

Farmaceutski vestnik 3

Š T 3 . J U N I J 2 0 1 0 . L E T N I K 6 1

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA



Pot do zdravja

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

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si



Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 3 • J U N I J 2 0 1 0 • L E T N I K 6 1

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Petra Slanc Može

Uredniški odbor

Janja Marc

Lucija Peterlin Mašič

Alenka Rutar Pariš

Andrijana Tivadar

Jurij Trontelj

Matjaž Tuš

Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mirjana Gašperlin

Mojca Prah Klemenčič

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

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

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

Letnik 2010 sofinancira Javna agencija za knjigo Republike Slovenije.

UVODNIK

V dnevih od 13. do 15. maja je v Portorožu potekala tradicionalna 35. skupščina Slovenskega farmacevtskega društva s spremljajočimi simpoziji: duševne motnje, debelost in motnje hranjenja ter okrogla miza o generičnem predpisovanju zdravil, na katerem so aktivno sodelovali pripravljavci novega amandmaja, ki bo verjetno ključen v spremembo Zakona o zdravilih, mnenja so predstavili farmacevti, zdravniki, ter predstavniki društva bolnikov. Na osnovi predstavitve in aktivnega sodelovanja vseh udeležencev okrogle mize, ki so uporabili za izražanje mnenja elektronske glasovalnice, smo prišli do sklepov, da je uvedba generičnega predpisovanja izjemno kompleksna sprememba, ki ji najbolj nasprotujejo bolniki, do njega pa so kritične tudi skoraj vse veje farmacije in medicine. Poglobljena analiza bo predstavljena v naslednji številki Farmaceutskega vestnika.

Današnja številka Farmaceutskega vestnika prinaša tri članke iz področja klinične biokemije, ki je eno od zelo pomembnih področij farmacije, na kar moramo biti ponosni, saj smo ena od redkih držav, kjer je tako izobraževalni del, kot tudi strokovno in znanstveno udejstvovanje kliničnih biokemikov del farmacije. Prvi članek predstavlja prvo slovensko javno banko popkovnične krvi, nato sledi članek o zunajceličnih nukleinskih kislinah ter nato članek avtorjev Jasne Omersel in prof. dr. Boruta Božiča o mehanizmih nastanka avtoimunosti in pomenu redoks procesov. V članku kolegov iz področja biofarmacije je predstavljen članek o korelacijah v pogojih »in vivo« in »in vitro« pri učinkovinah v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo, tehnologije pa so pripravili pregled razvoja naprav za oblaganje delcev. V zadnjem prispevku pa kolegica Katja Berginc in prof. dr. Albin Kristl s farmakološkega vidika predstavita vpliv različnih česnovih pripravkov.

Ker imate v rokah zadnjo številko pred dolgim, vročim poletjem, želim vsem bralcem Farmaceutskega vestnika aktivno, prijetno in sproščujoče dopustovanje.

Prof. dr. Borut Štrukelj

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Metka Krašna, Janez Jazbec, Peter Černelč, Dragoslav Domanović

Slovenska javna banka popkovnične krvi
Slovenian public cord blood bank

139

Darko Černe

Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin
v laboratorijski medicini
Contemporary use of cell-free nucleic acids analysis in laboratory medicine

144

Jasna Omersel, Borut Božič

Avtoimunost - mehanizmi in pomen redoks procesov
Autoimmunity - mechanisms and significance of redox processes

149

Matevž Luštrik, Rok Dreu, Stane Srčič

Primerjava in razvoj naprav za oblaganje delcev
Comparison and development of particle coating devices

155

Uroš Klančar, Igor Legen, Albin Kristl, Aleš Mrhar

»In vitro-in vivo« korelacija (IVIVC) za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem,
ki se intenzivno metabolizirajo ali absorbirajo s prenašalci v prebavilih
*In vitro in vivo correlation (IVIVC) for drugs in extended release formulations which are
extensively metabolized or absorbed with transporters*

162

Katja Berginc, Albin Kristl

Farmakološki učinki česnovih pripravkov in njihove interakcije z zdravilnimi učinkovinami
The pharmacological effects of garlic supplements and their interactions with prescribed therapy

171

Zanimivosti iz stroke

Maruša Hribar

65. mednarodni homeopatski kongres
'Liga Homeopatica'

177

Društvene novice

Simpozij in 35. skupščina SFD

179

Slovenska javna banka popkovnične krvi

Slovenian public cord blood bank

Metka Krašna, Janez Jazbec, Peter Černelč, Dragoslav Domanović

Povzetek: Javna banka popkovnične krvi je nepridobitna organizacija, ki obdeluje in shranjuje darovano nesorodno popkovnično kri (PK), iz katere zagotavlja celične pripravke za zdravljenje nekaterih krvnih in metabolnih bolezni, pri katerih bolniki potrebujejo presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC). V slovensko banko je v prvem letu in pol darovalo PK 833 žensk, glede na standardne kriterije pa smo shranili 267 (32%) enot PK. V zadnjih treh mesecih je PK darovalo približno 80 oseb na mesec, v povprečju pa smo od teh mesečno shranili 24 enot. Mediana števila levkocitov v pripravkih PK pred zamrzovanjem je bila 977×10^6 ($n = 125$; od 507×10^6 - 2631×10^6). Učinkovitost zbiranja levkocitov z aparatom Sepax pa je bila v povprečju 74% ($n = 44$; 38 - 94%). V bližnji prihodnosti nameravamo delovanje javne banke PK akreditirati pri mednarodnem registru EuroCord in s tem zagotoviti učinkovite pripravke, ki bodo dosegali standarde NetCord-FACT.

Ključne besede: Popkovnična kri; krvotvorne matične celice; zamrzovanje celic; javna banka popkovnične krvi

Abstract: The public cord blood bank is a non-profit organization that processes and stores donated unrelated cord blood for haematopoietic stem cell transplantations. In the past year and half, 833 women donated cord blood to our bank, of which 267 units (32%) were stored. In the past three months, an average of 80 parents per month donated cord blood and 24 units per month were cryopreserved. The median number of leukocytes per cord blood unit prior cryopreservation was 977×10^6 ($n = 125$; 507×10^6 - 2631×10^6). The mean recovery of leukocytes after processing the cord blood with the Sepax cell separation system was 74% ($n = 44$; 38 - 94%). We are planning to start the accreditation process at the international registry EuroCord to achieve consistent production of high quality cord blood products that will comply with NetCord-FACT standards.

Keywords: Cord blood, haematopoietic stem cells, cell freezing, public cord blood bank

1 Uvod

Slovensko banko popkovnične krvi smo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino ustanovili aprila 2008 v okviru Enot za shranjevanje popkovnične krvi. V njej shranjujemo nesorodno PK, po naročilu zdravnikov pa tudi sorodno PK, ki jo pridobijo s tako imenovanim usmerjenim odvzemom. Prvič smo v Sloveniji shranili sorodno PK 15.11.1999, ki so jo po naročilu Pediatrične klinike v Ljubljani odvzeli novorojencu za morebitno zdravljenje sorojenca z aplastično anemijo.

Delovanje banke smo zasnovali po mednarodnem standardu NetCord-FACT, ki predpisuje načine zbiranja, obdelave, testiranja, shranjevanja, izbiranja in sproščanja PK (1). V prihodnjih letih nameravamo pridobiti ta standard in s tem potrditi kakovost in učinkovitost pripravkov. Slovenska zakonodaja od leta 2007 ureja to področje z Zakonom o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC) in pripadajočimi pravilniki (2). Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke pa je uradni organ, ki to področje nadzira.

PK, kostni mozeg in periferna kri, po predhodni farmakološki stimulaciji, so lahko viri krvotvornih matičnih celic (KMC) za zdravljenje nekaterih

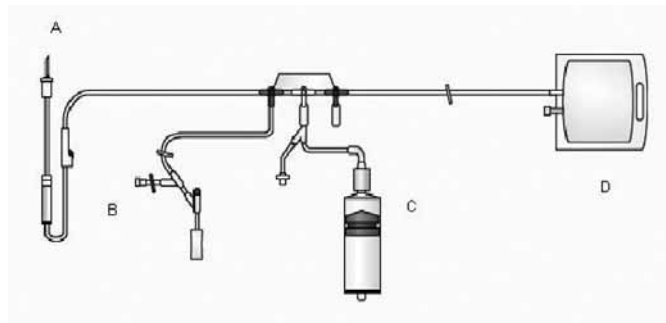
bolezni, pri katerih bolniki nujno potrebujejo presaditev KMC, da bi lahko preživel. Najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na uspešnost presaditve KMC, sta število presajenih celic CD34+ in skladnost tkivnih antigenov HLA med darovalcem in prejemnikom celic. Kostni mozeg sicer vsebuje več jedrnih celic in med njimi tudi celic CD34+ (1 do 3% vseh jedrnih celic) kot PK (0,01 do 1,0%), toda celice iz PK, zaradi svoje funkcionalne nezrelosti, redkeje povzročijo akutno bolezen presadka proti gostitelju, imajo večjo zmožnost pomnoževanja, vsebujejo več imunsko naivnih celic (3) in imajo daljše telomere (4, 5). Različne javne banke, glede na stroške delovanja, same določijo minimalno število jedrnih celic, ki jih mora vsebovati PK, da jo sprejemo v banko, nadaljujejo z obdelavo in zamrznejo. Tako na primer javna banka v Milanu shrani le tiste enote, ki vsebujejo najmanj 1000×10^6 jedrnih celic (6), v Madridu 800×10^6 celic (7), ter 500×10^6 celic v Mannheimu (8). Prav število jedrnih celic v PK omejuje njeno klinično uporabnost, ki je omejena na telesno težo bolnika. Pri tem namreč velja, da je za uspešno zdravljenje potrebno presaditi najmanj 2×10^7 živih jedrnih celic na kilogram telesne teže prejemnika (9). Zato lahko s PK, ki ima veliko jedrnih celic, zdravimo tudi bolnike z večjo telesno maso.

Italijansko združenje bank popkovnične krvi (GRACE) poroča, da v povprečju za zdravljenje letno izdajo 1 do 2% shranjenih enot PK (10), prodajna cena posamezne enote pa je 17.000 EUR (11). Višina slednje je razumljiva, saj zaradi velikih stroškov obdelave, testiranja, shranjevanja in razvoja, javne banke le na takšen način lahko pokrivajo stroške svojega delovanja (12). Tako je Pediatrična klinika v Ljubljani za zdravljenje dveh svojih bolnikov plačala PK, ki so ju prejeli iz bank v tujini, po 16.060 EUR in 30.560 USD.

Na področju pomnoževanja celic iz PK poteka več raziskav, saj bi želeli povečati klinično uporabnost pripravkov (13-15), pri čemer nekateri že poročajo o dobrih kliničnih rezultatih (16).

2 Odvzem, obdelava in shranjevanje popkovnične krvi

Nosečnice približno v 34. tednu nosečnosti izpolnijo prijavnico in podpišejo privolitev za darovanje PK. Babice ali porodničarji ob porodu, še pred porodom posteljice, odvzamejo in zberejo popkovnično kri v vrečko z 21 mL antikoagulantom CPD (citrat, fosfat, dekstroza). PK odvzamejo tako pri vaginalnem kot pri porodu s carskim rezom. Kurir jo nato pri temperaturi od 2 do 24°C dostavi v našo banko, kjer jo analiziramo, obdelamo in shranimo.



Slika 1: Sterilni sistem za enkratno uporabo za ločevanje celic v popkovnični krvi z aparatom Sepax. A - vbojna igla za vrečko s popkovnično krvjo; B - priključek za zamrzovalno vrečko, kjer se zberejo jedrne celice; C - centrifuga; D - vrečka, kjer se zbere plazma.

Figure 1: A Sterile single-used system for cord blood cell separation with Sepax machine. A - spike for cord blood bag; B - connection port for freezing bag for collection of nucleated cells; C - centrifuge; D - plasma collection bag.

Najprej določimo volumen PK in preverimo, da ni minilo več kot 48 ur od poroda. S hematološkim analizatorjem (Cell-DYN 3200, Abbott) določimo krvno sliko in preverimo skupno število jedrnih celic. Če je PK vsebuje več kot 750×10^6 levkocitov (skupaj z retikulociti), oziroma je od njenega odvzema minilo več kot 48 ur, nadaljujemo z obdelavo, drugače pa kri uničimo. 750 milijonov levkocitov zadošča za zdravljenje vsaj 25 kg osebe, oziroma zdravi se lahko tudi težje, če vsebuje PK še več celic. S prvim aprilom 2009 smo zvišali minimalno, še sprejemljivo število levkocitov na 900×10^6 , ker smo uvedli nov postopek obdelave PK, ki vsebuje ločevanje celic in koncentriranje levkocitov z aparatom Sepax (Slika 1) (Biosafe, Švica). Pri tem uporabljamo program UCB, ki nam omogoča pripravo levkocitnega



Slika 2: Računalniško voden zamrzovalnik za programirano zamrzovanje s pomočjo tekočega dušika.

Figure 2: Programmable freezer for controlled - rate liquid nitrogen freezing.



Slika 3: Zamrzovalnik na tekoči dušik, kjer so shranjeni zamrznjeni pripravki popkovnične krvi.

Figure 3: Liquid nitrogen freezer for storage of cryopreserved cord blood products.

Preglednica 1: Analiza popkovnične krvi.**Table 1:** Analysis of cord blood.

Vrsta analize
1. volumen pripravka
2. št. levkocitov, retikulocitov
3. št. celic CD34+
4. hematokrit
5. krvna skupina AB0, RhD
6. abnormalni hemoglobini
7. št. klonogenih krvotvornih celic (CFC)
8. genotipizacija HLA (A,B, DRB1)
9. živost celic
10. rast anaerobnih in aerobnih mikroorganizmov

Preglednica 2: Seznam potencialno prisotnih patogenov, ki jih preverimo v materini krvi.**Table 2:** List of potentially present pathogens determined in maternal blood.

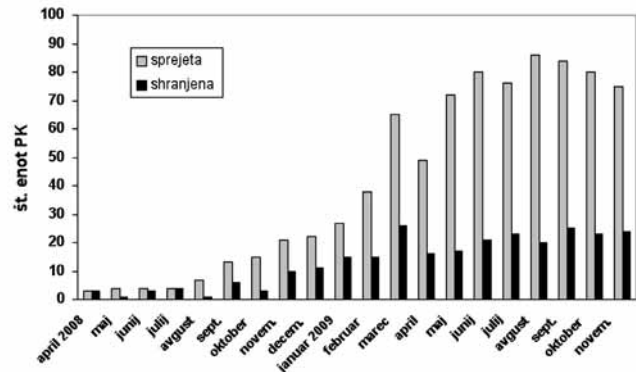
Vrsta označevalca
1. anti-HIV1/2 in p24 Ag (virus HIV)
2. HBsAg, anti-HBc (virus hepatitisa B)
3. anti-HTLV I / II (humani T limfotropni virus)
4. anti-HCV (virus hepatitisa C)
5. anti- <i>Treponema pallidum</i>
6. anti-CMV IgM in IgG (citomegalovirus)
7. NAT testiranje HBV DNA, HCV RNA in HIV 1 RNA (NAT- nucleic acid amplification technology)

pripravka z izbranim končnim volumnom 27 mL. Polno PK ali pa levkocitni pripravek zamrzujemo v raztopini krioprotektorja, sestavljeno iz 10% DMSO (WAK-Chemie) in 5% humanega albumina (Octapharma) v računalniško vodenem zamrzovalniku (Slika 2) (Nicool plus, Air Liquide), ki je v določenih temperaturnih intervalih zamrzuje s hitrostjo: $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od 0 do $-5,5^{\circ}\text{C}$, $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od $-5,5$ do -40°C in $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od -40 do -130°C . Zamrznjene pripravke trajno shranjujemo pri temperaturi od -150°C do -196°C v parah tekočega dušika ali v samem tekočem dušiku (Slika 3) in jih nameravamo shranjevati neomejeno dolgo. Vsem shranjenim pripravkom PK določimo biološke lastnosti, ki jih prikazuje Preglednica 1, poleg tega pa preverimo tudi pripadajočo materino kri (Preglednica 2).

3 Delovanje javne banke popkovnične krvi

V prvem letu in pol delovanja (april 2008 - november 2009) je v Slovensko javno banko darovalo popkovnično kri 833 mater iz vseh porodnišnic v Sloveniji. Od teh smo, skladno s kriteriji, shranili 267 enot (32%), ostale pa smo zaradi premajhnega števila levkocitov, prisotnosti mikroorganizmov ali pa prekoračitve časovnega intervala 48 ur od odvzema do zamrzovanja, uničili. Le dva vzorca od 267 (0,7%) sta bila pozitivna na prisotnost bakterij, kar govori o dobri aseptični tehniki zbiranja in obdelave PK. V okuženih vzorcih smo izolirali *Bacteroides vulgatus*, *Escherichia coli* in *Enterococcus faecalis*. Iz drugih bank poročajo, da imajo približno 2% takih vzorcev (17). Šestinsitideset

vzorcem smo določili genotipe HLA, vendar nimamo v svetovni register vpisanega še nobenega vzorca, saj nam to preprečujejo težave pri vpeljavi novega informacijskega sistema, ki bo povezal slovenski register s svetovnim BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide). Povprečno število levkocitov v enoti PK po obdelavi in pred zamrzovanjem je bilo 1061×10^6 , mediana 977×10^6 ($n = 125$; od 507×10^6 do 2631×10^6). Učinkovitost zbiranja levkocitov z aparatom Sepax je bila v povprečju 74% ($n = 44$; od 38% do 94%). V enem od 267 pregledanih vzorcev PK smo odkrili abnormalni hemoglobin (HbH,

**Slika 4:** Prikaz števila darovalcev popkovnične krvi za javno banko in število shranjenih enot po mesecih.**Figure 4:** Number of mother who donated cord blood to the Slovenian public cord blood bank and number of cryopreserved units, per month.

0,3%). Matere vseh novorojencev, katerih PK smo shranili, so imele ustrezne virusne označevalce (negativne rezultate testov za okužbo z HIV 1/2, HTLV I/II, hepatitis B in C) ter negativen izvid za bakterijo *Treponema pallidum*.

Kljub odsotnosti načrtnega obveščanja širše javnosti o naši dejavnosti, kar je posledica prostorske, finančne in kadrovske stiske, se je število darovalk iz meseca v mesec povečevalo. V zadnjih treh mesecih je v povprečju darovalo 80 oseb na mesec, shranili pa smo jih v povprečju 24 na mesec (Slika 4). Zasebne pridobitne banke, ki delujejo v Sloveniji, so v preteklem letu v različnih medijih pogosto oglaševale svoje storitve, zato se je verjetno tudi zanimanje za krvotvorne matične celice in darovanje povečevalo. Delovanje banke podpira računalniški program StemLab (StemSoft Software Inc.), ki vsaki sprejeti enoti PK dodeli identifikacijsko številko in omogoča sledljivost darovalcev (novorojencev), njihovih mater in pripravkov.

Po naročilu zdravnikov shranjujemo tudi sorodno PK (t. i. usmerjeni odvzem). Trenutno imamo shranjenih 14 enot, od leta 1999 do danes pa smo jih shranili 19. Najpogostejši naročnik te storitve je bila Pediatrična klinika, sledi Hematološka klinika v Ljubljani in drugi. Indikacije za usmerjen odvzem so bile različne rakave bolezni pri sorojencih. Ker je zdravljenje s PK v Sloveniji razmeroma novo področje, je potrebno izdelati smernice za usmerjeni odvzem PK. Otroški onkologi zagovarjajo stališče, da je usmerjen odvzem PK indiciran v primeru, da se sorojenec novorojenega otroka, katerega PK bi shranili, zdravi zaradi bolezni, za katero je po trenutnih smernicah

EBMT (Evropska skupina za presajanje krvotvornih matičnih celic) alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic rutinska metoda zdravljenja (18,19). V takih primerih, bi torej moralo biti zbiranje in shranjevanje PK za bolnikovo družino brezplačno. Zaenkrat ostaja nerešeno tudi vprašanje trajanja shranjevanja za ta namen zbrane PK. Ena od možnih rešitev bi bila, da je shranjevanje take enote PK za družino in druge potencialne uporabnike brezplačno za obdobje do pet let po zaključenem zdravljenju boleznii sorojenca, za katerega je bila enota PK zbrana. Po preteku tega obdobja pa bi se družina lahko odločila ali prevzame stroške nadaljnjega shranjevanja ali pa se enoto PK uniči, saj zaradi krvnih bolezni v ožji družini, ni primerna za prenos in javno banko PK.

4 Klinične izkušnje pri presaditvi popkovnične krvi

Prvo nesorodno PK smo v Sloveniji presadili leta 2004 pri enoletnem dečku z mielodisplastičnim sindromom (MDS). Do danes smo v Sloveniji presadili dve nesorodni PK, ki sta jih priskrbeli tuji javni banki, in nobene avtologne. V obeh primerih je presaditev potekala brez nepričakovanih zapletov. Podaljšan čas do vzpostavitve trombopoeze, ki smo ga opazovali v obeh primerih, je posebnost, ki je znana in opisana značilnost presaditve PK. Kljub uspešni presaditvi, je v obeh primerih prišlo razmeroma zgodaj do ponovitve bolezni. V prvem primeru je MDS hitro napredoval v akutno mieloblastno levkemijo. Pri drugem dečku, ki je imel v osnovi akutno limfoblastno levkemijo z visokim tveganjem za relaps, pa je do ponovitve bolezni prišlo znotraj prvih šestih mesecev po presaditvi. Ponovitev osnovne bolezni v obeh dosedanjih primerih, je lahko povezan z dejstvom, da je imunski učinek presadka, ki ga imenujemo tudi učinek presadka proti levkemiji, pri presaditvi PK manj izražen, kot pri presaditvi krvotvornih matičnih celic, pridobljenih s standardnimi postopki, od sorodnih in nesorodnih dajalcev. Podatki EuroCorda kažejo, da je preživetje bolnikov po presaditvi odvisno od vrste osnovne bolezni in stanja bolnikov ob presaditvi in je v povprečju od 27 do 100% (20).

5 Novosti in prihodnost pri zdravljenju s popkovnično krvjo in shranjevanju KMC

Glavna pomanjkljivost PK, ki preprečuje njeno širšo uporabo, je relativno majhno število KMC, zato jih poskušajo v ustreznih gojiščih *in vitro* pomnožiti do števila, ki bo omogočilo zdravljenje tudi odraslih bolnikov z večjo telesno maso. Žal pa pri pomnoževanju *in vitro* matične celice pogosto izgubijo značilne lastnosti in se diferencirajo v potomke matičnih celic, na primer v različne prednice krvnih celic. Te imajo omejeno zmožnost pomnoževanja, vendar kljub temu doprinesejo k hitrejši obnovitvi presajenih matičnih celic (21-24). Zato zaenkrat zdravljenje s pomnoženimi matičnimi celicami *in vitro* poteka tako, da bolniku presadijo dve enoti; eno s pomnoženimi celicami in drugo z ne-pomnoženimi. Pri tem pa sta lahko enoti od enega darovalca PK (16,21,25) ali pa od dveh (26). Prav zaradi možnosti pomnoževanja celic je pomembno, da posamezno enoto PK shranimo v več vrečkah ali vialah.

Nov pristop k učinkovitejšemu sprejemanju in delovanju presadka KMC nekateri vidijo v uporabi haploidentičnih (polovično tkivno skladnih) mezenhimskih matičnih celic, ki jih osamijo iz kostnega mozga in pomnožijo *in vitro* ter presadijo hkrati s KMC iz nesorodne PK (27). Mezenhimske matične celice naj bi po presaditvi pospešile sprejetje KMC zaradi svojega imunsko supresivnega učinka (28). Ugotovili so tudi, da lahko na hitrejše sprejetje presajenih KMC vpliva tudi neposreden vnos KMC preko črevnice v kostni mozeg (direct intra bone transplantation) (29,30).

Shranjevanje KMC v zamrzovalnikih s tekočim dušikom je velik strošek, zato poskušajo razviti nove načine dolgotrajnega shranjevanja celic. Postopek liofilizacije KMC, ki jih nato shranjujejo pri 2 – 8°C, je patentirala in objavila izraelska skupina strokovnjakov (31). Poročajo o dobrih rezultatih *in vitro*, na izsledke kliničnih raziskav pa bo potrebno še počakati.

6 Zaključek

Nesorodna popkovnična kri se že vrsto let uspešno uporablja za zdravljenje nekaterih malignih in nemalignih krvnih bolezni. Raziskave, s katerimi preučujejo primernost PK za zdravljenje drugih bolezni (nevrolške bolezni, diabetes tip 1), oziroma za potrebe regenerativne medicine, zaenkrat potekajo predvsem na živalskih modelih, zato lahko pričakujemo, da bo v prihodnosti objavljenih tudi več rezultatov kliničnih aplikacij na ljudeh, iz katerih bodo lahko nastale nove smernice za zdravljenje z matičnimi celicami (32-37).

7 Literatura

1. NETCORD-FACT International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection, and release. International NetCord foundation. Foundation for the accreditation of cellular therapy. Third Edition, December 2006.
2. Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC). Uradni list RS, št. 61/2007.
3. Ballen KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005; 105:3786-92.
4. De Pauw ES, Verwoerd NP, Duinkerken N, Willemze R, Raap AK, Fibbe WE, Tanke HJ. Assessment of telomere length in hematopoietic inter-phase cells using *in situ* hybridization and digital fluorescence microscopy. *Cytometry*. 1998;32:163-9.
5. Pipes BL, Tsang T, Peng SX, Fiederlein R, Graham M, Harris DT. Telomere length changes after umbilical cord blood transplant. *Transfusion*. 2006;46:1038-43.
6. Lecchi L, Perego L, Garcea F, Ratti I, Brasca M, Dotti D, Cimoni S, et al. Ten-year quality control of a semiautomated procedure of cord blood unit volume reduction. *Transfusion*. 2009;49:563-9.
7. Bornstein R, Flores AI, Montalbán MA, del Rey MJ, de la Serna J, Gilsanz F. A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. *Stem Cells*. 2005;23:324-34.
8. Eichler H, Meckies J, Schmut N, Kern S, Klüter H, Zieger W. Aspects of donation and processing of stem cell transplants from umbilical cord blood. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2001;205:218-23.
9. Gluckman E. Cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:808-12.
10. Sirchia G, Rebulla P, Tibaldi S, Lecchi L. Cost of umbilical cord blood units released for transplantation. *Transfusion*. 1999;39:645-50.
11. Recepimento dell'Accordo tra il Ministro della Salute, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante: "Aggiornamento del prezzo unitario di cessione del sangue e degli emocomponenti tra servizi sanitari pubblici" – 24 luglio 2003. DELIBERAZIONE N. VII / 15690 DEL 18.12.2003.
12. Rubinstein P. Why cord blood? *Hum Immunol*. 2006;67:398-404.

13. Lazzari L, Lucchi S, Montemurro T, Porretti L, Lopa R, Rebulla P, Sirchia G. Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:693-8.
14. Beshlawy AE, Metwally HG, Khalek KA, Hammoud RF, Mousa SM. The effect of freezing on the recovery and expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Exp Clin Transplant.* 2009;7:50-5.
15. Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, Kidd S, Ramin S, Paganessi LA, Gregory SA, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion.* 2008;48:2638-44.
16. De Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson BS, Hosing C, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:771-8.
17. Kurtzberg J, Cairo MS, Fraser JK, Baxter-Lowe L, Cohen G, Carter SL, Kernan NA. Results of the cord blood transplantation (COBLT) study unrelated donor banking program. *Transfusion.* 2005 Jun;45(6):842-55.
18. Smernice Evropske skupine za presajanje krvotvornih matičnih celic. <http://www.ebmt.org/1/WhatisEBMT/whatisebmt2.html>
19. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirel T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, et al; European Group for Blood and Marrow. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:439-49.
20. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica.* 2009;94:451-454.
21. Kögler G, Nürnberger W, Fischer J, Niehues T, Somville T, Göbel U, Wernet P. Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:397-403.
22. Williams DA. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells -robbing Peter to pay Paul? *Blood.* 1993;81:3169-72.
23. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood.* 1993;82:2664-72.
24. McNiece IK, Almeida-Porada G, Shpall EJ, Zanjani E. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol.* 2002;30:612-6.
25. Jaroscaj J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, Howrey R, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase I trial using the AastromReplicell System. *Blood.* 2003;101:5061-7.
26. Delaney C, Brashem-Stein C, Voorhies H, Gutman J, Dallas M, Heimfeld S, Bernstein ID. Notch-Mediated Expansion of Human Cord Blood Progenitor Cells Results in Rapid Myeloid Reconstitution in Vivo Following Myeloablative Cord Blood Transplantation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2008; 112: 212.
27. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:447-54.
28. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, Locatelli F, Fibbe WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;110:2764-7.
29. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood.* 2003;101:2905-13.
30. Frassoni F, Gualandi F, Podestà M, Raiola AM, Ibatici A, Piaggio G, Sessarego M, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 2008;9:831-9.
31. Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. *PLoS One.* 2009;4:e5240.
32. Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatric Research.* 2006; 59:244-249.
33. Kuh SU, Cho YE, Yoon DH, Kim KN, Ha Y. Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat. *Acta Neurochir.* 2005; 9:985-92.
34. Nishio Y, Koda M, Kamada T et al. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine.* 2006; 5:424-33.
35. Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy.* 2005;7:368-373.
36. Haller MJ, Wasserfall CH, McGrail KM, Cintron M, Brusko TM, Wingard JR et al. Autologous Umbilical Cord Blood Transfusion in Very Young Children With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:2041-6.
37. Harris DT. Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol.* 2009; 147:177-84.

Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini

Contemporary use of cell-free nucleic acids analysis in laboratory medicine

Darko Černe

Povzetek: Zunajcelične nukleinske kisline so nukleinske kisline, ki se nahajajo v plazmi, serumu, pa tudi v drugih bioloških vzorcih zunaj celic. Njihova analiza omogoča neinvaziven vpogled v tkivo oziroma organ, iz katerega zunajcelične nukleinske kisline izhajajo. V prispevku je predstavljena sodobna uporaba kvantitativne in kvalitativne analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. V prvem delu je na primeru pljučnega raka predstavljen kronološki razvoj različnih analitskih pristopov, v drugem pa uporaba na področju neinvazivne prenatalne diagnostike genskih in genomskih sprememb ploda ter bolezni oziroma zapletov v nosečnosti. V zadnjem delu prispevka so navedeni izbrani primeri uporabe na ostalih področjih laboratorijske medicine. Analiza zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini pomeni sodobno raziskovalno orodje, zanimiv strokovni izziv ter alternativo oziroma dopolnilo analitiki proteinov.

Ključne besede: *izvencelične nukleinske kisline, analiza, uporaba, laboratorijska medicina*

Abstract: Cell-free nucleic acids are nucleic acids in plasma, serum or in cell-free fraction of various others biological fluids. Their analysis offers noninvasive inspection of the tissue or organ of their origin. The paper reviews contemporary use of quantitative and qualitative analysis of cell-free nucleic acids in laboratory medicine. The first part summarises chronologic development of major analytical approaches to cell-free nucleic acids analysis in the case of medical assessment of lung cancer patients. The second part presents the use of cell-free nucleic acids analysis in noninvasive diagnosis of gene and genome alterations of the fetus and diseases and complications of pregnancy. The last part indicates the prominent examples of its use in the other areas of laboratory medicine. Cell-free nucleic acids analysis in laboratory medicine means a novel research tool, an interesting professional challenge and alternative or supplement to protein analysis.

Key words: *cell-free nucleic acids, analysis, applications, laboratory medicine*

1 Uvod

Zunajcelične nukleinske kisline (zNK in njihove podvrste, kot so zDNA, zRNA, zmRNA itd.) so nukleinske kisline, ki se nahajajo v plazmi, serumu, pa tudi v drugih bioloških vzorcih zunaj celic (urin, likvor, bronhialni izpirek itd.) (1-3). Odkrila sta jih Mandel in Metais leta 1947 (4). Dolgo neopaženo odkritje je ponovno pritegnilo pozornost v sedemdesetih letih, zaradi odkritja zvišanih koncentracij zDNA v plazmi bolnikov s sistemskim eritematoznim lopusom (*systemic lupusom erythematosusom*) in kasneje v serumih rakavih bolnikov, še posebej tistih z napredovano obliko bolezni. Proučevanje zNK se je znova razmahnilo v devetdesetih letih, z razvojem novih analitskih metod za kvalitativno analizo DNA in kasneje metod za analizo mRNA (2).

zNK imajo lastnosti celičnih NK, le da so fragmentirane. Tako na primer je zDNA dvoverižna, nizkomolekularna skupina molekul velikosti od 0,5 do 21kb, strukturno povezanih s histoni v mono- in oligonukleosomi. zNK se v plazmi lahko nahajajo v obliki apoptotičnih telesc, mono- in

oligo-nukleosomov, proste in vezane na plazemske proteine. Koncentracije zNK v telesnih tekočinah so rezultat ravnotežja mehanizmov sproščanja iz celic (fiziološka ali patološka apoptoza, liza, nekroza ali še ne dovolj pojasnjen mehanizem aktivnega izločanja) in mehanizmov odstranjevanja (razgradnja z endonukleazami, odstranjevanje s celicami retikuloendotelnega sistema in makrofagi). Mehanizmi odstranjevanja so zelo učinkoviti (razpolovna doba eksogenih nukleosomov v krvi je le nekaj minut), vendar pa vezava zNK na proteine proces močno upočasni. V plazmi zdravih ljudi sta nivoja koncentracije zDNA do 50 µg/L in zRNA do 250 µg/L, pri bolnikih pa lahko v obeh primerih preseže 3000 µg/L (3).

Analiza zNK omogoča neinvaziven vpogled v dogajanje v tkivu oziroma organu, iz katerega zNK izhajajo. Njihova analiza predstavlja alternativo oziroma dopolnilo k analitiki proteinov. Danes se intenzivno proučuje uporaba kvalitativne in kvantitativne analize zNK predvsem v tumorski in prenatalni diagnostiki. Najnovejše strokovne objave pa nakazujejo neizmerne potencialne možnosti nadaljnje uporabe.

Namen prispevka je predstaviti sodobno uporabo kvalitativne in kvantitativne analize zNK v laboratorijski medicini. V prvem delu je na primeru pljučnega raka predstavljen kronološki razvoj različnih analitskih pristopov. V drugem delu je predstavljena sodobna uporaba na področju neinvazivne prenatalne diagnostike genskih in genomskih sprememb ploda ter bolezni oziroma zapletov v nosečnosti. V zadnjem delu prispevka pa so navedeni izbrani primeri uporabe na ostalih področjih laboratorijske medicine.

2 Obravnava bolnika s pljučnim rakom

Pljučni rak je po stopnji smrtnosti med najbolj nevarnimi oblikami raka na svetu. Največji problem predstavlja pomanjkanje klinično uporabnih, učinkovitih, neinvazivnih metod za zgodnje odkrivanje ter presejanje asimptomatskih posameznikov z visokim tveganjem. Kvalitativna in kvantitativna analiza zNK odpira številne nove možnosti neinvazivne, zgodnje presejalne diagnostike bolezni, pridobivanja prognostičnih podatkov in sledenja uspešnosti zdravljenja (5, 6).

Različne pristope k analizi zNK pri obravnavi bolnikov s pljučnim rakom podaja Preglednica 1. Analitski pristopi v danem trenutku so bili povsem odvisni od stopnje razvoja metod v molekularni biologiji, zato ima pregled kronološki značaj. Najstarejši analitski pristop je merjenje koncentracije celotne zDNA v plazmi ali serumu, v katerem imajo bolniki s pljučnim rakom v primerjavi z zdravimi ljudmi zvišane koncentracije zDNA, še posebej pri napredovani bolezni z metastazami (7). Z razvojem kvalitativnih metod v molekularni biologiji je bilo ugotovljeno, da ima zDNA rakavih bolnikov enake spremembe kot DNA v tumorskem tkivu, iz katerega izhaja. Kvalitativna analiza zDNA je pomembno izboljšala diagnostično specifičnost metod, ki je bila najpomembnejši problem predhodnega analitskega pristopa. Med spremembami v zDNA so najprej proučevali mikrosatelitske nestabilnosti in izgubo heterozigotnosti, kasneje pa predvsem mutacije v onkogenih in tumor-supresorskih genih, ki so značilne za tumorsko tkivo (na primer v genu *kras* ali *tp53*). Kadar je mutacija prisotna v tumorskem tkivu, obstaja velika verjetnost njene prisotnosti tudi v zDNA v plazmi. V primeru tumor-supresorskega gena *tp53* je mutacija prisotna v tkivu in odgovarjajoči zDNA v 73,1 %. Zaradi nizke pogostosti posamezne mutacije v tumorskem tkivu je nov diagnostični pristop zajemal analizo več mutacij v zDNA iz plazme istočasno. Tako na primer so v zDNA iz plazme našli vsaj eno od šestih genskih sprememb pri 60,7 % bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, oziroma v 68,2 %, če upoštevamo le bolnike, ki so vsaj eno od omenjenih sprememb imeli istočasno tudi v tumorskem tkivu (8). Alternativa omenjenemu pristopu je analiza epigenetskih sprememb v zDNA. V zDNA v plazmi so našli hipermetilacijo gena *dap1* pri 39 % bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, vsaj eno spremembo (hipermetilacijo gena *dap1*, *rassf1* ali *pycard* ali mutacije gena *kras*) pa pri 74,5 % bolnikih oziroma v 82 %, če je bila vsaj ena od omenjenih sprememb istočasno prisotna tudi v tumorskem tkivu (9). Razvoj obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je omogočil nov analitski pristop. Omogočena je bila analiza tudi različnih podvrst zmRNA. Sprva so določali zmRNA genov izraženih pri mnogih vrstah tumorjev, kasneje pa zmRNA genov s specifičnim izražanjem v primeru pljučnega tumorja. Tako na primer so pri analizi seruma našli zmRNA gena *hnrnpa2b* pri 77,8 % bolnikih s pljučnim rakom in zmRNA

vsaj enega od genov *hnrnpa2b* in *erbb2* pri vseh bolnikih (10). Ista raziskovalna skupina je analizirala zmRNA omenjenih genov tudi v bronhialnem izpirku in dosegla podobne uspehe (11). Pri tem je pomembno predvsem spoznanje o možnosti analize zNK tudi v različnih drugih bioloških vzorcih (bronhialni izpirek, urin, likvor, peritonealni izpirek itd.). Nov razvojni korak je omogočila verižna reakcija s polimerazo v realnem času in možnost merjenja koncentracije za pljučni tumor specifičnih zmRNA. Pri bolnikih s pljučnim rakom so na primer izmerili višje plazemske koncentracije zmRNA gena *hnrnpa2b*, kot pri bolnikih z benignimi pljučnimi boleznimi in višje kot pri zdravih preiskovancih (12). Pri standardizaciji plazemske koncentracije zmRNA gena *hnrnpa2b* glede na izražanje gena za β -aktin so bile razlike med bolniki s pljučnim rakom in kontrolno skupino (bolniki z benignimi pljučnimi boleznimi, na primer tuberkulozo, in zdravi) še močnejše izražene (13). S tem je analiza zNK postala v osnovi podobna klasični analizi tumorskih označevalcev. Vzporedno s proučevanjem diagnostične uporabnosti novih analitskih pristopov na trenutni stopnji razvoja biološko-molekularnih analitskih metod se je proučeval tudi njihov prognostičen pomen ter možnosti za boljše spremljanje zdravljenja bolezni. Na primer, na področju farmakogenomike nam analiza zDNA v plazmi omogoča neinvazivno zaznavo bolnikov s pljučnim rakom rezistentnih na različne vrste kemoterapije (14).

3 Prenatalna diagnostika genskih in genomskih sprememb ploda ter bolezni oziroma zapletov v nosečnosti

Analiza zNK ploda v krvi matere (pzNK in njegove podvrste, kot so pzDNA, pzRNA, pzmRNA itd.) predstavlja večji izziv od analize zNK pri rakavih bolnikih. V krvni obtok matere se sprostijo iz apoptotičnih oziroma poškodovanih plodovih celic posteljice, na primer trofoblastov in eritroblastov. Z današnjimi analitskimi metodami jih lahko zaznamo v 4. tednu nosečnosti, zanesljivo pa od 7. tedna dalje (15). Proti koncu nosečnosti je v plazmi matere do 6 % pzDNA od celotne zDNA.

pzNK so specifičen in občutljiv označevalec genskih in genomskih sprememb ter genskega izražanja ploda. V primerjavi s horionsko biopsijo ali amniocentezo omogoča analiza zNK zgodnejšo in predvsem neinvazivno diagnostiko bolezni ploda s prav nič slabšo diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo (16). Je tudi obetavnejša od poskusov izolacije in analize intaktnih trofoblastov ali eritroblastov v krvi nosečnice (17). Posebnost pzNK je visoka fragmentiranost, kar v postopkih izolacije kratkoverižnih DNA izkoriščamo za koncentriranje pzDNA v primerjavi s celotno zDNA, žal pa to preprečuje detekcijo obsežnejših genskih sprememb ploda, kot so večje delecije ali vstavitve genov.

Primere zgodnje neinvazivne prenatalne diagnostike vrojenih in prirojenih bolezni ter genskega svetovanja z analizo pzNK navaja Preglednica 2. Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko imajo utečeno rutinsko določanje plodovega spola. Dokaz nukleotidnih sekvenc kromosoma Y v plazmi matere pomeni moški spol ploda in odsotnost nukleotidnih sekvenc ženski. Zgodnja diagnostika plodovega spola se uporablja za izključitev dedovanja na kromosom X vezanih recesivnih bolezni (hemofilija, mišična distrofija Duchenne,

adrenoleukodistrofija itd.), ki jih je vseh skupaj približno 5 na 10000 rojstev. Dokaz ženskega spola bolezen izključuje in zmanjša potrebo po invazivni prenatalni diagnostiki za 50 % (18). V primeru suma na kongenitalno adrenalno hiperplazijo zgodnja določitev plodovega moškega spola prepreči ali zmanjša nepotrebno zdravljenje s steroidi, ki se uporablja za preprečitev virilizacije pri ženskem plodu (19). Z novim diagnostičnim pristopom lahko zanesljivo določimo spol v primeru nenormalnega razvoja zunanjih spolnih organov, ko je ultrazvočna preiskava neuporabna. Analiza pzDNA omogoča relativno enostavno diagnostiko monogenskih prirojnih bolezni, ki se dedujejo avtosomno dominantno (Huntingtonova bolezen, ahondroplazija, miotonična distrofija), vendar le v primeru, če je bolezen prisotna pri očetu in materi bolezni nima. V primeru prisotnosti bolezni tudi pri materi pa je obvezna uporaba invazivnih diagnostičnih postopkov. Diagnostika avtosomnih recesivnih monogenskih bolezni s pomočjo analize pzDNA je močno omejena in sicer le na izključevanje dedovanja sicer redkih kombiniranih heterozigotnih oblik bolezni. Dokaz odsotnosti okvarjenega očetovega alela pri plodu, ki pa pri materi ne sme biti prisoten, pomeni odsotnost kombinirane heterozigotne oblike bolezni in izključuje potrebo po invazivni prenatalni diagnostiki v primeru bolezni kot so: cistična fibroza, β -talasemija, mnoge hemoglobinske variante – z izjemo hemoglobina S, kongenitalna adrenalna hiperplazija, pa tudi klasična oblika galaktozemije. S takšnim presejalnim pristopom lahko zmanjšamo potrebo po invazivni diagnostiki za 50 % (20). Analiza pzNK veliko obeta v diagnostiki aneuploidij. Kmalu bodo dosegljivi tudi prvi komercialno dostopni diagnostični testi (21). Diagnostika v tem primeru temelji na določitvi količinskega razmerja obeh alelov pri heterozigotnem polimorfizmu posameznega nukleotida (SNP). Predpogoj je analiza izključno genetskega materiala plodu in ne matere. Analiziran gen mora biti na kromosomu proučevane aneuploidije (v primeru diagnostike Downovega sindroma na kromosomu 21). Primer je kvantitativna analiza heterozigotnih SNP-ov v pmRNA gena *plac4* (gen se nahaja na 21. kromosomu, izražanje gena pa poteka le v posteljici in je odraz genskih lastnosti ploda).

Količinsko razmerje heterozigotnih SNP-ov 1:2 je dokaz Downovega sindroma, razmerje 1:1 pa pomeni, da sta kromosoma 21 dva, kar sindrom izključuje (22). Najnovejše instrumentalne tehnike (digitalna verižna reakcija s polimerazo, določanje zaporedja s kvantifikacijo števila oligonukleotidov) pa omogoča odkrivanje že najmanjših spremenjenih količinskih kromosomskih razmerij in sicer brez zahteve po heterozigotnosti SNP-a in/ali ločbe pzNK od zNK matere (23, 24).

Druga možnost prenatalne uporabe analize pzNK je neinvazivna diagnostika bolezni in zapletov v nosečnosti ter prognozična sklepanja in ocenjevanje uspešnosti zdravljenja (primere navaja drugi del Preglednice 2). Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko imajo utečeno rutinsko določanje RhD statusa ploda. Dokaz nukleotidnih zaporedij gena za RhD v plazmi RhD negativne matere opozarja na neskladnost v RhD med plodom in materjo (pojavi se v 10 % nosečnostih) in na potrebo po ustrezni imunoprofilaksi za preprečitev hemolitične bolezni ploda; po drugi strani dokazana odsotnost njeno potrebo izključuje. Nov diagnostičen pristop zmanjša nepotrebno uporabo imunoprofilakse za 40 % (25). Drug primer uporabe je diagnostika in spremljanje motenj v rasti in razvoju posteljice, med katerimi je najpomembnejša preeklampsija (pojavi se v 5-10 % nosečnostih). Koncentracija pzDNA v plazmi nosečnice poraste za 2 do 3-krat že pred pojavom preeklampsije in je v času bolezni zvišana 2 do 14-krat (26). Kljub temu pa je zaradi velike biološke variabilnosti koncentracije pzDNA v plazmi matere in vpliva mnogih dejavnikov (teža matere, rasa itd.) uporaba omenjenega pristopa v presejalne namene pri asimptomatskih nosečnicah vprašljiva. Kvantifikacija pzmRNA gena za γ globin v plazmi matere je lahko dokaz in ocena obsega feto-maternalne krvavitve.

Najpogosteje uporabljena instrumentalna tehnika na področju analize pzNK je verižna reakcija s polimerazo v realnem času, zaradi enostavne dostopnosti, preiskušene dobre specifičnosti in občutljivosti ter možnosti analize večjih serij. Z določenimi spremembami le ta metoda omogoča tudi določanje metiliranih zNK. Hiter razvoj instrumentalnih tehnik ter uvajanje dosežkov elektronike in

Preglednica 1: Različni pristopi k analizi zunajceličnih nukleinskih kislin (zNK in podvrst, kot so zDNA, zRNA, zmRNA itd.) pri obravnavi bolnikov s pljučnim rakom.

Table 1: Major analytical approaches to cell-free nucleic acids analysis (zNK and their subpopulations, such as zDNA, zRNA, zmRNA itd.) in medical assessment of lung cancer patients.

Analitski pristop	Primeri	Dodatna pojasnila
Kvantitativna analiza zNK v plazmi ali serumu	Celotna zDNA (tudi celotna zRNA)	Dobra občutljivost, slaba specifičnost
Kvalitativna analiza zDNA	Mikrosatelitske nestabilnosti, izguba heterozigotnosti, mutacije v onkogenih in tumor-supresorskih genih	Visoka specifičnost; zaradi slabe občutljivosti analiziramo več mutacij istočasno
Analiza epigenetskih sprememb v zDNA (hipermetilacija nukleotidov)	V promotorju gena <i>cdkn2a</i> , v kodirajočem delu gena <i>dapk1</i> itd.	Visoka specifičnost; zaradi slabe občutljivosti analiziramo več sprememb in mutacij istočasno
RT-PCR in semikvantitativna analiza podvrst zmRNA v plazmi ali serumu	Geni <i>erbb2</i> , <i>magea2</i> , <i>hnrnpa2b</i> , <i>uchl1</i> , za telomerazni enoti itd.	Iskanje genov s specifičnim izražanjem v pljučnem tumorju
Analiza različnih drugih bioloških vzorcev	Urin, bronhialni izpirek itd.	Pomembno spoznanje o možnosti analize zNK tudi v drugih bioloških vzorcih
Verižna reakcija s polimerazo v realnem času in kvantitativna analiza podvrst zmRNA v različnih bioloških vzorcih	Gen <i>hnrnpa2b</i>	Analitski pristop podoben kot pri klasičnih biokemičnih tumorskih označevalcih

elektrotehnike v laboratorijsko medicino pa omogoča uvedbo povsem novih analitskih metod, na primer analizo produktov po verižni reakciji s polimerazo z masno spektroskopijo, digitalno verižno reakcijo s polimerazo in določanje nukleotidnega zaporedja z možnostjo vzporedne kvantifikacije oligonukleotidov. Njihova zanesljivost mora biti še potrjena, po drugi strani pa je njihova zahtevnost zaenkrat še neprimerna za množičnejšo uporabo.

Glede na objavljene rezultate je diagnostična zanesljivost analize pzNK zelo dobra. Spol je mogoče v prvem trimesečju pravilno določiti v 99,4 % nosečnosti (27), še več, vsi laboratoriji za molekularno diagnostiko v Veliki Britaniji so v obdobju enega leta pravilno določili spol v 97,6 % nosečnosti (18). Downov sindrom je mogoče diagnosticirati z občutljivostjo 90,0 % in specifičnostjo 96,5 % (22), kar je mnogo bolje od vseh dosedanjih neinvazivnih pristopov. Najpogostejši vzrok lažno pozitivnih rezultatov je sindrom izginjajočega dvojčka in sicer v primeru, da je njegova genetska zasnova drugačna od močnejšega zarodka. Sindrom in s tem možnost lažno pozitivnega rezultata lahko

izključimo z ultrazvočno preiskavo. V primeru dokazane prisotnosti sindroma je interpretacija rezultata nezanesljiva do 7. tedna nosečnosti, ko dvojček običajno popolnoma izgine. V primeru določanja spola takšen problem nastane pri 0,5 % nosečnosti (18). Mnogo resnejši so lažno negativni rezultati analize, ki so najpogosteje posledica premajhne količine ali preslabe kakovosti izoliranih pzNK. Analitski problem je možno rešiti z vzporednim določanjem dodatnih nukleotidnih zaporedij ploda, ki niso predmet zdravniške obravnave (univerzalni označevalec ploda). Dokaz njihove prisotnosti v izolatu pomeni zadostno količino kakovostnih pzNK primernih za zanesljivo analizo. Novejša analzna pristopa sta določanje epigenetsko spremenjenih nukleotidnih zaporedij ploda, na primer metiliranih nukleotidnih zaporedij v promotorju gena *rassf1* (pri odraslih so omenjene sekvence nemetilirane) (28) ali plodove oziroma posteljicne zmrna tistih genov, ki pri materi niso izraženi (29). Predvsem slednji pristop veliko obeta, zaradi možnosti uporabe enostavnih in zanesljivih analitskih tehnik.

Preglednica 2: Področja uporabe analize zunajceličnih nukleinskih kislin ploda (pzNK in podvrst, kot so pzDNA, pzRNA in pzmRNA itd.) v krvi matere.

Table 2: Field of interests for fetal cell-free nucleic acids analysis (pzNK and their subpopulations, such as pzDNA, pzRNA in pzmRNA itd.) in the blood of pregnant woman.

Področje uporabe	Primeri	Dodatna pojasnila
<i>Zgodnja neinvazivna prenatalna diagnostika vrojenih in prirojenih bolezni ter gensko svetovanje</i>		
Določanje spola	Izključitev dedovanja na kromosom X vezanih recesivnih bolezni Optimizacija zdravljenja	Hemofilija, mišična distrofija Duchenne, adrenoleukodistrofija Kongenitalna adrenalna hiperplazija
	Nenormalen razvoj zunanjih spolnih organov	Ultrazvočna preiskava neuporabna
Avtosomne dominantne monogenske bolezni	Diagnostika/izključitev dedovanja (le če je bolezen prisotna pri očetu in mati bolezni nima)	Huntingtonova bolezen, ahondroplazija, miotonična distrofija
Avtosomne recesivne monogenske bolezni	Izključitev dedovanja kombiniranih heterozigotnih oblik bolezni (odsotnost okvarjenega očetovega alela pri plodu, ki pa pri materi ne sme biti prisoten)	Cistična fibroza, β -talasemija, mnoge hemoglobinske variante, kongenitalna adrenalna hiperplazija, klasična oblika galaktozemije
Aneuploidije	Diagnostika/izključitev	Downov sindrom, trisomija 18, trisomija 13
<i>Neinvazivna diagnostika bolezni in zapletov v nosečnosti, prognostična sklepanja in spremljanje zdravljenja</i>		
Določanje RhD statusa	Optimizacija preprečevanja zapletov v primeru neskladnosti v RhD	Zmanjšana nepotrebna imunoprofilaksa za 40 %
Motnje v rasti in razvoju posteljice	Diagnostika, spremljanje	Preeklampsija
pzmRNA gena za γ -globin	Dokaz in ocena obsega feto-maternalne krvavitve	Vprašljiva uporaba v presejalne namene
Analiza drugih pzmRNA	Spremljanje rasti in razvoja ploda, zgodnja diagnostika zapletov in spremljanje zdravljenja	Še neraziskano področje, ki veliko obeta

4 Izbrani primeri uporabe na ostalih področjih laboratorijske medicine

Analiza zNK omogoča diagnostiko in spremljanje mnogih bolezni. Plazemska koncentracije zmRNA gena za albumin ima boljšo diagnostično občutljivost za poškodbo hepatocitov kot plazemska koncentracija katalitične aktivnosti alanin-aminotransferaze (30). Pri bolnikih z opekljami so bile plazemske koncentracije zmRNA genov specifično izraženih v endotelijskih celicah premosorazmerne opečeni površini (31). Zvišane koncentracije zDNA gena za β -globin so našli v plazmi bolnikov z akutnim koronarnim sindromom (32), travmatskimi poškodbami (33) ali možgansko kapjo (34). V vseh treh primerih so visoke koncentracije napovedovale pogostejše hospitalne zaplete. Merjenje koncentracije zDNA genov moškega spolnega kromosoma pri ženskah prejemnicah organov ali tkiv moškega darovalca omogoča zaznavo in spremljanje zavrnitve presadka (35). Analiza zNK nam omogoča študijo etiologije bolezni in proučevanje novih načinov zdravljenja. Na primer, apoptotična razgradnja zDNA v plazmi bolnikov s sladkorno boleznijo nakazuje, da je zvečana koncentracija katalitične aktivnosti γ -glutamil-transferaze v plazmi posledica zvečane apoptoze celic (36). Z merjenjem koncentracije zDNA v peritonealnem izlivu, kot biokemičnem označevalcu celične smrti, lahko *in vivo* proučujemo biokompatibilnost različnih peritonealnih dializnih raztopin (37).

5 Zaključek

Kvantitativna in kvalitativna analiza zNK odpira številne nove možnosti neinvazivne, zgodnje presejalne diagnostike bolezni, pridobivanja prognostičnih podatkov in sledenja uspešnosti zdravljenja. Analiza zNK v laboratorijski medicini pomeni sodobno raziskovalno orodje, zanimiv strokovni izziv ter alternativo oziroma dopolnilo analitiki proteinov.

6 Literatura

1. Dovč-Drnovšek T, Emeršič B, Rožman P et al. Optimization of purification of human cell-free mRNA from plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 125-129.
2. Lukač-Bajalo J, Černe D. Klinični pomen zunajcelične DNK. In: Kržišnik C, Batellino T. *Pediatrična pulmologija. Izbrana poglavja iz pediatrije* 17. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, 2005: 65-84.
3. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23: 879-883.
4. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-243.
5. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem* 2006; 52: 1833-1842.
6. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005; 49: 1-12.
7. Sozzi G, Conte D, Mariani L et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4675-4678.
8. Andriani F, Conte D, Mastrangelo T et al. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004; 108: 91-96.
9. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2003; 193: 207-216.
10. Fleischhacker M, Beinert T, Ermitsch M et al. Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 179-188.
11. Engel E, Schmidt B, Carstensen T et al. Detection of tumor-specific mRNA in cell-free bronchial lavage supernatant in patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 140-146.
12. Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K et al. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer* 2005; 48: 77-83.
13. Kim JM, Hwang SH, Song EJ et al. Comparative Quantification of Plasma hnRNP B1 mRNA in Non-small Cell Lung Cancer Patients by Real-time PCR. *Korean J Lab Med* 2009; 29: 249-255.
14. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem* 2006; 52: 1833-1842.
15. Birch L, English CA, O'Donoghue K et al. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; 51: 312-320.
16. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 687-694.
17. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 57-62.
18. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 139-151.
19. Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 1135-1136.
20. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 76-83.
21. <http://www.sequenom.com/>, dostopno: avgust, 2009.
22. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13: 218-223.
23. Lo YM, Lun FM, Chan KC et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13116-13121.
24. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16266-16271.
25. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53-57.
26. Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta* 2005; 26: 515-526.
27. Galbiati S, Smid M, Gambini D et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117: 243-248.
28. Chan KC, Ding C, Gerovassili A et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of non-invasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006; 52: 2211-2218.
29. Tsui NB, Dennis Lo YM. Placental RNA in maternal plasma: toward noninvasive fetal gene expression profiling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 96-102.
30. Kudo Y, Ochi T, Shimada H et al. Utility of plasma circulating mRNA as a marker to detect hepatic injury. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 993-995.
31. Fox A, Gal S, Fisher N et al. Quantification of circulating cell-free plasma DNA and endothelial gene RNA in patients with burns and relation to acute thermal injury. *Burns* 2008; 34: 809-816.
32. Rainer TH, Lam NY, Man CY et al. Plasma beta-globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 110-113.
33. Lam NY, Rainer TH, Chan LY et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1286-1291.
34. Rainer TH, Wong LK, Lam W et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003; 49: 562-569.
35. Lui YY, Woo KS, Wang AY et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem* 2003; 49: 495-496.
36. Langford MP, Redens TB, Harris NR et al. Plasma levels of cell-free apoptotic DNA ladders and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in diabetic children. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 1160-1169.
37. Pajek J, Kveder R, Guček A et al. Cell-free DNA in the peritoneal effluents of peritoneal dialysis solutions. *Ther Apher Dial* 2010 14:20-26.

Avtoimunost - mehanizmi in pomen redoks procesov

Autoimmunity - mechanisms and significance of redox processes

Jasna Omersel, Borut Božič

Povzetek: Porušenje mehanizmov tolerance do lastnega vodi do avtoimunosti in razvoja avtoimunskih bolezni. Znani vzroki za spremenjeno imunoreaktivnost limfocitov in antigenov so genetskega ali imunskega izvora, nihanje hormonskega statusa ali posledica vpliva okolja. Področje raziskovanja se v zadnjem času usmerja neposredno na molekule protiteles in na spremembe v njihovi osnovni strukturi, ki so posledica delovanja oksidativnega okolja v telesu ali izven njega. Oksidacijske spremembe v konstantnih in variabilnih strukturnih regijah molekul protiteles vodijo do spremembe njihove tridimenzionalne zgradbe, kar vpliva na efektorske funkcije in spremeni afiniteto vezave tudi na telesu lastne proteine.

Ključne besede: avtoimunost, oksidacija, protitelesa, redoks-reaktivna protitelesa

Abstract: The collapse of the self-tolerance mechanisms leads to the development of autoimmunity and the onset of various autoimmune diseases. Currently the attention to find the reasons for the observed altered immunoreactivity of the lymphocytes and antigens is focused not only on the known genetic and immunological factors, fluctuations in the hormone state and environmental triggers, but also directly on the antibody structure. It was proposed that the alteration in their basic structure can also occur due to the oxidative environment in and outside of the body. Such oxidation changes in constant and variable regions can modify three-dimensional structure of antibodies, affecting their effector functions and altering their binding affinity towards body's own-proteins.

Key words: antibodies, autoimmunity, oxidation, redox-reactive antibodies

1 Avtoimunost in razvoj avtoimunskih motenj

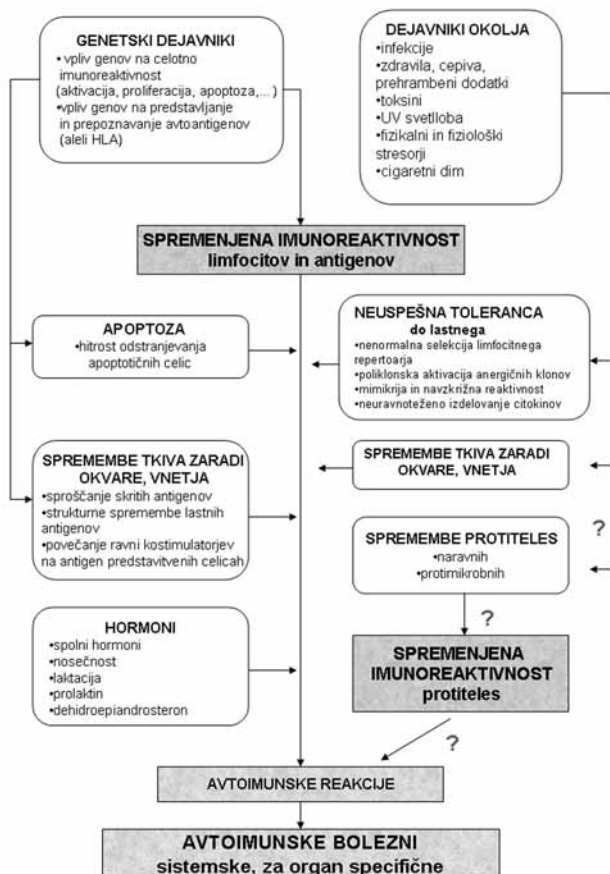
Toleranca do lastnega je ena izmed temeljnih značilnosti imunskega sistema. Vzdržuje se z različnimi mehanizmi, ki preprečujejo zorenje in aktivacijo potencialno škodljivih limfocitnih klonov, reaktivnih z lastnim (1). Leta 1900 je Paul Erlich resno podvomil o možnosti razvoja uničujočih mehanizmov imunskega sistema in nastanku toksičnih protiteles, ki bi uničila organizem. Njegova teorija je danes znana pod sinonimom "horror autotoxicus" in je bila mnogokrat jedro spora med imunologi, sploh po eksperimentalnih dokazih obstoja patogenih avtoprotiteles (2). V petdesetih letih 20. stoletja je to prvotno teorijo razširil avstralski virolog Macfarlane Burnet. Ena izmed postavk njegove hipoteze o klonski selekciji pravi, da se antigensko reaktivni limfociti odstranijo, če se z antigenom srečajo v času embrionalnega razvoja oz. imunske nezrelosti (3). Danes je znano, da se s centralno toleranco nezrelih limfocitov v primarnih limfatičnih organih (timus, kostni mozeg) in s periferno toleranco njihovih zrelih klonov v sekundarnih limfatičnih organih (bezgavke, vranica), preprečujeta zorenje in aktivacija tistih celic, ki izkazujejo previsoko afiniteto do lastnih in tujih antigenov. Seveda pa je možna tudi izguba tolerance, ki je lahko posledica nenormalne selekcije klonov, napačne stimulacije

limfocitov s citokini ali aktivacije s poliklonskimi aktivatorji, npr. z bakterijskimi lipopolisaharidi in superantigeni, ter sproščanja lastnih antigenov ob poškodbah in vnetjih. Vsi ti mehanizmi vodijo do aktivacije številnih klonov limfocitov T in B ter posledično do nastanka širokega spektra protiteles, med njimi tudi reaktivnih z lastnim (1).

Avtoimunost, ki v širšem smislu pomeni imunski odziv proti lastnim molekulam, običajno povezujemo z bolezenskim stanjem. Vendar pa ob vprašanju "Kaj je lastno?" spoznamo, da ima lahko takšen imunski odziv tudi pozitivne vplive oziroma obrambne funkcije. Tipičen primer za to je na primer imunski odziv s protitelesi na lastne maligno preobrazene celice, odziv na znotrajcelične infekcije in uravnavanje oziroma zaviranje imunskega odziva z anti-idiotipskimi protitelesi (4). Četrto stanje, najpogosteje povezano s terminom avtoimunost, pa je škodljiv, uničujoč in neželen odziv proti lastnim molekulam v sicer zdravem posamezniku, ki ne vodi več do obrambe, temveč do patološkega stanja. Ko se število avtoimunskih reakcij, ki se sicer nenehno odvijajo v posamezniku, poveča nad "nevtralizacijsko kapaciteto" organizma, kar pomeni, da se pojavijo številni avtoreaktivni limfocitni kloni, presežek imunskih kompleksov in prekomeren izbruh nevtrofilcev, posledično pa poškodbe tkiv, govorimo o avtoimunskih boleznih.

Avtoimunske bolezni, s pojasnjenim ali delno pojasnjenim vzrokom, se v populaciji pojavljajo v 3-8 % in predstavljajo enega izmed izzivov in problemov na področju klinične imunologije (5, 6). Med vzroke, ki vodijo do nastanka preko 100 tovrstnih bolezni, uvrščamo genetske in

imunske dejavnike, hormonsko stanje in vplive iz okolja (slika 1). Za avtoimunske bolezni je značilna tako prisotnost avtoaktivnih limfocitov T v prizadetih tkivih, kot tudi cirkulirajoča avtoprotitelesa, ki reagirajo s telesu lastnimi antigeni in imajo velikokrat pomembno diagnostično vrednost (7-9). V primeru, da pride do nepravilnega uravnavanja in poliklonske aktivacije različnih limfocitnih klonov, se razvijejo sistemske avtoimunske bolezni, kot na primer revmatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus, polimiozitis/dermatomiozitis in druge (8). Prekinitev tolerance limfocitov za posamezen lastni antigen ali majhno število tkivnih antigenov v posameznem organu pa vodi do organsko specifičnih bolezni, na primer avtoimunskega tiroiditisa, celiakije, diabetesa tipa I, multiple skleroze, primarne biliarne ciroze (8, 10).



Slika 1: Dejavniki nastanka avtoimunske bolezni. Geni, okolje in hormoni so glavni dejavniki, ki poleg primarnih motenj imunskega sistema vplivajo na spremenjeno imunoreaktivnost limfocitov in/ali antigenov, nato pa samostojno ali vzajemno vodijo do razvoja avtoimunske bolezni. Možnost za nastanek avtoimunske reakcije v zadnjem času predstavlja tudi spremenjena imunoreaktivnost protiteles, vzroki zanjo pa so do danes le slabo pojasnjeni.

Figure 1: Pathways to autoimmune diseases. Genes, environment and hormones are besides primary immune deficiencies the main factors contributing to the changed immunoreactivity of lymphocytes and/or antigens. Independently or mutually they lead to the development of autoimmune reactions and subsequently to autoimmune diseases. Recently, a possibility for the development of autoimmune reactions is orientated directly towards changed immunoreactivity of natural or antimicrobial antibodies, for which the complete explanation remain unexplained.

2 Protitelesa

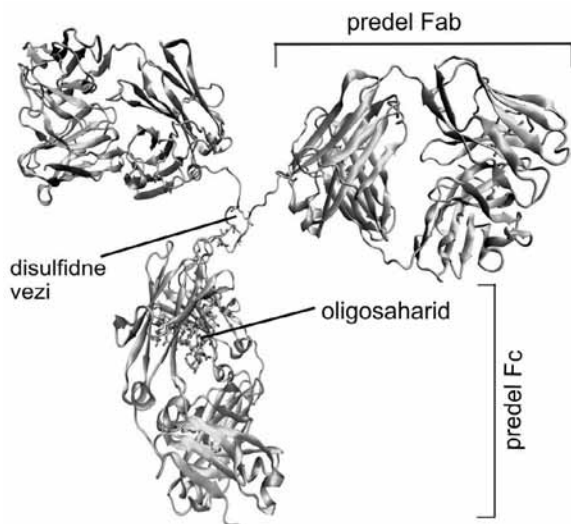
2.1 Zgradba in funkcija protiteles

Protitelesa v krvi vretenčarjev predstavljajo frakcijo cirkulirajočih proteinov, ki jih proizvajajo plazmatke, B-limfocitne celice imunskega sistema, kot odziv na vdor tujih molekul v organizem. Osnovna funkcija protiteles je torej specifično prepoznavanje tujkov (antigenov), njihova odstranitev ter aktiviranje mehanizmov prirojene imunosti, katerih glavni izvajalci so makrofagi, naravne celice ubijalke in komplementni sistem, ki dodatno pripomorejo k odstranitvi nevarnosti.

Protitelesa ali imunoglobulini so si med seboj strukturno in funkcijsko podobni glikoproteini, ki posredujejo humoralno imunost pri sesalcih. Osnovno zgradbo tvorita po dve lahki in dve težki verigi aminokislin, ki so medsebojno povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami (slika 2). Za prepoznavo in vezavo z antigenom so odgovorne aminokislinske v variabilnih regijah lahkih in težkih verig, imenovane hipervariabilne regije (CDR). Približno 10 aminokislinskih ostankov, ki se nahajajo v zankah šestih CDR (3 v lahkih in 3 v težkih verigah), je izpostavljenih na površino molekule protitelesa in so tako dostopni za interakcijo z antigenom (slika 3) (11). Razlike aminokislinskih zaporedij v CDR med posameznimi kloni in razredi protiteles doprinejajo k raznolikosti površin in specifičnosti posameznega protitelesa, konstantni predel Fc pa vrši druge biološke oziroma efektorske funkcije (preglednica 1).

Na podlagi strukturnih razlik konstantnih regij težkih verig razlikujemo med petimi razredi protiteles, in sicer IgG, IgA, IgM, IgD in IgE, ki se med seboj ločijo še v valenci vezave, efektorskih funkcijah, vsebnosti in mestu pripetih ogljikovih hidratov (11, 12). V primarnem imunskem odzivu na večino antigenov dominirajo pentamerna protitelesa IgM, ki so najučinkovitejša pri aktivaciji komplementa in posledični lizi opsoniziranih celice (12). Predstavljajo tudi pomembno frakcijo t.i. naravnih protiteles, v monomerni obliki pa so izražena na limfocitu kot B-celični receptor (13). Protitelesa IgG, ki predstavljajo 75 % serumskih imunoglobulinov, nastajajo po infekciji in imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi proizvodi; zaradi prehoda skozi placento pa dajejo pomembno zaščito tudi otroku v prvih tednih življenja. Ob okužbah ljudi in živali s paraziti se v serumu močno poveša koncentracija protiteles IgE, ki pa so udeležena tudi v alergijskih reakcijah. Ob prvem stiku z alergenom pride do senzibilizacije, ponovni vnos alergena pa povzroči navzkrižno povezavo IgE vezanih na receptorje Fc, izražene na mastocitih, kar sproži njihovo degranulacijo in sproščanje alergijskih

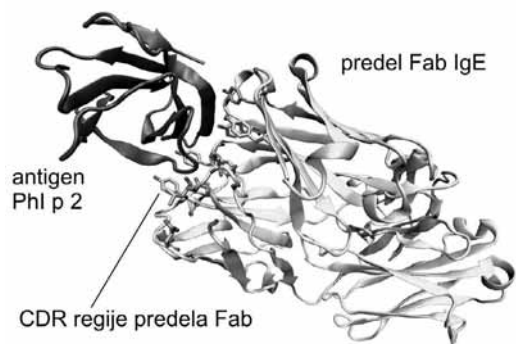
mediatorjev in citokinov. V serumu se nahajajo tudi nizke koncentracije IgD, katerih funkcija je le malo znana, in IgA. Slednja protitelesa so prisotna na površinah sluznic oz. epitelija, kjer preprečujejo pritrjevanje ter vdor bakterij in virusov (11, 12).



Slika 2: Kristalna struktura monoklonskega protitelesa IgG2a.

Figure 2: Crystal structure of the monoclonal IgG2a antibody.

pdb: 1IGT, Harris L.J. et al., Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* v36 pp. 1581-97, 1997.



Slika 3: Vezava protitelesa z antigenom. Slika prikazuje specifično prepoznavanje med fragmentom Fab IgE in glavnim respiratornim alergenom trave Phl p 2. V CDR regijah so vidni aminokislinski ostanki, ki tvorijo vodikove vezi in nepolarne interakcije z epitopom antigena.

Figure 3: Binding of an antibody to an antigen molecule. A view of the interacting surfaces of the major grass respiratory allergen Phl p 2 and a Fab fragment of an IgE. Amino acid residues in CDR, forming H-bonds and hydrophobic interactions with the antigen, are shown.

pdb: 2VXQ, Padavattan S. et al., High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography, *J. Immunol.* 2009;182; 2141-2151.

Preglednica 1: Efektorske funkcije protiteles.

Table 1: Effector functions of antibodies.

Efektorske funkcije protiteles:
- nevtralizacija mikrobov in njihovih toksičnih produktov
- aktivacija komplementa, ki vodi do lize mikrobne celice in sproščanja biološko aktivnih molekul
- opsonizacija patogenov in pospeševanje fagocitoze ter mikrobicidne aktivnosti fagocitov
- s protitelesi posredovana celična citotoksičnost
- reakcije takojšnje preobčutljivosti in aktivacija mastocitov
- encimska aktivnost

2.2 Avtoprotitelesa

Prva opažanja, ki so nakazovala razširitev teorije Paula Erlicha, so bila povezana z možnim obstojem avtoprotiteles proti spermi, leta 1900, s funkcijskimi testi dokazanimi protitelesi pri bolnikih z Gravesovo boleznijo ter s precipitacijskimi testi dokazanimi imunskimi kompleksi ob stiku z izvlečkom žleze ščitnice (14, 15). Rezultati eksperimentov so jasno pokazali, da imunski sistem posameznika proizvaja protitelesa proti proteinom lastnega tkiva, med njimi žal tudi takšna, ki sprožijo bolezensko stanje. Avtoprotitelesa so običajno izotipa IgG ali IgM, za njihovo proizvodnjo pa je prav tako kot pri nastanku ostalih vrst protiteles, nujna prisotnost antigena in sodelovanje specifičnih celic T pomagalk (16, 17). Posamezen limfocit T ali B lahko izrazi samo enega izmed več kot 10^{11} možnih klonskih specifičnosti antigenskega receptorja (TCR in BCR). Eksperimentalno so namreč dokazali, da so v primeru reaktivnosti takšnega receptorja do lastnega, možni štirje načini odstranitve (6):

- po teoriji o selekciji klonov se sprožijo ustrezni signali in celica umre v procesu programirane celične smrti ali apoptoze;
- s celičnimi mehanizmi se nadaljujejo rekombinacije genskih segmentov, ki kodirajo regije V(D)J (V - variability; D - diversity; J - join) ali somatske hipermutacije, kar lahko pripelje do izražanja receptorja, ki ni več reaktiven do lastnega;
- intrinzični biokemični in genski mehanizmi lahko celico vodijo do stanja klonske neodzivnosti ali anergije;
- z ekstrinzičnim nadzorom se lahko omeji prisotnost rastnih dejavnikov, kostimulacijskih signalov in provnetnih mediatorjev, s čimer se zavre aktivnost regulatornih celic T.

Kljub številnim mehanizmom uravnavanja tolerance in večnivojskim mehanizmom odstranjevanja avtoreaktivnih klonov pa se lahko pojavijo takšni kloni, ki so jih obšli in ki so, skupaj z ustreznimi zunanjimi dražljaji, zmožni proizvajati avtoprotitelesa. Le-ta so pogosto prisotna in jih je možno zaznati še preden se izrazi bolezen, zato lahko v določenih primerih predstavljajo odlične nadomestne označevalce bolezenskega stanja, prav tako pa omogočajo tudi spoznavanje patogeneze in spremljanje poteka zdravljenja. Moramo pa se zavedati, da mnogi posamezniki z dokazanimi avtoprotitelesi nimajo avtoimunске bolezni, kar predstavlja omejitev pri interpretaciji diagnostičnih preiskav in poudarja pomen sodelovanja med pacientom, zdravnikom in laboratorijskim strokovnjakom (18).

3 Celični redoks procesi in njihov vpliv na avtoimunost

Mnogi celični procesi, kot na primer presnova, vnetje kot obrambni mehanizem in celično dihanje, vključujejo oksidacijsko-redukcijske (redoks) reakcije. Ti redoks procesi potekajo v celotni evkariontski celici, najživahnejše reakcije prenosa elektronov pa so v mitohondrijih (19). Poleg enostavnega prenosa elektronov na končni prejemnik, najpogosteje je to kisik, se v celici tudi v normalnih pogojih odvijajo hidroksilacije, radikalske reakcije, prenosi protonov in tiol/disulfidne izmenjave. Posledice oksidacije, ki lahko poteče pod vplivom neradikalnih (visoko energetsko sevanje, kovinski ioni, aktivirane limfocitne celice in podobno) ali radikalnih oksidantov, so nastanek in sproščanje novih reaktivnih snovi (npr. peroksidov), spremenjeno uravnavanje in izražanje genov, modulacija celičnega signaliziranja ter indukcija nekroze ali apoptoze (20). Za celoten človeški organizem zato redoks procesi predstavljajo nekakšen dvorezni meč. Potrebuje jih za izgorevanje hrane in posledično pridobivanje energije, za obrambo pred mikroorganizmi in za prenos signalov znotraj in med celicami, po drugi strani pa lahko omenjeni procesi sami oziroma njihovi pretirano nakopičeni proizvodi napadejo in razgradijo normalne celice in njihove organele ter v primeru porušenega znotrajceličnega redoks potenciala, skupaj z naravno prisotnimi oksidanti, povzročijo strukturne in funkcijske spremembe na lastnih celičnih/tkivnih proteinih. Za pravilno delovanje redoks procesov so celice razvile natančen in učinkovit nadzor v obliki kompleksne regulatorne povratne zveze. S prisotnimi endogenimi encimskimi sistemi, kot so superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, peroksiredoksin in tioredoksin, vzdržujejo natančno ravnovesje med oksidirajočimi in reducirajočimi snovmi v organizmu (21). Pri sesalcih obstaja tudi omejen repertoar antioksidacijskih genov, ki se aktivirajo pod vplivom oksidativnega stresa (21). Danes je že dobro znano, da lahko okvare in nepravilno delovanje v nadzorovanju tovrstnih procesov močno prispevajo k staranju celic, tkiv in organov ter povzročijo resna bolezenska stanja. Dvig znotrajcelične koncentracije oksidirajočih spojin (hidroksilni radikal, peroksidni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid, peroksinitrit) in kopičenje pod njihovim vplivom spremenjenih bioloških molekul, privede organizem v stanje oksidativnega stresa, ki ga povezujejo z mnogimi nevrodegenerativnimi (Alzheimerjeva bolezen, Downov sindrom, Parkinsonova bolezen), cerebrovaskularnimi in kardiovaskularnimi boleznimi ter tudi diabetesom, revmatoidnim artritisom in kroničnim vnetjem (22-24). Tako lahko tudi razlike v antioksidativnem statusu posameznika opredeljujejo obseg sprememb in vplivajo na ravnovesje med zdravjem in boleznijo.

3.1 Redoks-reaktivna protitelesa

Spremembe v imunoreaktivnosti limfocitov in antigenov zaradi genetskih dejavnikov, napak v regulaciji apoptoze, okvare tkiva, kakor tudi neravnovesje hormonov in porušenje tolerance, predstavljajo glavne dejavnike za posledični razvoj avtoimunskih bolezni (slika 1). V zadnjih nekaj letih, ko potekajo intenzivne raziskave na področju oksidacije protiteles, pa se je izkazalo, da človeški serum vsebuje labilno frakcijo naravnih protiteles, dovzetnih za oksidacijo. To je nakazalo novo smer raziskav in odmik od hipoteze, da so samo antigeni lahko podvrženi strukturnim spremembam preko biološko-kemijskih mehanizmov in so, tako spremenjeni, tarča za sicer naravna protitelesa (7, 25). Čeprav protitelesa zaradi močnih kovalentnih

povezav med verigami (S-S vezi) in dodatnih hidrofobnih interakcij veljajo za zelo stabilne molekule, pa so kot proteini prav tako dovzetna za oksidacijo, seveda če so za to izpolnjeni ustrezni pogoji. Oksidacija aminokislin v konstantnih predelih protiteles vodi do sprememb efektorskih funkcij, videti pa je tudi, da oksidacija v hipervariabilnih regijah lahko povzroči izgubo ali spremembo njihove aktivnosti, afinitete in specifičnosti (26-28). To je dobro razvidno na primeru tako imenovanih antifosfolipidnih protiteles (aPL). Injiciranje določenih virusnih in bakterijskih peptidov v laboratorijske živali je povzročilo nastanek aPL (29, 30). Domnevali so, da so nastala zaradi homologije in posledično navzkrižne reaktivnosti med antigenom in proteini gostitelja (31). Smiselna posledica teh rezultatov je bilo načrtno iskanje aPL pri pacientih z bakterijskimi okužbami. Visoke titre aPL so določili v komercialnih pripravkih krvi, medtem ko so bili serumi pacientov negativni. Pozitivni so bili tudi vzorci pripravkov krvi, ki so jih inkubirali s serumi zdravih krvodajalcev. Leta 2004 je McIntyre s sodelavci podal razlago za ta opažanja in opisal nastanek še mnogih drugih avtoproteles. Po izpostavitvi seruma ali frakcije IgG oksidirajočemu dejavniku heminu, so dokazali visoko reaktivnost in vezavo protiteles IgG z mieloperoksidazo, dekarboksilazo glutaminske kisline, tirozinfosfatazo, fosfolipidi in številnimi drugimi antigeni (26). Hemin, derivat hemoglobina, ki v svoji strukturi vsebuje Fe^{3+} , se je izkazal kot edina izmed komponent krvi, ki je povzročila pojav reaktivnih protiteles aPL. Predvidevali so, da je takšna reverzibilna oksidacija povzročila nitriranje tirozinskih ostankov v hipervariabilnih regijah protiteles (26, 32). V drugi študiji pa so poliklonsko frakcijo IgG izpostavili Fe^{2+} ionom (1mM), pri čemer so ugotovili povišano imunoreaktivnost z jetrnimi antigeni, kot tudi z reaktivnimi kisikovimi snovmi, ki so povzročile povečano reaktivnost z bakterijskimi antigeni in s predelom Fc človeškega IgM (33).

Redoks-reaktivna protitelesa so bila nedavno sprejeta kot samostojna družina protiteles. Ne moremo jih namreč zaznati z običajnimi imunskimi metodami, saj morajo biti predhodno podvržena redoks reakciji (34). Predpostavljajo, da so redoks-reaktivna protitelesa v organizmu posameznika neaktivna, vse dokler jih ne stimulirajo sprožitveni dejavniki iz okolja (npr. sprememba celičnega potenciala, vrednosti pH, prisotnost reaktivnih kisikovih spojin), kar nato izzove imunsko reakcijo. Natančni mehanizmi oziroma vrsta oksidativnih sprememb v strukturi molekule protitelesa ter sami pogoji oksidacije ostajajo še vedno nepojasneni, prav tako pa tudi niso opredeljeni učinki oksidiranih protiteles z afiniteto do lastnih antigenov v človeškem organizmu.

4 Post-translacijske modifikacije proteinov

Predpostavljajo, da je med 50-90 % proteinov, nastalih v človeškem telesu, podvrženih strukturnim spremembam v smislu cepitve polipeptidne verige ali kemične spremembe v stranski verigi aminokislin. S temi modifikacijami se namreč bistveno razširi nabor fizikalno-kemijskih značilnosti aminokislin posamezne evkariontske celice, ki je sicer omejen z 20 osnovnimi aminokislinami, definiranimi z genetskim kodom. Ta proces, imenovan post-translacijske spremembe, zagotavlja neposreden mehanizem za regulacijo aktivnosti proteinov, hkrati pa tudi izrazito poveča njihovo strukturno raznolikost. Dokumentiranih je preko 400 encimskih in ne-encimskih

modifikacij, ki lahko vplivajo na strukturo posameznega proteina, njegove interakcije z ligandi ter na biokemično aktivnost ali transport proteinov v celici. Post-translacijske modifikacije, ki so lahko stalne ali reverzibilne, predstavljajo dinamičen pojav in imajo osrednjo vlogo v bioloških procesih (35).

Najpogostejša post-translacijska modifikacija, ki jo najdemo v vseh živih organizmih, je fosforiliranje stranskih verig serina, treonina in tirozina. To je reverzibilen proces, ki kot stikalo nadzoruje številne celične procese: presnovne poti, signalizacijo in prepisovanje genov. Verjetno najkompleksnejša in najbolj raznolika modifikacija pa je glikozilacija, pri kateri gre za vezavo oligosaharidov na stranske verige asparagina, serina ali treonina. Glikozilacija je prisotna tudi v molekulah protiteles, v regijah CH₂ oz. CH₃ predela Fc, kjer pomembno prispeva k stabilnosti in biološki aktivnosti molekule. Raznolikost v glikozilaciji pa naj bi bila tudi specifična lastnost nekaterih avtoproteles pri avtoimunskih boleznih (36).

Post-translacijske modifikacije potekajo med samo sintezo proteina ali po njej, ter s tem neposredno vplivajo na njegovo strukturo in funkcije. Z vidika redoks-reaktivnih protiteles, so zanimive tiste modifikacije, ki se odvijajo po njihovi sintezi in izven celic. Glede na izsledke omenjenih študij redoks-reaktivnih protiteles se takšni pogoji za njihovo post-translacijsko modifikacijo *in vivo* lahko vzpostavijo lokalno, na mestu velike koncentracije nevtrofilcev, na primer v sinovijski tekočini sklepov bolnikov z revmatoidnim artritisom, kjer nastajajo reaktivne kisikove spojine, pa tudi ob zastrupitvah organizma s kovinami, ki lahko vstopajo v redoks procese s protitelesi, ali s staranjem, ko se aktivnost encimskih sistemov v organizmu zmanjšuje, kar posledično vodi v zvišanje količine oksidirajočih snovi v telesu.

5 Zaključek

Osnovna spoznanja in temeljni mehanizmi o avtoimunosti so bili postavljeni že stoletje nazaj. Številne bolezni, neznanega oziroma nepojasnjenega izvora pa so še danes povod za iskanje vzrokov za njihov nastanek, v kontekstu škodljivih imunskih reakcij proti telesu lastnim proteinom. Dokazi, da oksidativni stres oz. njegovi produkti pomembno vplivajo na razvoj bolezni, so vse številnejši. Vprašamo se torej lahko, kako se posledice delovanja teh dejavnikov odražajo na molekulskem nivoju razmeroma strukturno stabilnih protiteles. Oksidacijsko-redukcijske reakcije, ki lahko potekajo v vezavnih mestih protiteles, zato odpirajo nov vidik in izziv za proučevanje osnovne imunske reakcije antigen-protitelo in njihovo vpletenost v avtoimunost, kar smo povzeli v prispevku. Obstajajo eksperimentalno podprte študije, da sprememba zgradbe protiteles pod vplivom naravno prisotnih oksidirajočih snovi v telesu lahko pozitivno vpliva na mnoge fiziološke funkcije, kot na primer odstranjevanje starih eritrocitov in apoptotičnih ali rakavih celic (34). Po drugi strani pa je iz preventivnega vidika pomembno zavedanje, da pretiran oksidativni stres deluje tako na antigene kot na protitelesa in ima zato lahko velik vpliv na razvoj imunske pogojenih bolezni.

6 Literatura

1. Abbas K, Lichtman AH, Pallei S. Immunological Tolerance. In: Cellular and Molecular Immunology. Saunders; 2007: 243-263.
2. Silverstein AM. Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. Nat Immunol 2001; 2(4): 279-281.
3. Burnet M. Auto-immune disease. I. Modern immunological concepts. Br Med J 1959; 2(5153): 645-650.
4. Brickman CM, Shoenfeld Y. The mosaic of autoimmunity. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2001; 235: 3-15.
5. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. Nat Med 2001; 7(8): 899-905.
6. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B et al. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature 2005; 435(7042): 590-597.
7. Oertelt S, Invernizzi P, Podda M et al. What is an autoantibody? In: Autoantibodies. Elsevier B.V.; 2007: 3-6.
8. Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, editors. Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases. Humana Press; 2008.
9. Božič B. Laboratorijska diagnostika in spremljanje revmatičnih bolezni = Laboratory diagnostics and monitoring of rheumatic diseases. Farm Vestn 2004; 55(Special Issue): 113-118.
10. Božič B. Sladkorna bolezen in avtoimunost = Diabetes and autoimmunity. Farm Vestn 2005; 56(4): 250-258.
11. Abbas K, Lichtman AH, Pallei S. Antibodies and Antigens. In: Cellular and Molecular Immunology. Saunders; 2007: 75-96.
12. Vozelj M. Zgradba in funkcija protiteles. In: Temelji imunologije. DZS; 2000: 47-74.
13. Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. Trends Immunol 2009; 30(1): 43-51.
14. Witebsky E, Rose NR. Studies on organ specificity. IV. Production of rabbit thyroid antibodies in the rabbit. J Immunol 1956; 76(6): 408-416.
15. Metalnikoff S. Études sur la spermotoxine. Ann Inst Pasteur 1900; 14: 577-589.
16. Bonifacio E, Lampasona V. Autoantibodies. In: Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice. Academic Press; 2005: 193-200.
17. Cervera R, Shoenfeld Y. Pathogenic Mechanisms and Clinical Relevance of Autoantibodies. In: Autoantibodies. Elsevier Science; 2007: 29-36.
18. Božič B. An example of evidence-based laboratory medicine in autoimmune serology. 3rd Slovenian Congress of Clinical Chemistry with International Participation and 18th International Symposium of Slovenian Association for Clinical Chemistry and Croatian Society of Medical Biochemists: Ljubljana, Slovenia, November 13-15, 2008: abstracts, Clin Chem Lab Med 2008; 46(10): A237.
19. Go YM, Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. Biochim Biophys Acta 2008; 1780(11): 1273-1290.
20. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. Biochim Biophys Acta 2005; 1703(2): 93-109.
21. Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. Trends Biochem Sci 2005; 30(8): 453-461.
22. Pocernich CB, Sultana R, Mohammad-Abdul H et al. HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations. Brain Res Brain Res Rev 2005; 50(1): 14-26.
23. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 2005; 827(1): 65-75.
24. Halliwell B, Gutteridge MCJ. Reactive species and disease: fact, fiction or filibuster? In: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press; 2007: 488-613.
25. Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. Autoimmun Rev 2008; 7(7): 567-573.
26. McIntyre JA. The appearance and disappearance of antiphospholipid autoantibodies subsequent to oxidation-reduction reactions. Thromb Res 2004; 114: 579-587.
27. Margiloff L, Chaplia L, Chow A et al. Metal-catalyzed oxidation of immunoglobulin G impairs Fc receptor-mediated binding to macrophages. Free Radic Biol Med 1998; 25(7): 780-785.
28. Omersel J, Božič B. Sprememba specifičnosti imunoglobulinov razreda G pod vplivom elektro-oksidacije = Changes in specificity of class G immunoglobulins after electro-oxidation. Farm Vestn 2006; 57(5): 311-315.
29. Gharavi AE, Pierangeli SS. Origin of antiphospholipid antibodies: induction of aPL by viral peptides. Lupus 1998; 7 Suppl 2: S52-54.
30. Blank M, Krause I, Fridkin M et al. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. J Clin Invest 2002; 109(6): 797-804.
31. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. N Engl J Med 1999; 341(27): 2068-2074.

32. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Faulk WP. Autoantibodies unmasked by redox reactions. *J Autoimmun* 2005; 24(4): 311-317.
33. Dimitrov JD, Ivanovska ND, Lacroix-Desmazes S et al. Ferrous ions and reactive oxygen species increase antigen-binding and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *J Biol Chem* 2006; 281(1): 439-446.
34. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Faulk WP. Redox-Reactive Autoantibodies. In: *Autoantibodies*. Elsevier B.V.; 2007: 47-54.
35. Twyman R. Protein Modification in proteomics. In: *Principles of Proteomics*. Bios Scientific Publishers; 2004: 172-198.
36. Holland M, Yagi H, Takahashi N et al. Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760(4): 669-677.

Primerjava in razvoj naprav za oblaganje delcev

Comparison and development of particle coating devices

Matevž Luštrik, Rok Dreu, Stane Srčič

Povzetek: Tehnologija oblaganja delcev je proces, ki ga v farmacevtski industriji uporabljamo že več desetletij. Delce oblagamo z namenom prekritja neprijetnega okusa učinkovine, zaščite pred svetlobo, vlago in zračnim kisikom, iz estetskih razlogov, boljše sprejemljivosti s strani uporabnikov ter z namenom prirejanja sproščanja. V članku smo proces oblaganja delcev predstavili z vidika procesne opreme. Za oblaganje lahko uporabljamo različno opremo, ki jo širše gledano, delimo na bobne za oblaganje in vrtničnoslojne naprave. V prvem delu so tako predstavljene nekatere najpomembnejše izboljšave na področju bobnov za oblaganje, v drugem pa sama tehnologija z vrtnčenjem skupaj z nekaterimi podvrstami naprav, ki so pripomogle k učinkovitejšemu nanašanju obloge, hkrati pa so omogočile izdelavo enakomerno obloženih delcev visoke kakovosti.

Ključne besede: oblaganje delcev, bobni za oblaganje, tehnologija z vrtnčenjem

Abstract: Particle coating technology is a process that is being used in pharmaceutical industry for many decades. Particles are coated with the purpose of taste masking of unpalatable substances, protection from light, moisture and oxygen from the atmosphere surrounding the particles, aesthetic reasons, better acceptance by users and modified release. In this article the coating process is presented in term of process equipment. Various process equipment can be used for particle coating, which is in general divided to coating drums and fluid bed devices. The first part comprehends some of the most important improvements in drum coating technology. Additionally the fluid bed technology is described together with certain device subtypes that have enabled more efficient coating deposition and production of high quality and uniformly coated particles.

Keywords: particle coating, coating drums, fluidized bed technology

1 Uvod

Proces oblaganja delcev je poznan že stoletja. Prva pisna poročila segajo v čas med 9. in 11. stoletjem in govorijo o oblaganju delcev s sluzjo trpotca ter oblaganju delcev s srebrom. Prav tako zapisi iz tistega časa omenjajo nanašanje oblog iz medu ali sladkorja z namenom prekrivanja neprijetnega okusa uporabljenih zdravilnih učinkovin. Pogosto so za ljudi iz višjih slojev prebivalstva izdelovali farmacevtske oblike, katere so v oblogi vsebovale srebro ali celo zlato. Kot delce pojmuje material, ki vstopa v proces oblaganja. V največji meri s tem mislimo na oblaganje tablet, z razvojem tehnologije pa so omogočili oblaganje tudi manjših delcev (pelet, zrnc oz. granulata).

Veliko težavo pri oblaganju delcev so že v začetku predstavljale naprave v katerih je potekal postopek oblaganja. Pri tem so se srečevali s težavami kot so: nedoločeno in neenakomerno gibanje delcev, neenakomerno dodajanje tekočine za oblaganje, neenakomerno in nezadostno sušenje tekom procesa oblaganja, kar je posledično vodilo do lepljenja delcev med seboj in na stene naprave in onemogočalo oblaganje manjših delcev (pod 1 mm).

Prekrivanje okusa je bilo vse do leta 1950 glavni namen procesa oblaganja. V tem času pa so se pojavile prve naprave, v katerih so s pomočjo ventilatorjev in grelnikov zraka dosegli učinkovit prenos toplote. To je skupaj z razvojem in uporabo polimernih pomožnih snovi, omogočilo izdelavo zelo tankih oblog (filmsko oblaganje) ter s tem številne nove možnosti uporabe. Z izrazom filmsko oblaganje (angl. film coating) označujemo proces, pri katerem je debelina nanešene obloge med 10 μm in 200 μm . Na delce lahko nanesemo tudi obloge debelejše od 200 μm , v katere je praviloma poleg pomožnih snovi vključena še zdravilna učinkovina in ga zato lahko označimo z izrazom oblaganje z učinkovino (angl. layering).

Obloga in njena debelina igrata pomembno vlogo pri prekrivanju neprijetnega okusa učinkovine, pri zaščiti pred svetlobo, vlago in zračnim kisikom. Pri izdelavi oblog s podaljšanim sproščanjem, pa je poleg debeline obloge pomembna tudi njena enakomernost in zveznost tekom celotne površine delca. Na kakovost obloge ima velik vpliv tako izbira vhodnih materialov (jedra, pomožne snovi), kot tudi lastnosti naprave v kateri poteka proces. Tekom zadnjih desetletij smo bili priča številnim tehnološkim izboljšavam in novostim na področju

prenosa toplote in gibanja zraka, razvoju sistemov za razprševanje ter uporabi novih materialov, ki so skupaj prispevali k boljši učinkovitosti naprav za oblaganje. Vendar smo kljub številnim izboljšavam naprav, še vedno omejeni s fizikalnimi lastnostmi tekočine za oblaganje, kot so stični kot, viskoznost in površinska napetost. V primeru, ko imata viskoznost in površinska napetost visoki vrednosti, stični kot pa je majhen, se poveča težnja po zlepljanju delcev in tvorbi aglomeratov. V nasprotnem primeru pa smo lahko priča nizkim izkoristkom procesa oblaganja. Posebno pozornost moramo nameniti procesom oblaganja, pri katerih disperzni medij tekočine za oblaganje predstavlja hlapno organsko topilo. Uporaba tovrstnih topil lahko privede do nastanka eksplozivne atmosfere, kar moramo upoštevati tudi pri izbiri procesne opreme. Ta mora biti eksplozijsko varna, kar pomeni, da mora biti celotna naprava načrtovana in izdelana tako, da preprečimo kakršno koli pojavljanje isker. Poleg tega morajo njene stene zdržati tlak (komercialno dosegljive naprave vzdržijo tlak do 12 barov), ki se ustvari ob morebitni eksploziji ter imeti vgrajene varnostne ventile za uravnavanje tlaka znotraj naprave (1, 2).

2 Vrste naprav za oblaganje delcev

Naprave za oblaganje delcev razdelimo na bobne za oblaganje (angl. pan coaters) in na naprave, ki temeljijo na tehnologiji z vrtinčenjem (angl. fluidized bed coaters).

Nadalje bobne za oblaganje delimo na:

- bobne, ki se vrtijo okoli osi nameščene pod kotom (angl. pans rotating around inclined axes),
- bobne, ki se vrtijo okoli vodoravne osi (angl. pans rotating around horizontal axes),
- bobne, katerih os vrtenja je nameščena navpično (angl. pans rotating around vertical axes).

Prav tako naprave, ki temeljijo na tehnologiji z vrtinčenjem delimo na različne podvrste in sicer na:

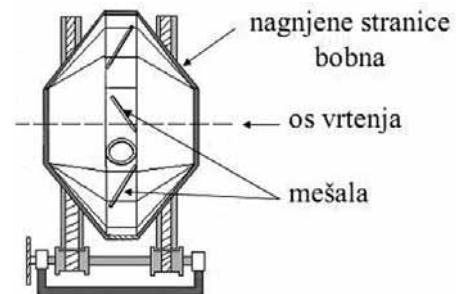
- naprave za oblaganje delcev, kjer prihaja do gibanja delcev, ki je podobno gibanju tekočine (angl. fluidized),
- izmetavanja delcev (angl. spouted),
- naprave, ki omogočajo kontinuirano proizvodnjo (angl. continuous processing) (1,3,4).

2.1 Bobni za oblaganje

Proces oblaganja se je najprej uveljavil v živilski industriji, kjer je bil omejen predvsem na oblaganje delcev s sladkorjem v velikih vrtečih se posodah (bobnih). Ta tehnika se je hitro prenesla na področje izdelave farmacevtskih oblik, ker je bilo na ta način mogoče prekriti neprijeten okus zdravilnih učinkovin. Zaradi majhne mehanske obremenitve delcev so se bobni za oblaganje izkazali za učinkovite predvsem pri oblaganju kapsul in tablet. Začetek razvoja naprav za oblaganje delcev predstavljajo bobni, ki se vrtijo okoli osi nagnjene pod kotom. V procesu oblaganja delci zaradi vrtenja posode neprenehoma prihajajo v stik s tekočino za oblaganje, ki se v procesu sušenja pretvori v trdno oblogo (1,4).

Z namenom povečanja stične površine med delci in zrakom za sušenje so os vrtenja bobna premaknili v vodoravno smer. V primerjavi z bobni z nagnjeno osjo gibanja, je pri tovrstnih napravah čas stika med delci in zrakom daljši, kar skrajša čas sušenja in tako omogoča oblaganje večje količine delcev (4).

Glavni pomanjkljivosti, ki ju srečamo pri bobnih za oblaganje, sta neučinkovito gibanje delcev in nezadostno sušenje zaradi neenakomernega pretoka zraka, kar lahko povzroča zadrževanje delcev v t.i. mrtvih predelih naprave in tako onemogoča enakomerno nanašanje obloge na celotno količino delcev. Poleg tega pa neenakomerno sušenje lahko povzroča nepravilnosti v oblogi, kot so neenakomerna debelina obloge in neosušena površina delcev, ki v skrajnem primeru privede do zlepljanja delcev in tvorbe aglomeratov. Eden izmed osnovnih pristopov k izboljšanju gibanja delcev znotraj bobnov, ki se vrtijo okoli osi nameščene vodoravno oz. nagnjene pod kotom, je bila vgradnja mešal in/ali lopatic (4). Tako je Keil leta 1965 v svojem patentu opisal boben za oblaganje z vgrajenim mešalom (5). Kasneje je to idejo prevzel tudi Pellegrini in leta 1969 predstavil boben, vrteč se okoli vodoravne osi, z vgrajenim sistemom mešal ter nagnjenimi stranicami. Tako je pripomogel k intenzivnejšemu gibanju delcev ob straneh naprave in s tem še dodatno izboljšal stik delcev s snovjo za oblaganje ter zrakom za sušenje (slika 1) (6).



Slika 1: Pellegrinijeva naprava.

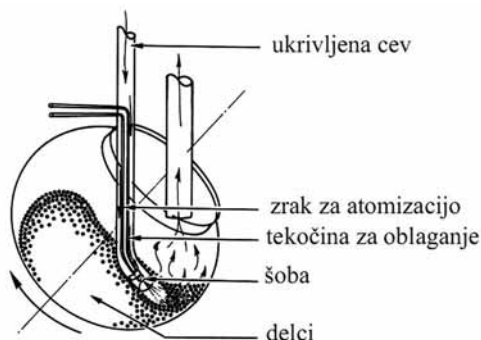
Figure 1: Pellegrini drum coater.

Z razvojem novih materialov (to so predvsem polimeri, katerih osnovo predstavljajo derivati akrilne kisline ali celuloze) se je pojavila potreba po napravah, ki bi omogočale nanašanje tanjših (filmskih) oblog. Poleg sistema razprševanja (šob) je pri filmskem oblaganju izrednega pomena učinkovito sušenje. Tako so v 50-tih letih prejšnjega stoletja predstavili naprave, katerih glavna značilnost je bila perforirana stena bobna. Uvajanje zraka skozi stranice bobna za oblaganje in vgrajenih perforiranih mešal, je zagotavljalo zelo učinkovito sušenje, mešanje ter odpravo predelov, kjer je bilo gibanje delcev omejeno (mrtve cone) (7, 8).

Tovrstne naprave so uporabljali predvsem za oblaganje večjih delcev, medtem ko je bilo oblaganje delcev manjših od odprtine luknjic v steni bobna skoraj nemogoče zaradi zamašitve ali prehoda le-teh. V izogib temu so razvili posebne dušilne lopute, ki so med oblaganjem majhnih delcev delno prekrile perforirane dele bobna (9,10).

Strunck je patentiral tudi posebno ukrivljeno cev (angl. immersion tube), skozi katero je bilo mogoče neposredno vstaviti v plast delcev in tako hkrati dovajati kapljevino za oblaganje in zrak za sušenje (slika 2). Z uporabo takšne cevi izboljšamo izkoristek in enakomernost

oblaganja, po drugi strani pa zaradi trenja med cevjo in delci prihaja do krušenja in neenakomernega gibanja (11, 12).



Slika 2: Boben za oblaganje z vstavljenimi ukrivljenimi cevjo za dovod zraka za sušenje in tekočine za oblaganje.

Figure 2: Coating drum with inserted immersion tube for drying air and coating liquid supply.

2.1.1 Bobni za kontinuirano oblaganje

V želji po proizvodnji večje količine izdelkov konstantne kakovosti, varnosti in učinkovitosti in težav prisotnih pri prenosu tehnologije z laboratorijskega na industrijski nivo, se je pričel razvoj naprav za kontinuirano oblaganje. V začetku so poskušali s povezovanjem posameznih bobnov med seboj z napravami za transport materiala iz enega bobna v drugega. Danes so bobni za kontinuirano oblaganje sestavljeni iz podolgovatega ohišja, v katerega je vgrajen valj, ki se vrti okoli osi nameščene horizontalno. Na vsaki strani ima odprtino skozi katero je mogoče dodajati neobložene oz. odvzeti že obložene delce. Po celotni dolžini so nameščene šobe za razprševanje raztopine obloge. Prednosti kontinuiranega oblaganja so: zmanjšana variabilnost produkta v primerjavi s serijsko proizvodnjo, celoten proces poteka znotraj ene naprave (primerno tudi za oblaganje z učinkovinami, pri katerih moramo biti ob rokovanju še posebej pazljivi; manj je tudi čiščenja), skrajšan čas proizvodnje (ni »mrtvega« časa med posameznimi procesnimi fazami), zmanjšane izgube, zaradi visoke stopnje avtomatizacije je potrebnega manj ročnega dela, zaradi svoje geometrije pa zavzamejo tudi manj prostora. Poleg prednosti pa imajo omenjene naprave tudi nekatere pomanjkljivosti. Tako je ta postopek primeren le za izdelavo velikih količin produkata pri čemer moramo upoštevati tudi stroškovno upravičenost. V primeru oblaganja delcev s široko porazdelitvijo velikosti, se težko doseže enakomerno razprševanje tekočine za oblaganje po vseh delcih, zaradi česar je težko določiti optimalno hitrost razprševanja in čas trajanja postopka oblaganja (2).

2.2 Tehnologija z vrtninjenjem

V farmaciji se tehnologija z vrtninjenjem (angl. fluidised bed technology) uporablja za različne postopke kot so: oblaganje z raztopinami, suspenzijami, praškastimi delci (pomožnimi snovmi in/ali zdravilnimi učinkovinami), filmsko oblaganje, sušenje, granuliranje z dograjevanjem, direktno izdelavo pelet in mešanje. Tehnologija z vrtninjenjem omogoča, da se trdni delci v mnogih pogledih obnašajo kot tekočina. Ta proces imenujemo fluidizacija (angl. fluidisation). Do tega pride zaradi vpihovanja zraka, usmerjenega navzgor, skozi plast trdnih

delcev. V toku zraka se delci dvignejo in ostanejo večino časa ločeni drug od drugega (13).

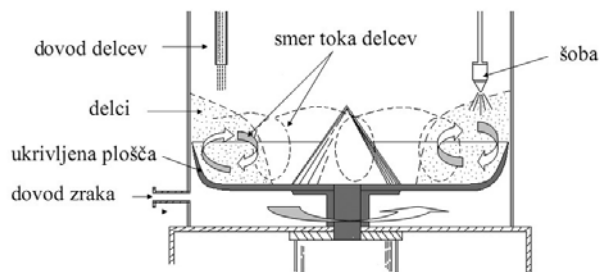
Komore, ki temeljijo na tehnologiji z vrtninjenjem, se med seboj razlikujejo po vzorcu gibanja vhodnega zraka in delcev ter smeri razprševanja kapljevine. Njihov razvoj je narekovala uporaba za različne namene kot so: oblaganje, granuliranje, peletizacija in sušenje.

2.2.1 Razprševanje od zgoraj

Najpreprostejšo izvedbo tehnologije z vrtninjenjem predstavlja komora za razprševanje od zgoraj, ki ima obliko obrnjenega in prisekanega stožca. Napravo so razvili iz vrtnično slojnega sušilnika (angl. fluid bed dryer). Zgornji, širši del, predstavlja ekspanzijski prostor, na spodnjem delu je nameščena perforirana plošča in/ali mrežica gostega tkanja preko katere uvajamo zrak za fluidizacijo. Opisana naprava je primarno namenjena izdelavi granulata (angl. top spray fluid bed granulator). Delci s tokom zraka potujejo proti šobi nameščeni na določeni oddaljenosti od plošče/mrežice, ki je nameščena na dnu komore, kar omogoča razprševanje proti smeri zračnega toka. Pri oblaganju je pomembno, da ga izvajamo pri nižjem položaju šobe, kjer sta številčna gostota in hitrost delcev največja ter razdalja potovanja razpršene kapljice do delca najmanjša. Tovrstna komora zaradi manj definirane toka zraka in posledično poti delcev ni primerna za izdelavo funkcionalnih oblog, pri katerih je zahtevana enakomernost in zveznost nanosa (npr. gastrorezistentnih), jo pa uporabljamo pri nanašanju oblog za prekrivanje neprijetnega okusa učinkovin (14).

2.2.2 Tangencialno razprševanje - rotorska komora

Rotorska komora sestoji iz spodnjega dela z vrtečo ploščo, šobe in ekspanzijskega dela. Zaradi toka zraka in mehanske sile rotorske plošče se delci gibljejo zelo homogeno, kar se odraža tudi v enakomernosti oblaganja. Šoba je postavljena tangencialno glede na smer gibanja delcev in je med procesom potopljena v delce. Z rotor granulatorji lahko celoten postopek izdelave pelet izvedemo v eni napravi (izdelava jedra, oblaganja in sušenja), kar omogoča tudi enostavnejšo in hitrejšo validacijo opreme (14, 15). Tu velja omeniti tudi t.i. CF granulator (angl. centrifugal tumbling apparatus), ki se od zgoraj opisane naprave loči po obliki vrteče se plošče na dnu naprave. Kot je razvidno iz slike 3, je plošča ob straneh zakrivljena navzgor in tvori obliko nekakšne posode z ravnim dnom. Ta izboljšava zagotavlja intenzivno mešanje večjih količin delcev ter v primerjavi s klasičnimi napravami omogoča izdelavo večjih serij. Pri oblaganju tekočino za oblaganje dovajamo preko navpično nameščene šobe, tako da



Slika 3: CF granulator z ukrivljeno vrtečo ploščo na dnu.

Figure 3: CF apparatus with curved circulating disc at the bottom.

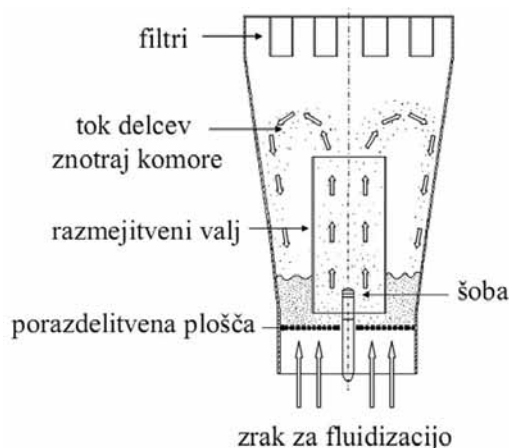
razpršujemo od zgoraj navzdol. Z uporabo sistema za dovajanje prahov je mogoče nanašati tudi praškaste obloge (16).

Zaradi velike vlažnosti delcev prihaja do njihovega lepljenja na stene komore in filtre v zgornjem delu naprave, kar predstavlja eno večjih pomanjkljivosti rotor tehnike (14). Posamezni proizvajalci nudijo rešitev v obliki vgrajenega senzorja vlažnosti, ki je povezan s sistemom za razprševanje. S tem je zagotovljena avtomatska prilagoditev hitrosti razprševanja tekočine za aglomeracijo/oblaganje in zraka za sušenje glede na vlažnost vsebine v napravi (17).

2.2.3 Razprševanje od spodaj

Kot pove že samo ime, je pri tovrstnih napravah šoba nameščena na spodnji strani naprave, kar omogoča razprševanje tekočine v smeri toka zraka. Leta 1953 je Dale Wurster razvil in patentiral napravo za oblaganje s pomočjo katere je lahko na tablete, suspendirane v toku toplega zraka, razprševal disperzijo za oblaganje (18).

V patentih iz let 1957 in 1963 je opisal napravo in način izdelave granulata znotraj ene same procesne komore. Tako je v omenjeni napravi zaradi toka zraka lahko potekalo mešanje prahov in sušenje končnega produkta po dodatku raztopine za granulacijo (19, 20). Naprava je predstavljala osnovo t.i. Wursterjevi komori, ki se od ostalih vrtninoslojnih naprav loči predvsem po sredinskem razmejitvenem valju in konfiguraciji odprtin v porazdelitveni plošči (slika 4) (21).

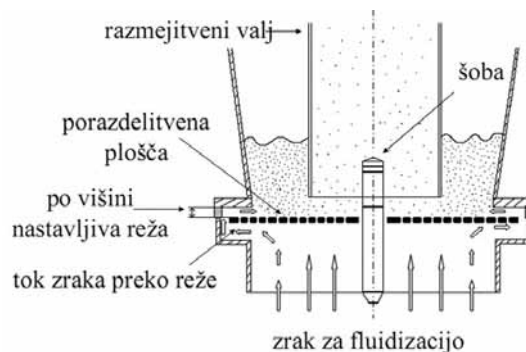


Slika 4: Wursterjeva komora s prikazanim tokom delcev.

Figure 4: Wurster process chamber with represented particle motion.

Za oblaganje manjših delcev (pelete, granule) predstavlja oblaganje v Wursterjevi napravi metodo izbora. Pri oblaganju večjih delcev (tablet) pa Wursterjevo napravo uporabljamo le redko, saj zaradi intenzivnega gibanja pogosto prihaja do krušenja nanešene obloge in jeder. Specifična razporeditev odprtin v porazdelitveni plošči Wursterjeve naprave zagotavlja tok zraka tudi ob stenah v spodnjem delu komore. Ker je tu tok zraka relativno šibek, se ustvarjajo področja, kjer se delci zadržujejo dlje časa in tako ne vstopajo v območje razprševanja. Težavo so najprej poskušali odpraviti z uporabo porazdelitvene plošče z večjimi odprtinami na obodu, kar pa se je pri oblaganju določenih snovi (predvsem večjih delcev) izkazalo za neučinkovito (22). Težavo so rešili z vpihovanjem zraka skozi režo, nameščeno tik nad

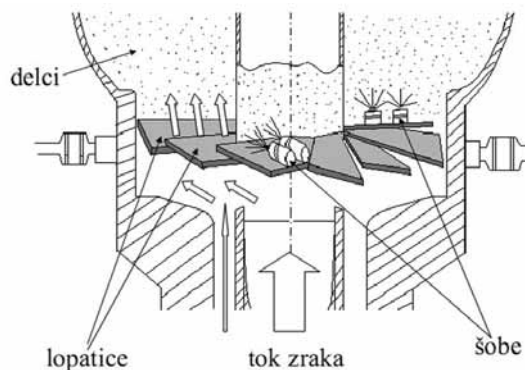
porazdelitveno ploščo. S tem so delce usmerili stran od stene naprave, proti razmejitvenemu valju in zagotovili enakomerno oblaganje vseh delcev. Edina pomanjkljivost te modifikacije je v uporabi komprimiranega zraka iz zunanjega vira (potreba po dodatni opremljenosti, zrak ni enake temperature, enake vlažnosti kot zrak za fluidizacijo) (23). To so odpravili z namestitvijo obrova, ki je skozi režo omogočal vpihovanje zraka za fluidizacijo. Višino reže oz. velikost odprtine za vpihovanje je moč nastavljati ter s tem uravnati pretok zraka (slika 5) (24).



Slika 5: Modificirana Wursterjeva naprava z nastavlljivo režo tik nad porazdelitveno ploščo, ki zagotavlja tok zraka za usmerjanje delcev stran od stene komore.

Figure 5: Modification of Wurster fluidized bed apparatus with adjustable gap located directly above distribution plate to guide particles away from walls of the process chamber.

Pri oblaganju se pogosto srečamo tudi s problemom prehajanja delcev v območje še ne dokončno izoblikovanega curka kapljic tekočine, kar zmanjšuje učinkovitost in izkoristek oblaganja zaradi lokalne aglomeracije. Aglomeraciji so se uspešno izognili z namestitvijo posebnega valja (ščita) okoli šobe, ki onemogoča prezgodnje prehajanje delcev v območje razprševanja ter zagotavlja, da je tok zraka okoli šobe nemoten in brez delcev (25, 26).



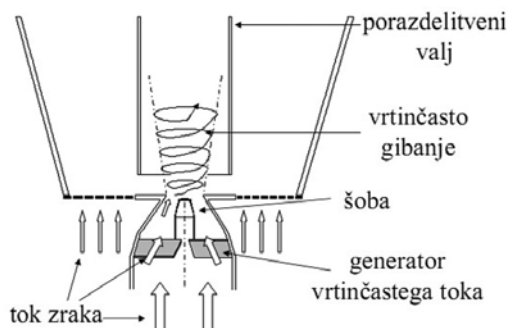
Slika 6: Spodnji del naprave za oblaganje delcev z radialno nameščenimi lopaticami za usmerjanje toka zraka in šobami za razprševanje tekočine za oblaganje.

Figure 6: Lower part of coating apparatus with radially installed gas guiding walls and coating liquid spray nozzles.

Med napravami za razprševanje od spodaj velja omeniti Hüttlinovo napravo, ki ima namesto porazdelitvene plošče nameščen sistem lopatic za usmerjanje zraka. Nameščene so radialno glede na steno komore in tako tvorijo nekakšno statično mešalo. Zrak, ki prihaja s spodnje strani, se zaradi "mešala" zvrtniči in ustvari posebno vrtnično plast (angl. swirl). Drugo posebnost predstavljajo šobe za razprševanje, ki so nameščene med posameznimi lopaticami (slika 6). Zaradi vrtničastega gibanja delcev v komori, sta procesa oblaganja in sušenja izredno učinkovita, tako da ne prihaja do nenadzorovanega gibanja ter odlaganja (lepljenja) delcev na stene naprave (27).

Idejo o uporabi posebne vrtnične plasti (swirl) za oblaganje manjših delcev z namenom zmanjšane pojavljanja aglomeracije in enakomernejšega oblaganja, srečamo tudi pri napravah drugih proizvajalcev. Tako je Walter leta 1998 v svojem patentu opisal napravo, katere oblika je enaka klasični komori za razprševanje od spodaj, le da je namesto porazdelitvene plošče vgradil poseben generator vrtničastega toka (slika 7). Ta se od Hüttlinovega izuma razlikuje po obliki in številu lopatic za usmerjanje toka zraka, vrtničasta plast pa je omejena le na območje okoli šobe in vzdolž razmejivnega valja. Poleg tega se premer odprtine generatorja vrtničastega toka za vstop zraka v komoro proti vrhu naglo zmanjšuje, kar še dodatno poveča hitrost zraka na njegovem izhodu in s tem zagotavlja še izrazitejše vrtničenje (28, 29).

Leta 2004 je Hüttlin predstavil napravo za oblaganje delcev, pri kateri je dno sestavljeno iz številnih med seboj prekrivajočih se obročev. Med dvema sosednjima obročema je reža, skozi katero v napravo vpihujemo zrak za fluidizacijo (30). Zaradi nagnjenih stranic naprave, se ob steni tok zraka ter posledično tudi delcev, usmeri navzgor. Gravitacijska sila delce po dosegu določene višine usmeri navzdol proti sredini naprave. Znotraj naprave se tako ustvari posebno harmonično in krožno gibanje, kar zmanjša trenje med delci in izboljša razprševanje tekočine za oblaganje.



Slika 7: Spodnji del vrtničnoslojne naprave za oblaganje delcev z vgrajenim generatorjem vrtničastega toka, ki ustvarja vrtničasto gibanje zraka znotraj razmejivnega valja.

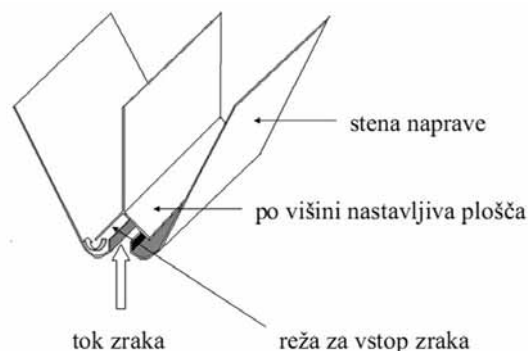
Figure 7: Lower part of the fluidised bed coating apparatus with swirl generator, which generates a swirling air motion inside of internal draft tube.

Napravo je nato dodatno izboljšal z namestitvijo reže okoli šobe, skozi katere je vpihaval zrak vzporedno glede na dno ter s tem okoli šobe

ustvaril tok zraka, ki je preprečeval prezgodnje zahajanje delcev v območje razprševanja (31).

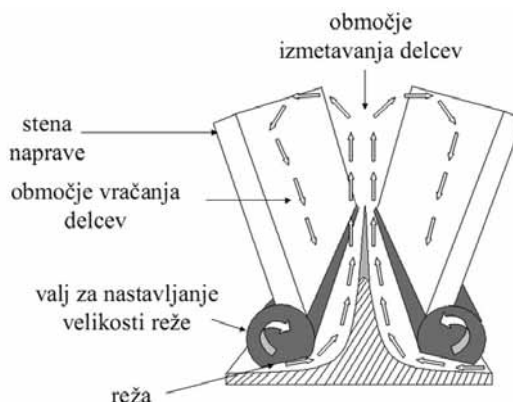
2.2.4 Naprave za oblaganje, ki temeljijo na tehnologiji izmetavanja

Naprave za oblaganje, ki temeljijo na tehnologiji izmetavanja delcev (angl. spouted bed coaters), so razvili kot alternativo klasičnim napravam s področja tehnologije z vrtničenjem. Zaradi posebnega, pulzirajočega toka delcev so te naprave učinkovite tudi pri oblaganju delcev večjih od 2 mm. Za razliko od vrtničnoslojnih naprav zrak tu ne vstopa skozi porazdelitveno ploščo, temveč z veliko hitrostjo (1 - 30 m/s) skozi napravo za uravnavanje toka zraka, katere ima poleg oblike procesne komore največji vpliv na vzorec in hitrost gibanja delcev. Konstruirana je lahko kot sredinsko nameščena odprtina na dnu komore ali pa kot reža vzdolž celotne naprave. Z različnimi konstrukcijskimi spremembami naprave za uravnavanje toka zraka so izboljšali tok delcev med oblaganjem. Tako so razvili napravo, pri kateri vstopni del predstavlja ozka reža vzdolž dna naprave preko katere je



Slika 8: Shema naprave za izmetavanje delcev z nastavljivo režo vzdolž celotne naprave, preko katere vstopa zrak za fluidizacijo.

Figure 8: Scheme of spouted bed apparatus with adjustable gap for fluidisation air intake down the process chamber.



Slika 9: Naprava z nastavljivo režo v obliki valja.

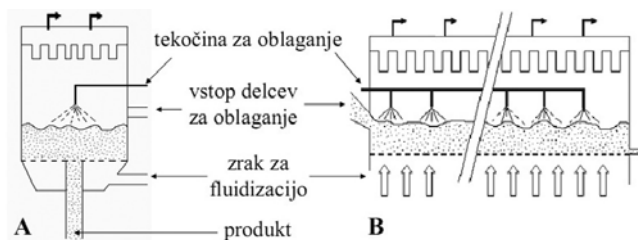
Figure 9: Spouted fluidizing chamber with gap formed by turnable cylinder.

nameščen nastavek, ki omogoča prilagajanje odprtine za vstop zraka (slika 8). Pomanjkljivost omenjene naprave je kopičenje okruškov obloge in praškastih delcev na reži, kar lahko vpliva na vzorec gibanja zraka (32). Pri modifikaciji zgoraj omenjene naprave, so med stene naprave na spodnjem delu vgradili prisekan valj, ki z obračanjem določa velikost reže in tako uravnava pretok zraka (slika 9). S tem so rešili tudi težavo lepljenja delcev na režo za vpihovanje zraka (33).

Jacob je s sodelavci oblikoval napravo, v katero je zrak vpihoval v aksialni smeri skozi režo na dnu naprave (34). Premer naprave se je proti vrhu hitro povečeval, s tem pa je naglo padala tudi hitrost zraka za izmetavanje delcev. Vse to je omogočilo nadzorovano krožno gibanje delcev. Šobo za razprševanje je bilo moč namestiti iz zgornje ali spodnje strani ter tako doseči optimalno razprševanje tekočine za oblaganje. S povezovanjem takšnih naprav med seboj so izdelali tudi napravo za kontinuirano oblaganje (35).

2.2.5 Naprave za kontinuirano oblaganje delcev

Ravno tako kot v primeru oblaganja delcev v bobnih, so tudi na področju tehnologije z vrtnčenjem vodilo razvoja naprav za kontinuirano oblaganje (angl. continuous processing) predstavljale težave pri serijski izdelavi delcev (variabilnost med serijami, možna kontaminacija produkta med prenosom iz ene v drugo napravo, majhne proizvodnje serije). Začetek razvoja je predstavljala vgradnja naprav za dovajanje začetnih jeder in sistemov za odvajanje produkta iz klasične naprave za serijsko proizvodnjo (angl. batch processing) (slika 10A). Tovrstne naprave lahko imenujemo tudi monocelične naprave za kontinuirano oblaganje (angl. monocell continuous fluid bed), kajti celoten proces poteka le v eni procesni komori. Prave naprave za kontinuirano oblaganje delcev so se pojavile z razvojem t.i. horizontalnih vrtnčnoslojnih naprav. Te si lahko predstavljamo kot eno samo zelo dolgo procesno komoro, brez vmesnih pregrad, vzdolž katere po celotni dolžini vpihujemo zrak za fluidizacijo ter preko številnih šob razpršujemo tekočino za oblaganje (slika 10B). Vstop delcev poteka na eni, izstop pa na drugi strani naprave. Delci se vzdolž naprave pomikajo zaradi vibriranja, nagibanja naprave, tekočih travov ali zraka za fluidizacijo. Za dosego ustrezne debeline obloge je potreben določen čas oblaganja, ki ga lahko dosežemo le z zadostno dolžino procesne naprave. Dolžina tovrstnih naprav lahko meri od nekaj metrov pa vse do več deset metrov (36).



Slika 10 : Monocelična (A) in horizontalna (B) naprava za kontinuirano oblaganje delcev.

Figure 10: Monocell (A) and horizontal (B) continuous coating apparatus.

Proti koncu 90-tih let prejšnjega stoletja so se številni izdelovalci procesne opreme odločili skrajšati dolžino naprav za kontinuirano

oblaganje, pojavila pa se je tudi želja, da bi v eni napravi izvajali več različnih procesov. Zato so razvili t.i. večcelično napravo. V takšni napravi lahko v vsakem predelu ustvarimo različne procesne pogoje (različna hitrost in/ali temperatura zraka za fluidizacijo, hitrost razprševanja, vrsta disperzije za oblaganje). Med posameznimi predeli delci potujejo zaradi zraka za fluidizacijo. Ena izmed pomanjkljivosti teh naprav je oblaganje delcev s široko distribucijo velikosti, saj le s tokom zraka za fluidizacijo težko zagotovimo enakomerno gibanje vseh delcev (36).

Temu se je uspešno izognil Liborius, ko je predstavil večcelično napravo, ki je bila sestavljena iz več povezanih procesnih enot. Tovrstno proizvodnjo lahko označimo kot pol-kontinuirani proces, kajti postopek najprej poteka v eni napravi, iz katere se po končani operaciji s pomočjo pnevmatskega transporta prenese v naslednjo (37).

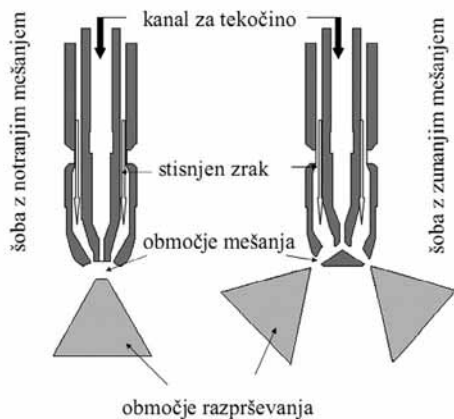
3 Načini dodajanja tekočine za oblaganje

Poleg same konstrukcijske izvedbe naprave za oblaganje ima eno ključnih vlog pri procesu oblaganja, način dodajanja tekočine za oblaganje. Pri tem je bistvenega pomena, da na vse delce tekom celotnega postopka oblaganja enakomerno nanese enako količino tekočine.

Pri bobnih za oblaganje lahko tekočino za oblaganje dodajamo na različne načine. V začetku so tekočino dodajali s polivanjem. To pomeni, da so skozi odprtino bobna na delce polili določeno količino tekočine, ki se je nato zaradi intenzivnega gibanja delcev razporedila po njihovi površini. Po določenem času, ki je bil potreben za sušenje, so postopek ponovili. To so ponavljali dokler niso dobili obloge želene debeline. Takšen način dodajanja je primeren le za izdelavo debelejših in predvsem sladkornih oblog. Neenakomerno dodajanje tekočine ter neenakomerno sušenje delcev je velikokrat vodilo v nastanek aglomeratov. Prav tako ta metoda ni primerna za izdelavo tanjših (filmskih) oblog. Z uporabo šob za razprševanje tekočine so se zgoraj omenjenim težavam uspešno izognili. Danes v večini procesov oblaganja (to še posebno velja za naprave, ki temeljijo na vrtnčenju) tekočino za oblaganje na delce razpršujemo s pomočjo različnih šob. Glavna naloga šob je, da tekočino razpršijo v majhne kapljice in da zaradi neprekinjenega dodajanja tekočine za oblaganje zagotavljajo konstantno rast debeline obloge.

Običajno pri oblaganju uporabljamo hidravlične ali pnevmatske šobe. Prve lahko opišemo kot šobe, pri katerih ne potrebujemo zraka, temveč le črpalko za potiskanje tekočine. S pomočjo črpalke dosežemo visok tlak tekočine (50 – 150 barov), kar povzroči njeno atomizacijo na izhodu šobe. Za pnevmatske oz. binarne šobe je značilno, da so povezane s črpalko za dovajanje tekočine in dovodom stisnjenega zraka. Na koncu binarne šobe prihaja tekočina za oblaganje v stik z hitrim tokom zraka v ekspanziji, kar zaradi močnih strižnih sil povzroči razbitje na drobne kapljice. Uporabljamo jih lahko za oblaganje s suspenzijami, disperzijami in visoko viskozniimi tekočinami, saj je verjetnost zamašitve zaradi večje odprtine na koncu šobe v primerjavi s hidravličnimi, precej manjša. Poznane pa so tudi ternarne šobe, pri katerih dodaten komprimiran zrak ustvarja mikro klimo okoli stožca atomizirane tekočine.

Šobe lahko ločimo tudi glede na mesto stika med tekočino (pri večfaznih šobah lahko pride do mešanja več tekočin) in stisnjenim zrakom (slika 11). Pri večini binarnih šob se ta zgodi tik nad kapico šobe z odprtino, zato jim pravimo tudi šobe z zunanjim mešanjem (angl. external mixing nozzle). Lahko pa do stika pride že znotraj šobe (šobe z notranjim mešanjem – angl. internal mixing nozzle).



Slika 11: Šoba z zunanjim ter notranjim mešanjem.

Figure 11: External and internal mix jet nozzle.

Pomembna lastnost šob je tudi oblika curka tekočine, ki ga ustvarijo na izhodu. Oblika curka vpliva na močenje in porazdelitev kapljic tekočine na delcih ter ima pomemben vpliv na proces oblaganja. Vpliva lahko na poroznost, gostoto in enakomernost debeline obloge. Poznamo šobe, katere ustvarjajo curek podoben obroču (angl. hollow cone pattern), stožcu (angl. full cone pattern) ali sploščnemu krogu (angl. flat jet pattern). Obročast curek je zaželen predvsem pri procesu močenja in aglomeracije, medtem ko sta ostali dve obliki primernejši v procesu oblaganja (38).

4 Zaključek

Izdelava farmacevtskih oblik s postopkom oblaganja predstavlja pomemben del proizvodnje v farmacevtski industriji. Zato ne preseneča veliko število objavljenih patentov s področja razvoja, nadgradnje in optimizacije naprav za oblaganje. V zadnjih desetletjih so bile izdelane tudi številne študije s področja razumevanja in poznavanja posameznih procesnih dejavnikov, ki vplivajo na potek oblaganja, pa vendarle je predpogoj za uspešno voden proces še vedno procesna oprema. Danes razvoj temelji predvsem na avtomatizaciji in računalniškem vodenju že znanih izvedenk naprav. Moderne naprave za oblaganje delcev so tako opremljene z napravami za samodejno polnjenje začetnih jeder, odvajanje končnega produkta, z različnimi sistemi avtomatskega čiščenja (angl. CIP – cleaning in place) in številnimi senzori, ki omogočajo spremljanje postopka v realnem času.

5 Literatura

1. Lehman K, Bröggman B. Tablet coating. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York, 1995; 14: 355-384

2. Seitz JA, Metha SP, Yeager JL. Tablet coating. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. The theory and practice of industrial pharmacy. Lea&Febiger, Philadelphia, 1986; 346-373

3. http://www.glatt.com/e/04_maschinen/04_02_02.htm (2009)

4. Felton AL. Film Coating of oral solid dosage forms. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York 2007: 1729-1747

5. Keil H. Drageekessel. DE1198187 (1965)

6. Pellegrini P. Candy apparatus for coated confectionary. US patent 3438353 (1969)

7. Seits JA. Aqueous Film Coating. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York 1995; 1: 337-349

8. Miyata K, Samuma Y, Motoyama S et al. Coating apparatus. US patent 4799449 (1989)

9. Hostetler VB. Tablet Coating apparatus. US patent 3601086 (1971)

10. Forster E. Method and Apparatus for the batchwise coating of particles. US patent 4581242 (1986)

11. Porter SC. In: Gennaro AR. (Ed). Remington: The science and practice of pharmacy, 19th Edition, Mack Publishing Company, 1995; 93: 1650-1675

12. O'Hara D, Marjeram J. Continuous feed tablet coating system. WO patent 2006108280 (2006)

13. Mathur LK. Fluid-Bed Dryers, Granulators and coaters. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York, 1992; 6: 171-195

14. Ghebre-Sellassie I, Knoch A. Peletization techniques. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York, 1995; 11: 369-394

15. Glatt W, Bauer K. Fluidized bed apparatus. US patent 4323312 (1982)

16. Takei H, Kurita K, Akiyama H, Yamanaka K. Centrifugal tumbling granulating-coating apparatus. US patent 5582643 (1996)

17. Vrečer F. Izdelava pelet v vrtninoslojnom granulatorju. Zbornik posvetovanja tehnološke sekcije – Sodobni tehnološki trendi k oblikovanju zdravil, 1996: 77-86

18. Wurster DE. Method of applying coatings to edible tablets or the like. US patent 2648609 (1953)

19. Wurster DE, Wis M. Means for applying coatings to tablets or like. US patent 2799241 (1957)

20. Wurster DE, Wis M. Granulating and coating process for uniform granules. US patent 3089824 (1963)

21. Wurster DE, Wis M, Lindolf JA. Particle coating apparatus. US patent 3241520 (1966)

22. Cole CG. Coating pans and coating columns. In: Cole GC, Hogan J, Michael A. Pharmaceutical coating technology, Francis and Taylor, Philadelphia, 1995: 229-232

23. Jones DM, Smith RA, Kennedy JP et al. Apparatus for coating tablets. US patent 6579365 (2003)

24. Bender M. Wurster fluid bed coater with fluidizing gas distribution plate bypass. US patent 11478903 (2008)

25. Jones DM. Fluidized bed with spray nozzle shielding. US patent 5437889 (1995)

26. Bender MP. Wurster fluid bed coater with agglomeration enhancement screen. US patent 7147717 (2006)

27. Hüttlin H. Fluidized bed apparatus for the product and/or further treatment of granulate material. US patent 4970804 (1990)

28. Walter K. Apparatus for coating solid particles. US patent 5718764 (1998)

29. Heng PWS, Chan LW, Tang ESK. Use of swirling airflow to enhance coating performance of bottom spray fluid bed coaters, Int J Pharm Sci 2006; 327: 26-35

30. Hüttlin H. Device for treating particulate material. US patent 2004/0013761 (2004)

31. Hüttlin H. Apparatus for treating particulate material. US patent 2006/0112589 (2006)

32. Moeri L, Kuenne HJ, Krell L et al. Apparatus for radiative layer drying of adhesive granular and thermolabile materials. DE patent 3400397 (1984)

33. Moeri L, Heinrich S, Krueger G et al. Adjustable gas-flow device for jet bed apparatuses. DE patent 10004939 (2001)

34. Jacob M, Rümpler K, Waskow M. Method and device for introducing liquids into a flow of solids a spouted bed apparatus. EP patent 1622711 (2003)

35. Jacob M, Rümpler K, Waskow M. Fluidized bed apparatus for batch-by-batch or continuous process control and method for operating a fluidized bed apparatus. US patent 7241425 (2004)

36. Teunou E, Poncelet D. Batch and continuous fluid bed coating – Review and state of the art, J Food Eng 2002; 53: 325-340

37. Liborius E. Continuous multi-cell process for particle coating providing for particle recirculation in the respective cells. US patent 5648118 (1997)

38. Dybdahl HP, Bach P, Jensen AD. Two-fluid spray atomisation and pneumatic nozzles for fluid bed coating/agglomeration purposes: A Review. Chem Eng Sci 2008; 63: 3821-3842

»In vitro-in vivo« korelacija (IVIVC) za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali absorbirajo s prenašalci v prebavilih

In vitro in vivo correlation (IVIVC) for drugs in extended release formulations which are extensively metabolized or absorbed with transporters

Uroš Klančar, Igor Legen, Albin Kristl, Aleš Mrhar

Povzetek: Na sproščanje učinkovin iz pripravkov s podaljšanim sproščanjem in absorpcijo iz prebavil vplivajo fizikalno kemijske lastnosti učinkovine, lastnosti farmacevtske oblike in fiziološke lastnosti gastrointestinalnega trakta (GIT). Nekatere učinkovine se v prebavilih lahko intenzivno metabolizirajo, ali pa na njih vplivajo različni prenašalci. Oboje lahko znatno spremeni obseg absorpcije in posledično stopnjo »in vitro-in vivo« korelacije (IVIVC), ki predstavlja osnovo za napovedovanje plazemskih koncentracijskih profilov učinkovine na osnovi »in vitro« preskusov raztapljanja. V članku so glede na vrsto učinkovin, ki imajo različne lastnosti glede na biofarmaceutski sistem klasifikacije (BCS) in so vgrajene v pripravke s podaljšanim sproščanjem, opisani primeri vplivov metaboličnih procesov in prenašalcev na uspešnost doseganja IVIVC.

Ključne besede: IVIVC, metabolizem, prenašalci, podaljšano sproščanje

Abstract: Physical-chemical characteristics of a drug, formulation properties and physiology of gastrointestinal (GI) tract have an influence on drug release from extended release formulations and consequent absorption. Absorption of various drugs is influenced by metabolism and different transporters which can lead to changes in the extent of absorption and difficulties in establishing *in vitro in vivo* correlation (IVIVC). IVIVC models are prerequisite to predict *in vivo* plasma concentration profiles on basis of *in vitro* data. In this article various examples of metabolism and transporter influences on IVIVC for different drugs (according to biopharmaceutical classification system - BCS) incorporated in extended release formulations are theoretically discussed.

Keywords: IVIVC, metabolism, transporters, extended release

1 Uvod

Ključna lastnost pripravkov, v večini primerov tablet, s podaljšanim sproščanjem je v tem, da sprostijo učinkovino po vnaprej določenem profilu, ki ga pridobimo s pomočjo »in vitro« testiranj in izvedbe »in vivo« študij na ljudeh. V idealnem primeru je »in vitro« profil sproščanja enak kot ga pričakujemo »in vivo« in takrat lahko rečemo, da obstaja dobra IVIVC. Doseganje dobre IVIVC, zlasti za pripravke s podaljšanim sproščanjem, je trenutno eden najbolj aktualnih ciljev tako proizvajalcev originatorskih zdravil kot tudi generične farmacevtske industrije. Z razvojem IVIVC želimo zmanjšati obseg farmakokinetičnih testiranj tekom razvoja originatorskega zdravila, pri generičnih zdravilih pa povečati uspešnost bioekvivalenčnih študij, kar je glavni pogoj za registracijo zdravila. V obeh primerih se zmanjšajo stroški in število potrebnih študij na ljudeh. Dobra IVIVC olajša tudi registracijo drugih jakosti zdravil preko koncepta opustitve bioekvivalenčne študije (biowaiver – koncept, ki omogoča registracijo generičnega zdravila samo z izvedbo *in vitro* preskusov), omogoča postavitev biološko

relevantne specifikacije in vključevanje raznih sprememb v proizvodnem postopku, sestavi ter lokaciji proizvodnje potem ko je bilo zdravilo že registrirano (1,2).

Da bi dosegli dobro IVIVC, moramo za test sproščanja uporabiti ustrezno »in vitro« metodo, ki dobro ponazarja pogoje v GIT. Na sproščanje učinkovin iz farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem lahko vplivajo pH, ionska moč, površinsko aktivne snovi, etanol in druge komponente v mediju za raztapljanje (3-6). Predvsem na ogrodne tablete, bolj kot na katere druge farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem, vplivajo različni hidrodinamski vplivi, motorična aktivnost želodca - MMC (mioelektrični migrirajoči kompleks) in druge fizikalne obremenitve v GIT, v stanju na tešče (angl. fasted) ali po obroku (angl. fed), kar je pomembno pri načrtovanju bioekvivalenčnih študij (7, 8, 9). Pomembno je tudi, da se učinkovina iz pripravkov s podaljšanim sproščanjem sprosti v času znotraj absorpcijskega okna. Tableta se v tankem črevesju zadržuje od 3 do 4 ure, v debelem pa približno 22 ur.

Poleg dejavnikov, ki vplivajo na sproščanje učinkovine iz pripravka, na farmakokinetiko vpliva tudi mehanizem ter kinetika absorpcije in (predsystemskega) metabolizma učinkovine, potem ko je ta že raztopljena v prebavilih. Prehod skozi enterocite v črevesni steni lahko poteka na različne načine kot so pasivna difuzija, endocitoza in s prenašalci. Na absorpcijo lahko vpliva tudi limfni obtok, ki ga stimulira prisotnost maščob v hrani (10). Prenášalci na enterocitih lahko tudi zmanjšajo ali povečajo obseg absorpcije določenih učinkovin in tako vplivajo na biološko uporabnost. Poznavanje vseh naštetih dejavnikov je pomembno pri ugotavljanju IVIVC.

2 Uporaba BCS klasifikacije pri pripravkih s podaljšanim sproščanjem

2.1 Osnove biofarmacevtskega sistema klasifikacije (BCS)

Biofarmacevtski sistem klasifikacije (angl. Biopharmaceutical Classification System, BCS) predstavlja osnovni okvir za ocenjevanje in doseganje IVIVC. Od pojava koncepta BCS leta 1995 je njegov glavni namen razdeliti učinkovine v 4 razrede glede na topnost učinkovine in permeabilnost skozi membrano stene GIT (Slika 1 in 2) (11). Glede na to, v kateri razred učinkovina spada, lahko napovemo uspešnost IVIVC. Uporabnost BCS klasifikacije se je do danes razširila, saj predstavlja smernico pri iskanju novih učinkovin, pri predkliničnem in kliničnem razvoju zdravil, pri načrtovanju in razvoju različnih generičnih zdravil in kot orodje za zmanjšanje števila bioekvivalenčnih študij (11, 12).

<p>Razred I dobra topnost dobra permeabilnost <i>dobra IVIVC</i></p>	<p>Razred II slaba topnost dobra permeabilnost <i>dobra IVIVC</i></p>
<p>Razred III dobra topnost slaba permeabilnost <i>omejena IVIVC</i></p>	<p>Razred IV slaba topnost slaba permeabilnost <i>omejena IVIVC</i></p>

Slika 1: BCS razdeli učinkovine na štiri razrede. Dobra permeabilnost pomeni, da se po peroralni aplikaciji absorbira več kot 90 % odmerka; dobra topnost pomeni, da se v 250 ml vodnega medija raztopi najvišji odmerek zdravila v pH območju 1-7,5.

Figure 1: According to BCS there are four classes of drugs. Good permeability is when more than 90% of dose is absorbed after oral application. Good solubility means that the highest dose of drug is dissolved in 250 ml of aqueous media within pH range 1-7,5.

<p>Razred I <i>amilorid, amitriptilin, antipirin, atropin, buspiron, ciklofosfamid, diazepam, difenhidramin, diltiazem, doksepin, efedrin, enalapril, estradiol, etambutol, etinil fenilalanin, fenobarbital, fluoksetin, imipramin, kaptopril, ketoprofen, kinidin, klorfeniramin, klorokinon, kofein, levodopa, levofloksacin, lidokain, meperidin, metoprolol, metronidazol, midazolam, misoprostol, prednizolon, primakin, promazin, propranolol, rosiglitazon, salicilna kislina, teofilin, valprojska kislina, verapamil, zidovudin</i></p>	<p>Razred II <i>amjodaron, atorvastatin, azitromicin, ciklosporin, ciprofloksacin, cisaprid, danazol, dapson, difunisal, digoksin, diklofenak, eritromicin, fenitoin, flubiprofen, glipizid, gliburid, griseofulvin, ibuprofen, indinavir, indometacin, itrakonazol, karbamazepin, karvedilol, ketokonazol, klorpromazin, lansoprazol, lovastatin, mebendazol, naproksen, nelfinavir, ofloksacin, oksaprozol, piroksikam, ritonavir, sakvinavir, sirolimus, spironolakton, takrolimus, talinolol, tamoksifen, terfenadin, varfarin</i></p>
<p>Razred III <i>amoksisilin, aciklovir, atenolol, bidizomid, bisfosfonati, cefazolin, cetirizin, cimetidin, ciprofloksacin, dikloksacilin, eritromicin, famotidin, feksofenadin, furosemid, ganciklovir, hidroklorotiazid, kaptopril, kloksacilin, lizinopril, metformin, metotreksat, nadolol, penicilini, pravastatin, ranitidin, tetraciklin, trimetoprim, valsartan, zalcitabin</i></p>	<p>Razred IV <i>amfotericin B, ciprofloksacin, furosemid, klorotiazid, klortalidon, kolistin, mebendazol, metotreksat, neomicin</i></p>

Slika 2: Primeri učinkovin glede na BCS razred. Nekatero učinkovino so v dveh razredih, npr. furosemid (I in IV), kaptopril (I in III), metotreksat (III in IV) ali celo treh, kot je ciprofloksacin (II, III, IV), kar je posledica različnih virov in načina določanja (13, 14).

Figure 2: Examples of drugs according to BCS. Some drugs appear in two classes: furosemid (I and IV), captopril (I and III), methotrexat (III and IV) or three: ciprofloxacin (II, III, IV). This is due to different literature data and methods for BCS class determination (13, 14).

2.2 BCS in pripravki s podaljšanim sproščanjem

Kljub razširjenosti uporabe BCS klasifikacije je njena uporabnost za ocenjevanje IVIVC pri pripravkih s podaljšanim sproščanjem vprašljiva in predstavlja velik izziv, predvsem zaradi težavnosti simuliranja dejanskih razmer v GIT z »in vitro« testi. Po drugi strani pa na osnovi BCS klasifikacije lahko ocenjujemo, katere učinkovine je smiselno vgrajevati v pripravke s podaljšanim sproščanjem. Dobro topne in dobro permeabilne učinkovine z večjo ali enako permeabilnostjo kot jo ima metoprolol (uporabljen standard za dobro permeabilnost) so najbolj primerne za vgrajevanje v pripravke s podaljšanim sproščanjem

in v tem primeru ponavadi obstaja tudi dobra IVIVC. Učinkovina se iz pripravkov s podaljšanim sproščanjem lahko sprošča tudi do 24 h, zato je ključno, da poznamo njen mehanizem absorpcije vzdolž celotnega GIT. Del učinkovine se bo absorbiral tudi v kolonu in pomembno je, da zagotovimo ustrezno absorpcijo tudi v tem delu črevesja. Nekatere učinkovine se bolje absorbirajo v kolonu kot v tankem črevesju in biološka uporabnost bi bila večja, če bi dosegli sproščanje učinkovine in absorpcijo v tem predelu GIT. Iz slike 3 vidimo, da bi bila biološka uporabnost nifedipina večja, če bi dosegli, da se absorbira bolj v kolonu (intubacija v kolon). Razlog za to je večji metabolizem nifedipina pri prvem prehodu skozi jetra. Za diltiazem in teofilin pa je relativna biološka uporabnost po intubaciji učinkovine v kolon nižja kot po peroralni aplikaciji (11).

Pri učinkovinah s slabo permeabilnostjo, obstaja nevarnost nepopolne absorpcije in večje intra- in interindividualne variabilnosti, saj je ponavadi permeabilnost v kolonu še nižja kot v tankem črevesju. To pomeni, da učinkovine iz BCS razredov III in IV niso dobre kandidatke za pripravke s podaljšanim sproščanjem, pričakujemo pa tudi slabo IVIVC. Pri amoksicilinu na primer, ki spada v BCS III in se absorbira s pomočjo oligopeptidnega prenašalca (PepT1), niso dokazali nikakršne absorpcije v kolonu. V tem primeru je izdelava farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem nesmiselna. Podobno je pri uporabi učinkovin, ki se v kolonu bolj metabolizirajo. Posebej problematične so učinkovine, ki imajo absorpcijsko okno v zgornjem delu tankega črevesja, na primer šibke kisline s slabo permeabilnostjo, ki se slabo absorbirajo v ileumu, kjer je pH višji. Tak primer je atorvastatin, ki je hkrati tudi substrat za P-gp (15). Z novjšimi tehnološkimi pristopi pa je tudi za tovrstne učinkovine možno doseči ustrezno absorpcijo, saj se na primer zaradi določenih lastnosti farmacevtske oblike lahko dalj časa zadržujejo v zgornjem delu GIT (11,12).

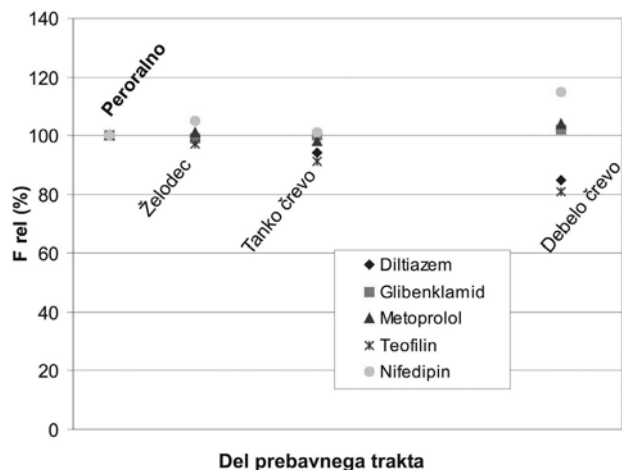
V praksi v pripravkih s podaljšanim sproščanjem vseeno prevladujejo učinkovine iz prvih dveh razredov in razvrstitev učinkovin po BCS klasifikaciji pri teh lahko napišemo tudi drugače (Preglednica 1). Avtorji predlagajo razdelitev učinkovin kjer sta razreda III in IV s slabo permeabilnostjo izvzeta, prva dva razreda pa sta dodatno razdeljena glede na to, ali je permeabilnost različna vzdolž GIT ali ne. Dodan je še peti razred, za učinkovine s pH odvisno topnostjo in permeabilnostjo.

Preglednica 1: Razširitev BCS klasifikacije za pripravke s podaljšanim sproščanjem (12).

Table 1: BCS classification for extended release formulations (12).

Razred	Opis	IVIVC	Primeri
I a	dobra topnost, dobra permeabilnost, ki je enaka vzdolž GIT	Dobra	glipizid, nitroglicerol, paracetamol, teofilin
I b	dobra topnost, permeabilnost, ki je različna vzdolž GIT	Omejena	atropin, celiprolol, levodopa, morfin, verapamil
II a	slaba topnost, dobra permeabilnost, ki je enaka vzdolž GIT	Dobra	ciklosporin, danazol, diklofenak, digoksin, eritromicin, glipizid
II b	slaba topnost, permeabilnost je različna vzdolž GIT	Omejena	fenacetin, indometacin, kloramfenikol, steroidi,
V a	topnost in permeabilnost različni vzdolž GIT, bazične učinkovine	Dobra ali omejena*	felodipin, mesalamin, metoprolol, morfin, nifedipin, omeprazol
V b	topnost in permeabilnost različni vzdolž GIT, kisle učinkovine	Dobra ali omejena*	acetazolamid, amoksicilin, diklofenak, fenitoin, ketoprofen, naproksen

* za razred Va je IVIVC dobra, če je tableta načrtovana tako, da omogoča od pH neodvisno sproščanje učinkovine, če pa se topnost učinkovine zmanjša zaradi pH okolja, ki je nad njenim pKa, bo korelacija omejena. Za kisle učinkovine (razred Vb) je lahko omejena IVIVC, saj se že v tankem črevesju ionizirajo zaradi česar se jim zmanjša permeabilnost. Lahko pa je tudi pri višjih pH dovolj dobra permeabilnost in IVIVC bo dobra. Tak primer je ketoprofen.



Slika 3: Povprečna relativna biološka uporabnost (F_{rel}), po aplikaciji različnih dobro permeabilnih učinkovin na različna mesta v GIT s pomočjo intubacije. Na različnih predelih v GIT se absorbira podobna količina učinkovine, relativno glede na absorbirano količino učinkovine vzete po peroralni aplikaciji. Biološka uporabnost učinkovine vzete po peroralni aplikaciji je hipotetično 100 % (11).

Figure 3: Mean relative bioavailability (F_{rel}) after administration to different sites in the GI tract of different high-permeability drugs to humans by use of intubations. The amount of drug absorbed was similar over the entire GI tract also including the colon relative to absorbed amount after oral administration.

Za vse razrede v Preglednici 1 je možna IVIVC, kar je odvisno od specifičnih lastnosti učinkovine in farmacevtske oblike. Ocena ali gre za dobro (stopnja A) ali omejeno (stopnja C) IVIVC je povzeta iz literarnih podatkov (12).

2.3 Biofarmaceutski sistem klasifikacije odstranjevanja učinkovine (BDDCS)

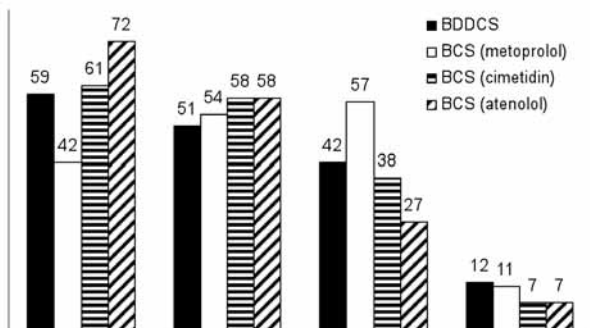
Biofarmaceutski sistem klasifikacije odstranjevanja učinkovine (angl. Biopharmaceutic Drug Disposition Classification System, BDDCS) so uvedli z namenom, da bi bolj poudarili komponento metabolizma in vpliv prenašalcev na obseg absorpcije (Slika 4).

Razred I dobra topnost obsežen metabolizem	Razred II slaba topnost obsežen metabolizem
Razred III dobra topnost nizek metabolizem	Razred IV slaba topnost nizek metabolizem

Slika 4: BDDCS klasifikacija razdeli učinkovine na 4 razrede na osnovi topnosti in metabolizma namesto permeabilnosti.

Figure 4: BDDCS classification system divides drugs into 4 classes on basis of solubility and metabolism instead of permeability.

Obe predstavljeni klasifikaciji dajeta dokaj primerljivo razvrstitev učinkovin (Slika 5), čeprav temeljita na različnih procesih. BDDCS upošteva encimsko vezavo in prenašalce, BCS pa permeabilnost skozi različne membrane celic. Razlike so odvisne tudi od tega, glede na katero standardno učinkovino, ki je merilo za dobro permeabilnost, je primerjava narejena (13).



Slika 5: Primerjava med 164 učinkovinami razvrščenih v razrede BDDCS in BCS-glede na tri standardne učinkovine (metoprolol, cimetidin, atenolol), izbrane kot merilo za dobro permeabilnost (13).

Figure 5: Comparison plots of the classification of 164 drugs by BDDCS and by BCS using three different reference high permeability drugs (13).

Za učinkovine iz razredov BCS I in BDDCS I, ki se dajejo v velikem odmerku, bo vpliv prenašalcev in metabolizma na biološko uporabnost manjši, saj se metabolični encimi in prenašalci (izločevalni ali absorptivni) v GIT nasitijo, učinkovina pa je v osnovi dobro permeabilna. V primeru pripravkov s podaljšanim sproščanjem pa bi tudi pri tej skupini učinkovin lahko bil viden vpliv metabolizma in prenašalcev, saj se sprostijo manjša količina učinkovine v določenem času in encimi ali prenašalci se ne nasitijo. Možno je tudi, da se biološka uporabnost za učinkovine v sistemih s podaljšanim

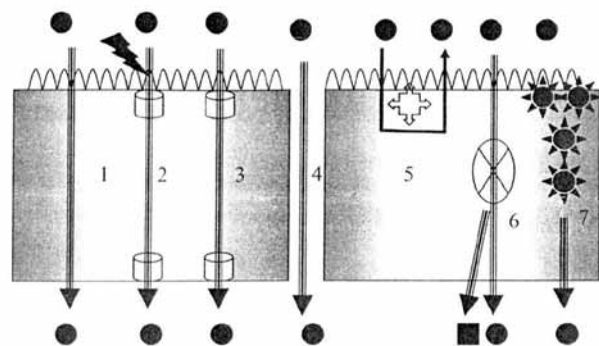
sproščanjem poveča. To se zgodi v primeru, ko se učinkovina intenzivno metabolizira bolj v zgornjem delu GIT. Če se takrat celotna količina učinkovine sprostijo hitro, se je metabolizira več kot če se sprošča počasi skozi celoten GIT. V splošnem so torej vplivi prenašalcev in metabolizma pogojeni s koncentracijo učinkovine, zato lahko pričakujemo drugačne vplive na učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem glede na pripravke s takojšnjim sproščanjem.

Pri učinkovinah iz razreda II je zaradi slabe topnosti manj učinkovine na voljo za absorpcijo, izločevalni prenašalci se ne nasitijo, kar lahko bistveno zmanjša obseg absorpcije. Še večji vpliv prenašalcev bo na tiste učinkovine iz razreda II, ki se hkrati tudi encimsko razgradijo v steni GIT. Tudi pri učinkovinah iz razredov III in IV so pomembni absorptivni in izločevalni prenašalci (14).

V realnosti tudi BDDCS sistem ne da vseh omenjenih in predvsem dovolj natančnih napovedi za »in vivo« obnašanje učinkovin, saj vsebuje dodatne neznanke metabolizma, katere je potrebno določiti in raziskati. Možno je, da bo BDDCS sistem v prihodnosti omogočal bolj natančno razvrstitev učinkovin, kar bi posredno omogočilo boljše napovedi IVIVC.

3 Biofarmaceutske lastnosti učinkovin pomembne pri absorpciji

Absorpcija je kompleksen proces, ki poteka po različnih mehanizmih (Slika 6), ključni pa so topnost in hitrost raztapljanja učinkovine ter metabolizem v lumnu črevesja in permeabilnost skozi enterocite GIT.



Slika 6: Različne poti in vplivi na absorpcijo (puščice kažejo smer absorpcije iz lumna skozi enterocit v kri): pasivna-transcelularna (1), aktivna-s pomočjo ATP (2), olajšana difuzija (3), pasivna-paracelularna (4), vpliv izločevalnih prenašalcev (5), vpliv intestinalnega metabolizma in absorpcija metabolitov (6), posredovana z receptorji (7) (16).

Figure 6: Different absorption routes and influences (arrows shows direction of absorption from GI lumen through enterocyte into the blood circulation): passive-transcellular (1), active (2), facilitated diffusion (3), passive-paracellular (4), export transporters (5), intestinal metabolism (6), receptor mediated absorption (7) (16).

V proces absorpcije so lahko vpleteni: metabolizem s Citokromi P450 (CYP), absorpcija preko receptorsko posredovane endocitoze, olajšana difuzija, absorpcija s pomočjo prenašalcev in vpliv prenašalcev na interakcije med različnimi učinkovinami ter interakcije učinkovina-hrana. Na obseg absorpcije lahko vplivajo tudi prebavni encimi v lumnu GIT, črevesna mikroflora in snovi, ki vplivajo na permeabilnost črevesne stene (pospeševalci absorpcije). V nadaljevanju sledi podrobnejši pregled vpliva metabolizma s CYP in prenašalcev v črevesni steni na absorpcijo različnih učinkovin (16, 17, 18).

3.1 Metabolizem s Citokromi P450

Encimi družine Citokrom P450 (CYP) sodelujejo pri metaboličnih oksidacijah, redukcijah, hidrolizah in konjugacijah številnih učinkovin in so pomembni za učinek prvega prehoda (angl. first pass). Posledica učinka prvega prehoda je lahko zmanjšana biološka uporabnost (kljub dobri absorpciji), nastanek toksičnih metabolitov in aktivacija učinkovine, ki je v obliki predzdravila. Znano je, da se približno 50 % registriranih zdravil bolj ali manj encimsko razgradi z encimi družine CYP. V smislu vpliva na sam proces absorpcije so najbolj odgovorni encimi družine CYP3A4, saj se v veliki meri nahajajo v enterocitih.

Citokromi P450 3A4 (CYP3A4)

Encimi te družine so glavni pri metabolizmu različnih učinkovin. Nahajajo se v jetrih, steni GIT in drugih tkivih. Aktivni del encima je molekula hema, ki je vpeta v proteinsko strukturo encima. Od jejunuma do ileuma se količina encima zmanjšuje, v kolonu ga ni, kar pomeni, da ima lahko učinkovina, ki je substrat za CYP3A4, večjo biološko uporabnost, če bi s pripravkom dosegli sproščanje pretežno predvsem v ileumu. Teoretično je absorpcija učinkovine, ki je substrat za CYP3A4, iz tablete s podaljšanim sproščanjem slabša kot v primeru takojšnjega sproščanja. Če se učinkovina takoj sprosti, se CYP3A4 nasiti in delež metabolizirane učinkovine v steni GIT je relativno nizek. Poznamo tudi kompetitivne (vsak substrat je lahko kompetitivni inhibitor drugemu substratu) in nekompetitivne inhibitorje CYP3A4, ki izboljšajo absorpcijo in biološko uporabnost drugih učinkovin. Kot inhibitor CYP3A4 je znan grenivkin sok, ki vsebuje flavonoide in furanokumarine (16-18). Tudi mnoge zdravilne učinkovine so substrati za CYP3A4 (Preglednica 2) in pri vseh teh lahko ob določenih pogojih pride do spremenjene

biološke uporabnosti. Znani so še induktorji CYP3A4, ki lahko preko zvečanja genske ekspresije dodatno povečajo metabolizem učinkovin. Za doseganje uspešne IVIVC v teh primerih je potrebno imeti jasno sliko o vplivu metabolizma v steni črevesja.

3.2 Prenášalci

Prenašalni proteini se na splošno nahajajo v različnih organih (GIT, ledvica, jetra, pljuča, možgani, testisi, skeletno mišičje, itd.). Izražanje genov za prenašalne proteine je različno glede na vrsto tkiva in organ v katerem se nahajajo. V prebavilih prenašalni proteini sodelujejo pri procesu absorpcije v smislu olajšane difuzije učinkovin ali pa omogočijo aktiven prenos učinkovin v obeh smereh gastro-intestinalne membrane. Prenášalci lahko torej zmanjšajo ali povečajo obseg absorpcije. Na proces absorpcije neke učinkovine in posledično na biološko uporabnost zdravila lahko vpliva več različnih prenašalcev in drugih substratov. Pri absorpciji gre torej za kompleksen proces. Teoretično je vpliv na učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem večji, saj se prenašalci ne nasitijo tako hitro (glej tudi poglavje 2.3). Izločevalnih prenašalcev je več vrst, fiziološko in evolucijsko gledano so v glavnem povezani s preprečevanjem absorpcije telesu tujih, toksičnih snovi in razvojem rezistence. Po drugi strani je tudi veliko prenašalcev, ki absorpcijo izboljšajo in tako povečajo biološko uporabnost (Slika 7) (20, 21).

ATP kasetni prenašalci

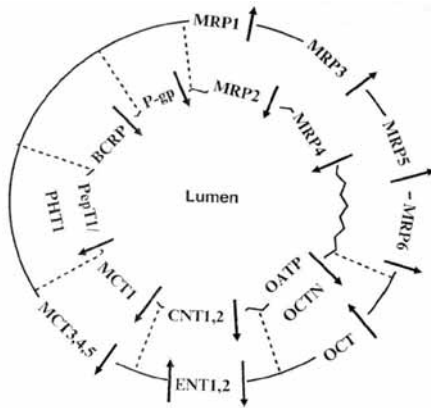
ATP kasetni prenašalci (angl. ATP Binding Cassette Transporters, ABC Transporters) so družina transmembranskih proteinov. Omogočajo izločanje različnih substratov iz citoplazme skozi celično membrano. Nahajajo se v različnih tkivih. Glavni predstavniki so P-glikoprotein (P-gp), družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (MRP) in resistantni protein izoliran pri raku na dojki (BCRP). Najbolj pomemben predstavnik ATP kasetnih prenašalcev je P-gp (Slika 8).

P-gp se nahaja na apikalni membrani enterocitov in povzroča izločanje določenih učinkovin (substratov za P-gp) nazaj v lumen GIT. Večje gensko izražanje P-gp so določili v distalnih delih črevesja, obstaja tudi velika interindividualna variabilnost v genskem izražanju P-gp. P-gp torej zmanjšuje biološko uporabnost učinkovin (substratov), najslabša biološka uporabnost pa je v primeru, če je učinkovina substrat za P-gp

Preglednica 2: substrati, inhibitorji in induktorji CYP3A4 (19).

Table 2: substrates, inhibitors and inducers of CYP3A4 (19).

Substrati	Inhibitorji	Induktorji
<i>Zaviralci kalcijevih kanalov:</i> diltiazem, felodipin, nifedipin, verapamil	<i>Makrolidi:</i> eritromicin, telitromicin, klaritromicin	<i>Barbiturati:</i> fenobarbital
<i>Imunosupresivi:</i> ciklosporin, sirolimus, takrolimus	<i>Inhibitorji proteaz:</i> indinavir,	<i>Ostali:</i>
<i>Kemoterapevtiki:</i> ciklofosfamid, docetaksel, doksorubicin, vinblastin	nelfinavir, ritonavir	fenitoin, hiperforin, tamoksifen,
<i>Benzodiazepini:</i> alprazolam, flunitrazepam, klonazepam, midazolam, tiazolam	<i>Ostali:</i> amiodaron, cimetidin,	pioglitazon, rifampicin,
<i>Antidepresivi:</i> amitriptilin, citalopram, fluoksetin, imipramin, sertralini	fluoksetin, fluvoksamin, klorfenikol,	
<i>Statini:</i> atorvastatin, lovastatin, simvastatin	kvercetin, nefazodon, sakvinavir,	
<i>Ostali:</i> alfentanil, amiodaron, buspiron, cisaprid, etinilestradiol, haloperidol, indinavir, metadon, pimoziid, risperidon, terfenadin, teofilin, venlafaksin, valprojska kislina ...	verapamil ...	



Slika 7: Nahajanje in smer prenosa s pomočjo različnih prenašalcev. Lumen GIT je hipotetično na sredini. P-glikoprotein (angl. P-glycoprotein, P-gp), resistantni protein izoliran pri raku na dojki (angl. breast cancer resistance protein, BCRP), peptidni prenašalec (angl. peptide transporter, PepT1), peptidni histidinski prenašalci (angl. peptide histidine transporter, PHT1), monokarboksilatni prenašalci (angl. monocarboxylate transporter, MCT), koncentracijski nukleozidni prenašalec (angl. concentrative nucleoside transporter, CNT), ravnotežni nukleozidni prenašalec (angl. equilibrative nucleoside transporter, ENT), proteinski prenašalec organskih anionov (angl. organic anion transporting protein, OATP), družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (angl. multiple resistance protein, MRP) (21).

Figure 7: Localization of intestinal drug transporters P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), peptide transporter (PepT1), peptide histidine transporters (PHT1), monocarboxylate transporters (MCT), concentrative nucleoside transporter (CNT), equilibrative nucleoside transporter (ENT), organic anion transporting protein (OATP), multiple resistance protein (MRP) on the apical and basolateral membranes of the intestinal epithelial cells surrounding a hypothetical lumen. (21).

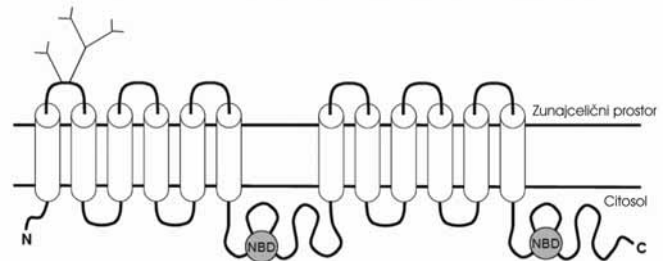
Preglednica 3: skupine z učinkovinami (substrati in inhibitorji), ki interagirajo s P-gp (21).

Table 3: list of compounds (substrates and inhibitors) that interact with P-gp (21).

Substrati	Inhibitorji
<p><i>Protitumorne učinkovine:</i> aktinomycin D, daunorubicin, doksorubicin, paklitaksel, vinblastin, vinkristin</p> <p><i>Statini:</i> atorvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin</p> <p><i>Antihistaminiki:</i> feksofenadin, terfenadin</p> <p><i>Antidiaroiiki:</i> domperidon, loperamid, ondasetron</p> <p><i>Antibiotiki:</i> daktinomycin, eritromicin, grepafloksacin, ivermektin, itrakonazol, ketokonazol, valinomicin</p> <p><i>Inhibitorji HIV proteaz:</i> amprenavir, indinavir, ritonavir, sakvinavir</p> <p><i>Steroidi:</i> aldosteron, deksametazon, hidrokortizon, kortizol, kortikosteron</p> <p><i>Kardio učinkovine:</i> digoksin, digitoksin, kinidin</p> <p><i>Analgetiki:</i> asimadolol, fentanil, morfin</p> <p><i>Beta antagonist:</i> bunitrolol, celiprolol, karvedilol, talinolol</p>	<p><i>Imunosupresivi:</i> ciklosporin A, gramicidin, valinomicin</p> <p><i>Sestavine hrane:</i> piperin, kvercetin, naringin, kurkumin, bergamotin, kamferol, rutin</p> <p><i>Pomožne snovi:</i> Tween 20, Tween 80, Nonidet P-40, Akacia, polietilenglikoli, Triton-X 100, blok kopolimeri, Brij 30, 35, solutol HS 15, poloksameri</p>

in CYP3A4, saj hkrati potekata metabolizem učinkovine v enterocitu in izločanje s P-gp.

Sočasna uporaba učinkovine (substrata) in inhibitorja P-gp pa lahko vodi do povečane koncentracije učinkovine (substrata) v plazmi in možnosti pojava neželenih učinkov. Tako so opazili dvig koncentracije digoksina v plazmi (substrat) ob sočasni uporabi inhibitorja PSC833 (valsopodar). Inhibitorji delujejo preko znižanja genskega izražanja P-gp ali po principu kompetitivne in nekompetitivne inhibicije. Nekatere pomožne snovi, predvsem površinsko aktivne snovi (Tween 80) in sotopila (polietilenglikoli) lahko tudi inhibirajo P-gp, verjetno preko spremembe fluidnosti membrane. Obstaja še možnost interakcije s snovmi v prehrani. V primeru talinolola, ob sočasnem pitju soka grenivke (inhibitor P-gp), sta se povečali najvišja plazemska koncentracija (C_{max}) in površina pod krivuljo (AUC), skrajšal se je čas, potreben da je dosežena najvišja plazemska koncentracija (t_{max})



Slika 8: struktura P-gp; dve glavni domeni s po šest enotami, dve vezavni mesti za ATP (angl. NBD-nucleotide binding site), N-glikozilirani del se nahaja na prvi zanki-levo, v zunajceličnem prostoru (20).

Figure 8: Topology of P-gp. P-gp has been proposed to be composed of two symmetrical halves, each with six transmembrane segments and one cytoplasmic nucleotide-binding site (NBD). The N-glycosylation sites are located in the first extracellular loop (20).

talinolola. Podobno se je zgodilo tudi v kombinaciji fenitoina in popra, ki vsebuje inhibitor P-gp, piperin.

Obstajajo tudi induktorji P-gp genskega izražanja kateri povzročijo padec koncentracije učinkovine (substrata) v plazmi, saj je več P-gp na enterocitih in večje je izločanje. Primer je kombinacija rifampina in fenoksfenadina kjer rifampin inducira gensko izražanje P-gp in tako zmanjša biološko uporabnost fenoksfenadina, ki je substrat za P-gp (20,21).

Naslednji predstavnik ATP kasetnih prenašalcev je družina proteinov povezanih z resistenco na več spojin (angl. multiple resistance protein, MRP). Do danes so odkrili devet poddružin (MRP1-MRP9). Nahajajo se na apikalni in bazolateralni strani enterocitov in so odgovorni za izločanje in zmanjšano absorpcijo učinkovin, predvsem protitumorih (vinca alkaloidi, antraciklini, kamfotericin, metotreksat). Kot izločevalna prenašalca sta najbolj pomembna MRP1 in MRP2. Substrati za MRP so tudi glukuronirani konjugati bilirubina, estradiola, paracetamola, grepafloksacina in anionske učinkovine irinocetan, pravastatin, ampicilin. Nekateri inhibitorji MRP so verapamil, benzbromaron in sulfipirazon (21).

Tretji predstavnik ATP kasetnih prenašalcev je resistentni protein izoliran pri raku na dojki (angl. breast cancer resistance protein, BCRP). Nahaja se na apikalni strani endotelnih celic tankega črevesja in kolona kjer sodeluje pri izločanju učinkovin. Izražanje gena za BCRP je večje v jejunumu in se niža proti kolonu. Obstaja velika interindividualna variabilnost in razlika glede na spol. Substrati so predvsem protitumorne učinkovine (mitoksantron, metotreksat, kamfotericini), fiziološki substrati (Estron-3-sulfat, 17 -estradiol sulfat, folna kislina). Inhibitorji, s katerimi se absorpcija substratov poveča so dietilstilbestrol, taksani, flavonoidi, imatinib, gefitinib, fumitremorgin C, tamoksifen, inhibitorji HIV proteaze, novobiocin. Induktorjev je manj znanih, primer je kurkumin (21).

Protitumorne učinkovine redko vgrajujemo v pripravke s podaljšanim sproščanjem, zato BCRP in MRP pri teh pripravkih nimata tako kritičnega pomena.

Prenašalni nosilci topljencev, SLC

Prenašalni nosilci topljencev (angl. solute carrier transporters, SLC) so družina integralnih membranskih proteinov, ki se nahajajo na apikalni strani enterocitov in izboljšajo prenos substratov skozi površino celic ali

površino celičnih organelov z olajšano difuzijo ali aktivnim transportom v celico. Udeleženi so tudi pri soprenosu ionov v nasprotni smeri elektrokemijskega gradienta. Sodelujejo pri prenosu aminokislin, peptidov, sladkorjev, vitaminov, žolčnih kislin, nevrottransmitterjev in različnih ksenobiotikov. Prenašalci te skupine torej olajšajo, povečajo absorpcijo substratov. Skupine SLC prenašalcev so od protona odvisni oligopeptidni prenašalci (angl. proton dependent oligopeptide transporters, SLC15A), prenašalci organskih kationov (angl. organic cation transporters, SLC22A), prenašalni polipeptidi organskih anionov (angl. organic anion transporting polypeptides, SLC21A), prenašalci nukleozidov (angl. nucleoside transporters, SLC28, 29A) in monokarboxilatni prenašalci (angl. monocarboxylate transporters, SLC16A). Te prenašalce smo tu poimenovali glede na gen, ki kodira določen prenašalec. Prenašalce torej poimenujemo glede na gen, ki ga kodira, ali pa glede na mehanizem delovanja, na primer, ATP kasetni prenašalci.

S farmakokinetičnega vidika je za biološko uporabnost najbolj pomembna družina SLC15A in znotraj nje peptidni prenašalec (angl. peptide transporter, PepT1). Substrati in inhibitorji za PepT1 so prikazani v Preglednici 4 (21). Inhibitorji delujejo po principu kompetitivne ali nekompetitivne inhibicije.

Prenašalci organskih kationov (SLC22A) in prenašalni polipeptidi organskih anionov (SLC22A) interagirajo z različnimi endogenimi substrati in učinkovinami iz skupin nesteroidnih protivnetnih učinkovin, -laktamskih antibiotikov, protivirusnih učinkovin in zaviralcev angiotenzinske konvertaze.

Prenašalci nukleozidov (SLC28, 29A) izboljšajo absorpcijo purinskih in pirimidinskih nukleozidov, kamor spadajo protivirusne učinkovine (didanozin, ribavarin, zidovudin, zalcitabin) in protitumorne učinkovine (citarabin, gemcitabin, 5-florouridin, fludarabin).

Monokarboxilatni prenašalci (SLC16A) so pomembni pri absorpciji -laktamskih antibiotikov (penicilin), valprojske kisline, atorvastatina in nateglinida. Pomembni so tudi pri transportu endogenih kislin kot so mlečna kislina, piruvat, acetoacetat, butirat (21).

4 Primeri IVIVC

Glede na množico dejavnikov, ki lahko vplivajo na uspešnosti IVIVC, se na prvi pogled zdi možnost IVIVC za učinkovine v pripravkih s

Preglednica 4: skupine z učinkovinami (substrati in inhibitorji), ki interagirajo s PepT1 (21).

Table 4: List of compounds (substrates and inhibitors) that interact with PepT1 (21).

Substrati	Inhibitorji
<i>Cefalosporini:</i> cefaklor, cefadroksil, cefamandol, cefaleksin, cefradin, moksalaktam	latamoksef
<i>Penicilini:</i> benzilpenicilin, dikloksacilin, kloksacilin, metampicilin, oksacilin, propicilin	karbenicilin
<i>Zaviralci angiotenzinske konvertaze:</i> benazepril, enalapril, fosinopril, kaptopril, kvinalapril	benazeprilat, enalaprilat, fosinoprilat, kvinalaprilat
<i>Protivirusne učinkovine:</i> valciklovir, valganciklovir	
<i>Ostali:</i> bestatin, α -metildopa fenilalanin, Pro-Phe-Alendronat, inhibitorji renina, inhibitorji trombina, tirotropin sproščajoči hormoni	glibenklamid, nateglinid

podaljšanim sproščanjem, ki so substrati za metabolične encime ali prenašalce, majhna. Pristop k IVIVC za takšne pripravke mora biti celovit in multidisciplinaren. Kompleksnost pristopa je verjetno tudi razlog, da v literaturi še ni veliko objavljenih podatkov. Pogosto neuspešne IVIVC pa tudi niso objavljene.

Pristop k določanju IVIVC lahko najbolje predstavimo na primeru. V primeru škrobne ogrodne tablete z diltiazemom so želeli ugotoviti »in vivo« lastnosti sproščanja diltiazema iz ogrodne tablete, ga primerjati z »in vitro« podatki ter določiti stopnjo IVIVC (22). Pripravili so tri vrste škrobnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem, ki so se razlikovale glede na hitrost sproščanja »in vitro« (hitra, vmesna in počasna). Predpogoj za ugotavljanje IVIVC je predhodno razvit test raztapljanja, ki simulira »in vivo« pogoje v GIT in je diskriminatorev v tem smislu, da pokaže razlike med preiskovanimi tabletami. S testom raztapljanja (angl. dissolution test) spremljamo sproščanje učinkovine iz pripravka in njeno nadaljnje raztapljanje. Test raztapljanja so razvijali na podlagi lastnosti učinkovine, sestave tablet in »in vivo« pogojev v GIT. Z razvitim testom raztapljanja so testirali vse tri tablete in dobili profile raztapljanja (delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa). Vse tri vrste ogrodnih tablet so nato preskusili v farmakokinetični študiji na ljudeh in iz plazemskih vzorcev določili delež absorbirane učinkovine v odvisnosti od časa. V nadaljevanju so primerjali »in vitro« profile, pridobljene s testom raztapljanja in profile »in vivo« ter določili stopnjo korelacije. Ugotovili so stopnjo korelacije A, kar pomeni dobro korelacijo. Tako razvit model IVIVC se v nadaljevanju lahko uporabi za napovedovanje »in vivo« farmakokinetičnih parametrov zgolj na podlagi testa raztapljanja »in vitro« (22).

Več primerov določanja IVIVC je prikazanih v Preglednici 5 (22-38). Iz podatkov v Preglednici 5 je razvidno, da je večina učinkovin, ki se vgrajujejo v sisteme s podaljšanim sproščanjem iz BCS razreda I in manj iz BCS razreda II. Za učinkovine iz BCS razredov III in IV pa

zaenkrat še ni na voljo podatkov. Izjema so tablete s podaljšanim sproščanjem, ki vsebujejo metformin (BCS razred III), kjer so bili uspešni in IVIVC dosegli. Metformin tako lahko služi kot modelni primer za učinkovine, ki imajo slabo permeabilnost in ozko absorpcijsko okno, absorpcija poteka le v tankem črevesju (35).

Ocena IVIVC v Preglednici 5 je podana glede na stopnjo korelacije tako kot je definirana s smernicami FDA, ameriške agencije za hrano in zdravila. Stopnja A velja za najvišjo stopnjo korelacije, kjer vsaka točka na »in vitro« profilu raztapljanja ustreza točki na »in vivo« profilu raztapljanja učinkovine iz pripravka. Stopnja B vključuje primerjavo vrednosti povprečnega časa, ko je raztopljena vsa učinkovina (MDT, mean dissolution time) »in vitro« in povprečnega časa zadrževanja učinkovine v telesu (MRT, mean residence time) ali časa raztapljanja »in vivo«. Lahko se primerja tudi hitrostno konstanto raztapljanja »in vitro« s hitrostno konstanto absorpcije »in vivo«. Stopnja C pa opisuje samo korelacijo v eni točki, na primer, količino raztopljene učinkovine v določenem času »in vitro« z nekim farmakokinetičnim parametrom »in vivo«. Obstaja še večkratna stopnja korelacije C, ki povezuje količino raztopljene učinkovine »in vitro« v več časovnih točkah z več farmakokinetičnimi podatki npr. površino pod krivuljo v različnih časovnih intervalih (39).

5 Zaključek

Na podlagi dosegljivih podatkov v literaturi lahko zaključimo, da je IVIVC za dobro stopnjo korelacije za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali vežejo na transportne proteine, možno doseči, predvsem v primerih, ko gre za učinkovine iz BCS razredov I in II. Na splošno pa ni veliko podatkov o IVIVC, za kar je verjetno krivo dejstvo, da se testiranja IVIVC bolj intenzivno izvajajo šele zadnja leta. Za izvajanje IVIVC je potrebno pridobiti »in vivo« podatke; takšne študije so drage, sama industrija pa

Preglednica 5: Različni primeri IVIVC za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se bolj metabolizirajo ali vežejo na transportne proteine.

Table 5: Various IVIVC examples for drugs in extended release formulations which are extensively metabolized or absorbed with transporters.

Učinkovina	Sistem	BCS	Metabolizem	IVIVC	VIR
Diltiazem	Škrobna ogrodna tableta	I	Inhibitor, substrat CYP3A4	Stopnja korelacije A	22
Paracetamol	Tableta Ring Cap®	I	Substrat za MRP in CYP3A4	Stopnja korelacije A	23
Teofilin	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za CYP3A4	Stopnja korelacije A	24
Metoprolol	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za CYP2D6	Različne stopnje korelacije	25, 26
Valprojska kislina	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za MCT in CYP3A4	Stopnja korelacije A	27
Diltiazem	Pelete obložene z etil celulozo	I	Inhibitor, substrat CYP3A4	Različne stopnje korelacije	28
Rifampicin	Pelete obložene z etil celulozo	II	Induktor CYP3A4	Stopnja korelacije A	29
Karbamazepin	Hidrofilna ogrodna tableta	II	Substrat in induktor CYP3A4	Stopnja korelacije A	30
Buspiron	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Substrat za CYP3A4	Stopnja korelacije A za C _{max}	31
Nilvadipin	Hidrofilna ogrodna tableta	II	Substrat za CYP3A4	Stopnja korelacije A (študija na psih)	32
Propranolol	Hidrofilna ogrodna tableta	I	Intenziven metabolizem v jetrih	Stopnja korelacije A (študija na psih)	33
Verapamil	Obložene pelete, ogrodne tablete	I	Substrat in inhibitor za CYP3A4, substrat za P-gp	Stopnja korelacije C	34
Metformin	Pelete obložene z etilcelulozo	III	Omejena permeabilnost, absorpcijsko okno	Stopnja korelacije A, C	35

zaradi patentnih situacij in varovanja podatkov izsledkov študij ne objavi v celoti ali jih objavi veliko kasneje. FDA smernice za IVIVC so bile določene leta 1997 in mogoče jih bodo morali prilagoditi na nove pripravke in učinkovine, kajti stopnjo korelacije A ni vedno možno doseči, kljub temu pa lahko s IVIVC modelom dobro napovemo posamezne farmakokinetične parametre. V prihodnosti zato pričakujemo še bolj intenzivno raziskovanje področja IVIVC, za učinkovine s različnimi biofarmaceutskimi lastnostmi, ki jih vgrajujemo v pripravke s podaljšanim sproščanjem.

6 Literatura

1. EMEA. Note for guidance on quality of modified release products: A: Oral dosage forms, B: Transdermal dosage forms section 1 (Quality), CPMP/QWP/604/96, London, 29 July, 1999.
2. Emami J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2006; 9 (2): 31-51.
3. Dasbach T and Davidson J. The effect of dissolution media on drug release from CR tablets. *KSP and CRS joint symposium on recent advances in drug delivery and biomaterials, Seoul, Korea, September 24 - 26, 1997.*
4. Nokhodchia A, Norouzi-Sania S, Reza M, Siahi-Shadbada, Lotfipoora F, Saeedi M. The effect of various surfactants on the release rate of propranolol hydrochloride from hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-Eudragit matrices. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 54: 349-356.
5. Kayijama A, Takagi H, Moribe K, Yamamoto K. Improvement of HPMC tablet disintegration by the addition of inorganic salts. *Chem Pharm Bull* 2008; 56(4): 598-601.
6. Kavanagh N, Corrigan OI. Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethylcellulose (Hypromellose) matrices—influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int J Pharm* 2004; 279: 141-152.
7. Abrahamsson B, Roos K, Sjogren J. Investigation of prandial effects on hydrophilic matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25(6): 765-771.
8. Wonnemann M, Schug B, Schmücker K, Brendel E, Zwieten PA, Blume H. Significant food interactions observed with a nifedipine modified-release formulation marketed in the European Union. *Int J Clin Pharm Ther* 2006; 44 (1): 38-48.
9. Dokumetzidis A, Macheras P. IVIVC of controlled release formulations: Physiological-dynamical reasons for their failure. *J Con Rel* 2008; 129: 76-78.
10. Christopher Porter JH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews Drug discovery* 2007; 6(3): 231-248.
11. Abrahamsson B, Lennernas H. The biopharmaceutical classification system. In: Testa B, Waterbeemd H. ADME-Tox approaches 5: Comprehensive medicinal chemistry II. Elsevier, 2006: 971-988.
12. Corrigan OI. The biopharmaceutical drug classification and drugs administered in extended release (ER) formulations. *Adv Exp Med Biol* 1997; 423: 111-128.
13. Takagi T et al. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain and Japan. *Mol Pharm* 2006; 3(6): 631-643.
14. Leslie Z. Using the BDDCS to predict when metabolism and drug transport influence the disposition of a drug. AAPS workshop on drug transporters in ADME: from the bench to the bedside, March 8, 2005.
15. Wu X, Whitfield LR, Stewart BH. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm Res* 2000;17(2): 209-215.
16. Balimane PV, Chong S. Evaluation of permeability and P-glycoprotein interactions. In: Krishna R, Yu R. *Biopharmaceutics applications in drug development.* Springer science, 2008: 101-138.
17. Wilding IR. Evolution of the biopharmaceutics classification system (BCS) to oral modified release (MR) formulations; what do we need to consider? *Eur J Pharm Sci* 1999; 8: 157-158.
18. Peternel L, Mrhar A, Kristl A. Metabolične pregrade pri absorpciji učinkovin iz zabavnega trakta. *Farm Vest* 2003; 54: 189-198.
19. Flockhard DA. Drug Interactions, Cytochrome P450 drug interactions table. Indiana University School of Medicine, 2007 (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>).
20. Amo EM, Heikkinen AT, Monkkonen J. In vitro-in vivo correlation in p-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 200-211.
21. Bhardwaj RK et al. Intestinal transporters in drug absorption. In: Krishna R, Yu R. *Biopharmaceutics applications in drug development.* Springer science, 2008: 175-261.
22. Korhonen O, Kanerva H, Vidgren M, Urtti A, Ketolainen J. Evaluation of novel starch acetate-diltiazem controlled release tablets in healthy human volunteers. *J Contr Rel* 2004; 95: 515- 520.
23. Dalton JT, Straughn AB, Dickason DA, Grandolfi GP. Predictive ability of level A *In Vitro-in Vivo* correlation for RingCap controlled-release acetaminophen tablets. *Pharm Res* 2001; 18(12): 1729-1734.
24. Souliman S, Beyssac E, Cardot JM, Denis S, Alric M. Investigation of the biopharmaceutical behavior of theophylline hydrophilic matrix tablets using USP methods and an artificial digestive system. *Drug Dev Ind Pharm* 2007; 33: 475-483.
25. Sirisuth N, Eddington ND. The influence of first pass metabolism on the development and validation of an IVIVC for metoprolol extended release tablets. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 301-309.
26. Mahayni H, Rehki GS, Uppoor GR, Marroum P, Hussain AS, Augsberger LL, Eddington ND. Evaluation of "external" predictability of an in vitro-in vivo correlation for an extended-release formulation containing metoprolol tartrate. *J Pharm Sci* 2000; 89(10): 1354-1361.
27. Dutta S, Qiu Y, Samara E, Cao G, Granneman GR. Once-a-day extended-release dosage form of divalproex sodium III: development and validation of a level A in vitro-in vivo correlation (IVIVC). *J Pharm Sci* 2005; 94 (9): 1949-1956.
28. Sirisutha N, Augsburger LL, Eddington ND. Development and Validation of a non-linear IVIVC model for a diltiazem extended release formulation. *Biopharm Drug Dispos* 2002; 23: 1-8.
29. Sreenivasa Rao B, Seshasayana A, Pardha Saradhi SV, Ravi Kumar N, Narayan CPS, Ramana Murthy KV. Correlation of 'in vitro' release and 'in vivo' absorption characteristics of rifampicin from ethylcellulose coated nonpareil beads. *Int J Pharm* 2001; 230: 1-9.
30. Veng-Pedersena P, Gobburub JVS, Meyer MC, Straughn AC. Carbamazepine level-A *In vivo-In vitro* correlation (IVIVC): A scaled convolution based predictive approach. *Biopharm Drug Dispos* 2000; 21: 1-6.
31. Takka S, Sakr A, Goldberg A. Development and validation of an in vitro-in vivo correlation for buspirone hydrochloride extended release tablets. *J Contr Rel* 2003; 88: 147-157.
32. Tanaka N, Imai K, Okimoto K, Ueda S, Tokunaga Y, Ibuki R, Higaki K, Kimura T. Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): In vivo evaluation. *J Contr Rel* 2006; 112: 51-56.
33. Huang YB, Tsai YS, Yang WC, Chang JC, Wu PC, Takayama K. Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 607-614.
34. Langguth P, Bolger M, Tubic M, Biowaiver for BCS class II compounds? Application of simulation for BCS classification. <http://www.aapspharmaceutica.com/meetings/files/90/29Langguth.pdf>
35. Balan G, Timmins P, Greene DS, Marathe PH. In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. *J Pharm Sci* 2001; 90(8): 1176-85.
36. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Dynamic dissolution testing to establish in vitro/in vivo correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res* 2008; 25(12): 2778-2785.
37. Wei H, Lobenberg R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 45-52.
38. Rouini MR, Ardakani YH, Mirfazaelian A, Hakemi L, Baluchestani M. Investigation on different levels of in vitro-in vivo correlation: gemfibrozil immediate release capsule. *Biopharm Drug Dispos* 2008; 29: 349-355.
39. Cardot JM, Beyssac E, Alric M. In vitro-in vivo correlation: importance of dissolution in IVIVC. *Dissolution Technologies*, February 2007: 15-19.

Farmakološki učinki česnovih pripravkov in njihove interakcije z zdravilnimi učinkovinami

The pharmacological effects of garlic supplements and their interactions with prescribed therapy

Katja Berginc, Albin Kristl

Povzetek: Zaradi farmakoloških učinkov česnovih pripravkov, dokazanih v predkliničnih in kliničnih študijah, po tovrstnih pripravkih posegajo številni kronični bolniki brez vednosti o potencialno nevarnih farmakokinetičnih in farmakodinamskih interakcijah, ki se lahko razvijejo ob sočasno predpisani terapiji. Inhibicija encimov iz družine citokromov in/ali spremenjena aktivnost sekretornih prenašalcev v jetrih in črevesju ob prisotnosti nekaterih česnovih sestavin lahko pomembno spremeni profil plazemskih koncentracij apliciranih učinkovin in njihovih metabolitov, kar lahko vodi v terapevtsko neučinkovitost ali v toksične učinke. Zasledimo lahko tudi poročila o farmakodinamskih interakcijah med česnovimi pripravki in nekaterimi učinkovinami z ozkim terapevtskim oknom (npr. varfarinom). Zaradi naštetega se sočasna uporaba česnovih pripravkov z nekaterimi učinkovinami odsvetuje oz. je priporočeno terapevtsko spremljanje plazemskih koncentracij učinkovin.

Ključne besede: česen, farmakološke lastnosti, CYP, PGP, interakcije

Abstract: The consumption of commercially available garlic supplements especially by chronic patients is continuously rising due to disease preventing effects, recognized in numerous preclinical and clinical studies. However, combining in conventional therapy utilized drugs with garlic phytochemicals can lead to serious pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. Namely, in some cases significant plasma profile changes of applied drugs and their metabolites, caused by intestinal and hepatic CYP inhibition and/or altered efflux membrane transporter activity, have been recognized in the presence of garlic phytochemicals leading to therapeutic failure or toxic side effects. There are also reports on pharmacodynamic interactions between drugs with narrow therapeutic window (i.e. warfarin) and garlic. Therefore combining garlic supplements and certain drugs should be closely monitored or in some cases even discontinued.

Key words: garlic, pharmacological activity, CYP, PGP, interactions

1 Uvod

Prvi zapisi o uporabi česna zaradi njegovih preventivnih in kurativnih lastnosti izvirajo že iz antičnih kultur (Egipt, Grčija, Rim, Kitajska, Japonska, Indija) (1). Česen (*Allium sativum*), čebula (*Allium cepa*), por (*Allium porrum*), drobnjak (*Allium schoenoprasum*), zimski luk (*Allium fistulosum*) in mnogi drugi predstavniki rodu *Allium* z okrasnimi lastnostmi izvirajo iz Azije (2). Dandanes se česen uporablja predvsem kot hrana oz. začimba ter kot prehranski pripravek (3). Česnovi pripravki kot tudi sama droga veljajo za varne kljub nasprotujočim se literaturnim poročilom, ki onemogočajo nedvoumno potrditev njihove klinične učinkovitosti in varnosti v kombinaciji z drugimi zdravili (4).

2 Farmakološki učinki česna

Česnovi pripravki in posamezne česnove sestavine so se v *in vitro* in *in vivo* predkliničnih študijah izkazali kot pomembni nosilci farma-

koloških učinkov in so bili zato tudi predmet številnih kliničnih študij (2, 6). Preiskovani česnovi pripravki (sveža droga, praški, olja, ekstrakti) na prostovoljcih in bolnikih so se v različno dolgih kliničnih študijah (4 tedne do enega leta) sicer izkazali kot učinkovito preventivno in kurativno sredstvo, vendar pa nekateri potencialno terapevtski učinki *in vivo* niso bili nedvoumno znanstveno potrjeni v vseh izvedenih raziskavah kot posledica nekonsistentne izvedbe kliničnih študij, uporabe nestandardiziranih in različnih česnovih pripravkov oz. nepopolnih podatkov (2, 5, 6). Če povzamemo zaključke kliničnih študij, ugotovimo, da uživanje česnovih pripravkov pomembno zmanjša tveganje za nastanek kardiovaskularnih zapletov zaradi antiaterogenega, antiateroskleroznega, antitromboznega, fibrinoliznega, hipotenzivnega in hipoglikemijskega učinka. V primeru antiaterogenega in hipoglikemijskega učinka signifikanten vpliv česnovih pripravkov na znižanje plazemskih koncentracij holesterola oz. glukoze potrjuje kar dve tretjini izvedenih kliničnih študij, medtem ko je bil signifikanten vpliv česnovih pripravkov v primeru fibrinolitične,

antiagregatorne aktivnost ter hipotenzivnega učinka potrjen v večini kliničnih študij (7).

Sestavine česnovih pripravkov delujejo tudi antitumorogeno in antikarcinogeno, saj antioksidativne, protivnetne in imunomodulatorne lastnosti sestavin česnovih pripravkov pomembno zavirajo različne stopnje kancerogeneze. Že iz antičnih časov pa so najbolj poznane predvsem protibakterijske, protivirusne in protiglivične lastnosti surove česnove droge, potrjene tudi za česnove pripravke. Nekatere sestavine namreč preprečujejo privzem kisika v mikroorganizme ter zmanjšajo sintezo lipidov, proteinov in nukleinskih kislin; vse naštetu tako vodi v zavrti proliferacijo mikrobov.

Posamezne česnove sestavine oz. iz njih pridobljene spojine, ki so odgovorne za zgoraj opisane farmakološke učinke, mehanizmi, ki privedejo do navedenih farmakoloških učinkov, ter *in vitro/in vivo* modeli, na katerih so bili ti učinki tudi dokazani, so predstavljeni v Preglednici 1.

3 Interakcije med česnovimi pripravki in zdravili

Farmakokinetske interakcije med sočasno zaužitimi zdravilnimi učinkovinami in česnovimi pripravki so posledica vpliva česnovih sestavin na jetrne in črevesne citokrome (CYP) ter na aktivnost P-glikoproteinskega (PGP) ter drugih sekretornih prenašalcev (8).

Številne lipofilne žveplo vsebujoče spojine v česnovih pripravkih *in vitro* ter *in vivo* inhibirajo CYP1A, 3A5, 3A7, 2B, 2D6 in 2E1 izooblike, nekatere pa lahko CYP tudi inducirajo. Inhibitorjen vpliv je večji, če je vsebnost žveplo vsebujočih snovi višja. *In vitro* testi na človeških mikrosomih so pokazali, da staran česnov ekstrakt («aged garlic extract» AGE) in sveža droga inhibirata tudi CYP 2C9, 2C19 in 3A4 izooblike (9). Substrati za CYP encime pa so običajno tudi substrati za PGP. Usklajeno delovanje CYP encimov in PGP prenašalcev v jetrih in črevesju omogoča, da se učinkovina iz enterocita/hepatocita s PGP prenese nazaj v lumen črevesja oz. v žolč, s čimer se prepreči nasičenje CYP encimov, ki zato nemoteno metabolizirajo aplicirano učinkovino. Rezultat tako usklajenega delovanja so nižji deleži absorbirane učinkovine iz farmacevtskih oblik oz. nižja biološka uporabnost. Znano je, da so česnove sestavine najverjetneje tudi PGP substrati (3, 10). Ker ima PGP 4 transportna oz. regulatorna mesta, je pomembno, ali je vezavno mesto za učinkovino istočasno tudi vezavno mesto za česnove sestavine, saj tako učinkovina in sestavine pripravkov tekmujejo za isto vezavno mesto, kar vodi do znižanja prenosa učinkovine s PGP (11). Možno je tudi, da sta vezavni mesti za učinkovino in česnovo sestavino na PGP različni (10). V tem primeru se zaradi alosteričnih sprememb, ki jih povzroči vezava česnove sestavine na eno mesto, poviša afiniteta drugega vezavnega mesta za učinkovino, s tem pa se poveča prenos učinkovine s PGP. V literaturi tako lahko zasledimo poročila, da so česnove spojine PGP inhibitorji kot tudi aktivatorji sekrecije učinkovin s PGP (10, 11).

Glede na navedene farmakološke učinke česnovih pripravkov ter vpliva na CYP in PGP lahko pričakujemo, da sočasno uživanje zdravil in česna vodi tako v farmakokinetske kot tudi farmakodinamske interakcije. Literatura poroča o klinično pomembnih farmakodinamskih interakcijah v primerih sočasne uporabe česnovih pripravkov z

antikoagulantni, antidiabetiki in nesteroidnimi antirevmatiki (NSAID), in o farmakokinetskih interakcijah, ki so se izrazile v primeru paracetamola, inhibitorjev angiotenzinske konvertaze in antiretrovirusnih učinkovin (9, 12).

a) Farmakodinamske interakcije

Sočasno jemanje česnovih pripravkov pri pacientih zdravljenih z varfarinom (9) in s fluindionom (13) prispeva k significantnemu podaljšanju časa strjevanja krvi zaradi aditivnih antiagregatornih učinkov česnovih pripravkov in aplicirane učinkovine. Pacientom z antikoagulativno terapijo se zato svetuje previdnost pri uporabi omenjenih kombinacij oz. prenehanje jemanja česnovih pripravkov 4 do 8 tednov pred predvidenim kirurškim posegom zaradi povečane nevarnosti postoperativnih krvavitev ter nastanka spontanega spinalnega epiduralnega in retrobulbarnega hematoma. Prav tako Borrelli (13) s sodelavci odsvetujejo tudi kombinacijo česnovih pripravkov z nesteroidnimi antirevmatiki (NSAID) zaradi povišane verjetnosti krvavitev, zlasti v želodcu. Inhibirana sinteza prostaglandinov in znižana produkcija mukusa pod vplivom NSAID pomeni zmanjšano zaščito želodčne sluznice pred agresivnimi vplivi želodčne kisline. To pa poleg antiagregatornega delovanja česnovih pripravkov prispeva k višji verjetnosti poškodb in krvavitev želodčne sluznice (14).

Farmakodinamske interakcije so opazili tudi pri terapiji s klorpropamidom, kjer je sočasno uživanje česnovih pripravkov povzročilo hipoglikemični učinek in significantno znižanje plazemske koncentracije glukoze kot posledica aditivnega delovanja česnovih sestavin in predpisanega antidiabetika (8).

b) Farmakokinetske interakcije

Trimesečna klinična študija na 16 prostovoljcih s paracetamolom in AGE (8) v količini, ekvivalentni 6-7 strokom česna dnevno, je pokazala, da se oksidativni metabolizem s CYP2E1 encimom, glukuronidacija in sulfatiranje paracetamola v jetrih ne spremenijo. Vendar pa se je v drugi, 28-dnevni študiji uporabe česnovega olja (15), ki za razliko od AGE vsebuje številne aliilsulfide, izkazalo, da je bil CYP2E1 encim significantno inhibiran. V primeru prevelikih odmerkov paracetamola bi to lahko pomenilo manjšo tvorbo toksičnega metabolita N-acetil-p-benzokininimina s CYP2E1 ter posledično hepatoprotektivno delovanje, ki je že bilo potrjeno na miših. Le-tem so 1 uro pred oz. sočasno z aplikacijo toksične doze paracetamola (25 mg/kg telesne teže) aplicirali tudi česnov metabolit dialil sulfon (7).

Pri terapiji hipertenzije z inhibitorjem angiotenzinske konvertaze (ACE inhibitor) lizinoprilom so se pri sočasni uporabi staranega česnovnega ekstrakta inhibirali encimi, vpleteni v metabolizem lizinopрила, kar je vodilo v povišanje plazemskih koncentracij lizinopрила in nastop vrtočlavitice ter hipotenzije. Omenjeni neželeni učinki so prenehali takoj po prekinitvi jemanja česnovnega ekstrakta (16).

Najpomembnejše farmakokinetske interakcije s česnovimi pripravki so opazili pri pacientih, ki se zdravijo s HIV-proteaznimi inhibitorji (HIV-PI) (sakvinavir, ritonavir). To so peptidomimetiki (izjema darunavir in brekanavir), ki inhibirajo virusno aspartatno proteazo, imenovano HIV-proteaza. Ker virus napade za HIV-PI zelo težko dostopna in po celem telesu razsejana tarčna mesta (testikularne folikularne in CD4 T-celice ter makrofage), je doseganje terapevtskih koncentracij teh učinkovin v

Farmakološki učinki česnovih pripravkov in njihove interakcije z zdravilnimi učinkovinami

Preglednica 1: Farmakološki učinki, opaženi zaradi jemanja česnovih pripravkov, mehanizmi, ki privedejo do njih, in posamične sestavine česnovih pripravkov, testirane na različnih *in vitro*, *in vivo* modelih, ki so soodgovorne za opažene farmakološke učinke (2).

Table 1: Pharmacological effects, induced by the consumption of garlic supplements, mechanism that lead to the observed pharmacological effects, and individual phytochemicals, contained in garlic supplements, responsible for the observed pharmacological effects, tested on different *in vitro* or *in vivo* models.

Farmakološki učinek/mehanizem delovanja	Sestavine česnovih pripravkov in modeli
Antiaterogeno delovanje	
inhibicija	
HMG-CoA reduktaze	<i>in vitro</i> podganji hepatociti: alicin, ajoen, aliin, metanolni in vodni česnov ekstrakt, selenocisteini
lanosterol-14-demetilaze sintaze maščobnih kislin de novo sinteze maščobnih kislin	SAC, DATS, DADS, S-Pr-Cys, S-Et-Cys
↓ tkivne konc. NADPH	<i>in vivo</i> študije na zajcih, podganah, perutnini in prašičih: česnov prašek, česnov olje, AGE, alicin
aktivacija tkivne lipaze	
↓ absorpcije holesterola	
↑ pretvorba holesterola v žolčne kisline	
Antihipertenzivno delovanje	
inhibicija angiotenzin konvertaze	<i>in vivo</i> (psi): česnov ekstrakt
odpiranje K ⁺ in Ca ²⁺ kanalov	<i>in vivo</i> (podgane): česnov prašek
spremenjena funkcija in sinteza vazokonstriktornih in relaksatornih faktorjev	<i>in vitro</i> (podganje celice gladkih mišic aorte): AMS, DAS
Antitrombozno, fibrinolizno delovanje	
inhibicija COX, LOX in FL (↓ sinteza TXA ₂)	<i>in vitro</i> človeški Trc: alicin, ajoen, MATS, DMTS, DATS
↓ privzem in ICT mobilizacija Ca ²⁺	<i>in vivo</i> (zajci): česnov olje, surov česen
interakcije s fibrinogenim GPIIb/IIIa Rec	
Antidiabetično delovanje	
↑ izločanje in sinteza inzulina	<i>in vivo</i> (zajci): etanolni in eterni ekstrakt
↓ glikiranje kapilar	<i>in vivo</i> (podgane, miši): alicin, aliin, alil propil sulfid, SAC, AGE
Antikarcinogeno, antitumorogeno delovanje	
ANTIOKSIDATIVNO: ↑ ICT konc GSH in antioksidativnih encimov (katalaza, GSH dizmutaza, GSH peroksidaza)	<i>in vitro</i> celične kulture hepatocitov in endotelnih celic: alicin, SAC, SAMC, DADS, DATS, dialil polisulfidi, flavonoidi, superoksid dizmutaza, saponini, Se, lektini
PROTIVNETNO: ↓ ekspresija proonkogenega faktorja NF-κB, zato ↓ ekspresija COX in inducibilne NO-sintaze	
IMUNOSTIMULATORNO: ↑ proliferacija limfocitov v vranici, ↑ aktivnost in preživetje celic ubijalk ter makrofagov v tkiva, ↑ sproščanje IF-γ, IL-2 in TNF-α	<i>in vivo</i> (podgane): AGE, česnov prašek, visokomolekularna proteinska frakcija
VPLIV NA METABOLNE ENCIME: inhibicija CYP2E1 in 2A6, zato ↓ pretvorba prokarcinogenov v karcinogene, indukcija encimov II.faze (GSH-S-transferaza), zato povečanje polarnosti in hitrejše izločanje karcinogenov	<i>in vitro</i> Cyp2E1, 2A6: DADS <i>in vitro</i> GSH-S-transferaza: DADS, DAS
INHIBICIJA RASTI RAKASTIH CELIC	<i>in vitro</i> rakaste celične kulture Sarcoma-180, LL/2, CCRF-CEM, HepG2, Caco2: česnov ekstrakt in prašek, SAC, DADS, AMS, AMDS, DATS, DAS, SAMC
Antimikrobno delovanje	
PROTIGLIVNIČNO (<i>Candida</i> , <i>Trichophyton</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Rhodo torula</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Trichosporum</i> , <i>Micosporum</i>)	<i>in vitro</i> testi z mikrobnimi kulturami: alicin, DATS, DADS, DAS, ajoeni, proteini, saponini, fenoli

Farmakološki učinek/mehanizem delovanja	Sestavine česnovih pripravkov in modeli
Antimikrobno delovanje	
PROTIBAKTERIJSKO (<i>Staphylococcus</i> , <i>Echerichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Bacillus</i> , <i>H. Pylori</i> ...)	
PROTIVIRUSNO (virus parainfluenze tipa 3, <i>Herpes simplex 1</i> , virus influence B, Coxsackie B1 virus)	
Hepatoprotektivno delovanje	
↓ hepatotoksičnost toksinov (npr. CCl ₄ , toksini akutnega hepatitisa, galaktozamin)	<i>in vitro</i> (mišji in podganji hepatociti): alicin, SAMC, S-Me-Cys, SAC, S-Pr-Cys
↓ poškodbe DNA (antioksidativno delovanje)	
Prebiotično delovanje	
Ugodni pogoji za rast bifidobakterij in laktobacilov	<i>in vitro</i> (bifidobakterije in laktobacili): topne vlaknine, inulin, fruktooligosaharidi

AGE – staran česnov ekstrakt («aged garlic extract»), AMS – alilmetilsulfid, AMDS – alilmetildisulfid, COX – ciklooksigenaza, DAS – dialilsulfid, DADS – dialildisulfid, DATS – dialiltrisulfid, DMTS – dimetiltrisulfid, FL- fosfolipaza, GSH – glutation, HMG-CoA reduktaza – 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koencim A reduktaza, IF- γ - interferon gama, IL-2 – interleukin 2, Limf – limfociti, LOX – lipoksigenaza, MATS – metilaliltrisulfid, SAC – S-alilcistein, SAMC – S-alilmerkaptocistein, S-Me-MC – S-metilmerkaptocistein, S-Et-Cys – S-etilcistein, S-Pr-Cys – S-propilcistein, TNF- α - tumornekrotizirajoči faktor alfa, Trc – trombociti.

tarčnih celicah bistvenega pomena za znižanje virusnega bremena. To pa je onemogočeno zaradi obsežnega metabolizma teh učinkovin s CYP3A4 v prebavni cevi in jetrih, sekrecije z efluksnimi prenašalci (PGP, MRP-2), slabe vodotopnosti in hitrosti raztapljanja ter nestabilnosti v želodčnem okolju. Uspešno terapijo še dodatno ovirajo nenehne mutacije HIV virusa, odgovorne za navzkrižno rezistenco (17), in pri dolgotrajni terapiji s HIV-PI poleg ostalih neželenih učinkov nastop presnovnega sindroma (značilni znaki: hiperinzulinemija, hiperglikemija, hipertenzija, dislipidemije in lipodistrofija) (18). V izogib presnovnemu sindromu in oportunističnim infekcijam HIV-okuzeni pacienti posegajo po česnovih preparatih. Tako so v dveh kliničnih študijah na 10 prostovoljcih, ki so prejeli sakvinavir skupaj s česnovim pripravki, ugotovili signifikantno 50 % znižanje najvišje terapevtske koncentracije - Cmax in površine pod plazemsko krivuljo – AUC (19). Predvideva se, da je vzrok za tako drastične spremembe nastanek metabolitov iz ene ali več česnovih sestavin z dolgim razpolovnim časom, ki inducirajo CYP3A4 encime. S CYP3A4 tako nastanejo novi metaboliti sakvinavirja z dolgim razpolovnim časom, ki inducirajo metabolizem sakvinavirja. Zaradi navedenega se kljub prenehanju jemanja česnovih pripravkov plazemske koncentracije sakvinavirja in posledično AUC vrednosti še vsaj 10 dni ne povrnejo na prvotne vrednosti. Podrobnejših raziskav na področju mehanizma interakcij med sakvinavirjem in česnom trenutno še ni. Dosegljiva literatura navaja tudi primer HIV-okuzenega pacienta, ki je pričel prejemati ritonavir, predhodno pa je že dalj časa užival tudi česnovi pripravke (20). Sočasna uporaba obeh pripravkov sicer ni povzročila signifikantnih sprememb AUC in Cmax vrednosti ritonavirja, pacient pa je razvil znake hude gastrointestinalne zastrupitve, ki je prenehala s prenehanjem jemanja ritonavirja ali pripravkov. V tem primeru je do klinično pomembnih interakcij najverjetneje prišlo zaradi medsebojnih vplivov česnovih sestavin in ritonavirja na metabolizem obeh. Inhibicija CYP3A4 z ritonavirjem namreč zmanjša metabolizem česnovih sestavin in poveča njihovo koncentracijo, zaradi česar je inhibitorjen vpliv česnovih pripravkov na CYP3A4 in PGP še večji, to pa posledično pomeni še višje koncentracije ritonavirja v enterocitih ter poškodbo GIT trakta. Varnost dolgotrajne uporabe česnovih preparatov skupaj s HIV-

PI je zaradi vsega navedenega vprašljiva in bi zahtevala intenzivnejše izvajanje programa farmacevtske skrbi pri izdaji zdravil in prodaji prehranskih pripravkov HIV okuzenim glede na predpisan terapevtski režim posameznika.

4 Sklep

Poraba česnovih pripravkov zaradi preventivnih in kurativnih lastnosti med starejšimi bolniki, ki sočasno prejemajo tudi več predpisanih zdravil, v svetovnem merilu nenehno narašča. Vpliv sestavin česnovih pripravkov na CYP encime in prenašalce v črevesju in jetrih lahko ob sočasnem uživanju zdravil, zlasti tistih z ozkim terapevtskim oknom, vodi v pomembne farmakokinetske interakcije, ki se izrazijo kot terapevtska neučinkovitost oz. toksičnost. Zaradi navedenega je predhodni posvet bolnika z zdravnikom ali farmacevtom priporočljiv, saj se na tak način posameznik lahko izogne nepotrebnim stranskim učinkom, ki bi se lahko izrazili kot posledica spremenjenih plazemskih koncentracij.

5 Literatura

- Rivlin RS. Historical perspective on the use of garlic. *J Nutr* 2001; 131: 951S-4S.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Garlic. In: *Herbal medicines*, 3rd ed. Pharmaceutical Press 2007: 279-89.
- Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 57-104.
- Foster BC, Arnason JT, Briggs C. Natural health products and drug disposition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 203-226.
- Yeh YY, Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extract and organosulfur compounds: human and animal studies. *J Nutr* 2001; 131: 989S-993S.
- Rahman K, Lowe GM. Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J Nutr* 2006; 136: 736S-740S.
- Banerjee SK, Maulik SK. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal* 2002; 1: 4-18.
- Hu Z, Yang X, Ho PCL, Chan SY, Heng PWS, Chan E, Duan W, Koh HL, Zhou S. Herb-drug interactions, a literature review. *Drugs* 2005; 65: 1239-1282.

9. Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW. Interactions of herbs with Cytochrome P450. *Drug Metab Rev* 2003; 35: 35-98.
10. (Van den Bout-van den Beukel CJP, Koopmans PP, Van de Ven AJAM. Possible drug-metabolism interactions of medicinal herbs with antiretroviral agents. *Drug Metab Rev* 2006; 38: 477-514.
11. Berginc K, Žakelj S, Uršič D, Kristl A. Aged garlic extract stimulates P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 mediated effluxes. *BPB* 2009; 32: 994-999.
12. Foster BC, Foster MC, Vandenhoeck S, Krantis A, Budzinski JW, Arnason JT, Gallicano KD, Choudri S. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2001; 4: 176-184
13. Borrelli F, Capasso R, Izzo AA. Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1386-1397.
14. Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Ther* 2002; 27: 391-401.
15. Izzo AA. Herb-drug interactions: an overview of the clinical evidence. *Fund Clin Pharmacol* 2004; 19: 1-16.
16. Williamson EM. Drug interactions between herbal and prescription medicines. *Drug Safety* 2003; 26: 1075-1092.
17. Lee LS, Andrade AS, Flexner C. Interactions between natural health products and antiretroviral drugs: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. *Clin Infectious Disease* 2006; 43: 1052-1059.
18. Wynn GH, Zapor MJ, Smith BH, Wortmann G, Oesterheld JR, Armstrong SC, Cozza KL. Antiretrovirals part 1: overview, history, and focus on protease inhibitors. *Psychosomatics* 2004; 45: 262-270.
19. Mills E, Montori V, Perri D, Phillips E, Koren G. Natural health-HIV drug interactions: a systematic overview. *Int J STD & AIDS* 2005; 16: 181-186.
20. Fugh-Berman A, Ernst E. Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 587-595.

Par je več kot dvojica – AstraZeneca vaš partner pri zdravljenju

astme in kronične obstruktivne bolezni pljuč,
gastroezofagealne refluksne bolezni in peptične razjede,
motene presnove maščob,
visokega krvnega tlaka in srčnega popuščanja,
shizofrenije in bipolarni motnje,
raka dojke in raka prostate.

avtor: skulptur: Manjan Drey, foto: skulpture Boris Gaberščik, travnik: Bojan Pergovnik, oblikovanje: Evita Lukež



65. mednarodna homeopatski kongres

'Liga Homeopatica' Los Angeles, 18 - 22 maj, 2010

Maruša Hribar

Homeopatija beleži že kar dve stoletji udejstvovanja v doseganju in ohranjanju človekovega zdravja kot njegove največje dobrine. Tokrat so se na 65. mednarodnem kongresu v Los Angelesu zbrali ugledni predstavniki medicinske in homeopatske stroke, da bi s pomočjo kliničnih raziskav, izkušenj in opazovanj pripomogli k dvigovanju kakovosti homeopatskega zdravljenja in sodelovanja z medicino. Zbralo se je več kot 400 udeležencev iz 27 držav. Strokovne prezentacije so segale tako na področje farmacije, stomatologije, ginekologije, sodelovanja z onkologijo in pediatrijo ter veterino. Za oris predstavljenih del na mednarodni homeopatski konferenci podajam dva povzetka izbranih predavateljev.

Dr. Peter Fisher je eden najvidnejših predstavnikov homeopatskega akademskega kroga in direktor razvoja v *Royal London Homeopathic Hospital* ter osebni zdravnik angleške kraljice. Na konferenci je predstavil 'Pregled sodobnih znanstvenih raziskav o homeopatiji' (*Overview of current scientific research in Homeopathy*).

Ugotavljal je, da avtorji članka Shang in drugi objavljenega v vplivni medicinski publikaciji *Lancet* (2005; 366: 726-32), ki so s pomočjo meta analize preizkušali homeopatska zdravila vzporedno s konvencionalnimi, niso upoštevali enotnih kriterijev in individualizirane narave homeopatskega zdravljenja. Poroča tudi o meta raziskavi Kleijnen-a in drugih o 'Kliničnih raziskavah homeopatije' (*Clinical trials of homeopathy*) v *British Medical Journal* (1991; 302: 316-323). Ta članek ugotavlja učinkovitost homeopatskega zdravljenja v 81 od 105 študij, vendar avtor članka izpostavi premajhno raziskanost mehanizma delovanja homeopatskih zdravil kot pomembno oviro pri integraciji homeopatskih zdravil v splošno klinično uporabo.

Cucherat in drugi so v svoji raziskavi 'Poročilo o klinični učinkovitosti homeopatije; meta analiza kliničnih poizkusov' (*Evidence of clinical efficacy of homeopathy. A meta-analysis of clinical trials*) z vzorcem 2001 oseb, ugotovili, da homeopatska zdravila statistično odstopajo od placebo učinka. Članek je objavljen v *European Journal of Clinical Pharmacology* (2000;56:27-33). Fisher je poudaril, da članku primanjkuje metodološke kakovosti.

Fisher navaja zanimiv Mathie-jev pregled homeopatskih kliničnih testiranj v letih 1975-2001. Mathie je objavil v publikaciji *Homeopathy* (*The research evidence base for homeopathy: a fresh assessment of the literature*; 2003, 92:84-91), da je 50 od 93 raziskav pozitivnih za homeopatijo ali vključujočih. Homeopatska zdravila so bila testirana vzporedno s placebom ali drugimi zdravili. Obolenja ob katerih se je

homeopatsko zdravljenje izkazalo za učinkovito so bila: alergijski rinitis, otroška diareja, fibromialgija, influenza, bolečine, zmanjševanje stranskih učinkov pri radio ali kemoterapiji, izvini in infekcije zgornjega respiratornega trakta. Jonas in drugi, je istega leta sistematično pregledal dvanajst kliničnih poizkusov na področju zdravljenja s homeopatijo. Ugotavlja, da je homeopatsko zdravljenje učinkovito pri zdravljenju alergij, otroške diareje, influence in za post operativni ileus. Homeopatija pa naj ne bi bila učinkovita pri migrenah, kot preventiva influenci in za bolečine v mišicah, ki nastopijo z zamikom (*A critical overview of homeopathy. Annual Int Medicine*, 2003; 38:393-399).

Predavatelj je omenil tudi raziskavo, ki ni bila randomizirana in se je nanašala predvsem na prakso. Predmet zanimanja so bila prehladna obolenja pri otrocih, ki se zdravijo z antibiotiki ali s homeopatskimi zdravili. Poizkus je bilo možno izvesti v Franciji, kjer splošni zdravniki lahko uporabljajo obe vrsti zdravljenja. Otroci so bili stari med 18. mesecev in 5 let, z najmanj petimi prehladnimi epizodami na leto. 231 otrok se je zdravilo pri 62-ih zdravnikih, ki niso homeopati in 268 otrok pri 73-ih zdravnikih, ki so tudi homeopati. Raziskava se je usmerjala predvsem na čas, ki so ga starši potrebovali za nego otroka in stranske učinke, ter kako finančno učinkovita sta antibiotično in homeopatsko zdravljenje. Homeopatsko zdravljenje se je izkazalo za statistično bolj učinkovito v naslednjih postavkah: učinkovitost zdravnikov, komplikacije, število konzultacij, kakovost življenja, dolžina bolniške za starše. Finančni stroški obeh zdravljenj pa so bili primerljivi. (Trichard M in drugi, *Pharmacoeconomic comparison between homeopathic and antibiotic treatment strategies in recurrent acute rhinopharyngitis in children*. *Homeopathy* 2005;94:3-9).

Fisher je podal tudi razloge, zakaj se pacienti odločajo za zdravljenje v *Royal Homeopathic Hospital*. Prejeli so 925 različnih odgovorov od 493 pacientov. 32 % se jih je za homeopatsko zdravljenje odločilo, ker druge terapije niso učinkovale; 26 % zaradi zaskrbljenosti pred stranskimi učinki nekaterih konvencionalnih zdravil; 22 % je sprejelo takšno odločitev zaradi osebne preference; 14 % zato, ker je že imelo neprijetne stranske učinke drugih zdravljenj in 6 % je navedlo druge razloge (Sharples in drugi, '*NHS patients'perspective on complementary medicine*'. *Complementary Therapies in Medicine*; 2003;11:243-248).

Dr. Fruzsina Gábor je na konferenci predstavila svoje videnje 'Vloge farmacevtov v homeopatiji' (*The role of the pharmacist in homeopathy*). Pojasnila je, da vloga farmacevtov v homeopatiji zajema delo v laboratorijih, lekarnah, pri registraciji zdravil, v pisarnah in

farmakopejah. Posebej zahtevna naloga farmacevtov pa je predvsem v komunikaciji s splošnimi javnostmi, zdravniki medicine, drugimi farmacevti in pacienti. Farmacevti pri zdravljenju s homeopatijo komunicirajo s pacienti in jim nudijo potrebno oporo med zdravljenjem, ter jih integrirajo v homeopatijo. Gáborjeva je mnenja, da pri homeopatskem zdravljenju farmacevt najprej dovoli pacientu, da s svojimi besedami opiše bolezensko stanje, med tem ga farmacevt lahko opazuje in mu zastavlja dodatna vprašanja, tudi o tem ali že jemlje kakšna zdravila z ali brez recepta. Za splošno diagnosticiranje je predavateljica uporabila črke vljudnostne angleške fraze 'SIT DOWN SIR' kar pomeni 'usedite se gospod'. S (kot *site* ali lokacija obolenja), I (kot *intenziteta* ali resnost bolena), T (*tip* za obolenja), D (kot *duration* ali trajanje obolenja), O (*onset* ali nastopni čas obolenja), W (*with* ali s katerimi simptomi), N (*annoyed*, kje je vznemirjenje ali nemir), S (za *spread* oziroma razširitev obolenja), R (za *relieved* oziroma kako nastopi olajšanje). S številkami in praktičnim primerom z Madžarske je poudarila kako pomembna je vloga farmacevtov, saj v 20 dneh skoraj celotna populacija države vsaj enkrat stopi do lekarne in povpraša za nasvet. Tu se kaže pomembna vloga farmacevtov. Meni, da je podobna situacija tudi drugod po državah Evropske unije. Seveda je položaj madžarskih lekarn neprimerljiv s slovenskimi, saj tam lahko lekarne prodajajo homeopatska zdravila brez recepta že od leta 1991. V letih med 2003/4 je Gáborjeva skupaj s kolegico izvedla raziskavo o uporabi homeopatskih zdravil v štirih lekarnah z dvesto pacienti. Kar 85 % kupcev je žensk, glede na starostno skupino v 56 % prevladuje skupina med 26-45 letom, kupujejo jih v največji meri za lastno uporabo, za otroke v 23 % in za ostale družinske člane v 13 %.

62 % sodelujočih kupuje homeopatske monokomponente (Arnica, Belladonna, Pullsatilla, Rus thox. Nux vomica, Sulfur in drugo) pri kompleksnih homeopatskih zdravilih (38 %) se odločajo predvsem za nosni sprej, tinkture za obravnavo ran, ter tablete za alergije in nespečnost. Raziskovalki je zanimalo tudi kako dolgo so pacienti uporabljali kupljene homeopatske izdelke; 1-14 dni: 53 %, od 15-30 dni: 13 %, več kot 30 dni: 34 %. Pomembno je bilo tudi njuno vprašanje zakaj so se odločili za nakup homeopatskega zdravila: 32 % se jih je odločilo na podlagi priporočila s strani farmacevta, 27 % na podlagi priporočila lečečega zdravnika, 20 % na podlagi drugih priporočil, 17 % zato, ker homeopatijo vedno uporabljajo, zaradi oglaševanje in medijev pa le 4 % vprašanih. Kar 75 % vseh, ki so obiskali lekarno je želelo od farmacevta prejeti nasvet in kar 94 % pacientov je pomoč z nasvetom tudi dobilo. Tu se kaže odločilna vloga farmacevtov pri prvem koraku zdravljenja večine pacientov, ki najprej stopijo v lekarno in šele nato k zdravniku (v ne nujnih primerih), in s tem tudi velika odgovornost tega poklica. Predavateljica je mnenja, da je potrebno pacienta integrirati, mu pomagati in spremljati njegov primer. Homeopatska zdravila na Madžarskem svetujejo predvsem pri akutnih težavah s prehladom in alergijami na cvetni prah, po poškodbah ali operacijah, manjših obolenjih pri otrocih, prebavnih težavah in težavah z dojenjem ali labialnim herpesom. Po mnenju Gáborjeve je homeopatsko opazovanje pacientov pomembno, ker je podrobno in se usmerja na posameznikove vedenjske značilnosti tudi, če ti ne znajo dovolj nazorno opisovati svojih težav. Homeopatska diagnostika farmacevtov tako lahko služi kot prva diagnostika in nato primerna usmeritev ali k nakupu zdravila ali obisku zdravnika.

Simpozij in 35. skupščina SFD

GH Bernardin, Evropa, Portorož, 13. - 15. maj 2010

Jelka Dolinar

Okoli 400 udeležencev srečanja kaže, da ostaja simpozij ob rednih letnih skupščinah SFD najbolj številno strokovno srečanje slovenskih farmacevtov. Letošnji izbor tem je bil namenjen dvema, med seboj prepletenima tematikama **DUŠEVNE MOTNJE** ter **MOTNJE HRANJENJA IN DEBELOST**. Zadnji dan srečanja, v soboto dopoldan, je »vroča« tematika, **GENERIČNO PREDPISOVANJE ZDRAVIL** pritegnila veliko število udeležencev iz različnih področij dela v farmaciji. O različnih vidikih generičnega predpisovanja zdravil so se udeleženci opredeljevali s tajnim glasovanjem. Rezultate glasovanja bomo objavili v septembrski številki Farmaceutskega vestnika.

Največje srečanje slovenskih farmacevtov se je končalo s redno 35. letno skupščino, na kateri so delegati potrdili predlog sprememb in dopolnitev Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj:

Dopolni se 3. člen Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj z besedilom:

Za utemeljitev uspešnosti kandidata mora predlagatelj navesti pozitivne spremembe v delovnem okolju, ki so posledica kandidatovih aktivnosti. Iz predloga mora biti razvidno kako je kandidat v smislu kvalitete in kvantitete presejel svoje obveznosti, ki izhajajo iz opisa del in nalog delovnega mesta, ki ga zaseda.

Dopolni se 4. člen tako, da omeji največje možno število Minaříkovih priznanj:

Na vsaki skupščini se podeli največ eno Minaříkovo odličje in največ 5 Minaříkovih priznanj.

Spremeni se 11. člen - namesto plakete se odlikovancem podeli umetniška skulptura:

Minaříkovo odličje sestavljajo:

- umetniška skulptura (plastika), ki ponazarja simboliko farmacije

Dobitniki društvenih priznanj 2010

Slavnostna podelitev je potekala v Tartinijevem gledališču v Piranu, v četrtek, 13. maja 2010 zvečer. Program je povezovala gledališka igralka Mojca Fatur, popestril pa ga je mladi operni solist Jure Počkaj, ki ga je na klavirju spremljal profesor Ivan Vombergar.

V letu 2010 je izvršni odbor podelil 8 Minaříkovih priznanj in eno odličje. Priznanja sta podelila predsednik društva dr. Gašper Marc in predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj, prof. dr. Aleš Mrhar, ki je pripravil in prebral utemeljitve.



Iz obrazložitve predloga Sekcije bolnišničnih farmacevtov SFD povzemam sledeče:

Magistra **Cvetka Bačar** je vso svojo profesionalno aktivnost posvetila bolnišnični farmaciji, natančneje psihiatrični bolnišnični lekarniški dejavnosti, ki je še posebej zahtevna glede na naravo dela in delovno okolje. Svoje raziskovalno delo je večkrat predstavila v obliki predavanj za zdravnike, farmacevte, medicinske sestre in študente zdravstvene nege ter sodelovala s posterji na mednarodnih in domačih strokovnih in znanstvenih srečanjih. O njenem strokovnem delu pričajo tudi številni objavljeni prispevki, med katerimi je najpomembnejši knjiga z naslovom *Modra farmakoterapija*, ki je izšla leta 2008.



Iz obrazložitve predloga Primorske podružnice SFD povzemam sledeče:

Magister **Branko Morenčič** je član SFD že od leta 1964. V tem času se je v zgodovino slovenskega, predvsem pa primorskega lekarništva zapisal kot lekarnar, ki je s svojim širokim znanjem bolnikom in



zdravnikom vedno lahko ponudil zanesljiv nasvet. Kot direktor lekarn Ajdovščina in Tolmin je z vztrajnostjo in gospodarnostjo poskrbel, da so bili tudi manjšim lekarnam na severnem Primorskem zagotovljeni ustrezni pogoji za delo. Po upokojitvi pa se je poglobil v arhive in s sebi lastno natančnostjo za naše znanjce zapisuje in objavlja zgodovino lekarniške službe na severnem Primorskem.

Iz obrazložitve predloga Sekcije farmacevtov javnih lekarn SFD povzemam sledeče:

Magistra **Nina Pisk** je zaposlena v Gorenjskih lekarnah, kjer je od leta 2005 vodja farmakoinformativne službe. Njeno strokovno delo je obsežno in dokumentirano s številnimi objavljenimi članki za strokovno in laično javnost. Več let je sodelovala pri vodenju učnih delavnic, ki so bile namenjene lekarniškim farmacevtom in zdravnikom. Od leta 2007 je kot predsednica Sekcije farmacevtov javnih lekarn prevzela pretežni del odgovornosti za organizacijo simpozijev Sekcije in izvedbo Dnevov slovenskih lekarn. V sklopu vsebine Dnevov slovenskih lekarn je spodbudila izvedbo več raziskovalnih projektov, ki jih je predstavila javnosti. Aktivno je sodelovala pri pripravi izobraževalno terapevtskega multimedijskega priročnika Tris na temo panične motnje in komunikacijskega protokola. S svojim delom je magistra Pisk veliko prispevala k prepoznavni vlogi lekarniškega farmacevta v zdravstvenem timu.



Iz obrazložitve predloga Sekcije seniorjev SFD povzemam sledeče:

Magister **Milan Popovski** je v funkciji inšpektorja ves čas vspodbujal in neposredno pomagal vodjem lekarn in galenskih laboratorijev pri dvigu ravni urejenosti in opremljenosti prostorov, ter za uveljavitev dobrih lekarniških in delovnih praks. S strokovnimi nasveti je pripomogel tudi pri ureditvi grosističnih skladišč. Zaslužen je za uveljavitev GMP norm v proizvodnji zdravil v Sloveniji. Z odločnimi zahtevami je pri odgovornih za razvoj bolnišnic dosegel, da so bile obnovljene tudi bolnišnične lekarne. Kot inšpektor ni nadzoroval represivno, temveč konstruktivno in razvojno, ter se tako odlikoval po koordinaciji in ne po

konfrontaciji. Aktiven je bil tudi v okviru tedanjega Jugoslovanskega združenja za kakovost.



Iz obrazložitve predloga Mariborske podružnice SFD povzemam sledeče:

Magistra **Irena Pušnik**, je že na začetku svoje poklicne poti razumela vlogo lekarniškega farmacevta širše in ne samo kot delo v lekarni. Že 1988 je pričela organizirati učne delavnice in osnovnošolcem predstavljati poklic farmacevta in pomen zdravil. Program še vedno izvaja na več šolah na Koroškem, v osnovni šoli Prežihov Voranc pa je to uvrščeno v učni program. V letu 2000 je pričela s projektom „Pravilna in varna uporaba zdravil“, ki je namenjen starejšim. V sodelovanju z različnimi društvi je v okviru teh projektov izvedla čez 20 predavanj v dvanajstih občinah Koroške. Od 2004 s predavanji sodeluje pri projektu ZD Radlje z naslovom „Živimo zdravo“. Poleg tega ji je uspelo povezati Zavod za zdravstveno varstvo Ravne, Regionalno agencijo Koroške ter Koroško lekarno v projekt „Krepitev duševnega zdravja in preprečevanje samomorilnosti na Koroškem“. Magistra Irena Pušnik je pomembno prispevala k prepoznavnosti lekarniškega farmacevta v družbi in v zdravstvenem sistemu.



Iz obrazložitve predloga Ljubljanske podružnice SFD povzemam sledeče:

Med strokovnimi dosežki magistre **Milene Radoha Bergoč** je potrebno posebej izpostaviti njeno delo in dosežke na področju izgradnje sistema farmakovigilance na katerem je aktivna v sklopu JAZMP že od leta 2002. Njeno delo ima še posebno težo, saj svoje znanje in izkušnje z omenjenega strokovnega področja s predavanji uspešno širi v farmacevtski in zdravniški strokovni javnosti. Za farmacevtsko stroko pa je pomembno tudi njeno delo na področju farmacevtsko tehnološkega izrazoslovja preko sodelovanja v Komisiji SFD za slovensko farmacevtsko-tehnološko terminologijo.



Iz obrazložitve predloga Celjske podružnice SFD povzemam sledeče:

Magistra **Marina Urbanc Mokotar** se je po diplomi zaposlila v lekarni Splošne bolnišnice Celje in opravila specializacijo iz klinične farmacije. Po zaposlitvi v javnem zavodu Celjske lekarne je prevzela vodenje



lekarne. Je članica Razširjenega strokovnega kolegija za lekarniško farmacijo ter različnih komisij LZS. Je že dva mandata prepoznavna predsednica CP SFD in članica IO. Sodeluje pri pripravi protokolov za samozdravljenje, s svojo energijo, ustrezno komunikacijo in vsestransko aktivnostjo in sodelovanjem z laično javnostjo pa vseskozi uspešno promovira farmacevtsko stroko in motivira mlajše sodelavce, da ji sledijo.

Iz obrazložitve predloga Dolenjske podružnice SFD povzemam sledeče:

Magistra **Evridika Morosini Berus** se je po diplomi zaposlila v Krki, kjer je najprej delovala kot analitik, kasneje pa je prevzela vodenje skupine pooblaščenec za kakovost in skupine vseh notranjih presojevalcev. S svojimi aktivnostmi je postala prepoznavna v širšem okolju, kjer je na prošnjo Slovenskega združenja za kakovost prevzela delo ocenjevalke za državno nagrado za poslovno odličnost in predavanja na temo uveljavljanja principov presojanja kakovosti po ISO in GMP standardih. S temi aktivnostmi je promovirala farmacevtsko stroko v širšem industrijskem in podjetniškem okolju.



Dobitnica Mlinařikovega odličja

Iz obrazložitve predloga Ljubljanske podružnice SFD in na podlagi razprave na Odboru za podeljevanje društvenih priznanj povzemam sledeče:

Magistra **Tatjana Kogovšek Vidmar** je ena najbolj vidnih in prepoznavnih osebnosti v slovenski lekarniški farmaciji. Njene najodmevnejše aktivnosti lahko strnemo v nekaj naslednjih ugotovitev: večletno zastopanje lekarniške farmacije v Zdravstvenem svetu pri Ministrstvu za zdravje in v zvezi s tem pobuda za ustanovitev RSK za lekarniško farmacijo, ohranitev izdaje zdravil v lekarnah v zakonu o zdravniški službi, pobuda za uvedbo in soorganizacija Dneva slovenskih lekarn, soorganizacija letnih simpozijev Sekcije farmacevtov javnih lekarn, vodenje delovne skupine za pripravo pravilnika o podeljevanju licenc v lekarniške dejavnosti ter kontinuirano informiranje in osveščanje laične in strokovne javnosti o lekarniški farmaciji v različnih medijih. To ne bi bilo mogoče, če se magistra Kogovšek Vidmar ne bi nenehno izobraževala v vseh svojih življenjskih obdobjih;

tako je najprej uspešno zaključila specializacijo iz lekarniške farmacije, kasneje pa magistrski študij, pri čemer sta obe njeni deli tako specialistična kot tudi magistrska naloga s svojimi tezami in ugotovitvami naleteli na velik odziv strokovne javnosti. S specialistično nalogo je opozorila, da je v lekarništvu poleg znanja o zdravilih nujno potrebno tudi poznavanje pravnih, socioloških, gospodarsko-ekonomskih in finančnih vidikov delovanja. V magistrski nalogi pa je z znanstveno prepoznavnim metodološkim pristopom predlagala ustrezne strokovne in organizacijske rešitve pri prehodu iz tradicionalnega v spletno poslovanje lekarn.

Magistra Kogovšek Vidmar je bila tudi dolgoletna direktorica Lekarne Ljubljana in podpredsednica Lekarniške zbornice Slovenije. V tem svojstvu je imela zelo velik vpliv na razvoj lekarniške farmacije v devetdesetih letih, t.j. v obdobju dinamičnih družbenih, političnih in ekonomskih sprememb. Pri tem je bilo storjenega veliko dobrega, kot npr. obsežna prenova obstoječih in odpiranje novih lekarn, preobrazba galenskega in kontrolno analiznega laboratorija ter organizacija farmakoinformativne službe, po drugi strani pa v času hitrih sprememb morda niso bile izkoriščene vse možnosti za vzgojo vrhunskih farmacevtskih kadrov za vodenje in upravljanje lekarn predvsem pa za statusno preobrazbo lekarništvu v organizacijske oblike, ki bi v sedanjem času omogočale ustreznejši razvoj lekarniške farmacije kot zdravstvene stroke in s tem večjo prepoznavnost farmacevtov kot zdravstvenih delavcev. Zaradi teh razlogov magistra Kogovšek Vidmar v Odboru za podeljevanje društvenih priznanj ni dobila soglasne ampak večinsko podporo. Člani Odbora, ki so predlog za podelitev odličja podprli, so izrecno izpostavili pozitivno vlogo magistre Kogovšek Vidmar, ki se je v obdobju zakonskih omejitev, na katere ni imela vpliva, zavzeto borila za obstoj javnega zavoda Lekarna



Ljubljana in širše za integriteto lekarniške farmacije kot dela zdravstvenega sistema.

Izvršni odbor SFD je skrbno pretehtal stališča in sklepe Odbora, jih soglasno podprl in sklenil, da magistri Kogovšek Vidmar podeli najvišje društveno priznanje.

Slavnostne prireditve so se udeležili tudi predsednik strokovno-organizacijskega odbora simpozija prof. dr. Borut Štrukelj, direktor Kemofarmacije, magister Davorin Poherc, direktorica Javne agencije za zdravila in medicinske pripomočke dr. Martina Cvelbar.





SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO
SLOVENIAN PHARMACEUTICAL SOCIETY

in



Lekarniška zbornica Slovenije

6. Dan slovenskih lekarn
26. september 2010
o pravilni in varni uporabi zdravil

ZDRAVILA IN STAROSTNIKI

Aktivnosti bodo potekale
v petek in soboto, 24. in 25. septembra 2010

Gengigel
Najpogosteje
priporočni
stomatologik

Novalac
Najpogosteje
priporočena
hrana za dojenčke

Voltaren Emulgel
Najpogosteje
priporočni
topikalni analgetik
in antirevmatik

Fenistil gel
Najpogosteje
priporočni
topikalni antialergik

Calcium-Sandoz forte
Najpogosteje
priporočni
pripravek s kalcijem

Lamisil
Najpogosteje
priporočni
antimikotik
/ proti glivicam
na nogah



STRNJENA VRSTA PRVOVRSTNIH

V letošnji neodvisni raziskavi se je znova kar 6 Medisovih izdelkov uvrstilo med tiste, ki jih farmacevti najpogosteje priporočite.*
Zaupanje v naše izdelke lahko gradimo samo prek trdnega partnerstva z vami.
Pohvala vsem farmacevtom, ker znate prepoznati odlične proizvode in jih svetovati tako, da so uporabniki zadovoljni.

Ponudba Medisovih izdelkov zajema prvovrstna, preizkušena, kakovostna, inovativna in zaupanja vredna zdravila, prehranska dopolnila in medicinske pripomočke.

*Neodvisna raziskava o najpogosteje priporočenih izdelkih brez recepta v slovenskih lekarnah je bila izvedena po mednarodni licenci priznanega nemškega založnika Apotheken Spiegel Verlag.
Raziskavo je v Sloveniji opravilo podjetje FarmAsist. Več informacij: www.medis.si.

1 PRVO
VRSTNO

 **MEDIS** zdrave
vrednote

Bilobil. In nič vam ne uide iz glave!



Novo zdravilo za boljši spomin in večjo moč koncentracije

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

www.krka.si

KRKA

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

Pred uporabo natančno preberite navodilo!

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