uporabo se danes uporabljata predvsem ALK (slika 3) in metilni ester ALK. FDZ na osnovi ALK se uspešno uporablja v zdravljenju aken, bazalnega celičnega karcinoma, Bownove bolezni, Pagetove bolezni, idr.



Slika 3: Aminolevulinska kislina (13).

Figure 3: Aminolevulinic acid (13).

ALK je vodotopna molekula in je izhodna spojina v sintezi hema. ALK je predzdravilo, njen vnos povzroči povečano sintezo endogene fotoobčutljive spojine PpIX v celicah. Zaradi omejene kapacitete encima ferohelataze, ki pretvarja PpIX v hem, se ta spojina kopiči v celicah, kar izkoriščamo v FDZ. Kopičenje ALK je povečano v tumorskih celicah, kar zmanjšuje neželene starnske učinke pri FDZ (6, 14, 15).

ALK je majhna molekula, zato prehajanje v kožno tkivo iz topikalnih dostavnih sistemov ni problematično. Omejitev je njena hidrofilna narava, kar sicer omejuje prehodnost skozi zdravo kožo, so pa epiteljske bariere, ki pokrivajo neoplazme, bolj dovzetne za prehod ALK, kar še poveča njeno selektivnost. Iz omenjenega lahko razberemo, da je ALK zelo učinkovita za zdravljenje površinskih kožnih obolenj, vendar pa njena hidrofilnost preprečuje prodiranje v globlje tkivo. ALK je vgrajena v poltrdne farmacevtske oblike, kot so mazila, kreme in geli. V zadnjem času pa so v razvoju novi dostavni sistemi, ki bi povečali prodiranje ALK v globlje plasti kože. Najpreprostejša rešitev je sprememba same spojine z lipofilnimi komponentami (npr. zaestrenje karboksilne skupine) in pa dodatek pospeševalcev prodiranja (DMSO). ALK se lahko vnaša tudi z obliži in

bioadhezivnimi geli, za povečan vnos pa se uporabljajo tudi številne fizikalne metode kot so iontoforeza in sonoforeza. Ti dostavni sistemi, zaenkrat niso izpolnili velikih pričakovanj, nekatere pa je potrebno še preizkusiti v kliničnih študijah. Razvoj je na tem področju zelo zaželen, saj je FDZ idealna metoda za zdravljenje raznih kožnih bolezni (14).

4 FDZ s sistemskim vnosom FS

Pri FDZ s sistemskim vnosom FS je potreben razvoj dostavnih sistemov, ki selektivno ciljajo tumorske celice, saj bi le tako lahko zmanjšali neželene učinke takega zdravljenja. Napredek pri razvoju FDZ s sistemskim vnosom FS je pogojen tudi z napredkom v laserski tehnologiji, ki je ključni del FDZ. Vidna svetloba namreč prodre le nekaj milimetrov v samo tkivo, tako da od zunaj ne moremo aktivirati FS, ki se nahajajo globlje v telesu. Rešitev ponujajo optična vlakna, s katerimi lahko vnesemo lasersko svetlobo na notranje tumorje.

4.1 Konjugati s FS

Po sistemskem vnosu se večina FS veže na proteine v plazmi, npr. albumin in lipoproteine. Zaradi povečane proliferacije tumorjev imajo tumorske celice na površini več receptorjev za lipoproteine v primerjavi z normalnimi, kar vodi do kopičenja FS, vezane na lipoproteine, v tumorskih celicah. Tumorske celice imajo večje energetske potrebe, zato izražajo tudi večje količine prenašalcev za monosaharide. S kovalentno vezavo FS na monosaharide dosežemo selektivno kopičenje spojine v tumorskih celicah, hkrati pa povečamo topnost spojine v vodnih medijih.

Peptidni ligandi so majhne molekule, ki jih je relativno lahko sintetizirati in imajo lahko veliko vezavno afiniteto za specifičen receptor. S konjugatom FS in peptida, ki ima afiniteto do receptorja, izraženega predvsem na tumorskih celicah, lahko ciljamo tumorske celice, teoretično pa bi lahko ciljali celo posamezen del celice (npr. mitohondrije), kar bi še dodatno pripomoglo k selektivnosti FDZ. Take konjugate ponavadi tvorimo med amino skupino peptida in karboksilno skupino FS, tako da nastane amidna vez. Ti konjugati imajo podobne lastnosti kot sama spojina, vendar je lahko tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti nekoliko zmanjšana. Podobno kot konjugati s saharidi so tudi ti konjugati bolj topni v vodnih medijih kot sama FS.

Za povečanje specifičnosti zdravljenja lahko FS konjugiramo tudi s proteini. Ti proteini so lahko ligandi, ki se vežejo na celične receptorje, za katere je znano, da se bolj izražajo na površini tumorskih celic, ali pa monoklonska protitelesa proti tem receptorjem. Kovalentna vezava proteinov z FS je lahko težavna, saj mora biti ohranjena njihova nativna struktura, kar pomeni, da morajo reakcije potekati pri milih pogojih. Konjugacija ponavadi poteka preko amino skupin lizinskih ali argininskih ostankov in karboksilne skupine na FS. Vezava večjega števila molekul FS na eno molekulo proteina lahko zakrije mesto vezave na receptor, kovalentna vez pa lahko povzroči spremembo strukture proteina, kar zmanjša biološko aktivnost. To lahko izboljšamo z uporabo distančnikov (npr. dekstrana), ki jih vgradimo med protein in FS. Na tak način lahko na eno molekulo proteina vežemo več molekul FS in s tem povečamo koncentracijo FS na mestu delovanja.

FS lahko konjugiramo tudi z različnimi večjimi molekulami. Taki konjugati izkoriščajo učinek povečane prepustnosti in zadrževanja,

poleg tega pa lahko nanje vežemo vse prej omenjene molekule in so torej osnova bolj kompleksnih dostavnih sistemov (1, 16).

4.2 Dostavni sistemi za sistemski vnos FS

Značilnost teh sistemov je izkoriščanje učinka povečane prepustnosti in zadrževanja. Tumorsko tkivo ima svoje ožilje, katerega endotelijska bariera je bolj porozna v primerjavi z normalnim ožiljem. Večji dostavni sistemi prehajajo v tumorsko tkivo, medtem ko je normalna endotelijska bariera za njih neprehodna. Po drugi strani pa je v tumorskem tkivu slabo razvit limfatični sistem, ki odvaja prepuščene snovi iz medceličnega prostora, zato ti sistemi ne le prehajajo v tumorsko tkivo, ampak se tam tudi zadržujejo. V te dostavne sisteme lahko vgradimo velike količine FS, ki se kopiči v tumorskem tkivu, kar poveča učinkovitosti FDZ.

4.2.1 Miceli

Miceli so okrogli makromolekulski kompleksi, ki se tvorijo spontano, ko amfililen polimer zmešamo z vodno raztopino, v primeru, ko je dosežena kritična micelna koncentracija. Hidrofobne enote polimera tvorijo notranjost micela, kamor lahko vgradimo hidrofobno FS. Polimerni miceli lahko povečajo učinkovitost FDZ *in vitro* z večjo internalizacijo v celice. Micele lahko tudi liofiliziramo, kar daje možnost za dolgotrajno shranjevanje pripravkov. Velika prednost teh sistemov je njihova enostavna priprava (16).

4.2.2 Liposomi

Liposomi so dostavni sistemi, sestavljeni iz fosfolipidov, pogosto pa je vključen tudi holesterol. Slednji poveča rigidnost sistema in tako zmanjša uhajanje spojine ter poveča stabilnost dvosloja, ki je značilen za liposome. V večih raziskavah je bilo potrjeno, da liposomi povečajo učinkovitost FDZ. Ugotovljeno je bilo, da se FS, vgrajene v liposome, lokalizirajo v drugih celičnih organelih kot FS, dane v standardnih raztopinah (16, 17).

Liposomi se v organizmu ne zadržujejo dolgo zaradi izmenjave lipidov z lipoproteini, kar vodi v razpad liposomov, po drugi strani pa ti veliki sistemi po opsonizaciji postanejo lahka tarča mononuklearnega fagocitnega sistema. Slednje poveča koncentracijo FS v jetrih, vranici in kostnem mozgu.

Verteporfin ima v obliki liposomske formulacije dovoljenje za promet v EU. Uporablja se za zdravljenje bolnikov s subfovealno horoidno neovaskularizacijo. To je nenormalna rast krvnih žil pod rumeno pego, osrednjim delom mrežnice. Liposomska formulacija verteporfina se uporablja pri dveh boleznih, mokri obliki starostne okvare rumene pege in bolezenski kratkovidnosti, redkemu tipu kratkovidnosti, pri kateri pride do prekomerne rasti očesnega zrkla. Na trgu je od leta 2007 (17, 18).

4.2.3 Nanodelci

Nanodelci so trdni koloidni delci velikosti 10-1000 nm. Za te dostavne sisteme je v zadnjih letih veliko zanimanja, tudi pri razvoju dostavnih sistemov za sistemski vnos FS. Razlogi za to so: v njihovo strukturo lahko vgradimo hidrofobno spojino; imajo veliko površino, primerno za vezavo peptidnih ali proteinskih molekul; celice jih brez težav internalizirajo; možno je kontrolirati sproščanje FS in nenazadnje, obstaja že veliko različnih strategij za njihovo pripravo (2, 19).

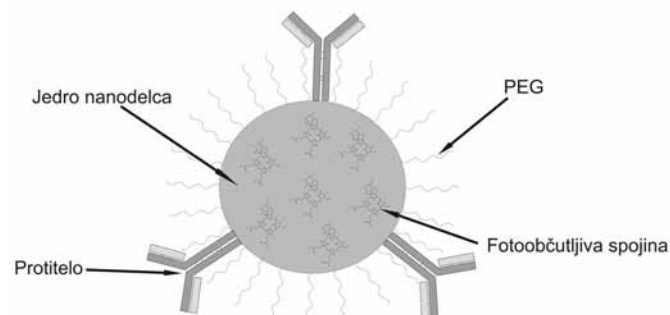
Nanodelce ločimo na biorazgradljive in nebiorazgradljive. Biorazgradljivi nanodelci so narejeni iz polimerov, ki se razgradijo v bioloških pogojih, posledica pa je sproščanje FS v okolje. Za njihovo pripravo se večinoma uporabljata polimer mlečne kisline in kopolimer mlečne in glikolne kisline. Njuna velika prednost poleg biorazgradljivosti je biokompatibilnost razgradnih produktov (mlečna in glikolna kislina), zato imajo taki polimeri nizko toksičnost. Premer takih nanodelcev je navadno med 100 in 400 nm, v njih pa lahko vgradimo veliko količino FS (okoli 7% m/m) (2, 20).

Nebiorazgradljivi nanodelci se manj uporabljajo za dostavo učinkovin. So pa ti nanodelci v primerjavi z biorazgradljivimi nanodelci predvsem bolj fizikalno stabilni, bolj odporni na spremembe pH-ja ter bolj ponovljivi glede velikosti in homogenosti. Ker pri FDZ končni nosilec delovanja ni sama FS, temveč reaktivne kisikove zvrsti, ki nastanejo po aktivaciji FS ob prisotnosti kisika, lahko v FDZ uporabljamo tudi nerazgradljive nanodelce, ki pa morajo biti dovolj porozni, da skozi njih prehaja svetloba in kisik ter v končni fazi toksični produkti reakcij. Pri uporabi nebiorazgradljivih nanodelcev v FDZ je večina raziskav usmerjenih v pripravo nanodelcev z organsko spremenjeno siliko (ORMOSIL), FS je lahko adsorbirana na površini ali pa kovalentno vezana na samo siliko (2, 16).

Posebna vrsta nebiorazgradljivih nanodelcev so aktivni nanodelci. FS vgradimo ali kovalentno vežemo na aktivne nanodelce, ki imajo lastnost, da ob obsevanju z rentgenskimi žarki ali svetlobo valovnih dolžin v infrardečem območju oddajajo svetlobo valovnih dolžin okoli 700 nm, kar aktivira vezano FS. Tako obsevanje prodira globlje v telo, zato so ti nanodelci zelo zanimivi za prihodnji razvoj FDZ (2).

4.2.4 Izboljšave dostavnih sistemov

Eden glavnih problemov dostavnih sistemov, kot so nanodelci ali liposomi, je da jih hitro prepoznajo in fagocitirajo celice mononuklearno fagocitnega sistema. Fagocitozo lahko vsaj omejimo z vezavo hidrofilnih molekul na površino liposoma oz. nanodelca, kar naredi slednjega nevidnega za makrofage. Uspehi so bili doseženi z vezavo glikolipidov na liposome, daleč najuspešnejša strategija pa je vezava polietilenglikola (PEG) na površino teh delcev. Molekule PEG tvorijo izredno gibljive hidrofilne verige na površini liposoma oz. nanodelca, kar prepreči vezavo na fagocite in fagocitozo (5).



Slika 4: Shema nanodelca za specifično ciljanje tumorskih celic.
Figure 4: Scheme of nanoparticle for specific targeting of tumour cells.

Poleg učinka povečane prepustnosti in zadrževanja večjo specifičnost zagotavlja še vezava peptidov in proteinov na površje

delca. Primer takšnega nanodelca je prikazan na sliki 4. Za kovalentno vezavo peptidov in proteinov na polimerno strukturo tudi tu uporabimo aminske skupine na proteinih in peptidih ter karboksilne in hidroksilne skupine na nanodelcih. Prednost teh sistemov pred konjugati je veliko večja količina FS, ki jo lahko dostavimo do tumorske celice. (1, 5).

5 Zaključek

FDZ je že uveljavljeno tako pri različnih vrsta rakavih obolenj kot pri drugih boleznih. Bistvena prednost FDZ je njegova specifičnost, saj le s svetlobo aktivirane FS sprožajo toksične učinke, poleg terapevtskega učinka pa omogočajo tudi diagnostično uporabo.

Izboljšanje FDZ predstavlja raziskovalcem pomemben izziv. Razvoj dostavnih sistemov, ki omogočajo sistemski vnos FS in pa ciljanje tumorskih celic, je pri tem eden glavnih pristopov, vendar se ti sistemi razen liposomske formulacije verteporfina še ne uporabljajo v klinični praksi.

Pomanjkljivost FDZ je njegova cena, saj moramo tu poleg razvoja samih spojin in dostavnih sistemov upoštevati še lasersko tehnologijo, ki je nujna za uporabo FDZ. Kljub temu predvidevamo, da bo imel FDZ v prihodnosti zelo pomembno vlogo pri zdravljenju rakavih obolenj.

6 Literatura

- Verma S, Watt GM, Mai Z, Hasan T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. *Photochem Photobiol*. 2007 Sep-Oct;83(5):996-1005.
- Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Dec 14;60(15):1627-37.
- O'Neil, Maryadele J. The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed., Whitehouse Station : Merck, 2001. 9217,10030.
- U.S. national institutes of health (<http://clinicaltrials.gov/ct2/home>). Dostopano: 06-2009.
- Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002 Mar;66(2):89-106.
- Japelj B, Pečar S. Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja. *Farm vestn*. 2006;57:131-139.
- Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2000 Aug;57(1):1-13.
- Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)*. 2003;39(12):1137-1150.
- Zaak D, Karl A, Knüchel R, Stepp H, Hartmann A, Reich O, Bachmann A, Siebels M, Popken G, Stief C. Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. *BJU Int*. 2005 Aug;96(2):217-22.
- Goh AC, Lerner SP. Application of new technology in bladder cancer diagnosis and treatment. *World J Urol*. 2009 Jun;27(3):301-7.
- Spletišče Eudrapharm (<http://eudrapharm.eu/eudrapharm/>). Dostopano: 01-2010.
- Ameriška agencija za hrano in zdravila (<http://www.fda.gov/>). Dostopano: 01-2010.
- Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Aminolevulinic_acid). Dostopano: 01-2010.
- Donnelly RF, McCarron PA, Morrow DI, Sibani SA, Woolfson AD. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 1: Topical carrier platforms. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008 Jul;5(7):757-66.
- Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers. *Met Based Drugs*. 2008;2008:276109.
- Sibani SA, McCarron PA, Woolfson AD, Donnelly RF. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008 Nov;5(11):1241-54.
- Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Jan 13;56(1):17-30.
- Evropsko Javno Poročilo O Oceni Zdravila (EPAR)- Visudyne- Povzetek EPAR za javnost. 2008.
- Obermajer N, Kos J, Kristl J. Nanodelci: sodobni dostavni sistemi za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. *Farm vestn*. 2007;57:39-44.
- Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. 2008 Nov;26(11):612-21.

Gensko zdravljenje raka

Cancer gene therapy

Nina Kočevar, Maja Čemažar, Gregor Serša

Povzetek: Gensko zdravljenje je uporaba genov za zdravljenje bolezni. Velik delež raziskav poteka na raku, saj imajo trenutne metode zdravljenja omejeno učinkovitost in neželene učinke. V prispevku najprej na kratko predstavimo osnovne principe genskega zdravljenja. Sledi opis glavnih dostavnih sistemov, ki jih delimo na virusne in nevirusne ter glavnih pristopov genskega zdravljenja pri raku. Te lahko razdelimo na imunološke, kjer izkoriščamo imunski sistem za pobijanje rakavih celic preko antigenskih, stimulatornih in kostimulatornih molekul, ter molekularne, kjer izkoriščamo inaktivacijo onkogenov, vstavitve tumorje zaviralnih genov, uporabo interferenčne RNA, encime za aktivacijo zdravil, onkolične viruse, inhibicijo angiogeneze in vstavitve genov za odpornost na zdravila v hematopoetske celice.

Ključne besede: rak, gensko zdravljenje, virusni vektorji, nevirusni vektorji, pristopi za zdravljenje

Abstract: Gene therapy uses genes to treat diseases. Large amount of research is based on cancer because current methods for cancer treatment have limited efficiency and unwanted side effects. In the following article we first present the basic principles of gene therapy. Next, we describe the main delivery systems, which are viral and non-viral, and then the main therapeutic strategies of cancer gene therapy. These can be divided into immunological, where we take advantage of the immune system for cancer cell killing through antigenic, stimulatory and co-stimulatory molecules, and molecular, where we take advantage of oncogene inactivation, tumor suppressor gene insertion, RNA interference, prodrug activating enzymes, oncolytic viruses, angiogenesis inhibition and insertion of drug resistance genes in hematopoietic progenitors.

Keywords: cancer, gene therapy, viral vectors, nonviral vectors, therapeutic strategies

1 Uvod

Rak je bolezen, oziroma skupina bolezni, za katere je značilna nekontrolirana rast celic v različnih organih, brez fiziološke funkcije za ta organ (1). Tumor, ki nastaja, okvarja fiziološke funkcije organa, zaradi invazivnosti tumorskih celic pa nastajajo oddaljeni zasevki oz. metastaze. Uporabljajo se različni pristopi zdravljenja (kirurško zdravljenje, radioterapija, kemoterapija), med novejšje pa spada gensko zdravljenje. Gensko zdravljenje je uporaba genov za zdravljenje bolezni (2). Prvotno so z njim poskušali zdraviti pogoste monogenske bolezni krvnih celic, kot sta beta talasemija in anemija srpastih celic (3). Njihove molekularne mehanizme so namreč dobro razumeli, tarčne celice pa so bile lahko dostopne za odvzete, gensko manipulacijo v samem laboratoriju in za ponoven vnos v bolnika. V primerjavi z ustaljenim zdravljenjem teh bolezni, presaditvijo hematopoetskih matičnih celic primernih darovalcev, je gensko zdravljenje teoretično omogočalo možnost uporabe vsem bolnikom. Zanj namreč ni bilo potrebno iskati primernih darovalcev, saj so celice za gensko manipulacijo lahko odvzeli samim bolnikom. Tako so se izognili iskanju primernih darovalcev in s tem povezanim imunološkim oviram. Nato se je težišče v sredini 80-ih let prejšnjega stoletja prestavilo na veliko redkejše bolezni hude kombinirane imunske pomanjkljivosti (SCID, angl. *severe combined immunodeficiency disease*), nastale zaradi okvare v encimu adenozin deaminazi (ADA) (3). Ravno ta bolezen je postala tarča prve odobrene klinične študije z genskim zdravljenjem pri dveh otrocih leta 1990, študija pa je dala zagon še novim

raziskavam (4). Tako je število poskusov z genskim zdravljenjem slabo desetletje strmo naraščalo, vse do smrti 18-letnega bolnika leta 1999 zaradi vnetne reakcije na adenovirusni vektor ter razvoja levkemiji podobne klonalne proliferacije limfocitov pri dveh otrocih leta 2002 (4). Po zaustavitvi takrat potekajočih in novih planiranih študij, ter ugotavljanju vzrokov nastanka neželenih učinkov, dandanes njihovo število spet počasi narašča in izvajajo se študije uporabe genskega zdravljenja pri različnih boleznih.

V prispevku bomo najprej na kratko pojasnili osnovne principe genskega zdravljenja, nato pa opisali glavne dostavne sisteme in pristope pri genskem zdravljenju raka. Uporabo le-tega v praksi bomo osvetlili s primeri kliničnih študij, ki so bile objavljene v zadnjih letih v znanstvenih revijah ali v podatkovnih zbirkah.

2 Osnovni principi genskega zdravljenja

V splošnem lahko pri genskem zdravljenju za popravilo okvarjenih genov uporabljamo različne pristope (2):

- Nespecifična vstavitve delujočega gena za zamenjavo nedelujočega.
- Zamenjava nedelujočega gena z delujočim s homologno rekombinacijo.
- Popravilo nedelujočega gena z reverzno mutacijo.
- Sprememba v uravnavanju določenega gena.

Pri zdravljenju rakavih bolezni lahko z genskim zdravljenjem popravimo oz. zamenjamo genetske okvare, značilne za rakave celice, npr. z zamenjavo tumorje zaviralnega gena ali z onemogočanjem izražanja onkogene. Poleg tega pa lahko tudi sprožimo smrt tarčnih tumorskih celic, npr. z gensko usmerjeno kemoterapijo, z ojačitvijo imunskega odziva ali s ciljanjem tumorskega žilja (5). Dostava genetskega materiala lahko poteka na dva načina (6): *in vivo* ali *ex vivo*. V prvem primeru DNA dostavimo neposredno v tarčne celice tkiva bolnika, kot so nedavno to naredili na primer Matsumoto in sodelavci (7). V svoji pilotski študiji so 5 bolnikom z napredovanim melanomom injicirali kationske liposome z genom za humani interferon (HuIFN) v kožo ali podkožno. Pogoji za tako dostavo je, da so celice lahko dostopne in da vektor za prenos omogoča specifično okužbo, integracijo in izražanje željenega gena (6). V drugem primeru pa gen za zdravljenje vstavimo v celice *ex vivo*, čemur sledi presaditev modificiranih celih v tarčno tkivo. Na ta način so Hacein-Bey-Abina in sodelavci v celice kostnega mozga prenesli retrovirusni vektor, ki je nosil zapis za gen za skupno verigo petih citokinskih receptorjev, in jih vnesli v 5 bolnikov z na kromosom X-vezano hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo (8). Pri tem načinu je posebej pomembna izbira celic za manipuliranje: morajo biti lahko dostopne, dolgo časa preživeti *in vivo*, sposobne izražati transgen v visokih količinah dalj časa ter ne smejo izzvati imunskega odziva (6). V poštev tako pridejo transformirane celične linije, avtologne primarne celične kulture, ki niso imunogene in imajo znižano tveganje za maligno transformacijo ali zarodne celice, ki imajo potencial se popolnoma inkorporirati v katerokoli gostiteljevo tkivo in se transformirati v zrelo celico organa.

Ključnega pomena za gensko zdravljenje je dostava želenega gena v celice. Za to uporabljamo različne tipe vektorjev, ki jih v grobem razdelimo na virusne in nevirusne (2, 9). Virusni ostajajo najpogostejši; do sedaj so jih raziskovalci uporabili v približno dveh tretjinah kliničnih študij z genskim zdravljenjem (4). V odobrenih, še trajajočih ali zaključenih kliničnih študijah z genskim zdravljenjem se za dostavne sisteme najpogosteje uporabljajo adenovirusi (24,1% oz. 370 študij), sledijo jim retrovirusi (21,2% oz. 326 študij), gola/plazmidna DNA (24,1% oz. 370 študij), virus vakcinije (18,1% oz. 278 študij), lipofekcija (7,1% oz. 109 študij), adenovirusom pridruženi virus (4,4% oz. 67 študij) in virus herpesa simpleksa (3,3% oz. 51 študij) (10).

Gensko zdravljenje lahko cilja somatske ali zarodne celice. Le v drugem primeru pride do prenosa spremembe na potomce, je pa tovrstno zdravljenje vprašljivo (predvsem etično) za izvedbo pri večjih živalih in ljudeh (2).

3 Gensko zdravljenje raka

Zaenkrat je največ kliničnih študij genskega zdravljenja, približno dve tretjini, usmerjenih v gensko zdravljenje raka (4). Gensko zdravljenje raka je pomemben nov pristop zdravljenja raka, ki temelji na ciljanem in specifičnem zdravljenju, podobno kot zdravljenje s tarčnimi zdravili. Cilj obeh pristopov je čim bolj specifično ciljati tumorske celice in čim manj prizadeti ne-maligne normalne celice. Ustaljena zdravljenja raka, kot sta radioterapija in kemoterapija, ne izpolnjujeta vseh teh pogojev, kar mnogokrat vodi do lokalnih in sistemskih neželenih učinkov. Gensko zdravljenje raka verjetno ne bo v prvih fazah klinične uporabe uporabljeno kot samostojno zdravljenje, ampak v kombinaciji z radioterapijo in kemoterapijo. Zato je potrebno gensko zdravljenje

prilagoditi kombinaciji z radio in kemoterapijo, tako prostorsko kot časovno. Eden od takih pristopov je nadzor izražanja vnesenega transgena z ionizirajočim sevanjem ali s citostatiki (6).

Pri vsakem genskem zdravljenju je poglobitnega pomena varen in učinkovit vnos genskega materiala, od bolezni pa je odvisno, koliko časa mora le-ta vzdržati v celicah (9). Tako je ponekod zaželeno čim daljše izražanje genov, druge pa je zadosti že kratko obdobje. Večina načinov za gensko zdravljenje raka spada k slednjim. Pri dostavi genov za zdravljenje je pomembno tudi, ali bomo genski material vnesli sistemsko ali lokalno (t. i. ciljana dostava). Odločitev je odvisna od lokacije oz. dostopnosti tumorja in prisotnosti oddaljenih zasevkov ter samih sposobnosti dostavnih sistemov (11). Kar nekaj tipov tumorjev je pripravnih za direktno injiciranje (npr. melanom) ali druge načine lokalne aplikacije (npr. peritonealno injiciranje za rak jajčnikov) genov za zdravljenje. Pri oddaljenih zasevkih, na primer, pa pride v poštev vnos materiala v krvni obtok in ciljanje določenega mesta. Tu se lahko zatakne. Dostavni sistemi morajo namreč v krvi preživeti nevarnost razgradnje in celične obrambne mehanizme, ko pridejo do izbranega tkiva se morajo specifično vezati na tarčne celice, ko so enkrat v celici, pa se morajo tam izogniti še znotrajceličnim oviram. Kot že omenjeno, delimo dostavne sisteme na virusne in nevirusne (Preglednica 1).

3.1 Virusni dostavni sistemi

Virusi so naravno razviti za infekcijo celic in vnos svojega genskega materiala vanje (9). Pri genskem zdravljenju se uporablja t. i. virusne vektorje, ki so laboratorijsko spremenjeni, tako da so odstranjeni geni za njihovo patogenost (npr. oviranje virusnega razmnoževanja z odstranitvijo strukturnih genov). Kot dostavni sistemi veljajo virusni vektorji za bolj učinkovite kot nevirusni, a jih pesti vprašanje varnosti. Poleg tega so omejeni kar se tiče velikosti vključka in jih je težko proizvajati. V uporabi za gensko zdravljenje raka prevladujejo adenovirusni in retrovirusni vektorji, vektor virusa vakcinije, adenovirusom pridruženi virusni vektorji ter vektor virusa herpesa simpleksa.

3.1.1 Adenovirusni vektorji

Adenovirusni vektorji so najpogosteje uporabljeni vektorji za dostavo genov (12). Sami adenovirusi imajo dvoverižni DNA genom, ki se ne integrira v gostiteljev kromosom, tako da je tudi izražanje gena za zdravljenje prehodno. Lahko okužijo tako deleče se kot nedeleče se celice. Za vstop v tarčno celico se vežejo na celični receptor CAR (angl. *coxsackie and adenovirus receptor*) in dalje z $\alpha\beta$ integrini. Največ adenovirusnih vektorjev je narejenih na osnovi serotipa 5. Obstaja več generacij replikacijsko okvarjenih virusov, katerim izbrišemo gene zgodnjih (E1A, E2B, E2A, E2B, E3, E4) in/ali poznih (L1, L2, L3, L4, L5) regij. Prva generacija replikacijsko okvarjenih virusov ne vsebuje regije E1 ter včasih E3, druga ima poleg tega inaktivirano ali izbrisano regijo E2 in/ali E4, tretja (angl. *high-capacity, gutless, helper-dependent*) pa ima izbrisane vse virusne gene z izjemo ITR (angl. *inverted terminal repeat*) in signalov za pakiranje virusnih delcev. Adenovirusni vektorji omogočajo vključevanje malo večjih kosov DNA kot retrovirusni, njihova glavna slabost pa je, da so zelo imunogeni. To se je izkazalo za usodno pri 18-letnem bolniku z okvaro v ornitin transkarbamilazi, ki je sodeloval v pilotski študiji genskega zdravljenja (4). Številne klinične študije so vseeno pripeljale do tega, da so oktobra 2003 kitajske oblasti za zdravljenje ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu odobrile uporabo rekombinantnega adenovirusnega vektorja s kaseto za

Preglednica 1: Pregled glavnih dostavnih sistemov in njihova uporaba v kliničnih študijah pri genskem zdravljenju raka. Podatki so povzeti po zbirkah *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* in *ClinicalTrials.gov* (10, 29).

Table 1: An overview of main gene delivery systems and their application in clinical trials for cancer gene therapy. The data were collected from databases *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* and *ClinicalTrials.gov* (10, 29).

	KLINIČNE RAZISKAVE	PRISTOPI ZA ZDRAVLJENJE	IDENTIFIKACIJSKA ŠTEVILKA ŠTUDIJE
VIRUSNI VEKTORJI			
Adenovirusni vektorji	Rak dojke, rak prostate, rak prostate, gliom, rak jajčnikov in peritonealne votline, rak jeter, rak glave in vratu, rak mehurja, rak pljuč	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom, vnos tumorje zaviralnega gena, zdravljenje z onkolitičnim virusom	NCT00849459, CA-001, NCT00583492, BE-018, NCT00003450, NCT00003147, DE-072, NCT00109655, US-470
Retrovirusni vektorji	Nevroblastom, rak pljuč, gliom, melanoma, rak jajčnikov, rak trebušne slinavke, rak dojke	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom, vnos tumorje zaviralnega gena, zmanjševanje toksičnosti kemoterapije	NCT00186862, CN-002, DE-014, UK-005, US-339, UK-106, CA-008
Vektor virusa vakcinije	Rak dojke, melanom	Imunoterapija, vnos tumorje zaviralnega gena	NCT00003761, BE-011, CH-020
Adenovirusom pridruženi virusni vektorji	Melanom, rak prostate	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom	CH-025, JP-014
Vektor virusa herpesa simpleksa	Rak želodca, gliom, rak debelega črevesa, rak glave in vratu	Imunoterapija, zdravljenje s samomorilskim genom, zdravljenje z onkolitičnim virusom	UK-096, FR-034, NCT00012155, UK-066
NEVIRUSNI VEKTORJI			
Gola DNA	Rak glave in vratu, melanom, rak ledvic	Imunoterapija	DE-010, CH-045, NCT00096629
Elektroporacija	Melanom	Imunoterapija	NCT00323206
Kationski lipidi	Melanom, levkemija, različni solidni tumorji, rak jajčnikov	Imunoterapija, siRNA, vnos tumorje zaviralnega gena	CA-004, NCT00860522, NCT00938574, US-415
Kationski polimeri	Različni solidni tumorji	siRNA	NCT00689065

izražanje človeškega *p53* (Gendicine™), ki je tako postal prvi komercializiran proizvod za gensko zdravljenje (13). Poleg omenjenega tipa pa obstajajo tudi replikacijsko kompetentni (onkolitični) adenovirusi, ki se razmnožujejo specifično v tarčnih tumorskih tkivih (9).

3.1.2 Retrovirusni vektorji

Retrovirusni vektorji so bili prvi dostavni sistemi uporabljeni v genskem zdravljenju (14). Genom retrovirusa sestavljata dve identični enoverižni RNA molekuli, iz katerih lahko s svojo reverzno transkriptazo napravijo dvoverižne DNA kopije, ki se integrirajo v genom gostitelja. Ravno ta lastnost, ki omogoča stabilen genski prenos, pa je hkrati njihova glavna slabost: v francoski študiji na kromosom X-vezane hude kombinirane imunske pomanjkljivosti se je namreč po začetnem navdušenju pri dveh otrocih pojavila levkemija podobna klonalna proliferacija limfocitov, saj naj bi se retrovirusni vektor integriral v bližino promotora protoonkogene LMO2 (4). Z izjemo lentivirusov (HIV) se retrovirusi ne morejo razmnoževati v nedeležih se celicah (14). Izbira tarčnih celic je vezana na tip proteinov ovojnice virusa in na njim ustrezne gostiteljske receptorje. Večina vektorjev izhaja iz mišjega virusa levkemije (angl. *Moloney murine leukemia virus*), ki mu odstranimo večino genoma (gene *gag*, *pol* in *env*), da ostanejo le ponovitve LTR (angl. *long*

terminal repeat) in signal za pakiranje, vanj pa lahko vključimo do 8 kb tuje DNA. Taki virusi so replikacijsko okvarjeni in za svoje razširjanje potrebujejo mediatorske celice, ki dopolnjujejo manjkajoče virusne funkcije. Poleg retrovirusov z okvarjeno replikacijo so v uporabi, podobno kot pri adenovirusih, tudi onkolitični virusi (9).

3.1.3 Vektor virusa vakcinije

Virus vakcinije, ki spada v družino poksvirusov, je sodeloval pri izbrisu črnih koz in je zato najdlje uporabljen virus pri ljudeh (15). Ima dvoverižni DNA genom. Tekom življenjskega cikla lahko tvori tri oblike infektivnih delcev, ostane pa v citoplazmi od vstopa v celico do izstopa novonastalih virusov, tako da ne pride do integracije v gostiteljev genom. Okuži lahko tako deleže se kot nedeleže se celice (9). O samem receptorju za vstop znanstveniki niso enotnega mnenja, vendar pa virus lahko okuži različne celične linije (15). Ravno zaradi njihove zgodovine obstaja veliko različnih sevov, ki so za funkcijo rekombinantnih vektorjev različno obdelani: sev Ankara, na primer, je klasično oslabilen s pasažami v fibroblastih piščančjih embrijev, dalje sta tu z delecijami modificirana seva NYVAC in Lister itd. Zaradi velikega genoma ima možnost prenosa velikega vključka (vsaj 25 kb). Poleg replikacijsko okvarjenih je tudi tu za gensko zdravljenje raka možno uporabiti onkolitične viruse.

3.1.4 Adenovirusom pridruženi virusni vektorji

Adenovirusom pridruženi virusi so mali parvovirusi z enoverižnim DNA genomom, ki potrebujejo pri infekciji in replikaciji pomoč drugega virusa (adenovirusa ali herpesvirusa) (16). Če le-tega ni, vzpostavijo latentno infekcijo in se bodisi integrirajo v genom na specifično mesto (domnevno naj bi imeli preferenco za transkripcijsko aktivne regije kromatina) bodisi vztrajajo kot episom. Okužijo lahko tako deleče se kot nedeleče se celice. Serotip 2 (AAV2) uporablja heparin sulfat proteoglikane kot primarne receptorje ter receptorje za fibroblastni rastni faktor 1 (ang. *fibroblast growth factor 1*) in $\alpha_v\beta_5$ integrine kot koreceptorje in tako lahko dostopa do različnih tipov tkiv (17). Ravno na njegovi osnovi so bili narejeni prvi vektorji, danes pa skoraj za vsak organ obstaja preferenčni serotip (16). Genom adenovirusom pridruženih virusov vsebuje dva odprta bralna okvirja, *Rep* in *Cap*, ki ju za gensko zdravljenje odstranimo in tako kot vektorji zadržijo le neprevedena zaporedja ITR. Ena izmed glavnih slabosti adenovirusom pridruženih virusnih vektorjev (poleg učinka nevtralizirajočih protiteles) je, da vanje lahko vključimo manj kot 5 kb DNA (9).

3.1.5 Vektor virusa herpesa simpleksa

Virus herpesa simpleksa je iz družine herpesvirusov in ima velik dvoverižni DNA genom (18). Tekom svojega življenjskega cikla ima latentno fazo v obliki episoma in se tako ne integrira v gostiteljski genom. Okuži lahko deleče se in nedeleče se celice. Virus je po naravi nevrotropen (latentna faza poteka v živčnih celicah), kar lahko izkoriščamo pri dostavi genov v možganske tumorje (9). V vektor ga preoblikujemo z odstranitvijo nekaterih sekvenc, izraženih med zgodnjo infekcijo, kot so ICP0, ICP4, ICP27, ICP22. Zaradi velikega genoma lahko sprejme večje vključke kot ostali pogosto uporabljeni virusni vektorji, in sicer do skoraj 40 kb. Poleg replikacijsko okvarjene različice je zelo uporaben tudi kot onkolitični virus in se po odstranitvi nekaterih genov (gen za timidinsko kinazo, ICP34,5, ICP6...) selektivno razmnožuje le še v delečih se tumorskih celicah (17, 18).

Zgoraj naštetih skupine virusnih vektorjev v genskem zdravljenju raka prevladujejo. V manjši meri se raziskujejo tudi virus atipične kokošje kuge, virus vezikularnega stomatitisa, reovirus, poliovirus, virus ošpic itd. (17).

3.2 Nevirusni dostavni sistemi

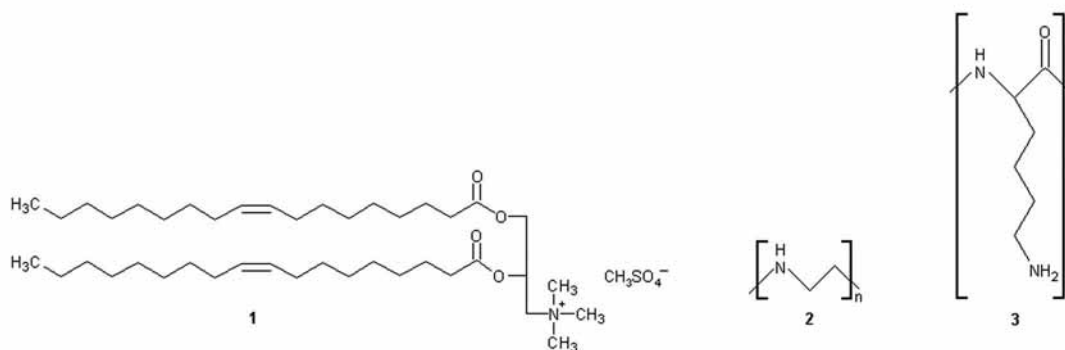
Nekatere slabosti virusnih dostavnih sistemov, kot sta npr. varnost ali proizvodnja na veliko, pridejo do manjšega izraza pri nevirusnih dostavnih sistemih (9). V tej kategoriji za uporabo v genskem zdravljenju raka prevladujejo gola DNA kot posebna enota ter kationski lipidi in polimeri (Slika 1). Prva je bila uspešno uporabljena za direktno injiciranje v tumorje ali kot DNA cepivo, vendar pa jo organizem lahko hitro odstrani (9). Za zaščito in za zmanjšanje velikosti oz. kompleksnosti lahko DNA »vgradimo« v kationske nevirusne dostavne sisteme, kot so kationski lipidi in kationski polimeri (11). Ti z negativno nabito DNA interagirajo preko elektrostatskih interakcij, neto naboj celega kompleksa pa ostane pozitiven, kar v nadaljnji stopnji omogoči učinkovito interakcijo z negativno nabitimi celičnimi membranami in internalizacijo, ki v glavnem poteka z endocitozo (9). Kationske nevirusne vektorje sicer pesti slabša učinkovitost v primerjavi z virusnimi in so odvisni od svojih fizikalno-kemijskih lastnosti, vendar pa jih z lahkoto modificiramo, npr. za zmanjšanje nespecifičnih interakcij s sestavinami krvi ali za ciljanje receptorjev na površini tarčne celice (11).

3.2.1 Gola DNA

Gola DNA lahko neposredno uporabimo za vnos, če jo vnesemo blizu bolezenskega mesta in stran od elementov, ki bi jo utegnili razgraditi (19). Tako jo v krvi, na primer, ogrožajo nukleaze (11). V pomoč pri dostavi nam je lahko elektroporacija – fizikalna metoda za dostavo različnih molekul v celice z aplikacijo kontroliranih zunanjih električnih polj, ki začasno povečajo propustnost celične membrane (20). Z njo so proučevali uporabo različnih genov za zdravljenje in pristopov. Še posebej primerna je za dostavo genov, ki ciljajo na tumorsko žilje, saj že metoda sama po sebi deluje žilno razdiralno. V letošnjem letu bomo pričeli tudi na Onkološkem inštitutu v Ljubljani s klinično študijo z uporabo elektroporacije kot dostavnega sistema za antiangiogen gen pri zdravljenju kožnih metastaz melanoma v okviru evropskega projekta Angioskin.

3.2.2 Kationski lipidi

Kationski lipidi so najbolj proučevani izmed nevirusnih vektorjev (19). Pri fiziološkem pH so pozitivno nabiti in se vežejo z DNA preko



Slika 1: Primer kationskega lipida DOTAP oz. *N*-[1-(2,3-dioleoiloksi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonijevega metilsulfata (1) ter kationskih polimerov poli(etilenimina) (2) in poli(L-lizina) (3).

Figure 1: An example of the cationic lipid DOTAP or *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate (1) and cationic polymers poly(ethyleneimine) (2) and poly(L-lysine) (3).

elektrostatskih interakcij. Vsi vsebujejo hidrofobno skupino, ki je lahko iz enega ali dveh maščobnokislinskih ali 12-18 C-atomskih alkilnih ostankov ali holesterolnega dela ter aminoskupino: hidrofobni del omogoči v vodnem mediju ureditev v dvoslojne vezikle (liposome), aminoskupina pa veže DNA in kondenzira v t.i. lipoplekse. Tekom razvoja so jih modificirali na različne načine, npr. z dodatkom nevtralnih lipidov, kot je holesterol, za povečanje učinkovitosti ali s polietilenglikolom za podaljšanje časa kroženja v krvi (9). V uporabi je tudi mešanica liposom/protamin/DNA: protamin je peptid, ki kondenzira DNA, preden se le-ta poveže s kationskimi lipidi. Liposomi tako reagirajo z že kondenzirano DNA, pri čemer nastane manjši kompleks, ki najverjetneje podaljša čas kroženja v krvi in olajša endocitozo (9).

3.2.3 Kationski polimeri

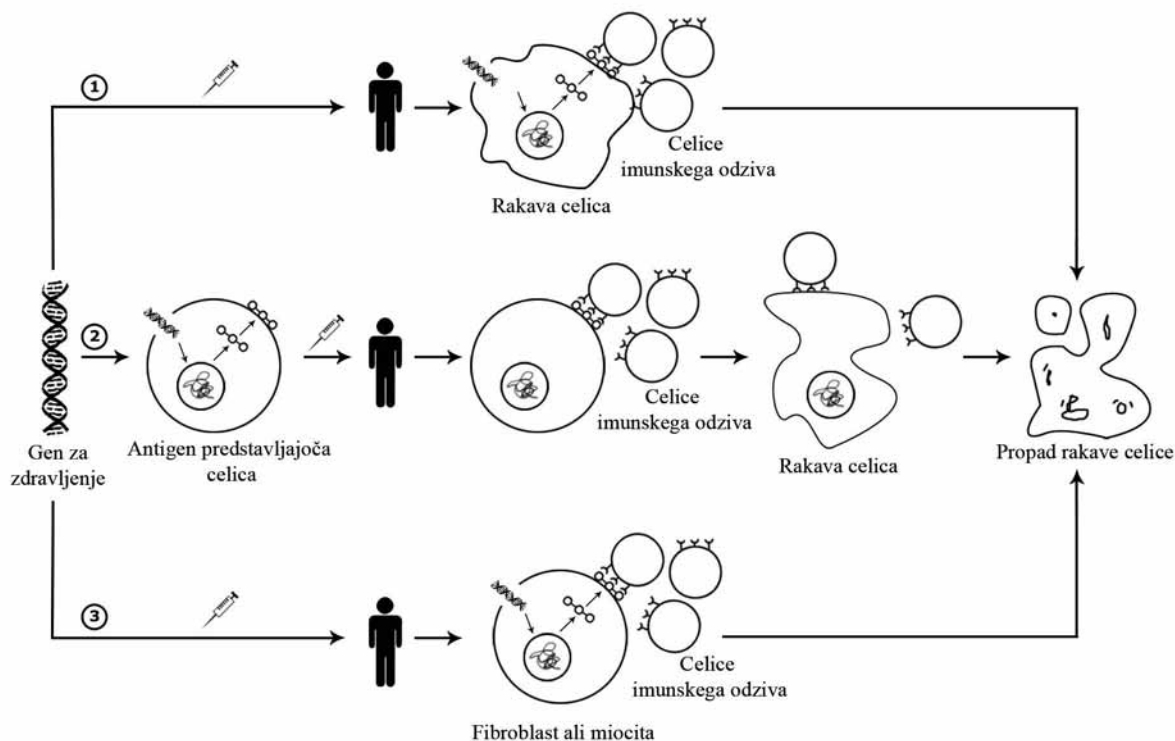
Kationski polimeri imajo prav tako pri fiziološkem pH pozitiven naboj, s katerim elektrostatsko privlačijo negativno nabito DNA v t.i. polipeks (19). Kot prvega so za gensko zdravljenje uporabili poli(L-lizina). V nasprotju s kationskimi lipidi je tu veliko dela potekalo na ligandih, ki bi olajšali celični privzem. Prav tako so raziskovalci nekatere L-lizine v polipeksu zamenjali s cisteinskimi ali triptofanskimi ostanki in s tem povečali učinkovitost prenosa ter polipekse prekrili s hidrofilnimi

polimeri za preprečitev opsonizacije s plazemskimi proteini. Poleg poli(L-lizina) je najbolj proučevan linearen ali razvejan poli(etilenimin) (9), v to skupino pa spadajo tudi hitosani, dendrimeri in reducibilni polikationi (9).

Zgoraj opisane kategorije prevladujejo v skupini nevirusnih dostavnih sistemov, raziskuje pa se tudi dostava genov s kationskimi peptidi, z različnimi kombinacijami omenjenih vektorjev (npr. lipopolipeksi), z različnimi nanodelci, z gensko pištolo, z ultrazvokom itd. (10, 19, 21).

3.3 Pristopi k zdravljenju

Razvoj raka je povezan s številnimi spremembami na genskem nivoju. Zaradi njegove kompleksne narave gensko zdravljenje na tem področju vsebuje različne pristope. Njihova razdelitev je težka, ker se med seboj prepletajo. Ena izmed možnosti je delitev na imunološke (Slika 2) in molekularne (Slika 3) (22), posamezne pristope pa lahko tudi kombiniramo z že obstoječimi metodami zdravljenja, npr. z radioterapijo (5). Kombinacija radioterapije, kot lokalnega zdravljenja, in promotorjev, katerih delovanje sprožimo z ionizirajočim sevanjem, lahko omogoči nadzorovano izražanje genov za zdravljenje v tumorju (t.i. transkripcijsko ciljanje) in s tem prispeva k zmanjšanju toksičnosti za normalno tkivo.



Slika 2: Shematski pregled imunološkega pristopa pri genskem zdravljenju raka. Gen za imunostimulacijo lahko vnesemo v tumorske celice (1), z in vitro manipulacijo usposobimo antigen predstavljajoče celice aktivno predstaviti tumorski antigen (2) ali neposredno vnesemo DNA cepivo z antigen-kodirajočimi geni (3).

Figure 2: A schematic overview of the immunological approach in cancer gene therapy. The gene coding for the immunostimulatory molecule can be inserted in cancer cells (1), the antigen presenting cells can be manipulated in vitro to enable them of active tumor antigen presentation (2) or DNA vaccine with the antigen coding gene can be directly injected (3).

V nadaljevanju prispevka bomo na kratko opisali glavne pristope genskega zdravljenja raka in uporabo le-teh v praksi osvetlili s primeri kliničnih študij, ki so bile objavljene v zadnjih letih v znanstvenih revijah ali v podatkovnih zbirkah.

3.3.1 Imunološki pristop

Rakave celice so po naravi imunogene, vendar pa so se sposobne izogibati imunskemu sistemu. To lahko počnejo zaradi izločanja imunosupresivov, znižanega izražanja antigenov ali molekul pglavitnega histokompatibilnostnega sistema in pomanjkanja kostimulacije (22). Posledično imunski odziv organizma ni dovolj za prepoznavanje in ubijanje tumorskih celic. Gensko zdravljenje, ki spreminja imunski odziv bolnika (imunoterapija), lahko izkoristimo kot spodbudo T celični imunosti, raziskuje pa se tudi celična in DNA cepiva z antigen-kodirajočimi geni.

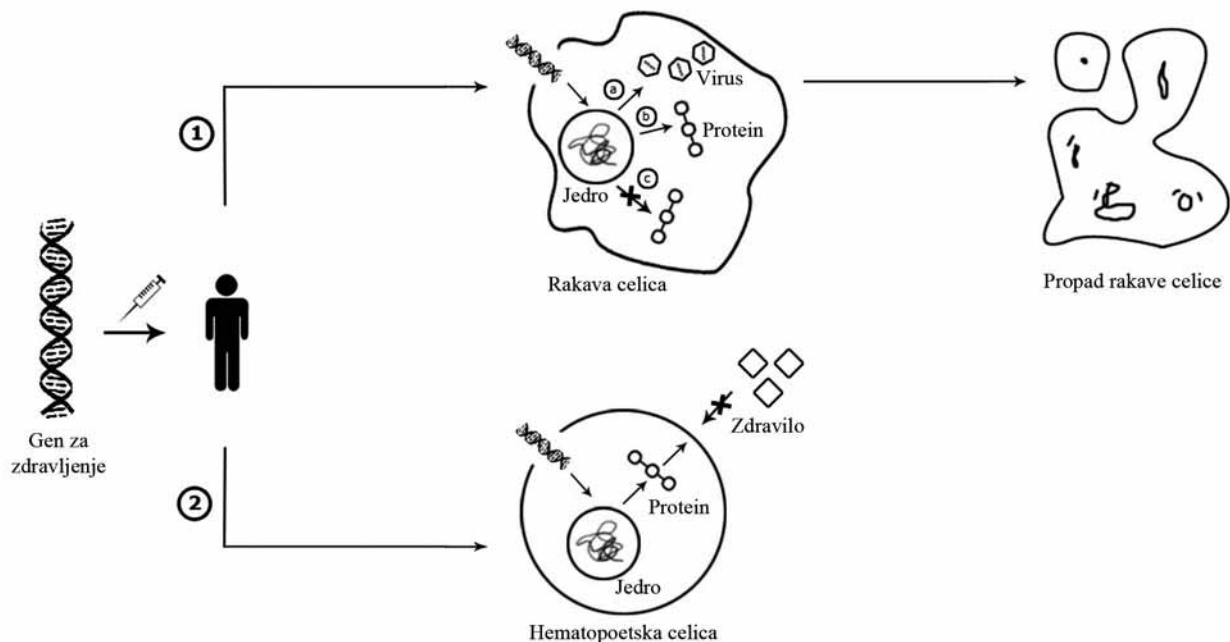
3.3.1.1 Prenos gena za imunostimulatorno molekulo

Ena izmed možnosti imunološkega pristopa je prenos gena za imunostimulatorno molekulo (npr. citokini), pri čemer se aktivirajo predvsem T limfociti in naravne celice ubijalke (22). Daud in sodelavci (23) so ta princip uporabili pri bolnikih z metastatskim melanomom, in

sicer z elektroporacijskim vnosom gena za interleukin-12 (*IL-12*). Gre za prvo klinično študijo za dostavo plazmidne DNA z *in vivo* elektroporacijo na ljudeh. Na 24 bolnikih so v svoji klinični študiji I. faze ugotovili, da je postopek varen in ga bolniki dobro prenašajo. Še posebej pa je vredno izpostaviti, da ima metoda potencial tudi za zdravljenje oddaljene bolezni. Pri nekaj vključenih bolnikih so se poleg lezij, v katere so injicirali plazmid, zmanjšale tudi oddaljene, nezdravljene lezije. Pri polovici teh bolnikov so opazili sistemski odziv na gensko zdravljenje, bodisi v obliki stabilizirane bolezni bodisi kot zmanjšanje nezdravljenih lezij, pri treh bolnikih pa celo popolno regresijo oddaljenih lezij.

3.3.1.2 Celična cepiva

Druga možnost genskega zdravljenja, ki spreminja imunski odziv bolnika, je *in vitro* manipulacija antigen predstavljajočih celic, da so sposobne aktivne predstavitve tumorskega antigena (22). Ta princip so uporabili Di Nicola in sodelavci (24), ko so z virusom vakcinije prenesli v dendritične celice tirozinazo (antigen, povezan z melanomom). Genetsko modificirane dendritične celice so nato injicirali v 6 bolnikov z metastatskim melanomom. S klinično študijo I. faze so pokazali, da je takšno cepljenje varno in učinkovito spodbuja T celično



Slika 3: Shematski pregled molekularnega pristopa pri genskem zdravljenju raka. Če gen za zdravljenje vnesemo v rakave celice (1), te propadejo zaradi razmnoževanja onkolitičnega virusa (1a), zaradi izražanja tumorja zaviralnega gena, encima za aktivacijo zdravila ali inhibitorja angiogeneze (1b) ali zaradi inhibicije izražanja onkogenega ali induktorja angiogeneze (1c). Če gen za zdravljenje vnesemo v normalne (hematopoetske) celice, te sintetizirajo protein za odpornost na zdravilo (2).

Figure 3: A schematic overview of the molecular approach in cancer gene therapy. If the therapeutic gene is inserted in cancer cells (1), cell death occurs due to propagation of the oncolytic virus (1a), due to expression of the tumor suppressor gene, prodrug activating enzyme or angiogenic inducer (1b) or due to inhibition of expression of the oncogene or angiogenic inhibitor (1c). If the therapeutic gene is inserted in normal (hematopoietic) cells, they synthesize the drug resistance protein (2).

posredovan odziv na tirozinazo, pri 1 bolniku pa so opazili tudi delni odgovor na zdravljenje v obliki zmanjšanja podkožne metastaze.

3.3.1.3 DNA cepiva

Poleg zgoraj omenjenih možnosti se raziskuje tudi neposredna DNA cepiva z antigen-kodirajočimi geni, kar so storili npr. Conry in sodelavci (25). Na 17 bolnikih z metastatskim kolorektalnim karcinomom so preizkušali kombinacijo gena za karcinoembrionalni antigen (CEA, angl. *carcinoembryonic antigen*), kot tumorskega antigena, in gena za površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) kot pozitivno kontrolo imunskega odziva. Metoda se je izkazala za varno, bolniki so jo dobro prenašali, objektivnih kliničnih odgovorov pa pri tej skupini niso opazili, tako da bodo potrebne dodatne raziskave.

3.3.2 Molekularni pristop

Za tumorje je značilno spremenjeno izražanje nekaterih genov, za kar so lahko krive tudi mutacije. Te spremembe lahko izkoristimo za gensko zdravljenje z molekularnim pristopom in tako na različne načine ciljamo onkogene, tumorje zaviralne gene, gene vpletene v angiogenezo itd. Poleg tega lahko za zdravljenje uporabimo tudi viruse, ki se selektivno razmnožujejo v rakavih celicah (onkolitični virusi) in gene, ki pretvarjajo neaktivna zdravila v aktivna (samomorilski geni). Cilj omenjenih možnosti je zaustavitev celičnega cikla ali programirana celična smrt (apoptoza) (22).

3.3.2.1 Onkogeni in tumorje zaviralni geni

Ena glavnih genskih skupin, vpletenih v nastanek raka, je skupina onkogenov. Na njihovo biološko aktivnost lahko vplivamo s t.i. anti-onkogeni (protismiselni oligonukleotidi, angl. *antisense oligonucleotides*), ki se vežejo na mRNA preko parjenja baz in tako inhibirajo onkogeno aktivnost (22). Tak je na primer G3139, 18-merni fosforotioatni protismiselni oligodeoksinukleotid, ki se veže na mRNA človeškega antiapoptotskega proteina Bcl-2 (26). Liu in sodelavci so ga proučevali v kombinaciji s karboplatinom in paklitakselom na 46 bolnikih z različnimi tipi čvrstih tumorjev. Ugotovili so, da lahko G3139 varno kombinirajo s standardnimi dozami obeh kemoterapevtikov. Prav tako so opazili znižanje mRNA Bcl-2 v perifernih mononuklearnih celicah in v tumorskih biopsijah.

Raziskuje se tudi anti-onkogene, ki se vežejo na zaporedje v DNA (antigenski oligonukleotidi, angl. *antigene oligonucleotides*) z vodikovimi vezmi in tako inhibirajo onkogeno aktivnost (22). Carbone in sodelavci (27) so proučevali uporabnost 11-mernega antigenkega oligonukleotida, bogatega z gvanini in timini, ki se veže na sekvenco blizu promotorja P2 onkogenega *c-myc* in z njimi tvori tripleks. Za povečanje njegove stabilnosti so antigenski oligonukleotid konjugirali z daunomicinom, ki interkalira v DNA. Ugotovili so, da kompleks inhibira transkripcijo *in vitro* in zmanjša aktivnost promotorja in zniža endogeno izražanje *c-myc* v celičnih linijah raka dojke in raka prostate. Kliničnih študij za uporabo pri genskem zdravljenju raka zaenkrat še ni.

Druga velika skupina, vpletena v nastanek raka, je skupina tumorje zaviralnih genov (22). Ti nadzorujejo delitev celice in jo lahko, če je potrebno, usmerijo v apoptozo. Za gensko zdravljenje lahko prenesemo divji tip proteina v celice z mutiranim genom in tako nadomestimo njegovo funkcijo. Glavni predstavnik tumorje zaviralnih genov je *p53*, ki je mutiran v skoraj 40% rakov. Na principu vstavitve

divjega tipa *p53* deluje že omenjeni Gendicine™ (13). Gre za rekombinantni adenovirus, ki ima regijo E1 zamenjano s kaseto za izražanje človeškega *p53*. V klinični študiji I. faze so ga preizkušali na 12 bolnikih z rakom glave in vratu. Po uspešnih rezultatih so ga v klinični študiji II/III. faze pri 135 bolnikih uporabili v kombinaciji z radioterapijo in ugotovili očitni sinergistični učinek. V teku je tudi klinična študija IV. faze (13). Zanimivo je, da so izvedene študije v obliki raziskovalnih člankov opisane le v kitajščini in da je v angleščini dostopen le pregledni članek, ki na kratko povzema te rezultate (13).

3.3.2.2 Uporaba interferenčne RNA

V posebno skupino pristopov lahko uvrstimo uporabo interferenčne RNA. Princip delovanja temelji na komplementarnosti med kratkimi dvoverižnimi RNA (mikro RNA (miRNA), kratke interferenčne RNA (siRNA)) in tarčno mRNA, kar vodi v utišanje izbranega gena (28). V grobem razdelimo kratke dvoverižne RNA molekule na tiste, ki jih sintetiziramo v laboratoriju in jih vnašamo v celice z dostavnimi sistemi (siRNA) in na endogene miRNA, ki nastanejo s prepisom iz DNA molekule.

Ena izmed možnosti uporabe so siRNA, ki nastanejo s procesiranjem iz daljše dvoverižne RNA, in jih vnesemo v celice v obliki plazmidne DNA, ki nosi zapis za daljšo dvoverižno RNA molekulo. Za svoje delovanje se priključijo v multiencimski kompleks RISC-a (angl. *RNA-induced silencing complex*) in argonava 2, kjer se najprej odstrani njihova smiselna veriga. Tako nastane aktiviran kompleks, ki ga protismiselna veriga siRNA vodi do komplementarne mRNA tarčnih genov in ga veže nanjo. To mRNA naposled argonava 2 razreže. SiRNA so že v I. fazi kliničnih testiranj (29). Tako se npr. na različnih solidnih tumorjih preizkuša varnost in učinkovitost CALAA-01. Aktivna učinkovina v CALAA-01 je siRNA, ki inhibira rast tumorjev preko znižanja izražanja podenote M2 ribonukleotidne reduktaze (29, identifikacijska številka NCT00689065).

V sklop interferenčnih RNA spadajo tudi male nekodirajoče miRNA (30), ki nastanejo s prepisom iz DNA. Njihova funkcija je predvsem uravnavanje izražanja proteinov. Povezali so jih z različnimi boleznimi, med drugim tudi z onkogenim ali tumorje zaviralnim vplivom pri raku, kadar so deli DNA, ki kodirajo za miRNA mutirani ali se drugače nepravilno izražajo. Tako na primer mutirana oblika miRNA ne razgrajuje mRNA tarčnega onkogenega, kar vodi v povečano izražanje tega onkoproteina. Gre za novejša področja, kjer še ni kliničnih testiranj v genskem zdravljenju raka. MiRNA se pri svojem delovanju, podobno kot siRNA, vežejo v multiencimski kompleks in dalje s protismiselno verigo na mRNA tarčnega gena. Njihova vezava lahko vodi bodisi v blokiranje prevajanja tarčne mRNA bodisi v njeno razgradnjo. Tako so Tsang in sodelavci (31) na različnih celičnih kulturah ugotovili, da miR-18a* cilja onkogen *K-Ras* in ima morda tumorje zaviralni vpliv. Zato bi lahko bila uporabna pri zdravljenju raka. Poleg tega se da miRNA tudi utišati, kot so to storili Lu in sodelavci s komplementarnimi oligonukleotidi (32). Na celičnih kulturah so proučevali možnost utišanja treh onkogenih miRNA z enim samim večtarčnim oligonukleotidnim inhibitorjem in dobili spodbudne rezultate. Pred uporabo v genskem zdravljenju raka pri ljudeh pa bodo seveda potrebne še nadaljnje raziskave.

3.3.2.3 Samomorilski geni

Naslednji pristop uporablja t.i. samomorilske gene (22). Tu gre za pretvorbo neaktivne substance z neselskimi encimi v fiziološko aktivno (citotoksično) obliko. Eden izmed najbolj proučevanih sistemov

je timidinska kinaza iz virusa herpesa simpleksa, ki fosforilira in s tem aktivira ganciklovir. Slednji preko apoptotskih in neapoptotskih mehanizmov uniči rakavo celico. Važen je tudi učinek na sosednje celice (angl. *bystander effect*): toksični metaboliti se preko medceličnih stikov ali apoptotskih veziklov prenesejo iz gensko spremenjenih celic v sosednje, gensko nespremenjene. Ta lastnost je koristna, če gre za širjenje v rakave celice in škodljiva, če gre za širitev v normalne celice. Na podoben princip deluje tudi citozin deaminaza iz *Escherichie coli*, ki pretvarja fluorocitozin v fluorouracil, ta pa inhibira sintezo DNA in RNA. Veliko dela z uporabo samomorilskih genov je opravljenega na gliomih, v zadnjem času pa potekajo študije tudi na raku prostate. Tako so Nasu in sodelavci (33) v klinični študiji I. faze 8 bolnikom v prostato injicirali adenovirusni vektor s timidinsko kinazo, temu pa je sledila intravenozna administracija ganciklovirja. S študijo so potrdili varnostni profil takega pristopa zdravljenja, rezultati pa kažejo tudi na morebiten protirakav učinek sodeč po znižanju nivoja serumskega prostatičnega specifičnega antigena (PSA) bolnikov.

3.3.2.4 Onkolitični virusi

Virusni vektorji za uporabo pri genskem zdravljenju raka so lahko replikacijsko okvarjeni ali replikacijsko selektivni (onkolitični). Slednji imajo naravno ali umetno vgrajeno sposobnost tumorske selektivnosti (34). Na ta način so se sposobni razmnoževati in uničiti le tumorske celice, brez ogrožanja normalnih. Novembra 2005 so kitajske oblasti odobrile prvo onkolitično gensko zdravljenje raka z uporabo genetsko modificiranega adenovirusa H101 za zdravljenje raka nosno-žrelnega prostora v kombinaciji s kemoterapijo. Gre za rekombinantni adenovirus serotipa 5, ki ima izbrisan gen za *E1B-55kD* in krajši segment v regiji E3. Zato naj ne bi mogel inaktivirati p53 v normalnih celicah z učinkovito razmnoževanje (35). Tumorske celice pa imajo dostikrat mutiran p53 in naj bi posledično bile dovzetne za virusno razmnoževanje in citopatske učinke. Tudi v tem primeru so objave kliničnih študij z izjemo pilotske študije II. faze (35) dostopne le v kitajščini, v angleščini pa zgolj povzete v referenci (34). V klinični študiji I. faze so na 15 bolnikih z različnimi tipi raka ugotovili, da je H101 varen za injiciranje v tumor, zaznali pa so tudi zmanjšanje tumorja pri 3 bolnikih. Ko so opravili še klinično študijo II. faze so ugotovili, da onkolitični virus deluje bolje v kombinaciji s kemoterapijo. To ugotovitev so potrdili na študiji III. faze, kjer so bolnike z rakom glave in vratu zdravili bodisi s kombinacijo H101 in kemoterapije bodisi s kemoterapijo samo.

3.3.2.5 Angiogeneza

Angiogeneza je tvorba novih žil iz že obstoječih in je, med drugim, potrebna za rast tumorjev (36). Brez nje težko zrastejo več kot 2-3 mm. En izmed pristopov genskega zdravljenja raka je ciljanje na gene, povezane z angiogenezo. To lahko dosežemo na dva načina, in sicer z inhibicijo njenih aktivatorjev ali z vstavitvijo njenih inhibitorjev. Primer prve možnosti je klinična študija I. faze Wenga in sodelavcev (37). Za zdravljenje so uporabili Angiozyme, prvi sintetični ribocim testiran kot dejavnik za zdravljenje pri ljudeh. Cilja in razreže mRNA receptorja za žilni rastni dejavnik 1 (VEGFR-1) in s tem zniža njegovo izražanje. V ocenjevanju zdravljenja so na 28 bolnikih s solidnimi tumorji ugotovili, da je uporaba ribocima varna. Poleg tega se je bolezen pri sedmih bolnikih stabilizirala za vsaj 6 mesecev, 2 bolnika pa sta kazala znake manjšega odziva. V letošnjem letu bomo pričeli tudi na Onkološkem

inštitutu v Ljubljani s klinično študijo z uporabo elektroporacije kot dostavnega sistema za antiangiogen gen pri zdravljenju kožnih metastaz melanoma v okviru evropskega projekta Angioskin.

Našteti in opisani pristopi prevladujejo v genskem zdravljenju raka. Poleg teh pa lahko gensko zdravljenje koristi tudi drugače, npr. z zmanjšanjem neželenih učinkov kemoterapije z vstavitvijo genov za odpornost v hematopoetske celice (22).

4 Sklep

Gensko zdravljenje je zadnja desetletja predmet številnih raziskav, velik delež pa se jih opravlja na raku. Pri njem je velikega pomena, kako dostavimo želeni gen za zdravljenje. V preteklih letih so raziskovalci veliko truda vlagali v razvijanje novih in spreminjanje starih dostavnih sistemov. Pričakujemo lahko, da bo v prihodnosti uspešno zdravljenje raka z genskim zdravljenjem vključevalo predvsem kombinacije, bodisi z že obstoječimi metodami zdravljenja bodisi z različnimi pristopi genskega zdravljenja. Na vsaj delno uporabnost tovrstnega zdravljenja kaže odobritev kitajskih oblasti za uporabo rekombinantnega adenovirusnega vektorja s kaseto za izražanje človeškega *p53* pri zdravljenju raka glave in vratu ter za uporabo genetsko modificiranega onkolitičnega adenovirusa H101 pri zdravljenju raka nosno-žrelnega prostora. Več o koristi in delovanju omenjenih zdravil kot tudi o dolgoročnih neželenih učinkih in varnosti na širši populaciji, pa nam bodo povedale šele postmarketinške klinične raziskave.

5 Literatura

1. Serša G. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farm Vestn* 2009; 60 (2): 43-47.
2. Human genome project information http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml
3. Kohn DB, Candotti F. Gene therapy fulfilling its promise. *Editorial. N Eng J Med* 2009; 360 (5): 518-521.
4. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J Gene Med* 2007; 9 (10): 833-842.
5. Kamensek U, Sersa G. Targeted gene therapy in radiotherapy. *Radiol Oncol* 2008; 42 (3): 115-135.
6. Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J* 2004; 80 (948): 560-570.
7. Matsumoto K, Kubo H, Murata H, Uhara H, Takata M, Shibata S, Yasue S, Sakakibara A, Tomita Y, Kageshita T, Kawakami Y, Mizuno M, Yoshida J, Saida T. A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38 (12): 849-856.
8. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Eng J Med* 2002; 346 (16): 1185-1193.
9. El-Anead A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94 (1): 1-14.
10. Podatkovna zbirka kliničnih študij Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (*Journal of Gene Medicine*): <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>.
11. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with nonviral gene delivery systems. *Drug Discov Today*. 2002; 7 (8): 479-485.
12. Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells* 2008; 25(4): 462-466.
13. Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 2005; 16 (9): 1016-1027.
14. Rainov NG, Ren H. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy – what have we learned? *J Neurooncol* 2003; 65 (3): 227-236.

15. Shen Y, Nemunaitis J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* 2005; 11 (2): 180-185.
16. Coura R dos S, Nardi NB. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Viro J* 2007; 4: 99. doi:10.1186/1743-422X-4-99.
17. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006; 208 (2): 299-318.
18. Latchman DS. Herpes simplex virus-based vectors for the treatment of cancer and neurodegenerative disease. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7 (5): 415-418.
19. Brown MD, Schätzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 2001; 229 (1-2): 1-21.
20. Cemazar M, Sersa G. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9 (6): 554-562.
21. Prokop A, Davidson JM. Gene delivery into cells and tissues. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering, third edition. Academic Press, 2007: 493-515.
22. El-Aneel A. Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 2004, 498: 1-8.
23. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AL, Sondak VK, Munster PN, Sullivan DM, Ugen KE, Messina JL, Heller R. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26 (36): 5896-5903.
24. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Mortarini R, Baldassari P, Guidetti A, Gallino GF, Del Vecchio M, Ravagnani F, Magni M, Chaplin P, Cascinelli N, Parmiani G, Gianni AM, Anichini A. Boosting T Cell-Mediated Immunity to Tyrosinase by Vaccinia Virus-Transduced, CD34⁺-Derived Dendritic Cell Vaccination. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (16): 5381-5390.
25. Conry RM, Curiel DT, Strong TV, Moore SE, Allen KO, Barlow DL, Shaw DR, LoBuglio AF. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (9): 2782-2787.
26. Liu G, Kolesar J, McNeel DG, Leith C, Schell K, Eickhoff J, Lee F, Traynor A, Marnocha R, Alberti D, Zwiebel J, Wilding G. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic correlative study of the antisense Bcl-2 oligonucleotide G3139, in combination with carboplatin and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (9): 2732-2739.
27. Carbone GM, McGuffie E, Napoli S, Flanagan CE, Dembech C, Negri U, Arcamone F, Capobianco ML, Catapano CV. DNA binding and antigene activity of a daunomycin-conjugated triplex-forming oligonucleotide targeting the P2 promoter of the human c-myc gene. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 (8): 2396-2410.
28. De Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6 (6): 443-453.
29. Podatkovna zbirka kliničnih študij ClinicalTrials.gov (U.S. National Institutes of Health): <http://clinicaltrials.gov/ct2/home>.
30. Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics. *Cancer Res* 2009; 69 (2): 393-395.
31. Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis* 2009; 30 (6): 953-959.
32. Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, Yang B. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (3): e24.
33. Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku H, Abarzua F, Manabe D, Thompson TC, Kumon H. Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-1K gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther* 2007; 15 (4): 834-840.
34. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7 (2): 141-148.
35. Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (24): 3634-3638.
36. Liu CC, Shen Z, Kung HF, Lin MC. Cancer gene therapy targeting angiogenesis: an updated review. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (43): 6941-6948.
37. Weng DE, Masci PA, Radka SF, Jackson TE, Weiss PA, Ganapathi R, Elson PJ, Capra WB, Parker VP, Lockridge JA, Cowens JW, Usman N, Borden EC. A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2005; 4 (6): 948-955.

Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov

Microbiological quality of pharmaceutical products

Meta Resnik, Janez Kerč

Povzetek: Farmacevtska industrija velja za eno najbolj reguliranih proizvodnih okolij, saj neposredno vpliva na zdravje človeka. Velik delež k temu prispeva tudi mikrobiološka kontrola farmacevtskih izdelkov, na katero vpliva bodisi okolje, v katerem jih izdelujemo, bodisi snovi, ki jih uporabljamo v farmacevtskih oblikah. V današnjem načinu proizvodnje, z zagotavljanjem kakovosti kot prvim pogojem izvajanja dobre proizvodne prakse, želimo z natančnimi postopki preprečiti mikrobo kontaminacijo v vseh izdelkih. Farmacevtska podjetja se trenutno srečujejo z zahtevno nalogo izvrševanja harmonizacije zahtev, ki naj bi kljub poenotenju nudile še močnejšo osnovo za zagotavljanje varnosti izdelkov. Poleg mikroorganizmov, ki so pomembni v farmacevtski industriji, so v članku predstavljeni ključni dejavniki, ki vplivajo na mikrobo kontaminacijo farmacevtskih izdelkov in različni testi za mikrobiološko kontrolo kakovosti izdelkov.

Ključne besede: mikrobiološka kontrola, mikrobna kontaminacija, limitni testi, test sterilnosti, harmonizacija

Abstract: Pharmaceutical industry is known to be one of the most regulated production environments because of its direct effect on human health. Microbiological quality control of pharmaceutical products contributes a huge part to this whether it is the production environment that mostly affects them or the substances which are used in the products. With quality assurance as the first approach of performing good manufacturing practice in today's production the aim is to prevent microbial contamination in every product. Nowadays pharmaceutical companies are dealing with pretentious implementation of harmonised regulations which would offer even better basis for product's quality. Besides microorganisms found in pharmaceutical industry, factors affecting microbial contamination, microbiological control and different tests are reviewed in the article.

Key words: microbiological quality control, microbial contamination, limit testing, sterility testing, harmonization

1 Mikroorganizmi, pomembni v farmacevtski industriji

Mikroorganizmi naseljujejo skoraj vsa okolja in so sposobni zelo hitrega razmnoževanja, kar pomeni, da jim izredna metabolna prilagodljivost omogoča menjavanje in naseljevanje novih ekoloških niš. Mednje uvrščamo bakterije (prokarioti) in arheje, ter glive, praživali in alge kot evkariotski tip mikroorganizmov (1).

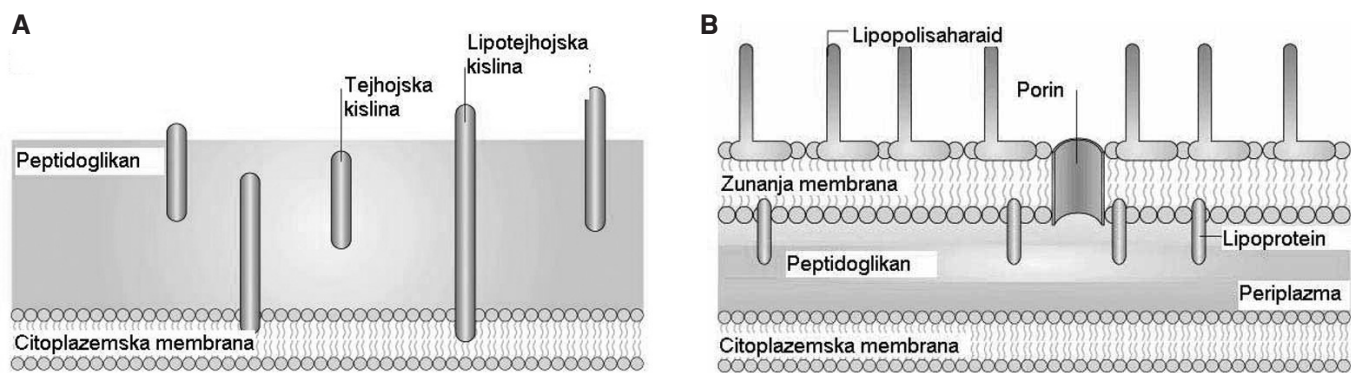
1.1 Bakterije

Bakterije so zelo pestra skupina organizmov, ki naseljujejo praktično vsa naravna okolja. Bakterijsko celico sestavljajo trije pomembni deli: tekoča citoplazma, citoplazemska membrana in celična stena, ki daje celici trdnost in rigidnost. Primarna identifikacija bakterij poteka na podlagi razlik v sestavi celične stene (Slika 1). Gram-pozitivne bakterije sestavlja debelejša plast peptidoglikana v steni (po Gramu se obarvajo modro), gram-negativne pa tanjša (rdeče obarvanje po Gramu). Bakterijski genom ponavadi predstavlja dvoverižna krožna DNK, vsebuje pa lahko tudi nekromosomske elemente kot so plazmidi, ki nosijo zapise za edinstvene lastnosti in se prenašajo z genskimi prenosilci. Nekatere vrste lahko oblikujejo dormantne oblike, t.i. spore, ki so zelo odporne in mirujoče strukture. Vsebujejo ves

dedni material, vendar niso metabolno aktivne. Prenesejo zelo neugodne pogoje, kot so izsušitve, razkužila (70% etanol) in visoke temperature (>100°C). Spore tvorijo sporogene bakterije kot npr. *Clostridium* in *Bacillus*. Razmnoževanje bakterij je nespolno, za rast pa nujno potrebujejo vodo, hranila, kisik, ustrezno temperaturo in pH okolja. Glede na potrebo po kisiku ločimo obligatne aerobe, fakultativne anaerobe, obligatne anaerobe, aerotolerantne anaerobe in mikroaerofile (1, 2).

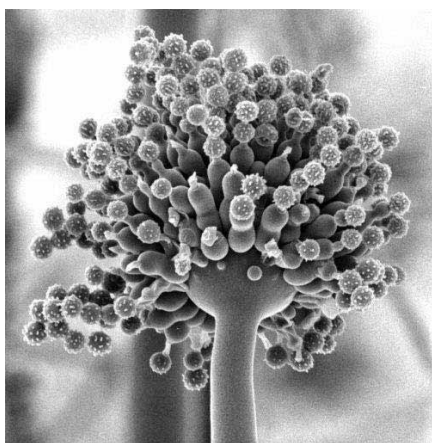
1.2 Glive

Glive najdemo v vodi, zemlji in zraku, prav tako so tudi del normalne flore pri ljudeh in živalih. Poznamo jih kot nižje (plesni, kvasovke) in višje glive (npr. gobe). Kvasovke so enocelični organizmi, večji od bakterij in se razmnožujejo s cepitvijo ali brstenjem. Micelij plesni sestavljajo filamentozne strukture - hife, na katerih nastajajo spolne ali nespolne oblike spor (Slika 2). Nekatere glive, npr. patogen *Candida albicans*, lahko fenotipsko preklapljajo med kvasno rastjo v nekaterih okoljih in filamentozno v drugih. Glive uspevajo počasneje kot bakterije, zmožne so rasti pri nižjih pH, prenesejo tudi visoke koncentracije sladkorja. Večina gliv ni patogena, a so zaradi odpornosti spor pomembne kot kontaminanti surovin, zlasti tistih naravnega izvora (1, 2).



Slika 1: Celična stena a) Gram pozitivnih bakterij in b) Gram negativnih bakterij (prirejeno po 3).

Figure 1: Cell wall of a) Gram positive bacteria and b) Gram negative bacteria. (adapted from 3).



Slika 2: Nespolne strukture Aspegillus niger (4).

Figure 2: Asexual structures of Aspegillus niger (4).

1.3 Virusi

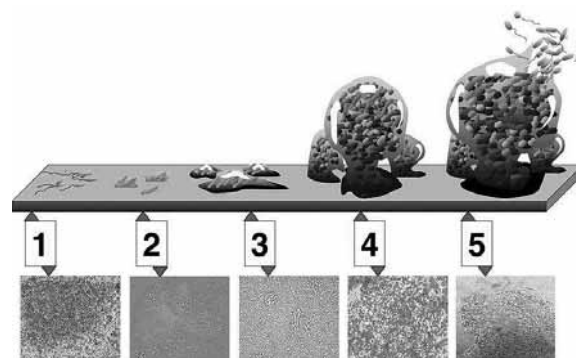
Viruse, viroide in prione uvrščamo med neživeče organizme, saj je njihov obstoj odvisen od gostitelja. V farmacevtskem kontekstu so pomembni zaradi izjemne odpornosti proti sterilizaciji – pari, gama sevanju in dezinficiensom (1, 2).

2 Viri mikrobne kontaminacije v farmacevtski industriji

Mikrobi v končnem izdelku lahko izvirajo iz surovin, opreme, uporabljene v proizvodnem postopku, vode, atmosfere, osebjia, ki sodeluje v procesu ali primarne ovojnine izdelka. Kontaminanti izdelkov so lahko patogeni ali nepatogeni, ki so sposobni rasti navkljub prisotnosti protimikrobnih sredstev. Večino prisotnih mikrobov uničimo s segrevanjem in dezinfekcijo, nekateri celični ostanki lahko kljub temu ostanejo toksični ali pirogeni (2, 5).

Zahteva za mikrobiološko kakovost surovin dovoljuje prisotnost določenega števila nepatogenih mikroorganizmov, če sta bila ovrednotena tveganje njihovega preživetja in s tem možnost kvarjenja končnega izdelka. Hkrati mora biti proučeno obnašanje

mikroorganizmov v prisotnosti protimikrobnih sredstev in učinkovitost uničenja mikrobov med procesom. Naravne surovine so lahko težavne zaradi samega izvora (rastlinskega, živalskega), načina pridobivanja, obdelave in pogojev shranjevanja, medtem ko so sintetične surovine manj problematične zaradi neugodnih pogojev med samo sintezo, možna pa je kasnejša kontaminacija npr. z okuženo vodo (2, 6).



Slika 3: Proces nastajanja bakterijskega biofilma. 1. povratna (reverzibilna) pritrnitev mikrobnih celic; 2. nepovratna (ireverzibilna) pritrnitev; 3. bujna rast mikrobnih celic in razvoj mikrobne kolonije; 4. razvoj zrelega biofilma; 5. delni razkroj biofilma in sprostitvev mikrobnih celic. Te mikrobne celice poiščejo nove površine za naselitev in ponovni razvoj biofilma (7).

Figure 3: Biofilm maturation. 1. initial (reversible) attachment; 2. irreversible attachment; 3. cell growth and maturation of microbial colony; 4. development of mature biofilm; 5. partial decomposition and dispersion of microbial cells. These cells then attach to new surfaces and mature into the biofilm again (7).

Mikrobna ekologija vode ima v farmacevtski industriji velik pomen zaradi mnogokratnosti njene uporabe, bodisi kot sestavine izdelkov ali kot čistilne in hladilne tekočine. Voda predstavlja življenjsko okolje za mikroorganizme in posledično deluje kot prenašalni vektor. Je med pogostejšimi vzroki mikrobne kontaminacij. V industrijski vodi se v

98% kontaminacij pojavljajo Gram-negativne bakterije (*Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacter* spp., *Chromobacter*, *Serratia* sp., enterobakterije,...), drugi najdeni izolati so še *Micrococcus* spp., *Cytophaga* spp., kvasovke, glive in aktinomycete (2). Zelo pomembno vlogo igra sposobnost pritrjevanja nekaterih mikroorganizmov na površino, kjer tvorijo biofilm (Slika 3). Ti se lahko formirajo v vodnih sistemih ali procesnih posodah in predstavljajo vir kontaminacije izdelka, povzročajo korozijo ter zmanjšujejo učinkovitost toplotnega prenosa. Biofilmi so ponavadi zelo odporne oblike mikrobne rasti, katerih ne uniči niti dezinfekcija (2, 5).

Zrak bolj kot naravno življenjsko okolje predstavlja za mikroorganizme prenašalni medij. V zrak se vnašajo s prašnimi delci, ki se dvigujejo zaradi aktivnosti v okolju, preko kože in obleke oseba ali z vlažnimi kapljicami slin. Vsebnost mikrobov v zraku se poviša tudi pri rokovanju s kontaminiranim materialom med pripravo farmacevtskih oblik (8). Najpogosteje v zraku zasledimo sporogene mikroorganizme, kot sta *Bacillus* in *Clostridium*, nesporogene *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium*, plesni *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* in kvasovke iz rodu *Rhodothorula* (1, 2).

V čistih prostorih osebje kljub zaščitni obleki povzroča dviganje delcev. Izvor okužbe so običajno mikroorganizmi, ki so del normalne človeške mikroflore respiratornega trakta in kože (2, 8). Posebno pozornost si zaslužita tudi *oprema* in *prostor*, zato je treba skrbeti da sta ustrezno očiščena, posušena, dezinficirana oz. sterilizirana, da sta iz primernega materiala (npr. oprema iz nerjavečega), s čimbolj gladkimi površinami (2).

Ovojnina ima z mikrobiološkega vidika vlogo, da ohranja izdelek neoporečen in preprečuje vstop mikroorganizmov ali vlage, hkrati pa sama ne sme predstavljati vira kontaminacije. Zelo primerni sta steklena in plastična ovojnina, saj sta primerni za pranje, preneseta višje temperature, čistilna sredstva in dobro tesnita. Neprimerna ovojnina je kartonska, ker lahko vsebuje glivne in bakterijske spore, ima hrapavo površino in je ne moremo prati (2).

Mikrobiološko testiranje spremlja sterilno in nesterilno farmacevtsko proizvodnjo in podpira razvoj izdelkov tako, da nadzira proizvodni proces in polnjenje, ter testira končne izdelke. Mikrobiološko testiranje torej zajema nadzor pogojev okolja (zrak, površine, medije in osebje), testiranje mikrobiološke obremenitve vstopnih surovin in ovojnine, testiranje prisotnosti bakterijskih endotoksinov (BET), neoporečnost shranjevanja in validacijo aseptičnega postopka polnjenja z gojiščem (9).

3 Vpliv mikroorganizmov na kakovost zdravil

Mikrobne združbe oblikujejo večji del naravnega procesa recikliranja biološkega materiala v okolju in razgradnja kompleksnih spojin se pojavi v ostrem boju za ekološko nišo. Mikrobna pokvarljivost farmacevtskih izdelkov je lahko rezultat preživetja patogenih mikroorganizmov, prisotnosti toksičnih mikrobnih metabolitov ali mikrobne rasti zaradi kemijske razgradnje sestavin farmacevtske oblike (2).

Za mikrobno kontaminacijo so občutljive farmacevtske sestavine kot so npr. *organski polimeri*. Mikrobi s specifičnimi ekstracelularnimi

encimi depolimerizirajo spojine v hranljive fragmente in monomere. Pod določenimi pogoji lahko tudi sintetični polimeri, ki naj bi veljali za bolj odporne, postanejo občutljivi na te procese. Hitro prilagodljive pseudomonade lahko izkoriščajo *površinsko aktivne snovi*. Prisotnost določenih mikroorganizmov v nesterilnih pripravkih lahko povzroči znižanje ali celo inaktivacijo *zdravilne učinkovine*. V nekatere izdelke vključujemo snovi z nizko molekulsko maso - *vlažila* (glicerol, sorbitol), ki zmanjšujejo izgubo vode. Če niso prisotni v višjih koncentracijah, jih mikroorganizmi lahko zelo hitro razgradijo. Tudi *maščobe in olja* so lahko tarča mikrobne razgradnje, ko so razpršene v vodi (O/V emulzije). *Sladila*, *ojačevalci okusa in barvila* so že same po sebi substrati za mikrobno rast. Če jih uporabimo v zelo visokih koncentracijah, znižujejo vodno aktivnost v tekočih izdelkih in inhibirajo mikrobno rast. *Konzervanse* uporabljamo kot protimikrobni sistem za farmacevtske izdelke zato, da med proizvodnim procesom in do konca roka uporabnosti inhibirajo rast potencialnih mikroorganizmov. Razgrajuje jih širok spekter gram negativnih bakterij. Problematični kontaminanti kot npr. pseudomonade so sposobne razgraditi konzervans tako, da izgubi protimikrobno delovanje. Farmakopeja predpisuje uradne metode za testiranje učinkovitosti konzervansov, za katere moramo preveriti učinkovitost proti potencialnim kontaminantom med uporabo izdelka kot tudi potencialnim medprocesnim kontaminantom (2, 5, 6, 10).

Zgodnje indikacije pokvarljivosti izdelka so ponavadi organoleptične, z zaznavnim neprijetnim vonjem in okusom metabolitov. Rast je lahko lokalizirana na površini v obliki filma ali neenakomerno porazdeljena po viskozem izdelku. Mikrobi lahko s svojimi pigmenti povzročijo tudi razbarvanje izdelka. Sredstva za zgoščevanje in redčenje depolimerizirajo, s tem izdelek izgubi viskoznost in suspendirane sestavine sedimentirajo. pH izdelka se spremeni glede na kislost oz. bazičnost metabolitov, ki se sproščajo ob razgradnji. Kemijske spremembe lahko tako modificirajo izdelek, da ga napadejo mikrobi, ki so bili s prvotnim pH inhibirani (2, 11).

3.1 Dejavniki, ki vplivajo na mikrobno kontaminacijo farmacevtskih izdelkov

Koncentracija prisotnih mikroorganizmov (inokulum) ni vedno pokazatelj možnosti za kvarjenje izdelka, saj nizka koncentracija kontaminanta še ne pomeni pokvarjenega izdelka, če se v njem ni sposoben razmnoževati. Nizka koncentracija pseudomonad na primer predstavlja večje tveganje kot visoka mikrobiološka obremenitev z glivnimi in bakterijskimi sporami (2, 11).

Preproste zahteve po *hranilih* in izjemna metabolna prilagodljivost omogočajo mikroorganizmom izrabo mnogih sestavin farmacevtskega izdelka kot substrat za biosintezo in rast. Naravne rastlinske in živalske snovi že same po sebi predstavljajo vir hranil, demineralizirana voda kljub odsotnosti hranil nudi še vedno ugodno okolje za rast Gram negativnih bakterij. Nepreživetje takšnih kontaminantov je bolj kot pomanjkanje hranil posledica fizikalno-kemijskih sprememb ali toksičnih učinkov. Za akutne patogene so farmacevtski izdelki neugodno okolje, kjer se sicer ne morejo razmnoževati, lahko pa ostanejo živi in infektivni za določen čas v trdnih farmacevtskih oblikah (2, 11).

Voda je nujno potrebna za rast mikroorganizmov. *Vodno aktivnost* tekočih oblik lahko znižamo z dodatkom visokih koncentracij sladkorjev, PEG ali s sušenjem. Na površini trdnih farmacevtskih oblik se lahko akumulira kondenzirana voda v obliki filma, ki je zelo ugoden za rast gliv (2, 15). Mikrobna rast v okolju je odvisna od razmerja oksidacij – redukcij (*redoks potenciala*), saj je potreben kompatibilen terminalni akceptor za sklenitev dihalnih poti (2). Kvarjenje farmacevtskih izdelkov se lahko pojavi v območju od -20°C do 60°C. *Temperatura shranjevanja* za sestavljene sirupe in večodmerne kapljice za oči je 8 - 12°C (hladilnik) zaradi zmanjšanja tveganja rasti mikroorganizmov med uporabo. Voda za injekcije naj bi se pred pakiranjem in sterilizacijo hranila pri 80°C, da se prepreči rast Gram negativnih bakterij (2, 11). Ekstremne *pH vrednosti* preprečujejo mikrobno rast. Nad pH 8 je rast mikrobov redka, pri izdelkih z nižjim pH pa je možen pojav plesni in kvasovk. Kvasovke lahko s presnavljanjem organskih kislin dvignejo pH, ki je potem ugoden za sekundarno bakterijsko rast (2). Poleg vseh opisanih dejavnikov ima tudi *ovojnina* pomemben vpliv na mikrobno stabilnost farmacevtskih oblik pri kontroli vstopa kontaminantov med shranjevanjem in uporabo (2).

Na preživetje mikroorganizmov velikokrat vpliva prisotnost relativno inertnih materialov, mikrobi so bolj odporni na vročino ali sušenje v prisotnosti polimerov (škrob, želatina). Adsorpcija na delce lahko pomaga pri preživetju mikroorganizmov v nekaterih okoljih (2).

4 Mikrobiološka kontrola kakovosti

V 60. letih prejšnjega stoletja so mikrobne kontaminacije predstavljale velik problem. Na Švedskem je npr. izbruhnila salmoneloza, kjer je bil

vir kontaminacije tiroidni prah (10, 11). V ZDA je leta 1965 več ljudi zbolelo za infekcijo s *Salmonello* zaradi jemanja kapsul, obarvanih s karminom (12), poznane so tudi kontaminacije raztopine jod-poloksamera s *Pseudomonas aeruginosa* (13), uroinfekcije pseudomonad s klorheksimidinom (14), metaproterenol sulfat inhalacijske raztopine, kontaminirane s *Pseudomonas gladioli/cepacia* (16). To je vodilo do podrobnejših raziskav in težnje za zmanjšanje kontaminacij ter večji nadzor in mikrobiološko kontrolo kakovosti sterilnih in nesterilnih farmacevtskih izdelkov in snovi za farmacevtsko uporabo.

4.1 Mikrobiološka kontrola sterilnih in nesterilnih farmacevtskih izdelkov in snovi za farmacevtsko uporabo

Proizvajalec mora zagotavljati nizko biološko obremenitev končnega izdelka s tem, da upošteva smernice dobre proizvodne prakse med proizvodnjo, shranjevanjem in distribucijo farmacevtskih izdelkov (9).

S farmakopejami so predpisane splošne zahteve za mikrobiološko testiranje sterilnih in nesterilnih zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi in izdelkov (17, 18, 19, 20). Izdelki so razvrščeni v posamezne skupine glede na način uporabe, ter učinkovine in pomožne snovi glede na namen uporabe (19), prav tako pa je določena pogostost testiranja in ustrezna metoda (17, 18).

Merilo sprejemljivosti za nesterilne farmacevtske izdelke se vrednoti na osnovi določanja skupnega števila aerobnih mikroorganizmov (ang. TAMC, total aerobic microbial count), skupnega števila plesni in kvasovk (ang. TYMC, total combined yeast/mould count) in odsotnosti specifičnih mikroorganizmov (Pregl. 1 in 2) (19).

Preglednica 1: Zahteve za mikrobiološko kakovost nesterilnih in sterilnih farmacevtskih oblik (19).

Table 1: Acceptance criteria for microbiological quality of non-sterile and sterile dosage forms (19).

Skupina / Način uporabe izdelka	TAMC (CFU/g oz. CFU/ml)	TYMC (CFU/g oz. CFU/ml)	Specifični mikroorganizmi
1 Parenteralni izdelki, oftalmiki	Testiranje sterilnosti		Odsotnost viabilnih mikroorganizmov
2A Inhalacijska uporaba (posebne zahteve za tekoče izdelke za razprševanje)	10 ²	10 ¹	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Na žolč odpornih gram negativnih bakterij
2B Izdelki za lokalno uporabo: Oromukozalna uporaba Gingivalna uporaba Dermalna uporaba Nazalna uporaba Aurikularna uporaba TTS izdelki* Vaginalna uporaba	10 ²	10 ¹	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i>
3A Tekoči izdelki za peroralno uporabo	10 ²	10 ¹	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Escherichia coli</i>
3B Trdni izdelki za peroralno uporabo Rektalna uporaba	10 ³	10 ²	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Escherichia coli</i> -

* TTS izdelki / transdermalni obliži (ang. transdermal therapeutic systems / transdermal patches)

Preglednica 2: Zahteve za mikrobiološko kakovost farmacevtskih izdelkov, ki vsebujejo snovi naravnega izvora in pripravke rastlinskega izvora (19).

Table 2: Acceptance criteria for the microbiological quality of dosage forms containing raw materials of natural origin and herbal medicinal products (19).

Skupina / Način uporabe izdelka	TAMC (CFU/g oz. CFU/ml)	TYMC (CFU/g oz. CFU/ml)	Specifični mikroorganizmi
4A Posebni predpis Ph. Eur.: Trdni izdelki za peroralno uporabo, ki vsebujejo sestavine naravnega izvora (živalskega, rastlinskega, mineralnega) in za katere predhodni postopek odstranjevanja mikroorganizmov ni mogoč. Kompeten ten regulatorni organ mora dovoljevati, da je začetni TAMC več kot 10^3 CFU/g oz. ml	10^4	10^2	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella</i> (v 10g oz. 10 ml) Ne več kot 10^2 CFU na žolč odpornih gram negativnih bakterij
Pripravki rastlinskega izvora, ki so sestavljeni iz ene ali več rastlinskih drog (celih, razdrobljenih ali v prahovih):			
4B Pripravki rastlinskega izvora, katerim se pred uporabo dodaja vre la voda	10^7	10^5	V 1g oz. ml: Ne več kot 10^2 CFU <i>Escherichia coli</i> → kvantifikacijski test za <i>E. coli</i>
4C Pripravki rastlinskega izvora, katerim se pred uporabo ne dodaja vre la voda	10^5	10^4	V 1g oz. ml: Ne več kot 10^3 CFU na žolč odpornih gram negativnih bakterij Odsotnost <i>Salmonella</i> (v 10g oz. 10 ml)

Harmonizirana poglavja priporočajo tudi ovrednotenje vpliva drugih mikroorganizmov, ki niso navedeni. V okviru pričakovanj ameriške agencije za zdravila (ang. FDA, Food and drug administration) predpisujejo odsotnost spornih mikroorganizmov, njihovo določanje pa zaupajo v roke posameznega podjetja in njihovega mikrobiološkega laboratorija (19, 22).

V skladu s harmonizirano verzijo farmakopeje se prvič pojavijo tudi splošne zahteve za mikrobiološko kakovost surovin (Pregl. 3) (19, 23).

Preglednica 3: Splošne zahteve za mikrobiološko kakovost surovin (19).

Table 3: Acceptance criteria for the microbiological quality of non sterile substances for pharmaceutical use (19).

	TAMC (CFU/g oz. ml)	TYMC (CFU/g oz. ml)
Surovine	10^3	10^2

4.2 Limitni testi

Izbira metode za določanje mikrobiološke kvalitete je odvisna od lastnosti izdelka, zahtev, protimikrobne učinkovitosti in količine vzorca na razpolago. Skupno število aerobnih mikroorganizmov (TAMC) in skupno število kvasovk in plesni (TYMC) določamo z metodami membranske filtracije, petrijevih plošč ali MPN metode (ang. Most probable number, metoda najbolj verjetnega števila) (17, 18).

Membransko filtracijo ponavadi uporabljamo za vzorce, ki vsebujejo protimikrobne snovi. Uporabljamo membranske filtre z nominalno velikostjo por ne večjo od $45 \mu\text{m}$. Po filtraciji filter obvezno spiramo s primernim tekočim medijem, katerega volumen in količina spiranja sta odvisna od velikosti filtra in protimikrobnih lastnosti vzorca, katerih vpliv je prav tako treba proučiti. Filter potem prenesemo na ustrezno gojišče za detekcijo mikrobov (17, 18). Pri metodi petrijevih plošč poznamo več izvedb. Metodo razmazovanja po površini gojišča (ang. spread plate), kjer vzorec nanese mo na površino gojišča in ga potem enakomerno razmažemo, ter metodo umešanja (ang. pour plate), pri kateri v prazno, sterilno petrijevko najprej dodamo ustrezno količino vzorca, nato pa dodamo utekočinjeno trdno gojišče, ohlajeno na 45°C , ter vsebino petrijevke nežno pomešamo (1). Metodo petrijevih plošč izvajamo vsaj v dveh paralelkah za posamezno gojišče (17). Metoda MPN je manj natančna metoda za vrednotenje mikrobov kot prejšnji dve, ker ni zanesljiva pri določevanju števila plesni. Zato jo uporabljamo za določevanje TAMC v primerih, ko uporaba druge metode ni možna oziroma za izdelke ali surovine z zelo nizko biološko obremenitvijo.

Uporabljamo lahko tudi alternativne metode, če le dokažemo primerljivost s klasičnimi metodami (21). Hitre mikrobiološke metode farmacevtskim podjetjem omogočajo boljše in hitrejše rezultate kot klasične metode, so lahko bolj učinkovite glede na stroške in izboljšujejo kvaliteto samega testiranja. V uporabi so neposredne ali posredne metode detekcije, ponekod je za povečanje signala potrebna tudi obogatitvena faza. Alternativne metode za kontrolo mikrobiološke kvalitete omogočajo kvalitativno, kvantitativno analizo,

ter identifikacijska testiranja. Razlikujemo jih glede na način detekcije celic oz. iskanih sestavin. Poznamo metode na osnovi mikrobne rasti, kjer povečanje signala dosežemo s kultivacijo celic (bioluminescenca, mikrokalorimetrija, turbidimetrija, metoda s fagi,...), direktne metode, kjer lahko posamezne celice ločimo med seboj in jih potem vrednotimo (fluorescentne tehnike, pretočna citometrija,...), analitske metode posameznih celičnih komponent, kjer iz izražanja določene komponente lahko sklepamo na prisotnost mikroorganizmov (fenotipske kot npr. masna spektrometrija, profiliranje maščobnih kislin, imunološke tehnike in genotipske metode z nukleinskimi kislinami npr. verižna reakcija s polimerazo, ribotipizacija) in komplementarne metode, ki združujejo klasične in alternativne tehnike (mikročipi) (21, 23).

4.3 Testiranje sterilnosti

Testiranje sterilnosti izvajamo za snovi, izdelke in predmete, za katere se po farmakopeji zahteva, da so sterilni. Pomembno je, da se testiranje izvaja v aseptičnih pogojih, ter da se skušamo čimbolj izogniti sekundarni kontaminaciji. Testiranje vključuje dve osnovni gojišči: tekoče tioglikolno gojišče se primarno uporablja za gojenje anaerobnih bakterij, prav tako lahko odkriva aerobne - inkubiramo ga 14 dni pri temperaturi 30 - 35°C, ter tekoče gojišče iz soje, ki je primerno za gojenje gliv in aerobnih bakterij - inkubiramo ga 14 dni pri temperaturi 20 - 25°C. Pomembno vlogo pri testiranju imajo tudi negativne kontrole, s katerimi zagotovimo, da pozitivni rezultati niso posledica kontaminacije gojišča (20).

Pri testiranju sterilnosti uporabljamo metodi membranske filtracije in direktne inokulacije v gojišče. Izbira metode je odvisna od lastnosti izdelka in vrste farmacevtske oblike, pri čemer mora imeti prednost metoda membranske filtracije. Uporabljamo membranske filtre z nominalno velikostjo por ne večjo od 45 µm. Za filtracijo vodnih, oljnih in šibko alkoholnih raztopin uporabljamo celulozno nitratne filtre, za filtracijo močno alkoholnih raztopin celulozno acetatne filtre, posebej prilagojene filtre pa uporabljamo za posamezne specifične izdelke (npr. antibiotike). Testiranje izvajamo pri aseptičnih pogojih, treba je tudi nevtralizirati morebitne protimikrobne aktivnosti z večkratnimi spiranji ter membrano prenesti v primerno gojišče ali dodati ustrezno gojišče v samo filtrsko enoto za inkubacijo. Analizirati moramo vsaj minimalno določeno količino vzorca. Aseptične pogoje lahko dosežemo v komori razreda A z laminarnim pretokom zraka, katera je postavljena v prostor razreda čistosti B, najlažje pa se sekundarni kontaminaciji izognemo z delom v izolatorju (24).

5 Harmonizacija predpisov

V zadnjih dveh desetletjih sta globalizacija in širjenje mednarodne trgovine postavile tudi farmacevtsko industrijo pred izzivalno nalogo, da razvije celovite standardne kakovosti, ki bi upravljali zahtevna področja registracij, nadzora trga in prostega pretoka zdravil med čimveč možnimi državami. V tej težnji se je začela uresničevati ideja harmonizacije treh večjih farmakopej, evropske, ameriške in japonske.

Harmonizacija predpisov je prinesla spremembe tudi v mikrobiološko testiranje farmacevtskih izdelkov. Poleg uvedbe novih parametrov (TAMC, TYMC) in uvajanja harmoniziranih analitskih metod so največji

kompromis zagotovo testiranja za specifične mikroorganizme (22, 25). Spremenile so se tudi zahteve za interpretacijo mejnih vrednosti, s tem pa posredno povzročile zaostrovanje (ožanje mej) specifikacij izdelkov. Trenutno poteka faza uvajanja novosti harmonizirane izdaje, kar za podjetja pomeni zelo obširen proces revalidacije obstoječih metod in usklajevanja specifikacij za njihove izdelke (25, 26).

Sprejemanje zahtev za največje trge se vseeno razlikuje glede na napotke posameznih regulatornih organov. Medtem ko harmonizirana poglavja lahko zamenjajo poglavja v japonski farmakopeji z odobritvijo japonskega ministrstva za zdravje, delo in blaginjo, bo ameriška agencija za hrano in zdravila lahko zahtevala dokaz ustreznosti izbrane metode za posamezen material oz. izdelek neodvisno od osnovne metode opisane v ameriški farmakopeji. Podjetja morajo za evropski trg upoštevati monografije iz evropske farmakopeje, harmonizirane zahteve pa se lahko uporabijo le kot dopolnitev (27).

Vključevanje zahtev in posodabljanje metod je naloga specifičnih združenj strokovnjakov, ki postopoma uresničujejo harmonizacijo. Prednost je vseeno ta, da se poleg obveznih predpisov pušča prostor za najboljšo individualno prilagoditev oz. rešitev, ki najbolj ustreza posameznemu podjetju in je v rokah njegovega mikrobiološko usposobljenega osebja.

6 Sklep

Mikrobiološka kontrola kakovosti predstavlja nepogrešljiv del vsakega farmacevtskega podjetja. Njena vloga je nadzor kakovosti proizvodnih in sterilizacijskih procesov ter končnih izdelkov. Poenotenje predpisov največjih svetovnih farmacevtskih trgov pomeni njihovo regulatorno zblíževanje, v tako kompleksnem procesu pa je najpomembnejše ohraniti osnovni cilj farmacevtskih podjetij, da zagotavljajo učinkovita, kakovostna in varna zdravila.

7 Literatura

1. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 10th ed., Prentice Hall, Pearson Education, New Jersey 2003.
2. Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP, Hugo & Russell's Pharmaceutical microbiology. 7th ed., Blackwell, Oxford 2004.
3. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. Nature Rev Micr 2005; 3: 601-610.
4. <http://kacatko.wordpress.com/2008/11/16/mykotoxiny-hrozba-ci-plany-poplach/>. Dostopano: 29.06.2009
5. Winkowski K. Controlling microbial contamination. Paint & coatings industry 2002: 60-67.
6. de la Rosa MC, Medina MR, Vivar C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. Pharmaceutica Acta Helvetiae 1995; 70: 227-232.
7. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. PLoS Biol 2007; 5(11): 2458-2461.
8. Ljungqvist B, Reinmueller B. Predicted contamination levels in cleanrooms: When cleanroom-dressed people are the contamination source. Pharmaceutical technology, Aseptic processing 2006: 18-22.
9. Flickinger B. Drug-resistant pathogens drive a more concerted effort against microbial contamination. Cleanrooms 2006: 16-21.
10. Kallings LO, Ringerts O, Silverstolpe L. Microbiological contamination of medical preparations. Acta Pharm Scand 1966; 3: 219-228.
11. http://www.pharmmedia.com/Stability_Of_Drugs:Microbiological_Stability. Dostopano: 29.06.2009.
12. Lang DJ, Kunz LS, Martin AR et al. Carmine as a source of nosocomial salmonellosis. New Eng J Med 1967; 276: 829-832.

13. Berkelman RL, Anderson RL, Davis BJ e tal. Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 752-756.
14. Mitchell RG, Hayward AC. Postoperative urinary tract infection caused by contaminating irrigation fluid. *Lancet* 1966; 9i: 793-795.
15. Martinez EJ. Microbial bioburden on oral solid dosage forms. *Pharm tech* 2002: 58-70.
16. FDA. IGS: Guide to inspections of microbiological pharmaceutical quality control laboratories, fda.gov/ora/Inspect_ref/igs/micro.html. Dostopano: 29.06.2009.
17. European Pharmacopoeia, 6th Ed, Suppl. 6.5: 2.6.12 Microbiological examination of non sterile products, microbial enumeration tests. EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3923-3927.
18. European Pharmacopoeia, 6th Ed, Suppl. 6.5: 2.6.13 Microbiological examination of non sterile products, tests for specified microorganisms. EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3927-3931.
19. European Pharmacopoeia, 6th Ed, Suppl. 6.5: 5.1.4 Microbiological quality of non sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use, EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3957-3958.
20. European Pharmacopoeia, 6th Ed, Suppl. 6.5: 2.6.1 Sterility, EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3919-3922.
21. European Pharmacopoeia, 6th Ed, Suppl. 6.5: 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality. EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008:532-543.
22. Sutton S. The harmonization of the microbial limits tests. *Pharm tech* 2006. <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Microbiological+testing/The-Harmonization-of-the-Microbial-Limits-tests/ArticleStandard/Article/detail/390985>. Dostopano: 29.06.2009.
23. Moldenhauer J. Rapid microbiological methods and the PAT initiative. *BioPharm Intl* 2005; 18(12): 31-46.
24. Agalloco J. Importance of background microbial levels in the manufacture and testing of sterile products. *Pharm tech* 2005: 74-80.
25. McAteer F. Pharmaceutical microbiology: Harmonization of microbial limits test for nonsterile products. *Cleanrooms* 2007: 30-31.
26. Bombles L, Weiss C, Beckmann G. Examination of microbiological quality of pharmaceutical raw materials. *Pharmeuropa scientific notes* 2007; 1:1-7.
27. Q4B evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions, Annex 8: Sterility test general chapter. Bruselj, 2008, <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM127798.pdf>. Dostopano: 22.01.2010.

Kokristali zdravilnih učinkovin

Co-crystals of active pharmaceutical ingredients

Borut Kovačič, Odon Planinšek, Franc Vrečer

Povzetek: Zdravilne učinkovine lahko obstajajo v trdnem stanju v različnih oblikah, ki se med seboj razlikujejo po fizikalno-kemijskih in farmakoloških lastnostih. Lastnosti zdravilne učinkovine na molekularnem nivoju tradicionalno spreminjamo s tvorbo soli, izolacijo različnih polimorfnih, psevdopolimorfnih ali amorfne oblike. Zadnja leta se kot dodatna možnost uveljavlja izdelava farmacevtskih kokristalov. Z njimi lahko pridobimo nove kristalne strukture zdravilne učinkovine in s tem spremenimo njene lastnosti, ki so pomembne za razvoj in učinkovitost zdravila: topnost, hitrost raztapljanja, temperatura tališča, higroskopnost, kemijska stabilnost, mehanske lastnosti itd. Farmacevtski kokristal je sestavljen iz zdravilne učinkovine in tvorilca kokristala, ki je lahko ena od t.i. »varnih substanc« oziroma splošno uporabljena farmacevtska pomožna snov. Kokristali so zanimivi tudi z vidika intelektualne lastnine, saj kokristalizirana zdravilna učinkovina lahko v primerjavi s čisto obliko izkazuje izboljšane lastnosti, hkrati pa zaradi različnosti strukture potencialno zadostuje kriteriju novosti in inventivnosti, kar pomeni, da jih farmacevtsko podjetje lahko patentno zaščiti in s tem vpliva na situacijo na trgu zdravil.

Ključne besede: kokristalizacija, farmacevtski kokristali, lastnosti snovi v trdnem stanju.

Abstract: Active pharmaceutical ingredients (API) are found in different solid state forms, which differ in their physicochemical and pharmacological properties. Properties of API on molecular scale has been traditionally limited to salt formation, isolation of different polymorphs, pseudopolymorphs or amorphous form, but in the last few years formation of pharmaceutical cocrystals has emerged as an additional alternative. By preparing pharmaceutical cocrystals new crystal forms are created for certain drug molecule and they can lead to altering the properties, which are important for drug development and efficacy: solubility, dissolution rate, melting point, hygroscopicity, chemical stability, mechanical properties etc. Pharmaceutical cocrystal is composed of API and cocrystal former, that can be chosen among so called »safe substances« or any other widely used pharmaceutical excipient. Cocrystals are also gaining interest from the point of view of intellectual property. Cocrystallized API can exhibit improved properties and potentially satisfies the criteria of novelty and inventiveness, which means that a pharmaceutical company can issue a patent and influence the drug market.

Key words: cocrystallization, pharmaceutical cocrystal, solid-state properties.

1 Uvod

Zdravilne učinkovine so pri sobnih pogojih večinoma v trdnem agregatnem stanju v kristalni obliki in so najpogosteje vgrajene v trdne farmacevtske oblike – tablete ali kapsule. Farmakokinetične lastnosti zdravilne učinkovine so pogosto odvisne od njenih fizikalno-kemijskih lastnosti, znano pa je, da lahko posamezna zdravilna učinkovina obstaja v različnih oblikah kot so soli, različne kristalne oblike (polimorfi, psevdopolimorfi) in amorfna oblika, katerih kemijske in fizikalne lastnosti se lahko bistveno razlikujejo. Z metodo čiščenja in izolacije (kristalizacije) zdravilne učinkovine lahko vplivamo na njene fizikalne in kemijske lastnosti. Amorfna oblika zdravilnih učinkovin se hitreje in predvsem bolje raztaplja (višja topnost) od kristalnih oblik, vendar jih redko zasledimo v farmacevtskih izdelkih zaradi slabše kemijske in fizikalne stabilnosti oziroma težnje po kristalizaciji. Različne kristalne oblike (polimorfi) zdravilne učinkovine se lahko med seboj razlikujejo v temperaturi tališča, topnosti, stabilnosti, hitrosti raztapljanja, intrinzični topnosti, biološki uporabnosti, obliki delcev,

gostoti, barvi in stisljivosti. Termodinamično bolj stabilna oblika (višje temperatura tališča) je slabše topna od termodinamično manj stabilne oblike. Variranje kristalne oblike zdravilne učinkovine je tako eden od načinov za prirejanje njenih fizikalno-kemijskih lastnosti (1-3). Pri tem se moramo zavedati, da lahko topnost s spreminjanjem kristalne oblike spreminjamo samo v omejenem območju (v literaturi najdemo primere, kjer je razlika v topnosti med najbolj in najmanj topno kristalno obliko manj kot 10-kratna), medtem, ko lahko topnost z uporabo amorfne oblike povečamo tudi za več kot 1.000-krat (4).

Kokristalizacija ponuja dodatne možnosti in ima velik potencial za pripravo novih, stabilnih struktur, s katerimi lahko izboljšamo lastnosti zdravilnih učinkovin (3, 5). V nasprotju s polimorfi, ki imajo enako kemijsko strukturo, so kokristali spremenjene kemijske entitete, ki nastanejo z interakcijo dveh ali več različnih molekul. Po svoji strukturi so kokristali najbližje solvatom saj gre v obeh primerih za heteromolekularne strukture, pri čemer je osnovna razlika med obema v agregatnem stanju. Pri kokristalih sta tako zdravilna učinkovina kot tvorilec kokristala pri normalnih pogojih v trdnem stanju, pri solvatih

Borut Kovačič, mag. farm., Krka d.d. Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

Izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

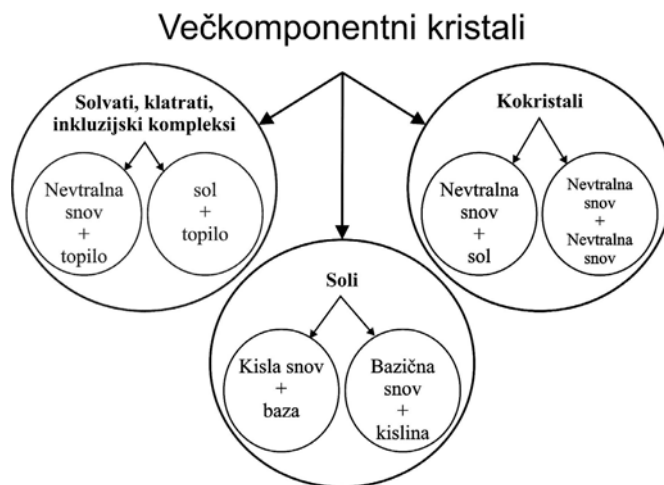
Izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm., Krka d.d. Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto, Slovenija in Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

pa je ena komponenta v tekočem stanju. V primerjavi z različnimi kristalnimi oblikami, lahko z izdelavo kokristalov dosežemo večje razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih zdravilne učinkovine. Lastnosti, ki so pomembne za farmacevtsko uporabo zdravilne učinkovine in jih lahko »prirejamo« s tvorbo kokristala, so temperatura tališča, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost, higroskopnost, mehanske lastnosti in biološka uporabnost (5).

2 Farmacevtski kokristali

Kokristali spadajo v skupino t.i. večkomponentnih kristalov, kamor glede na naravo molekul v kristalni rešetki uvrščamo tudi solvate, klatrate, inkluzijske komplekse in soli (slika 1) (6). Izraz »kokristal« se je že leta 1968 pojavil v znanstveni literaturi, ko so avtorji opisali večkomponentni kristal, ki je sestavljen iz pirimidina in purina (7, 8). Zaenkrat še nimamo enotne definicije pojma »kokristal«, saj v literaturi naletimo na različne definicije s strani različnih avtorjev (preglednica 1) (9-18). V splošni definiciji lahko povzamemo, da so kokristali enotne kristalinične snovi, njihovo kristalno rešetko sestavljajo nevtralne komponente (molekule) v stehiometrijskem razmerju (ponavadi 1:1, 1:2 ali 1:3) in so pri sobnih pogojih v trdnem agregatnem stanju. Najpogosteje je kokristal sestavljen iz dveh molekul, t.j. iz tarčne molekule in tvorilca kokristala. Zasledimo pa tudi kokristale, ki so sestavljeni iz treh ali več molekul, v tem primeru je ponavadi tarčna molekula v obliki solvata ali soli (16, 19, 20).

V farmacevtskem kokristalu nastopa zdravilna učinkovina kot tarčna molekula, tvorilec kokristala pa je lahko neaktivna snov ali druga zdravilna učinkovina. Tvorilci kokristala, ki so primerni za farmacevtsko uporabo, so lahko mnoge uveljavljene pomožne snovi, ki se uporabljajo v farmacevtski ali prehrabeni industriji, oziroma so lahko to substance, ki jim FDA dodeli oznako GRAS (angl. generally regarded as safe- splošno varne substance) (17, 21).



Slika 1: Klasifikacija večkomponentnih kristalov. Prirejeno iz (6).

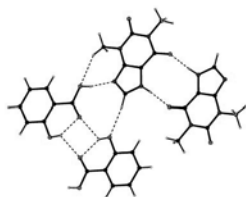
Figure 1: Classification of multicomponent crystals. Adapted from (6).

Preglednica 1: Definicije kokristala in farmacevtskega kokristala*.

Table 1: Definitions of a cocrystal and pharmaceutical cocrystal*.

Avtor	Definicija kokristala	Lit. vir
Desiraju, 2003	»večkomponentne kristale, v katerih so molekule med seboj povezane s specifičnimi nekovalentnimi interakcijami, ne moremo imenovati kokristali, temveč molekulski kompleksi«	9
Dunitz, 2003	»kristalinični molekulski kompleksi, solvati, inkluzijske zmesi, klatrati in druge vrste večkomponentnih kristalov, v katerih so raznovrstne molekule med seboj močnejše povezane kot v enostavnih zmeseh«	10
Aakeröy, 2005	»snov, ki je zgrajena iz posameznih nevtralnih molekulskih vrst; ioni in ioni kovin prehoda so izključeni« »sestavljani so iz reaktantov, ki so trdni pri sobni temperaturi« »strukturno homogena kristalinična snov, ki vsebuje dva ali več komponent v stehiometrijskem razmerju«	11
Jones, 2006	»kristalinični kompleks dveh ali več nevtralnih molekularnih komponent, ki so povezane v kristalno rešetko z nekovalentnimi povezavami, pogosto z vodikovo vezjo«	12
Bond, 2007	»sinonim za večkomponentni molekulski kristal«	13
Childs, 2007	»kristalinična snov iz dveh ali več komponent (atom, ion ali molekula), ponavadi v stehiometrijskem razmerju«	
Stahly, 2007	»molekulski kompleks, ki vsebuje dve ali več različnih molekul v skupni kristalni rešetki«	15
Nangia, 2008	»večkomponentna tvorba v trdnem stanju, ki jo sestavljata dve ali več komponent in so povezane z eno ali več medmolekulskimi interakcijami«	16
Zaworotko, 2006	* »sestavljani so iz molekularne ali ionske zdravilne učinkovine in tvorilca kokristala, ki je v trdnem agregatnem stanju pri sobnih pogojih«	17
Schultheiss, 2009	* »sestavljani so iz nevtralne ali ionske zdravilne učinkovine in nevtralnega tvorilca kokristala, ki sta povezana z nekovalentnimi, prosto reverzibilnimi povezavami« »tvorilec kokristala je lahko farmacevtsko sprejemljiva snov« »vsaj ena značilna fizikalnokemijska lastnost«	18

Raznovrstne molekule v kokristalu povezujejo nekovalentne interakcije, med katere prištevamo vodikove vezi, koordinacijske vezi, halogenske vezi, hidrofobne interakcije, van der Waalsove vezi, π - π interakcije in elektrostatske vezi (npr. dipol-dipol) (22). Zaradi jakosti in usmerjenosti je vodikova vez najpomembnejša interakcija v kokristalni formaciji (slika 2) (19, 23). Strukturne enote oz. funkcionalne skupine, ki povezujejo molekule med seboj z nekovalentnimi povezavami, imenujemo sintoni. V farmacevtskih in bioloških sistemih sta pomembna sintona karboksilni dimer O-H...O pri karboksilnih kislinah in karboksamidni dimer N-H...O pri amidih (5). V primeru, da je v molekuli zdravilne učinkovine in tvorilca kokristala prisotnih več funkcionalnih skupin, obstaja večja možnost tvorbe farmacevtskega kokristala (24). Analiza 100 najpogostejše predpisovanih zdravilnih učinkovin je pokazala, da ima 39% zdravilnih učinkovin vsaj eno nevtralno hidroksilno skupino in 30% jih ima vsaj eno karboksilno skupino, kar se tudi ujema z deležem učinkovin s hidroksilno ali karboksilno skupino, ki so navedene v Merckovem indexu (25-27).



Slika 2: Primer kokristala teofilin:salicilna kislina: molekuli sta povezani v skupno kristalno strukturo z vodikovimi vezmi (prekinjene črte) preko funkcionalnih skupin (23).

Figure 2: An example of theophylline:salicylic acid: molecules are connected together in crystal structure with hydrogen bonds (dotted lines) via functional groups (23).

3 Pomen in lastnosti farmacevtskih kokristalov

Četudi so kokristali že dolgo znani (7, 8), pa se je zanimanje zanje povečalo konec 80ih let 20. stoletja z odkritjem, da je kokristale možno uporabiti v supramolekulski kemiji, za organsko sintezo brez uporabe topil oz. sintezo v trdnem stanju, v tehnologiji nelinearne optike (NLO) in za razvijanje fotografskih filmov (28-31). Tudi farmacevtski kokristali so še relativno slabo raziskani, vendar pa farmacevtska znanost in industrija kažeta zanje vedno večje zanimanje ravno zaradi številnih novih možnosti pri razvoju zdravil. Največji potencial kokristalov so možnosti za izboljšanje lastnosti zdravilnih učinkovin brez kemijske spremembe molekule (5,17,32,33).

Zdravilne učinkovine tradicionalno uporabljamo v obliki soli, polimorfov, solvatov oziroma hidratov, s čimer želimo vplivati na fizikalno-kemijske lastnosti. Pri tem se srečujemo z različnimi težavami in omejenim naborom ustreznih protioionov ali topil (6, 34).

Pri farmacevtskih kokristalih teoretično obstaja večje število potencialnih tvorilcev kokristala za določeno zdravilno učinkovino in s tem večje možnosti za prirejanje fizikalno-kemijskih lastnosti. Spremenjene lastnosti lahko večinoma razložimo kot posledico

spremenjene lege molekule v kristalni rešetki in medmolekulskih povezav ter so zelo odvisne od lastnosti tvorilca kokristala. Lastnosti, ki so pomembne za farmacevtsko uporabo zdravilne učinkovine in ki jih lahko spreminjamo s tvorbo kokristalov so:

- **Temperatura tališča:** Kokristali imajo temperaturo tališča različno od temperature tališča posameznih komponent (5, 35, 36). Zanimivo je tudi, da pod to temperaturo ni nobenih drugih termičnih dogodkov. S tem, ko s tvorbo kokristala znižamo temperaturo tališča zdravilne učinkovine, se lahko izognemo težavam, povezanih z njeno termolabilnostjo v procesih, ki potekajo pri višjih temperaturah, t.j. v talini (5).
- **Hitrost raztapljanja, topnost, biološka uporabnost:** V raziskavah določanja hitrosti raztapljanja kokristalov se je izkazalo, da se pri raztapljanju težko topna zdravilna učinkovina v kokristalu lahko obnaša podobno kot čista amorfna oblike zdravilne učinkovine in lahko doseže tudi do 20-krat višjo koncentracijo v primerjavi s čisto kristalinično obliko (primer itrakonazol (37)), kljub temu, da ima čista kristalinična oblika manjše delce (35). Pri tem lahko nastane prenasočena raztopina zdravilne učinkovine v mediju. Kokristali, nasprotno kot amorfni, ne vplivajo samo na kinetiko raztapljanja, temveč tudi na ravnotežno topnost. Literaturni podatki kažejo, da je to povečanje manj izrazito kot v primeru soli zdravilnih učinkovin (28). Topnost in hitrost raztapljanja kokristalizirane zdravilne učinkovine sta v veliki meri odvisni od tvorilca kokristala. V primeru kokristalov fluoksetinijevega klorida se je izkazalo, da je kokristal z benzojsko kislino slabše topen, kokristal s fumarno kislino rahlo bolje topen, medtem ko učinkovina v kokristalu z jantarno kislino takoj doseže dvakrat višjo koncentracijo, preden se pretvori v stabilno obliko in doseže ravnotežno topnost čiste učinkovine (20).

Eden od vzrokov za povečano hitrost raztapljanja in topnost je lahko sprememba pH medija, v katerem poteka test raztapljanja med raztapljanjem ene od komponent. Še posebej to velja za učinkovine, ki ionizirajo v vodi ali imajo pH-odvisno topnost in ko je izbrani medij nepufirana vodna raztopina ali kar sama voda (5, 18, 20). V pufranih medijih pa je povečana topnost zdravilne učinkovine lahko posledica solubilizacijskega učinka raztopljenega kokristalnega partnerja oz. tvorbe bolj topnega kompleksa; slabša topnost pa je lahko posledica doseženega topnostnega produkta zaradi raztapljanja kokristalnih komponent (38). V primeru kokristalov, ki imajo nižjo ali višjo temperaturo tališča, lahko sklepamo na šibkejše ali močnejše medmolekulske povezave, kar vpliva na hitrost disociacije kokristala in s tem na hitrost raztapljanja (18). Farmakokinetične študije na psih potrjujejo, da lahko z ustrezno kokristalizacijo slabo topne in dobro permeabilne zdravilne učinkovine, zaradi katere se ta hitreje raztaplja in ima višjo topnost, izboljšamo absorpcijo in biološko uporabnost zdravilne učinkovine (35).

- **Higroskopnost:** Molekule so v kokristalu med seboj povezane v enotno kristalno rešetko na način, ki temelji na komplementarnosti funkcionalnih skupin in vodikovih vezi, kar v nekaterih primerih inhibira proces vgradnje molekule topila, ki prav tako temelji na komplementarnosti sistema (5). Basavoju s sodelavci je pripravil kokristal indometacin-saharin v stehiometrijskem razmerju 1:1, ki je nehigroskopen v primerjavi s čistim indometacinom. Pri merjenju

dinamične sorpcije vlage (Dynamic vapour sorption – DVS) se je izkazalo, da nastali kokristal veže zanemarljivo količino vode (<0,05%) pri 95% relativni vlažnosti, kar je manj kot v primeru stabilne oblike indometacina (0,07%) ali v primeru fizikalne zmesi indometacina in saharina (0,10%) (36). Pojav manjše higroskopnosti kokristalov v primerjavi s čisto učinkovino ni pravilo. Tako so Trask in sodelavci ugotovili, da kokristal kofeina in oksalne kisline ni higroskopen, medtem ko kokristali kofeina z malonsko in maleinsko kislino vežejo vodo, pri čemer kokristal razpade in nastane hidrat kofeina (39).

- **Kemijska stabilnost:** Tvorba kokristala v določenih primerih izboljša kemijsko stabilnost zdravilne učinkovine, če je stabilnost oz. nastanek razpadnega produkta pogojena z določeno konformacijo molekule v trdnem stanju. V primeru molekule karbamazepin je fotokemijska stabilnost molekule odvisna od strukture kristala in razporeditve molekul v njem. Spremenjena konformacija molekule v kokristalu je razlog za izboljšano kemijsko stabilnost te učinkovine (5).
- **Mehanske lastnosti:** Oblika kristalov in velikost delcev zdravilne učinkovine sta pomembni lastnosti trdnih kristaliničnih snovi, ki lahko vplivajo na razvoj in proces izdelave zdravil (pretočne lastnosti, stisljivost, sedimentacija, hitrost raztapljanja) (40). Zaradi drugačne notranje strukture kristala se lahko spremeni tudi zunanja oblika ali morfologija in s tem mehanske lastnosti delcev, vendar se moramo pri tem zavedati, da ima na obliko delcev zelo velik vpliv postopek kristalizacije (40, 41). Ob enakih pogojih (ko)kristalizacije norfloksacina v prisotnosti saharina so nastali delci norfloksacinijevega saharinata dihidrata (sol), ki so imeli obliko dolgih, tankih iglic, hkrati pa so nastali tudi delci kokristala norfloksacin saharinat:saharin (kokristal soli in nevtralne molekule) v obliki dolgih, ploščatih iglic (19).
- **Farmakološke lastnosti:** Kot smo omenili, tvorba kokristalov lahko vpliva na večjo hitrost raztapljanja in s tem tudi na biološko uporabnost, kar pomeni, da dosežemo višjo koncentracijo zdravilne učinkovine v plazmi kot po aplikaciji istega odmerka čiste učinkovine in s tem močnejši učinek.

Leta 2007 je FDA prejela pritožbe lastnikov domačih živali zaradi številnih poginov živali, ki jo je povzročila hrana. Vzrok smrti je bila ledvična odpoved. Po preiskavi so odkrili, da sta okvaro ledvic povzročili dve relativno netoksični substanci – melamin in cianurska kislina, ki sta bili v hrani prisotni v manjši količini, kot je toksični odmerek. Naknadne raziskave so pokazale, da je kokristal melamin:cianurska kislina 1:1 praktično netopen v vodi in zato pride do obarjanja kokristala v ledvicah, kar je povzročilo zamašitev ledvičnih tubulov (33).

4 Metode oblikovanja (dizajniranja) in priprave kokristalov

Kristalizacija večkomponentnih kristalov v stehiometrijskem razmerju je rezultat različno močnih povezav, ki povzročajo agregacijo istovrstnih molekul – homomeri in med različnimi molekulami – heteromeri (5). Kokristali lahko nastanejo naključno, če sta v zmesi

komplementarni komponenti, ki se med seboj lahko povežeta v urejeno strukturo preko vodikovih ali drugih nespecifičnih nekovalentnih vezi. V primeru t.i. »inženiringa kristalov« oz. načrtovane priprave farmacevtskih kokristalov, pa je ponavadi prvi korak analiza obstoječih kristalnih oblik. Ta se ponavadi izvrši z uporabo *Cambridgeove strukturne podatkovne baze* (angl. Cambridge Structural Database - CSD), ki nam posreduje statistično analizo kristalnih oblik in razporeditve molekul v kristalu in s tem poda empirično informacijo o tem, kako so orientirane funkcionalne skupine in kakšne so možnosti medmolekulskih povezav preko supramolekulskih sintonov (17). Ko je izbrana učinkovina za kokristalizacijo, je potrebno izbrati pomožno snov z ustrežno strukturo. Sposobnost zdravilne učinkovine in tvorilca kokristala, da se vgradita v kokristal, je povezana z njunima molekulskima strukturama, lego molekul v kristalu, možnostjo nastanka vodikovih vezi in gibljivostjo molekul, zato ni mogoče zagotovo napovedati, ali bo med dvema komponentama potekla kokristalizacija. Zaenkrat so potrebni empirični poskusi (5). Razvoj kokristalov lahko racionaliziramo, če upoštevamo pravila tvorbe vodikovih vezi med trdnimi komponentami (17):

1. Vsi dobri donorji in akceptorji protona sodelujejo pri tvorbi vodikove vezi.
2. Šest-členski obroč, ki ga tvorijo medmolekulske vodikove vezi, nastane lažje kot znotrajmolekulske vodikove vezi.
3. Najboljši donorji in akceptorji protona, ki ostanejo prosti po tvorbi medmolekulskih vezi, tvorijo znotrajmolekulske vodikove vezi med seboj.

Upoštevanje teh pravil nam olajša izbiro komplementarne komponente, saj bo tako večja verjetnost tvorbe medmolekulskih vodikovih vezi in s tem možnost vgraditve obeh komponent v kokristal. Omenimo lahko, da v opisanih kokristalih najpogosteje nastopa ena molekula s karboksilno skupino in druga z dušikovim heterociklom v strukturi (preglednica 2).

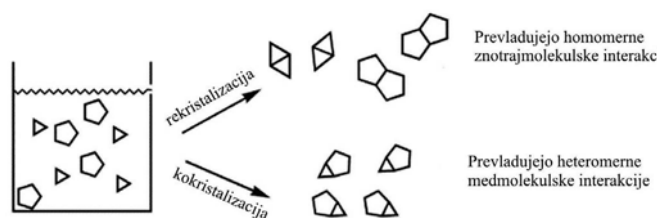
Kokristale najpogosteje pripravimo z obarjanjem raztopljenih komponent ali z mletjem zmesi komponent (5):

Kokristalizacijo iz raztopin najpogosteje izvajamo z metodo počasnega odparevanja topila iz raztopine z ekvimolarnim oz. stehiometrijskim razmerjem koncentracij kokristalnih komponent. Lahko uporabimo tudi metodo, pri kateri najprej raztopimo komponente pri višji temperaturi, nato pa raztopino ohlajamo, da poteče kristalizacija (5). Pri kokristalizaciji iz raztopine je pomembno, da imata obe komponenti podobno topnost, drugače se najprej obori le manj topna komponenta. Priporočljivo je, da uporabljamo za kokristalizacijo tiste učinkovine in pomožne snovi, ki lahko tvorijo več polimorfnih oblik. Če obstaja molekula v več polimorfnih oblikah, ima večjo strukturno fleksibilnost in ni ujeta le v določen tip kristalne rešetke. To pomeni večjo verjetnost, da se molekula postavi v primerno konformacijo za hkraten obstoj v kristalni rešetki z drugo molekulo (49). Vseeno sam polimorfizem ni zagotovilo, da je izbrana spojina ustreznna komponenta za kokristalizacijo, ključno vlogo pri tem igra jakost heteromernih medmolekulskih interakcij preko sintonov, ki morajo presežati homomerne znotrajmolekulske interakcije (19, 50).

Preglednica 2: Pregled nekaterih v literaturi opisanih farmacevtskih kokristalov in vpliv na lastnosti zdravilne učinkovine.

Table 2: Review of some pharmaceutical cocrystals reported in the literature and influence on API's properties.

Zdravilna učinkovina	Tvorilec kokristala	Metoda priprave	Izboljšana lastnost	Literaturni vir
Fluoksetinijev klorid	Jantarna kislina Fumarna kislina	Iz raztopine	Intrinzična hitrost raztapljanja	20
Indometacin	Saharin	Iz raztopine, mletje	Higroskopnost, hitrost raztapljanja	36
Itrakonazol	Izonikotinamid Jantarna kislina	Iz raztopine	Hitrost raztapljanja	37
Kofein	Oksalna kislina Glutarna kislina Metil galat	Mletje	Stabilnost Stisljivost	39 42
Karbamazepin	Nikotinamid Saharin	Iz raztopine	Higroskopnost, hitrost raztapljanja, biološka uporabnost	43
Teofilin	Oksalna, maleinska, malonska, glutarna kislina	Iz raztopine, mletje	Higroskopnost	44
Sildenafil	Acetilsalicilna kislina	Iz raztopine	Topnost, intrinzična hitrost raztapljanja	45
Norfloksacin	Izonikotinamid	Iz raztopine	Topnost	46
Celekoksib	Nikotinamid	Iz raztopine	Hitrost raztapljanja	47
Megestrol acetat	Saharin	Iz raztopine	Intrinzična hitrost raztapljanja	48



Slika 3: Kokristalizacija iz raztopine: dominacija homomernih znotrajmolekulskih interakcij vodi do rekristalizacije, dominacija heteromernih medmolekulskih interakcij vodi do kokristalizacije. Prirejeno iz (11).

Figure 3: Cocrystallization from solution: domination of homomeric intramolecular interactions leads to recrystallization, domination of heteromeric intermolecular interactions leads to cocrystallization. Adopted from (11).

Tvorba kokristalov v trdnem stanju temelji na mehanski aktivaciji komponent z mletjem. To je t.i. metoda »zelene kemije«, ki je alternativa pripravi kokristalov iz raztopine (19). Znano je, da se z mletjem pogosto poruši kristalna rešetka in nastane amorfna snov, prav tako literatura navaja primere tvorbe različnih polimorfnih oblik učinkovine kot posledice mehanske obremenitve pri mletju (51). Prednost te metode je, da je hitrejša z odsotnostjo težav povezanih z različno topnostjo komponent, zato je primernejša za reševanje (»screening«).

Če kokristalizacija poteka preko amorfne faze snovi, je hitrost kokristalizacije odvisna od pogojev mletja (temperatura) in od temperature steklastega prehoda reaktantov. Tako v primeru tvorbe kokristala karbamazepin-saharin z mletjem obeh komponent proces

kokristalizacije poteče hitreje pri sobni temperaturi kot v hladnejših pogojih, kjer je amorfna faza bolj stabilna (51).

Dodatek pomožne snovi z nizko temperaturo steklastega prehoda deluje kot mehčalo, saj zniža temperaturo steklastega prehoda zmesi in tako poveča mobilnost molekul in hitrost kokristalizacije. Voda je primer učinkovitega mehčala, saj je tvorba kokristalov pospešena, ko uporabimo hidratirano kristalno obliko reaktanta ali ko pri mletju uporabljamo zelo majhno količino vode (5, 51). Trask in sodelavci (52) so primerjali kokristale kofeina in glutarne kisline, ki so bili pripravljene z mletjem ob uporabi majhne količine (nekaj kapljic) različnih topil. Ugotovili so, da nastanejo različne kokristalne strukture, oz. so molekule obeh komponent drugače razporejene v kokristalni rešetki, ko komponente zmeljejo brez topila (nastane oblika I), z dodatkom nepolarnega topila (n-heksan, cikloheksan, heptan; nastane oblika I), ali z dodatkom bolj polarnega topila (kloroform, diklorometan, acetonitril, voda; nastane oblika II).

Kokristalizacija lahko nehoti poteka med različnimi procesi v proizvodnji ali med skladiščenjem zdravil. Zavedati se je treba, da ta proces poteka hitreje pri višji relativni vlažnosti. Tvorbo kokristalov bi torej morali dodati spisku možnih pretvorb k že dodani tvorbi polimorfov in solvatov, ki so posledica mehanskih, termičnih in kemijskih vplivov med izdelavo, transportom in shranjevanjem zdravil (5, 51).

5 Metode karakterizacije kokristalov

Kokristalne komponente so v kokristalu med seboj povezane in orientirane drugače, kot sicer vsaka posamezna komponenta. Zato so za karakterizacijo primerne vse metode, ki nam podajajo informacijo o kristalni strukturi. V procesu izdelave kokristalov nas najprej zanima, ali je kokristalizacija uspešno potekla. To lahko preverimo z

diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), termogravimetrično analizo (TGA), rentgensko praškovo analizo (XRPD), Ramansko in infrardečo (IR) spektroskopijo. Rezultat teh analiznih metod so posamezni spektri. V primeru, da kokristal ne nastane, so spektri vzorcev vsota spektrov izhodnih komponent. Če pa komponente po procesu priprave tvorijo skupno kristalno strukturo, so pripadajoči spektri drugačni – v DSC spektru vidimo eno samo tališče; v XRPD spektru se pojavijo odkloni pri kotih, ki jih ni v XRPD spektrih izhodnih komponent; v Ramanskem in IR spektru zaznamo signale, ki so rezultat novih interakcij in drugačno »fingerprint« območje. Vendar s temi metodami ne moremo potrditi prisotnosti kokristala, saj tudi pri tvorbi soli ali solvata nastanejo edinstveni spektri. Potrebne so metode, ki lahko zaznajo stopnjo prenosa protona med dvema komponentama in s tem podajo informacijo o tvorbi ionske interakcije ali vodikove vezi. Zato je najzmogljivejša analizna metoda za strukturno karakterizacijo kokristalov rentgenska difrakcija na monokristalu (Single Crystal X-Ray Diffraction). Ta metoda nam poda absolutno kristalno strukturo in s tem možnost, da razberemo razmerje molekul v kokristalu, prostorsko urejenost molekul ter vrsto in položaj interakcij v kokristalu. Vendar za to analizno metodo potrebujemo kristale ustrezne velikosti in kvalitete, kar pogosto predstavlja problem, saj kokristali, ki jih pripravimo z mletjem, praviloma niso primerni za takšno analizo. Močno analizno orodje predstavlja tudi jedrska magnetna resonanca v trdnem stanju (CP/MAS NMR), s katero lahko določimo polimorfe in razberemo interakcije v kokristalu. Metoda se dobro dopolnjuje z rentgensko praškovo analizo (18, 52-56).

6 Farmaceutski kokristali in intelektualna lastnina

Farmacevtska in biotehnološka podjetja se še posebej zanašajo na rigorozno zaščito intelektualne lastnine, ki hkrati tudi ščiti prihodke od lastnih proizvodov, saj so s to panogo povezane številne regulatorne ovire, visoki razvojni stroški in vselej prisotna tveganja, da se stroški razvoja izdelka ne bodo povrnili med njegovim trženjem. Kokristali, v katerih je zdravilna učinkovina povezana s tvorilcem kokristala lahko izpolnjujejo pogoje patentne zaščite (57).

Patent lahko podelijo izumu, ki izpolnjuje tri pogoje (58):

- **Novost:** Izum oziroma tehnična rešitev je nova, če ni obsežena s stanjem tehnike, se pravi, da ni bila pred datumom vložitve patentne prijave dostopna javnosti z ustnim ali pisnim opisom, z uporabo ali na katerikoli drug način.
- **Inventivnost:** Izum je na inventivni ravni, če za strokovnjaka predmet izuma očitno ne izhaja iz stanja tehnike.
- **Industrijska uporabnost:** Izum je industrijsko uporabljiv, če se predmet izuma lahko proizvede ali uporabi v katerikoli gospodarski dejavnosti, vključno s kmetijstvom.

Kokristalizacija pomeni alternativno modifikacijo zdravilne učinkovine v trdnem agregatnem stanju, kar pomeni, da gre za podobno spremembo, kot jo dosežemo s tvorbo soli in zatorej pravno zadostijo kriteriju novosti za patentibilnost.

Za koncept inventivnosti pri kokristalih lahko najdemo analogijo v kristalnih oblikah zdravilnih učinkovin. Dodatni patenti na novih kristalnih oblikah že znanih učinkovin pogosto dodatno podaljšajo ekskluzivno dobo zdravila na tržišču.

Farmaceutski kokristali z zdravilno učinkovino imajo večinoma enako terapevtsko uporabnost, kot jo ima sama zdravilna učinkovina in je patentno zaščiten z originatorjevo prijavo. Industrijska uporabnost se v primeru kokristalov izkazuje v prednostih, ki jih imajo kokristali zaradi izboljšanih fizikalno-kemijskih lastnosti v primerjavi s samostojno zdravilno učinkovino. Industrijska uporabnost se nanaša tudi na izvedljivost postopka v industrijskem merilu.

Z vidika patentne zaščite imajo nove oblike zdravilnih učinkovin velik pomen za farmacevtska podjetja. To lahko pomeni dodatno tržno prednost za podjetje, ki lahko vložijo dodatne prijave za ščitenje novih trdnih oblik in s tem časovno podaljšano ekskluzivnost svojega izdelka na trgu oz. omogoča generičnemu proizvajalcu, da predčasno vstopi na trg.

7 Zaključek

Povzamemo lahko, da ima v razvoju zdravil in zdravilnih učinkovin velik pomen izbira kristalne oblike. Tako postajajo raziskave farmacevtskih kokristalov del predformulacijskih študij, v katerih so do sedaj prevladovala raziskave polimorfov, soli in solvatov zdravilnih učinkovin. Pomemben prispevek kokristalov v farmacevtski industriji opazimo na področju prirejanja fizikalno-kemijskih lastnosti snovi, vendar se moramo zavedati, da lahko s tvorbo kokristala vplivamo tudi na farmakološke lastnosti, predvsem na večjo biološko uporabnost in s tem na toksičnost zdravila.

Nekateri farmacevtski kokristali izkazujejo fizikalno-kemijske, farmacevtsko-tehnološke in komercialne prednosti, kar pomeni, da so lahko tudi predmet patentne zaščite in omogočajo generičnim farmacevtskim podjetjem možnost predčasnega trženja zdravila.

Po drugi strani se je potrebno zavedati, da je področje kokristalov še relativno novo in zato ne dovolj raziskano za rutinsko uporabo v industriji, kar pred raziskovalce postavlja izziv, ki omogoča prelitje raziskovalnih dosežkov v njihovo aplikativno uporabo.

Zahvala: *Operacijo delno financira Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada.*

8 Literatura

1. Huang LF, Tong WQ. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv Drug Deliver Rev* 2004; 56: 321-334.
2. Vippaguntla SR, Brittain HG, Grant DJW. Crystalline solids. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 48: 3-26.
3. Datta S, Grant DJW. Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3, 42-57.
4. Singhal D, Curatolo W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliver Rev* 2003; 56: 335-347.
5. Rodriguez-Hornedo N, Nehm SJ, Jayasankar A. Cocrystals: Design, Properties and Formation Mechanisms. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York, 2007: 615-636.
6. Morissette SL, Almarsson Ö, Peterson ML. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. *Adv Drug Deliver Rev* 2004; 56, 275-300.

7. Zukerman-Schpector J, Tiekink ERT. What is a co-crystal? *Z Kristallogr* 2008; 223: 233–234.
8. Schmidt J, Snipes W. Free radical formation in a gamma-irradiated pyrimidine-purine co-crystal complex. *Int J Radiat Biol* 1968; 13: 101–109.
9. Desiraju GR. Crystal and co-Crystal. *Cryst Eng Comm* 2003; 5: 466-467.
10. Dunitz JD. Crystal and co-crystal: a second opinion. *Cryst Eng Comm* 2003; 5: 506.
11. Aakeröy CB, Salmon DJ. Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. *CrystEngComm* 2005; 7: 439-448.
12. Jones W, Motherwell WDS, Trask AV. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. *MRS Bull* 2006; 341: 875-879.
13. Bond AB. What is a co-crystal? *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 833-834.
14. Childs SL, Hardcastle KI. Cocrystals of Piroxicam and Carboxylic Acids. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1291-1304.
15. Stahly GP. Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1007-1026.
16. Bhogala BR, Nangia A. Ternary and quaternary co-crystals of 1,3-*cis*,5-*cis*-cyclohexanetricarboxylic acid and 4,4-bipyridines. *New J Chem* 2008; 32: 800-807.
17. Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ. Pharmaceutical Co-Crystals. *J Pharm Sci* 2006; 93: 499-516.
18. Schultheiss N, Newman A. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2950-2967.
19. Velaga SP, Basavoju S, Bostrom D. Norfloxacin saccharinate-saccharin dihydrate cocrystal – A new pharmaceutical cocrystal with an organic counter ion, *J Mol Struct* 2008; 29: 150-153.
20. Childs SL, Chyall LJ, Dunlap JT et al. Crystal Engineering Approach to Forming Cocrystals of Amine Hydrochlorides with Organic Acids. Molecular Complexes of Fluoxetine Hydrochloride with Benzoic, Succinic, and Fumaric Acids. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 13335-13342.
21. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/grasguid.html#Q16>, dostopano: maj, 2009.
22. Lehn JM. Supramolecular Chemistry — Scope and Perspectives: Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Edit* 1988; 27, 89-112
23. http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.rgu.ac.uk/graphics/PC%2520Co-crystal.jpg&imgrefurl=http://www.rgu.ac.uk/pharmacy/research/page.cfm%3Fpge%3D3326&usq=__TcTFXXaP2dUn_tee9Rur28D4oCA=&h=355&w=503&sz=20&hl=sl&start=1&tbid=CbO8EjXgz3JOMM:&tbid=92&tbid=130&prev=/images%3Fq%3Dcocrystal%26gbv%3D2%26hl%3Dsl. Dostopano: 10-2009.
24. Blagden N, De Matas M, Gavan PT et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv Drug Deliver Rev* 2007; 59: 617-630.
25. Shattock TR. Crystal Engineering of Co-Crystals and their Relevance to Pharmaceutical Forms. Doktorsko delo, University of South Florida, 2007.
26. <http://www.rxlist.com/top200.htm>. Dostopano: 05-2009.
27. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Company Incorporated, 2001.
28. Huang K, Britton D, Etter MC et al. A novel class of phenol-pyridine co-crystals for second harmonic generation. *J Mater Chem* 1997; 7: 713-720.
29. Gao X, Frišči T, MacGillivray LR. Supramolecular construction of molecular ladders in the solid state, *Angew Chem Int Edit* 2004; 43: 232-236.
30. Ma BQ, Zhang Y, Coppens P. Structural Variation and Supramolecular Isomerism in the C-Methylcalix[4]resorcinarene/Bipyridine System. *Cryst Growth Des* 2002; 2: 7-13.
31. Taylor LD, Warner JC. Process and composition for use in photographic materials containing hydroquinones, US patent 5,177,262 1994.
32. Almarsson Ö, Zaworotko MJ. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases: Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chem Commun* 2004; 1889-1896.
33. Shan N, Zaworotko MJ. The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discov Today* 2008; 13: 440-446.
34. Vishweshwar P, McMahon JA, Zaworotko MJ, Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-Crystals. v: Tiekink ERT, Vittal JJ. *Frontiers in Crystal Engineering*, John Wiley & Sons 2006: 25-50.
35. McNamara DP, Childs SL, Giordano J et al. Use of a Glutaric Acid Cocrystal to Improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. *Pharm Res* 2006; 23: 1888-1897.
36. Basavoju S, Boström D, Velaga SP. Indomethacin-Saccharin Cocrystal: Design, Synthesis and Preliminary Pharmaceutical Characterization. *Pharm Res* 2007; 25: 530-541.
37. Remenar JF, Morissette SL, Peterson ML et al. Crystal Engineering of Novel Cocrystals of a Triazole Drug with 1,4-Dicarboxylic Acids. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 8456-8457.
38. Nehm SJ, Rodriguez-Spong B, Rodriguez-Hornedo N. Phase Solubility Diagrams of Cocrystals are explained by Solubility Product and Solution Complexation. *Cryst Growth Des* 2006; 6: 592-600.
39. Trask AV, Motherwell WDS, Jones W, Pharmaceutical Cocrystalliation: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. *Cryst Growth Des* 2005; 5: 1013-1021.
40. Tiwary AK. Modification of crystal habit and its role in dosage form performance. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27: 699–709.
41. Yang G, Kubota N, Sha Z et al. Crystal Shape Control by Manipulating Supersaturation in Batch Cooling Crystallization. *Cryst Growth Des* 2006; 6: 2799-2803.
42. Sun CC, Huo H. Improving Mechanical Properties of Caffeine and Methyl Gallate Crystals by Cocrystallization. *Cryst Growth Des* 2008; 8: 1575-1579.
43. Hickey MB, Peterson ML, Scoppettuolo LA et al. Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 112-119.
44. Trask AV, Motherwell WDS, Jones W. Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization. *Int J Pharm* 2006; 320: 114-123.
45. Zegarac, M. et al. Pharmaceutically acceptable cocrystalline forms of sildenafil. PCT WO 2007/080362 2007.
46. Basavoju S, Boström D, Velaga SP. Pharmaceutical Cocrystal and Salts of Norfloxacin. *Cryst Growth Des* 2006; 6: 2699-2708.
47. Remenar JF, Peterson ML, Stephens PW et al. Celecoxib:Nicotinamide Dissociation: Using Excipients to Capture the Cocrystal's Potential. *Mol Pharm* 2007; 4:386-400.
48. Shiraki K, Takata N, Takano R et al. Dissolution Improvement and the Mechanism of the Improvement from Crystallization of Poorly Water-soluble Compounds. *Pharm Res* 2008; 25: 2581-2592.
49. Aakeröy CB. Crystal engineering: strategies and architectures. *Acta Crystallogr B* 1997; 53: 569-586.
50. Aakeröy CB, Beatty AM, Helfrich BA et al. Do polymorphic compounds make good cocrystallising agents? A structural case study that demonstrates the importance of synthon flexibility. *Cryst Growth Des* 2003; 3: 159-165.
51. Jayasankar A, Somwangthanaroj A, Shao ZJ et al. Cocrystal Formation during Cogrinding and Storage is Mediated by Amorphous Phase. *Pharm Res* 2006; 23: 2381-2392.
52. Trask AV, Motherwell WDS, Jonew W. Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem Commun* 2004; 890-891.
53. Vogt FG, Clawson JS, Strohmeier M et al. Solid-State NMR Analysis of Organic Cocrystals and Complexes. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 921-937.
54. Almarsson Ö, Hickey MB, Peterson M, et al. Pharmaceutical co-crystal compositions of drugs such as carbamazepine, celecoxib,olanzapine, itraconazole, topiramate, modafinil, 5-fluorouracil, hydrochlorothiazide,acetaminophen, aspirin, flurbiprofen, phenytoin and ibuprofen. PCT WO 2004/078163 2004.
55. Allesš M, Velaga S, Alhalweh A et al. Near-Infrared Spectroscopy for Cocrystal Screening. A Comparative Study with Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2008; 80: 7755-7764.
56. Harris RK. NMR studies of organic polymorphs & solvates. *Analyst* 2006; 131: 351-373.
57. Trask AV. An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. *Mol Pharm* 2007; 4: 301-309.
58. <http://www.uil-sipo.si/uil/dejavnosti/patenti/>. Dostopano: 10-2009.

Vloga silicijevih spojin v živih organizmih

The role of silicon compounds in living organisms

Martina Hrast, Aleš Obreza

Povzetek: Za rastline je silicij esencialni element, saj njegovo pomanjkanje povzroči šibkejšo strukturo rastlinskih organov in poveča verjetnost za nepravilno rast, razvoj in reprodukcijo rastlin. Silicijeve spojine povečajo odpornost rastlin proti boleznim, ki jih povzročajo glive, bakterije in drugi škodljivci, zmanjšajo toksičnost nekaterih kovinskih ionov in povečajo toleranco za slanost prsti. V živalskem in človeškem telesu vloga silicija še ni popolnoma razjasnjena. Dokazali so, da silicij vpliva na kalcifikacijo kosti in razvoj skeleta. Pomembno vlogo ima v osteogenih celic, zavira resorpcijo kosti ter vpliva na celjenje poškodb v telesu. Dandanes poteka veliko raziskav o uporabi silicija pri terapiji osteoporoze in Alzheimerjeve bolezni. O peroralni toksičnosti silicija je malo podatkov, medtem ko že dolgo vemo, da vdihavanje silicijevega dioksida povzroči azbestozo ali silikozo. Glede na dnevne potrebe silicijevih spojin je vnos s hrano dovolj velik, zato dodatno vnašanje le-teh nima racionalne osnove.

Ključne besede: silicij, esencialni element, kalcifikacija kosti, toksičnost

Abstract: Silicon has essential role in plant growth and reproduction by alleviating both biotic and abiotic stresses including diseases, pests, heavy metal toxicity and salinity of soil. Silicon in animal and human connective tissue also plays an important role. It has a physiological role in bone calcification process, and in development of skeleton. Silicon inhibits resorption of bone, affects the healing of injuries and is a major ion of osteogenic cells. Intensive research into the use of silicon in osteoporosis and Alzheimer's disease has therefore been carried out in recent years. Few data are available on the oral toxicity of silicon, meanwhile it is known for decades that inhalation of silica causes silicosis or asbestosis. Supplementation of silicon is not needed because the daily dietary intake of silicon with food is sufficient.

Key words: silicon, essential element, bone calcification, toxicity

1 Uvod

Pričujoči prispevek nadaljuje serijo člankov o esencialnih elementih, objavljenih v Farmaceutskem vestniku (1–3). Ime elementa izhaja iz latinske besede *silex*, kar pomeni kremen. Elementni silicij je leta 1824 z redukcijo silicijevega tetrafluorida s kalijem pripravil švedski kemik Jöns Jacob Berzelius. Silicij je drugi najbolj razširjen element v naravi, takoj za kisikom, nahaja se tudi v soncu, zvezdah in je glavna sestavina meteoritov, znanih pod imenom aeroliti. V zemeljski skorji ga je okoli 26 %. Elementni silicij v naravi ni prisoten, saj ima zelo veliko afiniteto do kisika, pri čemer nastanejo silicijev dioksid in silikati. V vodi se lahko zelo majhna količina SiO_2 raztopi in tvori silicijevo(IV) kislino (ortosilicijeva kislina, H_4SiO_4), ki je biološko uporabna. Le-ta je obstojna pri pH nižjem od 9 in pri koncentraciji nižji od 2mM. Pri višjih koncentracijah poteče spontana polikondenzacija (4, 5).

Silicijev dioksid in silikati so zelo široko uporabni na najrazličnejših področjih, tudi v farmaciji. Med najpomembnejše silikate spadata kalijev glinenec ali ortoklaz, ($\text{K}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$), ki sestavlja granit, gnajs in porfir, ter kaolin ($\text{Al}_2(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$), ki je sestavni del gline. SiO_2 je prav tako sestavni del granita, gnajsa in kremenovega peska. Kremen je najpomembnejši vir za pripravo silicija in njegovih spojin. Silikati so

prisotni v steklu, keramiki in cementu, silikoni sestavljajo tehnično zelo uporabne materiale, kot so olja, maziva in plastične mase, poleg tega pa se silicijeve spojine uporabljajo v elektronski industriji kot polprevodniki (4, 5).

2 Silicij v rastlinah

Silicij je izredno pomemben esencialni element za rastline, saj njegovo pomanjkanje povzroči šibkejšo strukturo rastlinskih organov in poveča verjetnost za nepravilno rast, razvoj in reprodukcijo rastlin. V rastlinah je njegova koncentracija zelo različna in se giblje med 0,1 in 10 % suhe teže. Na podlagi tega lahko sklepamo, da obstaja več mehanizmov privzema in transporta silicija v rastlinah. Silicij se v zemlji nahaja v obliki silicijeve(IV) kisline, ki jo rastline črpajo s pasivnim transportom. Privzem H_4SiO_4 lahko poteka tudi z aktivnim transportom, preko prenašalca Lsi1. Po privzemu silicijeve(IV) kisline v rastlino, se v njej v vodnih pogojih tvorijo silicijevi polimeri – silikati. Na polimerizacijo vplivajo koncentracija silicijeve kisline, temperatura, pH in prisotnost ostalih ionov, nizkomolekularnih organskih molekul in polimerov. V vseh primerih nastanejo polimeri s siloksansko vezjo Si-O-Si. Polimeri se razlikujejo v strukturi in fizikalno-kemičnih lastnostih,

kot so npr. gostota, topnost, viskoznost. Ti polimeri se nato vgradijo v celično steno, lumen določenih celic, medcelični prostor in pod kutikularni sloj (6).

Silicij zveča odpornost rastlin proti boleznim, ki jih povzročajo glive ali bakterije in zatira bolezni, ki jih povzročajo insekti in drugi škodljivci. Za tako delovanje naj bi bila odgovorna dva mehanizma. Silicijeve spojine so naložene pod kutikulo in tvorijo dvojno plast, ki deluje kot mehanska ovira, ki prepreči penetracijo gliv. Poleg tega polimere silicija nahajamo tudi v celični steni, kjer tvorijo mehansko bariero, ki oteži insektom žvečenje listov in žuželkam, da z bodalom prodrejo skozi rastlinsko tkivo (7). Drugi mehanizem so odkrili pred kratkim, saj so pri rastlinah, ki so jim v gnojilo dodajali silicijeve spojine, opazili zvečano aktivnost hitinaz, peroksidaz, polifenol-oksidad in flavonoida fitoaleksina, ki naj bi delovali protiglivično.

Silicij v rastlinah zmanjša toksičnost kovinskih ionov, kot so Mn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} in Zn^{2+} . Povzroči bolj enakomerno razporeditev Mn^{2+} v rastlinskem tkivu in zmanjša koncentracijo raztopljenih manganovih soli, tako da zveča adsorpcijo Mn^{2+} na celično steno. Signifikantno zmanjša lipidno peroksidacijo membrane, ki jo povzročajo Mn^{2+} ioni, in ojača delovanje encimskih (preko SOD) in neencimskih (askorbat, glutation) antioksidantov. Silicij z aluminijevimi ioni tvori slabo topen aluminijev silikat oziroma hidroksialuminijev silikat in na ta način zmanjša koncentracijo toksičnih Al^{3+} . Prav tako poveča nastajanje fenolnih spojin, ki lahko tvorijo kelate z Al^{3+} ioni. Silicij zmanjša tudi toksičnost Cd^{2+} . Natrijev metasilikat (polimerni Na_2SiO_3) in druge silicij vsebujoče spojine zvišajo pH prsti in tako zmanjšajo privzem Cd^{2+} v rastline. Silicij tvori s Zn^{2+} netopne silikate in s tem zmanjša njihovo delovanje (8).

Silicij poveča toleranco rastlin za slanost v okolju po več mehanizmi. Najprej zmanjša izparevanje vode iz listov, kar zmanjša osmotski stres. V koreninah zveča aktivnost H^+ -ATPaze in H^+ -fosfataze ter tako zveča privzem in transport K^+ in zmanjša privzem in transport Na^+ iz korenin do listov. Dodajanje silicija zmanjša permeabilnost plazemske membrane celic listov in izboljša strukturo kloroplastov, ki jih prekomerna količina NaCl zelo poškoduje. Silicij zveča aktivnost superoksid-dismutaze, peroksidaze, katalaze in glutation-reduktaze in koncentracijo glutationa v koreninah in listih ter zmanjša koncentracijo malonaldehida. S tem naj bi vplival na strukturo, integriteto in funkcijo plazemske membrane preko zmanjševanja lipidne peroksidacije membran (8).

3 Silicij v živalskem telesu

Že od leta 1970 potekajo intenzivne raziskave o pomenu silicija pri živalih. Prve raziskave na podganah in miših so pokazale, da se silicij nahaja pretežno v tistih delih kosti, kjer poteka aktivna mineralizacija, medtem ko je pri zrelejših kosteh, kjer koncentracija kalcija naraste zaradi večje vsebnosti hidroksiapatita, njegova vsebnost nižja. Na podlagi tega so prišli do zaključka, da silicij vpliva na zgodnjo fazo kalcifikacije kosti (9).

V nadaljnjih raziskavah so ugotavljali spremembe pri živalih (podganah in piščancih), ki so jih hranili s hrano, v kateri je primanjkovalo silicija. Pri obeh vrstah so opazili relativno atrofijo vseh organov, koža in sluznice pa so bile rahlo anemične. Razvoj skeleta je bil zavrt, prav tako je bila manjša lobanja, ki je imela tudi zgradbo

matriksa izrazito drugačno (10). Pomanjkanje silicija je vplivalo tudi na sklepe, ki so bili manjši in so vsebovali manj sklepnega hrustanca. Sklepni hrustanec je imel signifikantno nižjo vsebnost heksozaminov, kar jasno kaže na vlogo silicija pri tvorbi glikozaminoglikana v hrustancu (11, 12).

V eni od raziskav, kjer so teličkom v pitno vodo dodajali silicijevo(IV) kislino, so ugotovili značilno zvečano koncentracijo kolagena in hidroksiprolina v dermisu in opazili pozitivno korelacijo med serumsko koncentracijo silicija in koncentracijo hidroksiprolina v hrustancu (13). Z rentgensko analizo mladih kosti, ki so v fazi aktivne rasti, so ugotovili, da je silicij, poleg kalcija, fosforja in magnezija, glavni ion osteogenih celic. Vsebnost silicija je bila zelo visoka predvsem v osteoblastih, kjer se silicij nahaja v mitohondrijih (12, 14).

Na podlagi nekaterih raziskav predvidevajo, da silicij zavira resorpcijo kosti. Preučevali so učinek monometiltrisilanola na trabekularne kosti pri podganah, ki so jim odstranili jajčnike. Ugotovili so, da se zveča površina, ki jo na kosti prekrivajo osteoblasti in mineralizacija metafiznega dela trabekularnih kosti, poleg tega pa se zmanjša število osteoklastov in površina kosti, ki jo zasedajo. To je povzročilo večji volumen trabekularne kosti pri ovariektomiranih podganah v primerjavi z zdravimi. Ovariektomiranim podganam so dodajali tudi natrijev metasilikat, pri čemer so ugotovili, da je izguba kostne gostote manjša, poleg tega se zveča longitudinalni razvoj stegenice v primerjavi z zdravimi živalmi (15).

V kasnejših raziskavah so dokazali, da pomanjkanje silicija vpliva na celjenje poškodb v telesu. Pomanjkanje silicija podaljša čas tvorbe kolagena na poškodovanem delu in zmanjša aktivnost jetrne ornitin-aminotransferaze, ki pretvarja ornitin v prolin, ki je glavni prekurzor sinteze kolagena. Poleg tega so ugotovili, da pomanjkanje silicija zmanjša koncentracijo eozinofilcev, ki sproščajo citokine, ki vplivajo na celjenje rane, in zmanjša koncentracijo bakra v kosteh, za katerega vemo, da vpliva na prečno povezovanje kolagena v kosteh (16).

4 Silicij v človeku

Silicij je relativno pogost v človeškem telesu, po masi ga je nekoliko manj kot železa in cinka ter več kot mangana in bakra. Najvišja koncentracija silicija je v vezivnem in kostnem tkivu, med organi pa v aorti, trahejah, kitah in koži, saj se veže na glikozaminoglikan in proteine v vezivnem tkivu. V manjši koncentraciji ga najdemo v parenhimskem tkivu organov, kot so jetra, srce, mišice in pljuča, v krvi pa se nahaja v obliki silicijevo(IV) kisline (15).

Predvidene dnevne potrebe (esencialnost ni dokazana) po siliciju znašajo 10 – 25 mg, z normalno hrano ga dobimo 20-50 mg/dan. 20 % dnevnega odmerka zaužijemo že s pitno vodo, ostalo pa pridobimo s hrano. Največ silicija vsebuje hrana, bogata z žitaricami (oves, ječmen, riževi in pšenični otrobi), vendar ga je veliko tudi v bananah, rozinah, fižolu, korenju, sladkorni pesi in leči, medtem ko ga je v mesni hrani manj. Med pijačami je pogost zlasti v pivu, kjer je njegov vir ječmenov slad (17). Iz predstavljenih števil lahko razberemo, da ne glede na morebitno esencialnost silicija, le-tega ni potrebno posebej dodajati, saj potrebne količine njegovih spojin zaužijemo s prehrano.

Na biološko uporabnost silicija vpliva več faktorjev. Le-ta je odvisna od tipa hrane, sestave hrane, prisotnosti vlaknin in kemizma prisotnih

silicijevih spojin. Vlaknine zmanjšajo absorpcijo številnih mineralov, med katere spada tudi silicij. Na absorpcijo Si vplivajo kationi, saj so v raziskavah na podganah ugotovili, da velika vsebnost kalcija v hrani zmanjša absorpcijo silicija. Na podlagi teh raziskav predlagajo dva možna mehanizma interakcij. Možno je, da imata silicij in kalcij enako pot absorpcije ali pa kalcij tvori s silicijem netopen kalcijev silikat, kar zmanjša biološko uporabnost silicija. Bolj verjeten je drugi mehanizem, saj tudi magnezij tvori s silicijem netopne silikate. Magnezij ima pomembno vlogo pri presnovi silicija, saj je magnezijev ortosilikat njegova najpomembnejša oblika v urinu, v taki obliki pa se nahaja tudi plazmi. Nekateri raziskovalci predvidevajo, da metabolizem silicija uravnavajo steroidni in ščitnični hormoni, ker naj bi njihova manjša koncentracija in aktivnost ščitnice v starosti zmanjšala njegovo absorpcijo (18).

Absorpcija silicija je zelo odvisna od kemijske oblike, v kateri se nahaja v živilih. Najlažje se absorbira v obliki silicijeve(IV) kisline, ki se nahaja v vodi, mleku in pivu. Slabša je absorpcija v obliki polimerov, ki so pogosto prisotni v hrani rastlinskega izvora, saj mora v gastrointestinalnem traktu najprej poteči hidroliza polimerov do silicijeve(IV) kisline (19). Iz vode in piva se absorbira najmanj 50 % H_4SiO_4 , medtem ko se iz rastlinske hrane po hidrolizi v povprečju absorbira 40 %. Mehanizem absorpcije silicija na nivoju molekul še ni poznan, vendar predvidevajo, da absorpcija poteka v proksimalnem delu tankega črevesa, kjer prevladuje aktivni transport, saj se ortosilicijeva kislina hitro in dobro absorbira. Nekateri tudi predpostavljajo, da se lahko H_4SiO_4 transportira paracelularno ali preko majhnih por transcelularno (15). Plazemske koncentracije se znatno zvečajo 100–120 minut po zaužitju hrane s silicijem. Silicij se ne veže na plazemske proteine, ampak je v krvi prisoten v obliki silicijeve(IV) kisline, ki lahko prosto prehaja v eritrocite in v okoliška tkiva. Poleg proste kisline je silicij prisoten tudi v obliki silikatov, kot sta magnezijev in kalcijev silikat. Silicij se hitro izloča skozi ledvica z glomerularno filtracijo in se izloči iz organizma v 4–8 urah po zaužitju. Majhen del se ga izloči tudi z blatom. V tubulih se le v manjši meri reabsorbira, zato je njegova koncentracija v urinu dober pokazatelj absorpcije iz gastrointestinalnega trakta (15, 18, 20).

Referenčne vrednosti za silicij v serumu se pri moških in ženskah signifikantno razlikujejo, na vrednost pa zelo vpliva starost. Pri moških, starih od 18-59 let, referenčna vrednost znaša 9,7-10,17 $\mu\text{mol/L}$, medtem ko pri ženskah, starih od 18-44 let, ta znaša 10,0-11,1 $\mu\text{mol/L}$. S starostjo se serumska koncentracija silicija zniža in pri ženskah, starih nad 74 let, znaša 8,0 $\mu\text{mol/L}$, pri moških enake starosti pa 7,7 $\mu\text{mol/L}$ (21).

Raziskav o vplivu silicija na človeško telo je malo. V eni prvih študij so ugotavljali vpliv Zeolita A, ki je kemijsko aluminijev silikat, na osteoblaste *in vitro*. Ugotovili so, da Zeolit A spodbudi proliferacijo in diferenciacijo osteoblastov in zavira resorpcijo kosti, povzročeno z osteoklasti. Zeolit A tudi zveča sproščanje transformirajočega rastnega faktorja $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), ki je citokin in stimulira nastajanje kolagena. Dokazali so, da imajo dojenčkah, ki so jih hranili le s parenteralno hrano, nižjo serumsko koncentracijo silicija, kar se je odražalo v manjši mineralni gostoti kosti v primerjavi z zdravimi dojenčki (22). Kasneje so dokazali, da koncentracije silicija v okviru referenčnih vrednosti stimulirajo sintezo kolagena tipa 1 v humanih osteoblastih in fibroblastih ter pospešijo diferenciacijo osteoblastov.

Točen mehanizem še ni poznan, vendar predvidevajo, da naj bi silicij deloval preko regulacije prolin-hidroksilaze, ki hidroksilira prolinske ostanke v kolagenu (23).

V dvojno slepi študiji so proučevali učinek s holinom stabilizirane silicijeve(IV) kisline (ch-OSA) na kožo, ki je postarana zaradi UV žarkov. Taka koža ima manj kolagena, glikozaminoglikana in proteoglikana. Prisotne so tudi poškodbe elastičnih vlaken, ki se kažejo kot hrapava površina kože z drobnimi ali globljimi gubami. Ženskam, starim med 40 in 65 let, so 20 tednov dodajali 10 mg Si/dan. Pri vseh preiskovankah so se izboljšale mehanske lastnosti kože in njena površina v primerjavi s kontrolno skupino, prav tako se je signifikantno zmanjšala krhkost las in nohtov. Na podlagi teh rezultatov predvidevajo, da dodajanje ch-OSA vpliva na regeneracijo ali *de novo* sintezo kolagenskih vlaken ter izboljša strukturo glikozaminoglikana v dermisu in strukturo keratina v laseh in nohtih (24).

5 Silicij in osteoporoz

Glede na prejšnje dokaze o vplivu silicija na rast kosti, so ugotavljali uporabo silicija pri osteoporozi in njegovem vplivu na mineralno kostno gostoto. Vemo, da je osteoporoz sistemski, degenerativni skeletni bolezen, za katero sta značilni nizka kostna masa in okvara mikrostrukture kostnega tkiva s posledičnim povečanjem kostne krhkosti in večjo občutljivostjo za zlom. Dognali so, da intravenska aplikacija silicija v obliki monometiltrisilanola zveča trabekularni volumen kosti, prav tako se zveča gostota stegenice po intramuskularni aplikaciji. V eni od epidemioloških študij so poročali o povezavi med vnosom silicija in kostno gostoto kolka pri moških in premenopavzalnih ženskah, pri čemer naj bi imel večji vnos silicija pomembno vlogo za zdravje kosti (22). Poleg tega so dokazali tudi, da zvečan vnos silicija pozitivno vpliva na mineralno kostno gostoto pri pomenopavzalnih ženskah, ki uporabljajo hormonsko nadomestno zdravljenje (25). Nedavno so dokazali, da uporaba s holinom stabilizirane silicijeve(IV) kisline (ch-OSA) pri osteopeničnih in osteoporotičnih pacientih zveča količino biokemičnega kazalca tvorbe kosti PINP (prokolagen tip I N-terminalni propeptid), ki je označevalec sinteze kolagena tipa I. Pri srednjih odmerkih ch-OSA (6 mg Si/dan) so opazili zvečano mineralno gostoto stegenice (18).

6 Toksičnost silicija

O peroralni toksičnosti silicija je zelo malo podatkov. Znano je le, da lahko pri dolgotrajni terapiji z antacidom magnezijevim trisilikatom nastanejo silicijevi kamni v ledvicah, sečniku in sečevodu (26).

Silicij oziroma silicijeve spojine pa so zelo nevarne, če jih vdihavamo. Tako poznamo dve bolezn, ki se pojavita kot posledici vdihavanja prahu azbesta ali silicijevega dioksida (kremena).

Azbestni prah je sestavljen iz drobnih iglic (dolgih 10 do 100 in več μm in širokih 0,5 do 15 μm) in lahko pride v telo z inhalacijo. Pri vdihavanju prah prodre globoko v pljuča skozi alveolarne prostore do obeh rebrnih mren, kjer sproži vnetje. Tam ga alveolarni makrofagi fagocitirajo in obdajo s kislim mukopolisaharidnim slojem, pri čemer nastanejo azbestna telesca, ki jih lahko dokazujemo v sputumu. So prva opazna obrambna reakcija organizma na azbestna vlakna.

Latentna doba bolezni je dolga od 15-20 let od prve izpostavljenosti azbestnemu prahu. Azbestna telesa povzročijo proliferacijo vezivnega tkiva v alveolarnem intersticiju, ki sčasoma vodi v pljučno fibrozo, ki jo imenujemo azbestoza. Simptomi bolezni so stalni kašelj, dispneja in bolečine v prsih. V zelo napredovalem stadiju lahko pljučna fibroza privede do hude obremenitve desnega srca, ki v končni fazi lahko vodi v smrt.

Na toksičnost kremenčevega prahu vplivajo količina vdihanega kristaliničnega kremenca, velikost delcev in karakteristika površine delcev. Večjo toksičnost naj bi imel kremenčev prah, ki nastane pri drobljenju in brušenju kremenca. Silikoza je intersticijska pljučna bolezen, ki je lahko kronična, pospešena ali akutna. Kronična oblika bolezni se pojavi po 10 letih od vdihavanja prahu, medtem ko se pospešena pojavi že po 2 letih. Akutna silikoza se pojavi kot posledica zelo visoke izpostavitve kristalnemu silicijevemu dioksidu in se pojavi lahko že po nekaj mesecih od vdihavanja delcev. Pri vseh tipih azbestoze v pljučnem parenhimu nastanejo nodularne tvorbe, okoli katerih se nabirajo kolagenska vlakna, ki jih obkrožajo makrofagi. Temu sledi pljučna fibroza, ki uniči normalno pljučno funkcijo. V zgodnji fazi bolezni je prisotno samo kašljanje, ki mu sledi dispneja ob naporu in kri v sputumu (27).

Silicijev dioksid je mednarodna agencija za raziskave raka uvrstila v skupino znanih humanih karcinogenov. In vitro raziskave so pokazale da SiO_2 inhibira učinek superoksida dismutaze, kar naj bi povzročilo večje število radikalskih poškodb. Vdihan SiO_2 naj bi povzročil večji nastanek reaktivnih kisikovih spojin, ki poškodujejo DNA in zmanjšajo sposobnost obrambe celic. Kronično vdihavanje silicijevega dioksida lahko vodi do bolezni ledvic, ki se odražajo kot albuminurija in hipertenzija, pride pa tudi do sprememb v glomerulih in proksimalnih tubulih (26).

7 Silicij in aluminij

Aluminij je znan kot nevrotoksičen element. Ima aktivno vlogo pri nastanku lezij pri Alzheimerjevi bolezni in predvidevajo, da je vpleten v nastanek neurofibrilarnih vozlov v možganih. Poleg tega je vezan v beta-amiloidih v možganih bolnikov s to boleznijo. Aluminij povzroča tudi apoptozo nevronov tako in vivo kot in vitro (28).

Silicij oziroma silicijeva kislina zmanjša biološko uporabnost aluminija, ker zmanjša njegovo absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta in zveča sproščanje aluminija iz skladišč v telesu, vključno s kostmi, in njegovo izločanje iz telesa (29). Silicij zmanjša količino aluminija v možganih in tako zmanjša lipidno peroksidacijo v možganih. Na poskusih na miših so ugotovili, da imajo živali, ki so jim dodajali silicijevo kislino ali pivo, signifikantno nižjo koncentracijo aluminija v možganih. Učinkovitost silicija povezujejo z nastankom netoksičnega hidroksialuminijevega silikata. Tako nekateri znanstveniki predlagajo uvedbo silicija v terapijo Alzheimerjeve bolezni (28).

8 Sklep

Silicij uvrščamo med nujno potrebne elemente za rastline, saj njegovo pomanjkanje povzroči šibkejšo strukturo rastlinskih organov in poveča verjetnost za nepravilno rast, razvoj in reprodukcijo. Silicij zveča tudi odpornost rastlin na bolezni, ki jih povzročajo glive, bakterije, insekti

in ostali škodljivci ter zmanjša toksičnost kovinskih ionov in poveča toleranco rastlin na slanost v okolju. Njegova vloga pri živalih in ljudeh je še vedno predmet obsežnih raziskav. Dokazali so, da silicij vpliva na zgodnjo kalcifikacijo kosti in razvoj skeleta. Je eden glavnih ionov osteogenih celic, zavira resorpcijo kosti in vpliva na celjenje poškodb v telesu. Glede na dnevne potrebe silicijevih spojin je vnos s hrano dovolj velik, zato dodatno vnašanje le-teh nima racionalne osnove. Trenutno poteka kar nekaj raziskav o siliciju, zlasti na področju terapije osteoporoze in Alzheimerjeve bolezni, zato lahko v prihodnosti pričakujemo, da se bodo na tržišču pojavile tudi nekatere silicijeve spojine.

9 Literatura

1. Obreza A. Vanadij v živem organizmu in farmaciji. *Farm Vestn* 2003; 54: 713-718.
2. Obreza A. Terapevtski pomen anorganskih borovih spojin in njihova toksičnost. *Farm Vestn* 2004; 55: 463-468.
3. Obreza A. Molibden kot pomemben element v sledovih. *Farm Vest* 2008; 59: 16-20.
4. Lazarini F, Brenčič J. Splošna in anorganska kemija. DZS, 1984: 375-398.
5. Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition (Internet Version 2009)*, CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, 2009; 4-33.
6. Currie HA, Perry CC. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Ann Bot (Lond)* 2007; 100: 1383-1389.
7. Ma JF, Yamaji N. Functions and transport of silicon in plants. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65: 3049-3057.
8. Liang Y, Sun W, Zhu YG, Christie P. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environ Pollut.* 2007; 147: 422-428.
9. Carlisle EM. Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 1970; 167: 279-280.
10. Carlisle EM. Silicon: an essential element for the chick. *Science* 1972; 178: 619-621.
11. Carlisle EM. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *J Nutr* 1980; 110: 1046-1056.
12. Carlisle EM. The nutritional essentiality of silicon. *Nutr Rev* 1982; 40: 193-198.
13. Calomme MR, Vanden Berghe DA. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage. *Biol Trace Elem Res.* 1997; 56: 153-165.
14. Carlisle EM. Silicon as a trace nutrient. *Sci Total Environ* 1988; 73: 95-106.
15. Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Thompson RPH, Powell JJ. Dietary silicon and bone health. *British Nutrition Foundation* 2005; 30: 222-230
16. Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89: 251-261.
17. Dejneka W, Łukasiak J. Determination of total and bioavailable silicon in selected foodstuffs. *Food control* 2003; 14: 193-196.
18. Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging.* 2007; 11: 99-110.
19. Robberecht H, Van Cauwenbergh R, Van Vlaslaer V, Hermans N. Dietary silicon intake in Belgium: Sources, availability from foods, and human serum levels. *Sci Total Environ* 2009; 407: 4777-4782.
20. Jugdaohsingh R, Anderson SH, Tucker KL, Elliott H, Kiel DP, Thompson RP, Powell JJ. Dietary silicon intake and absorption. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75: 887-893.
21. Bissé E, Epting T, Beil A, Lindinger G, Lang H, Wieland H. Reference values for serum silicon in adults. *Anal Biochem* 2005; 337: 130-135.
22. Spector TD, Calomme MR, Anderson SH, Clement G, Bevan L, Demeester N, Swaminathan R, Jugdaohsingh R, Berghe DA, Powell JJ. Choline-stabilized orthosilicic acid supplementation as an adjunct to calcium/vitamin D3 stimulates markers of bone formation in osteopenic females: a randomized, placebo-controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2008; 9: 85

23. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HF, Evans BA, Thompson RP, Powell JJ, Hampson GN. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003; 32: 127-135.
24. Barel A, Calomme M, Timchenko A, De Paepe K, Demeester N, Rogiers V, Clarys P, Vanden Berghe D. Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on skin, nails and hair in women with photodamaged skin. *Arch Dermatol Res*. 2005 ; 297: 147-153.
25. Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 297-307.
26. Minerals: silicon
27. Wagner GR. Asbestosis and silicosis. *Lancet*. 1997; 349: 1311-1315.
28. Gonzalez-Muñoz MJ, Meseguer I, Sanchez-Reus MI, Schultz A, Olivero R, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 1111-1118.
29. Perry CC, Keeling-Tucker T. Aspects of the bioinorganic chemistry of silicon in conjunction with the biometals calcium, iron and aluminium. *J Inorg Biochem*. 1998; 69: 181-191.

Matične celice iz maščobnega tkiva in njihova uporaba

Stem cells from adipose tissue and their use

Ariana Barlič, Krešimir Božikov

Povzetek: Podkožno maščobno tkivo predstavlja privlačen vir predniških celic predvsem zaradi svoje lahke dostopnosti, obilnosti in sposobnosti samoobnavljanja. Izvira iz mezodermalne klične linije in vsebuje stromalno vaskularno frakcijo (SVF – Stromal Vascular Fraction) celic, ki jo zlahka izoliramo. Ta heterogena populacija celic vsebuje poleg endotelijskih celic, gladko-mišičnih celic, pericitov, levkocitov in pre-adipocitov, tudi populacijo multipotentnih mezenhimskih matičnih celic imenovanih matične celice iz maščobnega tkiva (ASC – Adipose-derived Stem Cells). ASC imajo sposobnost diferenciacije v celične linije mezodermalnega izvora t.j. v adipocite, osteoblaste, hondrocite in miocite. Interes za uporabo ASC v medicini strmo narašča zaradi njihove sposobnosti razmnoževanja in diferenciacije *in vitro* pogojih. Adipogen potencial ASC bi lahko izkoristili za rekonstrukcije mehkih tkiv. Osteogen potencial bi lahko izkoristili pri težko celečih se zlomih kosti. Z uspešno hondrogeno diferenciacijo bi lahko z ASC zdravili poškodbe hrustanca in artritis. Raziskave kažejo, da delujejo tudi imunosupresivno, kar bi lahko izrabili za zdravljenje različnih avtoimunskih bolezni. Kljub velikemu potencialu za uporabo ASC v klinične namene se je potrebno zavedati, da ostaja odprtih še veliko pomembnih znanstvenih in medicinskih vprašanj. V preglednem prispevku podajamo najnovejša dognanja na področju ASC in primere njihove uporabe v kliniki.

Ključne besede: maščobno tkivo; mezenhimske matične celice; diferenciacijski potencial; regenerativna medicina

Abstract: Subcutaneous adipose tissue represents an attractive source of progenitor cells due to its easy availability, abundance and the ability of self-renewal. It originates from mesodermal cell layer and contains stromal-vascular cell fraction (SVF), which can be easily isolated. This heterogeneous population of cells contains endothelial cells, smooth-muscle cells, pericytes, leukocytes, pre-adipocytes, and a population of multipotent mesenchymal stem cells, named adipose-derived stem cells (ASC). ASC have the ability to differentiate into cells of mesodermal origin – adipocytes, osteoblasts, chondrocytes and myocytes. Because of their high proliferative rate and differentiation capability in *in vitro* conditions, interest for their use in medicine is increasing rapidly. Adipogenic potential may have many uses in soft-tissue reconstruction. Their osteogenic potential could aid repair bone non-union fractures. If successful chondrogenesis could be achieved, ASC could be used to treat cartilage lesions and arthritic joints. According to recent investigations ASC possess immunosuppressive characteristics. Therefore, different autoimmune diseases could be treated. However, despite the initial enthusiasm over their use for clinical purposes, many scientific and medical issues still need to be resolved. In this review we summarize the latest findings about ASC and examples of their clinical use.

Key words: fat tissue; mesenchymal stem cells; differentiation potential; regenerative medicine

1 Uvod

Kostni mozeg je do nedavnega predstavljal glavni vir odraslih matičnih celic. Poleg hematopoetskih matičnih celic vsebuje mozeg tudi predhodnike stromalnih celic, ki jih imenujemo mezenhimske matične celice (MSC - Mesenchymal Stem Cells). Te multipotentne celice imajo pri ustreznih pogojih gojenja sposobnost diferenciacije v celice mezodermalnih tkiv, kot so skeletne mišice, kost, hrustanec in maščobno tkivo (1). MSC so v središču znanstvene pozornosti predvsem zaradi svojega kliničnega potenciala za potrebe regenerativne medicine in drugih celičnih terapij. Nahajajo se v skoraj vseh do sedaj testiranih tkivih organizma. Poleg kostnega mozga in popkovnične krvi predstavlja najpomembnejši alternativni vir MSC maščobno tkivo (2). V primerjavi z aspiracijo kostnega mozga je sam

kirurški postopek pridobivanja maščobnega tkiva manj invaziven. Poleg tega lahko pridobimo tudi večje količine izhodiščnega materiala z večjim številom predhodniških celic, saj ima večina odraslih ljudi razvitega sveta višek podkožnega maščevja. V estetski kirurgiji je liposukcija najpogostejši operativni poseg, kjer naenkrat odstranimo tudi več litrov maščobe. Kot bo opisano kasneje, so MSC iz maščobnega tkiva, imenovane ASC, multipotentne in predstavljajo potencial za velik obseg terapevtskih aplikacij. Poleg krvodajalcev, ki darujejo kri, bi lahko v prihodnosti pacienti, po opravljeni liposukciji lipoaspirat darovali kot »maščobodajalci«. Poleg avtologne uporabe (celice odvzete in uporabljene pri isti osebi) je potencial ASC tudi v pripravi alogenskih presadkov (celice odvzete eni osebi in uporabljene pri drugi osebi), saj kaže, da imajo te celice imunosupresivne lastnosti. Ugotovili so, da ASC v *in vitro* pogojih ne

izzovejo aloreaktivnosti nekompatibilnih limfocitov. Poleg tega zavirajo reakcijo mešanih limfocitov (MLR - Mixed Lymphocyte Reaction) ter z mitogeni stimulirano razmnoževanje limfocitov (3, 4). Glede na rezultate študije izvedene na miših lahko z ASC nadziramo tudi bolezen presadka proti dajalcu (GvHD – Graft-versus-Host-Disease), ki nastane kot reakcija na alogensko presaditev kostnega mozga (5). Alogenska uporaba celic odstira torej nove perspektive klinične uporabe ASC.

2 Pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva

Maščobno tkivo je sestavljeno iz zrelih adipocitov, preadipocitov, fibroblastov, celic gladkih mišic žil, endotelijskih celic, monocitov, makrofagov in limfocitov. SVF maščobnega tkiva je vedno bolj v središču pozornosti raziskav, ker predstavlja bogat vir ASC (6).

Zaradi velike zmede v sami terminologiji (adipocitne prekursorke celice, preadipociti, odrasle matične celice iz maščobe (ADAS – adipose tissue-derived adult stem cells), stromalne celice iz maščobe, procesirane lipoaspiratne celice (PLA – processed lipoaspirate cells),...) so leta 2004 na drugem zasedanju IFATS (International Fat Applied Technology Society) sklenili, da te celice imenujemo matične celice iz maščobnega tkiva – ASC (adipose-derived stem cells). Termin se nanaša na populacijo izoliranih celic, ki so sposobne pritrjevanja na plastične površine (gojilne posode) in ohranjajo multipotentno sposobnost diferenciacije.

Na izkoristek izolacije matičnih celic iz maščobnega tkiva vpliva veliko dejavnikov:

- **starost in debelost donorja**

Povečan BMI (body mass index) korelira z manjšanjem izkoristka izolacije matičnih celic na gram maščobnega tkiva. Prav tako je povečan BMI povezan s slabo sposobnostjo diferenciacije celic (7). Staranje naj ne bi vplivalo na število celic ampak naj bi se odražalo na njihovi zmanjšani sposobnosti za proliferacijo in diferenciacijo (8).

- **mesto odvzema tkiva**

Narejenih je več študij, vendar na to vprašanje ni dokončnega odgovora, saj imata izhodiščna velikost biopsije in metoda izolacije stromalne vaskularne frakcije močan vpliv na končno število izoliranih celic (9). V glavnem velja, da je idealen vir maščobnega tkiva za izolacijo matičnih celic podkožna trebušna maščoba mlajše, nedebele ženske.

- **način odvzema**

Maščobo lahko odstranimo z izrezanjem ali liposukcijo. Liposukcijo so prvi pričeli uporabljati v Franciji. Metoda se je hitro razširila po vsem svetu (10). Študije kažejo, da je količina preadipocitov pridobljenih z liposukcijo večja kot pri izrezani maščobi (11). Tehniko liposukcije ter način procesiranja maščobe pred ponovnim avtolognim vbrizgavanjem (liposkulpturiranje), ki omogoča visoko preživetje celic, je opisal Coleman (12). Z uporabo 2 ali 3 mm kanule in negativnim podtlakom, ki ga dosežemo s pomočjo 10 ml brizge kar najmanj poškodujemo celice v lipoaspiratu. Lipoaspirat je tudi bolj kontaminiran z drugimi tipi celic (endotelijske celice, fibroblasti,...) kot

odrezan kos maščobe, kar s stališča priprave ožiljenega tkivno inženirskega pripravka predstavlja dodatno prednost. Večji tkivno inženirski pripravki morajo biti namreč ožiljeni, da se celice v notranjosti nosilca lahko prehranjujejo (13).

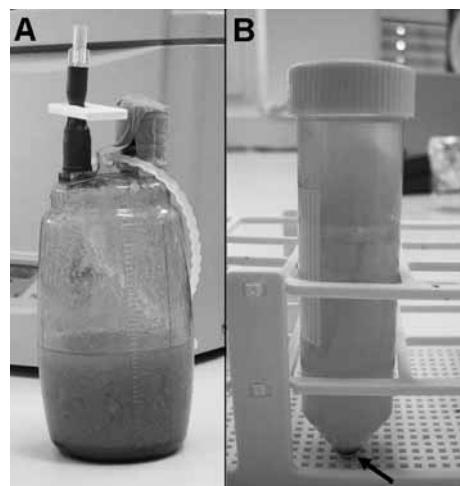
- **shranjevanje tkiva pred izolacijo**

Običajno je od odvzema tkiva in izolacije celic nek časovni zamik, ki vpliva na izkoristek celic. Po enodnevnem hranjenju vzorca v hladilniku je preživetje celic v aspiratu liposukcije bistveno boljše kot pri odrezani maščobi (11).

- **izolacija celic in nasajevanje**

Prvi korak izolacije celic iz lipoaspirata je razgradnja tkiva s kolagenazo tipa I. Pri odrezanem kosu maščobe moramo le-to najprej narezati na manjše koščke in šele nato encimsko obdelati. Po inaktivaciji encima suspenzijo filtriramo, da odstranimo nerazgrajeno tkivo. Vzorec centrifugiramo in dobimo SVF kot pelet celic na dnu centrifugirne posode, ki je dobro ločen od plavajoče plasti prostih lipidov in skoraj homogene populacije zrelih adipocitov (14).

Izolirane celice SVF se nasadijo v gojilno posodo, kjer se zelo hitro pritrldijo. Celice za rast in razmnoževanje potrebujejo gojilni medij z dodatkom seruma, ki je človeškega ali živalskega izvora. Ko celice prerastejo približno 80% dna gojilne posode, jih presadimo v novo, večjo posodo. Po potrebi lahko celice zamrznemo v tekočem dušiku, pri čemer se njihova sposobnost razmnoževanja in diferenciacije ohrani (15).



Slika 1: Vzorec lipoaspirata (A) in vzorec po obdelavi v laboratoriju; s puščico je označen pelet izoliranih celic – SVF (B).

Figure 1: Lipoaspirate sample (A) and sample after treatment in laboratory; an arrow points to pellet of isolated cells – SVF (B).

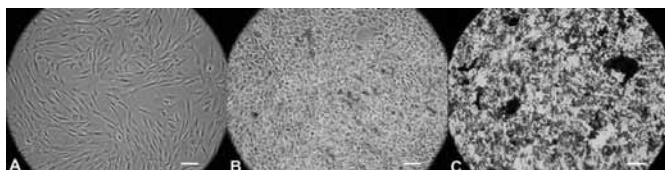
3 Diferencijski potencial ASC

Eksperimentalni podatki *in vitro* ter *in vivo* študij kažejo na multipotentnost ASC ljudi in drugih živalskih vrst.

V *in vitro* pogojih je pod vplivom različnih kemijskih dejavnikov in rastnih faktorjev diferenciacija matičnih celic iz maščobnega tkiva v

mezodermalne celične linije, kot so adipociti, hondrociti, skeletni miociti in osteoblasti, relativno enostavna (14). Nekateri raziskovalci opisujejo tudi njihovo sposobnost diferenciacije v celične linije ekto- in endodermalnega tipa kot so neuroni in Schwannove celice (16, 17), hepatociti (18), pankreatične celice (19) in endoteljske celice (13).

Zaradi sposobnosti diferenciacije v tako različne celične tipe so matične celice iz maščobnega tkiva potencialno uporabne v klinične namene za zdravljenje najrazličnejših stanj. Sposobnost diferenciacije ASC v adipocite bi lahko izbrali za rekonstrukcijo mehkih tkiv dojke ter drugih defektov, ki so nastali kot posledica različnih poškodb, kirurške odstranitve tkiva ali opeklin. Hondrogen potencial celic bi lahko izkoristili za popravilo hrustančnega tkiva v sklepih in medvretenčni ploščici, ter za rekonstrukcijo ušesnih in nosnih defektov. Z diferenciacijo ASC v kostne celice bi lahko popravljali poškodbe kostnih defektov, ki so posledica prirojenih napak ali različnih poškodb in tumorjev. Ob uspešni diferenciaciji v celične linije endo- in ektodermalnega tipa bi bile ASC primerne za zdravljenje širokega spektra najrazličnejših bolezenskih stanj kot so npr. regeneracija srčne mišice, ishemične bolezni žilja, poškodbe možgan in perifernih živcev, diabetes tipa 1, kronična odpoved jeter,... (6). Pri tem se je potrebno zavedati, da je v večini primerov do dejanske uporabe v klinični praksi še daleč. Odprtih je namreč še veliko pomembnih nerešenih znanstvenih in medicinskih vprašanj. Odkriti je potrebno ključne molekularne poti in mehanizme, ki usmerjajo ASC v določeno celično linijo, zagotoviti njihovo migracijo v poškodovano tkivo ali organ v *in vivo* okolju, preprečiti možno spontano transformacijo celic v organizmu ter v končni fazi postaviti temelje za proizvodni proces, ki bo zagotavljal ustrezno kvaliteto pridobljenih celic v skladu z zahtevami dobre proizvodne prakse (GMP) (6, 20, 21).



Slika 2: Mikroskopski posnetki matičnih celic iz maščobnega tkiva (merilo 100 μm): nediferencirane matične celice (A), celice diferencirane v adipogeno smer z lipidnimi vakuolami (B) in celice diferencirane v osteogeno smer s temno obarvanimi depoziti kalcija (C).

Figure 2: Microscopic images of adipose-derived stem cells (scale bar 100 μm): non-differentiated stem cells (A), cells differentiated into adipocyte lineage with lipid vacuoles (B) and cells differentiated into osteogenic lineage with dark colored calcium deposits (C).

4 Klinična uporaba danes

V današnji klinični praksi se matične celice iz maščobnega tkiva uporabljajo največkrat neizolirane - pomešane med maščobo, ki jo vbrizgavamo v različne dele telesa. Coleman je s svojimi kliničnimi primeri pokazal, da vbrizgavanje maščobe v obraz ne poveča le volumna ampak regenerira tudi kožo obraza (22). Učinke vbrizgavanja maščobe v dojke je opisal Delay s sodelavci (23). Vbrizgavanje maščobe z matičnimi celicami izboljša angiogenezo ter

celjenje ran po obsevanju (24). Trenutno najmodernejši način aplikacije matičnih celic iz maščobnega tkiva je t.i. cell assisted lipotransfer (CAL) metoda (25). Pri tem postopku iz polovice aspirirane maščobe izolirajo matične celice (optimiziran postopek traja približno 90 min), s katerimi obogatijo preostali del maščobe ter vse skupaj injicirajo v mesto, ki ga želijo zapolniti. Pri tej metodi avtologne matične celice pospešujejo angiogenezo, kar je bistveno za preživetje presadka in obenem zmanjšajo postoperativno atrofijo. Objavljene so že študije vbrizgavanja CAL v obraz in dojko (25, 26).

Matične celice iz maščobe so bile uporabljene tudi za rekonstrukcijo defektov kosti (27, 28). Lendeckel s sodelavci je defekt lobanje rekonstruiral s kombinacijo avtologne spongiozne kosti vzete iz črevnice ter matičnih celic, ki jih je prilepil s fibrinskim lepilom na resorbilen nosilec. Nosilec so nato vstavili na mesto vrzeli. Tri mesece po rekonstrukciji je glede na rezultate slikanja z računalniško tomografijo nastalo novo kostno tkivo. Defekt je bil skoraj popolnoma zaraščen (27). Mesimaki s sodelavci je za rekonstrukcijo defekta tkiv po hemimaksilektomiji uporabil mikrovaskularni prosti reženj z ektopično kostjo v njem, ki jo je vzgojil s pomočjo v prosti reženj vstavljenega konstrukta iz matičnih celic, rastnega faktorja BMP-2 in celičnega nosilca. Po osmih mesecih je iz konstrukta nastala zrela kost (28).

Na področju gastroenterologije potekajo zaključne faze kliničnih študij za zdravljenje kompleksnih perianalnih fistul, ki nastanejo pri Crohnovi bolezni in drugih podobnih stanjih. Iz rezultatov raziskave je razvidno, da matične celice iz maščobnega tkiva zelo uspešno sodelujejo pri zdravljenju fistul (29).

Imunosupresivni značaj ASC so izkoristili tudi Fang s sodelavci v klinični študiji šestih pacientov z akutno GvHD neodzivno na steroidno zdravljenje. Do umirjanja bolezni je prišlo pri petih pacientih, od katerih so v povprečnem obdobju spremljanja zdravljenja štiridesetih mesecev preživel štiri pacienti (30).

Glede na podatke ameriškega Nacionalnega instituta za zdravje (NIH; www.clinicaltrials.gov), poteka trenutno 14 kliničnih študij z uporabo ASC, med drugim tudi za zdravljenje diabetesa (tip 1 in 2), kardiovaskularnih bolezni (kronična ishemična miokarda, zdravljenje pacientov po preboleli srčni kapi) in jetrne ciroze.

5 Zaključek

Zaradi lahke dostopnosti, številčnosti in sposobnosti diferenciacije v različne celične tipe, predstavljajo ASC odličen vir MSC. Kljub temu, da poteka zaenkrat še veliko raziskav v *in vitro* pogojih, so se pojavile tudi prve klinične aplikacije predvsem na področju rekonstrukcijske kirurgije in regenerativne medicine. Nove perspektive njihove uporabe odstira tudi dejstvo, da podobno kot matične celice iz kostnega mozga, delujejo imunosupresivno. Za zdravljenje različnih prirojenih ali pridobljenih bolezenskih stanj, bi torej lahko uporabljali ne le avtologne temveč tudi alogenske celice, in sicer v smislu izrabljanja njihovega imunosupresivnega delovanja (avtoimunske bolezni, GvHD), kot tudi potenciala diferenciacije. V prihodnosti lahko pričakujemo vedno večjo uporabo matičnih celic v raziskovalne in klinične namene. Maščobno tkivo zaradi količine ter enostavnega dostopa postaja vedno bolj priljubljen vir le-teh.

6 Literatura

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
2. Bieback K, Kern S, Kocaömer A et al. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed. Mater. Eng.* 2008; 18(1 Suppl): S71-6.
3. Puissant B, Barreau C, Bourin P et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* 2005; 129: 118-129.
4. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006 May; 24: 1246-1253.
5. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24: 2582-2591.
6. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-827.
7. Van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003; 27: 889-895.
8. Akanbi KA, Brodie AE, Suryawan A et al. Effect of age on the differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in culture. *J. Anim. Sci.* 1994; 72: 2828-2835.
9. Bakker AH, Van Dielen FM, Greve JW et al. Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obes. Res.* 2004; 12: 488-498.
10. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5 year experience with over 3000 cases. *Plast. Reconstr. Surg.* 1983; 72: 591-597.
11. Von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S et al. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 87-92.
12. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: Controlled demonstrations. *Aesthetic Plast. Surg.* 1995; 19: 421-425.
13. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-663.
14. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7: 211-228.
15. Gonda K, Shigeura T, Sato T et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008; 121: 401-410.
16. Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294: 371-379.
17. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 2007; 207: 267-274.
18. Seo MJ, Suh SY, Bae YC et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 328: 258-264.
19. Timper K, Seboek D, Eberhardt M et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 341: 1135-1140.
20. Rubio D, Garcia S, Paz MF et al. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One.* 2008; 3: e1398.
21. Sensebé L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* 2008; 18(1 Suppl): S3-10.
22. Coleman SR. Facial augmentation with structural fat grafting. *Clin. Plast. Surg.* 2006; 33: 567-577.
23. Delay E, Delaporte T, Sinna R. Breast implant alternatives. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 2005; 50: 652-672.
24. Rigotti G, Marchi A, Galìè M et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 119: 1409-1422.
25. Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic. Plast. Surg.* 2008; 32: 48-55; discussion 56-57.
26. Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-Assisted Lipotransfer for Facial Lipoatrophy: Efficacy of Clinical Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Dermatol Surg.* 2008; 34: 1178-1185.
27. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2004; 32: 370-373.
28. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2009; 38: 201-209.
29. Garcia-Olmo D, Garcia-Arnanz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2008; 8: 1417-1423.
30. Fang B, Song Y, Liao L et al. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* 2007; 39: 3358-3362.

Navodila avtorjem

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

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

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

Sprejem prispevka v uredništvo

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

1 Spremni dopis:

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

2 Izjavo:

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

Prva verzija rokopisa

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

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

1 Oblika rokopisa

Naslovi rokopisa

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

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

Podnaslovi rokopisa

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

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

Besedilo rokopisa

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

2 Vsebina rokopisa

Rokopis naj bo sistematično strukturno urejen in razdeljena na poglavja.

Izvirni znanstveni članki naj imajo najmanj naslednja poglavja:

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

Pregledni članki pa

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

Vsako trditev

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

3 Slike, preglednice in grafikoni

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

3.1 Slike

Slike naj merijo v širino in višino največ 18 cm. Dimenzijsko naj se slika čimbolj približa dejanski velikosti v tiskani verziji. Velikost besedila na sliki pa je lahko med 8 in 12 pt. (*opomba*: največkrat v tisku naletimo na velikost črk10 pt).

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

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

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

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

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

Primer:



Slika 1. Logo Slovenskega Farmacevtskega društva (1).

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

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

3.2 Preglednice

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

Primer:

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

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

Tip objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

3.3 Grafikoni

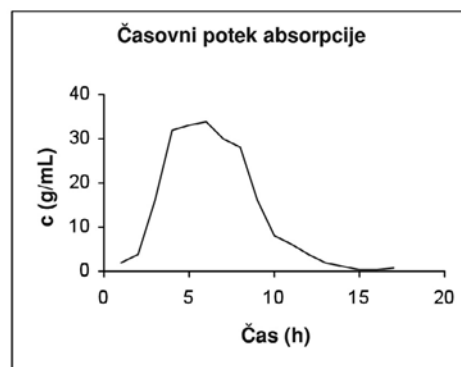
Vsaka grafikon mora biti ustrezno označen z zaporedno številko grafikona in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bil povzet, razen v primeru kadar je avtor grafikon pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad grafikonom.

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

Primer:

Grafikon 1. Časovni potek absorpcije (1).

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

**4 Poimenovanja in okrajšave**

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

5 Primer navajanja literature

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

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

Končna verzija prispevka

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

Končna verzija rokopisa

1 Naslovna stran prispevka (prva stran rokopisa) mora vsebovati:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni
- Korespondenčnega avtorja z njegovimi kontakti

2 Rokopis (druga stran rokopisa) naj v nadaljevanju vsebuje:

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

3 Spremljajoče slike

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

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

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika_1, slika_2, itd). Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk.

Ostali prispevki

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

Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v elektronski obliki korespondenčni avtorji pošljejo na naslov:

Uredništvo Farmacevtskega vestnika

Slovensko farmacevtsko društvo

Dunajska 184 A, 1000 Ljubljana

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

e-pošta:

glavna urednica: urednica-fv@sfd.si

tajništvo: tajninstvo-fv@sfd.si

Korekture

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

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

Prihodnost je na dlani - bolj kot kdajkoli prej.



21. stoletje bo doba podobnih bioloških zdravil. V Leku, članu skupine Sandoz, smo zaupali v naše znanje, zato smo danes lahko ponosni na našo pionirsko vlogo v razvoju podobnih bioloških zdravil. Z lastnim razvojem v genski tehnologiji smo začeli v osemdesetih letih prejšnjega stoletja in si ustvarili trden temelj za vstop v biofarmacevstvo – tehnologijo prihodnosti.

Danes razvojni center v Mengšu, ki je eden od centrov odličnosti biofarmaceutike v Novartis, pomembno prispeva k razvoju podobnih bioloških zdravil

za Sandozove trge po vsem svetu ter tudi za domači, slovenski trg. Razvoj in proizvodnja podobnih bioloških zdravil sta izjemno zahtevna, saj moramo proizvajalci v celoti izpolnjevati enake standarde kot veljajo za originalna zdravila. Nam je kot prvim uspelo priti do cilja.

Z našimi podobnimi biološkimi zdravili, ki so dokazano kakovostna, varna in učinkovita, bo še več bolnikov spet polno zaživel. Kar se je nekoč zdelo komaj uresničljiva ideja, je danes dosegljivo vsem nam.



član skupine Sandoz

Lek farmacevtska družba d.d. Verovškova 57, 1526 Ljubljana, Slovenija • www.lek.si



odzivno, kakovostno, učinkovito

oskrbujemo lekarne,
bolnišnice,
zdravstvene domove,
veledrogerije
ter druge, ki opravljajo
zdravstveno
in veterinarsko
dejavnost
širok Slovenije



že polna
štiri desetletja

SALUS, Ljubljana, d.d.
Mašera-Spasičeva ulica 10
SI - 1000 Ljubljana

telefon
+386 (0)1 589 91 00
telefaks
+386 (0)1 568 10 22

e-pošta
info@salus.si
splet
www.salus.si



ČESTITAMO OB 60. OBLETNICI SLOVENSKEGA
FARMACEVTSKEGA DRUŠTVA.

Supradyn® Q10

Supradyn® Junior

Supradyn® vital 50+

 **ASPIRIN**®

ASPIRIN® MIGRAN

ASPIRIN® DIREKT

 **ASPIRIN**® PLUS C

ASPIRIN® COMPLEX


elevit
PRONATAL

**Hvala za vaše
zaupanje
in priporočilo.**



Bayer HealthCare
Consumer Care

Rupurut
Rennie®

Canesten®
Mycospor®

Saridon®

Bepanthen®
Bepanthen® Plus
Bepanthol®



Z znanjem **za**
naš boljši jutri

Lercapress[®]
lerkanidipin

Nebilet[®]
nebivolol

Tenzopril[®]
zofenopril

Frotan[®]
frovatriptan

Premovir[®]
brivudin

Menadex[®]
deksketoprofen trometamol



BERLIN-CHEMIE
MENARINI

Dodatne informacije so na voljo pri:
BERLIN-CHEMIE AG - Podružnica Ljubljana,
Tivolska cesta 30, 1000 Ljubljana
telefon 01 300 2160, telefaks 01 300 2169,
berlin.chemie.menarini@siol.net

Klinična prehrana

Parenteralna prehrana

Fresenius Kabi

Enteralna prehrana

NA
VMESNI
LISTI



KABIVEN/ SMOFKABIVEN

- triprekatna vreča
- popolna
parenteralna
prehrana



SMOFLIPID

4 vrste maščob
v eni vreči!



OMEGAVEN

omega 3
maščobne
kisline



DIPEPTIVEN

glutamin v obliki
dipeptida za
intravensko
infundiranje

FRESUBIN ORIGINAL

1,0 kcal/ml

FRESUBIN ORIGINAL FIBRE

1,0 kcal/ml

FRESUBIN ENERGY

1,5 kcal/ml



FRESUBIN 2 KCAL

2,0 kcal/ml



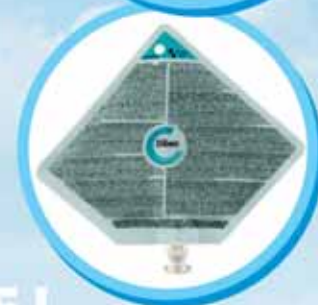
SUPPORTAN

1,5 kcal/ml
1g EPA/200 ml
za onkološke
bolnike



DIBEN

1,5 kcal/ml in 1,0 kcal/ml
za diabetike



KER ŽIVLJENJE ŠTEJE!



medias
international

Medias International, d.o.o.
Telefon: 01 520 2302
www.medias-int.si
info@medias-int.si



**FRESENIUS
KABI**

caring for life

Do popolnosti predani skrbi za življenje.



Pfizer Luxembourg SARL, SPAIN DIVISION OF LUXEMBOURG, S.A. Avenue J. J. Moëns
1, 1852 Pfaffers, pedanaica Ljubiata, LUXEMBOURG 2000 2000

Fragmin
dalvaz

SUTENT
sunitinibov maleat

SORTIS
dalvaz

VIAGRA
(sildenafil)

Zoloft
dalvaz

RELPAK
(eletriptan)

LYRICA
pregabalin

CHAMPIX
dalvaz

CARDURA XL
dalvaz

SAVAO ZA STROKOVNO JAVNOST

Iz Creda Johnson & Johnson, 1943:

Menimo, da smo najprej odgovorni zdravnikom, sestram in bolnikom, materam in očetom ter vsem drugim, ki uporabljajo naše izdelke in storitve. Ko poskušamo zadostiti njihovim potrebam, mora biti zelo kakovostno vse, kar naredimo ..."

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

Psihiatrija

Nevrologija

Onkologija

Dermatologija

Ginekologija

Virologija

Nefrologija

Bolečina



JANSSEN-CILAG

farmaceutski del *Johnson & Johnson* d.o.o.



STRNJENA VRSTA PRVOVRSTNIH.

Medis, d.o.o., Brnčičeva 1, Ljubljana / regionalna prodavnica / Istejka 10, Ljubljana



1 PRVO
VRSTNO

Vrsta prvovrstnih izdelkov za zdravje, ki jih prinašamo na police lekarn, bolnišnic in vaših domov, je strnjena, saj je predolga, da bi jo lahko v celoti objavili. V njej boste zlahka prepoznali odlične inovativne izdelke, ki jim že leta zaupate.

V Medisu vstopamo v svoje tretje desetletje in skupaj z vami gremo novim časom naproti.

 **MEDIS**  *dvajset let
zdravih vrednot*

Bilobil. In nič vam ne uide iz glave!



Novo zdravilo za boljši spomin in večjo moč koncentracije

Bilobil 120 mg vsebuje največji odmerek ginka na slovenskem trgu. Že z dvema kapsulama na dan zagotovimo največji dnevni odmerek (240 mg), ki ga priporočajo evropske smernice. Odmerjanje dvakrat na dan omogoča enostavnejše zdravljenje in zato boljše rezultate zdravljenja.

www.krka.si

KRKA

*Naša inovativnost in znanje
za učinkovite in varne
izdelke vrhunske kakovosti.*

Pred uporabo natančno preberite navodilo!

O tveganju in neželenih učinkih se posvetujte z zdravnikom ali s farmacevtom.