

Farm Vestn 2009; 60: 249-292  
UDK 615 CODEN FMVTA, SLO ISSN 0014-8229



# farmaceutski vestnik 5



Š T 5 . N O V E M B E R 2 0 0 9 . L E T N I K 6 0

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA





## Pot do zdravja

Nal oči so zdrav in srečni ljudje. Imo veletrgovalca za prodajo zdravil z najboljšo 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 številni lekarni in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

Zavedamo se, da nam prihodnost ponuja nešteto živov. Pomagamo jih lahko z nenehnim izpopolnjevanjem. S kakovostnimi storitvami in s široko paleto zdravil ter drugih izdelkov bomo zaupanje svojih kupcev opravičevali tudi v prihodnosti.

01 470 98 00 | [www.kemofarmacija.si](http://www.kemofarmacija.si)



# Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 5 • N O V E M B E R 2 0 0 9 • L E T N I K 6 0

## 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 / Adress of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

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

*V farmacevtski in medicinski stroki je završalo! Vzrok nemira je bila novica, da pripravlja Ministrstvo za zdravje s pripadajočimi agencijami in organi sistem generičnega predpisovanja zdravil. Zdravniki so komentirali nekako takole: »Ja, a zdaj bodo pa farmacevti odločali, katero zdravilo naj predpišem?« in lekarniški farmacevti: »Joj, že tako smo prezasedeni, časa ni niti sekunde več, sedaj bo pa odgovornost in dodatno delo na naši strani...« Naj takoj povem, da verjetno do tega še ne bo prišlo tako kmalu. Pred pričetkom delovanja sistema generičnega predpisovanja je potrebno zagotoviti celovito sistemsko računalniško podporo, sicer sistem ne bo ne pregleden, ne širše uporaben. Vendar, v prihodnosti bo verjetno ta način sprejet kot podpora racionalnemu predpisovanju zdravil. Namesto, da se držimo za glavo in z bojznijo gledamo, kaj bo nastalo, moramo farmacevti spoznati to namero kot še eno možnost, da se farmacija kot stroka, znanost in veda globlje zasidra med laično javnost, obenem pa omogoči povezovanje z širšo medicinsko stroko. Rešitev je torej le v izobraževanju (pa ne masovno turističnem v eksotičnih krajih). Upam, da tudi Farmaceutski vestnik vsaj delno pripomore k širitvi strokovnega znanja med farmacevti. Od nas samih je odvisno, kako bomo ob novem sistemu sprejeti in prepoznani kot nujni, soodgovorni del racionalnega predpisovanja zdravil. Tudi v tej številki boste tako lahko prebrali o epoetinih, pa poskusu priprave novih učinkovin za zmanjšanje prekomerne telesne teže. Iz področja farmacevtske biokemije se bomo seznanili z izoencimi aldo-keto reductaz in razvojem novih potencialnih učinkovin, usmerjenih proti omenjenim tarčam, sledita zanimiva prispevka iz področja farmacevtske tehnologije, na koncu pa je Maja Mulej Vedlin, dr. dent. med. prikazala idejno zasnovo za smernice pri preprečevanju infekcijskega endokarditisa v zobozdravstvu.*

*In kaj je pri Farmaceutskem vestniku še novega? Verjetno ste opazili, da je na mestu glavne urednice novo ime: dr. Petra Slanc Može, mag.farm. Petra sodeluje kot sourednica rubrike »Novosti iz sveta farmacije« že nekaj let, sedaj pa je na prigovarjanje uredništva, predvsem bivše glavne urednice, dr. Andrijane Tivadar, prevzela to pomembno funkcijo. V imenu uredništva in vseh bralcev Farmaceutskega vestnika se Andrijani najlepše zahvaljujem za dosedanje sodelovanje, saj je bila nekaj let gonilna sila, ki je skrbela za redno izhajanje Farmaceutskega vestnika, tudi s tem, ko je priganjala odgovornega urednika, naj pripravi uvodnik in pregleda vsebino številke. Kot odgovorni urednik sem vesel, da ostaja dr. Tivadarjeva v uredniškem odboru, saj je njen prispevek h kvaliteti Farmaceutskega vestnika še kako pomemben.*

*Prof.dr Borut Štrukelj*

## *Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles*

---

**Klementina Fon Tacer**

Hormon stradanja fibroblastni rastni dejavnik 21 - novo zdravilo za debelost in metabolni sindrom?  
Fasting hormone fibroblast growth factor 21 – new therapy for obesity and metabolic syndrome?

**251**

---

**Uroš Klančar, Saša Baumgartner**

Izzivi in možni tehnološki pristopi za doseganje kinetike 0. reda sproščanja učinkovin iz ogrodnih tablet  
Challenges and technological opportunities to achieve zero order drug release from matrix tablets

**257**

---

**Petra Brožič, Stanislav gobec, Tea Lanišnik Rižner**

Izoencimi aldo/keto-reduktaz iz poddružine 1C kot tarče za razvoj zdravilnih učinkovin  
Aldo/keto reductase isozymes of the 1C subfamily as new drug targets

**265**

---

**Ilija Ilić, Janez Kerč**

Tabletiranje obloženih pelet – večnotne farmacevtske oblike  
Tableting of coated pellets – multiple unit dosage forms

**271**

---

**Klemen Španinger, Nataša Debeljak**

Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija  
Erythropoietin, epoetins and detection

**279**

---

**Maja Mulej Vedlin**

Preventiva infekcijskega endokarditisa v zobozdravstvu  
Prevention of infective endocarditis in dentistry

**286**

---

# Hormon stradanja fibroblastni rastni dejavnik 21 - novo zdravilo za debelost in metabolni sindrom?

## Fasting hormone fibroblast growth factor 21 - new therapy for obesity and metabolic syndrome?

Klementina Fon Tacer

**Povzetek:** Naraščajoče pojavljanje debelosti in posledičnih metabolnih motenj zbuja zaskrbljenost in dobesedno kliče po razvoju učinkovitejših in varnejših terapevtskih strategij. Dosedanja priporočila za zdravljenje metabolnega sindroma obravnavajo posamezna bolezenska stanja. Tako so fibrati zdravilo izbora za zdravljenje hiperlipidemij kot glavnega predispozicijskega dejavnika metabolnega sindroma. Fibrati se vežejo na jedrni receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov alfa (PPAR $\alpha$ ), ki sproži izražanje genov, vključenih v razgradnjo maščob in sintezo ketonskih teles. Večina učinkov PPAR $\alpha$  posreduje nedavno odkriti hormon stradanja fibroblastni rastni dejavnik FGF21. Študije na glodalcih in primatih so pokazale, da FGF21 sproži številne pozitivne presnovne spremembe brez očitnih neželenih učinkov. FGF21 je tako zanimiv kandidat za razvoj novih zdravil za zdravljenje debelosti, kardiovaskularnih obolenj in sladkorne bolezni.

**Ključne besede:** *metabolni sindrom, sladkorna bolezen tipa 2, fibrati, PPAR $\alpha$ , stradanje*

**Abstract:** Increasing prevalence of metabolic diseases is alarming and highlights the need for more effective and safer therapies. Current recommendations for therapy for metabolic syndrome focus on corrections of the individual components. Fibrates are used to treat hyperlipidemia as a predisposing factor to metabolic syndrome and cardiovascular disease. Fibrates mediate their therapeutic effects through the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ). PPAR $\alpha$  acts as a transcriptional activator of genes involved in lipolysis and ketone body synthesis. The majority of PPAR $\alpha$  effects are mediated by recently discovered starvation hormone - fibroblast growth factor FGF21. Recent evidence from several animal studies indicates that FGF21 induces numerous beneficial metabolic changes without apparent adverse effects. These results suggest that FGF21 could be a novel and attractive drug candidate for the treatment of cardiovascular disease, obesity, and type 2 diabetes.

**Keywords:** *metabolic syndrome, type 2 diabetes, fibrates, PPAR $\alpha$ , starvation*

### 1 Debelost in metabolni sindrom

Debelost predstavlja velik zdravstveni, socialni in gospodarski problem v vseh državah Evropske Unije. Evropa stopa po sledih ZDA, kjer je debelost povzročila pravo epidemijo sladkorne bolezni tipa 2. Po podatkih Mednarodne zdravstvene organizacije (WHO) je bilo leta 2005 na svetu 1,6 milijarde odraslih s prekomerno telesno težo in več kot 400 milijonov predebelih (<http://www.who.int/topics/obesity/en>). Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja (<http://www.ivz.si>) prekomerna telesna teža in debelost naraščata tudi v Sloveniji. V letu 2007 je bilo v Sloveniji 55 % prebivalcev, starih 15 let in več, prekomerno težkih ali debelih (<http://www.ivz.si>).

Debelost je predvsem problem moderne družbe in posledica močno spremenjenega načina življenja. Osnovni vzrok debelosti je zelo

preprost, nesorazmerje med zaužitimi in porabljenimi kalorijami, do katerega pride zaradi preobilne prehrane in premajhne fizične aktivnosti. Že pred petdesetimi leti je Neel (1) predstavil hipotezo »varčnega gena oz. genotipa«, s katero je poskušal razložiti razširjenost debelosti v moderni družbi. V naši zgodnji evolucijski zgodovini so geni, ki so pospeševali shranjevanje maščob v obdobju, ko je bilo hrane v izobilju, omogočali preživetje med obdobji stradanja. V moderni družbi, ko je hrana vedno na voljo, so prav ti geni škodljivi, ker spodbujajo nalaganje maščob in nastanek debelosti. Posledica debelosti so resne zdravstvene težave, ki jih skupno imenujemo metabolni sindrom. Sindrom združuje več bolezenskih stanj, sladkorno bolezen tipa 2, moteno toleranco za glukozo, arterijsko hipertenzijo, dislipidemije, trebušno debelost, srčno-žilna obolenja in neodzivnost na inzulin.



## 2 Homeostaza energije

Organizem neprestano kroži med stanjema obilja hranilnih snovi in njihovega pomanjkanja. Konstantno koncentracijo hranilnih snovi v telesu zagotavlja s prefinjenim uravnavanjem številnih metaboličnih poti. Še posebej natančno je kontrolirana količina glukoze v krvnem obtoku, ki se giblje v zelo ozkih fizioloških mejah (4-6 mM). Glavni cilj vseh homeostatskih mehanizmov je obdržati dovolj visoko raven glukoze za oskrbo možganov in hkrati ohraniti energetske zaloge za ostala tkiva. Odločilno vlogo pri uravnavanju homeostaze energije imata hormona inzulin, kot hormon hranjenja, in glukagon, kot hormon stradanja, ki ju izločajo celice endokrinega dela trebušne slinavke (2).

Jetra predstavljajo centralni organ pri uravnavanju ravnovesja energetskih snovi v organizmu. Po hranjenju, ko je hranilnih snovi dovolj, jetra shranjujejo energijo v obliki glikogena in tvorijo maščobne kisline, ki se s lipoproteinskimi delci prenesejo v belo maščevje, kjer se skladiščijo v obliki trigliceridov. Med stradanjem se v jetrih sproži sinteza glukoze in ketonskih teles. Potrebno energijo pa zagotavlja razgradnja maščobnih kislin, ki po krvnem obtoku pridejo iz belega maščevja (2).

Vse živali potrebujejo energijo, ki jo pridobijo s hrano, za ohranjanje svojega bazalnega metabolizma, fizično aktivnost, rast in razmnoževanje. Na pomanjkanja hrane so se sesalci prilagodili z različnimi vedenjskimi, fiziološkimi in strukturnimi vzorci, s katerimi želijo znižati porabo energije. Tako znižajo svoj bazalni metabolizem in spontano aktivnost ter se prenehajo razmnoževati. Eden izmed ključnih mehanizmov prilagoditve na stradanje pa je uporaba alternativnega vira energije. Stradanje povzroči metabolni preklap, glavni energetski vir ne predstavljajo več ogljikovi hidrati pač pa maščobe in ketonska telesa. Pri nekaterih pticah in sesalcih stradanje izzove tudi znižanje telesne temperature in prehod v stanje torporja in hibernacije (3).

Jetra preklaplajo med dvema metabolnima ekstremoma z različnimi regulatornimi mehanizmi (2). Klasična alosterična kontrola aktivnosti encimov in njihove potranslacijske modifikacije predstavljajo hiter odgovor na spremembe. Uravnavanje prepisovanja genov, ki nosijo zapis za ključne encime metaboličnih poti, pa je dolgoročnejša prilagoditev in zahteva prenos signala s površine celice v celično jedro, kje se aktivira prepisovanje tarčnih genov.

## 3 Receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov alfa (PPAR $\alpha$ ), in fibrati

Jetra uravnavajo metabolizem lipidov na ravni njihovega sprejemanja iz krvnega obtoka, sinteze, pretvorbe v druga goriva, oksidacije in sproščanja nazaj v krvni obtok. Jedrni receptorji so transkripcijski dejavniki, ki delujejo kot znotrajcelični receptorji lipofilnih molekul, kot so steroidni hormoni in dietetne maščobe. Po vezavi liganda se receptorji aktivirajo in sprožijo prepisovanje tarčnih genov. Jedrni receptorji, ki delujejo kot heterodimeri z receptorjem 9-cis retinojske kisline (RXR, *angl. retinoic X receptor*), so osrednji senzori maščob v organizmu in kot metabolna stikala uravnavajo njihovo ravnovesje (4).

PPAR $\alpha$  (*angl. peroxisome proliferator activated receptor*) je postal zanimiv v farmacevtski industriji, ko se je izkazalo, da so takrat že

upeljavljena zdravila za zdravljenje hiperlipidemij, fibrati, pravzaprav njegovi ligandi (5). Fibrati delujejo tako, da se vežejo na PPAR $\alpha$ , ga aktivirajo in sprožijo izražanje genov, vključenih v razgradnjo maščob. Fibrati (pri nas sta na trgu fenofibrat in gemfibrozil) so zdravila izbora za zdravljenje povečane količine trigliceridov v krvi in alternativa pri zdravljenju s statini (5).

PPAR $\alpha$  je izražen v tkivih z visoko sposobnostjo presnove maščob, kot so jetra, ledvica in srce. Veže se na DNA kot heterodimer z RXR in uravnava izražanje genov, vpletenih v metabolizem maščobnih kislin in holesterola (6). Pri glodalcih aktivacija PPAR $\alpha$  sproži tudi razmnoževanje peroksisomov (od tod tudi njihovo ime) in povečanje jeter, česar pa ni zaznati pri ljudeh (7). Miši z izničnim genom PPAR $\alpha$  imajo moteno oksidacijo maščobnih kislin in spremenjeno razmerje lipoproteinov, zato se niso sposobne prilagoditi niti na stradanje niti na prehrano z veliko maščobami (8). PPAR $\alpha$  je namreč še posebno pomemben za prilagoditev organizma na stradanje. Med stradanjem je presnova maščob v jetrih programirana tako, da se maščobne kisline oksidirajo in zagotavljajo energijo za sintezo ketonskih teles in glukoze. Maščobne kisline, ki se ob pomanjkanju hranilnih snovi sprostijo iz maščobnih zalog, predstavljajo fiziološki ligand PPAR $\alpha$  in ga aktivirajo. PPAR $\alpha$  sproži transport maščobnih kislin, njihovo razgradnjo in tvorbo ketonski teles (povzeto v 9).

## 4 Hormon stradanja - fibroblastni rastni dejavnik 21 - FGF21

Večino učinkov PPAR $\alpha$  posreduje fibroblastni rastni dejavnik 21 (FGF21) (10, 11). FGF21 je član družine fibroblastnih rastnih dejavnikov, ki primarno uravnavajo embrionalni razvoj in rast organov (12). Poddružina FGF19 je edinstvena med ostalimi fibroblastnimi rastnimi dejavniki. FGF15/19, 21 in 23 imajo zaradi manj ohranjenih strukturnih motivov nizko afiniteto za glikozaminoglikane, kar jim omogoča difuzijo z mesta nastanka in endokrino delovanje (13). Tako se FGF15/19 izloča v tankem črevesju kot odgovor na povečano koncentracijo žolčnih kislin med hranjenjem in v jetrih zavre njihovo sintezo (14). FGF23 se izloča iz kosti in v ledvicah uravnava metabolizem fosfatov in vitamina D (15). FGF21 pa je neobhodno potreben za prilagoditev organizma na stradanje (Slika 1) (10).

### 4.1 Fibroblastni rastni dejavnik 21 in stradanje

Dve skupini sta s komplementarni raziskavami pokazali, da je FGF21 (10) zadosten in nujen (11) za prilagoditev organizma na stradanje. Med stradanjem PPAR $\alpha$  v jetrih sproži izražanje FGF21 (10), ki se sprosti v krvni obtok in kot endokrini hormon sproži razgradnjo maščob v belem maščevju in sintezo ketonskih teles v jetrih. Poleg tega pa FGF21 povzroči zmanjšanje telesne aktivnosti ter sproži torpor, kratkotrajno stanje odrevenelosti, ki je podobno zimskemu spanju (Slika 1) (10).

Dolgotrajno obdobje stradanja zavre tudi telesno rast. Inagaki in sodelavci (16) so pokazali, da FGF21 povzroči odpornost proti rastnemu hormonu, zniža namreč količino aktivne oblike transkripcijskega dejavnika STAT5, znotrajceličnega prenašalca

signala ravnega hormona. Tako inhibira izražanje inzulina podobnega ravnega dejavnika (IGF-1), ki posreduje učinke ravnega hormona.

FGF21 pa se izraža tudi v belem maščevju, kjer ga uravnava drugi član receptorjev peroksisomskih proliferatorjev gama (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  je tarča tiazolidindionov, zdravil za zdravljenje sladkorne bolezni, ki povečajo občutljivost na inzulin (17). Predpostavljajo, da del njihovih učinkov posreduje ravno FGF21.

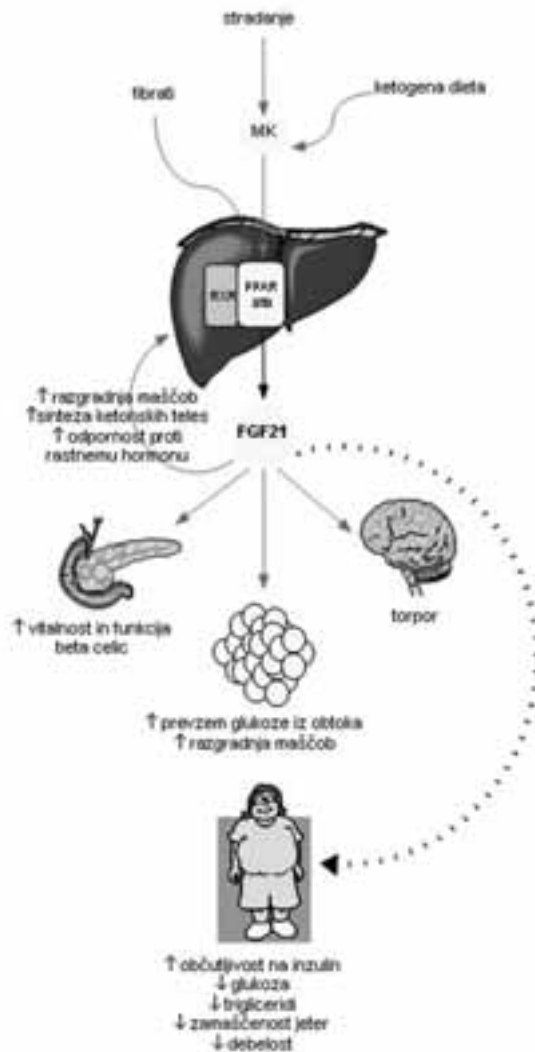
## 4.2 Fibroblastni rastni dejavnik 21 in ketogena dieta

Količina FGF21 pa ni povečana samo med stradanjem, pač pa tudi s prehrano z veliko maščobami in malo ogljikovimi hidrati (t.i. ketogena dieta ali Atkinsonova dieta). Ketogena dieta izzove stradanju podoben metabolni odziv (Slika 1). V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je dieto oblikoval ameriški zdravnik Robert Atkins in sprožil veliko zanimanja z novim pristopom k hujšanju brez odrekanja hrane.

Ketogena dieta v organizmu sproži procese oksidacije maščob, katerih posledica je izguba zalog maščobnega tkiva in hujšanje. Učinkovitost diete z malo ogljikovimi hidrati najverjetneje sloni tudi na hormonu stradanja FGF21, ki ima pomembno vlogo pri preklapu s porabe ogljikovih hidratov na porabo maščob, značilno tako za stradanje kot za ketogeno dieto. Z analizo transkriptoma miši, ki so bile na ketogeni dieti, so ugotovili, da je FGF21 eden izmed najbolj aktiviranih genov (11) in izražen podobno kot med stradanjem. Njegova aktivacija s ketogeno dieto pa je odvisna predvsem od PPAR $\alpha$ .

## 4.3 Terapevtski učinki fibroblastnega ravnega dejavnika 21

FGF21 se je pojavil v energetskem metabolizmu kot učinkoviti regulator ravnovesja glukoze in lipidov pri glodalcih (18). Najprej so odkrili njegove pozitivne metabolične učinke z visokozmogljivo analizo (*angl. high throughput screening*) dejavnikov, ki pospešijo



**Slika 1:** Fiziološka vloga fibroblastnega ravnega dejavnika FGF21 in njegovi potencialni terapevtski učinki. Stradanje izzove razgradnjo trigliceridov in sproščanje maščobnih kislin iz zalog v belem maščevju. Maščobne kisline po krvi pridejo v jetra, kjer se vežejo na jedrni receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov alfa (PPAR $\alpha$ ). Poleg stradanja, PPAR $\alpha$  aktivirajo tudi fibrati, zdravila za zdravljenje hiperlipidemij, in ketogena dieta. Po aktivaciji PPAR $\alpha$  v jetrih izzove izražanje endokrinega fibroblastnega ravnega dejavnika 21 (FGF21), ki omogoči organizmu prilagoditev na pomanjkanje/neravnovesje hranilnih snovi. Tako FGF21 v maščevju sproži razgradnjo maščob in sprejem glukoze v celice, v jetrih aktivira beta oksidacijo maščobnih kislin in sintezo ketonskih teles, v trebušni slinavki pa poveča vitalnost in aktivnost beta celic. FGF21 prav tako zavre rast in sproži prehod v stanje odrevenelosti (torpor). FGF21 ima tako potencialne terapevtske učinke pri pacientih z metabolnim sindromom, ker poveča občutljivost na inzulin, izboljša krvne parametre in zmanjša debelost ter zamaščenost jeter.

**Figure 1:** Physiologic role and potential therapeutic effects of fibroblast growth factor FGF21. Starvation induces lipolysis in white adipose tissue and release of free fatty acids that bind and activate the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) in the liver. In addition to starvation, PPAR $\alpha$  is also activated by hypelipidemic drugs fibrates and ketogenic diet. Upon activation, PPAR $\alpha$  activates the expression of endocrine fibroblast growth factor FGF21 in the liver that stimulates metabolic adaptation to the fasting state. FGF21 induces adipose tissue lipolysis and glucose uptake, liver beta oxidation and ketogenesis, preservation and survival of beta-cell in pancreas. Furthermore, FGF21 also inhibits growth and induces torpor. Therefore, FGF21 has several beneficial and potential therapeutic effects in patients with metabolic syndrome, specifically, FGF21 improves insulin sensitivity, corrects serum parameters, reverses obesity and fatty liver.

sprejem glukoze v mišje maščobne celice 3T3-L1 (18). Pri glodalcih in primatih zdravljenje s FGF21 zniža raven glukoze, popravi ravnovesje maščob v krvnem obtoku, izboljša občutljivost na inzulin in delovanje celic  $\beta$  trebušne slinavke (19, 20). FGF21 tako poveča občutljivost tkiv za inzulin in ima pozitiven vpliv na številne presnovne parametre. Kljub normalni prehrani miši s povečanim izražanjem FGF21 izgledajo, kot da stradajo (10).

Hkrati FGF21 nima negativnih posledic, kot so hipoglikemija, debelost in zadrževanje vode v organizmu, ki so pogosti spremljevalci trenutnih terapij metabolnih motenj (18, 21). Pri glodalcih povečano izražanje FGF21 ne povzroča novotvorb. Še več, upočasni potek sprožene kancerogeneze (22). FGF21 tako predstavlja idealnega kandidata za zdravljenje metabolnega sindroma.

Pri diabetičnih debelih miših iz izničnim genom za leptin (miši *ob/ob*) sistemsko zdravljenje s FGF21 povzroči izgubo telesne teže, zmanjšanje maščobnih zalog in zamaščenja jeter (21). FGF21 poveča porabo energije in izboljša odzivnost na inzulin (23). Miši s povečanim izražanjem FGF21 pa so odporne na dieto z veliko maščobami (18).

Vendar pa obstajajo med glodalci in sesalci vrstno specifične razlike. Mišji protein FGF21 spodbudi razgradnjo maščob v mišjih fibroblastih 3T3-L1 (14, 18), človeški protein pa nima enakega učinka na primarni kulturi človeških maščobnih celic (24). Pri ljudeh obstajajo tudi velike medosebne razlike v koncentraciji serumskega FGF21 (25). Poleg tega se koncentracija FGF21 poveča šele po daljšem stradanju (7 dni) ali večtedenski nizkokalorični prehrani (26).

Paradoksalno zveni tudi, da je koncentracija serumskega FGF21 povečana pri glodalcih in pacientih, ki so predebili (26, 27), imajo sladkorno bolezen tipa 2 (26, 28) ali imajo povečano količino serumskih maščob (25). Vendar pa to nakazuje na razvoj odpornosti proti FGF21, podobno kot je pri metabolnih motnjah to primer za inzulin (29) in leptin (30). Vseeno pa FGF21 kaže številne pozitivne terapevtske učinke pri primatih s prekomerno telesno težo in sladkorno boleznijo (31).

## 5 Zaključek

Stradanje ima številne pozitivne učinke na metabolizem, predvsem pa aktivira razgradnjo in porabo maščob (Slika 1). Glavni regulator metabolnega preskoka k uporabi maščob kot glavnega vira energije je jedrni receptor PPAR $\alpha$ , ki aktivira izražanje številnih genov, vključenih v razgradnjo maščob. PPAR $\alpha$  je tarča že uveljavljenih zdravil za zdravljenje hiperlipidemij, fibratov. Večina učinkov PPAR $\alpha$  posreduje fibroblastni rastni dejavnik FGF21, pred nedavnim odkriti hormon stradanja. FGF21 predstavlja odličnega kandidata za zdravljenje debelosti, sladkorne bolezni tipa 2 in ostalih metabolnih motenj, saj ima pri glodalcih in primatih številne terapevtske učinke na presnovo brez neželenih posledic, ki so problem aktualnih terapij. Klinični poskusi s FGF21 so že v teku in bodo ključni pri evalvaciji njegovih terapevtskih koristi pri pacientih.

## 6 Literatura

1. Nell, J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 1962; 14: 353-362.
2. Zimmerman, J. *Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations* (5th Ed.): Devlin, Thomas M. (ed.). *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2002; 30: 274-290.
3. Wang, T., Hung, C. C., Randall, D. J. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 223-251.
4. Kliewer, S. A., Lehmann, J. M., Willson, T. M. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 1999; 284: 757-760.
5. Remick, J., Weintraub, H., Setton, R., Offenbacher, J., Fisher, E., Schwartzbard, A. Fibrate therapy: an update. *Cardiol Rev* 2008; 16: 129-141.
6. Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., Evans, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992; 358: 771-774.
7. Peters, J. M., Cheung, C., Gonzalez, F. J. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med* 2005; 83: 774-785.
8. Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-1498.
9. Shulman, A. I., Mangelsdorf, D. J. Retinoid X Receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome. *N Engl J Med* 2005; 353: 604-615.
10. Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., et al. Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPARalpha-Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab* 2007; 5: 415-425.
11. Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., Maratos-Flier, E. Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR[alpha] and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism* 2007; 5: 426-437.
12. Ornitz, D. M., Itoh, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001; 2: REVIEWS3005.
13. Kuro-O, M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 239-245.
14. Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C. L., McDonald, J. G., et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2005; 2: 217-225.
15. Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 2006; 281: 6120-6123.
16. Inagaki, T., Lin, V. Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A. Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab* 2008; 8: 77-83.
17. Wang, H., Qiang, L., Farmer, S. R. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 188-200.
18. Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; 115: 1627-1635.
19. Wenthe, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitonov, A., Koster, A., Sandusky, G. E., et al. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 2006; 55: 2470-2478.
20. Kharitonov, A., Shanafelt, A. B. Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs* 2008; 22: 37-44.
21. Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008; 149: 6018-6027.
22. Huang, X., Yu, C., Jin, C., Yang, C., Xie, R., Cao, D., et al. Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog* 2006; 45: 934-942.



23. Xu, J., Lloyd, D. J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., et al. Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 2009; 58: 250-259.
24. Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P. J., Dunbar, J. D., Kharitonov, A., Ryden, M. FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett* 2008; 582: 1725-1730.
25. Galman, C., Lundasen, T., Kharitonov, A., Bina, H. A., Eriksson, M., Hafstrom, I., et al. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab* 2008; 8: 169-174.
26. Mraz, M. B., Z. Lacinova, D. Michalsky, M. Kasalicky, D. Haluzikova, M. Matoulek, I. Dostalova, V. Humenanska, M. Haluzik, Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical Endocrinology* 2008; 9999.
27. Zhang, X., Yeung, D. C., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z. G., Liu, F., et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008; 57: 1246-1253.
28. Chen, W. W., Li, L., Yang, G. Y., Li, K., Qi, X. Y., Zhu, W., et al. Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 65-68.
29. Leahy, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2005; 36: 197-209.
30. Lonngvist, F., Arner, P., Nordfors, L., Schalling, M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1995; 1: 950-953.
31. Kharitonov, A., Wroblewski, V. J., Koester, A., Chen, Y. F., Clutinger, C. K., Tigno, X. T., et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007; 148: 774-781.



# odprto

Novartis Oncology prinaša širok spekter inovativnih zdravil, s katerimi poskuša spremeniti življenje bolnikov z rakavimi in hematološkimi obolenji.

Ta vključuje zdravila kot so Glivec® (imatinib), Tassigna® (nilotinib), Exjade® (deferasiroks), Zometa® (zoledronska kislina), Sandostatil® LAR® (oktreotid/i.m. injekcije) in Femara® (letrozol).

Novartis Oncology ima tudi obširen razvojni program, ki izkorišča najnovejša spoznanja molekularne genomike, razumskega načrtovanja in tehnologij za odkrivanje novih učinkovin.

 glivec

 Tassigna  
nilotinib

 EXJADE  
deferasiroks

ZOMETA  
zoledronska kislina

 Sandostatil® LAR®  
oktreotid

 Femara  
letrozol

 NOVARTIS  
ONCOLOGY

Novartis Pharma Services Inc., Podružnica v Sloveniji • Trzinška 30, 1000 Ljubljana

NVS-JA-01/09-SI

Sarri za strokovno pomoč

# Izzivi in možni tehnološki pristopi za doseganje kinetike 0. reda sproščanja učinkovin iz ogrodnih tablet

## Challenges and technological opportunities to achieve zero order drug release from matrix tablets

Uroš Klančar, Saša Baumgartner

**Povzetek:** Kadar se dobro permeabilna učinkovina, ki ni podvržena predsistemskega metabolizmu, iz tablete sprošča s kinetiko 0. reda, je po določenem času dosežena konstantna koncentracija učinkovine v plazmi. S tem se izboljša učinkovitost terapije in zmanjša pojav neželenih učinkov. Eden glavnih ciljev in hkrati izzivov pri načrtovanju ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem je zato doseči časovno neodvisno hitrost sproščanja učinkovine. V članku je opisan mehanizem sproščanja iz ogrodnih tablet in teoretični vidiki, ki so osnova za pristop k načrtovanju ogrodnih tablet z želeno kinetiko sproščanja učinkovine. Omenjeni so nekateri polimeri in njihove kombinacije, ki se uporabljajo pri izdelavi hidrofilnih ogrodij in različni tehnološki pristopi kot so: dodatek elektrolitov, geometrijski pristopi, izdelava mikronosilnih sistemov, s katerimi lahko pripravimo farmacevtsko obliko, ki sprošča učinkovino s kinetiko 0. reda.

**Ključne besede:** ogrodne tablete, kinetika 0. reda, hidrofilni polimeri, sproščanje učinkovine

**Abstract:** Constant concentration of drug in plasma is achieved after a certain time, when a good permeable drug substance which is not prone to the pre-systemic metabolism is released from the tablet according to zero order kinetics. Constant concentration of various drugs in plasma can improve efficacy of therapy and reduce side effects. One of the main goals and challenges is to design the sustained release matrix tablets enabling release of drugs according to zero order kinetics. This review article focuses on drug release mechanism from mainly hydrophilic matrix tablets and provides theoretical considerations for their design. Brief overview of polymers, their combinations and technological approaches utilised to achieve zero order release like addition of electrolytes, geometric approach, designing of micro delivery systems are also presented.

**Keywords:** matrix tablets, zero order kinetics, hydrophilic polymers, drug release

## 1 Uvod

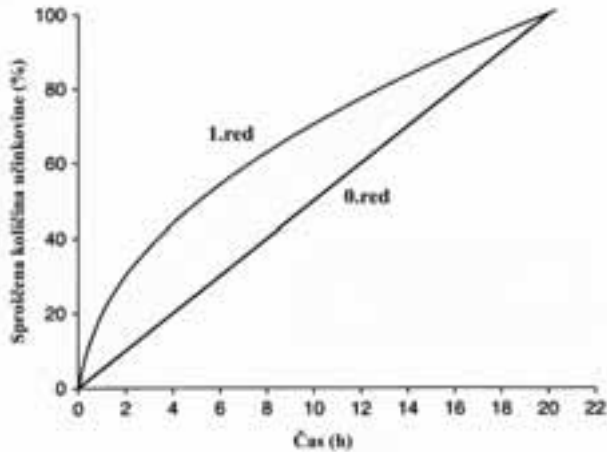
K zmanjšanju pojavnosti neželenih učinkov zdravil lahko pristopimo na različne načine. Farmacevtski kemiki načrtujejo in sintetizirajo učinkovino s čim bolj specifičnim delovanjem, farmacevti v lekarnah bolniku svetujejo pravi način uporabe zdravila. Število neželenih učinkov lahko zmanjšamo tudi tehnološki, z oblikovanjem farmacevtskih oblik, ki zagotavljajo ustrezno kinetiko sproščanja učinkovine. Neustrezna kinetika sproščanja učinkovine iz zdravila lahko povzroči neustrezno koncentracijo učinkovine v plazmi, kar posledično lahko vodi do pojavnosti neželenih učinkov zdravila. To je zlasti pomembno pri učinkovinah, kjer nihanja koncentracije v plazmi niso želena (učinkovine z nizkim terapevtskim indeksom, pri terapiji z antibiotiki, močnimi analgetiki, antihipertenzivi, idr.). Konstantno koncentracijo učinkovine v plazmi najlažje dosežemo z infundiranjem raztopine učinkovine, vendar je tovrstna dostava učinkovin v praksi zapletena in s strani bolnika neželena. Bolj pogosto zato oblikujemo tablete in druge trdne peroralne farmacevtske oblike, ki zagotavljajo podaljšano

sproščanje učinkovine, po možnosti sproščanje s kinetiko 0. reda, kar pomeni časovno neodvisno hitrost sproščanja. Sproščanje po kinetiki 0. reda zagotovi bolj konstantno koncentracijo učinkovine v plazmi kot v primeru sproščanja po 1. redu, saj je manjša hitrost sproščanja na začetku. Včasih je za zagotavljanje konstantne koncentracije v plazmi potrebno omogočiti večje sproščanje učinkovine iz ogrodne tablete v drugem (kasnejšem) delu sproščanja. Absorpcija učinkovine iz spodnjih delov GIT, kamor tableta sčasoma prispe, je namreč lahko otežena, tako zaradi konsistence črevesne vsebine, kot zaradi absorpcijskih lastnosti spodnjega dela GIT (1).

Najbolj pogosta vrsta tablet, ki omogočajo podaljšano sproščanje učinkovine so ogrodne, saj je njihova izdelava mogoča z uporabo konvencionalne proizvodne opreme, kar je za farmacevtsko industrijo zelo ugodno (2). Seveda so na voljo tudi druge tehnologije, ki omogočajo podaljšan čas sproščanja zdravilne učinkovine, kot na primer oblaganje ali izdelava osmotsko nadzorovanih sistemov. Vendar je pri teh, zlasti s stališča varnosti za bolnika, veliko omejitev, na primer



t.i. »dose dumping« zaradi poškodb obloge in obstrukcija črevesja zaradi nerazpadle osmotske oblike. V ogrodja lahko vgradimo učinkovine v visokih ali nizkih odmerkih ter učinkovine z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Učinkovine se iz ogrodja lahko sproščajo s kinetiko 0. reda, bolj pogosto s kinetiko 1. reda, ponavadi pa sproščanje opišemo deloma z eno in deloma z drugo kinetiko. Teoretični krivulji 0. in 1. reda hitrosti sproščanja učinkovine iz ogrodne tablete sta prikazani na sliki 1.



Slika 1: Teoretični krivulji hitrosti sproščanja učinkovine s kinetiko 0. in 1. reda (3)

Figure 1: Amount of released drug (%) versus time (h) for 0. and 1.order kinetics (3)

Kadar sproščanje učinkovine iz ogrodja poteka po kinetiki 0. reda, je v plazmi koncentracija dobro permeabilne učinkovine, ki ni podvržena predsistemskemu metabolizmu, po nekem začetnem času konstantna. Kadar pa sproščanje učinkovine poteka s kinetiko 1. reda, je na začetku sproščanje iz ogrodja hitrejše in posledično je tudi koncentracija učinkovine v plazmi visoka. S časom koncentracija v plazmi zaradi upočasnitve hitrosti sproščanja pade, lahko tudi pod mejo terapevtske učinkovitosti. Hitrost sproščanja učinkovine je v tem primeru časovno odvisna.

## 2 Pomen poznavanja mehanizma sproščanja učinkovin iz ogrodnih tablet za njihovo načrtovanje

### 2.1. Teoretične osnove

Sproščanje učinkovin iz ogrodij omogočata dva osnovna mehanizma - raztapljanje in difuzija.

Teoretično osnovo za opisovanje procesa difuzije učinkovine iz ogrodja predstavlja prvi Fickov zakon in analitske rešitve te enačbe. Prvi Fickov zakon in teorija difuzije temeljita na hipotezi, da je fluks,  $J$  (gostota masnega toka, hitrost difuzije) v sorazmerju s koncentracijskim gradientom skozi difuzijsko beriero. Sorazmernostni faktor je difuzijski konstanta,  $D$ .  $Q_t$  je količina sproščene učinkovine v času  $t$  (enačba 1).

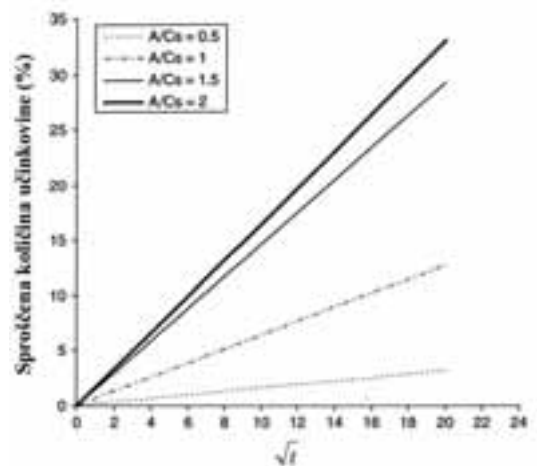
$$J = \frac{dQ_t}{dt} = -D \frac{dC}{dx} \quad (\text{enačba 1})$$

Enačbo za Fickov zakon lahko rešimo ob upoštevanju nekaterih začetnih oz. robnih pogojev in različnih predpostavkah. S tem pridemo do različnih analitičnih rešitev enačbe, ki ne opisujejo povsem zadovoljivo niti idealnih, kaj šele realnih sistemov. Razlike so zlasti pri opisovanju sproščanja v začetnih časovnih točkah. Zelo znana je na primer Higuchi-jeva enačba (enačba 2).

$$Q_t = \sqrt{C_s(2A - C_s)Dt} \quad (\text{enačba 2})$$

$Q_t$  je količina sproščene učinkovine v času  $t$ ,  $A$  je količina učinkovine na volumen ogrodja,  $D$  je difuzijski koeficient učinkovine,  $C_s$  je topnost učinkovine v hidratiranem ogrodju.

Higuchi-jeva enačba upošteva, da je raztapljanje učinkovine hitrejše od njene difuzije, sproščanje učinkovine iz hipotetičnega rigidnega ogrodja je linearno s  $\sqrt{t}$ . Takšno sproščanje v večini literarnih virov imenujejo kot Fickovo oz. difuzijsko nadzorovano oz. sproščanje 1. reda (2, 3). Iz enačbe 2 lahko teoretično napovemo, koliko učinkovine  $Q_t$  se bo sprostil v določenem času, izraženem kot  $\sqrt{t}$ , in sicer glede na razmerje med topnostjo učinkovine in njenim deležem v ogrodju (slika 2). Če je učinkovine v ogrodju več kot je njena topnost v hidratiranem ogrodju,  $A > C_s$ , je sproščanje hitrejše. Če je učinkovine v ogrodju manj ali enako kot je njena topnost v hidratiranem ogrodju,  $A \leq C_s$ , je sproščanje počasnejše. Higuchi-jeva enačba, kljub svojim številnim poenostavitvam opisa realnih sistemov in zato posledičnim omejitvam, predstavlja teoretično osnovo pri načrtovanju različnih sistemov s prirejenim sproščanjem, kjer je v mehanizmu sproščanja vpletena difuzija (3).



Slika 2: Sproščena količina učinkovine  $Q_t$  v določenem času, izraženem kot  $\sqrt{t}$ , za različna razmerja polnjenja učinkovine v ogrodju ( $A$ ) in topnost učinkovine v hidratiranem ogrodju ( $C_s$ ) (3).

Figure 2: The released amount of  $Q_t$  versus square root of time presented as plots for different  $A/C_s$  ratios, where  $A$  is amount of drug in matrix,  $C_s$  is solubility of drug in hydrated matrix (3).

Kadar je topnost učinkovine majhna oz. kadar je v ogrodju malo zdravilne učinkovine in je ta v obliki velikih delcev, potem sproščanje, poleg difuzije, nadzoruje tudi njeno raztapljanje. Slednje lahko prikažemo z enačbo, ki sta jo razvila Chandrasekaran in Paul in je modifikacija Higuchi-jeve enačbe, ki poenostavljeno opisuje hitrost sproščanja take učinkovine iz inertnega, neerodirajočega in nenabrekajočega ogrodja v psevdoravnotežnem stanju. To je stanje, ki predpostavlja, da sta debelina difuzijske plasti in koncentracijski gradient konstantna. Kadar raztapljanje učinkovine pogojuje hitrost sproščanja, potem je sproščanje v linearni odvisnosti od časa, oz. poteka po kinetiki 0. reda (enačba 3):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 2 \frac{C_s}{C_0} \sqrt{\frac{DK}{l^2}} \left( \frac{1}{2K} + t \right) \quad (\text{enačba 3})$$

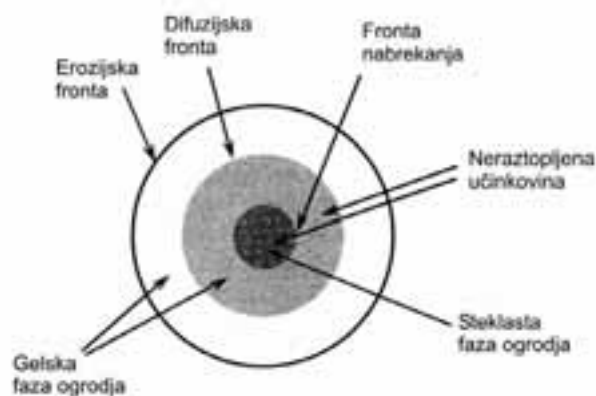
$M_t$  je količina učinkovine sproščene v času  $t$  in v neskončnosti ( $M_\infty$ ),  $C_0$  je količina učinkovine v ogrodju,  $C_s$  je njena topnost v hidratiranem ogrodju,  $D$ , difuzijska konstanta učinkovine v ogrodju,  $K$ , konstanta raztapljanja, odvisna od celokupne površine delcev učinkovine, ki se raztaplja in volumna ogrodja,  $l$  je debelina ogrodja, ki je v obliki ravne ploščice (3).

Na osnovi povedanega lahko zaključimo, da bi kinetiko sproščanja 0. reda lahko dosegli, če bi slabo topno učinkovino vgradili v inertno ogrodje, oziroma bi v takšno ogrodje vgradili malo učinkovine z relativno velikimi delci. Sproščanje v tem primeru nadzoruje hitrost raztapljanja učinkovine. Ker pa inertna ogrodja v farmaciji le redko uporabimo za izdelavo tablet s podaljšanim sproščanjem, si poglejmo mehanizme sproščanja učinkovin iz nabrekajočih hidrofilnih ogrodij.

## 2.2 Mehanizmi sproščanja iz hidrofilnih ogrodij

Osnova hidrofilnih ogrodnih tablet so hidrofilni polimeri, ki ob stiku z vodnim medijem nabrekajo in tvorijo gelsko plast na površini tablete. Najbolj pogosto uporabljen polimer je HPMC (hidroksiopropilmetilceluloza), veliko se uporabljajo tudi polietilenoksidi z visoko molekularno maso (Polyox), hidroksiopropilceluloza (HPC), hidroksi-etilceluloza (HEC), ksantan gumi, natrijev alginat, poliakrilna kislina (Carbopol) in drugi polimeri.

Pri teoretičnem opisu mehanizmov sproščanja iz inertnih ogrodij smo predstavili dva osnovna in skrajna primera: difuzijo in raztapljanje, ki sta se nanašala le na učinkovino. Pri hidrofilnih ogrodjih, ki niso inertna, pa ima veliko vlogo pri nadzoru sproščanja učinkovin tudi nastala gelska plast, tako da sproščanje sočasno nadzira več različnih mehanizmov: difuzija in raztapljanje učinkovine, nabrekanje in erozija tabletnega ogrodja. Dobro topna učinkovina se znotraj hidratiranega ogrodja raztopi in difundira skozi gelsko plast nabreklega hidrogela. Sproščanje učinkovine je v tem primeru bolj difuzijsko nadzorovano, poteka bolj s kinetiko 1. reda. Sočasno poteka tudi erozija oz. raztapljanje polimera, kar je pomembno predvsem za sproščanje slabo topnih učinkovin. Sproščanje učinkovine v tem primeru je erozijsko nadzorovano oz. nadzorovano s topnostjo polimera in učinkovine, poteka bolj s kinetiko 0. reda. Oba mehanizma (difuzija učinkovine in erozija ogrodja) se običajno med seboj prepletata in se odvijata sočasno, zato se med raztapljanjem ogrodja in sproščanjem učinkovine oblikujejo tri fronte (slika 3).



**Slika 3:** Shematski prikaz nabrekavanja hidrofinskega ogrodja, kjer je erozijska fronta meja med medijem in površino, ki se raztaplja; difuzijska fronta meja med raztopljeno in neraztopljeno učinkovino v gelski fazi ter fronta nabrekavanja med gelsko fazo in fazo nehidriranega ogrodja, kjer je polimer v steklastem stanju (3).

**Figure 3:** Schematic presentation of a swollen hydrophilic polymer matrix tablet. Erosion front separates media and dissolving surface; diffusion front separates dissolved and undissolved drug; swelling front separates gel phase and glassy phase of polymer matrix (3).

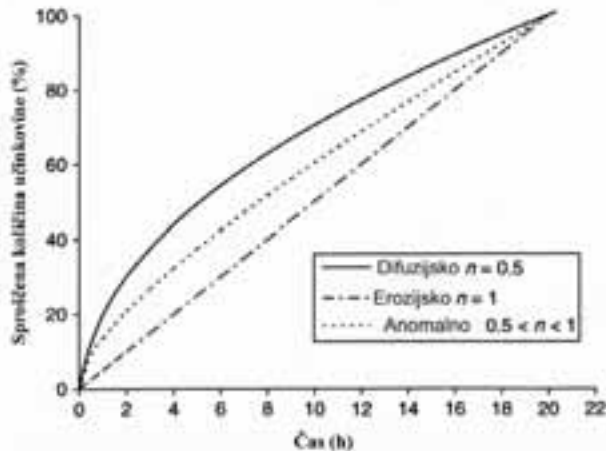
Vse tri fronte se med procesom nabrekavanja in sproščanja premikajo v odvisnosti od časa. Na začetku, ko polimerno ogrodje začne nabrekati, se erozijska fronta pomakne ven, fronta nabrekavanja pa relativno gledano v notranjost ogrodja. Istočasno se difuzijska fronta pomika proti notranjosti ogrodja, zaradi raztapljanja učinkovine v gelski fazi in difuzije raztopljene učinkovine iz ogrodja. Na začetku je sproščanje učinkovine torej difuzijsko nadzorovano, učinkovina se v gelski plasti raztaplja in potuje ven iz ogrodja, pride do hitrega sproščanja oz. »burst release« učinka. V nadaljevanju, ko se verige polimera v erozijski plasti hidratirajo in raztapljajo se napredovanje erozijske fronte upočasnijo. Zaradi raztapljanja polimernih verig v erozijski plasti ogrodja se raztopi manj učinkovine, posledično se zmanjša tudi difuzija učinkovine. Sčasoma pride do sinhroniziranja gibanja erozijske fronte z difuzijsko, sproščanje postane tako nadzorovano bolj z raztapljanjem polimernega ogrodja (erozijo ogrodja) in bolj podobno sproščanju 0. reda (3).

Natančni matematični opisi teh sočasno potekajočih procesov so izredno kompleksni in v praksi težko uporabni. Zato so raziskovalci razvili semi-empirične modele, ki velikokrat ne temeljijo na pravih fizikalno-kemijskih procesih mehanizma sproščanja, kljub temu pa tehnologom pomagajo pri razvoju tablet z ustrezno kinetiko sproščanja učinkovine. Najbolj pogosto uporabljen model, ki skuša opisati dualni mehanizem sproščanja je Ritger-Peppasov model eksponentne enačbe (enačba 4).

$$Q_t = kt^n \quad (\text{enačba 4})$$

$n$  je difuzijski eksponent,  $k$  je kinetična konstanta,  $Q_t$  je količina sproščene učinkovine v času  $t$ . Če difuzija učinkovine prevlada nad erozijo polimera, se eksponent  $n$  približuje vrednosti 0,5. Če mehanizem sproščanja pogojuje erozija ogrodja, se eksponent  $n$

približuje vrednosti 1. EkspONENT je med 0,5 in 1 za sisteme, kjer k sproščanju prispevata oba mehanizma (anomalno sproščanje). Na sliki 4 so prikazani profili sproščanja učinkovine za vse tri primere.



**Slika 4:** Sproščena količina učinkovine  $Q_t$  v odvisnosti od časa  $t$ , ko je sproščanje difuzijsko nadzorovano, erozijsko nadzorovano ali anomalno (kombinacija obeh mehanizmov) (3).

**Figure 4:** Released amount of drug  $Q_t$  versus time  $t$  presented as plots of diffusion controlled, erosion controlled and anomalous (controlled by both mechanisms) controlled drug release (3).

Difuzijski eksponent  $n$ , je odvisen tudi od geometrije sistema. Pomembna je eksperimentalna določitev difuzijskega eksponenta, ki nam lahko ob dobrem poznavanju proučevanih sistemov orientacijsko nakazuje, za kakšen mehanizem sproščanja gre. S spreminjanjem lastnosti polimera, učinkovine in drugih pomožnih snovi lahko vplivamo na to kateri mehanizem sproščanja bo prevladoval, s tem pa vplivamo tudi na kinetiko sproščanja (3, 4).

Pri polimerih, ki v mediju počasi nabrekajo in se počasi raztapljajo, tvorijo visoko viskozne sisteme in imajo dolg hidratacijski čas, je erozijska fronta počasna. Sproščanje iz takih tablet je počasno in nadzorovano z difuzijo raztopljenе učinkovine, poteka po kinetiki 1. reda (enačba 4, slika 4). Podobno se zgodi, če v tableto vgradimo dobro topno učinkovino v majhnem odmerku. Pomembno je poudariti, da je v takšnih primerih vedno prisotno hipno sproščanje, saj se učinkovina hitro sprosti s površine ogrodja, še preden se tvori gelska plast, ki bi sproščanje upočasnila.

Pri ogrodjih izdelanih iz zelo hidrofilnih polimerov, ki se hitro hidratirajo in imajo nizko viskoznost, se erozijska fronta pomika hitro (polimer erodira) in to pogojuje sproščanje učinkovine. Gre za erozijsko nadzorovano sproščanje, ki ga opišemo s kinetiko 0. reda (enačba 4, slika 4). Podobno se zgodi v primeru velikih odmerkov dobro topne učinkovine v ogrodju, ali v primeru slabše topnih učinkovin, kjer potovanje difuzijske fronte ni tako hitro kot gibanje fronte nabrekanja. Sinhronizacija gibanja difuzijske in erozijske fronte omogoči 0. red sproščanja (3, 4).

Povzamemo lahko, da je mehanizem sproščanja in posledično kinetika sproščanja učinkovine iz ogrodja odvisna od številnih dejavnikov, ki med seboj niso neodvisni. Zato je zelo težko posplošeno trditi, kaj bi se zgodilo s sproščanjem, če spremenimo enega izmed dejavnikov, ki vplivajo na mehanizem in posledično na hitrost sproščanja učinkovine.

### 3 Kako do kinetike 0. reda?

Doseganje 0. reda sproščanja je eden glavnih izzivov pri načrtovanju hidrofilnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem. Navadno je uspeh že, če se tej kinetiki samo približamo. Pri tem lahko uporabljamo različne geometrijske pristope, različne polimere in njihove kombinacije ter kombinacije polimerov z drugimi pomožnimi snovmi. Velikokrat se izdelava ogrodnih tablet kombinira tudi z drugimi tehnologijami, na primer z oblaganjem ogrodnih tablet ali z izdelavo večplastnih tablet. Nekateri drugi sistemi npr. osmotsko nadzorovani sistemi, prav tako omogočajo sproščanje 0. reda.

#### 3.1 Polimeri v hidrofilnih ogrodjih

Kadar v hidrofilno polimerno ogrodje vgrajujemo dobro topne učinkovine, je doseganje kinetike 0. reda sproščanja za tehnologa precej težavna naloga. Upoštevamo lahko nekaj navodil, ki so posledica dobrega teoretičnega poznavanja sistemov. 0. redu se lahko približamo s povečevanjem hitrosti erozije polimera, kar dosežemo z zmanjšanjem količine polimera, ali z uporabo polimerov z nizkimi molekulskimi masami. Vendar s tem, ko povečamo erodibilnost polimera, lahko pride do zmanjšanja konsistence gelske plasti, ki zato postane bolj občutljiva na spremembe v GI traktu (mehanske, ionske obremenitve). To lahko vodi do zmanjšanja robustnosti izdelka in možno hipno sproščanje v *in vivo* okolju. Poiskati moramo torej kompromis med robustnostjo farmacevtske oblike in želeno linearno kinetiko sproščanja.

Z izbiro pravega polimera ali prave kombinacije različnih polimerov lahko po drugi strani dosežemo sinhronizacijo gibanja erozijske fronte in difuzijske fronte ter se tako približamo 0. redu sproščanja. V vseh primerih pa je pri načrtovanju tablet potrebno upoštevati, da na gelsko plast ogrodne tablete vpliva tudi hidrodinamika okolja, v katerem se tableta nahaja, zato ni nujno, da bo v *in vivo* pogojih sproščanje takšno, kot smo ga predvideli na osnovi *in vitro* testiranj.

**Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)** je najbolj uporabljen polimer za izdelavo hidrofilnih ogrodnih tablet. Je delno O-metilirana in O-(2-hidroksipropilirana) celuloza različnih vrst, ki se med seboj razlikujejo v stopnji substitucije in razmerju med obema substituentama. Ob uporabi same HPMC, ne glede na vrsto, se težko povsem izognemo hipnemu sproščanju, zato pogosto uporabljajo različne kombinacije HPMC z drugimi polimeri.

Po navedbi nekaterih raziskovalcev kombinacije HPMC in natrijeve karboksimetilceluloze (NaCMC) v pravem razmerju vodijo do sinergizma, kar pomeni, da se zniža začetno hipno sproščanje in omogoči izboljšanje linearosti profila (5). Za doseganje bolj časovno neodvisnega linearnega sproščanja dobro topnih učinkovin je primerna tudi kombinacija PVP in HPMC z visoko viskoznostjo. Bolj linearno sproščanje kofeina so tako dosegli v kombinacijah z 10% in 20% HPMC ter 5-15 % PVP. Ko se vodotopna učinkovina raztaplja, se v ogrodju večata koncentraciji PVP in HPMC. HPMC difundira iz ogrodja



hitreje, zato se koncentracija PVP še naprej viša. Pri določeni kritični koncentraciji pride do razrahljanja nabreklih HPMC gela in pospešitve sproščanja. Sproščanje se približa ničtemu redu (6).

**Polietilenoksidi** (PEO, Polyox<sup>®</sup>) so neionski homopolimeri etilen oksida s splošno formulo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ . Ogrodja s PEO se zelo hitro hidratirajo, hitro nabrekajo in hitro erodirajo. Sproščanje različnih učinkovin poteka torej bolj z erozijo, zato PEO zagotavljajo bolj linearno kinetiko sproščanja učinkovin v primerjavi z drugimi polimeri (7).

**Ksantan** je polisaharidni anionski hidrofilni polimer pridobljen s fermentacijo iz bakterije *Xanthomonas campestris*. Ogrodja s ksantanom so znana, da omogočajo sproščanje blizu ničtega reda. Sproščanje zelo dobro topnih učinkovin vseeno poteka bolj z difuzijo. Kot ogrodje je bil ksantan vrednoten za več modelnih učinkovin (teofilin, cefaleksin, prednizolon, indometacin, diklofenak, pentoksifilin) (8,9,10).

Ksantan lahko v pravem razmerju z galaktomanani in glukomanani deluje sinergistično, kar omogoča počasnejše sproščanje učinkovin po kinetiki 0. reda. Znan je na primer TIMERx<sup>®</sup> CR sistem, ki združuje galaktomanan semensko sluz rožičevca in ksantan v razmerju 1:1 v 50 % deležu, drugo polovico pa predstavlja dekstroza. Ta sistem v vodi nabreka in tvori močen gel in lahko omogoča bolj linearen profil sproščanja za različne učinkovine (11,12).

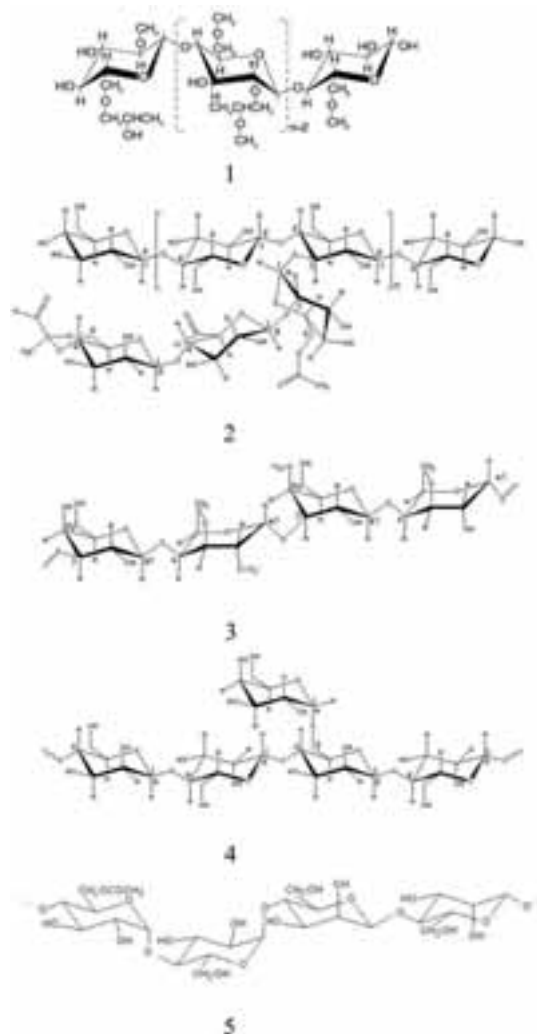
Tudi kombinacija ksantana in **konjak-a** (naravni glukomanan) ima sinergistični učinek. Ugotovili so, da konjak s ksantanom tvori najčvrstejši gel v razmerju konjak/ksantan 1:2,5. Ogrodja iz kombinacije ksantan-konjak tvorijo močnejši, na zunanje dejavnike manj občutljiv gel in so zato bolj učinkovita kot tista, ki so samo iz ksantana (13, 14).

**Karaya gumi** je še eden naravni polisaharid, ki omogoča sproščanje učinkovine podobno 0. redu. Kot mehanizem prevladuje erozija ogrodja, sproščanje pa je v primerjavi z ogrodji iz **guar** gumijev ali ksantana močno odvisno od lastnosti učinkovine in fizikalnih dejavnikov (mešanje medija, mehanske obremenitve). Pokazali so, da karaya gumi omogoča celo bolj linearno sproščanje od ksantana. Tako kot pri vseh naravnih polimerih, je za način sproščanja pomembna tudi variabilnost samega izhodnega materiala (vpliv pogojev rasti, način ekstrakcije) (15).

Kombinacija kationskega polimera **hitosana** in anionskega polimera **karbopola** (karbomeri) omogoča upočasnjeno sproščanje učinkovine, ki je bolj linearno v primerjavi s sproščanjem iz HPMC ogrodij, ki sicer veljajo kot standard za tablete s podaljšanim sproščanjem. Pri karbopolu je v kislem sproščanje nadzorovano bolj z erozijo, saj polimer v kislem slabo nabreka. V nevtralnem (pH 6,8), ko postane nabrekanje bolj izraženo in se debelina gelske plasti lahko poveča, pa postane sproščanje nadzorovano z difuzijo. Dodatek hitosana h karbopolu je zmanjšal pH odvisnost sproščanja, saj gre za anionski polimer, ki se v odvisnosti od pH obnaša ravno nasprotno karbopolu. Kationske in anionske polimere pogosto kombiniramo ravno iz razloga, da se izognemo oz. zmanjšamo pH odvisnost sproščanja (16).

**Karagenani** so skupina naravnih polisaharidov anionskega tipa, pridobljenih iz različnih vrst rdeče morske trave, družine *Rhodophyceae*. Tabletna ogrodja iz karagenana se uporabljajo predvsem za vgrajevanje topnih bazičnih učinkovin, ki s karagenani tvorijo ionske komplekse in tako se sproščanje dodatno upočasni. Sproščanje je

nadzorovano z erozijo ogrodja, bazična učinkovina se sprosti zaradi sprememb pH medija in ionske moči. Pokazali so, da je ob večji ionski moči medija sproščanje bolj časovno odvisno. Zaradi od pH in ionske moči odvisnega sproščanja, je pri ogrodjih s karagenani potrebna previdnost tako pri ugotavljanju mehanizma sproščanja, kot pri ugotavljanju *in vitro/in vivo* korelacije (17). Na sliki 5 so prikazane strukturne formule omenjenih polimerov.



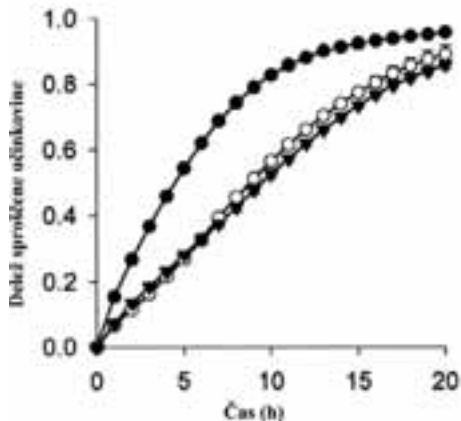
**Slika 5:** Strukturne formule nekaterih polimerov za hidrofilna ogrodja: 1. HPMC, 2. Ksantan, 3. Karagenan, 4. Galaktomanan semenske sluzi rožičevca, 5. Konjak

**Figure 5:** Structural formulas of various polymers: 1. HPMC, 2. Xanthan, 3. Carrageenan, 4. Locust Beam Gum, 5. Conjac gum

### 3.2 Polimeri v kombinaciji z drugimi pomožnimi snovmi

Eden od možnih pristopov za doseganje 0. reda kinetike sproščanja dobro topnih učinkovin je dodatek visokih koncentracij elektrolitov v

hidrofilno ogrodje polimera, npr vsaj 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> k HPMC ali PEO (polietilenoksid). Ko takšno ogrodje pride v stik z medijem, se *in situ* - v nabrekli gelu, inducirajo ionske interakcije med dodanimi ioni soli, učinkovino in polimerom. Dodani ioni tekmujejo za vodo za hidratacijo, posledično je nabrekanje polimera in raztapljanje učinkovine počasnejše. Polimer se ob stiku z vodo delno izsoli. Nastane heterogena utrjena struktura gela, kar prepreči nadaljnje nabrekanje. Sproščanje učinkovine sledi 0. redu in je hkrati pH neodvisno, gelska plast je po trditvah nekaterih raziskovalcev robustna (18,19,20). Na sliki 6 je prikazana primerjava profilov sproščanja učinkovine iz ogrodja, ki vsebuje samo PEO in ogrodja z dodanimi elektroliti.



**Slika 6:** Profili sproščanja 100 mg modelne učinkovine (metoprolol tartrat) v mediju pH 2,6 iz PEO ogrodja: kontrolni vzorec z ogrodjem iz 600 mg polimera (●); 300 mg polimera v kombinaciji s 300 mg natrijevega karbonata (○); 300 mg polimera v kombinaciji s 150 mg natrijevega karbonata in 150 mg pentanatrijevega tripolifosfata (▼) (20).

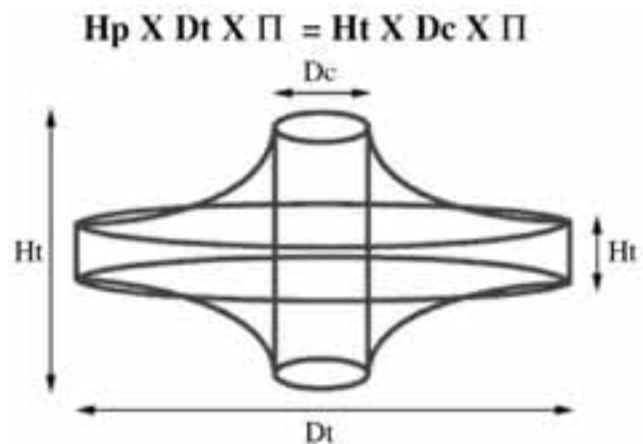
**Figure 6:** Release profiles for metoprolol tartrate (100 mg) in buffer medium pH 2.6 from PEO matrices without electrolytes, i.e., control composed of 600 mg polymer (●); and 300 mg of polymer in combination with 300 mg of electrolytes namely sodium carbonate (○) and 300 mg of polymer in combination with 150 mg of sodium carbonate and pentasodium triphosphate (▼) (20).

Časovno neodvisno linerano kinetiko sproščanja učinkovin lahko dosežemo tudi z lokalnim nadziranjem pH znotraj polimernih ogrodij. Takšen primer je sproščanje šibko bazične učinkovine z uporabo citronske kisline, ki je obložena z gastroresistentno oblogo. Te obložene delce skupaj s šibko bazično učinkovino in HPMC-jem stisnejo v ogrodno tableto. Ko takšna tableta pride v želodec, je sproščanje najprej oteženo, saj gastroresistentna obloga na delcih citronske kisline zmanjša površino, s katere se v kislem dobro topna učinkovina lahko raztaplja. Na ta način preprečijo hitro sproščanje v kislem. Ko tableta pride v tanko črevo, se obloga na delcih citronske kisline hitro raztopi, dobro topna citronska kislina pa v ogrodju ustvari kislo mikro okolje. Lokalno kislo okolje omogoča še nadaljnje raztapljanje šibko bazične učinkovine. Oba efekta, zadrževanje sproščanja v želodcu in pospešitev sproščanja učinkovine v tankem črevesju, pripomoreta k 0. redu profila sproščanja (21).

### 3.3 Geometrijski pristopi

Pristopov, ki modificirajo površino in geometrijo ogrodja, da bi dosegli 0. red sproščanja, je veliko. Sproščanje iz sistemov z večjim razmerjem površina/volumen je hitrejše, kot če je razmerje manjše, zato imajo lahko različno velike tablete iste formulacije različno hitrost sproščanja. Manjše tablete torej sproščajo učinkovino hitreje kot večje. Že samo sprememba velikosti ogrodja lahko vodi v doseganje zelenega profila, ponavadi manjše tablete omogočajo bolj časovno neodvisno sproščanje (2,3).

Obstaja več patentiranih tehnologij, ki omogočajo sproščanje 0. reda. PROCISE™ tehnologija zagotavlja konstantno površino sistema med sproščanjem učinkovine. Sistem je sestavljen iz jedra, ki se počasi raztaplja (slika 7). Jedro je, razen perifernih delov (robov) in sredine, obdano z zelo slabo topnim inertnim materialom (hidrofobni polimer). Raztapljanje jedra z učinkovino lahko tako poteka samo z robov in dela na sredini. Na začetku raztapljanja je površina, ki je v stiku z medijem  $Dt \times Hp \times \Pi$ . Med raztapljanjem se premer jedra ( $D$ ) z učinkovino zmanjšuje, višina ( $H$ ) pa se zaradi same oblike jedra, ki je zunaj ožje, v notranjosti pa širše, povečuje. Posledično je površina ( $D \times H \times \Pi$ ), ki je v stiku z medijem za raztapljanje, konstantna (slika 7) (22).



**Slika 7:** Shematski prikaz jedra v »Procise« sistemu (22).

**Figure 7:** Schematic presentation of »Procise« system (22).

Drug sistem, ki uporablja geometrijski koncept, je »RingCap®«. Med raztapljanjem se površina RingCap® tablete lahko zmanjša, ostane konstantna ali se celo poveča, da dosežemo ustrezen profil sproščanja. Okrog ogrodja tablete, ki je v obliki kapsule, so nameščeni različni netopni polimerni obročki (različno število, debelina, pozicija). S tem vplivajo na površino tablete, ki se raztaplja in tako na hitrost sproščanja učinkovine (23).

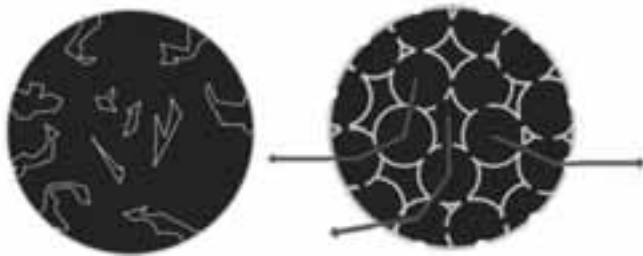
Poznamo še druge sisteme, ki temeljijo na spremembi površine, zato da dosežemo ustrezno kinetiko sproščanja. Geomatrix® in Smatrix® sistema sta si podobna. Gre za večplastne ogrodne tablete z učinkovino v jedru sistema, zgornja in spodnja plast pa sta iz manj topnih polimerov. Zunanje plasti preprečijo nabrekanje in/ali raztapljanje ogrodja na začetku ter tako upočasnijo oz. prilagodijo sproščanje učinkovine. Učinkovina se na začetku raztapljanja sprošča samo z robov tablete. Ko s časom zunanje plasti tablete s polimerom

brez učinkovine erodirajo, se površina jedra, iz katerega se učinkovina sprošča, povečuje in sproščanje se lahko pospeši. Zmanjšanje hipnega sproščanja na začetku in pospešitev sproščanja proti koncu vodita k bolj linearnemu sproščanju. V različnih plasteh je lahko tudi različna koncentracija učinkovine, kar omogoči dodatno uravnavanje kinetike sproščanja (23).

EgaleT<sup>®</sup> je še en novejši sistem, kjer sproščanje lahko nadzorujemo z geometrijo ogrodja. To je možno zato, ker se ogrodje samo raztaplja (erodira) in ne nabreka, sproščanje pa poteka s konstantno velike površine. Konstantno površino zagotavlja netopni plašč iz etilceluloze in cetostearil alkohola, v notranjosti pa je ogrodje iz vodotopnih polietilenglikolov (PEG). Za preprečitev nabrekanja dodajajo PEG monostearat. Ogrodje s PEG vsebuje učinkovino, v stiku z medijem polimer erodira in učinkovina se vseskozi sprošča samo iz robov. V netopni plašč iz etilceluloze lahko vložijo tudi več različnih ogrodij (različni posebej izdelani vsadki), ki so različno dolgi, lahko vsebujejo različne učinkovine in različne koncentracije učinkovin. Končen sistem lahko obložijo tudi z gastroresistentno oblogo. Vse te variacije dajejo veliko možnosti za doseganje želenega profila sproščanja (24).

### 3.4 Mikronosilni sistemi

Za doseganje 0. reda sproščanja so razvite tudi zelo inovativne tehnologije, kot je na primer tehnologija izdelave in polnjenja mikronosilcev **Cavilink<sup>TM</sup>**. Ta mikronosilni sistem tvori sintezni polimer v obliki rigidnih poroznih kroglic in se razlikuje od konvencionalnih



**Slika 8:** *Levo* - običajni makroporozni polimer z neenakomerno velikimi porami, vse pore niso prehodne, ker jih lahko obdajajo trdni predeli polimera. Posledica je sproščanje s kinetiko 1. reda. Poroznost je okrog 50 %. *Desno* - **Cavilink<sup>TM</sup>** HIPE polimer z enakomerno velikimi in povsem povezanimi porami, vse pore so dostopne, učinkovina se lahko sprosti iz vseh votlinic, sproščanje je podobno 0. redu. Poroznost je tudi do 90 % kar omogoča veliko polnjenje z učinkovino (25).

**Figure 8:** *Left* - Conventional macroporous polymer, pores within central portion of matrix may not be accessible since they are surrounded by regions of solid polymer. The consequence is the 1st order release kinetics. Total porosity is typically 50%. *Right* - **Cavilink<sup>TM</sup>** High Internal Phase Emulsion Polymer contains large cavities of micrometer dimensions that are interconnected. All internal regions are accessible due to the presence of these interconnections. Total porosity can exceed 90%, allowing very high loading of active ingredients. The drug release follows near zero order kinetics (25).

makroporoznih sistemov (slika 8). Gre za skupino sferičnih t.i. HIPE »high internal phase emulsion« polimerov, ki imajo pore mikrometerskih velikosti povezane z manjšimi porami. Pripravijo jih z nadzorovano »in situ« polimerizacijo, kemijsko se med seboj razlikujejo glede na to, kateri monomer uporabijo. Mikronosilni sistemi **Cavilink<sup>TM</sup>** so komercialno dostopni in omogočajo vgraditev različnih učinkovin. V prazne sfere so vgradili učinkovine v obliki raztopin, nato so topilo odstranili, v porah pa je ostala učinkovina. Tako pripravljene mikrosfere se polnili v kapsule. Učinkovina mora med sproščanjem preiti skozi vse prečne povezave, preden zapusti ogrodje (slika 8-desno). Sproščanje je podobno kinetiki 0. reda (25).

## 4 Zaključek

Večino izdelkov s podaljšanim sproščanjem še vedno predstavljajo ogrodne tablete na osnovi hidrofilnih polimerov, kjer na kinetiko sproščanja poleg samega polimera vplivajo tudi drugi dejavniki. S temi sistemi le redko hkrati dosežemo sproščanje s kinetiko 0. reda in od fizioloških pogojev neodvisno sproščanje (robustno sproščanje). Zato je dostikrat potreben kompromis med želeno kinetiko in robustnostjo sproščanja. V prihodnosti lahko pričakujemo razvoj novejših sistemov in tehnologij, ki bodo omogočale popoln nadzor sproščanja različnih učinkovin neodvisno od zunanjih dejavnikov.

## 5 Literatura

1. Dokumetizidis A, Macheras P. IIVC of controlled release formulations: Physiological-dynamical reasons for their failure. *J Con Rel* 2008; 129: 76-78.
2. Liu P, Ju T, Qiu Y. Diffusion-Controlled Drug Delivery Systems. In: X. Li, B. R. Jasti. *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*. McGraw-Hill 2006: 107-137.
3. Wang Z and Shmeis RA. Dissolution Controlled Drug Delivery Systems. In: X. Li, B. R. Jasti. *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*. McGraw-Hill 2006: 139-172.
4. Lowman AM, Peppas NA. Hydrogels. In: E. Mathiowitz (Ed.). *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. Wiley New York, 2000: 397-4.
5. Dow Chemical Company. Using METHOCEL Cellulose Ethers for Controlled Release of Drugs in Hydrophilic Matrix Systems. DOW July 2002.
6. Hardy JJ, Windberg-Baarup A, Neri C, Byway PV, Booth SW, Fitzpatrick S. Modulation of drug release kinetics from hydroxypropyl methyl cellulose matrix tablets using polyvinyl pyrrolidone. *Int J Pharm* 2007; 337: 246-253.
7. Dow Chemical Company. POLYOX Water-Soluble Resins NF in Pharmaceutical Applications. DOW August 2002.
8. Talukdar MM, Michoel A, Rombaut P, Kinget R. Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery I. Compaction and in vitro drug release behaviour. *Int J Pharm* 1996; 129: 233-241.
9. Yeole PG, Galgatte UC, Babla IB, Nakhat PD. Design and evaluation of Xanthan gum-based sustained release Matrix tablets of Diclofenac sodium. *Ind J Pharm Sci* 2006; 68: 185-189.
10. Baumgartner S, Pavli M, Kristl J. Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; In press.
11. Vendruscolo CW, Andrezza IF, Ganter JLMS, Ferrero C, Bresolin TMB. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. *Int J Pharm* 2005; 296: 1-11.
12. <http://www.penwest.com/timerx.html>
13. Alvarez-Mancenido F, Landin M, Lacik I, Mart'inez-Pacheco R. Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs. *Int J Pharm* 2008; 349: 11-18.
14. <http://www.cybercolloids.net/index.php>



15. Munday DL, Cox PJ. Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. *Int J Pharm* 2000; 203: 179–192.
16. Park SH, Chun MK, Choi HK. Preparation of an extended-release matrix tablet using chitosan/Carbopol interpolymer complex. *Int J Pharm* 2008; 347: 39–44.
17. Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Stavik E, Pena-Romero A, Caramella C. Factorial Analysis of the Influence of Dissolution Medium on Drug Release From Carrageenan-Diltiazem Complexes. *AAPS PharmSciTech* 2000; 1(2): article 15.
18. Hite M, Federici C, Turner S, Fassihi R. Novel Design of a Self-Correcting Monolithic Controlled-Release Delivery System for Tramadol. *Drug Del Tech* 2003; 3: 48-55.
19. Pillay V, Fassih R. Electrolyte-Induced Compositional Heterogeneity: A Novel Approach for Rate-Controlled Oral Drug Delivery. *J Pharm Sci* 1999; 88 (11): 1141.
20. Pillay V, Fassih R. A novel approach for constant rate delivery of highly soluble bioactives from a simple monolithic system. *J Contr Rel* 2000; 67: 67-78.
21. Gonza'lez IM, Robles LV. Influence of enteric citric acid on the release profile of 4- aminopyridine from HPMC matrix tablets. *Int J Pharm* 2003; 251: 183-193.
22. <http://www.mistralpharma.com/eng/technologies/procise.php>
23. Mehuy E. Development Of a Matrix-in-cylinder System for Sustained Zero-order Drug Release. Doktorska dizertacija. Ghent University, 2004.
24. [http://www.touchbriefings.com/pdf/1859/eaglet\\_tech2.pdf](http://www.touchbriefings.com/pdf/1859/eaglet_tech2.pdf)
25. Landgraf W, Li NH, Benson JR. New Polymer Enables Near Zero-Order Release of Drugs. *Drug Del Tech* 2005; 5 (2): 48-55.

### 3. Simpozij Homeopatske sekcije

Sobota, 21. november 2009  
Fakulteta za farmacijo v Ljubljani

## HOMEOPATIJA IN ALERGIJE

Dr. Dominique Cado Leclercq

francoski centra za izobraževanje in razvoj homeopatije CEDH ([www.cedh.fr](http://www.cedh.fr))

Dopoldan **Homeopatija in alergije**  
**Alergije in miazmi**

Popoldan **Homeopatska zdravila in alergijski rhinitis**  
**Homeopatska zdravila in alergijski konjunktivitis**  
**Homeopatska zdravila in alergične kožne težave**

Dodatne informacije in prijava: [www.sfd.si](http://www.sfd.si)

# Izoencimi aldo/keto-reduktaz iz poddružine 1C kot tarče za razvoj zdravilnih učinkovin

## Aldo/keto reductase isozymes of the 1C subfamily as new drug targets

Petra Brožič, Stanislav Gobec, Tea Lanišnik Rižner

**Povzetek:** Aldo/keto-reduktaze (AKR) katalizirajo redukcije karbonilnih skupin v ustrezne hidroksilne skupine. Človeški predstavniki AKR iz poddružine 1C (AKR1C1-AKR1C4) so vključeni v biosintezo in inaktivacijo spolnih hormonov, v metabolizem drugih steroidov, prostaglandinov in ksenobiotikov. Zaradi različnih vlog, ki jih imajo v organizmu, so povezani z nastankom različnih bolezní in predstavljajo zanimive farmakološke tarče za razvoj zdravil. Spremenjeno izražanje teh encimov je povezano z različnimi vrstami hormonsko odvisnih oblik raka, drugimi hormonsko odvisnimi boleznimi, akutno mieloidno levkemijo, pljučnim rakom, rakom ust ter ne-Hodgkinovim limfomom. Povezujejo jih tudi s porazdelitvijo maščobnega tkiva pri debelosti. Število publikacij o vpletenosti encimov AKR v različna patofiziološka stanja iz leta v leto narašča. Povezava med posameznimi izooblikami AKR1C in patološkimi stanji nakazuje možnost, da bi z zaviranjem tkivno specifičnih encimov lahko vplivali na reakcije, ki jih ti encimi katalizirajo, in s tem na delovanje produktov teh reakcij. Inhibitorji AKR1C tako predstavljajo potencialno novo vrsto zdravilnih učinkovin, tako imenovane selektivne intrakrine modulatorje.

**Ključne besede:** encimi, aldo/keto-reduktaze, steroidi, prostaglandini, ksenobiotiki

**Abstract:** Aldo-keto reductases catalyze reduction of carbonyl containing substrates to alcohols. Four human hydroxysteroid-dehydrogenases, members of the AKR1C subfamily (AKR1C1-AKR1C4), are involved in biosynthesis and inactivation of steroid hormones, and metabolism of other steroids, prostaglandins and xenobiotics. Since AKR1C enzymes have broad spectrum of physiological roles they represent interesting drug targets for treatment of different pathophysiological conditions like hormone-dependent cancers, acute myeloid leukaemia, lung cancer, oral cancer and non-Hodgkin lymphoma. These enzymes also affect distribution of fat tissue in obesity. Over the last decade, the number of publications on correlation between AKR1C expression and different pathophysiological conditions has increased enormously suggesting that inhibition of these enzymes would be beneficial for treatment of these diseases. Inhibitors of these tissue specific enzymes could represent a novel class of drugs, the so called selective intracrine modulators.

**Key words:** enzymes, aldo-keto reductases, steroids, prostaglandins, xenobiotics

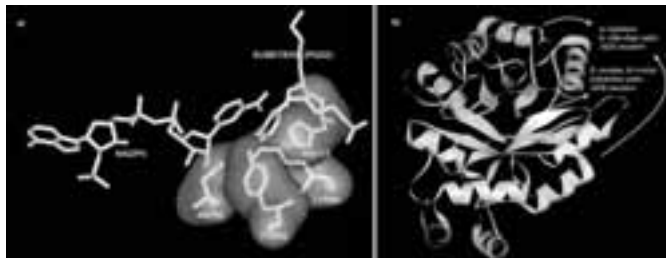
## 1 Uvod

Najbolj pogost način zdravljenja v 21. stoletju predstavlja uporaba učinkovin, ki delujejo na specifično makromolekulo, najpogosteje encim. Encimski inhibitorji predstavljajo znaten delež učinkovin v klinični uporabi in s tem tudi pomemben del raziskav v farmaciji. Aldo/keto-reduktaze (AKR) so encimi vpleteni v različne procese v človeškem organizmu. Ker število raziskav, ki potrjujejo vpletenost človeških izooblik AKR1C v različna patofiziološka stanja iz leta v leto narašča, predstavljajo ti encimi zanimive farmakološke tarče za razvoj učinkovin, ki bi inhibirale njihovo delovanje.

## 2 Naddružina aldo/keto-reduktaz in podružina aldo/keto-reduktaz 1C

Aldo/keto-reduktaze so citosolni, večinoma monomerni encimi, ki *in vivo* katalizirajo redukcije ketonov in aldehydov v ustrezne alkohole. Pri tem kot koencim uporabljajo NAD(P)H (1). Cilindrično jedro encimov AKR sestavljajo  $\beta$ -ravnine, ki so preko zank povezane z  $\alpha$ -vijačnicami, le-te pa obkrožajo jedro. Ta značilna tridimenzionalna struktura sodčka ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub> (slika 1) omogoča vezavo koencima v anti-konformaciji. Encimi

AKR imajo v aktivnem mestu ohranjeno katalitično tetrado Asp50, Tyr55, Lys84 in His117 (slika 1). Pri reakciji, ki jo katalizirajo, se 4-pro-R-hidridni ion prenese s koencima na substrat. Najprej Tyr55 odda proton substratu in veže proton iz imidazolne skupine His117. S prenosom protona na substrat je olajšan prenos hidridnega iona iz koencima (2).



**Slika 1:** a) Aktivno mesto encimov AKR s katalitično tetrado, substratom prostaglandinom D2 (PGD2) in koencimom NADPH (PDB 1RY0). b) Tridimenzionalna struktura sodčka  $(\alpha/\beta)_8$  encimov AKR.

**Figure 1:** a) Active site of AKR enzymes (PDB 1RY0). The catalytic tetrad, substrate prostaglandin D2 (PGD2) and coenzyme NADPH are shown. b) Typical three-dimensional structure of AKR enzymes.

Predstavnik naddružine aldo/keto-reduktaz poimenujemo po dogovorjenih pravilih: koren AKR označuje aldo/keto-reduktaze, arabska številka za korenem označuje družino, črka za številko poddružino in zadnja arabska številka označuje posamezen protein (izoencim). Vsak protein pa ima zaradi prepoznavanja različnih substratov lahko še druga imena (preglednica 1). Naddružina aldo/keto-reduktaz je sestavljena iz 15 družin (AKR1-AKR15). Devet družin se naprej deli v poddružine. Tako se družina AKR1 deli v poddružine AKR1A, AKR1B, AKR1C in AKR1D (3). Podružino AKR1C sestavlja 22 izoencimov, od katerih so štirje človeški: AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 in AKR1C4 (3). Kljub temu, da imajo ohranjenega 86-99 odstotkov aminokislinskega zaporedja se razlikujejo po substratni specifičnosti (preglednica 1), inhibicijskih profilih in porazdelitvi po tkivih (1).

### 3 Izražanje človeških encimov AKR1C v tkivih

Jetra so edini organ kjer se AKR1C1-AKR1C4 izražajo v približno enakih deležih. AKR1C4 se v največji meri izraža v jetrih, manj pa v

ostalih tkivih. V pljučih najdemo visoke deleže vseh izooblik AKR1C, le AKR1C4 je tu prisotna v manjši meri. V prostati prevladujeta izoobliki AKR1C2 in AKR1C3, v testisih je glavna AKR1C1, v žlezah dojk pa AKR1C3. V endometriju so prisotne izooblike AKR1C1- AKR1C3 (1, 4). V možganih je izražanje teh encimov nizko, v večjem obsegu sta tu izraženi izoobliki AKR1C1 in AKR1C2 (1). Izooblika AKR1C3 je prisotna tudi v ledvicah in mehuru (5, 6). AKR1C1-AKR1C3 se izražajo tudi v maščobnem tkivu (7).

## 4 Fiziološka vloga encimov AKR1C

### 4.1 Metabolizem steroidov

#### 4.1.1 Metabolizem spolnih hormonov

V biosintezi in inaktivaciji spolnih hormonov izoencimi AKR1C katalizirajo stereospecifične redukcije karbonilnih funkcionalnih skupin na mestih 3, 17 in 20 steroidnega skeleta v  $3\alpha$ -,  $3\beta$ -,  $17\beta$ - in  $20\alpha$ -hidroksilne skupine (slika 2). V steroidogenih tkivih so vključeni v biosintezo androgenov, estrogenov in progesterona, v perifernih tkivih pa pretvarjajo aktivno obliko le-teh v neaktivno obliko in obratno. S tem delujejo kot molekularna stikala, ki na pred-receptorski ravni uravnavajo lokalno koncentracijo hormonov. AKR1C1 katalizira redukcijo progesterona v manj aktiven  $20\alpha$ -hidroksiprogesteron, s  $3\beta$ -keto-steroid-reduktazno aktivnostjo pa katalizira inaktivacijo  $5\alpha$ -dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT) v  $3\beta,17\beta$ -androstandiol, ki deluje proapoptotično preko receptorjev za estrogene (ER)  $\beta$ . Tako določa koncentracijo aktivnih ligandov za receptorje za progesteron (PR) in za androgene (AR). AKR1C2 je predvsem  $3\alpha$ -HSD, ki katalizira redukcijo androgena  $5\alpha$ -DHT v  $3\alpha,17\beta$ -androstandiol, ki ima nizko afiniteto do AR. AKR1C3 deluje predvsem kot  $20\alpha$ -HSD (HSD in  $17\beta$ -HSD in katalizira inaktivacijo progesterona ter nastanek androgena testosterona in aktivnega estradiola in tako v tarčnih tkivih vpliva na aktivacijo AR, PR in ER (1, 8). AKR1C4 je 3-ketosteroid-reduktaza, ki ščiti organizem pred preveliko količino aktivnih steroidov, tako da skupaj s  $5\alpha/5\beta$ -reduktazami sodeluje pri tvorbi  $5\alpha/5\beta$ -tetrahydrosteroidov, ki se lahko konjugirajo in izločijo iz organizma (1).

#### 4.1.2 Metabolizem drugih steroidov

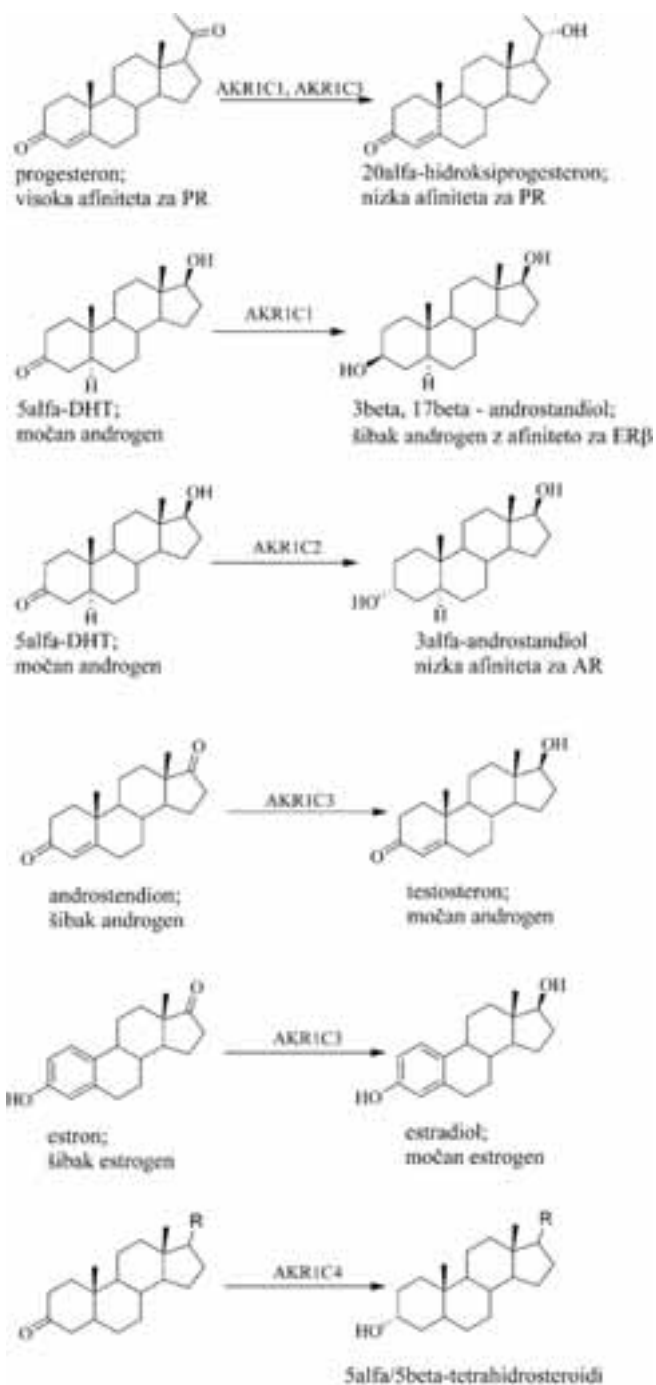
AKR1C1 in AKR1C2 v možganih sodelujeta pri metabolizmu nevrosteroidov (slika 3). Nevrosteroidi so nevroativni steroidi (endogeni steroidi, ki preko vezave na specifične receptorje spremenijo vzdražnost nevronov) ali njihovi metaboliti (ne vplivajo na vzdražnost nevronov), ki se sintetizirajo in delujejo v možganih.

**Preglednica 1:** Človeški izoencimi AKR1C in njihovi fiziološki substrati.

**Table 1:** Human AKR1C isozymes and their physiological substrates.

Protein	Druga imena	Fiziološki substrati
aldo/keto-reduktaza 1C1 (AKR1C1)	$20\alpha$ -HSD, DD1	progesteron, $5\alpha$ -DHT, ksenobiotiki, nevrosteroidi
aldo/keto-reduktaza 1C2 (AKR1C2)	$3\alpha$ -HSD tip 3, DD2	$5\alpha$ -DHT, ksenobiotiki
aldo/keto-reduktaza 1C3 (AKR1C3)	$3\alpha$ -HSD tip 2, $17\beta$ -HSD tip 5, prostaglandin F-sintaza, DDX	progesteron, estron, androstendion, deoksikortikosteron, PGH2, PGD2, ksenobiotiki
aldo/keto-reduktaza 1C4 (AKR1C4)	$3\alpha$ -HSD tip 1, DD4	3-keto- $5\alpha/5\beta$ -tetrahydrosteroidi, ksenobiotiki

HSD – hidroksteroid-dehidrogenaza; DD – dihidrodiol-dehidrogenaza;  $5\alpha$ -DHT -  $5\alpha$ -dihidrotestosteron, PG - prostaglandin



Slika 2: Metabolizem steroidov z encimi AKR1C.

Figure 2: Steroid metabolism catalyzed by AKR1C isozymes.

AKR1C2 katalizira nastanek 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP), najbolj aktivnega neurosteroida pri sesalcih, AKR1C1 pa katalizira reakcije inaktivacije 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona (5 $\alpha$ -DHP) in 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP je močan pozitivni alosterični modifikator receptorja za  $\gamma$ -aminobutanojsko kislino (GABA) tipa A. GABA po

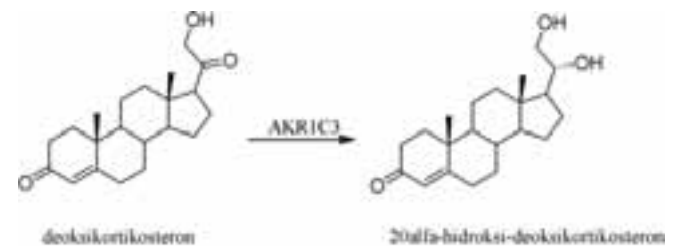
vezavi na receptor povzroči vdor Cl<sup>-</sup> ionov v celico in s tem hiperpolarizacijo. Za proženje akcijskega potenciala in prenos informacije je zato potreben večji impulz (9).



Slika 3: Metabolizem neurosteroidov z encimoma AKR1C1 in AKR1C2.

Figure 3: Neurosteroid metabolism by isozymes AKR1C1 and AKR1C2.

AKR1C3 katalizira tudi redukcijo deoksikortikosterona (DOC), močnega agonista receptorjev za mineralokortikoide, v 20 $\alpha$ -hidroksiDOC (slika 4). DOC je metabolit progesterona, zato se njegova koncentracija poveča pri stanjih, ko je koncentracija progesterona povečana (nosečnost, lutealna faza menstrualnega ciklusa). Inaktivacija DOC-a ščiti pred prekomerno aktivacijo receptorjev za mineralokortikoide in s tem pred razvojem hipertenzije (5).



Slika 4: Metabolizem deoksikortikosterona z encimom AKR1C3.

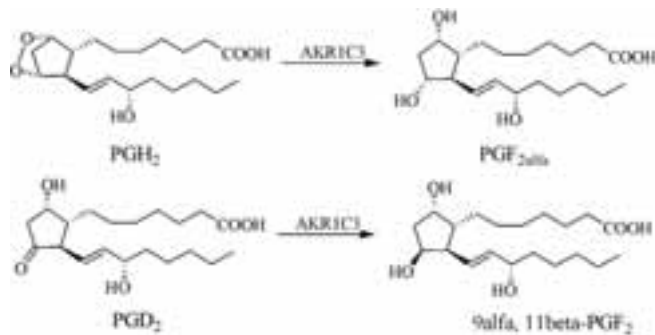
Figure 4: Deoxicorticosterone metabolism by AKR1C3 enzyme.

## 4.2 Metabolizem prostaglandinov (PG)

AKR1C3 katalizira redukcijo PGH2 v PGF2 $\alpha$  in PGD2 v 9 $\alpha$ , 11 $\beta$ -PGF2 (slika 5). S tem zmanjša koncentracijo 15-deoksi- $\Delta$ 12,14-PGJ2a, ki nastaja s spontano reakcijo iz PGD2 in njegovo vezavo na receptor  $\gamma$  aktiviran s peroksisomskim proliferatorjem (PPAR $\gamma$ ). Aktivacija tega receptorja povzroči prepisovanje genov, ki sprožijo diferenciacijo in/ali apoptozo. V normalnem kostnem mozgu je prisotna visoka koncentracija PGD2, zato se mora tkivo zaščititi pred prekomernim antiproliferativnim in prodiferencijskim delovanjem. AKR1C3 naj bi bil glavni encim, ki to omogoča (10, 11). Predvidevajo, da AKR1C3 zaradi vpletenosti v metabolizem prostaglandinov sodeluje tudi pri krčenju mehurja in izločanju urina in ima zaščitno vlogo na ravni ledvic,



ker preprečuje vazokonstrikcijo povzročeno s PGE2 (6). V zadnjem času ugotavljajo, da k sintezi PGF2 $\alpha$  prispeva tudi AKR1C2 (12).



Slika 5: Metabolizem prostaglandinov z encimom AKR1C3.

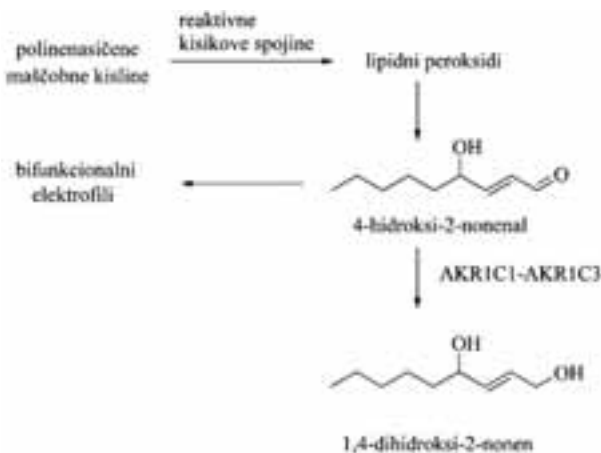
Figure 5: Prostaglandin metabolism catalyzed by AKR1C3.

### 4.3 Metabolizem ksenobiotikov

AKR1C kot dihidrodiol-dehidrogenaze sodelujejo v I. fazi metabolizma ksenobiotikov; tako učinkoviti kot kemičnih karcinogenov. Z redukcijo ketonov in/ali aldehydov omogočijo nastajanje spojin, ki se lahko konjugirajo in izločijo iz telesa. S temi reakcijami lahko omogočijo tvorbo aktivne oblike učinkovine ali pa zmanjšajo njeno delovanje (8).

### 4.4 Metabolizem lipidnih aldehydov

Iz polinenasičenih maščobnih kislin v našem organizmu po reakciji z reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS) nastajajo lipidni peroksidi, ki razpadajo v bifunkcionalne elektrofile. Ti lahko premrežijo proteine in jih zato povezujejo z boleznimi kot so ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen. Tvorijo lahko tudi adukte z DNA. Zaradi navedenega obstaja v našem telesu več mehanizmov, ki odstranjujejo te snovi. AKR1C1-AKR1C3 katalizirajo redukcijo 4-hidroksi-2-nonenala (enega najpogostejših citotoksičnih produktov lipidne peroksidacije) in s tem odstranijo dve reaktivni skupini: aldehidno in konjugiran sistem dvojnih vezi (slika 6) (8, 13).



Slika 6: Detoksifikacija lipidnih aldehydov z encimi AKR1C.

Figure 6: Detoxification of lipid aldehydes by AKR1C isozymes.

## 5 Patofiziološka vloga encimov AKR1C

Spremenjeno izražanje AKR1C je zaradi sodelovanja v različnih metabolnih procesih povezano z različnimi patofiziološkimi stanji. Ob prekomernem izražanju bi s selektivnimi inhibitorji lahko intrakrino vplivali na delovanje produktov reakcij, ki jih ti encimi katalizirajo (14).

### 5.1 Hormonsko odvisne bolezni/stanja

Spremenjeno delovanje nekaterih izooblik AKR1C, ki ima za posledico moten metabolizem steroidnih hormonov, lahko vodi v povečano proliferacijo celic in tako v kopičenje genetskih napak. Povezano je z različnimi vrstami hormonsko odvisnih oblik raka (rak dojk, prostate, endometrija, jajčnikov) ter drugimi hormonsko odvisnimi boleznimi (benigna hiperplazija prostate, endometrioza, epilepsija, predmenstrualni sindrom, depresivne motnje) (4, 8). Na splošno velja, da aktivni androgeni in estrogeni povečajo proliferacijo celic, progesteron pa nasprotuje temu delovanju in povzroči diferenciacijo. Znana je tudi povezava med motenim metabolizmom prostaglandinov ter izražanjem encimov AKR1C pri raku prostate (10-12).

#### 5.1.1 Benigna hiperplazija prostate (BHP) in rak prostate

Človeški AKR1C encimi so vključeni v metabolizem androgenov in tako sodelujejo pri rasti, razvoju in delovanju prostate. Za BHP je značilen prekomeren razrast epitelijskega in vezivnomišičnega tkiva kar vodi v povečanje organa in v najhujših primerih celo do zapore sečnih poti. Za to bolezen je dokazano povečano izražanje AR in encimov, ki usmerjajo metabolizem v sintezo aktivnih androgenov (15-18). Rak prostate se razvije predvsem v perifernem delu prostate. Dokazano je bilo povečano izražanje encimov (tudi AKR1C3), ki vodijo v povečano sintezo 5 $\alpha$ -DHT in zmanjšano izražanje ER $\beta$ , kar kaže na stimulacijo proliferacije celic z androgeni in zmanjšano apoptotično delovanje preko ER (15, 16, 18, 19). Pri precejšnjem številu bolnikov z rakom na prostati se po uspešnem hormonskem zdravljenju razvije t.i. od androgenov neodvisna oblika raka na prostati. Organ se pomanjkanju androgenov, ki ga dosežemo z zdravljenjem, prilagodi na različne načine. Med drugim je v tkivu povečano izražanje encimov, ki omogočajo nastajanje aktivnih androgenov (tudi AKR1C3) ter encimov, ki jih inaktivirajo (AKR1C1 in AKR1C2). AKR1C3 in AKR1C2 lahko spremembe v prostati povzročita tudi zaradi vpletenosti v metabolizem prostaglandinov (12, 16, 17, 20).

#### 5.1.2 Rak dojk

V celičnih linijah raka dojk in vzorcih patološkega tkiva so dokazali zmanjšano izražanje AKR1C1 in AKR1C2 ter povečano izražanje AKR1C3. Spremenjeno izražanje prvih dveh pomakne ravnotežje metabolizma progesterona v smer 4-pregnenjskih metabolitov, ki stimulirajo proliferacijo proučevanih celic. Povečano izražanje AKR1C3 poveča sintezo testosterona, ki se z encimom aromatazo pretvori v aktivni estrogen estradiol, ki ima proliferativne učinke. AKR1C3 lahko vpliva na proliferacijo celic tudi zaradi vpletenosti v metabolizem PG in ksenobiotikov in tako predstavlja zanimivo tarčo (21-23).

#### 5.1.3 Rak endometrija

V tkivu raka endometrija so pri nekaterih bolnicah dokazali povečano izražanje encimov, ki katalizirajo nastanek aktivnih androgenov in

estrogenov (AKR1C3) in povečano izražanje AKR1C1, ki inaktivira progesteron. Posledica je povečana proliferacija in zmanjšana diferenciacija celic endometrija (4, 24).

#### 5.1.4 Rak jajčnikov

V tumorskem tkivu je prisotno zmanjšano izražanje AKR1C1 in AKR1C2, izražanje AKR1C3 ni spremenjeno. Predvidevajo, da je spremenjen metabolizem progesterona (25).

#### 5.1.5 Druge hormonsko odvisne bolezni. Predmenstrualni sindrom, depresija, epilepsija, hirsutizem, endometrioza

AKR1C1 in AKR1C2 povezujejo s predmenstrualnim sindromom, depresijo in epilepsijo zaradi vpletenosti v metabolizem nevrosteroidov in proženja akcijskih potencialov v možganih (10, 11). Hirsutizem je moški tip poraščenosti, ki se pojavlja pri ženskah. V koži spolovil bolnic so pokazali spremenjen metabolizem androgenov z zmanjšanim izražanjem AKR1C2, kar ima za posledico kopičenje aktivnega androgena 5 $\alpha$ -DHT (26). Endometrioza je bolezen, pri kateri se sluznica maternice nahaja tudi zunaj maternice v trebušni votlini. Obstajajo trije tipi bolezni med katerimi je bilo za endometriozo jajčnikov dokazano povečano izražanje AKR1C1 in AKR1C3 ter s tem moten metabolizem estrogenov in progesterona (27).

### 5.2 Akutna mieolična levkemija (AML)

Akutna mieolična levkemija (AML) je rakavo obolenje mieloidne linije belih krvnih celic. Zaradi hitre proliferacije spremenjenih celic v kostnem mozgu je motena sinteza belih krvnih celic. V celičnih linijah AML so dokazali izražanje AKR1C3. Po inhibiciji tega encima se odzivnost teh celic na induktorje diferenciacije poveča. Rezultati kažejo, da je za tak odziv pomembna vpletenost AKR1C3 v metabolizmu PG (10, 11).

### 5.3 Debelost

Izoencimi AKR1C1-AKR1C3, ki so vključeni v metabolizem hormonov in ketoprogesterinov v maščobnem tkivu, so povezani tudi s tipom debelosti oziroma porazdelitvijo maščobnega tkiva. Poznamo ženski (ginoidni, hruškasti) tip debelosti in moški (androidni) tip debelosti. Za prvega je značilno predvsem nabiranje maščevja na območju spodnjega dela trebuha v podkožju. Debelost kjer se maščevje nabira v podkožju je večinoma nenevarna. Za moški tip debelosti je značilno nabiranje maščevja okrog trebuha in se v polovici primerov nahaja v podkožju, v polovici primerov pa med notranjimi organi. Notranje nabiranje maščevja lahko vodi v številne zaplete: metabolični sindrom, hipertenzija in druge (28). Ta tip debelosti se pojavlja že pri približno 20% žensk po 50. letu. Zaradi navedenega je iskanje novih tarč za zdravljenje debelosti v razmahu. Ugotovili so, da na tip debelosti vpliva razmerje med estrogeni in androgeni in metabolizem progesterona. Za androidno debelost je značilno porušeno razmerje med androgeni in estrogeni ter zmanjšana koncentracija progesterona, za ginoidno debelost pa je značilno povečano izražanje drugih encimov, ki sintetizirajo aktivne estrogene. Izooblike AKR1C so izražene v trebušnem maščevju vendar pa povezava med boleznijo in izražanjem še ni polnoma pojasnjena. AKR1C3 je povezan z debelostjo tudi preko metabolizma PG saj preko receptorja PPAR $\gamma$  vpliva na adipogenezo (28, 29).

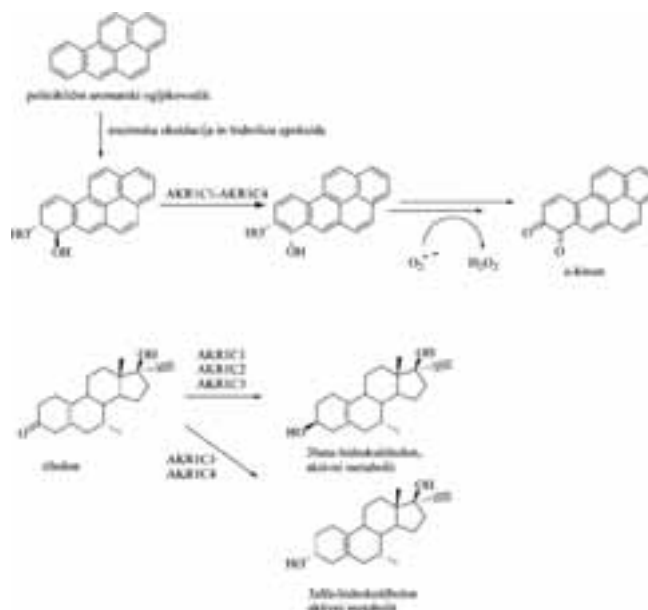
## 5.4 Patofiziološka stanja povezana z metabolizmom ksenobiotikov

### 5.4.1 Onesnaževalci okolja

Policiklični aromatski ogljikovodiki spadajo med najpogostejše in najbolj proučevane onesnaževalce. Nekateri med njimi po aktivaciji v telesu postanejo karcinogeni (slika 7). Obstaja več različnih poti nastanka metabolitov, ki poškodujejo DNA. AKR1C1-AKR1C4 encimi omogočajo nastajanje reaktivnih kinonov in reaktivnih kisikovih spojin. Kinoni lahko tvorijo kovalentne DNA-adukte, kisikove reaktivne spojine pa oksidativne poškodbe DNA. Po vstopu policikličnih aromatskih ogljikovodikov v organizem le-ti povečajo izražanje AKR1C. AKR1C1 – AKR1C3 so s sodelovanjem v metabolizmu policikličnih aromatskih ogljikovodikov in tudi drugih polutantov okolja (npr. arzena) povezani z nastankom in invazivnostjo pljučnega raka, z rakom ust, žrela, črevesja, sečnega mehurja, dojke ter ne-Hodgkinovim limfomom (8, 22, 30).

### 5.4.2 Učinkovine

AKR1C1-AKR1C4 z redukcijo karbonilnih skupin v hidroksilne skupine sodelujejo v metabolizmu nekaterih učinkovin. Takšen primer je aktivacija predzdravila tibolona, ki se uporablja v hormonski nadomestni terapiji za lajšanje simptomov menopavze ter za zaustavljanje napredovanja osteoporoze (slika 7) (31). V drugih primerih pa lahko ti encimi povzročijo tudi inaktivacijo učinkovin ter rezistenco na zdravilo. Ta pojav so zasledili npr. pri zdravljenju različnih rakavih obolenj (32).



Slika 7: Metabolizem ksenobiotikov z encimi AKR1C.

Figure 7: Xenobiotic metabolism by AKR1C isozymes.

## 6 Zaključek

Število publikacij o vpletenosti AKR1C v različna patofiziološka stanja iz leta v leto narašča. Zaradi različnih vlog človeških izoencimov AKR1C v organizmu, so le-ti povezani z nastankom različnih bolezni in predstavljajo zanimive farmakološke tarče. Najbolj raziskana je povezava med spremenjenim delovanjem AKR1C in hormonsko odvisnimi boleznimi. Ker imajo človeški AKR1C (AKR1C1-AKR1C4) ohranjenega vsaj 86 odstotkov aminokislinskega zaporedja predstavljajo velik izziv za pripravo selektivnih inhibitorjev in so v zadnjih letih vse pogosteje predmet raziskovanja. Rezultati dosedanjih raziskav so pokazali, da je inhibitorje AKR1C s selektivnim in vitro delovanjem mogoče pripraviti (33). Z uporabo novih tehnoloških pristopov, kot je npr. vgrajevanje učinkovine v nanodelce, ki omogočajo specifično ciljanje v posamezne celice ali tkiva, bi v prihodnosti selektivnost lahko še izboljšali (34). S selektivnimi inhibitorji bi lahko zavrli tkivno specifične AKR1C in tako vplivali na intrakrino delovanje hormonov.

## 7 Literatura

- Penning TM, Burczynski ME, Jez ME et al. Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex steroids. *Biochem J* 2000; 351: 67-77.
- Penning TM. Molecular determinants of steroid recognition and catalysis in aldo-keto reductases. Lessons from 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69: 211-225.
- Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV et al. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact* 2003; 143-144: 621-631.
- Lanišnik Rižner T, Šmuc T, Ruprecht R et al. AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 126-135.
- Sharma KK, Lindqvist A, Zhou XJ et al. Deoxycorticosterone inactivation by AKR1C3 in human mineralocorticoid target tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 79-86.
- Azzarello J, Fung K-M, Lin H-K. Tissue distribution of human AKR1C3 and rat homolog in the adult genitourinary system. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 853-861.
- Blouin K, Blanchette S, Richard C et al. Expression and activity of steroid aldo-ketoreductases 1C in omental adipose tissue are positive correlates of adiposity in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: 398-404.
- Penning TM, Drury JE. Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys* 2007; 464: 241-250.
- Higaki Y, Usami N, Shintani, S et al. Selective and potent inhibitors of human 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) that metabolizes neurosteroids derived from progesterone. *Chem Biol Interact* 2003; 143-144: 503-513.
- Desmond JC, Mountford JC, Drayson MT et al. The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 2003; 63: 505-512.
- Lovering AL, Ride JP, Bunce CM et al. Crystal structure of prostaglandin D2 11-ketoreductase (AKR1C3) in complex with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs flufenamic acid and indomethacin. *Cancer Res* 2004; 64: 1802-1810.
- Wang S, Yang Q, Fung K-M et al. AKR1C2 and AKR1C3 mediated prostaglandin D2 metabolism augments the PI3/Akt proliferative signaling pathway in human prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 289: 60-66.
- Burczynski ME, Sridhar GR, Palackal NT et al. The reactive oxygen species- and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde 4-hydroxynonenal to 1,4-dihidroksi-2-nonenol. *J Biol Chem* 2001; 276: 2890-2897.
- Penning TM. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 193-205.
- Bauman DR, Steckelbroeck S, Peehl D et al. Transcript profiling of the androgen signal in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer. *Endocrinology* 147: 5806-5816.
- Lanišnik Rižner T. Androgeni, benigna hiperplazija prostate in rak prostate. *Med Razgl* 2008; 47: 73-85.
- Wako K, Kawasaki T, Yamana K et al. Expression of androgen receptor through androgen-converting enzymes is associated with biological aggressiveness in prostate cancer. *J Clin Pathol* 2008; 61:448-454.
- Ji Q, Chang L, Stanczyk F et al. Impaired dihydrotestosterone catabolism in human prostate cancer: critical role of AKR1C2 as a pre-receptor regulator of androgen receptor signalling. *Cancer Res* 2007; 67: 1361-1369.
- Fung KM, Samara EN, Wong C et al. Increased expression of type 2 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) and its relationship with androgen receptor in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 169-180.
- Stanborough M, Buble G, Ross K et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2815-2825.
- Amin SA, Huang C-C, Reierstad S et al., Paracrine-stimulated gene expression profile favors estradiol production in breast tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 253: 44-55.
- Courter LA, Pereira C, Baird WM. Diesel exhaust influences PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture. *Mutat Res.* 2007; 625: 72-82.
- Ji Q, Aoyama C, Nien Y-D et al. Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signalling. *Cancer Res* 2004; 64: 7610-7617.
- Šmuc T, Lanišnik Rižner T. Aberrant pre-receptor regulation of estrogen, progesterone action in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 301:74-82.
- Ji Q, Aoyama C, Chen PK et al. Localization and altered expression of AKR1C family members in human ovarian tissues. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 261-266.
- Steiner AZ, Chang L, Ji Q et al., 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase type III deficiency: a novel mechanism for hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1298-1303.
- Šmuc T, Hevir N, Ribič-Pucelj M et al. Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 301:59-64.
- Wake DJ, Strand M, Rask E et al. Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol* 2007; 66: 440-446.
- Quinkler M, Bujalska IJ, Tomlinson JW et al. Depot specific prostaglandin synthesis in human adipose tissue: A novel possible mechanism of adipogenesis. *Gene* 2006; 380: 137-143.
- Tai H-L, Lin T-S, Huang H-H et al. Overexpression of aldo-keto reductases 1C2 as a high-risk factor in bladder cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 305-311.
- Steckelbroeck S, Oyesanmi B, Jin Y et al. Tibolone metabolism in human liver is catalyzed by 3 $\alpha$ /3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four isoforms of the aldo-keto reductases (AKR)1C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1300-1309.
- Hung JJ, Chow KC, Wang HW et al. Expression of dihydrodiol dehydrogenase and resistance to chemotherapy and radiotherapy in adenocarcinoma cells of lung. *Anticancer Res* 2006; 26: 2949-2955.
- Byrns MC, Steckelbroeck S., Penning TM. An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3 $\alpha$ -HSD, type 5 17 $\beta$ -HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 484-493.
- Gu FX, Karnik R, Wang AZ et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today* 2007; 2:14-21.

# Tabletiranje obloženih pelet - večnotne farmacevtske oblike

## Tableting of coated pellets - multiple unit dosage forms

Ilija Ilić, Janez Kerč

**Povzetek:** Obložene pelete stisnjene v tableto predstavljajo večnotno farmacevtsko obliko, ki ima številne tehnološke in terapevtske prednosti pred enoenotnimi farmacevtskimi oblikami. Stiskanje obloženih pelet je tehnološko zahteven proces, saj mora obloga ohraniti svojo funkcionalnost, še posebej kadar gre za filmsko oblogo, ki zagotavlja prirejeno sproščanje. Za učinkovito tabletiranje obloženih pelet lahko uporabimo različne blažilne pomožne snovi, ki zmanjšajo ali v celoti preprečijo poškodbe obloge. Ključna je tudi izbira vrste obloge, saj imajo različni polimeri različne mehanske lastnosti, ki jih lahko izboljšamo z dodatkom mehčal. Na lastnosti večnotnih tablet lahko vplivajo še sila stiskanja, delež obloženih pelet v tabletni zmesi, peletno jedro (poroznost, trdnost), velikost pelet, debelina obloge in prisotnost dodatne zaščitne obloge. Izdelane večnotne tablete morajo izpolnjevati enake farmakopejske zahteve kot enoenotni sistemi, pri čemer sta najbolj kritični lastnosti dovolj visoka trdnost in dovolj nizka krušljivost tablet. Primeri iz literature kažejo, da je tabletiranje obloženih pelet zahteven, vendar obvladljiv process.

**Ključne besede:** tabletiranje, obložene pelete, prirejeno sproščanje, večnotna farmacevtska oblika

**Abstract:** Tableting of coated pellets into multiple unit system represents a dosage form that has technological and therapeutical advantages over a single unit dosage form. Compression of coated pellets is a technologically demanding task, because the coating must preserve its functionality, especially in case of film coatings, that are used to modify the drug release. To effectively tablet coated pellets, different cushioning excipients can be used, that limit or completely prevent the damage to the coating. Type of coating used is also very important, because different polymers have different mechanical properties, which can be improved with the use of plasticizers. Properties of multiple unit tablets depend also on compression force, content of coated pellets in tableting blend, pellet core (porosity, hardness), size of pellets, thickness of the coating and presence of additional protective coating. Manufactured multiple unit tablets must comply with the same pharmacopoeial tests as single unit dosage forms, the most critical parameters being suitably high hardness and low friability. Tableting of coated pellets is a challenging task that requires a person skilled in the art of tableting.

**Keywords:** tableting, coated pellets, modified release, multiple unit dosage form

## 1 Uvod

### 1.1 Večnotne farmacevtske oblike: kapsule in tablete

Večnotne farmacevtske oblike se običajno polnijo v kapsule. Glavna slabost so visoki stroški povezani s kapsuliranjem trdnih snovi, predvsem zaradi cene kapsul ter nizke hitrosti izdelave kapsul v primerjavi s tabletami. Dodatna slabost kapsul je, da jih ne moremo prelomiti kot tablete, kadar je to zaželeno (1). Zaradi značilne sferične oblike pelet in s tem povezano ureditvijo delcev ter omejitev v velikosti farmacevtske oblike, je največji možni odmerek pelet v kapsulah okrog 250 mg (2). Alternativno lahko pelete namesto polnjenja v kapsule tabletiramo. V tablete lahko tudi vgradimo več zdravilne učinkovine, saj so tablete velikega volumna za bolnike bolj sprejemljive kot velike kapsule (3). Pri tabletiranju pelet sta na voljo dva možna pristopa, in

sicer tabletiranje pelet skupaj z blažilnimi pomožnimi snovmi in tabletiranje samih pelet brez prisotnosti pomožnih snovi; izjema je antiadheziv, ki je v nizkih koncentracijah praktično vedno prisoten v zmesi za tabletiranje.

V literaturi najdemo relativno malo zapisov o komercialnih izdelkih večnotnih tablet stisnjenih iz obloženih pelet; dva takšna produkta sta Beloc® ZOK (4) in Antra MUPS® (5). V prvem primeru gre za podaljšano sproščanje metoprolola z namenom doseganja 24-urnega odmernega intervala. Farmacevtska oblika je tableta, stisnjena iz nekaj sto pelet, ki omogočajo sproščanje ničtega reda (ZOK: angl.: Zero Order Kinetics), kjer vsaka peleta predstavlja samostojni dostavni sistem (slika 1). Izdelek se pojavlja na različnih trgih pod različnimi imeni kot so Seloken® ZOK, Betaloc® ZOK in TOPROL-XL® (ZDA). Antra MUPS® je podoben izdelek, kjer je učinkovina inhibitor protonske črpalke omeprazol (MUPS: angl.: Multiple Unit Pellet System). Na trgu najdemo



tudi pripravke z esomeprazolom (Nexium®), orodisperzibilno tableto z lansoprazolom stisnjeno iz gastrorezistentnih mikropellet pod imenom Prevacid® ter podoben izdelek z podaljšanim sproščanjem teofilina Theo-Dur®.



**Slika 1:** Shematski prikaz večenotne farmacevtske oblike – tablete stisnjene iz obloženih pellet (4).

**Figure 1:** Scheme of multiple unit dosage form – tablet compressed of film coated pellets (4).

V farmaciji pelete definiramo kot majhne, okrogle ali skoraj okrogle delce z ozko porazdelitvijo velikosti, gladko površino, nizko krušljivostjo in nizko poroznostjo. Najpogosteje so velike med 0,5 in 1,5 mm, čeprav so načeloma možne tudi druge velikosti (6). Izdelamo jih z aglomeracijo finih praškastih delcev ali zrnč z uporabo primerne procesne opreme. Pelete so znane v farmacevtski industriji že več kot štiri desetletja, vendar pravi razmah doživijo konec 1970-tih let s prihodom tehnologije izdelave farmacevtskih oblik z nadzorovanim sproščanjem. Šele takrat se pravzaprav izkažejo številne prednosti pelet, kot gradnikov večenotnih farmacevtskih oblik, pred enoenotnimi farmacevtskimi oblikami (7).

Poznamo dve osnovni vrsti pelet in sicer ogrodne pelete in z učinkovino obložene pelete. Pri ogrodnih peletah je učinkovina enakomerno porazdeljena po celotnem volumnu pelete. Najpogosteje jih izdelujemo s sočasno aglomeracijo prahov učinkovine in pomožnih snovi. To lahko dosežemo z različnimi tehnološkimi postopki in sicer: iztiskanje in krogličenje, peletiranje z uporabo hitrovrtčnega mešalnika in uporabo tehnologije zvrtničenih plasti (rotorska komora). Z učinkovino obložene pelete pa so izdelane s procesom oblaganja (angl.: layering), kjer na nevtralnno peletno jedro nanese učinkovino, ki je potem enakomerno porazdeljena v oblogi. Proces oblaganja najpogosteje izvajamo s tehnologijo zvrtničenih plasti z uporabo komore z razprševanjem od spodaj (t.i. Wursterjeva komora – Glatt, GEA Niro/Aeromatic, Hüttlin Turbojet, Kugelcoater). Obe vrsti pelet lahko potem še filmsko oblagamo (7).

Načeloma lahko tabletiramo tako ogrodne, kot z učinkovino obložene in filmsko obložene pelete. Tudi z ogrodnimi peletami lahko dosežemo nadzorovano sproščanje, vendar se moramo ob njihovem tabletiranju vprašati o smiselnosti slednjega. Nekatere polimere, ki omogočijo nadzorovano sproščanje v ogrodnih peletah, je namreč mogoče stisniti že v obliki prahov in je vmesni korak tvorbe ogrodnih pelet včasih smiselno izpustiti. Tabletiranje ogrodnih pelet lahko ohrani prednosti večenotnih farmacevtskih oblik, če taka tableta razpade na osnovne delce. V nadaljevanju bomo govorili predvsem o tabletiranju filmsko obloženih pelet.

Za nastanek pelete morajo imeti omočeni prahovi določene lastnosti, ki jih omogoča t.i. pospeševalec krogličjenja. Takšna pomožna snov je mikrokristalna celuloza (MCC), ki je higroskopska, porozna in ima relativno visoko specifično površino (8). Po zadostnem omočenju postane plastična in omogoči nastanek pelete, zato je pravzaprav nujna sestavina pelet. Le z rotorsko komoro lahko izvedemo celoten proizvodni postopek v eni procesni napravi (7), zato naj bi bil ta postopek najbolj ekonomičen. Kljub temu se v industrijskem merilu bolj uporablja metoda iztiskanja in krogličjenja.

Pelete v kapsulah ali tabletah imajo številne terapevtske in tehnološke prednosti pred enoenotnimi oblikami. Gre za delce manjše od 2 mm, zato se v GIT obnašajo bolj podobno tekočinam in hitro zapuščajo želodec (9). V primerjavi s tabletami imajo pelete večje razmerje površine in volumna, kar lahko omogoči bolj nadzorovano sproščanje učinkovine, manjše nihanje plazemskih koncentracij in posledično boljšo absorpcijo in manjšo verjetnost pojavljanja neželenih učinkov (7). Pelete se enakomerno porazdelijo vzdolž gastrointestinalnega trakta (10), kar zmanjša nevarnost lokalnega draženja sluznice. Predstavljajo bolj varno izbiro oblike v prirejenim sproščanjem v primerjavi z enoenotnimi oblikami, še posebej kar se tiče morebitnih defektov ali poškodb farmacevtske oblike in s tem povezanega neželenega prehitrega sproščanja dela odmerka (angl.: dose dumping).

## 2 Prirejeno sproščanje in filmsko oblaganje

Pogosto želimo izdelati farmacevtsko obliko, katere sproščanje je časovno ali prostorsko pogojeno, saj lahko na ta način dosežemo določene prednosti pred farmacevtskimi oblikami s hitrim sproščanjem. Tipičen primer je učinkovina s kratkim razpolovnim časom, ki se jemlje za kronično terapijo, ima dobro absorpcijo in ugoden terapevtski indeks – takšna učinkovina je idealen kandidat za farmacevtsko obliko s podaljšanim sproščanjem (11). Takšna formulacija omogoča nadzorovanje hitrosti dovajanja zdravilne učinkovine, doseči je mogoče daljše vzdrževanje plazemske koncentracije v optimalnem terapevtskem območju, zato se lahko podaljša dozirni interval jemanja v primerjavi z obliko s hitrim sproščanjem, ter se s tem doseže boljše sodelovanje bolnika (11, 12).

Dobre kandidatke za prirejeno sproščanje so tudi učinkovine, ki so občutljive na želodčne pogoje (običajno v kislem mediju nestabilne učinkovine). Njihov razpad v želodcu zmanjšamo z izdelavo gastrorezistentne formulacije, ki omogoča zakasnjeno sproščanje. To je lahko nadzorovano bodisi časovno (začetek sproščanja po določenem času) ali prostorsko (začetek sproščanja po izstopu FO iz želodca, ko pride farmacevtska oblika v področje višje pH vrednosti) (11).

Ena od možnosti, za doseganje prirejenega sproščanja je filmsko oblaganje, ki je, zaradi njihove sferične oblike in majhne površine zelo primerna za pelete. Običajno kot tvorce obloge uporabljamo komercialne izdelke, torej koloidne raztopine ali še pogosteje suspenzije polimerov, ki upočasnijo sproščanje ali pa je njihovo raztapljanje pogojeno s pH vrednostjo okolja (11). Kemijsko gre za akrilne ali celulozne polimere in polivinil acetat, njihova uporaba je v glavnem v funkciji njihove vodotopnosti. Podaljšano sproščanje

dosegamo s filmskimi oblogami, ki so v vodi netopne (prehod učinkovine skozi pore v oblogi) ali pa v vodi nabrekajo (upočasnjena difuzija) (13). Gastrorezistentne obloge dosežemo s polimernimi filmi, ki so občutljivi na pH - v kislem so slabo topni, v alkalnem pa dobro topni. V ta namen se uporabljajo celulozni acetat ftalat, HPMC ftalat, HPMC acetat sukcinat, polivinil ftalat in še nekaj različnih kopolimerov metakrilne kisline (13, 14).

### 3 Tabletiranje obloženih pelet

Pelete ne predstavljajo samostojne farmacevtske oblike, temveč jih polnimo v kapsule ali stiskamo v tablete in izdelamo večnotno farmacevtsko obliko. V primeru tabletiranja morajo takšne pelete izpolnjevati določene pogoje, ki so enaki kot v primeru stiskanja prahov in zrnc. Dve nujni lastnosti za uspešno tabletiranje sta dobra pretočnost in dobra stisljivost tabletne zmesi (11, 15). Načeloma trdni delci, ki so okrogli in dovolj veliki, nimajo težav s pretočnostjo (16). Zato so tudi pelete s stališča dobrih pretočnih lastnosti neproblematične in nas bo v nadaljevanju bolj zanimala njihova deformacija in morebitne poškodbe v procesu tabletiranja.

Deformacija materiala zaradi vpliva zunanje sile je lahko dvojna: elastična ali plastična. Pri elastični deformaciji se material po obremenitvi vrne v začetno stanje, raztezek ali skrček pa je premosorazmeren z aplicirano silo. Pri plastični deformaciji material po prenehanju obremenitve ostane v deformiranem stanju. Običajno se snovi najprej deformirajo elastično, od neke mejne sile naprej pa plastično. V plastičnem delu deformacije lahko prihaja tudi do lomljenja delcev (16). V grobem lahko razdelimo materiale, ki jih tabletiramo v farmaciji, v dve skupini; i) materiali, ki se lomijo in ii) materiali, ki se plastično deformirajo. Določene pomožne snovi se obnašajo predvsem na en ali drug način, najpogosteje pa je mehanizem deformacije kombinacija plastične deformacije in lomljenja delcev, saj imamo pri tabletini zmesi večkomponentni sistem, kjer se lastnosti komponent lahko močno razlikujejo (16). Kadar tabletiramo zmes materialov, kjer se nekatere snovi lomijo, druge pa plastično deformirajo, običajno prevladajo lastnosti plastičnega materiala (17). Torej, kadar tabletiramo pelete skupaj s pomožnimi snovmi, je smiselno, da so slednje čim bolj plastične, saj se bodo tako deformirale namesto pelet.

Že prej omenjena nujna sestavina pelet (MCC) tvori tablete pretežno s plastično deformacijo in tudi sicer velja za enega najbolj plastičnih materialov, ki jih farmacevtska industrija uporablja. Je pa po drugi strani njena deformacija časovno odvisna, zato višja hitrost tabletiranja rezultira v mehkih tabletah, kar je možno kompenzirati s povišanjem tlaka stiskanja. Pri visokih tlakih pa lahko pride do laminacije tablet. Optimalno je torej počasno tabletiranje pri nizkem tlaku, ker tako pridejo njene za tabletiranje ugodne lastnosti najbolj do izraza (16). Glede na to, da gre za glavno sestavino pelet, lahko smiselno sklepamo, da bo podobno veljalo tudi pri tabletiranju pelet.

#### 3.1 Vpliv različnih dejavnikov na tabletiranje obloženih pelet

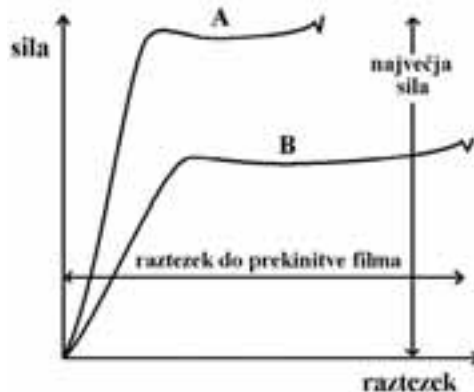
Prvi literaturni zapisi o tabletiranju obloženih delcev se pojavijo v začetku 1960-tih let, ko se pojavi patent, ki opisuje stiskanje tablet iz delcev, ki so površinsko obloženi z gastrorezistentno oblogo (18). Glavna začetna težava je v polimernih filmih, ki nimajo pravih

mehanskih lastnosti za tabletiranje. Šele razvoj filmov etil celuloze z visoko molekulsko maso omogoči tudi uspešno tabletiranje takšnih pelet brez lomljenja polimernega filma (19, 20). Že v tistem času se pojavi ideja o dodatku MCC kot blažilne pomožne snovi, ki omogoči nastanek tablete pri nižji sili in zmanjša mehansko povzročene poškodbe obloge med tabletiranjem (21).

##### 3.1.1 Vpliv vrste polimerne obloge in mehčala

Za učinkovito prirejenost sproščanje mora nanešena obloga ohranjati določene lastnosti. Biti mora zvezna, brez razpok ter dovolj debela. Številni v farmaciji uporabljeni polimeri so krhki in lomljivi, zato jim dodajamo mehčala, ki znižajo temperaturo stekalstega prehoda polimera in povečajo fleksibilnost molekul filmske obloge. Slednje omogoča večjo deformacijo filma brez lomljenja. Mehčala pripomorejo tudi k temu, da med oblaganjem pride do zadostne koalescence po površini pelete in tvorbe zveznega filma. So običajna sestavina filmskih oblog in igrajo ključno vlogo pri njeni učinkovitosti; najpogosteje se uporabljajo propilen glikol, polietilen glikoli, ftalatni estri, citratni estri (predvsem trietil citrat), itd (13).

Ker mehčala spremenijo mehanske lastnosti obloge, je zelo pomembno, da te spremembe merimo in kvantificiramo, še posebej kadar oblaganju pelet sledi njihovo stiskanje. Ena od pogosteje uporabljenih metod za določanje mehanske lastnosti obloge je merjenje natezne trdnosti obloge (slika 3) (13).



**Slika 2:** Primer profilov natezne trdnosti filmske obloge: A – brez mehčala; B – z mehčalom.

**Figure 2:** Example of stress-strain profiles of film coating: A – without plasticizer; B – with plasticizer.

Želimo si oblogo, ki se ob mehanski obremenitvi čim kasneje deformira, kadar pa do deformacije pride, naj se obloga plastično razteguje, ne pa lomi. Stanjšanje filmske obloge je boljše kot pa njena prekinitev. Mehanske lastnosti obloge so odvisne od fizikalnih lastnosti samega polimera, ki pa jih lahko tudi izboljšamo. Pri tem ima odločilno vlogo vrsta in količina dodanega mehčala, več ko ga dodamo, bolj lahko oblogo deformiramo, preden izgubi svojo zveznost in funkcijo (13). V optimalnih pogojih se lahko mehanske lastnosti (raztezek do prekinitve filma) zaradi dodatka mehčala povečajo za faktor sto (22). Visoka količina mehčala (30% in več) lahko povzroči težave z adhezivnostjo in lepljivostjo filmske obloge (23, 24). Nekateri raziskovalci ugotavljajo,

**Preglednica 1:** Osnovni podatki o nekaterih pogosto uporabljenih polimernih oblogah v farmaciji (27–31).

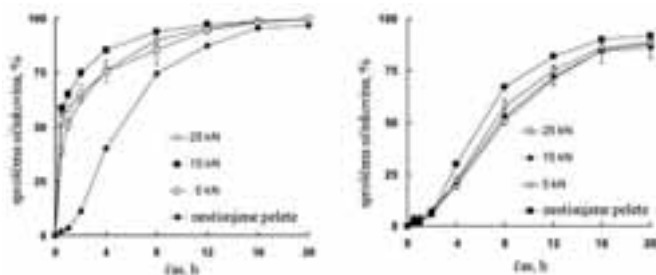
**Table 1:** Basic information about some commonly used polymeric coatings in pharmacy (27–31).

Zaščiteno ime	Oznaka	Vrsta polimera	Namen uporabe
Kollicoat®	SR	polivinilacetat	podaljšano sproščanje
	MAE	akrilni polimer	gastrorezistenca
	EMM	akrilni polimer	podaljšano sproščanje
	IR, Protect	polivinilalkohol-PEG kopolimer	zaščita
Eudragit®	L, S, FS	akrilni polimer	gastrorezistenca
	RL, RS, NE, NM	akrilni polimer	podaljšano sproščanje
	E	akrilni polimer	zaščita
Sureteric®	/	polivinilacetat ftalat	gastrorezistenca
Surelease®	/	etil celuloza	podaljšano sproščanje, zaščita
Pharmacoat®	603, 606, 615	HPMC	zaščita
HPMCP®	HP	HPMC ftalat	gastrorezistenca
Aqoat®	LF, MF, HF, LG, MG, HG	acetat sukcinat	gastrorezistenca
Aquacoat®	CPD	celuloza acetat ftalat	gastrorezistenca
	ECD 30	etil celuloza	podaljšano sproščanje, zaščita

da tabletiranje obloženih delcev zahteva oblogo, katera se raztegne za najmanj 75% preden pride do njene prekinitve (25).

Polimeri, ki se uporabljajo za filmsko oblaganje v farmaciji, lahko v grobem razdelimo v dve veliki skupini: celulozni polimeri in akrilni polimeri. Glavni celulozni polimer za podaljšano sproščanje je etil celuloza, npr. Surelease® ali Aquacoat® (22). Akrilne polimere poznamo pod zaščitenima imenoma Kollicoat® in Eudragit®. V primerjavi s celuloznimi oblogami veljajo akrilni polimeri za bolj gibljive in zato naj bi bili bolj primerni za oblaganje pelet, ki jih bomo stiskali v tablete (22, 26).

Vpliv dodatka mehčala na sproščanje so proučevali na primeru Kollicoata® SR 30 D, ki se uporablja za podaljšanje sproščanja. V odsotnosti mehčala je sproščanje po tabletiranju zaradi prekinjene obloge hitreje kot iz samih pelet. Ob dodatku 10 m/m % trietil citrata pa se sproščanje obloženih pelet s tabletiranjem le minimalno spremeni v primerjavi z nestisnjenimi peletami (slika 3). Do tega pride zaradi bistveno izboljšanih mehanskih lastnosti obloge po dodatku mehčala (22).



**Slika 3:** Vpliv mehčala na učinkovitost obloge za podaljšano sproščanje: levo - Kollicoat® SR 30 D brez mehčala; desno - Kollicoat® SR 30 D z mehčalom (22).

**Figure 3:** Influence of plasticizer on efficacy of sustained release coating: left - Kollicoat® SR 30 D without plasticizer; right - Kollicoat® SR 30 D with plasticizer (22).

V raziskavi so proučevali tudi nekatere druge vrste akrilnih polimerov kot sta Kollicoat® MAE 30 DP in Kollicoat® EMM 30 D. Pri MAE 30 DP so ugotovili, da gastrorezistentna obloga ne ohrani svoje funkcionalnosti med tabletiranjem, tudi ob prisotnosti 10 m/m % trietil citrata. Slabe mehanske lastnosti so izboljšali z dodatkom polimera za podaljšano sproščanje EMM 30 D, ki ima boljše mehanske lastnosti. Ustrezne profile sproščanja so dosegli s filmsko oblogo, ki je zmes MAE 30 DP / EMM 30 D v razmerju 70:30 in vsebuje 10 m/m % trietil citrata. Tablete stisnjene iz pelet obložene s takšno filmsko oblogo imajo enak profil sproščanja kot nestisnjene pelete (22).

Kombiniranje več različnih polimerov za filmsko oblaganje se v literaturi pogosto pojavlja kot način izboljševanja slabih mehanskih lastnosti določenih polimerov. Sproščanje učinkovine se iz gastrorezistentne obloge v kislem mediju zmanjša iz približno 28% na 4%, če Eudragitu® L dodajo Eudragit® NE v masnem razmerju 1:1 (farmakopejska zahteva je največ 10% sproščene učinkovine). Eudragit® NE ima boljše mehanske lastnosti, ki so jih potrdili tudi z meritvami natezne trdnosti, kjer se raztezek zmesi polimerov poveča več kot 20-krat v primerjavi s samim Eudragitom® L (32). Tudi manjši dodatki Eudragit® NE lahko zagotovijo ustreznost gastrorezistence pri stiskanju pelet obloženih z Eudragit® L polimerom. V raziskavi, kjer so stiskali obložene mikropelete so optimalne rezultate dosegli z razmerjem polimerov 9:1 v korist Eudragit® L. Vplivu stiskanja na sproščanje se v celoti niso mogli izogniti, vendar je bilo sproščanje v kislem mediju še vedno varno znotraj farmakopejsko zahtevanih 10 odstotkov (24).

### 3.1.2 Vpliv blažilnih pomožnih snovi

Idealna blažilna pomožna snov naj preprečuje neposreden stik med obloženimi delci oz. njihovo polimerno oblogo (33). Pri nizki obremenitvi naj se plastično deformira in/ali lomi, saj tako lahko zasede prazne prostore med peletami. Stik med delci blažilne snovi je tisti, ki naj drži tableto skupaj. Zmanjšati ali preprečevati mora segregacijo tabletno zmesi, kar je lahko posledica podobne gostote in velikosti delcev ali posebne oblike. Deformirati se mora pri nižjih mehanskih obremenitvah kot same pelete, omogočati mora nastanek dovolj trdnih tablet pri čim nižjih silah stiskanja, zagotavljati mora hitro razpadnost tablete in ne

sme vplivati na profil sproščanja pelet (33, 34). Slika 4 prikazuje delce blažilne pomožne snovi med obloženimi peletami.



**Slika 4:** Prelom tablete stisnjene iz zmesi obloženih pelet in blažilne pomožne snovi.

**Figure 4:** Cross-section of a tablet compressed of powder mixture of coated pellets and cushioning excipient.

Kot blažilne pomožne snovi pri tabletiranju pelet se lahko uporabljajo mikrokristalna celuloza, laktoza, manitol, polietilenglikoli (PEGi), voski (npr. parafinski vosek, voskasti maltodekstrin), različni granulati in še nekatere druge snovi (3, 22).

Pelete z bisakodilom, učinkovine z laksativnim delovanjem, obložene z gastrozistentno oblogo, so stiskali z različnimi blažilnimi pomožnimi snovmi. Glede na ohranjanje gastrozistentne funkcije filmske obloge se je kot najboljša blažilna pomožna snov izkaže Cellactose® (koprosesirana pomožna snov sestavljena iz 75% laktoze in 25% MCC), pred polietilenglikolom 6000, ki sintra in MCC (Avicel PH200), razlike med njimi pa niso zelo velike. Daleč najslabša blažilna snov je kalcijev hidrogenfosfat dihidrat, za katerega je znano, da ima nizko plastičnost in se v procesu tabletiranja lomi (32). Pri tabletiranju zrn obloženih s filmsko oblogo, ki omogoča podaljšano sproščanje, se poškodbe filmske obloge večajo v naslednjem vrstnem redu: polietilenglikol 3350 < Avicel PH101 (MCC) < PVP XL (polivinilpirolidon) < laktoza < kalcijev hidrogenkarbonat dihidrat (35). Rezultati potrjujejo, da so poškodbe obloge manjše ob uporabi bolj mehkih in plastičnih blažilnih pomožnih snovi, v primerjavi z tršimi, lomljivimi in manj plastičnimi snovmi.

Ena glavnih težav, ki se pojavi pri tabletiranju pelet, kadar so prisotne še druge pomožne snovi, je segregacija tabletne zmesi. Pomožne snovi imajo manjšo velikost delcev in drugačno gostoto, zaradi česar se lahko znotraj serije pojavijo nihanja v masi in vsebnosti učinkovine (1). Pri tabletiranju gastrozistentnih pelet z bisakodilom, so ugotovili, da manjši delci blažilne snovi vodijo v bolj intenzivno segregacijo in večjo variabilnost tablet kot ob uporabi večjih blažilnih zrn (1). Nekoliko v nasprotju s tem so ugotovile Haubitz-a in sodelavcev, ki ugotovijo, da je segregacija zmesi manjša, če kot blažilno pomožno snov uporabijo Avicel PH101 (povprečna velikost 50  $\mu\text{m}$ ) v primerjavi s Cellactose® (povprečna velikost 200  $\mu\text{m}$ ) (36). V drugi raziskavi ugotovijo, da manjše granule MCC (povprečna velikost 194  $\mu\text{m}$ ) omogočijo izdelavo bolj homogenih tablet v primerjavi z večjimi granulami (povprečna velikost 1055  $\mu\text{m}$ ). Največjo homogenost ponovno omogoči Avicel PH101, razlog za to pa je njegova visoka

specifična površina in značilna oblika delcev, kar v tabletni zmesi omogoči nastanek prepletene ogrodja, ki preprečuje segregacijo pelet (37). Zaključimo lahko, da je segregacija manj izrazita, kadar s peletami kombiniramo blažilno pomožno snov, ki ima čim bolj podobno velikost delcev in gostoto s peletami, pa tudi kadar so pretočne lastnosti blažilne pomožne snovi čim slabše, ter tako kljub tendenci segregacije slednje ne dopuščajo.

Pomembno industrijsko vrednost imajo tudi raziskave o povečanju serij (angl.: scale-up), v katerih so poskuse z uporabo Avicela PH 200 kot blažilne snovi naredili z rotirko in tabletirko na udarec, ter v obeh primerih dobili po farmakopeji ustrezne tablete glede na enakomernost mase in vsebnosti. Rezultati dokazujejo, da je tehnologijo tabletiranja obloženih pelet možno prenesti v industrijsko merilo (1, 37).

Kot blažilne pomožne snovi je mogoče uporabiti tudi mehke snovi, kot so voski in drugi podobni materiali. Pelete z učinkovino diltiazem (antihipertenziv, zaviralec kalcijevih kanalčkov) obložene s filmsko oblogo za podaljšano sproščanje so zaščitili z delci iz parafinskega voska in voskastega maltodekstrina. Ugotovili so, da se voskasti blažilni delci ustrezno deformirajo namesto obloženih pelet, vendar hkrati močno podaljšajo čas razpadnosti tablete in sproščanje še dodatno upočasnijo. Bistven vpliv na razpadnost ima velikost blažilnih delcev, če so delci mehke blažilne snovi majhni, nastanejo tablete nizke poroznosti, v katere voda le počasi prodira in čas razpadnosti se ustrezno podaljša. Prepočasno razpadnost rešijo z nadomestitvijo maltodekstrina z zmesjo koruznega voska in natrijevega karboksimetilškroba, ki se uporablja kot razgrajevalo. Z uporabo takšne blažilne snovi dosežejo s stiskanjem obloženih pelet v tableto enak profil sproščanja kot pri nestisnjenih peletah (3).

Zanimiv primer najdemo v patentni literaturi, kjer so tableto stisnili iz treh različnih vrst pelet: i) z etil celulozo obloženih pelet, ki so vsebovale učinkovino; ii) deformabilnih mehkih pelet in iii) razgrajevalnih pelet. Deformabilne mehke pelete so sestavljene iz glicerilmonostearata, barijevega sulfata in MCC. Tabletiranje le v manjši meri spremeni profil sproščanja, za zagotavljanje ustrezne trdnosti in krušljivosti pa je potrebna vsaj 30 m/m % vsebnost deformabilnih pelet. Tudi razgrajevalne pelete se izkažejo kot učinkovite, saj so časi razpadnosti krajši od 2 minut (38). Podobne deformabilne mehke pelete sestavljene iz koruznega škroba, razgrajevala in mikrokristaliničnega voska (zmes tekočih in trdnih ogljikovodikov, kemijsko podobna struktura parafinu, le verige so razvejane). Pri tabletiranju pelet z oblogo za podaljšano sproščanje ugotovijo, da približno 40 m/m % blažilnih pelet skoraj popolnoma ohrani profil sproščanja diltiazema (39).

Težava z na tlak občutljivimi snovmi, kot so obložene pelete, je sicer širša. Obstajajo učinkovine, ki pri tabletiranju spremenijo (psevdo)polimorfno obliko, kot npr. indometacin ali teofilin monohidrat. Proces stiskanja je lahko problematičen tudi za makromolekule, ki jih lahko tak proces poškoduje in inaktivira. V zadnjih letih se je pojavil tudi popolnoma drugačen koncept tabletiranja takšnih snovi, t.i. mehko tabletiranje (angl.: soft tableting). Od blažilnih delcev običajno pričakujemo, da so bolj plastični od pelet in se bodo deformirali namesto pelet, medtem ko so pri mehkem tabletiranju zaželene čim bolj elastične blažilne pomožne snovi. Če se blažilna snov, ki se nahaja okoli obložene pelete, deformira elastično, se lokalni tlak porazdeli po večjem volumnu tablete, zato se na tlak občutljive snovi manj



deformirajo. Za zmanjšanje lokalnega tlaka na enem mestu so primerjali učinek elastičnih karagenanov z MCC, ki je tipična plastična blažilna pomožna snov. Uporaba karagenanov močno zmanjša poškodbe gastrorezistentne obloge pri tabletiranju pelet s teofilinom, kot bolj učinkovit se izkaže -karagenan, pred -karagenanom, oba pa sta boljša pri preprečevanju poškodb od Avicela PH101 (40).

### 3.1.3. Vpliv sile stiskanja in deleža vgrajenih pelet

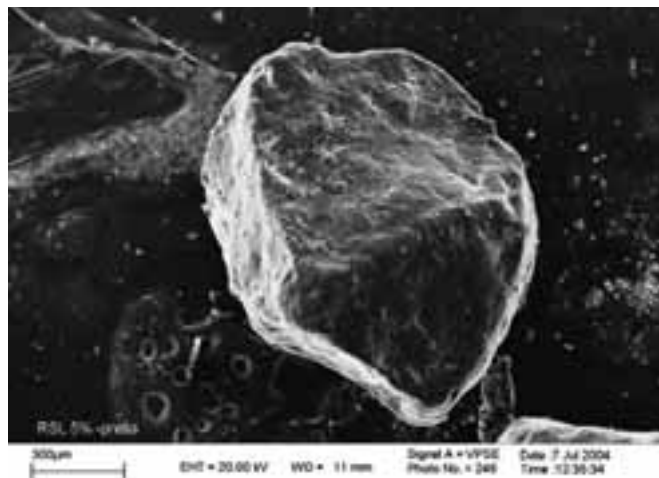
Vpliv sile stiskanja so proučevali preko vpliva na profil sproščanja, ki se spremeni takrat, kadar pri tabletiranju pride do poškodbe filma zaradi neposrednega stika pelet z od sebe tršo snovjo. To se lahko zgodi na površini tablete, kjer pelete prihajajo v stik s pečatom ali pa v notranjosti tablete, kjer pelete prihajajo v stik ena z drugo. Pri deležu pelet do 30 m/m % se deformacije obloge pojavljajo le na površini tablete, zaradi stika pelet s pečatom, višji delež pelet pa poveča poškodbe obloge zaradi stika med peletami (32, 34). Največji volumski delež pelet v zmesi, ob predpostavki, da so idealne sferične oblike, znaša 71%, zato višje deleže ni smiselno tabletirati, če želimo ohraniti njihovo obliko in funkcionalnost obloge (37). Delež pelet v zmesi za tabletiranje lahko močno vpliva na enakomernost mase in vsebnost, več literaturnih virov poroča o optimalnem deležu pelet med približno 30 in 70 m/m % (22, 32, 41). Nižji deleži pelet povečajo nihanja v masi in vsebnosti, višji pa povečajo možnost poškodb obloženih pelet zaradi neposrednega stika med peletami.

Gastrorezistentno obložene pelete z učinkovino piroksikam (nesteroidni antirevmatik) so tabletirali z uporabo voskastih blažilnih snovi. S faktorsko analizo so proučevali številne lastnosti tablet kot so trdnost, krušljivost, razpadnost in vpliv na sproščanje. Ugotovili so, da so trdnost, krušljivost in razpadnost tablet najbolj odvisni od razmerja pelet piroksikama in voskastih blažilnih snovi. Večji delež mehkih blažilnih delcev vodi v manjšo trdnost in krušljivost ter počasnejši razpad farmacevtske oblike (41).

Stiskanje gastrorezistentnih mikropelet (premer približno 300  $\mu\text{m}$ ) z učinkovino lansoprazol so proučevali z uporabo manitola kot glavne blažilne pomožne snovi. Namen je bil izdelava realne orodisperzibilne večnotne tablete, raziskava pa je rezultirala v več objavah in podeljenem patentu (24, 42, 43, 44). Preizkusili so tri različne deleže mikropelet (37,5; 47,4 in 64,3 m/m %), kot najboljši se izkaže srednji delež mikropelet. Pri nizki vsebnosti mikropelet je problematičen dolg razpadni čas, pri visoki vsebnosti pa nizka trdnost in povečano sproščanje v kislem mediju, zaradi izgube gastrorezistence kot posledice poškodovane obloge. Pri proučevanju vpliva tlaka stiskanja v območju od 200 do 300 MPa pričakovano ugotovijo, da se trdnost s tlakom stiskanja povečuje, razpadni čas pa podaljšuje. V preiskovanem območju tlaka stiskanja ne opazijo razlik v profilih sproščanja iz stisnjenih tablet (43).

Vpliv sile stiskanja so proučevali tudi na gastrorezistentnih peletah, ki so vsebovale učinkovino bisakodil. Različne zmesi pelet in blažilnih snovi so tabletirali pri silah v razponu od 5 kN do 25 kN (premer pečata 10,0 mm). Ugotovili so le minimalen vpliv sile stiskanja na profil sproščanja. Pri deležu pelet 50 m/m % pride pri vseh uporabljenih blažilnih pomožnih snoveh in vseh silah stiskanja do izgube gastrorezistence. Bistveno večji vpliv kot sila stiskanja imata delež pelet in vrsta uporabljenega blažilne snovi (32). Tudi kombinacija MCC/polietilenglikol 4000/PVP XL omogoči nastanek tablet, katerih

sproščanje je neodvisno od sile stiskanja, se pa vseeno pojavi majhno odstopanje sproščanja v primerjavi z nestisnjenimi peletami, obloženimi z oblogo za podaljšano sproščanje. Slike elektronskega vrstičnega mikroskopa (slika 5) razkrijejo idealno plastično deformacijo pelet in ohranitev zvezne obloge. Majhno razliko v profilu sproščanja avtorji pripisujejo bodisi stanjšanju filmske obloge zaradi stiskanja ali pa povečanju specifične površine obloženih pelet zaradi plastične deformacije (23).



**Slika 5:** SEM slika plastično deformirane obložene pelete po stiskanju s silo 15 kN (32).

**Figure 5:** SEM picture of plastically deformed coated pellet after compression at 15 kN (32).

Tudi drugi raziskovalci so proučevali vpliv sile stiskanja na sproščanje pelet, stisnjenih v tablete. V primeru oblaganja pelet z etil celulozno oblogo so ugotovili ravno nasprotno in sicer, da stiskanje bistveno spremeni profil sproščanja. Pri višjih silah opazijo hitrejše sproščanje zaradi bolj poškodovane obloge. Tudi pri nizkih silah in visokem deležu mehčala (25%) ni mogoče preprečiti poškodb obloge in posledičnega vpliva na sproščanje (22).

Neodvisnost sproščanja učinkovine od sile stiskanja lahko pomeni, da že pri najnižjih silah stiskanja dosežemo maksimalne poškodbe filmske obloge. Možno je tudi, da uporabljeni pogoji (npr. vrsta in debelina obloge, delež mehčala, itd) niso dovolj diskriminatorni, da bi se pojavile razlike s povečanjem sile stiskanja, saj so nekatere druge raziskave (45, 46) pokazale pomemben vpliv sile stiskanja na zmanjšanje funkcionalnosti filmskih oblog.

### 3.1.4. Ostali vplivi

Na tabletiranje lahko vplivajo tudi lastnosti peletnega jedra. Ugotovili so, da se pri tabletiranju pelet učinkovina hitreje sprošča iz mehkih peletnih jeder, saj trda zaradi boljših mehanskih lastnosti lažje vzdrži tlake ob tabletiranju brez poškodb na oblogi (32). Pri bolj poroznih peletnih jedrih so tudi opazili večjo spremembo oblike pelet pri stiskanju, kot pri manj poroznih peletnih jedrih (45, 47). Kljub večji deformaciji, pa se profili sproščanja manj spremenijo pri bolj poroznih jedrih, v primerjavi z manj poroznimi (45). Najbolj smiselna se zdi uporablja trdih in hkrati poroznih peletnih jeder, čeprav sta si obe

lastnosti nekoliko nasprotujoči. Če tabletiramo manj porozna jedra, ki ne zagotavljajo ustrezne stisljivosti, lahko to kompenziramo z dodatkom zelo stisljivih pomožnih snovi.

Lomljenje filmske obloge lahko zmanjšamo tudi z dodatno zaščitno oblogo. Tabletiranje pelet obloženih s celulozno acetat butirat filmsko oblogo močno spremeni profile sproščanja pelet, saj je obloga preveč lomljiva. Vpliv tabletiranja na sproščanje se zmanjša ob nanosu dodatne HPMC zaščitne obloge (448). Podobna primera najdemo v patentni literaturi, kjer stiskajo gastrorezistentne pelete z inhibitorjema protonske črpalke. Z zaščitno HPMC oblogo dosežejo v primeru omeprazola 7% sproščanje v kislem, v primeru lansoprazola pa 5% sproščanje (zahteva: manj kot 10% sproščene učinkovine) (49, 50). Srečamo tudi primere, kjer se kot polimeri za dodatno zaščitno oblogo uporabljajo poletilenglikoli, najpogosteje PEG 6000 (51).

Na poškodbe etilcelulozne filmske obloge vpliva tudi velikost obloženih pelet. Manj poškodb so ugotovili pri manjših peletah (0,44 mm), kot pri večjih peletah (0,85 mm) (52). Profil sproščanja ob tabletiranju manjših pelet (0,6 mm) se spremeni manj kot ob tabletiranju večjih pelet (1,0 mm) (48). Tudi debelejša filmska obloga je bolj zaželeno pri tabletiranju pelet, saj lahko pelete z debelejšo oblogo bolj stisnemo, preden pride do izgube zveznosti filma. Debelejša obloga ima tudi večjo mehansko trdnost ter tako lažje absorbira aplicirano silo in ščiti obložene delce (2, 46, 48).

## 4 Trdnost in krušljivost tablet kot večnotne farmacevtske oblike

Tudi tablete kot večnotne farmacevtske oblike morajo izpolnjevati farmakopejske pogoje med katere štejemo: enakomernost mase, enakomernost vsebnosti, krušljivost, razpadnost in raztapljanje. Poleg nizke trdnosti lahko težavo povzroča tudi visoka krušljivost, ki pa jo lahko kompenziramo z uporabo višjih sil stiskanja ali dodatkom suhih veziv. Dejanske vrednosti trdnosti in krušljivosti najdemo v le redkih literaturnih virih. Vrednosti tudi zelo težko direktno primerjamo, saj gre običajno za različne filmske obloge, deleže pelet, blažilne pomožne snovi in sile stiskanja. V večini raziskav so stisnili tablete s trdnostjo od 50 do 193 N in krušljivostjo od 0,3 do 0,5 % (1, 23, 32, 37, 53). Fizikalne lastnosti tablet se še dodatno izboljšajo, če zmes blažilnih pomožnih snovi pred tabletiranjem granuliramo z zmesjo etanola in vode do nastanka zelo poroznega in rahlega granulata. Takrat pri sili stiskanja 10 kN dobijo tablete s trdnostjo 145 N, krušljivostjo 0,05 % in razpadnim časom 3 minute (23). Še posebej težavno je tabletiranje z mehкими blažilnimi snovmi (voskaste snovi), kjer je trdnost tablet neodvisna od sile stiskanja v območju od 10 do 30 kN (premer pečata 12,0 mm) in znaša skromnih 15 do 25 N. Po drugi strani, pa je krušljivost tablet odvisna od sile stiskanja in ob uporabi več kot 55% voskastih blažilnih delcev, znaša pri vseh silah stiskanja skoraj 0%. Razpadnost je bila neproblematična, saj so vse formulacije razpadle v manj kot 6 minutah (41).

Znani so tudi primeri stiskanja brez uporabe blažilnih pomožnih snovi, kjer se trdnost tablet iz obloženih pelet poveča v primerjavi z neobloženimi peletami. Do tega pride zaradi fuzije filmske obloge, ki v primerjavi s peletnim jedrom tvori močnejše vezi (54), kar pa s stališča razpadnosti in ohranitve nadzorovanega sproščanja obloge ni

zaželeno. Kljub izdelavi ustreznih tablet se moramo zavedati, da je tabletiranje obloženih pelet zahteven, vendar obvladljiv proces za strokovnjaka s področja tabletiranja.

## 5 Zaključek

Uspešnost stiskanja obloženih pelet v tablete je močno odvisna od več dejavnikov. Ena najbolj bistvenih lastnosti filmske obloge je njena mehanska odpornost. S krhkimi polimeri bomo imeli pri tabletiranju več težav kot s tistimi, ki se raztegujejo in plastično deformirajo brez lomljenja. Priporočena je uporaba akrilnih polimerov saj so bolj fleksibilni v primerjavi s celulozni polimeri, ki so bolj krhki. Uporaba mehčala je zaželeno za izboljšanje mehanskih lastnosti obloge, vendar se pri visokih deležih lahko pojavijo težave s funkcionalnostjo obloge ali aglomeracijo med procesom oblaganja. Debelejše obloge so bolj zaželene pri tabletiranju filmsko obloženih pelet, saj se težje deformira ali pretrga v primerjavi s tanko oblogo.

Deformacijo pelet lahko zmanjšamo tudi z dodatkom blažilnih pomožnih snovi, ki pa naj bodo bolj plastične od pelet. Tako se bodo pri tabletiranju delci blažilne snovi lomili in plastično deformirali ter tako zasedli prostore med peletami. Tako so možnosti za direktno stik med peletami zmanjšane, s tem tudi možnosti za izgubo funkcionalnosti filmske obloge. Alternativno lahko, kot blažilne pomožne snovi uporabimo elastične snovi, ki zmanjšajo lokalne tlake in ublažijo poškodbe filmskih oblog, ter tako izvedemo t.i. mehko tabletiranje.

Uspešnost stiskanja obloženih pelet v tablete je odvisna tudi od deleža pelet v zmesi. Višji delež pelet poveča možnost stika med peletami in poškodbo njihove obloge, ter vodi v tablete z nizko trdnostjo. Po drugi strani pa višji delež pelet izboljša enakomernost mase in enakomernost vsebnosti pri tabletiranju. V večini primerov se izkaže približno 40 – 60 m/m % pelet v zmesi kot najboljši kompromis.

Tabletiranje obloženih pelet je smiselno pri čimnižjih silah stiskanja, saj bodo takrat funkcionalne poškodbe obloge najmanjše, vendar se lahko pri zelo nizkih silah stiskanja soočimo z nizko trdnostjo in visoko krušljivostjo tablet.

## 6 Literatura

1. Beckert TE, Lehmann K, Schmidt PC. Compression of enteric-coated pellets to disintegrating tablets: uniformity of dosage units. *Powder Technol* 1998; 96: 248–254.
2. Bérchard SR, Leroux JC. Coated pelletized dosage form: effect of compaction on drug release. *Drug Dev Ind Pharm* 1992; 18: 1927–1944.
3. Vergote GJ, Kiekens F, Vervae C, Remon JP. Wax beads as cushioning agents during the compression of coated diltiazem pellets. *Eur J Pharm Sci* 2002; 17: 145–151.
4. Sandberg A, Ragnarsson G, Jonsson UE, Sjögren J. Design of a New Multiple-Unit Controlled-Release Formulation of Metoprolol - Metoprolol CR. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; 33, Supplement 1: 3–7.
5. Petersen KU, Schmutzler W. Proton pump inhibitors. Active substance release from different preparations. *Deutsche Apotheker Zeitung* 1999; 139: 64–65.
6. Ghebre-Sellassie I. Pellets: A general overview. v: Ghebre-Sellassie I. *Pharmaceutical Pelletization Technology*, Marcel Dekker, New York, 1989: 1-13.
7. Ghebre-Sellassie I, Knoch A. *Pelletization Techniques*. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York, 2007: 2651-2663.

8. Sonaglio D, Bataille B, Ortigosa C, Jacob M. Factorial design in the feasibility of producing Microcel MC 101 pellets by extrusion/spheronisation. *Int J Pharm* 1995; 115: 53–60.
9. Clarke GM, Newton JM, Short MB. Comparative gastrointestinal transit of pellet systems of varying density. *Int J Pharm* 1995; 114: 1–11.
10. Lundqvist ČEK, Podczeck F, Newton JM. Influence of disintegrant type and proportion on the properties of tablets produced from mixtures of pellets. *Int J Pharm* 1997; 147: 95–107.
11. Singh SK, Naini V. Dosage Forms: Non-Parenterals. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York, 2007: 988-992.
12. Chien YW, Lin S. Drug Delivery: Controlled Release. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York, 2007: 1082.
13. Felton LA. Film Coating of Oral Solid Dosage Forms. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York, 2007: 1729-1737.
14. Dimnik A, Kerč J. Gastrorezistentne obloge za trdne farmacevtske oblike. *Farm Vestn* 2004; 55: 35–42.
15. Carstensen JT. *Advanced Pharmaceutical Solids*, Marcel Dekker, New York, 2001: 387-426.
16. Bogda MJ. Tablet Compression: Machine Theory, Design, and Process Troubleshooting. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York, 2007: 3611-3614.
17. Srčić S, Dreu R. Vaje iz Industrijske farmacije. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005: 31-39.
18. Hermelin VM. Timed release pharmaceutical preparations and method of making the same. U.S. patent 3,115,441, 1963.
19. Hsiao CH. Sustained release quinidine dosage form. U.S. patent 4,634,587, 1987.
20. Hsiao CH, Chou T. Controlled release potassium chloride. U.S. patent 4,863,743, 1989.
21. Hsiao CH. Aspirin tablet. U.S. patent 4,555,399, 1985.
22. Dashevsky A, Kolter K, Bodmeier R. Compression of pellets coated with various aqueous polymer dispersions. *Int J Pharm* 2004; 279: 19–26.
23. Abbaspour MR, Sadeghi F, Afrasiabi Garekani H. Design and study of ibuprofen disintegrating sustained-release tablets comprising coated pellets. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 747–759.
24. Shimizu T, Nakano Y, Morimoto S, Tabata T, Hamaguchi N, Igari Y. Formulation Study for Lansoprazole Fast-disintegrating Tablet. I. Effect of Compression on Dissolution Behavior. *Chem Pharm Bull* 2003; 51: 942–947.
25. Lehmann K. Chemistry and application properties of polymethacrylate coating systems. v: McGinity JW. *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, Marcel Dekker, New York, 1997: 101–176.
26. Bodmeier R, Paeratakul O. Mechanical properties of dry and wet cellulosic and acrylic polymer films prepared from aqueous colloidal polymer dispersions. *Pharm Res* 1994; 11: 882–888.
27. <http://www.pharma-solutions.basf.com/coatings.aspx>, dostopano: maj, 2009.
28. <http://www.pharma-polymers.com/pharmapolymers/en/eudragit/>, dostopano: maj, 2009.
29. <http://www.colorcon.com/products/coatings>, dostopano: maj, 2009.
30. <http://www.metolose.jp/e/pharmaceutical/index.shtml>, dostopano: maj, 2009.
31. <http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceuticals/tabid/500/Default.aspx>, dostopano: maj, 2009.
32. Beckert TE, Lehmann K, Schmidt PC. Compression of enteric-coated pellets to disintegrating tablets. *Int J Pharm* 1996; 143: 13–23.
33. Bodmeier R. Tableting of coated pellets. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 43: 1–8.
34. Aulton ME, Dyer AM, Khan KA. The strength and compaction of millispheres. *Drug Dev Ind Pharm* 1994; 20: 3069–3104.
35. Torrado JJ, Augsburg LL. Effect of different excipients on the tableting of coated particles. *Int J Pharm* 1994; 106: 149–155.
36. Haubitz H, Mehnert W, Frömming K-H. Preparation of teophylline multiple units tablets. *Pharm Ind* 1996; 58: 83–86.
37. Wagner KG, Krumme M, Schmidt PC. Investigation of the pellet-distribution in single tablet via image analysis. *Eur J Pharm Biopharm* 1999; 47: 79–85.
38. Newton JM. Preparation of tablets comprising a combination of active pellets, deformable pellets and disintegrating pellets. PCT WO 97/25029, 1997.
39. Remon JP. Cushioning wax beads for making solid shaped articles. U.S. patent 6,923,984, 2005.
40. Picker KM. »Soft Tableting«: A New Concept to Tablet Pressure-Sensitive Materials. *Pharm Dev Technol* 2004; 9: 107–121.
41. Debusse A, Vervaet C, Mangelings D, Remon JP. Compaction of enteric-coated pellets: influence of formulation and process parameters on tablet properties and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 305–314.
42. Shimizu T, Kameoka N, Iki H, Tabata T, Hamaguchi N, Igari Y. Formulation Study for Lansoprazole Fast-disintegrating Tablet. II. Effect of Triethyl Citrate on the Quality of the Products. *Chem Pharm Bull* 2003; 51: 1029–1035.
43. Shimizu T, Sugaya M, Nakano Y, Izutsu D, Mizukami Y, Okochi K, Tabata T, Hamaguchi N, Igari Y. Formulation Study for Lansoprazole Fast-disintegrating Tablet. III. Design of Rapidly Disintegrating Tablets. *Chem Pharm Bull* 2003; 51: 1121–1127.
44. Shimizu T, Morimoto S, Tabata T. Orally disintegrating tablets. U.S. patent 6,328,994, 2001.
45. Tunón C, Grósjó J, Alderborn G. Effect of intragranular porosity on compression behaviour of and drug release from reservoir pellets. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19: 333–344.
46. Lundqvist ČEK, Podczeck F, Newton JM. Compaction of, and drug release from, coated drug pellets mixed with other pellets. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 46: 369–379.
47. Johansson B, Alderborn G. Degree of pellet deformation during compaction and its relationship to the tensile strength of tablets formed of microcrystalline cellulose pellets. *Int J Pharm* 1996; 132: 207–220.
48. Haslam JL, Forbes AE, Rork GS, Pipkin TL, Slade DA, Khosravi D. Tableting of controlled release multiparticulates, the effect of millisphere size and protective overcoating. *Int J Pharm* 1998; 173: 233–242.
49. Depui H. Oral pharmaceutical dosage forms comprising a proton pump inhibitor and an antacid agent or alginate. PCT WO 97/25066, 1997.
50. Bergstrand PJA, Lövgren KI. Multiple unit pharmaceutical preparation containing proton pump inhibitor. EP 0 723 437, 1996.
51. Kumar P, Jain GK, Rampal A, Niithyanandam R, Ramakrishnan S, Raghuvanshi RS. Modified release, multiple unit drug delivery systems. PCT WO 03/103637, 2003.
52. Ragnarsson G, Sandberg A, Jonsson UE, Sjögren J. Development of a new controlled release metoprolol product. *Drug Dev Ind Pharm* 1987; 13: 1495–1509.
53. El-Mahdi IM, Deasy PB. Tableting of coated ketoprofen pellets. *J Microencapsul* 2000; 17: 133–144.
54. Maganti L, Çelik M. Compaction studies on pellets: II. Coated pellets. *Int J Pharm* 1994; 103: 55–67.

# Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija

## Erythropoietin, epoetins and detection

Klemen Španinger, Nataša Debeljak

**Povzetek:** Eritropoetin (EPO) je endogeni hormon, ki se sintetizira v posebnih epitelnih celicah v renalnih peritubulnih kapilarah. Je glavni faktor, ki vpliva na eritropoezo pri ljudeh in živalih. Glavna sinteza EPO poteka v ledvicah (90 %) nekaj pa ga sintetizirajo tudi jetra in možgani (10 %). Rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO), ki se uspešno uporablja v medicini, je prišel na tržišče v začetku devetdesetih let. Izboljšal je življenjski status bolnikov z ledvično odpovedjo in bolnikov z anemijami, ki so bili pred tem odvisni od transfuzij krvi. Vendar so po njem posegli tudi športniki različnih panog zaradi njegovega pozitivnega učinka pri premagovanju fizičnih naporov. EPO deluje kot vzpodbujevalec nastajanja rdečih krvnih celic in s tem poveča dostavo kisika v mišična tkiva. Zaradi tega ga je Mednarodni Olimpijski Komitee leta 1987 uvrstil na seznam prepovedanih substanc v športu. Vendar pa sama tehnologija detekcije in ločevanja endogenega in eksogeno vnesenega EPO ni bila dostopna vse do leta 2000, ko so prvič uporabili metodo izoelektričnega fokusiranja oziroma IEF. Problem detekcije rHuEPO je njegova kompleksnost in velika strukturna podobnost naravnemu endogenemu EPO. Poleg tega je koncentracija EPO v človeških tekočinah zelo nizka.

**Abstract:** Erythropoietin (EPO) is an endogenous hormone synthesized in special epithelial cells in renal peritubular capillaries. It is the main factor in human and animal erythropoiesis. EPO is synthesised in kidney (90 %) and some in liver and other organs like brain (10 %). Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) used in medicine, was introduced to the market in early nineties. rHuEPO improved quality of life of patients with kidney failure and anaemic patients, which were receiving blood transfusion. However, because of its positive influence some athletes from different sports abuse it. EPO acts as a stimulus for production of red blood cells, leading to more efficient oxygen delivery to muscles. Therefore the International Olympic Comity banned it in 1987. Detection method that could differentiate between endogenous and exogenous EPO was developed in 2000, when the method called isoelectric focusing (IEF) was first used. The problem of detection of rHuEPO is its complexity and structural similarity to endogenous EPO and also the low concentration of EPO in human blood and urine.

## 1 Endogeni eritropoetin

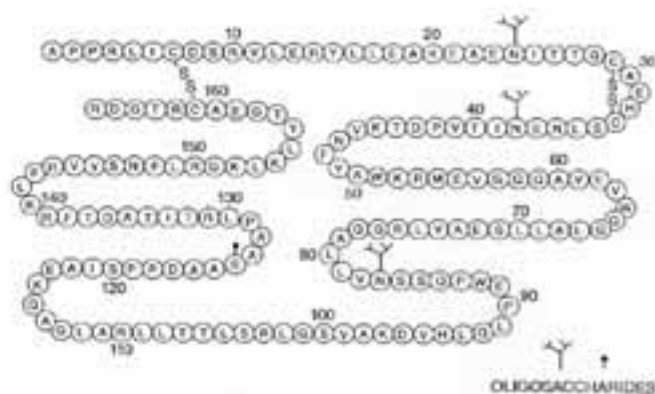
Eritropoetin (EPO) je glikoprotein z molekularno maso med 30-39 kDa. Glavno mesto sinteze endogenega EPO so ledvične celice (1, 2). Stimulus za samo sintezo EPO je hipoksija v tkivih. Povečana sinteza EPO v hipoksičnih ledvicah je dosežena tako, da se rekrutira večje število celic, ki sintetizirajo EPO protein. Celice, ki sintetizirajo EPO so podvrsta kortiko-intersticijskih celic (3). Sintetizira se v obliki prohormona s 193 dolgim aminokislinskim zaporedjem. Po cepitvi 27 aminokislinskega peptida z N-terminalnega konca in odstranitvi R166 na C-terminalnem koncu med postranslacijsko modifikacijo nastane končna oblika EPO; 165 aminokislinski protein v velikosti 30-34 kDa (4). EPO ima dve intramolekularni disulfidni vezi (C7-C161 in C29-C33) in 4 neodvisne sladkorne verige pripete na asparaginske ali serinske aminokislinske ostanke. Primarna struktura EPO je predstavljena na sliki 1. Polisaharidi predstavljajo kar 40 % molske mase proteina. Tri N-glikozidno vezane sladkorne verige na asparaginih (N24, N38 and N83) so pomembne pri biološki vlogi hormona *in vivo*, kot so biosinteza, sekrecija ter stabilizacija v obtoku. O-glikozidno vezana veriga na serinu (S126) nima znane vloge (5, 6). Polisaharidi so tudi pomembni dejavnik detekcije rHuEpa v krvi.

Izražanje EPO mRNA in proteina samega je uravnavano predvsem na nivoju transkripcije. Glavni regulator transkripcije je hipoksija. V regulacijo so vključeni transkripcijski faktorji GATA-2, NF-kappaB (negativna regulacija) ter HIF-2 in HNF-4alpha (pozitivna regulacija) (7, 8).

EPO je član citokinske družine, v katero spadajo rastni hormon, prolaktin, interleukini 2 do 7, granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (G-CSF) in drugi (9). Čeprav imajo ti proteini majhno sekvenčno homologijo, pa imajo podobno število eksonov in podobno strukturno obliko proteina. Imeli naj bi globularno obliko sestavljeno iz 4 alfa heliksov (9).

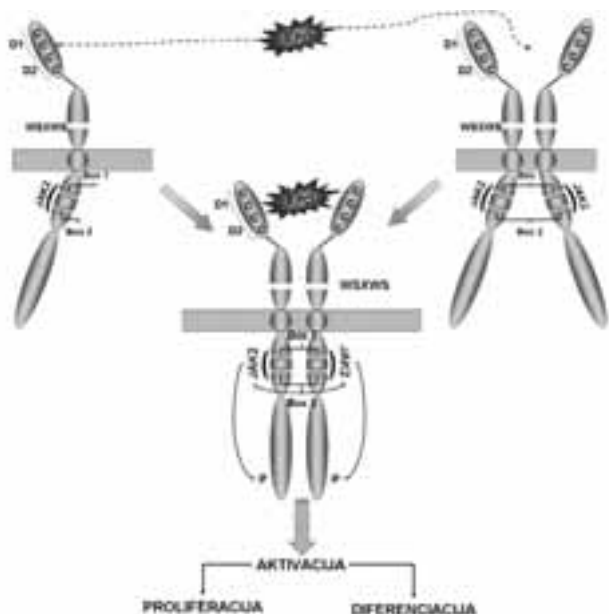
EPO se iz krvnega obtoka prenese v rdeči kostni mozeg. Povečano število eritrocitov opazimo 1 do 2 dni po tistem, ko se koncentracija EPO v plazmi zviša. Razpolovni čas EPO v krvnem obtoku je 6 do 8 ur (10, 11). EPO deluje na izvorne eritroidne celice (BFU-E; erythroid burst-forming units in CFU-E; erythroid colony-forming units). Te celice imajo posebne eritropoetinske receptorje (EPO-R). EPO-R je transmembranski glikoprotein z molekularno maso 55,2 kDa (12). Spada v družino citokinskih receptorjev in receptorjev za rastne faktorje. EPO po vezavi na EPO-R poveča možnost preživetja celice in s tem omogoči njeno nadaljnjo diferenciacijo v zrel eritrocit,





**Slika 1:** Primarna struktura EPO. Predstavljene sta dve disulfidni vezi, eno O- ter tri N- glikozilacijska mesta. Z dovoljenjem objavljeno po (5).

**Figure 1:** Primary structure of EPO. Shown are two disulfide bonds, one O- and three N-glycosylation sites. Published with permission (5).



**Slika 2:** Shema vezave eritropoetina na eritropoetinski receptor. Predlagani sta dve teoriji vezave EPO na EPO-R. Prva govori o tem, da se EPO veže na monomer, po vezavi EPO se na ta kompleks veže drugi monomerni EPO-R. Tako se tvori aktiviran dimer (slika 2 levo) (14). Druga teorija pa govori o že formiranem EPO-R dimeru, ki se aktivira ob vezavi EPO (slika 2 desno) (15).

**Figure 2:** Binding of erythropoietin to erythropoietin receptor. There are two possible theories of binding. The first theory proposes binding of EPO on monomer. After the binding another monomer of EPO-R binds to the complex. This forms an active dimer (figure 2 left) (14). Second theory is that EPO-R is already a formed dimer, which is activated after EPO binding (figure 2 right) (15).

sposoben prenosa kisika v tkiva. Ena molekula EPO se veže na dve molekuli EPO-R (Slika 2).

EPO in EPO-R sta prisotna tudi v nekrvotvornih tkivih, kot so možgani, jetra, srce, endotelijske celice, itd. EPO ima v omenjenih organih zaščitno vlogo, spodbuja celično delitev ter celice ščiti pred apoptozo. Mutacije EPO-R receptorjev v nekrvotvornih tkivih povezujejo z določenimi boleznimi (anemije, renalni rak) (13).

## 2 Rekombinantni eritropoetin

Humani rekombinantni eritropoetin (rHuEPO) se pridobiva tako, da cDNA za EPO vstavijo v genom ene izmed celičnih linij. Največkrat je to linija kitajskega hrčka (ovarijske celice kitajskega hrčka - chinese hamster ovary cells, CHO) (pridobivanje epoetina, epoetina  $\beta$  in darbepoetina) ali pa linija hrčka (Baby Hamster Kidney, BHK) (pridobivanje epoetina). Ti dve liniji omogočata pravilno tvorbo disulfidnih vezi ter glikozilacijo proteina, ki je pomembna za njegovo biološko funkcijo. Tako sintetiziran rHuEPO je v primerjavi z endogenim EPO identičen na nivoju peptidnega zaporedja, vendar pa je heterogen na nivoju pripetih sladkorjev. Klasifikacija epoetinov (epoetin alfa, epoetin beta, epoetin omega) temelji na metodi sinteze in pridobivanja rHuEPO. Čeprav se protein glikozilira v obeh celičnih linijah (CHO in BHK) in je glikozilacija zelo podobna kot pri endogenemu EPO, pa nekateri deli proteina ostanejo neglikozilirani zaradi odsotnosti specifičnih glukotransferaz (16).

Trenutno rHuEPO proizvajajo različni proizvajalci v različnih oblikah: epoetin  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\omega$  in darbepoetin (11). Ker se rHuEPO proizvaja s strani različnih proizvajalcev, v različnih delih sveta po različnih postopkih, z različnimi reagenti in materiali, se ti epoetini med seboj razlikujejo po glikozilaciji, kljub temu da se uporabljajo iste celične linije.

CERA in NESP sta modificirana epoetina, ki imata povečano biološko aktivnost. V razvoju je več novih oblik rHuEPO in eritropoezo stimulirajočih zdravil (17).

## 3 Epoetin alfa in epoetin beta

rHuEPO  $\alpha$  in  $\beta$  sta na nivoju peptidnega zaporedja enaka endogenemu EPO, z manjšo razliko na nivoju pripetih sladkorjev. rHuEPO  $\alpha$  je bil prvi komercialno dostopen rekombinantni epoetin leta 1985 v ZDA. Tako epoetin  $\alpha$  kot epoetin  $\beta$  sta sintetizirana v CHO. Primerjava biološke aktivnosti epoetina  $\beta$  in  $\alpha$  je pokazala, da je biološko bolj aktiven oziroma potenten epoetin  $\beta$ . Prav tako pa se epoetini razlikujejo v svojih izoformah. Razlike so posledica že predhodno omenjenih razlik v glikozilaciji (16). Tako lahko pri epoetinu  $\beta$  pri analizi IEF opazimo eno izoformo več v bazičnem območju kot pri epoetinu  $\alpha$ , kar mu daje tudi bolj bazične lastnosti (Slika 5: epoetin  $\beta$  in epoetin  $\alpha$ ).

Poleg razlike v biološki aktivnosti in razlike v strukturi, je razlika med epoetinom  $\alpha$  in epoetinom  $\beta$  tudi v farmakokinetičnih in farmakodinamičnih profilih (18). Zanimiv podatek je tudi, da so prostovoljci, ki so prejeli epoetin  $\alpha$  v 56 % poročali o bolečini po subkutani aplikaciji, za razliko od tistih, ki so dobili epoetin  $\beta$ , ki so bolečino čutili v 5,6 % (18). Vendar pa si to lahko razlagamo z dejstvom, da sta pripravka vsebovala različne pomožne snovi, ki bi lahko vplivale na ta pojav (19, 20).

Na trgu se je pojavil tudi epoetin  $\zeta$ , ki je biološko primerljivo zdravilo epoetinu  $\alpha$ . Izoliran je, kot epoetin  $\alpha$ , iz CHO celic. Zaradi spremenjene poti sinteze, se razlikuje od epoetina  $\alpha$  po profilu glikozilacije. To je razvidno tudi pri analizi z izoelektričnim fokusiranjem kjer vidimo močnejši signal prve lise (Slika 5: epoetin  $\zeta$ ).

V nadaljevanju so podrobneje predstavljeni epoetini, ki so bili spremenjeni z namenom večje biološke aktivnosti in razpoložljivosti, to so NESP, CERA in epoetin  $\delta$ .

### 4 NESP - oblika epoetina $\alpha$

Darbepoetin  $\alpha$  oziroma NESP (new erythropoiesis stimulating protein) je oblika epoetina  $\alpha$ , ki ima daljšo razpolovno dobo v primerjavi z ostalimi epoetini (razen CERA). NESP ima mutiranih pet aminokislin, kar omogoča vezavo dveh dodatnih N-glikoziliranih verig na mesto N30 in N88. Tako NESP vsebuje 5 N-vezanih verig ogljikovodikov in do 22 sialičnih kislin, s čemer se delež molske mase polisaharidov poveča na 51 % (21). Za primerjavo z ostalimi rHuEPO, ki imajo 3-N vezane ogljikovodikove verige in največ 14 sialičnih kislin ter 40 % delež polisaharidov. Dodatne ogljikove verige zmanjšajo afiniteto darbepoetina do EPO receptorja, podaljšajo serumski razpolovni čas ter povečajo biološko aktivnost. Ker je ta oblika epoetina tako dalj časa prisotna v krvnem obtoku, se lahko daje enkrat tedensko za razliko od ostalih oblik epoetinov (razen CERA), ki se dajejo 3-krat tedensko, da se doseže podoben klinični učinek (22, 23). Darbepoetin  $\alpha$  se v pH gradientu pri metodi izoelektričnega fokusiranja nahaja v kislem območju in se tako močno razlikuje od ostalih oblik epoetinov, ki se nahajajo v bazičnem delu elektroferograma (Slika 5). Darbepoetin sestavljajo 4 dominantne izoforme združene v kislem delu elektroferograma (Slika 5; lise A-D v kislem območju reference).

### 5 CERA - oblika epoetina $\beta$

CERA (continuously erythropoiesis receptor activator) je nova oblika epoetina  $\beta$ . Njegova velikost je kar dvakrat večja od navadnih epoetinov in sicer 60 kDa. Temelji na EPO molekuli, ki pa je modificirana z vezavo polidisperznih polimerov. Metoksi polietilen glikolni (PEG) polimer je vezan na N-terminalno aminokislino in -amino skupino lizina 52 in lizina 45. Posledično je razpolovni čas takega epoetina v telesu veliko daljši v primerjavi z rHuEpo in NESP, in sicer 135 ur po subkutani ali intravenozni aplikaciji. Na sam EPO-R se CERA veže počasneje z njega pa oddisociira hitreje, kar tudi vpliva na njegovo biološko uporabnost in framakokinetiko (9). Njegov elektroferogramski profil je v bazičnem delu in je celo bolj bazičen od ostalih epoetinov, kar nam omogoča njegovo ločitev od endogenega EPO. Vidimo lahko 6 izoform, od tega so prve 4 izoforme zelo močne in se skoraj ne prekrivajo z ostalimi epoetini (Slika 5; CERA). Najpomembnejša je prisotnost izoforme številka 3, ki ni prisotna ne pri epoetinih in prav tako ne v endogenem EPO.

### 6 Epoetin $\delta$

Epoetin  $\delta$  ali GA-EPO, kot ga imenujejo, se pridobiva v humani celični liniji, vendar pa ne v ledvičnih celicah (1). Kljub temu, da sinteza poteka v humanih fibrosarkomskih celicah, pa se glikozilacija EPO še vedno razlikuje od endogenega EPO (Slika 5). Vzrok temu je, da je

sama glikozilacija odvisna od encimov, ki so prisotni v Golgijevem aparatu celice. Tako te celice niso sposobne take glikozilacije kot celice v ledvicah. Njegov signal se pojavi v bazičnem delu elektroferograma. Opazimo lahko, da se od 7 izoform, 2 pojavita v endogenem delu elektroferograma, vendar pa je najmočnejši signal v bazičnem delu.

### 7 Epoetin $\omega$

Epoetin  $\omega$  je izoliran iz ledvičnih celic mladičkov hrčka (BHK). Je sialoglikoprotein z zmanjšanim številom O-vezanih sladkorjev, manjšo kislostjo in drugačno hidrofilitostjo kot ostali epoetini. Trži se predvsem v vzhodni Evropi in Latinski Ameriki in delu Azije. Nekatere študije so pokazale, da je potrebno dajati nižji odmerek epoetina  $\omega$  napram epoetinu  $\alpha$ , da dosežemo in vzdržujemo enako količino hemoglobina (24).

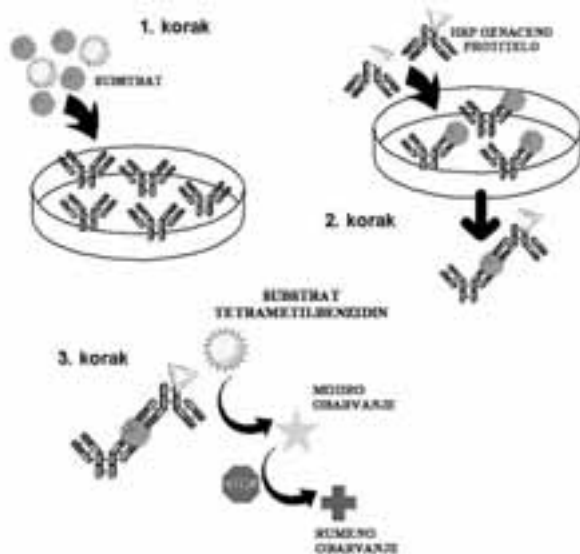
### 8 Detekcija eritropoetina

Ker se koncentracije EPO v telesu tekom dneva spreminjajo in močno nihajo in so razlike tudi na medindividualni ravni, samo merjenje koncentracije EPO z ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testom ni zanesljivo merilo. Še posebej pa to velja za protidopinške meritve, saj ELISA ne razlikuje med endogenim in rekombinantnim EPO proteinom. V te namene se poleg celokupne koncentracije eritropoetina v telesu določa še hematokrit, odstotek retikulocitov, odstotek makrocitov in koncentracija serumskega topnega transferinskega receptorja (sTfr) (1, 11). Vendar pa je to le osnova. Glavna metoda določevanja rHuEpa je izoelektrično fokusiranje (IEF).

### 9 Detekcija z ELISA

Encimskoimunski test ELISA je metoda, ki ni uporabna samo pri določevanju celokupne koncentracije epoetinov in endogenega EPO, temveč se uporablja tudi za določevanje drugih analitov. Temelji na detekciji proteina oziroma analita s specifičnimi protitelesi in encimsko barvno reakcijo. Koncentracija analita se določi glede na umeritveno krivuljo, ki jo dobimo iz meritev standardov znanih koncentracij. Sam postopek določevanja je sledeč. Naš vzorec, v primeru analiz EPO je to retantat urina ali plazma, naneseemo na mikrotitersko ploščico, katere dno je prevlečeno z EPO protitelesi (Slika 3). Poleg vzorca na mikrotitrski ploščici ločeno analiziramo tudi standarde in kontrole. Prvi nam služijo za določevanje umeritvene krivulje, drugi pa kot kontrola testa. Po inkubaciji prostorčke na ploščici izpraznimo in odstranimo nevezane proteine, EPO molekule pa ostanejo vezane na primarna EPO protitelesa. Dodamo sekundarna EPO specifična protitelesa, ki se vežejo na konjugat EPO-primarnih protiteles. Sekundarna protitelesa so označena z encimom peroksidazo (horseradish peroxidase, HRP), ki cepi substrat in vodi v nastanek barvnega produkta (Slika 3, korak 2). Temu sledi izpiranje ter dodajanje substrata za barvno reakcijo, ki jo po določenem času prekinemo (Slika 3, korak 3). Ko je barvna reakcija končana določimo količino nastalega produkta z merjenjem absorbance pri 450 nm. Izmerjena vrednost absorbance je sorazmerna količini EPO v vzorcu.

Sama metoda se pri detekciji rekombinantnih epoetinov uporablja izključno za določitev celokupne koncentracije EPO v vzorcu. S tem



**Slika 3:** Postopek detekcije eritropoetina z ELISA testom. 1. korak: vezava eritropoetina na primarna protitelesa, 2. korak: konjugacija primarnih protiteles z encimsko označenimi sekundarnimi protitelesi, 3. korak: detekcija.

**Figure 3:** Detection of erythropoietin using ELISA. 1. step: binding of erythropoietin on primary antibodies, 2. step: conjugation of primary antibodies with secondary enzyme labeled antibodies, 3. step: detection.

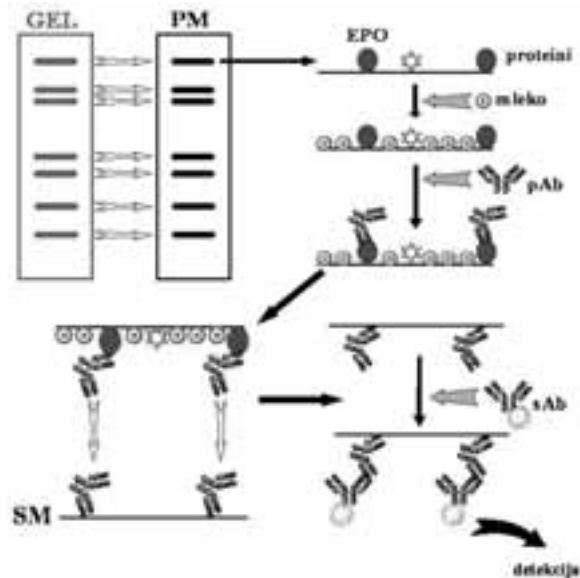
preprečimo prekomeren nanos vzorca na IEF gelu. S to metodo, kot že omenjeno, ne moremo ločiti med eksogenimi epoetini in endogenim EPO, ker se primarna EPO protitelesa vežejo na proteinski epotopin ne na sladkorni del, ki se razlikuje med EPO in izoformami.

## 10 Detekcija z izoelektričnim fokusiranjem

Osnova IEF je ločevanje izoform EPO molekul s pomočjo električnega toka na gelu s pH gradientom. Položaj izoforme v gelu s pH gradientom določa izoelektrična točka (pI). Izoforme epoetina so podrazred molekule epoetina, ki imajo različen nivo glikozilacije (število sialičnih kislin) in s tem različen naboj in pI. Izoelektrična točka (pI) je tisti pH, pri katerem je vrednost neto naboja molekule nič.

Izoforme so vidne na gelu kot signal v obliki pasu (Slika 5). Profil izoform je sestavljen iz pasov, njihovega števila, pozicije v pH gradientu in jakosti signala. Vse te karakteristike se razlikujejo med različnimi vrstami molekul z različnimi strukturnimi lastnostmi. Bolj kot je signal gost oziroma močan za določeno izoformo, več te izoforme je prisotne v našem vzorcu. Ločevanje EPO molekul poteka pri gradientu pH med 8 in 2 (Slika 5). Manj glikozilirane molekule imajo pI v bolj bazičnem območju (epoetini), bolj glikozilirane pa v kislem območju (NESP). Endogeni EPO ima večjo gostoto in število izoform v primerjavi z ostalimi rHuEPO. Izoforme endogenega EPO se nahajajo v endogenem in bazičnem območju (Slika 5, KS urin).

Metoda izoelektričnega fokusiranja za določevanje EPO, ki jo je razvila dr. Lasne (25), je bila prvič uporabljena leta 2000 na

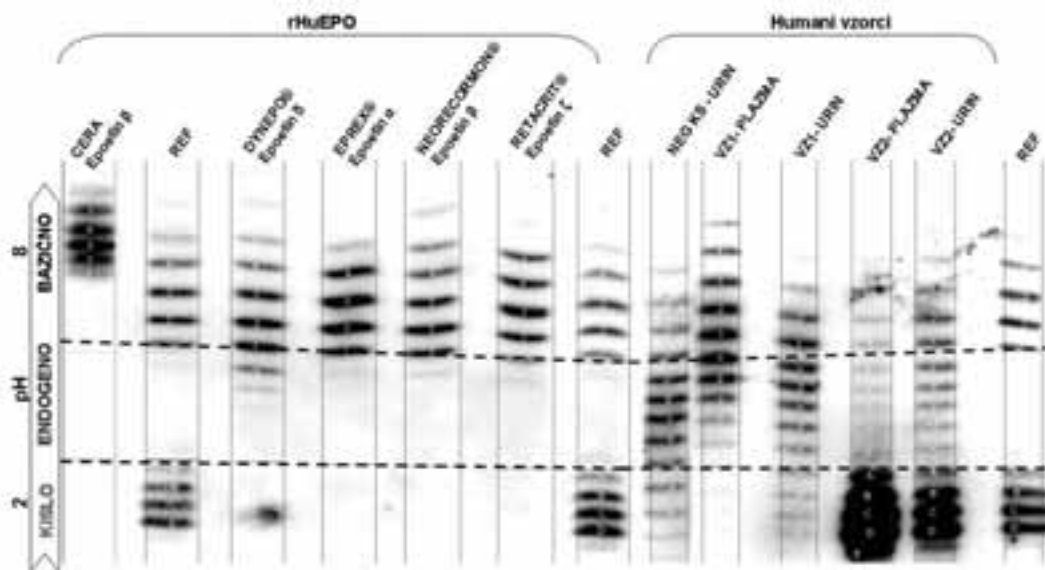


**Slika 4:** Postopek metode izoelektričnega fokusiranja z dvojnimi prenosom: prenos proteinov iz gela na primarno membrano (PM) ter nato na sekundarno membrano (SM). pAb, primarna protitelesa; sAb, sekundarna protitelesa; EPO, eritropoetin.

**Figure 4:** Isoelectric focusing with double blot: transfer of proteins on primary membrane (PM) following by second transfer on to secondary membrane (SM). pAb, primary antibodies; sAb, secondary antibodies; EPO, erythropoietin.

olimpijskih igrah v Sydneyu. Metoda temelji na 4 glavnih korakih: koncentriranja urina, ločevanje na gelu s pH gradientom, dvojni prenos in detekcija s kemoluminiscenco (1). Potek postopka je prikazan na sliki 4.

Urin pred nanosom na gel skoncentriramo in dodamo inhibitorje proteaz, da preprečimo razgradnjo EPO. Koncentriranje dosežemo z uporabo dveh različnih kolon z zamreženostjo 30 kDa. S tem urin skoncentriramo iz 20 mililitrov na nekaj mikrolitrov ter odstranimo večino proteinov z molekulska maso pod 30 kDa. Predhodno lahko uporabimo tudi ultrafiltracijo, da se znebimo morebitno prisotnih celic in bakterij. Ko imamo urin skoncentriran, izmerimo celokupno koncentracijo EPO s testom ELISA. S tem preprečimo prekomeren nanos na gel za IEF. Maksimalni nanos je 800 IU/l. Vzorce po potrebi razredčimo in nanosimo na gel za IEF, predhodno izpostavljenega električnemu toku v namen vzpostavitve pH gradienta. Gel je sestavljen iz amfolitov, uree, poliakrilamida in glukoze. Amfoliti so snovi, ki imajo specifični pH razpon. V EPO analizi se uporabljata v gelu dva, in sicer amfolit s pH območjem od 2-4 in od 4-6, ter amfolit 6-8 kot katodni elektrolit. S tem zagotovimo razpon gradienta gela od pH 2-8, ki je nujen za analizo trenutno dostopnih rekombinantnih epoetinov. Na gel poleg vzorcev nanosimo pozitivno in negativno kontrolo ter referenco (mešanico NESP in Epo standarda BRP – erythropoietin biological reference preparation), ki nam kasneje služijo za določevanje kislega, endogenega in bazičnega območja



**Slika 5:** Elektroferogram. rHuEPO, rekombinantni humani eritropoetin; CERA oblika rHuEPO; REF, referenca, mešanica epoetina alfa, beta in NESP, služi kot pozitivna kontrola; NEG-KS – vzorec urina zdrave osebe – negativna kontrola; VZ1 in VZ2 vzorci urina in krvi bolnikov z rakom, VZ2 je vzorec bolnika na terapiji z rekombinantnim humanim eritropoetinom (NESP).

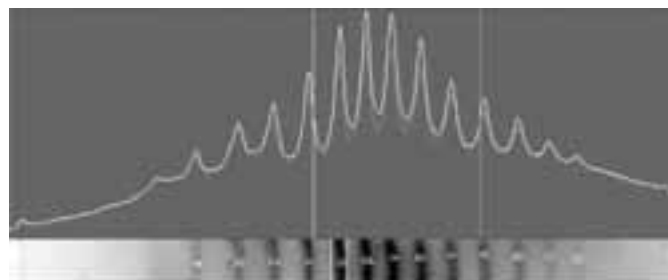
**Figure 5:** Electroferogram. rHuEPO, recombinant human erythropoietin; CERA, continuously erythropoiesis receptor activator, REF, reference, mixture of epoetin alpha, beta and NESP; NEG-KS – sample of urine – negative control; VZ1 and VZ2 samples of urine and blood from cancer patients, VZ2 sample of patient receiving rHuEPO (NESP).

elektroferograma (Slika 5). Po končanem fokusiranju sledi pol-suhi prenos proteinov na primarno PVDF (polyvinylidene fluoride) membrano v Tris/Glicinu. Proteini potujejo proti anodi, saj so negativno nabiti. Po končanem primarnem prenosu, membrano blokiramo v mleku ter nato dodamo primarna EPO protitelesa (monoklonska mišja protitelesa AE7A5). Da bi dosegli večjo specifičnost detekcije in boljše ločljivostjo, sledi drugi prenos, pri katerem prenesemo primarna protitelesa v kislem (ocetna kislina) na sekundarno PVDF membrano. Protitelesa so pozitivno nabita in potujejo proti katodi. Po drugem prenosu ponovno sledi blokiranje membrane z mlekom. Nato dodamo sekundarna protitelesa, ki so encimsko označena (biotinsko označena anti-mišja IgG), in nam služijo za streptavidin-peroksidazno detekcijo (26). Da bi se izognili

neprecižnemu prenosu vedno položimo dodatno DURAPORE® membrano med PVDF membranama in med PVDF membrano in gelom (25).

Metoda ni primerna samo za določanje EPO v urinu temveč sedaj tudi za določanje EPO v plazmi. Protokol je podoben že opisanemu. Uveden je le dodaten korak imunoafinitetnega čiščenja s pomočjo monoklonskih anti EPO protiteles (9C21D11) (27). Uporabi se lahko tudi pri urinskih vzorcih, ki imajo visoko koncentracijo ostalih proteinov (proteinurija). Visoka koncentracija proteinov lahko povzroči, da elektroferogram nima jasnih signalnih trakov, temveč vidimo ukrivljene trakove. To nam otežuje določevanje oziroma analizo slike. Po postopku imunoafinitetnega čiščenja pridobimo koncentrat, v katerem so bile odstranjene tudi vse proteaze in s tem ni potrebno dodajanje proteaznih inhibitorjev. Tako izključimo še en nepotreben poseg v sam vzorec (25, 27).

V primeru imunoafinitetne priprave krvnega in urinskega vzorca na elektroferogramu opazimo zamik trakov urinskega vzorca v primerjavi z krvnim vzorcem (Slika 5: VZ1 plazma in VZ1 urin). Do zamika urinskih vzorcev v kislno območje pride zaradi zakisanja EPO izoform v ledvicah. Do zamika ne pride v primeru proteinurije (28). Zamika urinskih vzorcev v kislno območje ne opazimo pri vzorcu bolnika, ki prejema cisplatinško kemoterapijo ter darbepoetin (Slika 5: VZ2) iz česar bi lahko sklepali na okvaro ledvic zaradi kemoterapije. Metoda IEF torej lahko služi kot diagnostično sredstvo detekcije količine endogenega EPO in delovanja ledvic pri rakavih bolnikih, ki prejemajo cisplatinško kemoterapijo.



**Slika 6:** Densitometrična analiza vzorca. Prikazana je analiza vzorca NEG-KS-urine (negativna kontrola) iz slike 5.

**Figure 6:** Densitometry of sample NEG-KS urine (negative control) from figure 5.



Ko razvijemo elektroferogram, sledi analiza le tega s pomočjo denzitometrije (Slika 6). S tem določimo relativno moč signala posameznih EPO izoform. Denzometrija je eden izmed pomembnih korakov pri določevanju pozitivnih in negativnih vzorcev pri dopinških testih.

### 11 Uporaba eritropoetina

Eritropoetin se uporablja kot terapija pri anemijah, ki so posledica kronične odpovedi ledvic, pri anemijah kot posledica kemoterapije pri bolnikih z rakavimi obolenji, pa tudi pri bolnikih z virusom HIV (29). EPO deluje tudi neuroprotektivno in tkivno zaščitno (epitelij, endometrij, srce itd.) (13).

Navadno se EPO daje intravensko, subkutano ali intraperitonealno. Način aplikacije je odvisen od farmakokinetičnih lastnosti oblike EPO ter od same praktičnosti.

Opaženo je bilo, da je učinek na eritropoezo večji pri rednem odmerjanju EPO v razdrobljenih odmerkih, kot pa dajanje velikega odmerka (30).

Maksimalna koncentracija izmerjena v krvnem obtoku je pri intravenskem dajanju zdravila dosežena v nekaj minutah, za razliko od subkutanega dajanja kjer lahko traja od 5 ur pa do 24 ur in več po dajanju (31).

Sekrecija rHuEPO v urin je pri zdravih prostovoljcih manjša od 1 % danega odmerka.

Jetra so udeležena pri razgradnji EPO, kjer se vrši desializacija oziroma odstranjevanje sialičnih kislin, kar je omejujoči dejavnik izločanja EPO (32). V urinu se pod kislimi pogoji ali pod vplivom proteaznih encimov lahko sialični ostanki hidrolizirajo. To vodi v spremembo profila v elektroferogramu (33), kar izkoriščajo športniki v namene prikrivanja dopinga.

### 12 Eritropoetin in doping

Povečana dostava kisika v mišična tkiva je zelo pomembna pri doseganju optimalnih sposobnosti atleta, predvsem njegove vzdržljivosti. Dokazano je bilo, da več metod povečuje oksigenacijo tkiv, med njimi tako imenovane višinske in hipoksične sobe, transfuzija krvi in vbrizgavanje humanega rekombinantnega eritropoetina (29). Ocenjuje se, da od 3-7 % vrhunskih atletov v vzdržljivostnih športih, kot sta kolesarstvo in atletika uporablja EPO v namene dopinga (34). Najnovejši primeri izhajajo iz predzadnjega Tour De France (2008) in olimpijskih iger v Pekingu, kjer so športniki zlorabljali novo obliko epoetina imenovanega CERA.

### 13 Eritropoetin in rakava obolenja

Epoetini vseh vrst se uporabljajo pri terapiji anemij, ki so posledica kemoterapij in obsevanj pacientov z rakom. Vendar pa kot vsaka učinkovina, imajo tudi epoetini neželene stranske učinke. Medtem ko je aplikacija rHuEPO močno zmanjšala potrebo po transfuziji, je povečala možnost pojava tromboemboličnih pojavov (35). Prav tako se pojavlja vprašanje ali je EPO-R prisoten na malignih rakavih celic, kar bi ob dajanju rHuEpo lahko povzročilo povečano razrast rakastega tkiva in s tem zmanjšalo možnost preživetja. To se je

pokazalo pri dveh študijah objavljenih v letu 2003, kjer so bile udeležene bolnice z rakom dojke (36, 37), in pacienti z rakom na vratu in glavi (38). Slabše preživetje je bilo kasneje pokazano pri več oblikah raka (39), pri čemer vseh razlik ne moremo razložiti z embolijami.

Točni mehanizmi, kako naj bi epoetini vplivali na rakavo tkivo še niso poznani. Nekatere hipoteze govorijo o spremenjeni signalizaciji, druge o vezavi epoetinov na druge vrste receptorje, v igri naj bi bili predvsem receptorji različnih interleukinov.

### 14 Zaključek

Rekombinantni eritropoetini so močno olajšali življenje prenekaterim bolnikom z rakom, kronično odpovedjo ledvic in anemijami. Vendar pa so ga za popolnoma druge namene pričeli uporabljati tudi športniki, predvsem kolesarji in atleti. Zaradi tega je bila svetovna protidopinška komisija WADA prisiljena razviti metodo, ki omogoča ločevanje različnih epoetinov. Izkazalo se je, da je najprimernejša metoda ločevanja z izoelektričnim fokusiranjem. Napačno je razmišljanje, da novih epoetinskih derivatov z izoelektričnim fokusiranjem ni mogoče določiti. Znanost stremi kljub temu k razvoju novih metod določevanja, ki temeljijo predvsem na masni spektroskopiji. Metoda IEF trenutno še ni v uporabi pri diagnostiki anemičnih bolnikov, vendar ima potencial za določanje vpliva rHuEpo in druge terapije na nivo izražanja in obliko endogenega EPO.

### 15 Zahvala

Zahvalil bi se dr. Francoise Lasne, Laurent Martin-u, Jean Antoine Martin-u in prof. dr. Jacques de Ceaurriz-u za šolanje na področju izoelektričnega fokusiranja eritropoetina in sprejem v nacionalnem protidopinškem laboratoriju Agence française de lutte contre le dopage - AFLD, Chatenay Malabry, Francija.

### 16 Literatura

1. Segura J, Pascual JA, Gutierrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388(7): 1521-9.
2. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 1997; 51(2): 393-401.
3. Thorling EB, Erslev AJ. The "tissue" tension of oxygen and its relation to hematocrit and erythropoiesis. *Blood* 1968; 31(3): 332-43.
4. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72(2): 449-89.
5. Romanowski RR, Sytkowski AJ. The molecular structure of human erythropoietin. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8(5): 885-94.
6. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004; 43(8): 649-59.
7. Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(10): 968-79.
8. Jelkmann W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods Enzymol* 2007; 435: 179-97.
9. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; 109(3): 868-73.
10. Adamson JW. Regulation of red blood cell production. *Am J Med* 1996; 101(2A): 4S-6S.
11. Pascual JA, Belalcazar V, de Bolos C, Gutierrez R, Llop E, Segura J. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. *Ther Drug Monit* 2004; 26(2): 175-9.

12. Debeljak N, Sytkowski AJ, *EpoR. UCSD-Nature Molecule Pages 2007: A000863*. 2007.
13. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 2008; 141(1): 14-31.
14. Watowich SS. Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999; 31(10): 1075-1088.
15. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. *Science* 1999; 283(5404): 987-990.
16. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 2001; 98(13): 3626-34.
17. Debeljak N, Sytkowski AJ. Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des* 2008; 14(13): 1302-10.
18. Halstenson CE, Macres M, Katz SA et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50(6): 702-12.
19. Veys N, Dhondt A, Lameire N. Pain at the injection site of subcutaneously administered erythropoietin: phosphate-buffered epoetin alpha compared to citrate-buffered epoetin alpha and epoetin beta. *Clin Nephrol* 1998; 49(1): 41-4.
20. Veys N, Vanholder R, Lameire N. Pain at the injection site of subcutaneously administered erythropoietin in maintenance hemodialysis patients: a comparison of two brands of erythropoietin. *Am J Nephrol* 1992; 12(1-2): 68-72.
21. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 Suppl 3: 3-13.
22. Locatelli F, Olivares J, Walker R et al. Novel erythropoiesis stimulating protein for treatment of anemia in chronic renal insufficiency. *Kidney Int* 2001; 60(2): 741-7.
23. Gaudard A, Varlet-Marie E, Bressolle F, Audran M. Drugs for increasing oxygen and their potential use in doping: a review. *Sports Med* 2003; 33(3): 187-212.
24. Bren A, Kandus A, Varl J et al. A comparison between epoetin omega and epoetin alfa in the correction of anemia in hemodialysis patients: a prospective, controlled crossover study. *Artif Organs* 2002; 26(2): 91-7.
25. Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis. *Electrophoresis* 2007; 28(12): 1875-81.
26. Lasne F. Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* 2001; 253(1-2): 125-31.
27. Lasne F, Martin L, Martin J, Ade Ceaurriz J. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol* 2007; 41(3): 354-7.
28. van de Pol SMG, Doornaert PAH, de Bree R, Leemans CRxe, Slotman B, JLangendijk JA. The significance of anemia in squamous cell head and neck cancer treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Oral Oncology*; In Press, Corrected Proof.
29. Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH. Doping in the recombinant era: Strategies and counterstrategies. *Clinical Biochemistry* 2005; 38(11): 959-965.
30. Gurney CW, Wackman N, Filmanowicz E. Studies on erythropoiesis. XVII. Some quantitative aspects of the erythropoietic response to erythropoietin. *Blood* 1961; 17: 531-46.
31. Goldberg MA. Erythropoiesis, erythropoietin, and iron metabolism in elective surgery: preoperative strategies for avoiding allogeneic blood exposure. *Am J Surg* 1995; 170(6A Suppl): 37S-43S.
32. Dunn CJ, Markham A. Epoetin beta. A review of its pharmacological properties and clinical use in the management of anaemia associated with chronic renal failure. *Drugs* 1996; 51(2): 299-318.
33. Belalcazar V, Gutierrez Gallego R, Llop E, Segura J, Pascual JA. Assessing the instability of the isoelectric focusing patterns of erythropoietin in urine. *Electrophoresis* 2006; 27(22): 4387-95.
34. Wilber RL. Detection of DNA-recombinant human epoetin-alfa as a pharmacological ergogenic aid. *Sports Med* 2002; 32(2): 125-42.
35. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(10): 708-14.
36. Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 2003; 4(8): 459-60.
37. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M et al. Maintaining Normal Hemoglobin Levels With Epoetin Alfa in Mainly Nonanemic Patients With Metastatic Breast Cancer Receiving First-Line Chemotherapy: A Survival Study. *J Clin Oncol* 2005; 23(25): 5960-5972.
38. Henke M, Laszig R, Rube C et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 362(9392): 1255-60.
39. Machtay M, Pajak TF, Suntharalingam M et al. Radiotherapy With or Without Erythropoietin for Anemic Patients With Head and Neck Cancer: A Randomized Trial of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG 99-03). *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 2007; 69(4): 1008-1017.

# Preventiva infekcijskega endokarditisa v zobozdravstvu

## Prevention of infective endocarditis in dentistry

Maja Mulej Vedlin

**Povzetek:** American Heart Association (AHA), katero citira večina svetovnih zvez in organizacij in po kateri pripravljajo nova slovenska priporočila, je v letu 2007 spremenila protokol antibiotične zaščite pred infekcijskim endokarditisom. Ta priporočila temeljijo na rezultatih novih znanstvenih in kliničnih raziskav, ki zavračajo široko uporabo antibiotikov. Razen nekaterih jasno določenih situacij, kot sta na primer preboleli endokarditis in umetne srčne zaklopke, med strokovnjaki ni enotnega mnenja glede uporabe antibiotične zaščite. Obstaja široka paleta priporočenih protokolov, vendar večina brez ustrezne znanstvene podlage. Antibiotikom naj bi se v zobozdravstveni praksi izogibali, razen v jasno določenih situacijah. Verjetnost, da pride do infekcijskega endokarditisa je večja pri izpostavljenosti patogenim mikroorganizmom zaradi vsakodnevnih dejavnosti (ščetkanje zob, nitkanje, uporaba zobotrebecv), kot pri povprečno enem zobozdravniškem posegu letno. Antibiotična zaščita lahko pri zobozdravniških pacientih prepreči le majhen delež infekcijskih endokarditisov, vendar ne moremo izključiti, da je v določenih primerih učinkovita, saj zobozdravniški posegi pogosto sprožijo bakterijemijo. Nevarnost neupravičene uporabe, stranski učinki in široka odpornost mikroorganizmov na antibiotike, se zdi večja, kot morebitne prednosti zaščite. Dobra ustna higiena lahko prepreči bakterijemijo, ki jo povzročijo vsakodnevne dejavnosti in je pomembna pri preprečevanju infekcijskega endokarditisa.

**Ključne besede:** bolezni srca, endokarditis, preventiva, antibiotična profilaksa

**Abstract:** American Heart Association (AHA) has recently changed the recommended protocol for antibiotic prophylaxis against infective endocarditis (IE). These changes reflect increasing scientific evidence and professional experience in opposition to widespread use of antibiotic prophylaxis in dentistry. There are relatively few situations in which antibiotic prophylaxis is indicated. Aside from the clearly defined instances of endocarditis and prosthetic cardiac valves, there is no consensus among experts on the need for prophylaxis. There is wide variation in recommended protocols, but little scientific basis for the recommendations. The emerging trend seems to be to avoid the prophylactic use of antibiotics in conjunction with dental treatment unless there is a clear indication. IE is much more likely to result from frequent exposure to random bacteria associated with daily activities than from bacteremia caused by dental procedures. Antibiotic prophylaxis may prevent an exceedingly small number of cases of IE, if any, in people who undergo dental procedures. The risk of antibiotic-associated adverse effects exceeds the benefits, if any, from antibiotic prophylactic therapy. Maintenance of optimal oral health and hygiene may reduce the incidence of bacteremia from daily activities and is more important than prophylactic antibiotics for dental procedures to reduce the risk of IE.

**Key words:** cardiovascular disease, endocarditis, prevention, antibiotic prophylaxis.

## 1 Uvod

American Heart Association (AHA) je v letu 2007 spremenila protokol antibiotične zaščite pred infekcijskim endokarditisom. Protokol, ki ga priporoča AHA je podprt s številnimi raziskavami, zato ga citira večina svetovnih zvez in organizacij. Spremembe, ki jih je uvedla AHA poudarjajo spremenjen odnos do uporabe antibiotikov zaradi prehodne bakteriemije, do katere pride pri nekaterih zobozdravniških posegih. Pogosti sta negotovost in napačne informacije o strokovni upravičenosti uporabe antibiotične zaščite pri zobozdravniških posegih. V tem članku so prikazane specifične situacije, ko je uporaba antibiotične zaščite v zobozdravstvu po AHA protokolu upravičena in potrebna.

Že dolgo je sprejeta teorija o žariščni infekciji, ki pravi, da subklinična oralna žarišča, predvsem na endodontsko zdravljenih zobeh, povzročajo sistemske bolezni in bolezenske procese na oddaljenih

mestih (1). Čeprav velja mnenje, da teorija nima trdnih znanstvenih dokazov, priporočila o antibiotični zaščiti pogosto temeljijo na tej teoriji. Zdravniki zato pogosto predpisujejo antibiotično zaščito v primerih, ko ta ni strokovno upravičena.

Povezava med bakterijsko okužbo in endokarditisom je bila prvič opisana pred začetkom 20. stoletja (2). Kirurški poseg, kot možen vzrok za prehodno bakteriemijo in infekcijski endokarditis (IE), so opisali v 20ih letih prejšnjega stoletja (3). Lewis in Grant sta postavila hipotezo, da s kirurškim posegom bakterijam omogočimo dostop do sistemske cirkulacije, kar lahko povzroči endokarditis. Takrat še ni bila znana natančna patofiziologija IE. Kasneje so ugotovili, da IE povzročajo bakterije, ki kolonizirajo že prej nastale lezije na endokardu. Te lezije so ponavadi iz fibrina in trombocitov, in se razvijejo zaradi poškodbe endotela, ki jo lahko povzroči bolezen, tuja telesa, turbulentni krvni tok (2,4).

V 30ih letih prejšnjega stoletja so z raziskavami dokazali povezavo med zobozdravniškimi posegi, ki povzročajo krvavitev, ter bakteriemijo in IE. Antibiotično zaščito se je pričelo uporabljati rutinsko pri vseh rizičnih pacientih. Uporabo antibiotične zaščite so razširili tudi na paciente z umetnimi sklepi in na paciente z znižano imunsko odpornostjo (5). Veliko zdravnikov uporablja zaščito tudi pri zdravih ljudeh v prepričanju, da je tako možnost lokalne okužbe po operaciji manjša.

Zdravniki in raziskovalci so zelo zaskrbljeni zaradi prepogoste uporabe antibiotikov, ki povzročajo razvoj na antibiotike odpornih sojev mikroorganizmov. V tem članku na podlagi priporočil iz literature o antibiotični zaščiti pred IE predstavljamo smernice za uporabo in odmerjanje antibiotikov.

## 2 Infekcijski endokarditis

Termin »bakterijski endokarditis« je bil zamenjan z »infekcijskim endokarditisom« (IE), saj IE lahko povzročijo tudi glive (38). Infekcijski endokarditis (IE), znan tudi kot akutni ali subakutni infekcijski endokarditis, je definiran kot eksudativna in proliferativna vnetna sprememba endokarda (8,9). Je redka, vendar življenjsko nevarna bolezen. Kljub napredku diagnostike, protimikrobnega zdravljenja, kirurških tehnik in boljšemu obvladovanju zapletov, sta obolenost in smrtnost povezani z infekcijskim endokarditisom še vedno visoki (10).

### 2.1 Patogeneza infekcijskega endokarditisa

Do IE pride, ko se patogeni mikroorganizem iz krvnega obtoka veže na fibrin in trombocite, na mestu, kjer je poškodovan endokard. Pogosto je manifestacija IE odvisna od imunskega odgovora telesa na patogeni mikroorganizem. Naslednje sosledje dogodkov naj bi vodilo v IE: nastanek nebakterijskega trombotičnega endokarditisa (NBTE) na srčni zaklopki ali drugje kjer je poškodovan endotelij; bakterijemija; vezava bakterije, ki je vstopila v kri, na NBTE; in razmnoževanje bakterij v tej leziji (10).

#### 2.1.1 Nastanek NBTE

Turbulenten tok krvi, ki se pojavi pri določenih prirojenih ali pridobljenih boleznih srca, na primer pri toku krvi skozi zožena ustja, poškoduje endotelij. Na poškodovan endotelij se fibrin in trombociti lažje nalagajo in tako nastane NBTE. Vdor patogenih mikroorganizmov v krvni obtok, lahko vodi v nastanek IE, če imajo ti mikroorganizmi sposobnost vezati se na lezijo (10).

#### 2.1.2 Prehodna bakteriemija.

Površina ustne sluznice je obdana s sebi lastno mikrofloro. Poškodba sluznice povzroči vdor bakterij v kri. Tako nastala prehodna bakteriemija je pogosta pri zobozdravniških posegih in drugih vsakodnevnih aktivnostih. Pogostost in jakost bakterijemije naj bi bili odvisni od vrste in velikosti poškodbe tkiva, bakterijske flore, ter od stopnje vnetja in okužbe na mestu poškodbe (10).

#### 2.1.3 Lepljenje bakterij

Sposobnost bakterij, da se vežejo na specifična oddaljena mesta je odvisna od anatomske lokacije mesta, kjer te bakterije povzročajo okužbo. Strukture bakterijske stene, ki bakterijam omogočajo vezavo,

so virulenčni faktor v patogenezi IE. Na živalskih modelih eksperimentalnega endokarditisa so dokazali, da so številne strukture bakterijske stene streptokokov, stafilokokov in enterokokov ključni faktor bakterijske adhezije. Nekateri streptokoki skupine viridans imajo lipoproteinski receptor, ki je glavni pri vezavi bakterije na fibrin in trombocite v NBTE (6).

#### 2.1.4 Razmnoževanje bakterij v leziji

Bakterije vezane na NBTE spodbujajo nadaljnje lepljenje fibrina in trombocitov. Tako so izolirane v žarišču, kjer se bakterije razmnožujejo izredno hitro. Več kot 90% mikroorganizmov v zrelih lezijah srčnih zaklopov naj bi bilo metabolično malo aktivnih, zato se slabo odzivajo na antibiotike (7).

## 3 Antibiotična zaščita pred infekcijskim endokarditisom

Dolgo so predvidevali, da je antibiotična zaščita pred infekcijskim endokarditisom pri zobozdravniških pacientih s srčnimi boleznimi uspešna in nujna, vendar zato ni jasnih znanstvenih dokazov. Majhen delež diagnosticiranih IE je posledica zobozdravniških posegov, ki povzročajo prehodno bakterijemijo. Posledično bi z antibiotično zaščito lahko preprečili izredno majhen delež novih bolezni, četudi bi ta bila 100% učinkovita (24). Velika večina IE povzročenih z ustno mikrofloro je verjetno posledica prehodnih bakterijemij, ki nastanejo pri vsakodnevnih dejavnosti kot so ščetkanje zob, grizenje trde hrane, uporabe zobotrebcev, nitkanja in drugih (27-36). Prisotnost zobnih in obzobnih bolezni poveča verjetnost nastanka prehodnih bakterijemij. Pozornost moramo usmeriti z zobozdravniških posegov in antibiotične zaščite, k večji dostopnosti zobozdravstvenih storitev in boljši ustni higieni, predvsem pri pacientih s srčnimi boleznimi in zato večjo verjetnostjo za nastanek IE (10).

Ni objavljenih študij, ki dokazujejo, da pri ljudeh prehodna bakterijemija z večjo koncentracijo mikroorganizmov v krvi pogosteje povzroči IE, kot bakterijemija z manjšo koncentracijo mikroorganizmov (10). Koncentracija bakterij v krvi po zobozdravniških posegih je relativno nizka (< 10 na 4 CFU bakterij na ml) in je podobna koncentraciji bakterij v krvi po vsakodnevnih dejavnostih. Obe koncentraciji sta nižji od koncentracije, ki je na živalih povzročila eksperimentalni IE (10na6-10na8 CFU bakterij/ml) (40,41). Primeri IE, ki ga povzročijo bakterije iz ustne votline, so verjetno posledica nizkih koncentracij bakterij v krvi po vsakodnevnih dejavnostih (ščetkanje, nitkanje). Velika večina bolnikov z IE ni imela zobozdravniških posegov manj kot dva tedna pred nastopom simptomov IE (15, 17).

Vpliv trajanja prehodne bakterijemije na IE še ni pojasnjen. Zgodnje raziskave so dokazale bakterije v krvi do 10 minut po ekstrakciji, število pozitivnih kolonij pa je naglo padlo 10 do 30 minut po posegu. Novejše raziskave podpirajo te ugotovitve, vendar dokazujejo nizek procent pozitivnih kultur tudi 30 do 60 minut po ekstrakciji. Zdi se smiselno, da daljša bakterijemija povzroča večjo verjetnost nastanka IE, vendar nobena objavljena raziskava tega ne dokazuje. Objavljeni podatki kažejo, da verjetno ni klinično pomembnih razlik v frekvenci, naravi, obsegu in trajanju bakterijemije povezane z zobozdravniškimi posegi in bakterijemije zaradi vsakodnevnih dejavnosti, zato smiselnost predpisovanje antibiotikov pred zobozdravniškimi posegi ni jasno



dokazana (10). Kljub temu ne moremo izključiti, da antibiotična zaščita v določenih situacijah lahko prepreči nastanek IE.

### 3.1 Bolezni srca pri katerih se priporoča antibiotično zaščito

Prirojene in pridobljene bolezni srca lahko povzročijo poškodbo endotela in olajšajo nastanek NBTE. Te bolezni spremenijo hemodinamiko srca in tako povzročajo turbulence, ki pripomorejo k bakterijski okužbi (ponavadi streptokokni) endotela (4).

Bolezni srca pri katerih se priporoča antibiotično zaščito pred IE prikazuje preglednica 1 (11). **AHA priporoča antibiotično zaščito pri pacientih z večjo verjetnostjo, da zbolijo za IE, ki ima lahko nevarne posledice (valvularno disfunkcijo, dehiscenco, kongestivno srčno odpoved, smrt) in NE pri vseh pacientih, ki imajo večjo verjetnost, da zbolijo za IE (11).** European cardiology society priporoča antibiotično zaščito pri vseh pacientih s povečano verjetnostjo, da zbolijo za IE (38). V prihodnjem letu naj bi slovenska republiška komisija za endokarditis izdala nove smernice, ki naj bi se ujemale s smernicami AHA. Poleg skrajšanega seznama bolezni, kjer se priporoča antibiotična zaščita, je

najbolj opazna sprememba, sprejeta s strani AHA in European cardiology society, zmanjšanje doze amoxicilina s 3 g na 2 g in ukinitve doze po posegu, ter zamenjava erythromicina, kot alternative penicilinu, z drugimi antibiotiki (11, 12). Dajani in sodelavci so ugotovili, da 2g amoxicilina predstavljata večurno zaščito (13). Preglednica 2 prikazuje nov protokol antibiotične zaščite pri zobozdravniških posegih.

Pri pacientih s prolapsom mitralne zaklopke (PMV) se lahko razvije tahikardija, sinkopa, kongestivna odpoved srca in endokarditis (14). Možnost okužbe je različna, odvisna od stopnje PMV in starosti pacienta (12). Kljub temu se pri PMV antibiotična zaščita po novem AHA protokolu ne priporoča, saj spada med bolezni, kjer je verjetnost IE majhna (10, 37). Pacienti z umetnimi srčnimi zaklopkami in pacienti, ki so preboleli endokarditis so bolj dovzetni za razvoj IE kot pacienti s PMV (15).

Pacienti v anamnezi pogosto omenijo srčno aritmijo, ne poznajo pa narave in obsega bolezni. Zobozdravnik je dolžan pacienta poslati na nadaljnje preiskave oziroma se posvetovati z osebnim zdravnikom. Preventivno ne predpisujemo antibiotikov (10).

**Preglednica 1:** Bolezni srca pri katerih se priporoča antibiotično zaščito

**Table 1:** Cardiac conditions considered for prophylaxis

Bolezni srca pri katerih AHA priporoča antibiotično zaščito
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Umetne srčne zaklopke in umetni materiali uporabljeni za korekcijo defektov srčnih zaklopk, biološke proteze in homografi</li> <li>• Preboleli IE</li> <li>• Kongenitalne srčne bolezni (KSB)*                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– Nekorigirane prirojene napake, vključno s paliativnimi odvodi</li> <li>– Z umetnimi materiali korigirani kongenitalni srčni defekt prvih 6 mesecev po korekciji**</li> <li>– Pozdravljena KSB z rezidualnim defektom na mestu ali ob mestu umetnega materiala (inhibira razrast endotela)</li> </ul> </li> <li>• Pacienti s transplantacijo srca, ki so razvili srčno valvulopatijo</li> </ul>
<p><b>European Cardiology Society priporoča antibiotično zaščito tudi pri:</b></p> <p>Pridobljenih boleznih srčnih zaklopk</p> <p>Prolapsu mitralne zaklopke z regurgitacijo ali zdebelitvijo zaklopke</p> <p>Necianotični kongenitalni srčni bolezni</p> <p>Hipertrofični kardiomiopatiji</p>

\* Razen zgoraj navedenih se po AHA protokolu antibiotična zaščita ne priporoča pri nobenih drugih kongenitalnih srčnih boleznih

\*\* Profilaksa je smiselna saj pride do epitelizacije umetnih materialov v 6ih mesecih po posegu

**Preglednica 2:** Protokol antibiotične zaščite pri določenih zobozdravniških posegih – AHA protokol

**Table 2:** Antibiotic prophylactic regimens for certain dental procedures – AHA protocol

PROTOKOL ANTIBIOTIČNE ZAŠČITE PRI DOLOČENIH ZOBOZDRAVNIŠKIH POSEGIH – AHA PROTOKOL (11)		
Stanje	Antibiotik**	Odmerjanje***
Zaščita izbora	amoksicilin	Odrasli 2g, otroci 50mg/kg telesne teže, peroralno 1 uro pred posegom
Parenteralna zaščita	ampicilin	Odrasli 2g IM* ali IV*, otroci 50 mg/kg IM ali IV, največ 30 min pred posegom
Zaščita pri alergiji na penicilin	klindamicin klaritromicin	Odrasli 600mg, otroci 20mg/kg, peroralno 1 uro pred posegom Odrasli 500mg, otroci 15mg/kg, peroralno 1 uro pred posegom
Parenteralna zaščita ob alergiji na penicilin	klindamicin	Odrasli 600mg, otroci 15mg/kg, IV 1 uro pred posegom

\*IM: intramuskularno; IV: intravensko

\*\* Cefalosporinov se ne sme predpisovati pri hipersenzitivnosti (urtikarija, angioedem, anafilaksa) na penicilin.

\*\*\* Maksimalni otroški odmerek ne sme preseči odraslega.

European Cardiology Society priporoča antibiotični protokol z eno dozo pri vseh rizičnih pacientih, vendar dopušča možnost individualnega predpisovanja antibiotikov glede na potrebe posameznih pacientov (39).

## 3.2 Zobozdravniški posegi pri katerih se priporoča antibiotična zaščita

Povezava med zobozdravniškimi posegi in IE še ni povsem pojasnjena. Leta 1984 je Guntheroth (16) poročal o nizki pojavnosti bakterijemije povezane z zobozdravniškimi posegi. Poudaril je, da je dobra higiena veliko pomembnejša od antibiotične zaščite pri preprečevanju BE. V raziskavi, v kateri je sodelovalo 273 pacientov z lezijami na srcu, je Storm s sodelavci (17) prikazal, da zobozdravniški posegi niso velik rizični faktor za razvoj IE niti pri pacientih z nepravilnostmi srčnih zaklopk. Dokazal je, da celo uporaba antibiotične zaščite ni 100% uspešna pri preprečevanju IE (17, 18).

Ni dokazano, da minimalno invazivni posegi in posegi v navidez zdravih ustih zmanjšajo verjetnost prehodne bakterijemije. Antibiotično zaščito pred IE se priporoča pri pacientih z boleznimi srca, kjer je verjetnost IE s hujšimi posledicami večja, **pri posegih, ko obstaja verjetnost prehodne bakterijemije** (ekstrakcija zoba (10-100%), parodontalna kirurgija (36-88%), luščenje in glajenje (8-80%), namestitve koferdama in matric (9-32%), endodontija (do 20%) (10)). **Torej pri vseh kirurških posegih dlesni, pri posegih v periapikalni prostor in pri perforaciji oralne sluznice.** Čeprav je antibiotična zaščita pri teh pacientih smiselna, njena učinkovitost ni dokazana. **Antibiotična zaščita je potrebna tudi pri biopsiji, odstranjevanju šivov in pri namestitvi ortodontskih obročkov, vendar ni potrebna pri rutinski lokalni anesteziji skozi neinficirana tkiva, pri izgubi mlečnih zob, pri krvavenju zaradi poškodbe ustnic in oralne sluznice** (11).

Do prehodne bakterijemije pogosto pride pri vsakodnevnih dejavnostih, ki niso povezane z zobozdravniškimi posegi. Ščetkanje in nitkanje povzročita prehodno bakterijemijo v 20 do 68%, uporaba zobotrebcev v 20 do 40%, zobna prha v 7 do 50% in žvečenje hrane v 7 do 51%. Če primerjamo pogostost omenjenih vsakodnevnih opravil z enim do dvema obiskoma pri zobozdravniku letno, je pogostost prehodne bakterijemije zaradi vsakodnevnih dejavnosti veliko večja, kljub temu, da nekateri zobozdravniški posegi pogosto sprožijo bakterijemijo. Roberts ocenjuje, da je kumulativna izpostavljenost bakterijemiji zaradi vsakodnevnih dejavnosti v enem letu 5.6 milijonX večja, kot pri ekstrakciji enega zoba (10).

## 4 Povzetki nekaterih kliničnih raziskav, ki prikazujejo učinkovitost antibiotikov pri preprečevanju IE po zobozdravniških posegih

Ni objavljenih prospektivnih naključnih placebo-kontroliranih raziskav o učinkovitosti antibiotične zaščite pred bakterijskim endokarditisom pri zobozdravniških posegih. Podatki iz objavljenih prospektivnih ali retrospektivnih kliničnih raziskav so omejeni z: 1. relativno majhnim številom IE, zato bi bilo potrebno zelo veliko število pacientov, da bi bili rezultati statistično značilni; 2. z velikimi razlikami v tipu in obsegu boleznih srca; 3. velikim številom različnih invazivnih zobozdravniških

posegov in različnimi stopnjami zobnih in zobobnih boleznih. Te in druge omejitve otežujejo objektivno oceno objavljenih kliničnih raziskav o antibiotični zaščiti pred IE (10).

Čeprav nekatere retrospektivne raziskave omenjajo učinkovitost antibiotične zaščite, so te študije majhne in ne vključujejo dovolj kliničnih primerov (19,20,21,22).

Van der Meer in sodelavci so objavili raziskavo o zobozdravniških posegih na Nizozemskem. Preučevali so učinkovitosti antibiotične zaščite pred IE pri pacientih z umetnimi in naravnimi srčnimi zaklopkami. Zaključili so, da zobozdravniški in drugi posegi povzročijo le majhen delež vseh endokarditsov, zato bi antibiotična zaščita preprečila le neznamen del IE, četudi bi bila zaščita 100% uspešna (23). Van der Meer in sodelavci so opravili dvoletno klinično raziskavo. Med pacienti, ki so zboleli za IE in pri katerih je bila zaščita priporočena, je 25% takšnih, ki so zboleli kljub antibiotični zaščiti. Zaključili so, da antibiotična zaščita ni bila učinkovita (24). V ločeni raziskavi so van der Meer in sodelavci ugotovili, da je osveščenost o priporočilih antibiotične zaščite med pacienti in zdravstvenimi delavci slaba (25).

Storm in sodelavci so ocenili antibiotično zaščito pri zobozdravniških posegih in boleznih srca, ki predstavljajo riziko za razvoj IE, v multidisciplinarni klinični raziskavi. Objavili so, da je večja nevarnost za razvoj IE pri pacientih s prolapsom mitralne zaklopke, pri pacientih s kongenitalnimi in revmatskimi srčnimi boleznimi in pri pacientih, ki so prestali operacijo srčnih zaklopk. Zaključili so, da zobozdravniški posegi niso rizični faktor za razvoj IE, in da bi z antibiotično zaščito preprečili le neznamen del primerov IE (17).

Te raziskave imajo podobne zaključke kot pred kratkim objavljena francoska raziskava (Duval X in sod.), ki prikazuje verjetnost, da bo pacient z boleznijo srca, po invazivnem zobozdravniškem posegu, zbolel za IE z ali brez antibiotične zaščite. V tej raziskavi so zaključili, da bi »ogromne doze antibiotikov preprečile le zelo malo IE« (26).

## 5 Posebne situacije in okoliščine

### 5.1 Pacienti, ki že prejemale antibiotično terapijo

Če je možno, poseg pri teh pacientih odložimo in počakamo, da pacient konča s terapijo. V najmanj 10ih dneh po prenehanju antibiotične terapije se v ustih vzpostavi normalna flora in takrat lahko rizičnemu pacientu predpišemo zaščito po običajnem protokolu. Če pacient dalj časa prejema antibiotik, ki ga priporočamo tudi za zaščito pred IE, ne povečamo doze tega antibiotika, ampak predpišemo antibiotik druge skupine. Na primer doza antibiotika, ki ga pacient jemlje za preprečevanje akutne revmatske vročice, je nižja od priporočene doze za preprečevanje IE. Pacienti, ki jemljejo penicilin za sekundarno preventivo revmatske vročice ali iz drugih razlogov, imajo v ustih verjetno na penicilin ali amoksicilin rezistenten streptokok viridans. V tem primeru je potrebno predpisati clindamicin, azithromicin ali clarithromicin za preprečevanje IE, vendar le v zgoraj opisanih situacijah.(10).

### 5.2 Pacienti z antikoagulantno terapijo

Prejemanje antibiotika intramuskularno pri teh pacientih ni priporočljivo. Antibiotik naj jemljejo oralno, vedno kadar je to mogoče. Pacienti

prejmejo antibiotik intramuskularno, kadar zdravila ne morejo absorbirati ali jemati oralno (10).

### 5.3 Pacienti, ki čakajo na operacijo srca

Tem pacientom je potrebno zagotoviti natančen pregled in sanacijo zob pred operacijo srca. S temi ukrepi zmanjšamo možnosti za nastanek endokarditisa po operaciji (10).

## 6 Zaključki

Veliko večja je verjetnost, da pride do infekcijskega endokarditisa zaradi vsakodnevnih dejavnosti (ščetkanje zob, nitkanje, uporaba zobotrebcev), kot zaradi zobozdravniških posegov.

Antibiotična profilaksa bi lahko pri zobozdravniških pacientih preprečila le neznamen delež infekcijskih endokarditsov, četudi bi bila 100% učinkovita.

Antibiotična zaščita se ne priporoča pri vseh pacientih, ki imajo večjo verjetnost, da zbolijo za IE in se priporoča samo pri boleznih, kjer je verjetnost za IE s hujšimi posledicami večja.

Antibiotično zaščito pred IE predpišemo pri posegih, ko obstaja verjetnost prehodne bakterijemije. Torej pri vseh kirurških posegih dlesni, pri posegih v periapikalni prostor in pri perforaciji oralne sluznice.

Nevarnost neupravičene uporabe, stranski učinki in široka odpornost mikororganizmov na antibiotike, se zdi veliko večja, kot morebitne prednosti zaščite.

Med strokovnjaki ni enotnega mnenja glede uporabe antibiotične zaščite, potrebne so nadaljne raziskave, ki jim bodo sledile nove nadgradnje protokola zaščite. Objavljene slovenske smernice za zaščito pred IE so drugačne od novega AHA protokola, vendar bodo v kratkem objavljene nove uradne smernice, ki naj bi se ujemale z opisanimi AHA priporočili.

## 7 Literatura

- Glassman G. Root canal cover up exposed: the resurgence of the refuted focal infection theory. *Oral Health* 1998;88(12):3.
- Cowper T. Pharmacologic management of the patient with disorders of the cardiovascular system: infective endocarditis. *Dent Clin North Am* 1996;40:611-47.
- Lewis T, Grant RT. Observations relating to subacute infective endocarditis. *Heart* 1923;10:21-77.
- Harris R, Kelly MA. Antibiotic prophylaxis of the dental patient. *Gen Dent* 1990;38:212-5.
- Asikainen S, Alaluusua S. Bacteriology of dental infections. *Eur Heart J* 1993;14 (suppl K):43-50.
- Burnette-Curley D, Wells V, Viscount H, et al. FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis* endocarditis. *Infect Immun* 1995;63(12):4669-74.
- Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis, part II: survival of a bacteria in endocardial vegetations. *Br J Exp Pathol* 1972;53(1):50-3.
- Taylor E, ed. *Dorland's illustrated medical dictionary*. 27th ed. Philadelphia: Saunders; 1988:552.
- Yagiela J. Prophylactic antibiotics: cardiac and prosthetic considerations. *J Calif Dent Assoc* 1995;23:29-40.
- Walter Wilson, Kathryn A. Taubert, Michael Gewitz, Peter B. Lockhart, Larry M. Baddour, Matthew Levison, et al. A guideline from the American Guidelines from the American Heart Association for the prevention of infective endocarditis. *J Am Dent Assoc* 2008;139:3S-24S.
- Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, et al. Prevention of bacterial endocarditis: recommendations by the American Heart Association. *JAMA* 1997;277(22):1794-1801.
- Wynn R, Meiller TF, Crossley HL. New guidelines for the prevention of bacterial endocarditis: American Heart Association. *Gen Dent* 1997;45:426-34.
- Dajani A, Bawdon RE, Berry MC. Oral amoxicillin as a prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? *Clin Infect Dis* 1994;18:157-60.
- Hope R, Longmore JM, McManus JK, et al. *Oxford handbook of clinical medicine*. 4th ed. Oxford, England: Oxford University Press; 1998:306.
- Durack DT. Antibiotics for prevention of endocarditis during dentistry: time to scale back? *Ann Intern Med* 1998;129:829-31.
- Guntheroth WG. How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *Am J Cardiol* 1984;54:797-801.
- Strom BL, Abrutyn E, Berlin JA, et al. Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis: a population-based, case-control study. Durack DT, Kaplan EL, Bisno AL. Apparent failures of endocarditis prophylaxis. *JAMA* 1983;250:2318-22.
- Oliver R, Roberts GJ, Hooper L. Penicillins for the prophylaxis of bacterial endocarditis in dentistry. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(2):CD003813.
- Everett ED, Hirschmann JV. Transient bacteremia and endocarditis prophylaxis: a review. *Medicine (Baltimore)*. 1977;56(1):61-77.
- Horstkotte D, Rosin H, Friedrichs W, Loogen F. Contribution for choosing the optimal prophylaxis of bacterial endocarditis. *Eur Heart J* 1987;8(supplement J):379-81.
- Imperiale TF, Horwitz RI. Does prophylaxis prevent postdental infective endocarditis? A controlled evaluation of protective efficacy. *Am J Med* 1990;88(2):131-6.
- van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands, part II: antecedent procedures and use of prophylaxis. *Arch Intern Med* 1992;152(9):1869-73.
- van der Meer JT, van Wijk W, Thompson J, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA, Michel MF. Efficacy of antibiotic prophylaxis for prevention of native-valve endocarditis. *Lancet* 1992;339(8786):135-9.
- van der Meer JT, van Wijk W, Thompson J, Valkenburg HA, Michel MF. Awareness of need and actual use of prophylaxis: lack of patient compliance in the prevention of bacterial endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1992;29(2):187-94.
- Duval X, Alla F, Hoen B, et al. Estimated risk of endocarditis in adults with predisposing cardiac conditions undergoing dental procedures with or without antibiotic prophylaxis. *Clin Infect Dis* 2006;42(12):e102-7.

27. Pallasch TJ, Slots J. Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol* 2000 1996;10:107-38.
28. Lockhart PB. The risk for endocarditis in dental practice. *Periodontol* 2000 2000;23:127-35.
29. Cobe HM. Transitory bacteremia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1954;7(6):609-15.
30. Sconyers JR, Crawford JJ, Moriarty JD. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *JADA* 1973;87(3):616-22.
31. Rise E, Smith JF, Bell J. Reduction of bacteremia after oral manipulations. *Arch Otolaryngol* 1969;90(2):198-201.
32. Schlein RA, Kudlick EM, Reindorf CA, Gregory J, Royal GC. Toothbrushing and transient bacteremia in patients undergoing orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99(5):466-72.
33. Faden HS. Dental procedures and bacteremia (letter). *Ann Intern Med* 1974;81(2):274.
34. Round H, Kirkpatrick HJR, Hails CG. Further investigations on bacteriological infections of the mouth. *Proc R Soc Med* 1936;29:1552-6.
35. Felix JE, Rosen S, App GR. Detection of bacteremia after the use of an oral irrigation device in subjects with periodontitis. *J Periodontol* 1971;42(12):785-7.
36. O'Leary TJ, Shafer WG, Swenson HM, Nesler DC, Van Dorn PR. Possible penetration of crevicular tissue from oral hygiene procedures, part I: use of oral irrigating devices. *J Periodontol* 1970;41(3):158-62.
37. Steckelberg JM, Wilson WR. Risk factors for infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7(1):9-19.
38. European Society of Cardiology Guidelines. *European Heart Journal* (2004) 00, 1-37
39. The Endocarditis Working Group of the International Society of Chemotherapy. Leport C. Antibiotic prophylaxis for infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 1998;4(Suppl 3):S56-61
40. Roberts GJ, Jaffray EC, Spratt DA, et al. Duration, prevalence and intensity of bacteraemia after dental extractions in children. *Heart* 2006;92(9):1274-7.
41. Lucas VS, Lytra V, Hassan T, Tatham H, Wilson M, Roberts GJ. Comparison of lysis filtration and an automated blood culture system (BACTEC) for detection, quantification, and identification of odontogenic bacteremia in children. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3416-20.



**FIDIMED**

*Z roko v roki  
že 15 let*

V želji, da bi imeli naši uporabniki še več možnosti za celovit strokovni nasvet, razširjamo Fidimedovo posvetovalnico.

**Iščemo**

**sodelavko/sodelavca za:**

- svetovanje po telefonu in
- vodenje baze uporabnikov.

**Pogoji in zaželeno osebne lastnosti kandidatke/kandidata:**

- ▶ končana Fakulteta za farmacijo,
- ▶ izkušnje s svetovanjem naravnih zdravil in prehranskih dopolnil,
- ▶ naklonjenost samozdravljenju,
- ▶ toplina, prijaznost, smisel za osebno obravnavo in
- ▶ poznavanje dela z računalnikom.

Nudimo delo za polovični delovni čas (štiri ure na dan) z možnostjo zaposlitve za polni delovnik.

Kandidatke in kandidate prosimo, da do 1. 11. 2009 pošljete prošnje z življenjepisom na [info@fidimed.si](mailto:info@fidimed.si) ali po pošti na naslov:

**Fimed, d. o. o., Brodišče 32, 1236 Trzin.**



## Navodila avtorjem

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

Strokovni **članki so recenzirani**, kar pomeni, da bodo avtorji oddali najmanj dve verziji besedila:

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

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

### Prva verzija

Predstavljajo jo:

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

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

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi inštitucij, v katerih so zaposleni,
- telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe ter
- izjavo, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo, ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji.

V primeru ponatisa slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje založbe, ki ima avtorske pravice. Rokopisi strokovnih člankov lahko obsegajo največ **20.000** znakov, vključno s presledki, obseg prispevkov za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja je lahko največ **6.000** znakov (vključno s presledki). Prispevki za rubriko osebne vesti ne smejo presežati **3.000** znakov (vključno s presledki). Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubilejih, smrti ali za posebne dosežke v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

### Vsebina

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

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

### Besedilo

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

### Slike in preglednice

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

### Vsako trditev

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

### Primer navajanja literature:

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

### Končna verzija

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

### Slike

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

### Naslov prispevka

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

### Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke avtorji **pošljejo na naslov**:

**dr. Petra Slanc Može, mag. farm.**  
glavna urednica Farmaceutskega vestnika  
e-pošta: [urednica-fv@sfd.si](mailto:urednica-fv@sfd.si)

### Tajništvo Farmaceutskega vestnika

Slovensko farmacevtsko društvo, Dunajska 184a, 1000 Ljubljana  
e-pošta: [tajništvo-fv@sfd.si](mailto:tajništvo-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 Farmaceutskega vestnika brezplačno. Članki so objavljeni tudi na spletni strani: [www.sfd.si](http://www.sfd.si) v pdf obliki.

#### Genigel

Najpogosteje priporočni stomatolog / medicinski pripomoček za boleznj dlesni

#### Novalac

Najpogosteje priporočena hrana za dojenčke

#### EkoVision

Najpogosteje priporočni vitaminski pripravek za oči

#### Fenistil

Najpogosteje priporočni topikalni antialergik / proti kožnim alergijam in pikom

#### Calcium-Sandoz forte

Najpogosteje priporočni pripravek s kalcijem

#### Lamisil

Najpogosteje priporočni antimikotik / proti glivicam na nogah



## STRNJENA VRSTA PRVOVRSTNIH

Kar 6 izdelkov družbe Medis farmacevti v lekarnah najpogosteje priporočijo. Vseh 6 je po neodvisni raziskavi uvrščenih na prvo mesto v svoji kategoriji.\* Zahvaljujemo se farmacevtom za priporočila in slovenskim uporabnikom za zvestobo.

\*Neodvisna raziskava o najpogosteje priporočenih izdelkih brez recepta v slovenskih lekarnah je bila izvedena po mednarodni metodi priznanega nemškega založnika Apotheken Spiegel Verlag, ki se že 10 let izvaja v Nemčiji, Avstriji in na Poljskem. Raziskava je v Sloveniji opravilo podjetje FarmAvis. Več informacij: [www.medis.si](http://www.medis.si)

**1** PRVO VRSTNO

 **MEDIS** dvajset let zdravih vrednot



# Hitro odpravi bolečino.

[www.nalgesin.si](http://www.nalgesin.si)



## Hitra rešitev.

Pri glavobolu, zobobolu,  
menstrualnih bolečinah,  
bolečinah v mišicah  
in sklepih.

KRKA

[www.krka.si](http://www.krka.si)

KRKA

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

Nalgesin S vsebuje naproksen natrij.

Pred uporabo natančno preberite navodilo!  
O tveganju in neželenih učinkih se posvetujte z zdravnikom ali s farmacevtom.