

Farm Vestn 2009; 60: 1-26  
UDK 615 CODEN FMVTA, SLO ISSN 0014-8229



# Farmaceutski vestnik 1

Š T 1 . A P R I L . 2 0 0 9 . L E T N I K 6 0

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA





## Pot do zdravja

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

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

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



# Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 1 • A P R I L 2 0 0 9 • L E T N I K 6 0

## Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

## Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

## Glavna urednica

Andrijana Tivadar

## Uredniški odbor

Tajda Gala Miharija

Stanko Gobec

Katja Gombač Aver

Iztok Grabnar

Janja Marc

Franc Vrečer

## Izdajateljski svet

Stane Srčič

Simona Cencelj

Boštjan Debelak

Mirjana Gašperlin

Lili Grosek

Mirjam Hočevar Korošec

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

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

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in:

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

## UVODNIK

*Letošnje številke Farmaceutskega vestnika praznujejo šestdesetletnico, torej Farmaceutski vestnik vstopa v zrelo dobo. Šestdeset let si stroka prizadeva obveščati strokovno javnost o razvoju farmacije in medicine, o novih postopkih izdelave zdravilnih učinkovin, zdravil in njihovem delovanju. Šestdesetletja poskušamo bolnikom in ostalim uporabnikom naših storitev in našega znanja omogočiti varna, kakovostna in učinkovita zdravila. In šestdeset let postavljamo razvoj stroke v ospredje, pred ekonomiko in pred hitrim zaslužkom. Seveda se zavedamo, da je ekonomika osnova za delovanje in da tako silnega razvoja farmacije na globalnem in lokalnem nivoju ne bi bilo brez znatnih finančnih vložkov, za kar smo vsem institucijam in posameznikom, ki vlagajo v znanje in razvoj stroke, neizmerno hvaležni. Ne smemo pa dopustiti, da postane strokovno delo in izobraževanje drugotnega pomena in prevladajo kruta načela trga pred stroko. Kako kratkotrajno je lahko hlepenje po profitu brez strokovnih osnov, lahko vidimo tudi v naši sredini, ko se nekdanj zdrava, uspešna podjetja borijo za preživetje. Prepričan sem, da večini kolegic in kolegov ni vseeno za razvoj in obstoj kvalitetne slovenske farmacije.*

*Tematika te številke prikazuje tri pregledne članke in dva izvorna znanstvena članka s področja klinične biokemije, farmacije in tehnologije. Tako doc.dr. Barbara Ostanek opisuje farmakogenetične osnove Gilbertovega sindroma, iz iste katedre pa prihaja tudi članek o optimizaciji analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu, ki sta ga pripravila Mojca Bilač Krašnja in izr. prof. dr. Darko Černe. Kologice tehnologinje opisujejo stabilizirane emulzije s trdnimi delci in membrane za testiranje dermalne absorpcije. Prav tako informativen pa je članek kologice Nine Pisk o vplivu zdravil na psihofizične sposobnosti upravljanja vozil in strojev, torej o vedenju, ki nam bo prišlo prav v vsakdanji lekarniški dejavnosti. Naj bo to uvod v novo pomlad in v naslednjih, uspešnih šestdeset let Farmaceutskega vestnika.*

*prof. dr. Borut Štrukelj*

# Vsebina

## *Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles*

---

### **Barbara Ostanek**

Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma  
Genetics and pharmacogenetics of Gilbert's syndrome

---

**3**

### **Mirjam Gosenca, Mirjana Gašperlin**

Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije  
Membranes for *in vitro* dermal absorption studies

---

**8**

### **Karmen Teskač, Mirjana Gašperlin**

Emulzije, stabilizirane s trdnimi delci – Pickering emulzije  
Emulsions stabilized by solid particles – Pickering emulsions

---

**14**

## *Izvirni znanstveni članki – Original Scientific articles*

---

### **Mojca Bilač Krašnja, Darko Černe**

Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu  
Optimization of an analytical procedure of lipoprotein lipase activity measurement in cancer tissue

---

**21**

### **Nina Pisk**

Poznavanje vpliva zdravil na psihofizične sposobnosti upravljanja vozil in strojev pri slovenskih bolnikih  
Slovenian patients' knowledge of drugs efficacy on their capacities to drive and operate machines

---

**27**

## *Novi doktorji znanosti*

---

Povečanje oksigenacije in učinkovitosti radioterapije kožnih tumorjev s topikalnim dajanjem vazodilatatorja -  
dr. Zrinka Abramovič, mag. farm.

---

**34**

Razvoj nanosistemov za povečanje hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin in aktivno ciljanje tumorskih celic -  
dr. Petra Kocbek, mag. farm.

---

**35**

## *Novice iz sveta farmacije*

---

**36**

# Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma

## Genetics and pharmacogenetics of Gilbert's syndrome

Barbara Ostanek

**Povzetek:** Gilbertov sindrom je najpogostejša dedna motnja v presnovi bilirubina. Blaga nekonjugirana hiperbilirubinemija nastane kot posledica znižane konjugacije bilirubina zaradi polimorfizmov v genu za UDP-glukuronil-transferazo 1A1 (UGT1A1). Dodatno lahko k njej prispeva zmanjšan transport nekonjugiranega bilirubina v hepatocite zaradi polimorfizmov v genu za organski anionski prenašalec SLCO1B1. Poleg bilirubina so substrati za UGT1A1 in SLCO1B1 tudi številne zdravilne učinkovine. Polimorfizmi v obeh genih, ki so prisotni pri bolnikih z Gilbertovim sindromom, imajo zato pomen v individualizaciji zdravljenja. Njihov vpliv na farmakokinetični profil zdravilnih učinkovin in s tem na njihove terapevtske ali stranske učinke je najbolje proučen pri zdravljenju z irinotekanom in pravastatinom.

**Ključne besede:** hiperbilirubinemija, UGT1A1, SLCO1B1, polimorfizem, toksičnost zdravil

**Abstract:** Gilbert's syndrome is the most common hereditary disorder of bilirubin metabolism. Mild unconjugated hyperbilirubinemia results from decreased activity of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 due to polymorphisms in the UGT1A1 encoding gene. Polymorphisms in the gene encoding organic anion transporter SLCO1B1 can reduce the hepatic uptake of unconjugated bilirubin and also contribute to hyperbilirubinemia. Besides bilirubin, several drugs are also substrates for glucuronidation with UGT1A1 or hepatic uptake by SLCO1B1. Polymorphisms in both genes associated with Gilbert's syndrome have therefore important implications for individualised therapy. Their impact on pharmacokinetic profile and therapeutic or side effects has been best described for irinotecan and pravastatin.

**Keywords:** hyperbilirubinemia, UGT1A1, SLCO1B1, polymorphism, drug toxicity

## 1 Uvod

Gilbertov sindrom (GS) je dedna motnja, za katero je značilna blaga nekonjugirana hiperbilirubinemija v odsotnosti hemolize in jetrnih boleznih. Prvič sta ga leta 1901 opisala Gilbert in Lereboullet. V literaturi je sindrom opisan tudi z naslednjimi sinonimi: Gilbert-Lereboulletov sindrom, Icterus intermittens juvenilis, Meulengrachtova bolezen in nekonjugirana benigna hiperbilirubinemija (1).

GS je najpogostejša dedna motnja v presnovi bilirubina (BLR), saj je glede na meritve serumske koncentracije BLR prisoten kar pri 3 - 10 % populacije (2). Pogostejši je pri moških (12,4 %), ki imajo tudi višje koncentracije BLR, kot pri ženskah (4,8 %) (2). Serumske koncentracije celotnega BLR se dvignejo na 20 do 50  $\mu\text{mol/L}$ , redko pa presežejo 85  $\mu\text{mol/L}$  (referenčne vrednosti za odrasle so do 17  $\mu\text{mol/L}$ ) (1). Značilno je, da vrednosti nihajo in narastejo ob metabolnem stresu kot je stradanje ali prisotnost druge bolezni.

Pri večini bolnikov se GS diagnosticira v puberteti ali v zgodnji odrasli dobi. Velja za benigno motnjo, saj razen občasno povišanih koncentracij BLR ni prisotnih drugih patoloških odstopanj in zdravljenje ni potrebno (1, 2). Kljub temu je diagnosticiranje GS klinično

pomembno, saj so bolniki bolj dovzetni za stranske učinke nekaterih zdravil. Poleg tega prispeva k razvoju hiperbilirubinemije in povečanemu tveganju za nastanek žolčnih kamnov pri mnogih dednih krvnih boleznih kot so pomanjkanje glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze,  $\beta$ -talasemiji, sferocitozi, neskladju krvnih skupin AB0 in srpasti anemiji. Prav tako lahko prispeva k povečanemu tveganju za razvoj raka na dojkah in jajčnikih, neonatalni hiperbilirubinemiji in razvoju žolčnih kamnov pri bolnikih s cistično fibrozo (3, 4). Diagnosticiranje GS je pomembno tudi zaradi izključitve potrebe po nadaljnji invazivni diferencialni diagnostiki vzrokov hiperbilirubinemij, kot je jetrna biopsija (1).

## 2 Presnova bilirubina

BLR je rumenooranžni pigment, ki v nizkih koncentracijah deluje kot antioksidant, v visokih koncentracijah pa je nevrotoksičen. Je razgradni produkt hema in se sintetizira v celicah retikuloendotelnega sistema, predvsem vranice. Hem-oksigenaza katalizira odprtje hemskega obroča, pri čemer se v obtok sprostita  $\text{Fe}^{2+}$  ter ogljikov monoksid, nastane pa zelen, vodotopen, netoksičen pigment biliverdin. Biliverdin se z biliverdin-reduktazo reducira do BLR, ki se sprosti v serum.

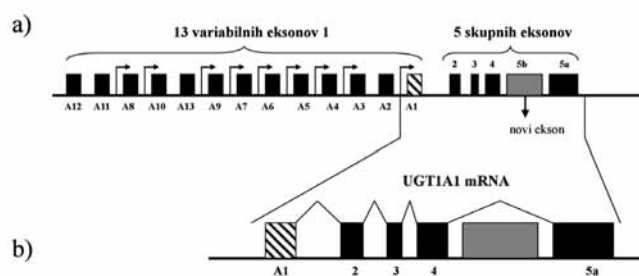
Dnevno nastane od 250 do 400 mg BLR. Nativni BLR je zaradi tvorbe intramolekularnih vodikovih vezi nevdotopen. V serumu se veže na albumin in se prenese do jeter. To obliko BLR imenujemo nekonjugiran BLR. Le 0,1 % BLR v serumu predstavlja nativni prosti BLR, ki lahko prehaja hematoencefalno pregrado in je nevrotoksičen. Pod vplivom svetlobe BLR prehaja v fotoizomere in fotooksidacijske produkte, ki so bolj vodotopni in se hitreje izločajo iz organizma, kar s pridom izkoriščamo pri zdravljenju hiperbilirubinemij s fototerapijo. V jetrih se BLR odcepi od albumina in preko anionskih membranskih proteinov ali s procesom difuzije, vstopa v hepatocite, kjer ga prevzame citoplazemski protein ligandin in prenese do endoplazemskega retikuluma. Na endoplazemskem retikulumu poteče reakcija esterifikacije z glukuronsko kislino, ki jo katalizira UDP-glukuroniltransferaza 1A1 (UGT1A1). Nastaneta vodotopna BLR monoglukuronid in bilirubin diglukuronid s skupnim imenom konjugiran BLR. Konjugiran BLR se z aktivnim transportom izloča v žolčni mehur od tam pa v tanko črevo.  $\beta$ -glukuronidaza hidrolizira konjugiran BLR do nekonjugiranega BLR, ki se nato pod vplivom anaerobnih bakterij reducira do urobilinogenov. Del nekonjugiranega BLR in do 20 % dnevno nastalih urobilinogenov se reabsorbira iz črevesja in vstopijo v enterohepatično cirkulacijo, kjer se ponovno skozi jetra izločijo v žolč. Ostalih 80 % urobilinogenov se v spodnjem delu prebavnega trakta spontano oksidira v urobiline, ki dajejo barvo blatu, s katerim se tudi izločijo. Povečana enterohepatična cirkulacija BLR npr. pri stradanju ali pri dojenih novorojenčkih lahko prispeva k razvoju hiperbilirubinemije (5).

### 3 Molekularne osnove Gilbertovega sindroma

Vzroki za GS še niso povsem razjasnjeni. Najpomembnejšo vlogo igra znižana konjugacija BLR, ki je pri bolnikih z GS znižana na 30 % normalne (6). Pri bolnikih so dokazali tudi zmanjšan jetrni očistek bromosulfoftaleina, indocianin zelenega, tolbutamida, nikotinske kisline in drugih organskih anionov, kar kaže, da zmanjšan privzem BLR v hepatocite tudi prispeva k hiperbilirubinemiji (7).

#### 3.1 Uridindifosfat-glukuroniltransferaza 1A1 (UGT1A1)

UGT1A1 je pri ljudeh edini fiziološko pomemben encim za konjugacijo BLR. Sodi v družino UGT1A mikrosomalnih UDP-glukuroniltransferaz, ki katalizirajo adicijo glikozilne skupine z nukleotidnega sladkorja na hidrofobno molekulo aglikona. Družino sestavlja več izoencimov, ki nastanejo s prepisovanjem 218 kbp dolgega kompleksa genov *UGT1A* na kromosomu 2q37 (Slika 1). Lokus *UGT1A* sestavljajo štirje stalni eksoni (eksoni 2, 3, 4 in 5a), ki kodirajo identične C-terminalne regije vseh UGT1A izoencimov iz 280 aminokislin ter trinajst variabilnih eksonov (eksoni 1), ki kodirajo približno 250 aminokislin vsebujoče N-terminalno področje vsakega posameznega izoencima. Stalni C-terminalni eksoni kodirajo področje za vezavo UDP-glukuronske kisline, N-terminalni eksoni pa področje za vezavo specifičnega substrata. Izoencim UGT1A1 tako kodira gen *UGT1A1*, sestavljen iz eksona A1 skupaj s stalnimi eksoni 2, 3, 4 in 5a. Neodvisno regulacijo ekspresije posameznega izoencima omogoča promotorska regija pred eksonom 1. Dejansko lahko nastane 9 funkcionalnih encimov UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 in



**Slika 1:** Struktura genskega lokusa *UGT1A*. **a)** Celotni genski kompleks sestavlja 13 variabilnih eksonov 1 in 5 skupnih eksonov. S kombinacijo skupnih eksonov 2, 3, 4 in 5a ter enega izmed eksonov 1, ki so označeni s puščico, nastane 9 funkcionalnih encimov. Pri ostalih, tako imenovanih psevdo eksonih 1, ne pride do izražanja gena ali pa nastane neaktiven protein. Do izražanja ne pride pri eksonih A13 in A12, ki nimata promotorske regije, pri eksonu A11 pa transkripcijo preprečuje regija bogata z gvanini in citozini, ki inhibira cepitev DNA verige. Pri eksonu A2 pride do delecije enega nukleotida, zaradi česar je nastali protein nefunkcionalen. S procesom alternativnega izrezovanja intronov lahko nastane dodatnih 9 proteinov, ki namesto eksona 5a vsebujejo novo odkriti ekson 5b. Ti nimajo transferazne aktivnosti ter delujejo kot negativni modulatorji svojih homologov z eksonom 5a. **b)** Izoencim UGT1A1, ki konjugira bilirubin, kodira ekson A1 skupaj s stalnimi eksoni 2, 3, 4 in 5a.

**Figure 1:** The structure of *UGT1A* locus. **a)** The entire gene complex consists of 13 variable exons 1 and 5 common exons. Nine functional enzymes are encoded by a combination of common exons 2, 3, 4 and 5a with one of the variable exons 1 indicated by an arrow. The remaining exons 1 are considered pseudoexons. Exons A13 and A12 are not transcribed because they lack a functional promoter and exon A11 is not transcribed due to a G-C clamp. Exon A2 contains a 1 nucleotide deletion that results in a truncated inactive protein. In addition, 9 enzymatically inactive isoforms can be formed by alternative splicing, containing the newly described exon 5b instead of exon 5a. These isoforms act as negative modulators of their homologs with exon 5a. **b)** Bilirubin conjugating enzyme UGT1A1 is encoded by variable exon A1 and common exons 2, 3, 4 and 5a.

UGT1A10. Pri ostalih štirih tako imenovanih psevdo eksonih 1 ne pride do izražanja gena ali pa nastane neaktiven protein (4, 8, 9).

Kompleksnost družine UGT1A je povečalo nedavno odkritje alternativnega eksona 5b. V različnih humanih tkivih so dokazali prisotnost vseh devetih možnih izoencimov, ki vsebujejo namesto običajnega eksona 5a alternativni ekson 5b. Ti proteini nimajo transferazne aktivnosti. Delujejo kot negativni modulatorji svojih homologov z običajnim eksonom 5a ter na ta način prispevajo k uravnavanju konjugacije (9).



## 3.1.1 Spremembe nukleotidnega zaporedja gena *UGT1A1*

V eksonu A1, njegovi promotorski regiji ter eksonih 2-5 genskega kompleksa, so odkrili že 113 sprememb nukleotidnega zaporedja (4), ki povzročijo različne stopnje nekonjugirane hiperbilirubinemije od GS (30 % aktivnost *UGT1A1*) do Crigler-Najjar-jevega sindroma II (10 % aktivnost *UGT1A1*) in Crigler-Najjar-jevega sindroma I (0 % aktivnost *UGT1A1*) (6). Vrsta in pogostost sprememb se razlikuje med pripadniki različnih etničnih skupin.

Pri Kavkazijcih je GS posledica polimorfizma ponovitev dinukleotida TA v promotorski regiji gena *UGT1A1* v območju TATA. V element  $A(TA)_6TAA$  se vrine dodaten par TA in nastane  $A(TA)_7TAA$ , kar zmanjša vezavo transkripcijskega faktorja IID in s tem posledično zniža ekspresijo *UGT1A1* na 20 do 30 %. Sindrom se deduje avtosomno recesivno, zato med bolnike z GS prištevamo samo homozigote s sedmimi ponovitvami TA (genotip  $TA_{(7/7)}$  ali *UGT1A1\*28/UGT1A1\*28*) (10). Odkrili so tudi posameznike s 5 ali 8 ponovitvami TA, vendar sta ta dva alela pri Kavkazijcih zelo redka (3). Med številom ponovitev TA in aktivnostjo encima obstaja obratno sorazmerje - z naraščanjem števila ponovitev TA aktivnost *UGT1A1* pada (3, 6). Frekvenca genotipa ( $TA_{(7/7)}$ ) je pri Slovencih 13,6 % (3) in se ne razlikuje od frekvenc določenih pri ostalih Kavkazijcih, ki so 11-16 % (8). Iz dejstva, da razen ob dieti z omejenim vnosom kalorij, hiperbilirubinemija ni prisotna pri vseh homozigotih  $TA_{(7/7)}$  sledi, da je homozigotnost potreben, ne pa tudi zadosten pogoj za klinično manifestacijo sindroma. Možni dodatni dejavniki so lahko skrajšana življenjska doba eritrocitov ali zmanjšan privzem BLR v hepatocite (8).

Frekvence  $TA_{(7/7)}$  se razlikujejo med različnimi populacijami in so najvišje pri Afričanih, srednje pri Kavkazijcih in najnižje pri Azijcih (3). Pri azijskih bolnikih z GS so odkrili spremembe v kodirajočem delu gena *UGT1A1*, ki povzročijo zamenjavo aminokislina. Najpogostejše spremembe so: 211G>A (G71R) in 686C>A (P229Q) v eksonu A1 ter 1456T>G (Y486D) v eksonu 5a (8, 11).

## 3.2 Organski anionski prenašalec 1B1 (*SLCO1B1*)

*SLCO1B1* s sinonimi (OATP1B1, LST1, LST-1, OATP2, OATPC, OATP-C, SLC21A6 in MGC133282) je predstavnik družine *SLCO*, ki se izraža izključno na bazolateralni membrani hepatocitov. Protein iz 691 aminokislinskih kodira gen *SLCO1B1*, ki leži na kromosomu 12p12 in je sestavljen iz 15 eksonov. *SLCO1B1* sodeluje pri prenosu številnih endogenih in eksogenih organskih anionov iz krvi v hepatocite (12). Natančen mehanizem prenosa nekonjugiranega BLR v hepatocite še ni poznan, predvideva pa se kombinacija difuzije in prenosa s prenašalci (13). Možno vlogo *SLCO1B1* v patogenezi GS dokazuje raziskava Cui-ja s sodelavci, ki so v *in vitro* pogojih dokazali, da je nekonjugirani BLR substrat za *SLCO1B1* (14), prenos bromosulfoftaleina kot modelne molekule za nekonjugirani BLR s *SLCO1B1* (14, 15), ter zvišane koncentracije nekonjugiranega BLR pri osebah s spremembami nukleotidnega zaporedja gena *SLCO1B1* (13, 16). Nasprotno pa Wang

in sodelavci niso uspeli dokazati prenosa nekonjugiranega BLR s *SLCO1B1* (15).

## 3.2.1 Spremembe nukleotidnega zaporedja gena *SLCO1B1*

V genu *SLCO1B1* so odkrili številne spremembe nukleotidnega zaporedja, ki vplivajo na lokalizacijo ali transportno funkcijo proteina. Podobno kot pri genu *UGT1A1* se tudi tu vrsta in pogostost razlikuje med pripadniki različnih etničnih skupin (17, 18). Pri Kavkazijcih so najpogostejše spremembe: 388A>G (N130D), 411G>A (S137S) in 463C>A (P155T) v eksonu 4, 521T>C (V174A), 571C>T (L191L) in 597C>T (F199F) v eksonu 5 in 1929A>C (L643F) v eksonu 14 (18). Pri posamezniku je lahko sočasno prisotnih več sprememb, ki imajo v kombinaciji lahko drugačne posledice kot bi pričakovali glede na vsako posamezno spremembo. Zato je smiselna korelacija fenotipa s kombinacijo sprememb – haplotipi (17, 18). Vpliv na serumsko koncentracijo BLR so dokazali za polimorfizma 388A>G (N130D) in 521T>C (V174A)<sup>1</sup>. Polimorfizem 388A>G (N130D) se nahaja v drugi ekstracelularni zanki proteina in verjetno vpliva na substratno specifičnost, saj poveča transport bromosulfoftaleina, zmanjša transport tauroholata in ne vpliva na transport 17 $\beta$ -estradiol glukuronida in estron sulfata (19, 20). Polimorfizem 521T>C (V174A) se nahaja v transmembranskem področju proteina in pomembno zniža transport estron sulfata in 17 $\beta$ -estradiol glukuronida (20).

Pri bolnikih z GS je bila dosedaj objavljena le ena študija polimorfizmov gena *SLCO1B1*. Huang in sodelavci so dokazali, da sta polimorfizma 388A>G in 521T>C pomemben dejavnik tveganja za GS pri Tajvancih (21). Ista skupina raziskovalcev je ugotovila, da prisotnost *SLCO1B1\*1b* alela za trikrat poveča tveganje za patološko neonatalno hiperbilirubinemijo pri tajvanskih novorojenčkih (22). Tudi dve manjši študiji na 23 oziroma 42 odraslih azijskega rodu sta potrdili vpliv alela *SLCO1B1\*15* na koncentracije nekonjugiranega BLR. Preiskovanci s kombinacijo haplotipov *SLCO1B1\*15/SLCO1B1\*15* in *SLCO1B1\*15/SLCO1B1\*1b* so imeli višje koncentracije kot ostali (13, 16). V študiji na 155 zdravih Kavkazijcih je bil polimorfizem 521T>C vsaj na enem alelu povezan z 20 % višjimi koncentracijami celotnega serumskega BLR (23).

## 4 Farmakogenetika Gilbertovega sindroma

Poleg BLR so substrati za *UGT1A1* in *SLCO1B1* tudi številne zdravilne učinkovine, ki so predstavljene v preglednici 1. Polimorfizmi v obeh genih, ki so prisotni pri bolnikih z GS lahko vplivajo na farmakokinetični profil zdravilnih učinkovin in s tem na njihove terapevtske ali stranske učinke. Glede na dosedanje raziskave imajo najpomembnejši vpliv na zdravljenje z irinotekanom.

### 4.1 Irinotekan

Irinotekan je inhibitor topoizomerase I, ki se uporablja za zdravljenje kolorektalnega karcinoma in drugih trdnih tumorjev. Predstavlja predzdravilo, ki se pod vplivom karboksilne esteraze pretvori v aktivni

<sup>1</sup> Poimenovanje polimorfizmov gena *SLCO1B1*: alel brez sprememb: *SLCO1B1\*1a*; alel 388G (130D): *SLCO1B1\*1b*; alel 521C (174A): *SLCO1B1\*5*; sočasna prisotnost 388G in 521C: *SLCO1B1\*15*.

**Preglednica 1:** Primeri zdravilnih učinkovin, ki so substrati za UGT1A1 in/ali SLCO1B1.

**Table 1:** Selected drugs that serve as substrates for UGT1A1 and/or SLCO1B1.

Substrati za UGT1A1	Substrati za SLCO1B1	Substrati za UGT1A1 in SLCO1B1
atazanavir (4, 25)	benzilpenicilin (17)	atorvastatin (4, 17)
buprenorfin (4)	feksofenadin (17)	cerivastatin (4, 17)
etinilestradiol (4)	fluvastatin (17)	ezetimib (4, 30)
etopozid (31)	gemfibrozil (29)	indinavir (4, 25, 26)
fulvestrant (4)	metotreksat (17)	irinotekan (sn-38) (4, 24)
ibuprofen (4)	nateglinid (32)	rosuvastatin (17, 33)
ketoprofen (4)	pitavastatin (17)	simvastatin (4, 28)
moksifloksacin (34)	pravastatin (17)	tiroksin (17, 35)
niflumaska kislina (36)	repaglinid (17)	
raloksifen (37)	rifampicin (17)	
tranilast (38)	temokapril (39)	
	valsartan (39)	

metabolit SN-38 s 100-krat višjim antitumorskim učinkom. UGT1A1 katalizira pretvorbo SN-38 v neaktivni SN-38 glukuronid. Ta se izloči z urinom ali žolčem. Irinotekan ima ozek terapevtski interval. Stranski učinki levkopenija, trombocitopenija in diareja se pojavijo pri 29 - 44 % bolnikov in pogosto zahtevajo znižanje odmerka ali ukinitve zdravljenja (4). Znižana aktivnost UGT1A1 vodi do resnejših stranskih učinkov, zato je priporočilo o individualnem doziranju irinotekana glede na genotip polimorfizma ponovitev TA v promotorju gena *UGT1A1* vključeno v navodilo za zdravilo, ki ga je odobrila ameriška agencija za zdravila. SN-38 je tudi substrat za SLCO1B1 in v *in vitro* študiji so dokazali, da je privzem znižan v prisotnosti alela *SLCO1B1\*15*. To je dodaten dejavnik tveganja za pojav stranskih učinkov pri zdravljenju z irinotekanom (24).

## 4.2 Atazanavir in indinavir

Atazanavir in indinavir sta proteazna inhibitorja, ki se uporabljata pri zdravljenju bolnikov s HIV. Zdravilni učinkovini se ne presnavljata z UGT1A1, zaradi kompetitivne inhibicije encima pa povzročita nekonjugirano hiperbilirubinemijo. Ta je prisotna pri približno tretjini bolnikov in je bolj izražena pri bolnikih z GS (4, 25). Indinavir je tudi inhibitor SLCO1B1, kar dodatno prispeva k hiperbilirubinemiji (26).

## 4.3 Pravastatin

Pravastatin je inhibitor reduktaze 3-hidroksi-3-metilglutaril koencima A (HMG-CoA-reduktaze) in se uporablja pri zdravljenju hiperholesterolemije. Med posamezniki so značilne velike razlike v serumskih koncentracijah. Pravastatin se v organizmu ne presnavlja, temveč se pretežno v nespremenjeni obliki izloča z žolčem, v manjši meri pa tudi z urinom. Za privzem v hepatocite je odgovoren SLCO1B1 in v številnih študijah so dokazali, da polimorfizem 521T>C (V174A) sam ali v kombinaciji z drugimi polimorfizmi gena *SLCO1B1* za približno 100 % poviša serumske koncentracije pravastatina. Zvišane serumske koncentracije so povezane z večjim tveganjem za miopatijo

(27, 28), po drugi strani pa zmanjšan privzem v hepatocite, vsaj dologoročno, ne prispeva značilno k zmanjšanemu terapevtskemu učinku. To razlagajo z dejstvom, da ima krivulja odvisnosti učinka od odmerka v območju terapevtskih odmerkov majhen naklon. V kliničnih študijah so namreč dokazali majhne razlike v znižanju holesterola ob uporabi 20 ali 40 mg odmerkov dnevno (27). Poleg pravastatina prenaša SLCO1B1 v hepatocite tudi ostale statine. (Preglednica 1).

Posebna previdnost je potrebna pri zdravljenju s kombinacijo več zdravilnih učinkovin, ki so substrati za SLCO1B1. Zaradi rabdomiolize ob sočasnem jemanju gemfibrozila in cerivastatina je bil slednji umaknjen s tržišča. Gemfibrozil in njegov glukuronid inhibirata privzem cerivastatina v hepatocite s SLCO1B1, kar predstavlja enega od razlogov za zvišanje serumskih koncentracij cerivastatina (29).

## 5 Sklep

GS je blaga, a zelo pogosta motnja v presnovi BLR. Ker so poleg BLR substrati za UGT1A1 in SLCO1B1 tudi številne zdravilne učinkovine, je dokazovanje polimorfizmov povezanih z GS pomembno pri individualizaciji zdravljenja. Vplivi na zdravljenje z nekaterimi zdravilnimi učinkovinami so že dokazani, smiselno pa je proučiti še ostale ter tudi tiste, ki so še v razvoju. Vključitev teh polimorfizmov v diagnostične teste na osnovi tehnologije DNA mikromrež bo omogočila njihovo hitro in enostavno detekcijo ter s tem pripomogla k varnejši in učinkovitejši farmakoterapiji.

## 6 Literatura

- Hirschfield GM, Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. *Ann Clin Biochem* 2006; 43 (Pt 5): 340-343.
- Radu P, Atsmon J. Gilbert's syndrome - clinical and pharmacological implications. *Isr Med Assoc J* 2001; 3 (8): 593-598.
- Ostaneck B, Furlan D, Mavec T, et al. UGT1A1(TA)<sub>n</sub> promoter polymorphism - a new case of a (TA)<sub>8</sub> allele in Caucasians. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38 (2): 78-82.
- Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics* 2008; 9 (6): 703-715.
- Chowdhury JR, Wolkoff AW, Chowdhury NRC, et al. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill: New York, 2001: 2161-2208.
- Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndromes. *Haematologica* 1999; 84 (2): 150-157.
- Persico M, Persico E, Bakker CT, et al. Hepatic uptake of organic anions affects the plasma bilirubin level in subjects with Gilbert's syndrome mutations in UGT1A1. *Hepatology* 2001; 33 (3): 627-632.
- Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 2003; 38 (1): 107-117.
- Girard H, Levesque E, Bellemare J, et al. Genetic diversity at the UGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. *Pharmacogenet Genomics*



- 2007; 17 (12): 1077-1089.
- 10 Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333 (18): 1171-1175.
  - 11 Kamisako T. What is Gilbert's syndrome? Lesson from genetic polymorphisms of UGT1A1 in Gilbert's syndrome from Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 (9): 955-957.
  - 12 Konig J, Cui Y, Nies AT, et al. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278 (1): G156-164.
  - 13 Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, et al. Influence of common variants in the pharmacokinetic genes (OATP-C, UGT1A1, and MRP2) on serum bilirubin levels in healthy subjects. *Hepatol Res* 2004; 30 (2): 91-95.
  - 14 Cui Y, Konig J, Leier I, et al. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 2001; 276 (13): 9626-9630.
  - 15 Wang P, Kim RB, Chowdhury JR, et al. The human organic anion transport protein SLC21A6 is not sufficient for bilirubin transport. *J Biol Chem* 2003; 278 (23): 20695-20699.
  - 16 Zhang W, He YJ, Gan Z, et al. OATP1B1 polymorphism is a major determinant of serum bilirubin level but not associated with rifampicin-mediated bilirubin elevation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34 (12): 1240-1244.
  - 17 Konig J, Seithel A, Gradhand U, et al. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 372 (6): 432-443.
  - 18 Mwinyi J, Kopke K, Schaefer M, et al. Comparison of SLCO1B1 sequence variability among German, Turkish, and African populations. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64 (3): 257-266.
  - 19 Michalski C, Cui Y, Nies AT, et al. A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J Biol Chem* 2002; 277 (45): 43058-43063.
  - 20 Tirona RG, Leake BF, Merino G, et al. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 2001; 276 (38): 35669-35675.
  - 21 Huang CS, Huang MJ, Lin MS, et al. Genetic factors related to unconjugated hyperbilirubinemia amongst adults. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15 (1): 43-50.
  - 22 Huang MJ, Kua KE, Teng HC, et al. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res* 2004; 56 (5): 682-689.
  - 23 van der Deure WM, Friesema EC, de Jong FJ, et al. Organic anion transporter 1B1: an important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism. *Endocrinology* 2008; 149 (9): 4695-4701.
  - 24 Nozawa T, Minami H, Sugiura S, et al. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 2005; 33 (3): 434-439.
  - 25 Rotger M, Taffe P, Bleiber G, et al. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis* 2005; 192 (8): 1381-1386.
  - 26 Campbell SD, de Morais SM, Xu JJ. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chem Biol Interact* 2004; 150 (2): 179-187.
  - 27 Kivisto KT, Niemi M. Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharm Res* 2007; 24 (2): 239-247.
  - 28 Pasanen MK, Miettinen TA, Gylling H, et al. Polymorphism of the hepatic influx transporter organic anion transporting polypeptide 1B1 is associated with increased cholesterol synthesis rate. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18 (10): 921-926.
  - 29 Shitara Y, Hirano M, Sato H, et al. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311 (1): 228-236.
  - 30 Oswald S, Konig J, Lutjohann D, et al. Disposition of ezetimibe is influenced by polymorphisms of the hepatic uptake carrier OATP1B1. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18 (7): 559-568.
  - 31 Watanabe Y, Nakajima M, Ohashi N, et al. Glucuronidation of etoposide in human liver microsomes is specifically catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *Drug Metab Dispos* 2003; 31 (5): 589-595.
  - 32 Zhang W, He YJ, Han CT, et al. Effect of SLCO1B1 genetic polymorphism on the pharmacokinetics of nateglinide. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62 (5): 567-572.
  - 33 Prueksaritanont T, Tang C, Qiu Y, et al. Effects of fibrates on metabolism of statins in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2002; 30 (11): 1280-1287.
  - 34 Tachibana M, Tanaka M, Masubuchi Y, et al. Acyl glucuronidation of fluoroquinolone antibiotics by the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2005; 33 (6): 803-811.
  - 35 Yoder Graber AL, Ramirez J, Innocenti F, et al. UGT1A1\*28 genotype affects the in-vitro glucuronidation of thyroxine in human livers. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17 (8): 619-627.
  - 36 Mano Y, Usui T, Kamimura H. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase responsible for the glucuronidation of niflumic acid in human liver. *Pharm Res* 2006; 23 (7): 1502-1508.
  - 37 Trontelj J, Bogataj M, Marc J, et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 855 (2): 220-227.
  - 38 Danoff TM, Campbell DA, McCarthy LC, et al. A Gilbert's syndrome UGT1A1 variant confers susceptibility to tranilast-induced hyperbilirubinemia. *Pharmacogenomics J* 2004; 4 (1): 49-53.
  - 39 Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, et al. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79 (5): 427-439.

# Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije

## Membranes for *in vitro* dermal absorption studies

Mirjam Gosenca, Mirjana Gašperlin

**Povzetek:** *In vitro* testiranja dermalne absorpcije zdravilnih učinkovin so pomemben del razvoja in vrednotenja dermalnih oz. transdermalnih dostavnih sistemov. Za določanje dermalne absorpcije *in vitro* nujno potrebujemo ustrezno membrano, ki v zadostni meri oponaša barierne lastnosti rožene plasti. V članku so predstavljene različne membrane, ki se uporabljajo: umetne membrane, živalska ter človeška koža in rekonstruirani celični kožni modeli.

**Ključne besede:** dermalna absorpcija, *in vitro* testi, človeška koža, kožne membrane

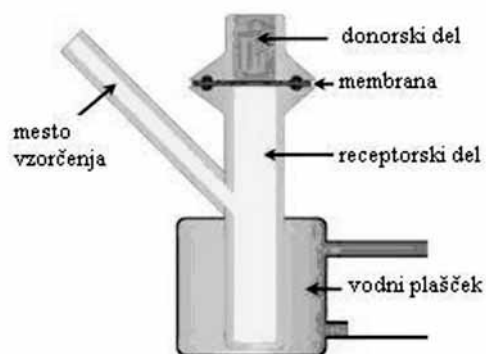
**Abstract:** The assessment of dermal absorption of molecules is one of the main steps in the initial design and later in the evaluation of dermal or transdermal drug delivery systems. Laboratory test systems require a membrane to mimic the barrier function of stratum corneum. The following membranes are discussed: synthetic membranes, animal models, human skin and reconstructed human epidermis.

**Key words:** dermal absorption, *in vitro* tests, human skin, skin membranes

### 1 Uvod

Dostava zdravilnih učinkovin v ali skozi kožo že dolgo ni več novost. Pri zdravljenju kožnih bolezni, ko je potrebno dostaviti zdravilno učinkovino v posamezne plasti kože, govorimo o dermalni dostavi (1). Transdermalna dostava učinkovin, tj. dostava skozi kožo v sistemski krvni obtok, pa predstavlja alternativo peroralnemu ali parenteralnemu dajanju učinkovin (2). Testiranje dermalne absorpcije je bistvenega pomena pri vrednotenju tako dermalnih kot transdermalnih farmacevtskih oblik. Dermalna absorpcija je krovní termin, ki opisuje difuzijo učinkovin skozi kožo. Obsega tri procese: penetracijo, permeacijo in absorpcijo. O penetraciji govorimo, ko učinkovina vstopa v posamezne plasti kože (npr. v roženo plast), permeacija opisuje prehod učinkovine med plastmi, ki so strukturno in funkcionalno različne, medtem ko se absorpcija nanaša na privzem učinkovine v krvni ali limfni sistem (3). Vendar je vrednotenje dermalne absorpcije praktično neizvedljivo *in vivo*, saj so testiranja na ljudeh pogosto etično sporna (npr. v razvojnih fazah, ko nimamo podatkov o toksičnosti učinkovin, pomožnih snoveh), draga in dolgotrajna. Problem je tudi velika inter- in intraindividualna variabilnost hitrosti in obsega absorpcije učinkovin, zaradi česar je razlaga rezultatov izredno zahtevna (4). Zato je pomembno, da imamo zanesljiv in ustrezno zasnovan *in vitro* sistem. Uporabljajo se difuzijske celice, največ statične Franz-ove difuzijske celice (slika 1), kjer je sistem v grobem razdeljen na donorski del, membrano in receptorski del (5). V donorskem delu je učinkovina, raztopljena v določenem pufru ali vgrajena v različne formulacije. Membrano, ki jo pri testiranju dermalnih oz. transdermalnih pripravkov predstavlja koža ali njeni nadomestki, namestimo tako, da je rožena plast obrnjena proti donorskemu delu

celice. Receptorski del je običajno napolnjen s pufrom pH=7,4, kar ustreza fiziološkemu pH, bistvena zahteva pa je zadostna topnost učinkovine v receptorskem mediju. Temperaturo receptorske tekočine lahko vzdržujemo na 32 °C, kar ustreza temperaturi na površini kože, ali pa vzpostavimo temperaturni gradient, tj. 32 °C na površini kože in 37 °C v receptorskem delu. Receptorska tekočina ne sme poškodovati membrane. Iz receptorskega dela v določenih časovnih intervalih jemljemo vzorce in z ustreznimi analiznimi metodami kvantitativno določimo vsebnost učinkovine (6). Rezultate podamo kot kumulativno količino sproščene učinkovine v določenem časovnem intervalu oziroma izračunamo tok učinkovine v stacionarnem stanju, nadaljnja obdelava rezultatov pa je odvisna tudi od tega, ali smo uporabili umetno membrano ali živalsko oz. človeško kožo.



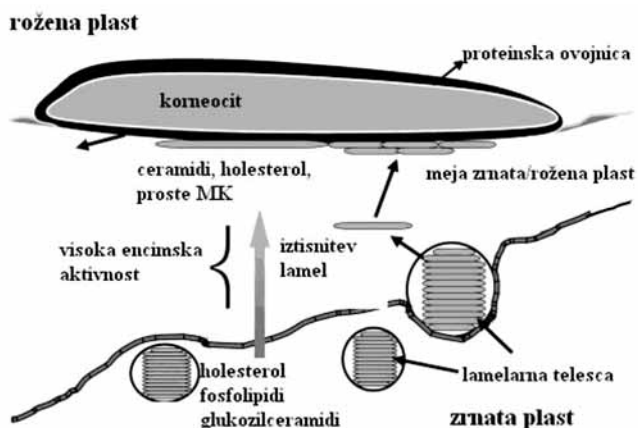
Slika 1: Franz-ova difuzijska celica.

Figure 1: The Franz diffusion cell system.

## 2 Zgradba kože

Koža je sestavljena iz epidermisa, dermisa in podkožja. Epidermis je najbolj zunanji del kože, brez veziva in žil. Je najtanjša plast kože, katere debelina (približno 150  $\mu\text{m}$ ) nekoliko niha na različnih predelih telesa. Sestavlja ga večplasten epitelij, v katerem večino celic predstavljajo keratinociti. Ti so podvrženi procesu diferenciacije, v katerem se proliferativne, nediferencirane celice pretvarjajo v visoko diferencirane celice, ki niso več sposobne delitve. Glede na stopnjo diferenciacije razdelimo epidermis na več plasti, in sicer nastajajo keratinociti v bazalni plasti, dozorevajo v trnasti in zrnati plasti ter odmirajo v roženi plasti, kjer poteka zadnja stopnja diferenciacije keratinocitov, to je sprememba v korneocite. Pod epidermisom leži 3-5 mm debela plast dermisa, kjer je glavno ležišče krvožilnega obtoka. Pod dermisom je podkožje, ki je v večini sestavljeno iz maščevja (7).

Rožena plast s svojo specifično zgradbo predstavlja bariero, zaradi katere je površina kože nepropustna oziroma selektivno propustna za vodo, ione in druge snovi. Rožena plast je najbolj zunanji del epidermisa, debela 10 do 40  $\mu\text{m}$ . Korneociti so obdani z ovojnico prečno premreženih proteinov. Novo nastali proteini, npr. profilagrin, loricin, involucrin, keratini 1 do 10 začnejo nastajati v keratohialinskih zrcnih v zrnati plasti. Profilagrin se pozneje pretvori v filagrin in služi za omreženje keratinskih niti v roženi plasti, ostali pa za učvrstitev ovojnice korneocitov. V trnasti plasti pa se pojavijo nove organele, imenovane lamelarna telesa ali Odlandova telesa, ki so sestavljena predvsem iz polarnih lipidov, razporejenih v obliki izmenjujočih se plasti, in hidrolitičnih encimov. V spodnjih plasteh epidermisa se lipidi sprostitjo v medcelični prostor, encimi pa pretvorijo polarne lipidne prekurzorje v nepolarne lipide in tako začne nastajati z lipidi bogat prostor med korneociti (slika 2). Holesterol, ceramidi in maščobne kisline so glavni gradniki intercelulernih lamel, ki so vzporedne s površino korneocitov. Medtem ko so ceramidi ključni za organizacijo lipidov, cholesterol olajša medsebojno strukturiranje različnih lipidov. Lipidi v roženi plasti tvorijo dve kristalinični lamelarni fazi, ki se ponavljata na 6,4 nm (short periodicity phase: SPP) oziroma 13,4 nm (long periodicity phase: LPP), manjši del lipidov pa tvori tekočo lipidno fazo. *In vivo* je struktura lipidov v ravnatežu med trdnim kristaliničnim (ortorombska ureditev) in gelskim ali tekoče kristalnim (heksagonalna ureditev) stanjem.



Slika 2: Sproščanje in pretvorba lipidov iz lamelarnih telesc (10)  
Figure 2: The lamellar extrusion process (10)

Ortorombska ureditev lipidov je najbolj gosto urejena konformacija in izkazuje najboljše barierne lastnosti (8, 9, 10). Vrsta in količina lipidov se razlikuje glede na anatomsko področje telesa.

## 3 Membrane za testiranje dermalne absorpcije

Za membrane, ki se uporabljajo za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije, je zlasti pomembno, da oponašajo barierno funkcijo kože. Delimo jih na umetne in naravne. Med umetne prištevamo polimerne in filtrske membrane ter membrane, prevlečene z mešanico lipidov, med naravne membrane pa živalske kože in rekonstruirane celične kožne modele.

### Testiranje membranske integritete

Za vzorce biološkega tkiva je potrebno dokazati, da imajo ustrezno integriteto. Metode izolacije in priprave podvržejo tkivo tako fizikalnim kot kemijskim dejavnikom, ki ga lahko poškodujejo. Poškodbe zaradi ločitve plasti ali čiščenja so največkrat prikrite in jih ne zaznamo niti z mikroskopom. Prav tako pri bolezensko prizadeti koži, čeprav je v postopku ločitve plasti ne poškodujemo, zaznamo izrazito povečan tok učinkovine v receptorsko komoro, zaradi česar jo moramo izločiti iz eksperimenta. Čiščenje ali nepazljiva dehidracija lahko tudi umetnim membranam zmanjšata njihovo barierno funkcijo. Vendar v tem primeru zadostuje pregled površine s svetlobnim ali elektronskim mikroskopom, medtem ko so poškodbe bioloških tkiv navadno komaj zaznavne, zato je potrebna bolj občutljiva oz. zanesljiva metoda za oceno njihove integritete. Merimo lahko električno upornost ali primerjamo permeabilnostni koeficient modelne spojine s standardnimi vrednostmi za določeno membrano. Kot modelna spojina je zelo primerna voda, saj membrane ne poškoduje, zato lahko slednjo uporabimo za nadaljnja testiranja. Veliko raziskovalcev uporablja tritiarno ( $\text{T}_2\text{O}$ ) ali delno tritiarno vodo (HTO). Tritij je radioaktivni izotop vodika, posledično je potrebna ustrezna metoda detekcije v receptorski fazi. Voda, ki jo naneseemo, je v ravnatežu z vezano in prosto vodo v celičnih plasteh in hitro prehaja površinske plasti kože. Pri tem ne pride do nasičenja vezavnih mest v roženi plasti ali ostalih plasteh epidermisa, zato se izplavlja iz kože. Molekule, ki ostanejo v membrani, so v ravnatežu z fiziološko prisotno vodo in ne vplivajo na barierno funkcijo, povečani difuziji zaradi hidratacije kože pa se izognemo z ustrezno metodo nadaljnega dela (4).

### 3.1 Umetne membrane

Umetne membrane se v difuzijskih celicah uporabljajo predvsem za proučevanje vpliva različnih nosilnih sistemov na sproščanje učinkovine. To so največkrat polimerne membrane, ki so komercialno dostopne, enotne sestave znotraj serij, stabilne, delo z njimi pa je relativno preprosto. Kljub obsežni uporabi umetnih membran, ki oponašajo človeško kožo, transport skozi membrano ne velja kot ekvivalenten model dermalne absorpcije. Umetna membrana največkrat ne predstavlja difuzijske bariere, temveč zgolj fizično, ki ločuje preiskovan nosilni sistem od receptorskega medija.

Barierne lastnosti porozne membrane so odvisne od sposobnosti učinkovine, da vstopa in difundira skozi pore, kar je povezana z njeno molekularno maso, obliko in elektrostatskimi interakcijami z membrano. Nasprotno, neporozna membrana predstavlja večji upor za difuzijo, s



čimer bolje oponaša biološko tkivo. Barierne lastnosti so v tem primeru povezane s topnostjo učinkovine v polimernem ogrodju (porazdelitveni koeficient med vehiklom in membrano) ter sposobnostjo difuzije skozi polimer (4).

### 3.1.1 Filtrske membrane

Filtrske membrane se manj uporabljajo, saj ne predstavljajo bistvene bariere za difuzijo (11). Celulozne membrane navadno vsebujejo veliko mehčal ter konzervansov, ki lahko vplivajo na difuzijo učinkovin ali prehajajo v receptorsko tekočino in motijo detekcijo. Ker gre večinoma za vodotopne spojine, jih odstranimo tako, da membrano namakamo ali prevremo v vodi. V primerjavi s človeško kožo je absorpcija skozi celulozno membrano večja, in to ne glede na lastnosti molekule. Z modifikacijami molekule celuloze lahko vplivamo na lipofilne oz. hidrofilne lastnosti membrane. Za difuzijo hidrofilnih molekul se uporabljajo hidrofilne membrane, kot recimo membrane iz celuloznih estrov (celulozni acetat, nitrati) ali regenerirane celuloze. Membrana iz regenerirane celuloze je v nasprotju z membranami iz celuloznih estrov kemijsko in mehansko odpornejša, kompatibilna z vodnimi in organskimi topili, lahko jo uporabljamo v širokem pH območju.

### 3.1.2 Polimerne membrane

Difuzija molekul skozi umetno polimerno membrano je v mnogočem analogna difuziji skozi tekoče lipidno ogrodje. Hitrost prehoda skozi membrano je odvisna od tega, kako hitro se tvori ustrezno velik prazen prostor za prehod molekule. Večja kot je, več polimernih enot se mora preurediti. Pri tem sta najpomembnejša parametra mobilnost oziroma togost polimernih verig in topnost molekule v ogrodju, ki vpliva na porazdelitveni koeficient. V kristaliničnih področjih znotraj ogrodja je stopnja difuzije nižja, hkrati pa lahko tudi receptorska tekočina vpliva na rotacijo ali iztegnjenost polimernih segmentov in posledično permeabilnost membrane (4).

Za *in vitro* testiranja se pogosto uporabljajo silikonske membrane. Le-te so relativno inertne, neporozne in zaradi lipofilne narave idealne za testiranje lipofilnih učinkovin. Dodatek polnil, kot je silicijev dioksid, poveča mehansko odpornost in barierno funkcijo teh membran (4). Za testiranje je primerna tudi Carbosil membrana, ki je kemijsko blok kopolimer polidimetilsiloksana-polikarbonata (PDMS-PC). Dobro oponaša strukturo človeškega epidermisa, saj ima v svoji strukturi prav tako območja različnih polarnosti in faz, na katera lahko vplivamo s sestavo PDMS-PC polimera. Najprej poteče porazdeljevanje med bolj polarno PC in nepolarno PDMS domeno, ki ji sledi difuzija skozi mnogo bolj propustno PDMS ogrodje. Raziskave kažejo, da je korelacija dermalne absorpcije med človeško kožo in Carbosil membrano zelo dobra za vrsto učinkovin z zelo različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, strukturo in delovanjem (12).

### 3.1.3 Membrane, prevlečene z lipidno mešanico

Na porozen substrat kot je polikarbonatni filter z ustrezno metodo (npr. airbrush technique) razpršimo lipidno mešanico. Pri optimalnem razmerju med holesterolom, prostimi maščobnimi kislinami in ceramidi, se lipidi organizirajo podobno kot v roženi plasti. Tako se tvorijo izmenjujoči lamelarni fazi ter kristalinična področja, ki so vzporedna glede na osnovni substrat. Hkrati je nujno, da so lipidi enakomerno nanešeni na površino substrata, brez razpok ali luknjic (8).

## 3.2 Živalska koža

Zaradi omejenih virov in etičnih omejitev se za *in vitro* testiranja človeška koža nadomešča z živalsko, vendar so rezultati zaradi različne strukture kože težko primerljivi. Zaradi razlik v debelini kože, gostoti lasnih foliklov ter žlez, predvsem pa različne sestave lipidov v koži, prihaja tudi do razlik med posameznimi živalskimi vrstami ter glede na mesto odvzema kože. Pri tem je potrebno omeniti, da je živalska koža bolj dostopna kot človeška, zato lahko optimiziramo tako mesto odvzema in starost kot spol živali ter posledično zmanjšamo variabilnost rezultatov. Testiranja se izvajajo na različnih živalskih kožnih modelih, in sicer na opicah, prašičih, zajcih, miših, podganah in kačah, kakor tudi na živalih brez dlake (predvsem miših in morskih prašičkih). Pri večini živali je namreč koža pokrita z dlako ali krznom, kar je bistvena razlika glede na človeško kožo. Ugotovili so, da je s človeško kožo najbolj primerljiva prašičja in opičja. Velja pa splošno pravilo, da je dermalna absorpcija skozi živalsko kožo večja (13). Metode odvzema ter razslojevanja kože so podobne kot v primeru človeške kože, seveda z določenimi modifikacijami.

### 3.2.1 Prašičja koža

Prašičja koža se veliko uporablja, saj je tako morfološko kot v sestavi lipidov zelo podobna človeški. Na prašičjem uhlju so debelina rožene plasti (21-26  $\mu\text{m}$ ) in epidermisa (66-72  $\mu\text{m}$ ), pa tudi število dlak (20 dlak na  $\text{cm}^2$ ) in struktura kožnih izvodil približno enaka kot pri človeku, le da je premer lasnih foliklov pri prašiču približno enkrat večji. Podobna je tudi struktura kolagenskih vlaken in žilnega spleta v dermisu ter vsebnost glikosfingolipidov in ceramidov v roženi plasti (14).

### 3.2.2 Koža glodavcev

Veliko se uporablja tudi koža glodavcev, npr. miši in podgan. Prednosti uporabe glodavcev so predvsem praktične in ekonomske narave, saj gre za majhne živali, zato je delo z njimi oz. njihova oskrba relativno nezahtevna in poceni. Rezultati testiranja so sicer manj primerljivi s človeško kožo kot pri uporabi prašičje kože, vendar pri slednji pogosto naletimo na praktičen problem, saj so prašičji uhlji iz klavnice večinoma toplotno obdelani in kot taki neuporabni za testiranje dermalne absorpcije. Med glodavci je najustreznejši model podgana, pri kateri je obseg absorpcije do največ 3-krat večji kot pri človeški koži, v kolikor uporabimo celotno debelino kože.

### 3.2.3 Kačja koža

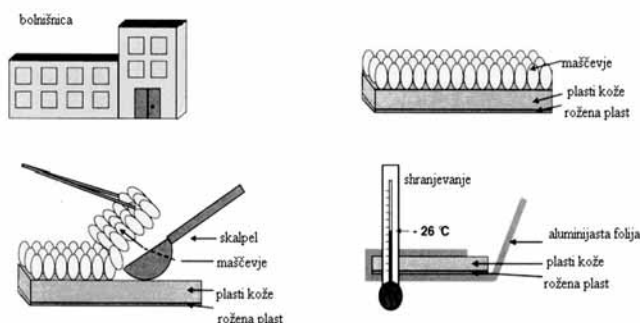
Za vrsto ZU je absorpcija skozi kačjo kožo primerljiva z človeško. Z DSC in IR meritvami so dokazali podobnosti v strukturi in sestavi rožene plasti pri kačah, prašičih in ljudeh. Pri testiranju uporabljamo ovojnico, ki jo kača odvrže pri levitvi. Le-te ni potrebno kemično ali toplotno obdelati, saj je ovojnica kot velik, nepoškodovan list, iz katerega dobimo več vzorcev hkrati. Ker se kača levi periodično, imamo več membran od iste živali in se tako izognemo interindividualni variabilnosti. Ovojnica tudi ni živo tkivo, zato jo lahko shranjujemo pri sobni temperaturi skozi daljše časovno obdobje. Glavna slabost je pomanjkanje foliklov, zato ne zaznamo transfolikularne poti prehoda (4).

Dermalno absorpcijo so testirali tudi na vrsti ostalih živalskih membran. Zajčja koža velja za najbolj propustno med običajno uporabljenimi laboratorijskimi živalmi, zaradi česar je dober model za testiranje iritacije. Za kožo opic je dokazana zelo dobra korelacija, vendar je uporaba primatov v eksperimentalne namene prepovedana. Kot model

za testiranje dermalne absorpcije se prav tako uporablja perfundirano vime krav, pogosto tudi za proučevanje metabolizma učinkovin v koži, seveda pod ustreznimi eksperimentalnimi pogoji (15).

### 3.3 Človeška koža

Za določitev dermalne absorpcije je najbolj primerna membrana človeška koža. Največkrat se uporablja koža, ki jo odstranijo pri plastičnih operacijah ali amputacijah. Rožena plast, ki predstavlja bariero za večino učinkovin, je sestavljena iz odmrlih celic, tako da lahko uporabimo tudi kožo trupel, namenjenih za medicinske raziskave ali po obdukcijah. Debelina rožene plasti in gostota kožnih izvodil se razlikujeta glede na anatomsko mesto, posledično tudi dermalna absorpcija (16). Razlike so prav tako posledica starosti, spola, rase in splošnega zdravja darovalca. Vsekakor moramo biti pozorni tudi na pogoje in čas shranjevanja (12). Največkrat se uporablja koža iz predela trebuha, hrbta ali dojke. Koži najprej odstranimo podkožno maščobo, nato jo zamrznemo v tesno zaprtih plastičnih vrečkah pri temperaturi -20 °C do -30 °C (slika 3). Tako shranjena koža obdrži prvotne barierne lastnosti nekaj mesecev, izogniti pa se moramo ponavljajočemu odtaljevanju in zmrzovanju. Posebno pozornost zahteva priprava vzorcev kože pred eksperimentom. Rezultati se namreč razlikujejo glede na to, katere plasti kože uporabimo pri testiranju ter kako izvedemo razslojevanje.



Slika 3: Postopek priprave in shranjevanja človeške kože.  
Figure 3: Preparation and storage of human skin.

#### 3.3.1 Celotna debelina kože

Celotna debelina kože pomeni epidermis in dermis. Postopek priprave ni zahteven, le spodaj ležeče maščobno tkivo odstranimo s skalpelom. Z dermatomom (kirurški instrument za odzemanje tankih rezin kože) nato odrežemo rezino zelene debeline, navadno 430  $\mu\text{m}$ , in pri tem pazimo, da ne poškodujemo rožene plasti. Sicer režemo skozi lasne folikle, vendar se nastale luknjice zaprejo zaradi nabrekanja tkiva v vodni raztopini. V pogojih *in vivo* učinkovine ne prehajajo skozi dermis, temveč v njem vstopijo v krvožilni obtok, medtem ko pri *in vitro* pogojih hidrofilno področje dermisa brez krvnega pretoka predstavlja še dodatno, umetno nastalo bariero za difuzijo lipofilnih učinkovin. Zato je pri zmerno do zelo lipofilnih učinkovinah problem dolg čas zakasnitve zaznavanja učinkovine v receptorski tekočini, saj se zadržujejo v spodnjih plasteh kože, pa tudi možnost mikrobiološke kontaminacije je večja. Iz tega razloga pri *in vitro* študijah pogosto uporabljamo posamezne plasti kože. S tem ko uporabimo tanjše rezine kože, se zmanjša čas prehoda, s tem pa tudi možnost mikrobiološke kontaminacije (6).

#### 3.3.2 Epidermis

Zaradi omenjenih problemov pri porazdeljevanju lipofilnih učinkovin se lahko uporablja samo epidermis (16). Z dermatomom odrežemo rezine kože debeline 200  $\mu\text{m}$ , kar je približna debelina epidermisa. Epidermis lahko ločimo od spodaj ležeče plasti tudi s segrevanjem pri 60 °C 30–120 sekund brez vpliva na barierno funkcijo kože. Prav tako je možna kemijska odstranitev s pomočjo baz ali kislin, ki pa lahko vplivajo na pufrsko kapaciteto ter integriteto kože, kar vpliva zlasti na prehod ioniziranih učinkovin.

#### 3.3.3 Rožena plast

Lahko uporabimo tudi roženo plast, saj *in vivo* predstavlja glavno bariero za prehod učinkovin. S proteolitičnimi encimi razgradimo živi del epidermisa, navadno uporabimo raztopino tripsina v pufru s pH 7,4. Vanjo lahko potopimo kožo z vsemi plastmi ali pa predhodno toplotno ločen epidermis za 24 ur pri 37 °C položimo na filter papir, prepojen z proteolitičnimi encimi. Vendar pri tem postopku lahko pride do razgradnje ogradnih proteinov ter sprememb biokemijske sestave rožene plasti.

#### 3.3.4 Dermis

Za poškodovano ali bolezensko spremenjeno kožo je značilna okrnjena barierna funkcija. Te pogoje posnemamo s testiranjem na dermisu. Slabšo barierno funkcijo potrdimo z meritvami, kjer zaznamo povečano transepidermalno izgubo vode in spremembo električne upornosti kože. Dermis odrežemo z dermatomom, uporabimo pa lahko tudi kožo, ki smo ji z adhezivnim filmom odstranili roženo plast. Toplotno razslojevanje epidermisa pri 60 °C ali odstranitev rožene plasti s tripsinom nista primerni tehniki, saj pride do precipitacije in razgradnje dermalnih proteinov.

### 3.4 Rekonstruirani celični kožni modeli

Rekonstruirani celični kožni modeli so sestavljeni iz epidermalnih celic na naravni ali umetni podlagi ter posnemajo fiziološke lastnosti epidermisa in/ali dermisa, dveh bistvenih plasti kože. V postopku priprave odzvememo vzorce kože, izoliramo keratinocite in jih nasadimo na površino kolagenske podlage, ki jo s spodnjim delom potopimo v medij za rast celic. Medij nato odstranimo s površine celic, tako da so le-te v stiku z zrakom, in na ta način omogočimo razvoj rožene plasti. Opisani modeli se uporabljajo za testiranje fototoksičnosti, korozije in iritacije kože, kakor tudi dermalne absorpcije. Dokazano je, da so podobni izvornemu človeškemu tkivu tako po zgradbi in sestavi lipidov kot tudi biokemijskih markerjih. Biokemijski markerji so proteini, ki so značilni za določeno stopnjo diferenciacije celic, mednje uvrščamo tako prekurzorje kot encime (proteaze), potrebne za njihov nastanek. V idealnem primeru naj bi bili v modelu prisotni v isti količini kot v sami koži.

Navadno ima vsak proizvajalec na trgu oba modela, tako za testiranje iritacije kot tudi dermalne absorpcije, v nadaljevanju so opisani slednji (17).

#### 3.4.1 SkinEthic®

SkinEthic® je model kože s keratinociti na inertnem polikarbonatnem filtru (18). Struktura modela je zelo podobna človeškemu epidermisu. Prisotne so vse glavne vrste ceramidov kakor njihovi prekurzorji,

glukozilceramidi, le da ima model nekoliko višjo vsebnost ceramidov. Človeški epidermis ima konstantno debelino, tako da je razmerje ceramidov, ki se nahajajo v roženi plasti, in fosfolipidov v epidermisu, konstantno. Pri SkinEthic® modelu ne pride do luščenja kože, zato postaja rožena plast s časom vedno debelejša, posledično je delež fosfolipidov nižji, delež ceramidov pa narašča. Celostno gledano je sestava lipidov primerljiva s človeško kožo. Prisotnih je tudi večina biokemijskih markerjev kot so keratin, lorcin, involukrin ter transglutaminaze (19).

### 3.4.2 EpiSkin®

Kožni nadomestek EpiSkin® je na razpolago v plošči z dvanajstimi vdolbinami. Keratinocite gojijo dvajset dni, tako da nastane plast diferenciranega epidermisa, ki ga nato prenesejo na kolagensko podlago. Model ima vse plasti, ki tudi sicer sestavljajo epidermis. V primerjavi s slednjim ima rožena plast bistveno večje število celičnih plasti in je debelejša. V živem delu epidermisa so prisotne vse celice, vendar so drugačnih oblik in nekoliko drugače organizirane. Tudi glavni razredi lipidov so prisotni, čeprav kvantitativna vsebnost ni vedno primerljiva s človeškim tkivom, opazne so tudi razlike med posameznimi serijami. Zlasti izstopa 20% višja vsebnost di-/trigliceridov. Povišana sinteza trigliceridov in njihovo zadrževanje med celicami rožene plasti je v živem tkivu sicer posledica hiperproliferacije (pri boleznih kot sta atopični dermatitis, psoriaza...) in zmanjšane barierne funkcije. Vendar pa so dokazali, da je transport učinkovin bolj odvisen od skupne količine lipidov kot od posamezne skupine lipidov, zato povišana vsebnost di-/trigliceridov ne vpliva bistveno na absorpcijo.

### 3.4.3 EpiDerm®

EpiDerm® model sestavljajo človeški keratinociti, ki jih gojijo toliko časa, da nastane večplasten in zelo diferenciran model človeškega epidermisa. Osnovna morfologija modela je primerljiva s človeškim epidermisom. Prisotni so vsi sloji, ima 6 do 8 plasti živih celic, kar znaša 28-43 µm epidermalne debeline. Sestava in količina lipidov sta primerljivi s človeškim tkivom.

Za našete modele najdemo veliko podatkov v literaturi in so po določenih kriterijih zelo dobri nadomestki za človeško kožo. Pri testiranju dermalne absorpcije dobimo primerljive rezultate med temi modeli, medtem ko je za človeško kožo značilna velika variabilnost. Največja omejitev pri uporabi modelov je še vedno slaba barierna funkcija, ki je verjetno posledica motenj pri luščenju (deskvamaciji) ter mikroskopsko majhnih predelov, kjer se ne tvorijo keratinociti. Opisani modeli oponašajo le človeški epidermis, so pa na trgu tudi celični modeli kože z vsemi plastmi, npr. EpiDermFT® (20). Vendar raziskave, ki bi objektivno ocenile primernost slednjih za testiranje dermalne absorpcije, še niso bile narejene, problem je tudi visoka cena. Ne glede na določene omejitve pa našeti modeli predstavljajo velik napredek v zadnjih letih pri proučevanju dermalne absorpcije.

## 4 Zaključek

Kljub široki izbiri membran, ki se razlikujejo tako po izvoru kot lastnostih, ostaja dejstvo, da se nismo sposobni približati rezultatom, ki jih dobimo pri testiranju na človeški koži. Največji problem je slabša barierna funkcija le-teh v primerjavi s človeško kožo. Vendar pa se tehnologija

izdelave umetnih membran konstantno izpopolnjuje, prav tako se veliko dela na izboljšanju in razvoju novih rekonstruiranih celičnih kožnih modelov. Oboji so zanimivi tako za farmacevtsko kot kozmetično industrijo, razvoj pa torej tudi na področju *in vitro* testiranja dermalne absorpcije teži k temu, da se živalske modele v celoti nadomesti z alternativnimi *in vitro* metodami (4, 21).

## 5 Literatura

1. Jurkovič P, Gašperlin M. Mikroemulzije za dermalno dostavo učinkovin. Farm Vestn 2004; 55: 565-571.
2. Gašperlin M. Transdermalna dostava zdravilnih učinkovin. Farm Vestn 2006; 57: 100-105.
3. The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 6<sup>th</sup> Revision.
4. Haigh MJ, Smith WE. The selection and use of natural synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. Eur. J. Pharm. Sci. 1994; 311-330.
5. European IP – Galenous Course 16/09/07-02/10/07 SKIN BARRIER FUNCTION "Cutaneous absorption and environmental factors" Claude Bernard University, Lyon France.
6. CellCourse 2008, Saarland University, Saarbruecken, Germany.
7. Jurkovič P. Proučevanje vpliva izbranih mikroemulzij na učinkovitost derivatov vitamina C v koži. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2003.
8. De Jager M, Groenink W, Van der Spek J, Janmaat C, Gooris G, Ponc M, Bouwstra J. Preparation and characterization of a stratum corneum substitute for *in vitro* percutaneous penetration studies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 2006; 1758(5): 636-644.
9. Kristl J, Gašperlin M, Jeras M. Izbrane vsebine iz kozmetologije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005; 3-16.
10. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Progress in Lipid Research 2003; 42(1): 1-36.
11. De Meere ALJ, Tomlinson E. Physicochemical description of the absorption rate of a solute between water and 2,2,4-trimethylpentane. Int J Pharm 1984; 22: 177-196.
12. Feldestein MM, Raigorodskii IM, Lordanski AL, Hadgraft J. Modeling of percutaneous drug transport *in vitro* using skin-imitating Carbosil membrane. J Control Rel 1998; 52(1-2): 25-40.
13. Poet TS, McDougal JN. Skin absorption and human skin assessment. Chemico-Biological Interactions 2002; 140(1): 19-34.
14. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery. Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. Advanced Drug Delivery Reviews 2007; 59(11): 1152-1161.
15. Kietzmann M, Loescher W, Arens D, Maass P, Lubach D. The isolated perfused bovine udder as an *in vitro* model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 30(2): 75-84.
16. Sartorelli P, Andersen HR, Angerer J, Corish J, Drexler H, Göen T, Griffin P, Hotchkiss SAM, Laresse F, Montomoli L, Perkins M, van de Sandt J, Williams F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. Environmental Toxicology and Pharmacology 2000; 8(2): 133-152.



17. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, corrosivity, and substance transport. Eur J Pharm and Biopharm 2005; 60(2): 167-178.
18. <http://www.skinethic.com>
19. Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. Int J Pharm 2001; 215(1-2): 51-56.
20. <http://www.mattek.com>
21. Barbotteau Y, Gontier E, Barberet P, Cappadoro M, De Wever B, Habchi C, Incerti S, Mavon A, Moretto P, Pouthier T, Smith RW, Ynsa MD. Reconstructed human epidermis: A model to study the barrier function. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Sectin B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2005; 231(1-4): 286-291.

## Klinična prehrana Parenteralna prehrana

**KABIVEN/ STRUCTOKABIVEN**  
-triprekatna vreča  
-popolna parenteralna prehrana

**SMOF LIPID**  
4 vrste maščob v eni vreči!

**OMEGAVEN**  
omega 3 maščobne kisline

**DIPEPTIVEN**  
glutamin v obliki dipeptida za  
intravensko infundiranje

## Fresenius Kabi Enteralna prehrana

**FRESUBIN ENERGY**  
1,5kcal/ml

**FRESUBIN PROTEIN ENERGY**  
1,5kcal/ml, 10g beljakovin na 100ml!

**SUPPORTAN**  
1,5kcal/ml, 0,5g EPA na 100m  
\*za ONKOLOŠKE bolnike\*

**GLUTAMIN PLUS**  
10g glutamina na vrečko!  
\*prašek za pripravo napitka\*

# Emulzije, stabilizirane s trdnimi delci - Pickering emulzije

## Emulsions stabilized by solid particles - Pickering emulsions

Karmen Teskač, Mirjana Gašperlin

**Povzetek:** Emulzije, stabilizirane s trdnimi delci, Pickering emulzije, postajajo v zadnjih letih raziskovalno izredno zanimive. Vse bolj se dopolnjuje znanje o umeščanju delcev na medfazo, predvsem pa se iščejo povezave med površinskimi značilnostmi delcev in tipom ter stabilnostjo nastale emulzije. Težnja delcev, da se raje porazdeljujejo v oljni ali vodni fazi, opišemo z močljivostjo, ki je opredeljena s stičnim kotom. Številne lastnosti Pickering emulzij lahko pripišemo visoki prosti energiji adsorpcije delca na medfazo. Tako je delec skorajda ireverzibilno umeščen na medfazi, kar prispeva k učinkoviti stabilizaciji emulzije. Slednje pa je odraz še nekaterih drugih dejavnikov, kot so: koncentracija, velikost in površinske lastnosti delcev, interakcije med delci, vrsta oljne faze, itd. Primerne interakcije oljne in vodne faze ter delcev omogočajo izdelavo najrazličnejših materialov, kjer so nastali emulzijski sistemi medprocesni ali končni izdelki. Uporabnost teh je doseganje boljšega nadzora nad stabilnostjo in odzivnostjo emulzij, kar zagotovo odpira nove možnosti farmacevtsko uporabnim odkritjem.

**Ključne besede:** emulzije, Pickering emulzije, trdni delci, mehanizem stabilizacije

**Abstract:** The use of solid – stabilized emulsions, Pickering emulsions, is a source of growing interest over the last few years. The overall knowledge about particles at interfaces, focused mostly toward the link between the interfacial properties and the emulsion type and stability, is progressing. The water - or oil – linking tendency of a spherical particle can be described in terms of its wettability via contact angle. Many of the emulsion properties can be attributed to the very large free energy of particle adsorption at the interface. Thus the particles are almost irreversible held at the interface what leads to extreme emulsion stability. There are also some additional factors influencing emulsion stability: concentration, size and surface characteristics of particles, interparticles interactions, oil type, etc. However, the appropriate association of oil, water and particles allows a large set of materials to be obtained, where emulsion systems are used either as intermediate or end products. These applications offered to achieve better stability and response control thus new developments are to be expected also in pharmaceutical field.

**Key words:** emulsions, Pickering emulsions, solid particles, stabilization mechanism

## 1 Uvod

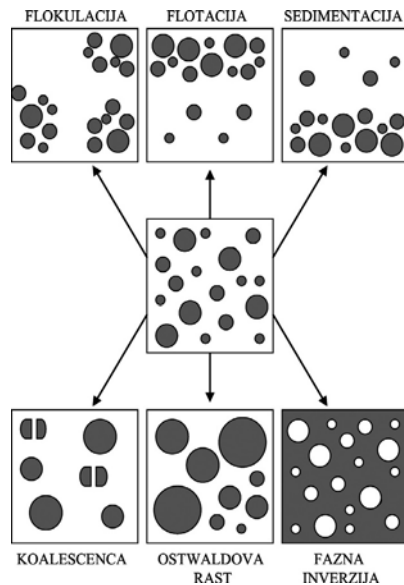
Emulzije so heterogeni pripravki, sestavljeni iz dveh nemešajočih se tekočin (vodna faza (V) in oljna faza (O)), od katerih je ena kot notranja faza enakomerno dispergirana v obliki majhnih kapljic, velikosti 0,1  $\mu\text{m}$  – 50,0  $\mu\text{m}$ , po celotnem volumnu druge tekočine (zunanja faza). Glede na lokacijo oljne in vodne faze ločimo dve vrsti emulzij. Tako je v primeru emulzije tipa O/V oljna faza notranja, medtem ko za emulzijo tipa V/O velja obratno, torej je notranja vodna faza (1). Zaradi nezdružljivosti faz je za stabilizacijo sistema potreben dodatek tretje komponente, t.i. emulgatorja, ki tvori medfazni film in tako igra vlogo »povezovalca« tekočin. Na takšen način emulgator prepreči nekatere oblike nestabilnosti emulzij, kot so koalescenca, flokulacija, Ostwaldova rast, fazna inverzija, flotacija in sedimentacija (Slika 1) (2). Največkrat se uporabljajo 'klasični' molekularni emulgatorji (npr. derivati sorbitola,...) ter tudi določene vrste polimerov in večji proteini (npr. albumin). Vse bolj aktualno področje stabilizacije emulzijskih

sistemov pa postaja uporaba tako anorganskih kot tudi organskih koloidnih delcev (2).

## 2 Trdni koloidni delci kot stabilizatorji

Povečanje oz. izboljšanje stabilnosti emulzijskih sistemov ob prisotnosti majhnih, posamičnih delcev je znano že iz prejšnjega stoletja. Glavne zasluge tega dognanja gre pripisati Pickeringu, po katerem so emulzije, stabilizirane s trdnimi delci tudi poimenovane: **Pickering emulzije** (3). Pickering je leta 1907 na osnovi Ramsden-ovega dela izpred štirih let (1903) (4) ugotovil, da je stabilizacija emulzije tipa O/V uspešnejša s hidrofilnejšimi delci, in nasprotno so za stabilizacijo emulzij V/O učinkovitejši hidrofobnejši delci (5).

Velika prednost uporabe trdnih delcev kot stabilizatorjev je odsotnost ali manjša vsebnost površinsko aktivnih snovi, saj le-te zamenjamo s



**Slika 1:** Shematični prikaz oblik emulzijske nestabilnosti. Flokulacija vodi v nastanek skupkov, kjer so kapljice še vedno ločene, saj je medfazni film nepoškodovan. Posledici gravitacije oz. razlik v gostoti oljne in vodne faze sta flotacija (nabiranje oljne faze na površju O/V emulzije) in sedimentacija (usedanje vodne faze na dno V/O emulzije). Koalescenca je ireverzibilno združevanje kapljic zaradi poškodovanega medfaznega filma. Ostwaldova rast je proces nastajanja večjih kapljic zaradi difuzije dispergirane (notranje) faze, kar vodi v rast večjih kapljic na račun manjših. Najrazličnejši dejavniki pa lahko vodijo v inverzijo faz.

**Figure 1:** Schematic representation of various emulsion instabilities: flocculation, where the drops with undamaged interface form clumps; flotation (collecting of oil phase on the surface of O/W emulsion) and sedimentation (sinking of the aqueous phase on the bottom of W/O emulsion) as consequences of gravity or phase-density differences; coalescence, where drops with damaged interface are irreversibly pooled; Ostwald ripening, where larger drops from smaller are formed due to diffusion of inner phase; and phase inversion as results of different factors.

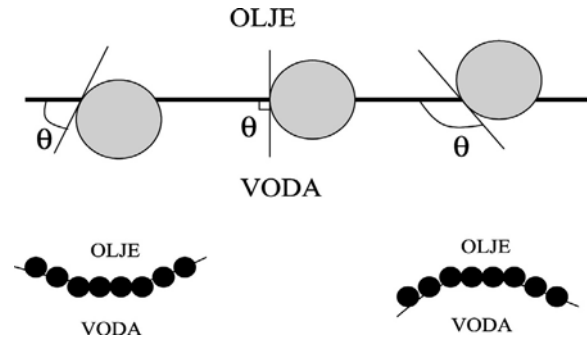
sestavlinami, s katerimi so neugodni biološki odzivi malo verjetni. V določenih primerih se lahko popolnoma izognemo sinteznim emulgatorjem, kar je zagotovo razlog povečanemu zanimanju za uporabo trdnih delcev kot stabilizatorjev tako na področju kozmetike kot tudi farmacije (6). Navsezadnje velja omeniti še vsakdanja primera Pickering emulzij, to sta sladoled in stepena smetana. Prvi je stabiliziran s kristalčki ledu, v drugem primeru pa so prisotni delci trdne maščobe (3).

## 2.a Energijski vidik adsorpcije delcev na medfazo

### Stični kot

Stični kot adsorbiranega delca na medfazni površini ( $\theta_{ov}$ ) je kot med tangento na trdno - vodni površini in tangento na oljno - vodni površini,

in sicer v točki, kjer se srečajo vse tri faze (Slika 2) (5). Sklepamo lahko, da se bo po analogiji z molekulami emulgatorjev, monosloj delcev na medfazni površini ukrivil tako, da bo večja površina delca ostala obrnjena k zunanji fazi. Tako nastane O/V emulzija, ko je stični kot delca na medfazni površini manjši od  $90^\circ$ , saj so takšni delci bolj hidrofilni in je večja površina le-teh znotraj vodne faze. Nasprotno bo nastala V/O emulzija, ko uporabimo bolj hidrofobne delce, katerih stični kot je večji od  $90^\circ$ . Večja površina takšnih delcev je namreč znotraj oljne faze (Slika 2) (3).



**Slika 2:** (zgoraj) Umeščanje sferičnega delca na O-V medfazo v odvisnosti od stičnega kota ( $\theta$ ) ( $<90^\circ$  levo,  $=90^\circ$  sredina in  $>90^\circ$  desno). (spodaj) Posledično ukrivljanje medfazne površine in nastajanje emulzije ustreznega tipa.

**Figure 2:** (upper) Position of spherical particle at oil-water interface for a contact angle ( $\theta$ ) less than  $90^\circ$  (left), equal to  $90^\circ$  (centre) and more than  $90^\circ$  (right). (below) Corresponding positioning of particles at a curved interface and forming the emulsion of suitable type.

### Energija prehoda delca med fazama

Delci, ki so uporabni kot stabilizatorji emulzij, so izredno majhni, zato se pri umeščanju na medfazno površino in posledičnemu vzpostavljanju ravnotežnega stanja z najnižjo prosto energijo izrazi Brownovo gibanje. Tako je minimalna površinska energija dosežena takrat, ko je večja površina delcev potopljena v isto fazo, s katero lahko vstopajo v interakcije. Za razlago tega procesa so v pomoč termodinamski modeli, ki vključujejo učinek gravitacije, obliko delcev in določene značilnosti interakcij delec - tekočina. S poznavanjem velikosti površine delca ( $4\pi r^2$ ) in vrednosti površinskih energij delec - tekočina ( $\gamma_{so}$ ,  $\gamma_{sv}$ ) lahko izrazimo spremembo energije ( $E_t$ ) pri prenosu majhnega sferičnega delca s polmerom  $r$  iz vodne v oljno fazo:

$$E_t = 4\pi r^2 (\gamma_{so} - \gamma_{sv}) \quad \text{Enačba 1}$$

kjer podpisani znaki ponazarjajo: »s« delec, »o« olje in »v« vodo.

V Enačbi 1 lahko razliko površinskih energij znotraj oklepaja zamenjamo s spodnjim izrazom (Enačba 2 - Youngova enačba), katera upošteva nastali stični kot delca na medfazni površini ( $\theta_{ov}$ ):

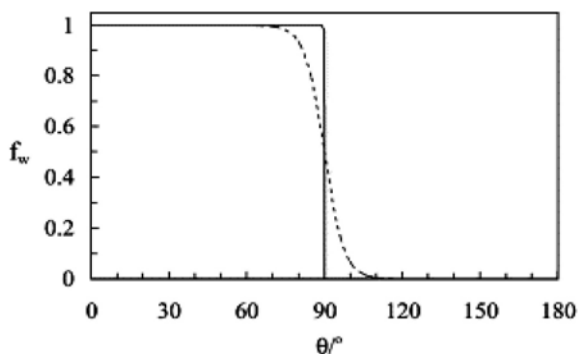
$$\gamma_{so} - \gamma_{sv} = \gamma_{ov} \cos \theta_{ov} \quad \text{Enačba 2}$$

Tako je ob predpostavki, da zanemarimo entropijo mešanja delcev z vodo in oljem, prosta energija medfaznega prenosa delca ( $E_t$ ) sledeča:

$$E_t = 4\pi r^2 \gamma_{ov} \cos \theta_{ov} \quad \text{Enačba 3}$$



Prenos delcev med fazama je odvisen od stičnega kota delca na medfazni površini, velikosti delcev in medfazne napetosti. Slika 3 prikazuje, kako vrednost medfazne napetosti ( $\gamma_{ov}$ ) vpliva na hitrost prehoda delcev med fazama (7). Tako majhna medfazna napetost omogoča postopni prehod delcev iz ene faze v drugo (Slika 3; črtkana krivulja), medtem ko pride v primeru visoke medfazne napetosti do enkratnega popolnega prenosa delcev med fazama (Slika 3; polna krivulja).

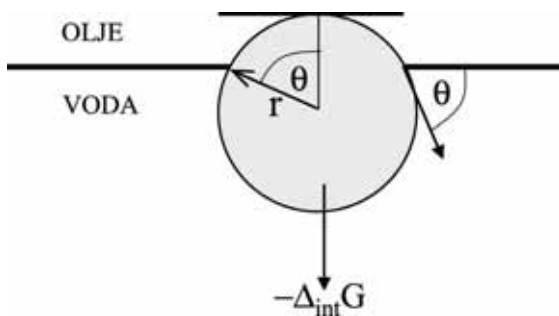


**Slika 3:** Delež delcev, prisotnih v vodni fazi ( $f_w$ ) kot funkcija stičnega kota ( $\theta$ ). Polmer delcev je 10 nm, polna krivulja velja za  $\gamma_{ov}=36 \text{ mNm}^{-1}$ , medtem ko črtkana za  $\gamma_{ov}=0,05 \text{ mNm}^{-1}$  pri 298 K (7).

**Figure 3:** Fraction of particles present in water ( $f_w$ ) as a function of the contact angle ( $\theta$ ). The particle radius is 10 nm and the curves are for  $\gamma_{ov} 36 \text{ mNm}^{-1}$  (full) and  $0,05 \text{ mNm}^{-1}$  (dashed) at 298 K (7).

#### Desorpcija delca z medfaze

Merilo za jakost stabilizacije emulzije z delci je količina energije, ki je potrebna, da adsorbirani delec odstranimo z medfaze. Ker predstavlja delec na medfazi sterično bariero pred ireverzibilnim združevanjem kapljic, je potrebna precej velika sila, da odstranimo delec s površine. Poškodovati je potrebno zaščitni film okrog kapljice ter tako sprožiti oz. dopustiti proces koalescence (2). Umestitev sferičnega delca na O/V medfazo je torej tako močna, da je posledično tudi energija, ki je potrebna za odstranitev delca z medfaze ( $-\Delta_{int}G$ ) izredno visoka (Slika 4).



**Slika 4:** Premik delca s polmerom  $r$  in stičnim kotom  $\theta_{ov}$  z medfaze v vodno fazo.

**Figure 4:** Transfere of particle with radius of  $r$  and contact angle  $\theta_{ov}$  from interface into water phase.

Ob predpostavki, da je delec dovolj majhen ( $2r < 1 \mu\text{m}$ ), smemo vpliv težnosti zanemariti in tako lahko izpeljemo naslednjo enačbo (3):

$$-\Delta_{int}G = \pi r^2 \gamma_{ov} (1 \pm \cos \theta_{ov})^2 \quad \text{Enačba 4}$$

kjer je  $r$  polmer delca;  $\gamma_{ov}$  medfazna napetost;  $\theta_{ov}$  stični kot; predznak znotraj oklepaja je pozitiven, ko pride do premika delca v oljno fazo, oz. negativen, ko pride do premika delca v vodno fazo.

Iz enačbe lahko posredno sklepamo, da je stabilnost emulzije v veliki meri odraz velikosti delcev, medfazne napetosti ter stičnega kota.

## 2.b Vrste delcev, primernih za Pickering emulzije

### Delci s homogeno močljivostjo (uniformni delci)

Delci homogene močljivosti so enako močljivi po celotni površini in so zato tudi t.i. 'uniformni' delci. V dosedanjih raziskavah so se kot 'uniformni' stabilizatorji uporabljali trdni delci netopnih kovinskih sulfatov in karbonatov, silicijevega dioksida, glinice, ogljika in drugih

**Preglednica 1:** Odvisnost stičnega kota in tipa nastale emulzije od vrste trdnih delcev in oljne faze (olja : vodna faza = 1:1 (v/v)) (6).

**Table 1:** Link between emulsion type and contact angle for different particles and a range of oils (oil : water = 1:1 (v/v)) (6).

Vrsta trdnih delcev	Oljna faza	Stični kot ( $\theta_{ov}/^\circ$ )	Tip nastale emulzije
barijev sulfat	dodekan	0	O/V
	izopropilmiristat	0	O/V
kalcijev karbonat	dodekan	43	O/V
	izopropilmiristat	39	O/V
hidrofilni $\text{SiO}_2$	dodekan	38	O/V
	cikloheksan	37	O/V
	PDMS 50 cS	81	O/V
	izopropilmiristat	32	O/V
	undekanol	38	O/V
delno hidrofobni $\text{SiO}_2$	dodekan	83	O/V
	cikloheksan	87	O/V
	izopropilmiristat	101	V/O
	undekanol	110	V/O
hidrofobni $\text{SiO}_2$	dodekan	135	V/O
	cikloheksan	135	V/O
	PDMS 50 cS	172	V/O
	izopropilmiristat	>175	V/O
	undekanol	151	V/O
bentonit	dodekan	81	V/O
	izopropilmiristat	96	V/O
hidrofobni bentonit	dodekan	110	V/O
	izopropilmiristat	141	V/O
polistiren	dodekan	152	V/O
	PDMS 50 cS	175	V/O
polifluorotetraetilen (PFTE)	dodekan	147	V/O
	izopropilmiristat	175	V/O
	undekanol	130	V/O

snovi. V preglednici I (povzeto po raziskavi 6) je prikazana povezava med stičnim kotom in tipom emulzije, ki nastane pri združevanju enakih volumnskih razmerij oljne in vodne faze (3). Povzamemo lahko, da uporaba anorganskih delcev vodi vedno k nastanku O/V emulzij. Organski delci, kot sta hidrofolbni bentonit ali polistiren, omogočajo nastanek V/O emulzij. Delno hidrofolbni delci (silicijev dioksid) stabilizirajo O/V emulzije, ko je stični kot manjši od  $90^\circ$  in je oljna faza bolj nepolarna oz. V/O emulzije, ko je stični kot večji od  $90^\circ$  in je prisotna bolj polarna oljna faza.

#### Delci s heterogeno močljivostjo ('Janus' delci)

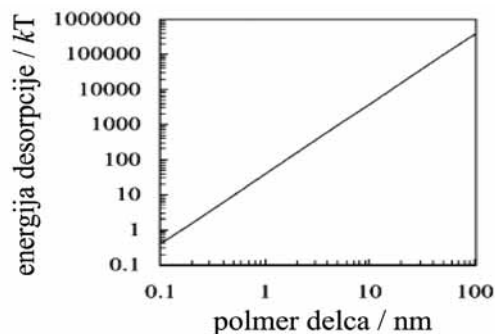
V primerjavi z 'uniformnimi' delci pa delci s heterogeno močljivostjo izkazujejo nekatere prednosti. Prvi tovrstni delci so imeli enaki delež hidrofilne in hidrofolbne površine in jih je *de Gennes* poimenoval 'Janus' delci (Janus je v rimski mitologiji bog vrat ter prehodov in je običajno upodobljen z dvema glavama in dvema obrazoma) (8). Adsorpcijska energija tovrstnih delcev je v primerjavi z 'uniformnimi' delci višja. Delec s homogeno površino (npr. enakomerno prisotnostjo alkilsilanov) ima namreč površinsko aktivne lastnosti, saj se lahko umešča pretežno samo v eno fazo. Vendar pa takšen delec ni amfilen, kar je v nasprotju z emulgatorji, ki imajo težnjo po umeščanju v obe med seboj nemešajoči fazi (3). To lastnost lahko pridobimo z delnim spreminjanjem površine delcev, pri čemer dobimo poleg hidrofolbnih (apolarnih) še hidrofilna (polarna) področja. Poznane so številne metode za sintezo majhnih monodisperznih delcev različnih oblik in površinskih lastnosti, tudi z različnimi deleži posameznih področij (2). Tako nasprotno od 'uniformnih' delcev, ki dosežejo maksimalno stabilnost emulzij pri stičnem kotu blizu  $90^\circ$ , so 'Janus' delci sposobni stabilizirati emulzije na širšem intervalu stičnih kotov, torej tudi takšnih, ki se bolj odmikajo od  $90^\circ$  (8).

## 2.c Mehanizem stabilizacije Pickering emulzij kot odraz koncentracije in lastnosti delcev

Stabilizacijo Pickering emulzij dosežemo s sterično bariero, ki nastane, ko se delci adsorbirajo na medfazno površino olje - voda in tvorijo zbito mono- ali več-slojno mreže okoli dispergiranih kapljic (3). Pri tem procesu je lahko prisotna tudi delna flokulacija delcev, ki so tesno skupaj ob sami medfazi ali tik nad njo (2). Prav tako pa se poveča viskoznost oz. spremenijo se reološke lastnosti emulzije, ko pri določeni vsebnosti med seboj interagirajočih delcev nastane v kontinuirani fazi 3D mreže delcev (2). Vendar pa na tip nastale emulzije in velikost emulzijskih kapljic vplivajo ne samo zgoraj naštetih procesi, ampak tudi koncentracija ter lastnosti uporabljenih delcev (npr. velikost delcev, močljivost).

Koncentracija delcev. Večanje deleža delcev vodi v zmanjševanje velikosti kapljic. Delci, ki se ne porabijo za prekrivanje površine kapljic, se začno združevati in tvoriti mreže v zunanji fazi, kar povzroči geliranje kontinuirane faze in to dodatno zavre pojav koalescence (3).

Velikost delcev. Primerno porazdelitev delcev okrog kapljic zagotavljajo delci, ki so manjši od nastalih emulzijskih kapljic. Stabilnost emulzij je v obratnem sorazmerju z velikostjo delcev. Z manjšimi delci je namreč dosežena visoka gostota delcev na površini kapljic in tako se oblikuje enakomerno in popolnoma prekrita plast delcev okrog kapljic (2). Kakorkoli, velikost delcev, primernih za stabilizacijo emulzij,



**Slika 5:** Odvisnost energije desorpcije delca, od njegove velikosti (stični kot  $90^\circ$ , medfazna napetost 50 mN/m) pri 298K (4).

**Figure 5:** From particle radius dependent energy required to detach a single spherical particle from an interface (contact angle of  $90^\circ$ , interfacial tension 50 mN/m) at 298K (4).

je omejena tudi navzdol. Desorpcijska energija za delce nanovelikosti doseže vrednosti [ $1000 \cdot kT$ ] (kjer je »k« Boltzmanova konstanta in »T« temperatura) (5). V primeru izredno majhnih delcev (npr. delci manjši od 1 nm) pade energija na velikostni red [kT], kar je delno primerljivo z emulgatorskimi molekulami (Slika 5) (4). Premik oz. odstranitev takšnega delca z medfaze v teh primerih ne zahteva veliko energije in sklepamo lahko, da tako majhni delci niso zelo učinkoviti stabilizatorji (3).

Stični kot. Ustrezno adsorpcijo na medfazno površino zagotavljajo samo delci, ki jih delno močita tako hidrofilna kot tudi hidrofolbna faza (5). Stabilna emulzija nastane v primeru, ko je za odstranitev delca z medfaze potrebno vložiti veliko energije. V primeru 'uniformnega' delca je to pri stičnem kotu  $\sim 90^\circ$  (glej Enačbo 4). Nasprotno pa pri odmikanju stičnega kota od  $90^\circ$  (npr.  $< 30^\circ$  oz.  $> 150^\circ$ ) energija desorpcije pade in za odstranitev delca z medfaze potrebujemo le malo energije (2).

Močljivost lahko spreminjamo na nivoju samih delcev kot tudi preko zunanjih dejavnikov. Prvo je dosegljivo z enakomernim spreminjanjem površinskih lastnosti ali pa z doseganjem heterogene močljivosti ('Janus' delci). Tako so v raziskavi Binksa in Lumsdona spreminjali tip emulzijskih sistemov ter tudi velikost nastalih kapljic s spreminjanjem hidrofolbnosti delcev (14). To so dosegli s spreminjanjem deleža silanolnih skupin na površini delcev silicijevega dioksida (Preglednica II). Prav tako lahko spremenimo tip emulzije z uporabo mešanice delcev različne hidrofolbnosti, npr. dodatek hidrofilnih delcev silicijevega dioksida k V/O emulziji, ki je že stabilizirana s hidrofolbnimi delci silicijevega dioksida. V teh primerih nastane v točki inverzije emulzijski sistem, odporen na koalescenco.

Zunanji dejavniki, ki vplivajo na močljivost, pa so lahko razni dodatki emulgatorjev, kjer lahko pride do tekmovanja z delci za medfazno adsorpcijo ali pa nastopijo sinergistični učinki (9). Slednjim je vzrok povečano znižanje medfazne napetosti; spremenjen stični kot s sledečo inverzijo tipa emulzije; ali delna flokulacija delcev in preureditev mreža na medfazi. Drugi zunanji dejavniki so majhni dodatki elektrolitov, ki zmanjšajo delcem površinski potencial in tako omogočijo šibko flokulacijo delcev v vodni fazi (3, 10). Nenazadnje pa je zunanji vpliv tudi spreminjanje pH, kar vpliva na ionizacijo funkcionalnih skupin, prisotnih na površini delcev. Tako so hidrofolbni

**Preglednica 2:** Nekatere značilnosti emulzij (voda : toluen = 1:1 (v/v)) v odvisnosti od hidrofobnosti silicijevih delcev (delež silanolnih skupin) (14).

**Table 2:** Some characteristics of emulsion (water : toluen = 1:1 (v/v)) in dependence of silica particles hydrophobicity (percentage of silanol groups) (14).

% silanolnih skupin	tip emulzije	premer kapljic (µm)	% koalescence	čas stabilnosti
100	O/V	150	30	2 min
79	O/V	120	5	10 min
76	O/V	75	0	3 leta
67	V/O	1	0	3 leta
50	V/O	0,7	0	3 leta
20	V/O	200	46	2 min

delci silicijevega dioksida v raziskavi Binksa in Lumsdona pri pH manjšem od 9 vodili k nastanku emulzije tipa V/O, medtem ko se pri pH večjem od 12,5 silanolne skupine ionizirajo in omogočijo premestitev delcev v vodno fazo (11, 12, 13).

### 3 Uporabnost Pickering emulzij

Z združitvijo vodne faze in različnih oljnih faz ter delcev lahko izdelamo široki spekter emulzijskih sistemov, ki so ali vmesna procesna stopnja ali končna samostojna oblika.

Z dobrim poznavanjem lastnosti delcev lahko spreminjamo različne parametre emulzij, npr. odzivnost na zunanje dražljaje. To področje je še posebej zanimivo s stališča nenadne destabilizacije emulzijskega sistema, kar bi bilo zelo uporabno za sproščanje zdravilne učinkovine na mestu delovanja (5).

#### 3.a Oblikovanje monodisperznih emulzij

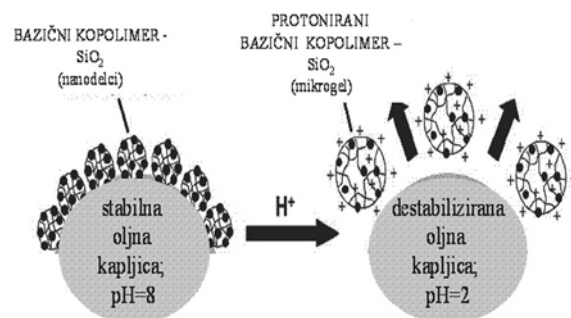
Lastnosti emulzij (fizikalno – kemijska stabilnost, reološke lastnosti) in njihova industrijska uporabnost so precej odvisne od velikostne porazdelitve kapljic. Zaželeno je, da je emulzija čim bolj monodisperzna, torej z ozko porazdelitvijo velikosti kapljic. Ta cilj je dosegljiv z metodo 'omejene koalescence', kjer oljni in vodni fazi dodamo takšno količino delcev, da le delno prekrijejo medfazno površino. Nezasedene površine se začno po principu koalescence združevati dokler ne nastanejo kapljice, ki so zaradi popolne obdanosti z delci stabilne (15).

#### 3.b Na dražljaje odzivni materiali

Uporabnost na dražljaje odzivnih materialov se kaže v možnosti destabilizacije sistema na zahtevo, torej na določene dražljaje, kot so pH, temperaturne spremembe, zunanje magnetno polje, itd. Takšna možnost nadzora emulzijske stabilnosti predstavlja pomembno odkritje za izdelavo sistemov z novimi mehanizmi dostave zdravilne učinkovine (18).

Raziskovalno zanimivi so t.i. delci, ki imajo na obodu polimerno ovojnico, katere posamezni odseki se lahko odvisno od pH-ja de/protonirajo. Umeščanje takšnih delcev na medfazo, lahko pri določenih zunanjih pogojih destabilizira sistem, če se zmanjšajo

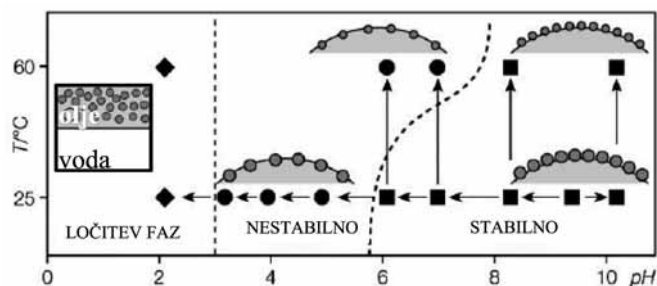
interakcije med oljno fazo in protoniranimi stabilizatorji (delci). Tako je Fujii s svojimi raziskovalci ugotovil, da lateksovi delci in tudi delci silicijevega dioksida s prečno povezanim bazičnim kopolimerom na obodu delcev, pri pH 8 uspešno stabilizirajo emulzijo O/V. Nasprotno pa nizek pH sproži razpad emulzije zaradi protoniranja ovojnice, kar desorbira delce lateksa oz. silicijevega dioksida na medfazni površini (Slika 6) (16).



**Slika 6:** Prikaz od pH-odvisne destabilizacije emulzije ob prisotnosti SiO<sub>2</sub> delcev, obdanih z bazičnim kopolimerom, kot »Pickering« stabilizatorjev (16).

**Figure 6:** Schematic representation of pH-induced demulsification using the particles [basic copolymers - SiO<sub>2</sub>] as "Pickering emulsifier" (16).

Bolj kompleksen oz. multiodzivni sistem je preučeval Ngai s sod. (17). Ugotavljal je vpliv pH-ja in temperature na stabilnost emulzije, ki vsebuje poli(*N*-izopropilakrilamidne) delce s površinskimi karboksilnimi skupinami. Pri visokem pH-ju so delci močno nabiti, emulzija je izredno stabilna in tudi odporna na temperaturne spremembe. Nasprotno je nižanje pH-ja in višanje temperature vodilo v razpad emulzije (Slika 7).



**Slika 7:** Učinkovitost stabilizacije O/V emulzije s površinsko-karboksiliranimi delci v odvisnosti od pH-ja in temperature. ■: stabilno, ●: nestabilno, ◆: fazna ločitev (17).

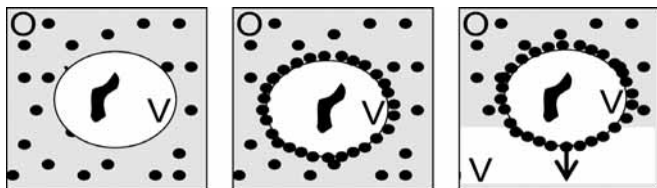
**Figure 7:** The stabilizing efficiency of surface-carboxylated particles for O/W emulsions as a function of pH and temperature. ■: Stable, ●: Unstable, ◆: Phase separation (17).

Kot stabilizatorji O/V emulzij so se izkazali tudi paramagnetni delci (18). Na medfazi tovrstnih emulzij lahko zunanje magnetno polje sproži reverzibilno makroskopsko ločitev faz. Če ločeni fazi ponovno mehansko zmešamo, dobimo ponovno dolgotrajno stabilno emulzijo. Zanimiv je tudi vpliv magnetnega polja nizke jakosti, ki lahko sproži tok emulzijskih kapljic po zunanji fazi.



### 3.c Stabilizacija z naravnimi delci

Sinteznim delcem se vse bolj pridružujejo delci naravnega izvora. Bionanodelci, kot so virusi ter drugi biološki materiali, so izredno monodisperzni in se lahko funkcionalizirajo v robustnih in dobro definiranih pogojih. Kot uspešni stabilizatorji so se izkazale spore *Lycopodium clavatum*, ki so ene najboljstojnejših snovi, saj ohranijo značilno morfološko strukturo tudi stoletja. Z njimi so uspešno stabilizirali emulzije z oljnimi fazami različnih polarnosti. Prav tako pa agregacija spor še dodatno prispeva k stabilizaciji emulzije (20).



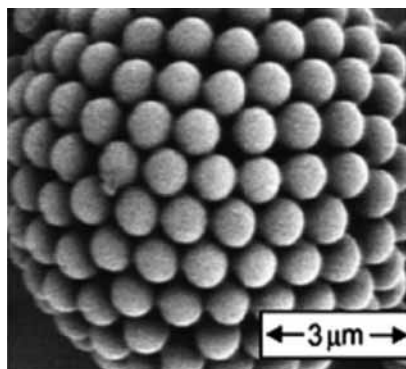
**Slika 8:** Nastanek koloidosomov po redčenju nastale Pickering emulzije z notranjo fazo. Legenda: vodna (V) in oljna (O) faza; koloidni delci (●) (18).

**Figure 8:** Schematic illustration of the self-assembly process for colloidosomes after dilution of Pickering emulsion with outer phase. Legend: water (V) and oil (O) phase; colloidal particles (●) (18).

### 3.č Koloidosomi

Pomembno področje raziskav je tudi vključevanje različnih snovi v notranjo fazo emulzijskih sistemov. Farmacija teži k čim bolj nadzorovanemu sproščanju zdravilnih učinkovin, proteinov in drugih aktivnih snovi. Za doseganje tega cilja se poslužujejo najrazličnejših tehnik.

Dinsmore je s svojimi raziskovalci predstavil izdelavo majhnih kapsul natančno nadzorovane velikosti, prepustnosti, mehanske trdnosti in kompatibilnosti (Slika 8) (21). Suspenzijo snovi, ki jo želimo vključiti v takšne kapsule, emulgiramo v tekočino, ki vsebuje tudi delce za stabilizacijo. Ti se adsorbirajo na površino emulzijskih kapljic, kjer se nato povežejo zaradi agregacije, preproste fuzije oz. sintranja ali s pomočjo adsorbiranega polimera. Pri tem nastane elastična ovojnica z mrežo por enakih velikosti. Centrifugirane kapsule prenesemo v topilo, ki je običajno enako kot notranja faza, ujeta v kapsuli. Končne strukture,

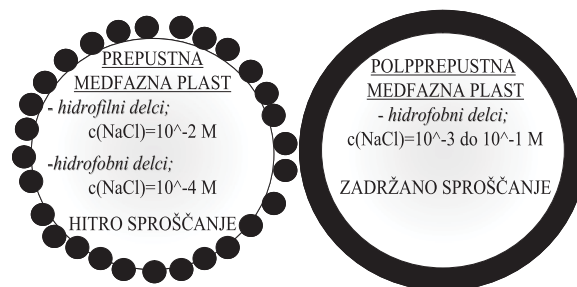


**Slika 9:** Delni prikaz koloidosoma (SEM) (21).

**Figure 9:** SEM images of the colloidosome (21).

t.i. koloidosomi, so tako luknjaste in elastične ovojnice z natančno nadzorovano prepustnostjo (Slika 9).

Nadalje je Prestidge s sod. v svoji raziskavi uporabil delce silicijevega dioksida različne hidrofobnosti (22). Adsorpcija hidrofilnih delcev je bila, bolj kot od pH-ja, odvisna od koncentracije elektrolita. Sloj hidrofilnih nanodelcev, adsorbiranih na medfazi ob prisotnosti visoke koncentracije elektrolita, predstavlja majhno bariero koalescenci in vodi v nastanek precej prepustnih kapljic. Adsorpcija hidrofobnih delcev silicijevega dioksida tvori rigidni sloj, ki značilno zadrži sproščanje snovi, vključene v notranjo fazo, npr. zdravilne učinkovine (Slika 10).



**Slika 10:** Shematska predstavitev odvisnosti med vrsto koloidnih delcev, njihovim medfaznim razporejanjem, lastnosti disperzije ter posledičnim načinom sproščanja vključene snovi.

**Figure 10:** Schematic representation of interplay between nanoparticle type, solution properties, interfacial structure of droplets and the release characteristics.

## 4 Zaključek

Emulzija kot sistem dveh nemešajočih tekočin zahteva za stabilizacijo dodatek tretje komponente. Spekter teh se neprestano širi in med najaktualnejšimi so trenutno koloidni delci, ki tvorijo t.i. Pickering emulzije. Visoka energija »zasidranja« delca na medfazno površino in specifične interakcije med delci prispevajo k edinstvenim lastnostim tovrstnih emulzij. Film na obodu emulzijskih kapljic je sestavljen iz precej rigidnih plasti, ki uspešno preprečujejo koalescenco. To je v popolnem nasprotju z obnašanjem 'klasičnih' emulgatorskih molekul, za katere je značilna vzpostavitev dinamičnega ravnotežja med medfazno in kontinuirano fazo.

Izkazalo se je, da kar nekaj dejavnikov vpliva na stabilnost Pickering emulzij. Omeniti velja velikost in koncentracijo ter tudi močljivost delcev. Podobno kot pri 'običajnih' emulgatorjih tudi za trdne delce velja pravilo, da je kontinuirana faza emulzije običajno tista, ki delce bolje moči. Izkazalo se je tudi, da šibka flokulacija delcev v zunanji fazi izboljša stabilnost emulzij. Nenazadnje lahko interakcije med delci povečajo stabilnost emulzij preko spremenjenih reoloških lastnosti disperznega medija.

Fazno inverzijo Pickering emulzij lahko dosežemo na več načinov, in sicer s spreminjanem močljivosti delcev, z uporabo mešanice delcev različnih površinskih lastnosti ali s spreminjanjem deleža posamezne faze. Blizu točke inverzije so Pickering emulzije še posebej stabilne, saj energija medfazne desorpcije delcev doseže maksimalno vrednost. To je v nasprotju z emulzijami, stabiliziranimi s 'klasičnimi' emulgatorskimi molekulami.

Komercialno dostopne emulzije so običajno stabilizirane s sistemom emulgator-delec. Za doseganje boljšega nadzora nad stabilnostjo in omejevanje uporabe 'klasičnih' emulgatorjev, ki so običajno zdravju manj prijazni, pa so raziskave usmerjene v pridobivanje delcev z novimi lastnostmi, kot so npr. delci, ki tvorijo monodisperzne emulzije, nato na dražljaje - odzivni delci, naravni delci ter koloidosomi. V določenih primerih se lahko popolnoma izognemo 'klasičnim' emulgatorskim molekulam, kar je zagotovo razlog povečanemu zanimanju za uporabo trdnih delcev kot stabilizatorjev tako na področju kozmetike kot tudi farmacije.

### 5 Literatura

1. Eccleston GM. Emulsions and Microemulsions. In: Swarbrick J. Encyclopedia of Pharmaceutical technology, Third edition; Informa Healthcare USA, Inc. 2007: 1548-1566.
2. Hunter TN, Pugh RJ, Franks GV, Jameson GJ. The role of particles in stabilizing foams and emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 2008; 137: 57-81.
3. Aveyard R, Binks PB, Clint JH. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv Colloid Interface Sci* 2003; 100-102: 503-546.
4. Pickering SU. Emulsions. *J Chem Soc* 1907; 91: 2001-2021.
5. Ramsden W. Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions'-preliminary account. *Proc R Soc* 1903; 72: 156-164.
6. Leal-Calderon F, Schmitt V. Solid-stabilized emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2008; 13: 217-227.
7. Binks BP. Particles as surfactants-similarities and differences. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2002; 7: 21-41.
8. Binks BP, Fletcher PDI. Particles adsorbed at the oil-water interface: a theoretical comparison between spheres of uniform wettability and "Janus" particles. *Langmuir* 2001; 17: 4708-4710.
9. Binks BP, Rodrigues JA. Synergetic interaction in emulsions stabilized by a mixture of silica nanoparticles and cationic surfactant. *Langmuir* 2007; 23: 3626-3636.
10. Binks BP, Lumsdon SO. Effects of oil type and aqueous phase composition on oil-water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity. *Phys Chem Chem Phys* 2000; 2: 2959-2967.
11. Binks BP, Lumsdon SO. Effects of oil type and aqueous-phase composition on oil-water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity. *Phys Chem Chem Phys* 2000; 2: 2959-2967.
12. Aveyard R, Clint JH, Nees D, Paunov VN. Compression and structure of monolayers of charged latex particles at air/water and octane/water interfaces. *Langmuir* 2000; 16: 1969-1979.
13. Horozov SH, Aveyard R, Binks BP, Clint JH. Structure and stability of silica particle monolayers at horizontal and vertical octane-water interfaces. *Langmuir* 2005; 21: 7405-7412.
14. Binks BP, Lumsdon SO. Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant free emulsions. *Langmuir* 2000; 16: 8622-8631.
15. Arditty S, Whitby CP, Binks BP, Schmitt V, Leal-Calderon F. Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions. *Eur Phys J* 2003; 11: 273-281.
16. Fujii S, Randall DP, Armes SP. Synthesis of polystyrene/poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-stat-ethylene glycol dimethacrylate] core-shell latex particles by seeded emulsion polymerization and their application as stimulus-responsive particulate emulsifiers for oil-in-water emulsions. *Langmuir* 2004; 20: 11329-11335.
17. Fujii S, Armes SP. Stimulus-Responsive Particulate Emulsifiers Based on Lightly Cross-Linked Poly(4-vinylpyridine)-Silica Nanocomposite Microgels. *Langmuir* 2006; 22: 6818-6825.
18. Ngai T, Auweter H, Behrens SH. Environmental Responsiveness of Microgel Particles and Particle-Stabilized Emulsions. *Macromolecules* 2006; 39: 8171-8177.
19. Melle S, Las M, Fuller GG. Pickering Emulsions with Controllable Stability. *Langmuir* 2005; 21: 2158-2162.
20. Binks BP, Clint JH, Mackenzie G, Simcock C, Whitby CP. Naturally Occurring Spore Particles at Planar Fluid Interfaces and in Emulsions. *Langmuir* 2005; 21: 8161-8167.
21. Dinsmore AD, Hsu MF, Nikolaidis MG, Marquez M, Bausch R, Weitz DA. Colloidosomes: Selectively Permeable Capsules Composed of Colloidal Particles. *Science* 2002; 298: 1006-1009.
22. Prestidge CA, Simovic S. Nanoparticle encapsulation of emulsion droplets. *Int J Pharm* 2006; 324: 92-100.

# Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu

## Optimization of an analytical procedure of lipoprotein lipase activity measurement in cancer tissue

Mojca Bilač Krašnja, Darko Černe

**Povzetek:** Raziskave kažejo na povezavo med aktivnostjo lipoproteinske lipaze (LPL; EC 3.1.1.34) in rastjo rakavega tkiva. Zaradi odsotnosti enostavnih metod za merjenje njene aktivnosti je intenzivnejše proučevanje vloge LPL v razvoju raka omejeno. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je postopek temelječ na izluževanju LPL iz tkiva z raztopino heparina in albumina ter merjenju aktivnosti encima v eluatu s komercialnim postopkom LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA) primeren za merjenje aktivnosti LPL v rakavem tkivu. Ugotovili smo, da je postopek zanesljiv le ob upoštevanju dodatnih, v naši raziskavi ugotovljenih priporočil glede stabilnosti izluževalne raztopine in substratne emulzije, merjenja v encimski reakciji nastalega fluorescenčnega produkta vsakih pet minut, individualne ocene ustreznosti poteka encimske reakcije in standardizacije aktivnosti encima na maso tkiva (nkat/kg). Z vpeljanim postopkom smo ugotovili, da je aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu v povprečju 1,94-krat višja kot v sosednjem, navidezno neprizadetem pljučnem tkivu istega bolnika ( $p < 0,001$ ; 10 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom brez metastaz). Zaključujemo lahko, da je vpeljan postopek primeren za merjenje aktivnosti LPL v tkivih in za nadaljnje proučevanje vloge encima pri preskrbi rakavega tkiva z maščobami, nujnimi za rast tkiva.

**Glavne besede:** lipoproteinska lipaza, rakavo tkivo, encimska aktivnost

**Abstract:** Several studies demonstrated that there is a connection between lipoprotein lipase activity (LPL; EC 3.1.1.34) and cancer tissue growth. An intensive investigation of the role of LPL in cancer progress is limited because of the lack of simple methods for LPL activity measurements. Our aim was to optimize the method which is based on the release of LPL from tissue with the solution containing heparin and albumin, and which is based on enzyme activity measurement with commercially available LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA). We also wanted to find out if this method is suitable for LPL activity measurement in cancer tissue. We came to the conclusion that the method is reliable only by considering additional – in our study established recommendations regarding the stability of all solutions we used, measurement fluorescent product in 5 minutes intervals, individual estimation of the appropriateness of enzyme reaction as well as standardization enzyme activity on weight of tissue (nkat/kg). Using this method we found out that LPL activity was higher in cancer tissue (1.9-fold median difference) than when compared to adjacent, apparently healthy lung tissue of the same patient ( $p < 0,001$ ; 10 patients with non-small cell lung cancer without metastases). We conclude that this method is suitable for LPL activity measurement in tissues as well as for further, better understanding of the role of LPL in possible mechanisms for increasing the supply of lipid nutrients to the tumour, necessary for tumour growth.

**Key words:** lipoprotein lipase, cancer tissue, enzyme activity

## 1 Uvod

Lipoproteinska lipaza (LPL; EC 3.1.1.34) je poglobitni encim znotrajšilne presnove trigliceridov. Sintetizira se v parenhimskih celicah mnogih tkiv, od koder se prenese na površino endotelija (1). Tkivno specifično uravnavanje sinteze in s tem aktivnosti LPL v tkivu omogoča tkivom z velikimi presnovnimi potrebami učinkovito črpanje maščob iz krvi (1).

Nekatere raziskave nakazujejo povezavo med LPL in rastjo rakavega tkiva. Na primer, pri ljudeh in živalih s tumorjem je aktivnost LPL v

netumorskem tkivu znižana (2, 3, 4, 5), znižanje pa se stopnjuje s stadijem bolezni oziroma z napredovanjem in rastjo tumorja (5) ter se v primeru odstranitve tumorja normalizira (6). Zvišano aktivnost v tumorju glede na okolno tkivo so opisali pri sarkomu in rektalnem raku (7). Stimuliranje aktivnosti LPL v netumorskem tkivu z bezafibratom (8) zmanjša hipertrigliceridemijo in zavre rast tumorja. Aktivnost LPL v humanih tumorjih dobro korelira z mitotično aktivnostjo in stopnjo rasti tumorja, z izjemo nekrotičnega dela tumorja, kjer je aktivnost znižana (7).



Postopki merjenja aktivnosti LPL so večinoma zahtevni in zamudni, kar omejuje njihovo pogostejšo uporabo v raziskovalne in diagnostične namene. Starejše radioizotopne metode (9) so izpodrinile fluorimetrične metode (10) in metode tekočinske kromatografije, ki so enostavnejše in hitreje (11). Zaradi nizke substratne specifičnosti encima LPL in nestabilnosti naravnih substratov, je metode težko standardizirati, reagenti so večinoma lastne proizvodnje in nestabilni (10, 11, 12, 13). Komercialno dostopne emulzije so sicer bolj stabilne, vendar manj specifične. V zadnjem času se z uporabo monoklonskih protiteles v encimsko imunskih testih dosega večje specifičnosti (12), vendar se tudi te metoda v praksi ne uporabljajo. Vsi omenjeni postopki se običajno uporabljajo za merjenje aktivnosti LPL v postheparinski plazmi (13). Merjenje aktivnosti LPL v tkivih zahteva dodatno predhodno izluževanje encima iz tkiva (14, 15) z izluževalno raztopino, kateri je dodan heparin, saj so dobljene aktivnosti v mediju brez heparina zelo majhne (16, 17, 18, 19).

Zaradi nedostopnosti enostavnih metod za merjenje aktivnosti LPL v plazmi in tkivih je proučevanje njene vloge v razvoju raka omejeno. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je postopek temelječ na izluževanju LPL iz tkiva z raztopino heparina in albumina (16) ter merjenju njene aktivnosti v eluatu s komercialnim postopkom LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA) primeren za merjenje aktivnosti LPL v rakavem tkivu, ter ga v primeru potrebe dodatno optimizirati.

## 2 Materiali in metode

### Zbiranje tkivnih vzorcev

V raziskavo smo vključili 42 bolnikov s pljučnim rakom. Vključitveni kriterij je bil tumor pljuč brez metastaz, ki se ni vraščal v okolno tkivo. Vsakemu bolniku smo odvzeli dva tkivna vzorca in sicer prvega iz periferije tumorja (območje najhitreje rasti) in drugega iz zdravega (nerakavega) pljučnega tkiva. Mesto odvzema zdravega, nerakavega pljučnega tkiva je bilo od tumorja oddaljeno vsaj 10 cm, tkivo pa je bilo organoleptično neprizadeto. Tkvine vzorce smo najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč potopili v tekoči dušik, kjer smo jih hranili do nadaljnje analize.

### Merjenje aktivnosti lipoproteinske lipaze v tkivu

V osnovi smo uporabili postopek Yamazakija in sod. (16), ki temelji na izluževanju LPL iz tkiva z raztopino heparina in albumina in merjenju aktivnosti encima v eluatu z encimskim fluorimetričnim analiznim postopkom ob uporabi komercialnega reagenčnega kompleta LPL Activity Kit (Roar Biomedical, New York, ZDA). Petstopenjski postopek opisuje Preglednica I. Za potrebe naše raziskave smo postopek optimizirali. Pogoji optimiziranega postopka so prikazani v drugem delu Preglednice I. Od zamrznjenega tkiva smo manjši košček (15-30 mg) oddelili z noževno konico in ga prenesli v mikroeproveto (Eppendorf). Na vsakih 5 mg tkiva smo dodali 100  $\mu$ l izluževalne raztopine, modificiranega Krebs-Ringerjevega pufru v sestavi 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L albumina (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 10.000 IU/L heparina (Krka, Novo Mesto, Slovenija) uravnane s HCl na pH 7,4. Zmes smo homogenizirali z ultrazvokom 2 minuti 30 sekund pri amplitudi 38 %, pulz 1 sekunda, prekinitev 2 sekundi (Cole-Parmer Ultrasonic Processor Instrument, Vernon Hills, Illinois, ZDA), jo inkubirali eno uro

na sobni temperaturi in nato centrifugirali v Eppendorf mikrocentrifugi 5 minut pri relativni centrifugalni sili 4400 x g. 20  $\mu$ L supernatanta (izlužnine z izluženim encimom) smo napipetirali skupaj z 200  $\mu$ L reakcijske raztopine (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) in 1  $\mu$ L LPL substratne emulzije (LPL Activity Kit) v mikrotitersko ploščo (Microplate White, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Nemčija). Zmes smo inkubirali na 37 °C v predhodno segreti fluorimetru (Genois, Tecan, Avstrija) in merili v encimski reakciji nastali fluorescenčni produkt vsakih pet minut, 1 uro in pol, pri ekscitaciji 360 nm in emisiji 465 nm. Narisali smo krivuljo naraščanja fluorescence v odvisnosti od časa in odčitali porast fluorescence v eni uri. Količino v encimski reakciji nastalega fluorescenčnega produkta v eni uri smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo jo naredili v vsaki seriji meritev s pomočjo raztopin z znanimi koncentracijami fluorescenčnega produkta priloženimi reagenčnemu kompletu. Fluorescence standardnih raztopin smo prav tako izmerili 1 uro po pričetku spremljanja fluorescence v merilnem postopku. Ob predpostavki, da je regresijski koeficient večji kot 0,999, smo umeritveni krivulji določili regresijski koeficient (B) in regresijsko konstanto (A), ki smo ju upoštevali pri izračunu aktivnosti encima v tkivu (enačba 1). Vse meritve smo naredili v dvojniku in za vsakega pacienta v tumorskem in kontrolnem tkivu v isti seriji meritev. Rezultate meritev smo standardizirali glede na količino tkiva in volumna izluževalne raztopine in jih izrazili kot katalitično aktivnost LPL na kg tkiva (enačba 1).

### Enačba 1: Izračun aktivnosti LPL v tkivu

#### Equation 1: Calculation LPL activity in tissue

$$\text{Aktivnost LPL v tkivu (nkat/kg)} = \frac{Y - A}{B} \cdot V \text{ reakcijske zmesi} \cdot V \text{ pufra} \cdot 1000$$
$$\text{zatehta tkiva} \cdot V \text{ supernatanta} \cdot 3600$$

Y – porast fluorescenčnega signala reakcijske zmesi v 1 uri (relativna fluorescenčna enota, RFU);

A – regresijska konstanta umeritvene krivulje standardov (RFU);

B – regresijski koeficient umeritvene krivulje standardov (RFU ·  $\mu$ L/pmol);

V reakcijske zmesi – končni volumen reakcijske zmesi ( $\mu$ L; v našem primeru 221);

V pufra – volumen izluževalne raztopine, v katerem smo homogenizirali tkivo ( $\mu$ L);

1000 – za preračun mg v g;

zatehta tkiva – masa zatehtanega vzorca (mg);

V supernatanta – ( $\mu$ L; v našem primeru 20);

3600 – za izračun encimske aktivnosti v sekundi.

# Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu

**Preglednica I:** Opis postopka merjenja aktivnosti LPL v tkivu (po priporočilih Yamazakija in sod. (16) in proizvajalca Roar Biomedical) ter priporočila glede optimizacije postopka, postavljena na osnovi naše raziskave

**Table I:** Procedure of LPL activity measurement in tissue (according recommendations of Yamazaki and co. and producer Roar Biomedical) and recommendations for optimization, established in our study

Stopnja	Priporočilo Yamazakija in sod. (16) in proizvajalca reagenta (LPL Activity kit, Roar Biomedical, NY, ZDA)	Naša priporočila glede optimiziranega postopka
1. (oddelitev manjšega koščka tkiva od zamrznjenega tkiva)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ni podatka</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>lomljenje tkiva z noževno konico (pri -70 °C)</li> <li>tehtanje oddeljenih delčkov tkiva v predhodno stehanih plastičnih mikroepruvetah</li> </ul>
2. (izluževanje encima iz tkiva)	<ul style="list-style-type: none"> <li>200 µl izluževalne raztopine na 3-10 mg tkiva</li> <li>inkubacija: nežno stresanje na 28 °C 40 min</li> <li>centrifugiranje 5 min</li> <li>stabilnost izluževalne raztopine – ni podatka</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100 µl izluževalne raztopine na 5 mg tkiva</li> <li>homogenizacija tkiva v izluževalni raztopini z ultrazvokom (2 min 30 sek, amplituda 38 %, pulz 1 sek, prekinitev 2 sek)</li> <li>inkubacija z občasnim stresanjem: 1 uro pri sobni T</li> <li>centrifugiranje 5 min (4400 x g)</li> <li>stabilnost izluževalne raztopine 6 dni</li> </ul>
3. (priprava umeritvene krivulje za izračun aktivnosti encima v izlužnini)	<ul style="list-style-type: none"> <li>LPL standardno raztopino (75,7 mmol/L) redčimo do ustreznih koncentracij, kjer pričakujemo rezultate meritev analiznih vzorcev</li> <li>ni zahteve za pripravo nove umeritvene krivulje za vsako serijo meritev</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LPL standardno raztopino (75,7 mmol/L) redčimo do ustreznih koncentracij, kjer pričakujemo rezultate meritev analiznih vzorcev</li> <li>za vsako serijo meritev naredimo novo umeritveno krivuljo</li> <li>fluorescence standardnih raztopin izmerimo 1 uro po pričetku spremljanja fluorescence v meritvenem postopku</li> </ul>
4. (merjenje aktivnosti encima v izlužnini)	<ul style="list-style-type: none"> <li>izlužnini z izluženim encimom (volumen ni definiran) dodamo 200 µl reakcijske raztopine in 1 µl substratne emulzije</li> <li>inkubacija na 25 °C – 37 °C</li> <li>merjenje fluorescence reakcijske zmesi pri ekscitaciji 370 nm in emisiji 450 nm</li> <li>ni podatka o frekvenci merjenja fluorescence</li> <li>ni podatkov o stabilnosti LPL substratne emulzije po njeni prvi uporabi</li> <li>ni priporočila o spremljanju poteka reakcij</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>20 µl izlužnine z izluženim encimom dodamo 200 µl reakcijske raztopine in 1 µl substratne emulzije (reakcijsko raztopino in LPL substratno emulzijo zmešamo za vse vzorce hkrati)</li> <li>inkubacija 37 °C eno uro in pol</li> <li>merjenje fluorescence reakcijske zmesi pri ekscitaciji 360 nm in emisiji 465 nm</li> <li>fluorescenco merimo vsakih 5 min</li> <li>stabilnost LPL substratne emulzije en mesec po njeni prvi uporabi</li> <li>priporočljiva je individualna ocena ustreznosti encimske reakcije</li> </ul>
5. (izračun rezultatov)	<ul style="list-style-type: none"> <li>pri vrednotenju se upošteva končna absolutna vrednost fluorescenčnega signala reakcijske zmesi</li> <li>ocena aktivnosti LPL relativno na vsebnost izluženih proteinov (končna vrednost fluorescence relativno glede na koncentracijo izluženih proteinov).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pri vrednotenju se upošteva porast fluorescenčnega signala reakcijske zmesi v 1 uri od začetka merjenja</li> <li>izražanje katalitične aktivnosti LPL glede na maso tkiva (nkat/kg tkiva)</li> </ul>

S krepkim tiskom so poudarjene stopnje in postopki, ki jih priporočamo glede na izsledke naše raziskave.

### 3 Rezultati

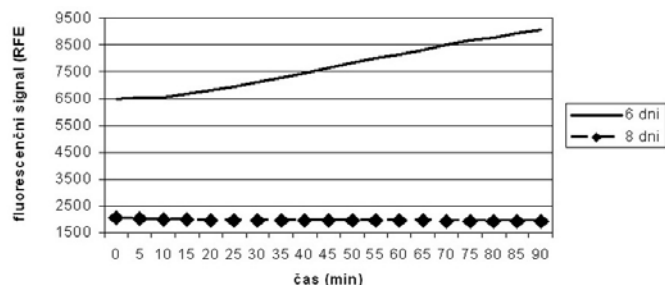
Uvodno preizkušanje postopka je pokazalo, da je originalni postopek potreben obsežne optimizacije. Vpeljane spremembe prikazuje preglednica I. Košček tkiva smo z nožovo konico oddelili od tkiva, potopljenega v suhi led. Tako smo preostanek tkiva ohranili zamrznjenega za morebitne kasnejše ponovitve meritev. Odlomljen košček tkiva smo homogenizirali v izluževalni raztopini z ultrazvokom. S takšnim postopkom smo iz tkiva izlužili več encima kot z maceriranjem tkiva na sobni temperaturi v izluževalni raztopini s pomočjo plastične palčke (rezultati niso prikazani). Za zanesljive rezultate je izjemnega pomena uporaba svežih raztopin. Preglednica II prikazuje ugotovitve o njihovi stabilnosti.

Uporaba raztopin s pretečenim rokom pomembno zmanjša izmerjene aktivnosti LPL v tkivu, kar prikazuje slika 1.

Med spremljanjem encimske reakcije s fluorimetrom v 1 uri v povprečju razpade 18 % fluorescenčnega produkta encimske reakcije (rezultati podrobneje niso prikazani), zato smo za izračun aktivnosti LPL v vzorcih uporabili umeritveno krivuljo, dobljeno iz fluorescenc standardnih raztopin, izmerjenih eno uro po začetku spremljanja fluorescence v meritvenem postopku. Umeritveno krivuljo smo naredili v vsaki seriji meritev in s tem dosegli primerljivost rezultatov med serijami. Prostor za mikrotitersko ploščico v fluorimetru smo pred postopkom merjenja segreti na 37 °C in tako dosegli običajni potek encimske reakcije (slika 2). Kinetiko nastajanja fluorescenčnega produkta smo merili v pet minutnih intervalih in individualno ocenili potek encimske reakcije. S tem smo preverili kinetiko reakcij in zaznali morebitna odstopanja. V primeru nepravilnega poteka encimske reakcije je potrebno meritve ponoviti. Slika 2 prikazuje običajni in nepravilni potek encimske reakcije.

Rezultate smo standardizirali kot aktivnost LPL na maso tkiva (nkat/kg tkiva). V izračunu smo upoštevali vse spremenljivke, ki vplivajo na rezultat aktivnosti: volumna pufra, reakcijske zmesi, supernatanta, zatehto tkiva, čas merjenja encimske aktivnosti kot tudi regresijski koeficient in regresijsko konstanto, ki smo jo določili iz umeritvene krivulje standardnih raztopin (enačba 1). Z natančno izračunano aktivnostjo smo lahko naredili absolutno primerjavo med tkivi.

Z vpeljanim postopkom smo zanesljivo izmerili aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu in jo primerjali z aktivnostjo v sosednjem, navidezno

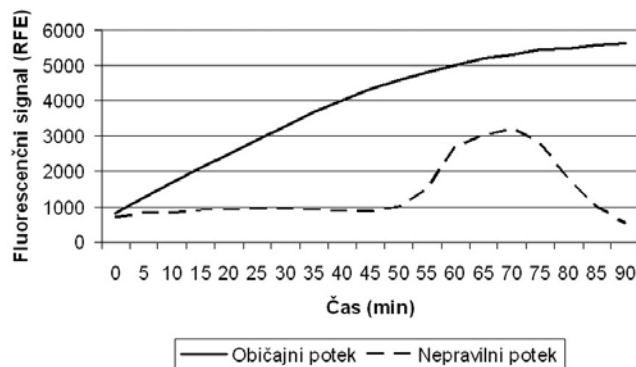


**Slika 1:** Kinetika encimske reakcije v odvisnosti od uporabe izluževalne raztopine stare 6 ali 8 dni.

**Figure 1:** Dependence enzyme reaction kinetic and usage 6 or 8 days old extraction solution.

**Preglednica II:** Stabilnost v analinem postopku uporabljenih raztopin.  
**Table II:** Stability of solutions, used in analytical procedure.

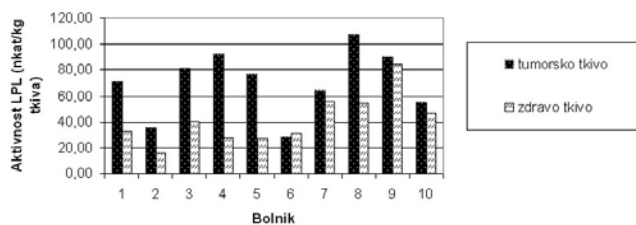
Raztopina	Stabilnost
Izluževalna raztopina	6 dni
Krebs-Ringerjev pufar	10 dni
LPL substratna emulzija	2 meseca in pol



**Slika 2:** Običajni in nepravilni potek encimske reakcije.

**Figure 2:** Regular and irregular course of enzyme reaction.

neprizadetem pljučnem tkivu istega bolnika. Aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu je bila v povprečju 1,94-krat višja kot v sosednjem, navidezno neprizadetem pljučnem tkivu ( $p < 0,001$ ; 10 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom brez metastaz). Razlike v aktivnosti LPL med tumorskim in zdravim tkivom bolnikov prikazuje slika 3.



**Slika 3:** Aktivnosti lipoproteinske lipaze (LPL) v tumorskem pljučnem tkivu in v sosednjem, organoleptično zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.

**Figure 3:** Lipoprotein lipase (LPL) activity in cancer lung tissue compared to adjacent, apparently healthy lung tissue of the same patient.

### 4 Razprava

V naši raziskavi smo ugotovili, da je postopek LPL Aktiviti Kit primeren za merjenje aktivnosti LPL v rakavem pljučnem tkivu, vendar je zanesljiv le ob upoštevanju dodatnih, v naši raziskavi ugotovljenih priporočil. Z vpeljanim postopkom smo dokazali 1,94-krat višjo aktivnost LPL v rakavem pljučnem tkivu kot v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.

Uporabljen izhodiščni postopek je v literaturi omenjen le enkrat (16), tako v izhodiščnem članku kot v navodilih proizvajalca reagenta LPL

Activity Kit pa je postopek uporabe zelo skopo opisan. Ni omenjeno, kako so hranili tkivo in manjši košček oddelili za analizo. Na podlagi preizkušanja smo se odločili za oddelitev manjšega koščka tkiva iz vial z noževno konico, pri tem pa je bila viala ves čas potopljena v suhi led. Postopek je tehnično zahtevnejši in zamudnejši od odtajanja celotnega vzorca, vendar smo želeli del tkiva ohraniti v zamrznjenem stanju za morebitne kasnejše ponovitve.

Prav tako ni podrobneje opisan način izluževanja encima iz tkiva. V naši raziskavi smo manjše koščke tkiva najprej razbili in razkrojili s pomočjo ultrazvoka, ki hitro razbije tudi trdnejše strukture na drobne koščke, kar bistveno poveča učinkovitost izluževanja encima iz tkiva v izluževalno raztopino. Menimo, da je omenjeni postopek enostavnejši in primernejši od maceriranja tkiva s plastično palčko (20), saj pri vseh vzorcih uporabljamo enake pogoje (amplituda, pulz, prekinitev), česar pri maceriranju s plastično palčko ne moremo zagotoviti. Čas inkubacije tkiva v izluževalni raztopini je bil v izhodiščnem članku 40 minut (16), podrobnejši pregled ostalih literarnih virov pa kaže na zelo raznolike čase inkubacije, ki se gibljejo med 30 in 90 minut (9, 14, 15, 17). Glede na podatek, da se največji del encima sprosti iz tkiva v prvih desetih minutah inkubacije, naslednjih 40 minut pa je izluževanje bistveno počasnejše ter da ni bistvene razlike v izluževanju encima iz tkiva na sobni temperaturi ali pri 37 °C (17), smo se odločili za enourno inkubacijo na sobni temperaturi.

Za zanesljive rezultate je izjemnega pomena stabilnost uporabljenih raztopin, tako komercialno dosegljivih kot pripravljenih v laboratoriju. Kinetika encimske reakcije je močno odvisna od starosti izluževalne raztopine, ki je stabilna največ šest dni. Možen vzrok nestabilnosti izluževalne raztopine je prisotnost govejega serumskega albumina in heparina. Podrobnejši organoleptični pregled raztopine s pretečenim rokom uporabe je pokazal prisotnost drobnih delčkov (kosmičev), ki pa jih nismo natančneje proučevali. Vzrokov nestabilnosti izluževalne raztopine nismo podrobneje raziskovali, smo pa pri nadaljnjem delu dosledno upoštevali ugotovitve o njeni šest dnevni stabilnosti in se tako izognili posledičnemu nepravilnemu poteku encimske reakcije in nezanesljivemu rezultatu analize.

Poleg nestabilnosti v laboratoriju pripravljene izluževalne raztopine smo opazili tudi nestabilnost komercialne substratne emulzije reagenčnega kompleta. Ugotovitev je bila neskladna s pričakovanji, saj proizvajalec ne navaja podatkov o njeni nestabilnosti po prvi uporabi, pa tudi sicer je zaprta v temni viali in zaščitena pred svetlobo. Proizvajalec navaja le rok uporabe celotnega kompleta nenačetih reagentov, ki smo ga dosledno upoštevali. Domnevamo, da je razpad LPL substratne emulzije posledica večkratnega odpiranja vial in pogoste izpostavljenosti svetlobi. Pri uporabi substratne emulzije smo namreč opazili, da je bila po dveh mesecih in pol bistveno zmanjšanja hitrost nastajanja fluorescenčnega produkta (kljub sveže pripravljenim ostalim raztopinam), kar je bilo vidno kot neobičajen potek encimske reakcije. LPL substratna emulzija je tudi izredno viskozna in nehomogena, kar še dodatno povzroča težave pri njenem mešanju in pipetiranju. Da bi preprečili naštetih možnih vzrokov za nestabilnost LPL substratne emulzije, smo dosledno upoštevali naslednje lastne ugotovitve: 1.) vialo smo odpirali v temnem prostoru in čim manjkrat; 2.) pred in po uporabi smo jo zavili v za svetlobo nepropustno folijo; 3.) pred pipetiranjem smo vialo dobro premešali na mešalcu (vortex); 4.) po prvem odprtju vialo smo dosledno upoštevali ugotovljen rok uporabe; in 5.) reakcijsko

raztopino in LPL substratno emulzijo smo zmešali za vse vzorce v seriji naenkrat in se tako izognili napaki zaradi pipetiranja netočne količine viskozne substratne emulzije (1 µL za en analizni vzorec).

Kljub temu, da tako avtorji izhodiščnega članka kot proizvajalec reagenčnega kompleta ne omenjajo, smo za vsako serijo meritev pripravili novo umeritveno krivuljo. S tem smo dosegli boljšo ponovljivost med serijami meritev. Sicer pa je tudi naše priporočilo, da je koeficient korelacije najmanj 0,999, kar pa ob natančnem delu ni težko dosegljivo.

Prav tako v izhodiščnem članku ni omenjena nestabilnost fluorescenčnega produkta encimske reakcije. Napaki zaradi njegovega razpadanja oziroma nestabilnosti smo se izognili z merjenjem fluorescence standardnih raztopin eno uro po začetku merjenja fluorescence v meritvenem postopku. Ugotovili smo, da moramo vsako reakcijo posebej oceniti in sicer tako, da spremljamo potek reakcije na pet minut. Glede na to, da v izhodiščnem članku to ni omenjeno, bi lahko spregledali mnogo napačnih meritev (v našem primeru 17 %).

V izhodiščnem članku (16) so pri izračunu aktivnosti LPL upoštevali končne absolutne vrednosti fluorescenčnega signala. Prepričani smo, da je primerneje upoštevati porast fluorescence v eni uri od začetka merjenja. S tem se tudi izognemo morebitnemu vplivu nehomogenosti vzorcev na velikost nastalega fluorescenčnega signala (7). V izhodiščnem članku (16) so aktivnost LPL izrazili relativno na vsebnost izluženih proteinov v vzorcu tkiva. Takšno podajanje koncentracije katalitične aktivnosti encima je neprimerno, saj koncentracije proteinov v izlužnini zaradi dodanega albumina (20) s postopkom po Lowryju ne moremo zanesljivo izmeriti (meritev zahteva preveliko redčitev vzorca). Alternativen pristop merjenja koncentracije proteinov z biuretним postopkom se je prav tako izkazal za neprimerne zaradi premajhne občutljivosti postopka in previsoke meje detekcije (20). Pri izračunu aktivnosti encima je nujno upoštevati tudi zatehto tkiva, ki ga z noževno konico pridobimo iz vial, volumen izluževalne raztopine, v kateri homogeniziramo tkivo ter volumen izlužnine uprabljene v reakcijski zmesi. Poleg tega smo želeli aktivnost LPL podati v standardiziranih enotah (katalih) in ne kot razmerje med različnimi tkivi. Standardna raztopina, priložena reagenčnemu kompletu, nam je omogočala pripravo umeritvene krivulje in natančno določitev v reakciji nastalega produkta, s tem pa določitev aktivnosti encima v standardiziranih enotah izraženih na zatehto tkiva.

Prav tako ni v izhodiščnem članku (16) nobenega opozorila, da je potrebno fluorimeter oz. merilno komoro pred pričetkom merjenja segreti na 37 °C. Opazili smo, da v primeru odsotnosti predhodnega segretja merilne komore na temperaturo reakcije, dobimo nezaželen potek encimske reakcije, ki onemogoča pravičen izračun porasta fluorescence v eni uri. Vzrok je najverjetneje v prepočasnem segrevanju reakcijske mešanice.

Z vpeljanim postopkom smo dokazali statistično značilno ( $p < 0,001$ ) zvečano aktivnost LPL v tumorskem tkivu v primerjavi z navidezno zdravim pljučnim tkivom. Glede na to, da ima zvišana aktivnost LPL v tkivu pomembno fiziološko vlogo pri prerazporeditvi maščob in preskrbi teh tkiv z lipidi (1), lahko razmišljamo o pomembnem prispevku tega dejavnika pri preskrbi maščob tudi rakavega tkiva in posledično vpliva na rast tumorja.



## 5 Sklep

Zaključimo lahko, da je ob doslednem upoštevanju naših priporočil encimski fluorimetrični postopek LPL Activity Kit proizvajalca Roar Biomedical primeren za merjenje aktivnosti LPL v tkivu. V primerjavi z drugimi objavljenimi postopki je hiter in enostaven, kar je njegova velika prednost.

Ugotovitve meritev na bolnikih predstavljajo pomembno osnovo nadaljnjega proučevanja vloge LPL v rasti in razvoju pljučnega raka. Za potrditev dejanske vloge LPL ter njeno morebitno diagnostično in terapevtsko delovanje, pa bi bile potrebne obsežnejše raziskave.

## 6 Literatura

1. Preiss-Landi K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 471-481.
2. Vlassara H, Spiegel RJ, San Doval D, Cerami A. Reduced plasma lipoprotein lipase activity in patients with malignancy-associated weight loss. *Horm metabol Res* 1986; 18: 698-703.
3. Nomura K, Noguchi Y, Yoshikawa T, Kondo J. Plasma interleukin-6 is not a mediator of changes in lipoprotein lipase activity in cancer patients. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1519 - 1526.
4. Lanza-Jacoby S, Lansey SC, Miller EE, Cleary MP. Sequential changes in the activities of lipoprotein lipase and lipogenic enzymes during tumor growth in rats. *Cancer Res* 1984; 44: 5062-5067.
5. Obeid OA, Wmery PW. Lipid metabolism in cachectic tumor-bearing rats at different stages of tumor growth. *Nutr Cancer* 1993; 19: 87-98.
6. Noguchi Y, Vydellingum NA, Younes RN, Fried SK, Brennan MF. Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels. *Cancer Res* 1991; 51: 863-869.
7. Sakayama K, Masuno H, Miyazaki T, Okumura H, Shibata T, Okuda H. Existence of lipoprotein lipase in human sarcomas and carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 1994; 85: 515-521.
8. Nomura K, Noguchi Y, Matsumoto A. Stimulation of decreased lipoprotein lipase activity in the tumor-bearing state by the anti-hyperlipemic drug bezafibrate. *Surg Today* 1996; 26: 89-94.
9. Nilsson-Ehle P, Schotz MC. A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1976; 17: 536-541.
10. Del Prado M, Hernandez-Montes H, Villapando S. Characterization of a Fluorometric Method for Lipoprotein Lipase. *Arc Med Res* 1994; 25: 331-335.
11. Eguchi Y. Analysis of lipoprotein lipase activity using high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2002; 16: 500-503.
12. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, Yamamoto A. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 1990; 31: 1911-1924.
13. Baginsky ML, Brown WV. A new method for the measurement of lipoprotein lipase in postheparin plasma using sodium dodecyl sulfate for the inactivation of hepatic triglyceride lipase. *J Lipid Res* 1979; 20: 548-556.
14. Persson B, Smith U, Larsson B. A study of different methods for the assay of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *Atherosclerosis* 1975; 22: 425-430.
15. Lithell H, Boberg J. A method of determining lipoprotein-lipase activity in human adipose tissue. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37: 551-561.
16. Yamazaki H, Arai M, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T. Intracranial administration of transforming growth factor – beta3 increases fat oxidation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E536-E544.
17. Taskinen MR, Nikkila EA, Huttunen JK, and Hilden H. A micromethod for assay of lipoprotein lipase activity in needle biopsy samples of human adipose tissue and skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 107-117.
18. Spooner PM, Garrison MM, Scow RO. Regulation of Mammary and Adipose Tissue Lipoprotein Lipase and Blood Triacylglycerol in Rats during Late Pregnancy. *J Clin Invest* 1977; 60: 702-708.
19. Karpe F, Olivercrona T, Walldius G, Hamsten A. Lipoprotein lipase in plasma after an oral fat load: relation to free fatty acids. *J Lipid Res* 1992; 33: 975-984.
20. Nagode K. Ocena analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakastem tkivu. *Diplomska naloga*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005.

# Poznavanje vpliva zdravil na psihofizične sposobnosti upravljanja vozil in strojev pri slovenskih bolnikih

## Slovenian patients' knowledge of drugs efficacy on their capacities to drive and operate machines

Nina Pisk

*Zahvala: Sekcija farmacevtov javnih lekarn pri Slovenskem farmacevtskem društvu in avtorica članka se iskreno zahvaljujemo vsem sodelujočim v raziskavi.*

**Povzetek:** Zdravila se glede na vpliv, ki ga imajo na človekovo sposobnost vožnje in upravljanja s stroji, delijo v tri kategorije: zdravilo nima učinka ali je ta učinek zanemarljiv; zdravila z manjšim ali srednjim učinkom; zdravila z močnim in nevarnim učinkom. Zdravila druge in tretje kategorije imajo na zunanji ovojnini imajo poseben znak – trikotnik in jih zato pogosto imenujemo trigoniki. Ta zdravila predstavljajo pomemben delež med predpisanimi in izdanimi zdravili v Sloveniji ter so tudi pogosto vzrok prometnih nesreč. Ta zdravila večinoma delujejo na centralni živčni sistem. Namen in metode: v slovenskih lekarnah smo z anketo želeli ugotoviti, koliko bolniki, ki so jim predpisana zdravila trigoniki, poznajo vpliv teh zdravil na njihove psihofizične sposobnosti upravljanja vozil in strojev. Rezultati: Analiza zbranih podatkov, ki se nanašajo na vključene bolnike (n = 1345) in/ali izdana zdravila (n = 1590), kaže, da slovenski bolniki relativno dobro poznajo vpliv njihovih zdravil na zmanjšanje psihofizičnih sposobnosti in s tem na upravljanje vozil in strojev. Obenem je analiza pokazala, da bi bilo potrebno izboljšati predvsem svetovanje ob prvem predpisovanju in izdajanju zdravil ter svetovanje starejšim bolnikom. Zaključek: Bolnik mora poznati vpliv zdravila na zmanjšanje psihofizičnih sposobnosti pri upravljanju vozil ali strojev.

**Ključne besede:** psihoaktivna zdravila, psihofizična sposobnost, farmacevtov nasvet

**Abstract:** Drugs which effect driving and operating machines are divided into three categories: drugs with no or negligible effect on driving ability, drugs with minor or relative disabling capability and drugs with absolute prohibition of driving or handling with machines. Drugs from the second and the third category have a special sign on packaging – a triangle - and we often call them "trigoniki". This drugs represent an important share of prescribed and dispensed medicines in Slovenia and are often the cause of car accidents. Mostly they have effect on central nervous system. Purpose and methods: By distributing a questionnaire among Slovenian community pharmacies we have set to assess patients' knowledge of the efficacy of drugs on their capacity to drive and operate machines when "trigoniki" drugs were prescribed. Results: The analysis of date referring to patients (n = 1345) and/or to dispended drugs (n = 1590), shows that Slovenian patients have relatively good knowledge of drugs efficacy on their capacities to drive and operate machines. The results show that, first of all, we have to improve advice given during the first prescribing and dispensing a drug and advice given to elderly people. Conclusions: Patients must have knowledge of drugs efficacy on the decreasing capacities to drive and operate machines.

**Key words:** psychoactive drugs, psychophysical capacity, pharmacists advice

## 1 Uvod

Statistike kažejo, da je človeški dejavnik glavni vzrok v dveh tretjinah prometnih nezgod. Poleg alkohola imajo pri tem iz leta v leto pomembnejše mesto tudi druge psihoaktivne snovi, kot so ilegalne droge in nekatera zdravila, ki lahko vplivajo na voznikove psihofizične

sposobnosti. V zadnjih letih se vse pogosteje zastavlja vprašanje, koliko je v prometnih nezgodah umrlih ali poškodovanih zaradi jemanja psihoaktivnih zdravil, ki lahko vplivajo na voznikove psihofizične sposobnosti in katerih učinek bi torej lahko bil spremljajoči vzrok nezgode (1). V okviru Zakona o varnosti v cestnem prometu je vozniku,

ki je pod vplivom mamil, psihoaktivnih zdravil in drugih psihoaktivnih snovi, ki zmanjšujejo njihovo sposobnost za vožnjo, prepovedano upravljati vozilo v cestnem prometu, pa tudi začeti vožnjo z njim (2). V obravnavi prometnih nezgod se pri strokovnem pregledu (zdravniški pregled, analiza odvzetih vzorcev krvi in urina) pogosto ugotovi prisotnost psihoaktivnega zdravila, alkohola ali prepovedane droge oziroma njihove sočasne uporabe (3).

Psihoaktivna zdravila imajo med predpisanimi in izdanimi zdravili v Sloveniji pomemben delež. V letu 2006 se je v povprečju predpisalo oziroma izdalo na vsak šesti zdravniški recept zdravilo z oznako triگونik (na vsak petdeseti zdravniški recept zdravilo, za katerega velja absolutna prepoved, in na vsak sedmi zdravniški recept zdravilo, za katerega velja relativna prepoved vožnje in upravljanja strojev) (4).

### 1.1 Zdravila, ki vplivajo na sposobnost vožnje in upravljanja s stroji

Na podlagi vseh ugotovitev iz farmakološko - toksikoloških in kliničnih študij (farmakodinamičnega profila, poročil o neželenih učinkih in/ali specifičnih študij, ki obravnavajo sposobnost za vožnjo ali upravljanje s stroji, izvedenih na primerni populaciji bolnikov) se zdravila za opredelitev ocene tveganja, glede na njihov vpliv na sposobnost vožnje in upravljanja s stroji, delijo v tri kategorije (5,6):

- I.: zdravila, ki nimajo učinka na vozniške sposobnosti ali je ta učinek zanemarljiv,
- II.: zdravila z manjšim ali srednjim učinkom na vozniške sposobnosti,
- III.: zdravila z močnim in nevarnim učinkom na vozniške sposobnosti.

Vpliv same bolezni na spremembo človekovih psihofizičnih sposobnosti pri tem ni upoštevan.

Navedena razdelitev je vključena tudi v smernice Evropske agencije za zdravila (EMA) za pripravo informacij o značilnostih zdravil. Za drugo in tretjo kategorijo je potrebno v povzetek temeljnih značilnosti in v priloženo navodilo za uporabo navesti posebna opozorila.

Vpliv zdravil na psihofizične sposobnosti pri vožnji in upravljanju strojev je posledica želenih ali neželenih farmakodinamičnih učinkov zdravil, ki na centralni živčni sistem (CŽS) vplivajo neposredno ali posredno preko metabolitov, ki nastanejo pri njihovi presnovi. Ta vpliv je treba proučiti pri vseh zdravilih, pri katerih je na podlagi kemične strukture, mehanizma delovanja, farmakokinetičnih in farmacevtskih značilnosti (farmacevtska oblika in pot uporabe zdravila) mogoče pričakovati delovanje na CŽS. Najpogostejši neželeni učinki zdravil, ki zmanjšajo sposobnost pri vožnji in upravljanju strojev, so zmanjšana pozornost, zaspanost, upočasnjena hitrost odziva ali kontrola dejanja, vrtoglavica, motnje vida ali sluha, slabost, nenadna agresivnost. Neželeni učinki zdravil se pri posamezniku izražajo v različnih jakostih in oblikah, na kar vplivajo številni dejavniki, kot so starost, spol, fizična zgradba telesa in telesna teža, bolezenska stanja, sočasna uporaba drugih zdravil ali uživanje alkohola. Neželene učinke zdravil, ki zmanjšajo varnost v prometu ali pri delu s stroji in opravljanju drugih nevarnih del ali športnih aktivnostih, lahko zmanjšamo s prilagoditvijo odmerka, spremenjenim režimom jemanja zdravila ali z zamenjavo zdravila s takšnim, ki manj vplivajo na psihofizične sposobnosti bolnika (5 -12).

Eden od primerov razvrstitve učinkovin glede na njihov vpliv znotraj dveh skupin ATC - anatomsko terapevtske klasifikacije (5):

- selektivni inhibitorji ponovnega privzema serotonina (N06AB): fluoksetin I, citalopram II, paroksetin I, sertralin II, fluvoksamin II, escitalopram II;
- benzodiazepinski anksiolitiki (N05BA): diazepam III, medazepam II, oksazepam III, lorazepam III, bromazepam III, klobazam II, alprazolam III.

Bolnikove psihofizične sposobnosti lahko bistveno spremeni tudi nenadna popolna prekinitve jemanja psihoaktivnih zdravil. V takih primerih bi moral bolnik dobiti informacije o tem, kako in kdaj varno prenehati z jemanjem takih zdravil.

#### 1.1.1 Farmakodinamske skupine zdravil, ki zmanjšajo sposobnost upravljanja vozil in strojev

Glede na lastnosti zdravil je lahko upravljanje z vozili in delo s stroji povsem prepovedano ali pa relativno prepovedano.

Registrirane **zdravilne učinkovine v Sloveniji, pri katerih je upravljanje z vozili in delo s stroji povsem prepovedano**, razvrščene po ATC klasifikaciji (13, 14):

- antimikotiki za sistemsko zdravljenje (J02AC): varikonazol;
- mišični relaksanti s perifernim delovanjem (M03AC): pankuronij;
- splošni anestetiki (N01A): izofluran, tiopental, fentanil, sufentanil, remifentanil, ketamin, propofol;
- opiodi (N02AH): buprenorfin, dihidrokodein, fentanil, hidromorfon, kodein, morfin, oksikodon, pentazocin, tramadol (tudi kombinacije);
- antipsihotiki (N05A), parenteralne oblike: flufenazin, haloperidol, ziprazidon, cuklopentiksol, sulpirid;
- hipnotiki in sedativi (N05C): flurazepam, midazolam;
- zdravila za zdravljenje zasvojenosti z opiodi (N07BC): buprenorfin, metadon;
- antitusiki, opijevi alkaloidi (R05DA): kodein (tudi v kombinaciji z drugimi učinkovinami);
- antihistaminiki za sistemsko zdravljenje (R06AD), parenteralne oblike: tetilperazin.

Registrirane **zdravilne učinkovine v Sloveniji, pri katerih je upravljanje z vozili in delo s stroji relativno prepovedano**, razvrščene po ATC klasifikaciji (13, 14):

- antiperistaltiki (A07): loperamid;
- propulzivi (A02AF): metoklopramid;
- vazodilatatorji za zdravljenje koronarne ishemije (C01DA): izosorbidmononitrat;
- antiadrenergiki s perifernim delovanjem (C02CA): urapidil;
- druga ginekološka zdravila (G02CB): bromokriptin;
- spodbujevalci ovulacije (G03GB): klomifen;
- antiandrogeni (G03HA): ciproteron;
- urospazmolitiki (G04BD): darifenacin, propiverin, tolterodin;
- zdravila za zdravljenje benigne hiperplazije prostate (G04CA): tamsulozin;

- fluorokinoloni (J01MA): ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin, pefloksacin;
- druge protimikrobne učinkovine (J01XD): metronidazol;
- zdravila z delovanjem na novotvorbe (L01): motoksantron, verteporfin, letrozol;
- mišični relaksansi z osrednjim delovanjem (M03BX07): tizanidin;
- lokalni anestetiki (N01BB): mepivakin;
- zdravila proti migreni (N02C): ergotaminijev tartrat, eletriptan, naratriptan, sumatriptan;
- antiepileptiki (N03A): fenobarbital, gabapentin, karbamazepin, klonazepam, lamotrigin, levetiracetam, metilfenobarbital, pregabalin, tiagabin, topiramata, valprojska kislina, vigabatrin;
- antiparkinsoniki (N04): biperiden, benserazid, bromokriptin, karbidopa, levodopa, pergolid, pramipeksol, ropinirol;
- antipsihotiki (N05A): amisulpirid, cuklopentiksol, flufenazin, flupentiksol, haloperidol, klozapin, kvetiapin, litij, levomepromazin, olanzapin, promazin, risperidon, sulpirid, tioridazin, ziprazidon;
- anksiolitiki (N05B): alprazolam, bromazepam, diazepam, lorazepam, medazepam, oksazepam;
- hipnotiki in sedativi (N05C): klobetazol, nitrazepam, zoleplon, zolpidem;
- antidepresivi (N06A): amitriptilin, citalopram, duloksetin, doksepin, ecitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, klomipramin, maprotilin, mianserin, mirtazepin, paroksetin, reboksetin, sertralin, tianeptin, trazodon, venlafaksin;
- zdravila za zdravljenje demence (N06D): galantamin, memantin;
- zdravila za zdravljenje zasvojenosti z alkoholom (N07BB): naltrekson;
- zdravila proti vrtoglavici (N07CA): cinarizin;
- zdravila za zdravljenje amebioz (P01AB): metronidazol;
- antitusiki, opijevi derivati (R05A): folkodin;
- antihistaminiki za sistemsko zdravljenje (R06A): dimenhidrinat, klemastin, tielperazin;
- antiholinergiki (S01FA): tropikamid.

Pazljivost je potrebna tudi pri jemanju drugih zdravil, ki ne delujejo na CŽS, in zdravljenju bolezni, ki lahko preko motenega krvnega obtoka v osrednjem živčevju, preko motene presnove življenjsko pomembnih snovi (npr. glukoze v krvi) ter vpliva na izločanje in delovanje hormonov in vpliva na delovanje čutil (predvsem vida in sluha), posledično vplivajo na sposobnost upravljanja vozil in strojev (15).

## 1.2 Viri informacij o vplivu zdravila na sposobnost upravljanja vozil in strojev

Skladno s smernicami EMEA informacije o vplivu zdravila na sposobnost upravljanja vozil in strojev podajajo (6, 16, 17):

1. Povzetek glavnih značilnosti pri zdravilu (v poglavju 4.7 z naslovom *Vpliv na sposobnost vožnje in upravljanja s stroji*)
2. Navodilo za uporabo pri zdravilu (2. poglavje z naslovom: "Kaj morate vedeti, preden <boste vzeli>

<boste uporabili> zdravilo X" (X je ime zdravila), rubrika *Vpliv na sposobnost upravljanja vozil in strojev*).

### 3. Zunanja ovojnina zdravila

Skladno z evropskimi smernicami lahko zunanja ovojnina vsebuje piktograme ali simbole, ki dodatno pojasnjujejo navodilo za uporabo.

V Sloveniji morajo biti pri zdravilih, ki vplivajo na psihofizične sposobnosti bolnikov, na zunanji ovojnini na vidnem mestu navedene oznake previdnostnih ukrepov v najmanj polovični velikosti imena zdravila (16). Oznake so naslednje:

- prazen trikotnik v barvi teksta ( $\Delta$ ) opredeljuje relativno prepoved upravljanja vozil in strojev,
- poln trikotnik v rdeči barvi ( $\blacktriangle$ ) opredeljuje absolutno prepoved upravljanja vozil in strojev,
- paragraf v barvi teksta (§) je oznaka za mamilo,
- klicaj v barvi teksta (!) opozarja na omejeno količino enkratne izdaje.

Zdravila, ki vplivajo na sposobnost upravljanja z vozili in stroji, zaradi oznak – trikotnikov – na zunanji ovojnini pogosto imenujemo **trigoniki** (gr. trigonon = trikotnik).

## 2 Namen

Namen raziskave je bil, da ob izdaji zdravila v lekarni preverimo, ali imajo bolniki informacije o vplivu predpisanih zdravil na sposobnost upravljanja vozil in strojev in, ali poznajo posebno oznako na zunanji ovojnini zdravila. Zanimalo nas je tudi, kje je bolnik dobil informacije o vplivu predpisanega zdravila, vpliv vrste izdanega zdravila ter vpliv starosti in spola na poznavanje informacije.

## 3 Materiali in metode

### 3.1 Anketa

Raziskavo je ob 3. Dnevu slovenskih lekarn septembra 2007 izvedla Sekcija farmacevtov javnih lekarn pri Slovenskem farmacevtskem društvu in sicer v 130 izbranih slovenskih javnih lekarnah. V anketo je bilo vključenih 1345 bolnikov oziroma izdaja 1590 zdravil trigonikov.

Magister/a farmacije je izvedel anketo pri desetih zaporedno izdanih zdravilih z oznako trikotnika na zunanji ovojnini in pridobljene podatke, upoštevajoč navodila za izpolnjevanje, vnašal na anketni list, ki smo ga za preverjanje razumljivosti predhodno testirali. Pri tem je zabeležil spol in leto rojstva bolnika, zaščitenost ime in jakost izdanega zdravila ter odgovore bolnika na vprašanja:

1. Ali vam je zdravilo predpisano prvič?
2. Ali poznate pomen znaka (pri tem je pokazal na poln ali prazen trikotnik) na zloženki?
3. Ali veste, da zdravilo vpliva na vašo sposobnost upravljanja vozil in strojev?
4. Kje ste dobili informacijo?

Če prvi dan magister farmacije ni izdal toliko zdravil, je anketo izvajal še naslednji dan. Primeri izdaje zdravil, ko je zdravilo dvignila druga oseba in ne bolnik sam, niso bili vključeni v anketiranje.



### 3.2 Metode analize podatkov

Dobljene podatke smo obdelali z metodo deskriptivne statistike, in sicer s pomočjo statističnega programa SPSS, verzija 11. Analizo smo opravili v dveh delih: v prvem delu smo najprej analizirali zbrane

podatke, ki so se nanašali na bolnike (n = 1345), v drugem delu pa še zbrane podatke, ki so se nanašali na izdano zdravilo (n = 1590). Vpliv spremenljivk starost, spol in prva izdaja smo ugotavljali s pomočjo logistične regresije.

## 4 Rezultati

### Vpliv prve ali naslednje izdaje zdravila

Pri izdaji 1590 trigonikov smo posameznemu anketiranemu bolniku izdali od enega do pet zdravil z oznako polnega ali praznega trikotnika, v največ primerih pa le en trigonik (85,7 %). Zdravilo trigonik je bilo v 24,6 % bolniku izdano prvič.

**Preglednica 1:** Preglednica prikazuje vpliv prve ali naslednje izdaje zdravila na poznavanje pomena znaka oziroma informacije pri bolnikih

**Table 1:** Effect at the first or next dispensing psychoactive drugs

Pogostnost izdaje	Vključeni bolniki (%)	Bolniki, ki so poznali pomen znaka (%)	Bolniki, ki so poznali informacijo (%)
Prva izdaja zdravila	36,1	23,1	23,8
Naslednje izdaje zdravila	63,9	45,0	46,5
Skupaj	100	39,6	40,3

### Vpliv vrste prepovedi upravljanja vozil in strojev

**Preglednica 2:** Preglednica prikazuje vpliv vrste prepovedi upravljanja vozil in strojev na poznavanje pomena znaka oziroma informacije pri bolnikih

**Table 2:** Effect of the type of prohibition to start driving on the result

Vrsta prepovedi	Izdana zdravila (%)	Zdravila, pri katerih so bolniki poznali pomen znaka (%)	Zdravila, pri katerih so bolniki poznali informacijo (%)
Relativna	75,3	38,5	41,0
Absolutna	24,7	42,6	37,5
Skupaj	100,0	39,5	40,2

### Vpliv vrste izdanega zdravila

Večinoma so bila izdana zdravila z delovanjem na živčevje.

**Preglednica 3:** Preglednica prikazuje vpliv vrste izdanega zdravila

**Table 3:** Effect of therapeutic class of drugs on the result

Vrsta izdanega zdravila	Izdana zdravila (%)	Zdravila, pri katerih so bolniki poznali pomen znaka (%)	Zdravila, pri katerih so bolniki poznali informacijo (%)
N05BA (anksiolitiki)	25,1	36,6	39,1
N02AX (opioidni analgetiki)	21,1	40,8	35,9
N06AB (SSRI antidepresivi)	12,2	34,2	48,8
N05CF (hipnotiki, sedativi)	8,9	33,1	35,9
N06AX (drugi antidepresivi)	3,8	49,2	43,9
druge skupine po ATC	28,9	43,9	41,1
skupaj	100,0	39,5	40,1

**Preglednica 4:** Preglednica prikazuje vpliv posamezne učinkovine

**Table 4:** Effect of the psychoactive drugs on the result

Vrsta izdanega zdravila	Izdana zdravila (%)	Zdravila, pri katerih so bolniki poznali pomen znaka (%)	Zdravila, pri katerih so bolniki poznali informacijo (%)
tramadol	9,7	50,3	43,1
bromazepam	9,2	37,1	42,2
tramadol + paracetamol	11,9	32,4	30,3
zolpidem	9,2	34,0	36,4
alprazolam	8,6	27,9	34,5

## Vpliv spola bolnika

**Preglednica 5:** Preglednica prikazuje vpliv spola bolnika med 1345 bolniki

**Table 5:** Effect of sex of the patient on the results

Spol	Vključeni bolniki (%)	Bolniki, ki so poznali pomen znaka (%)	Bolniki, ki so poznali informacijo (%)
Moški	36,1	40,5	44,7
Ženski	63,9	36,1	37,8
skupaj	100	37,5	40,3

## Vpliv starosti bolnika

Povprečna starost vključenih v anketo je bila malo manj kot 58 let.

**Preglednica 6:** Preglednica prikazuje vpliv starosti bolnika

**Table 6:** Effect of age of the patient on the results

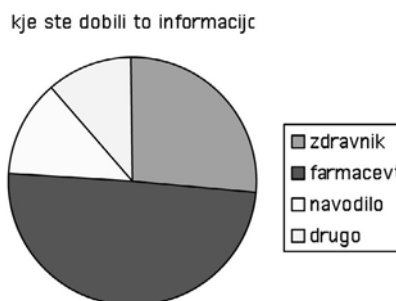
Starost (leta)	Vključeni bolniki (%)	Bolniki, ki so poznali pomen znaka (%)	Bolniki, ki so poznali informacijo (%)
do 35	9,8	47,3	45,5
35 - 45	14,1	41,4	44,7
46 - 55	22,5	41,8	48,9
56 - 65	20,5	41,6	46,3
66 - 75	19,6	30,1	32,0
nad 76	13,5	26,5	22,9
skupaj	100	37,9	40,1

Analiza podatkov z logistično regresijo je pokazala statistično značilen vpliv starosti bolnika ( $p=0,007$ ;  $\alpha = 0,05$ ) na poznavanje znaka in informacije o vplivu zdravila. Vpliv spola na poznavanje znaka in informacije o vplivu zdravila ni bil statistično značilen ( $p= 0,870$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

### Viri informacije o vplivu zdravila na psihofizične sposobnosti

**Slika 1:** Prikaz vira informacij o vplivu zdravila na psihofizične sposobnosti

**Figure 1:** Sources of information about medicines influence on psychophysics capacity



## 5 Razprava

V raziskavi smo se omejili na izdajo zdravil, ki so v Sloveniji glede na Pravilnik o označevanju zdravil označena s polnim ali praznim trikotnikom in je bil torej pri njih v postopku pridobivanja ali podaljšanja dovoljenja za promet z zdravilom ugotovljen vpliv na zmanjšano

sposobnost upravljanja vozil in strojev. Ugotovili smo, da sodelujoči bolniki relativno dobro poznajo trikotnik (poseben znak na zunanji ovojnini zdravila) in informacijo o vplivu zdravila na upravljanje vozil in strojev ne glede na vrsto prepovedi upravljanja in vrsto zdravil (preglednice 2, 3, 4). Ob tem pa je zelo pomembna tudi ugotovitev, da je imel informacijo o neželenem učinku zdravila in o pomenu posebnega znaka na obojnini ob prvi izdaji le vsak četrty bolnik. Bolniki, ki jim zdravilo ni bilo izdano prvič, so bili nekoliko bolje informirani tako o vplivu njihovega zdravila kot o pomenu oznake na zunanji ovojnini (preglednica 1).

Med bolniki, ki so poznali informacijo, jih je dobra polovica poznala tudi oznako na zunanji ovojnini. Pomen znaka na zunanji ovojnini, ki opozarja na nevarnost vožnje in upravljanja strojev pod vplivom teh zdravil, bi bilo smiselno obrazložiti tudi v priloženem navodilu za uporabo, in sicer v rubriki *Vpliv na sposobnost upravljanja vozil in strojev*, saj bi se s tem povečala njegova prepoznavnost in vloga.

V večini primerov v raziskavo vključenih izdanih trikotnikov je šlo za zdravila z delovanjem na živčevje, najpogosteje so to bili anksiolitiki in opioidni analgetiki, antidepresivi ter hipnotiki. Rezultati so pokazali, da vrsta zdravila ni imela vpliva na poznavanje informacije, razen v nekaterih primerih antidepresivov. Prav tako vrsta zdravila ni imela večjega vpliva na poznavanje oznake razen v nekaterih primerih antidepresivov in tudi opioidnih analgetikov (preglednica 3). Zanimive so ugotovitve, kako dobro bolniki poznajo informacije o vplivu zdravila pri najpogosteje izdanih trikotnikih v Sloveniji v letu 2006 (4): zolpidemu, bromazepamu, alprazolamu, tramadolu in kombinaciji tramadola s paracetamolom (preglednica 4).

Med tistimi bolniki, ki so poznali vpliv zdravila, so informacijo o tem v največjem deležu dobili pri zdravstvenih delavcih, le manjši delež bolnikov je to informacijo prebral tudi v priloženem navodilu za uporabo zdravila (slika 1). Samo trije bolniki so informacijo dobili tako pri zdravniku v ambulanti kot pri farmacevtu v lekarni in jo tudi prebrali v priloženem navodilu za uporabo.

Spol bolnika ni vplival na poznavanje znaka in informacije o vplivu (preglednica 5), kar potrjuje tudi obdelava podatkov z logistično regresijo. Po drugi strani pa smo ugotovili statistično značilen vpliv starosti bolnika. Rezultati kažejo nekoliko boljše poznavanje tako informacije o vplivu kot znaka pri osebah, mlajših od 35 let, in nekoliko slabše poznavanje pri osebah, starejših od 66 let (preglednica 6).

Ugotovitve raziskave smo vključiti tudi v pripravo smernic za farmacevtovo svetovanje ob izdaji trigonikov. Pri Sekciji farmacevtov javnih lekarn smo tako pripravili Komunikacijski protokol med farmacevtom in osebo v lekarni pri svetovanju za pravilno in varno uporabo zdravil, ki vplivajo na sposobnost upravljanja vozil in strojev. Protokol je spomladi 2008 obravnaval in sprejel Razširjeni strokovni kolegij za lekarniško farmacijo (35. seja) ter ga kot Protokol za svetovanje pri izdajanju zdravil z vplivom na psihofizične sposobnosti priporočil za uporabo vsem farmacevtom v lekarni ob izdaji tovrstnih zdravil.

Kljub informacijam v priloženem navodilu za uporabo in posebni oznaki na zunanji ovojni bolniki pričakujejo, da bosta zdravnik ob predpisovanju in farmacevt ob izdaji zdravila opozorila na nevarnosti vpliva zdravila v zvezi z vožnjo in upravljanjem strojev ter svetovanje tudi zabeležila. Poleg preventivnega delovanja je zelo pomembno tudi ustrezno svetovanje ob pojavu neželenih učinkov, pri čemer je potrebno sodelovanje med zdravnikom, farmacevtom in bolnikom. Pri tem bi zdravnik in farmacevt za zagotavljanje kakovosti storitev lahko uporabljala komunikacijski protokol in računalniško podporo, ki jo (jo bodo) nudijo sistemi pri predpisovanju in izdajanju zdravil.

V zvezi z vplivom zdravil in alkohola na vožnjo je pomembno vedenje, da so podatki o vplivu lahko rezultat eksperimentalnih študij, ki se izvajajo v laboratorijih na posebni simulatorjih ali v cestnem prometu na prostovoljcih ob znanem odmerku zdravila, in na drugi strani epidemioloških študij, ki zajemajo raziskave nesreč v prometu ter raziskave prisotnosti zdravil ali alkohola pri voznikih. Med študijami so lahko rezultati neprimerljivi, zato so v letih 2006/2007 mednarodni strokovnjaki pripravili smernice za prihodnje raziskave o vplivu zdravil na vožnjo in jih objavili kot evropski projekt DRUID, ki naj bi bil dokončan do leta 2010 (19). Ta projekt ima nalogo pregledati obstoječe klasifikacije/kategorije zdravil in označevanja vpliva zdravil na vožnjo, predlagati in se dogovoriti za kriterije in metodologijo za vzpostavitev evropskega sistema klasifikacije/kategorije zdravil in označevanja vpliva zdravil na vožnjo, razviti metodologijo za trajno nadgrajevanje klasifikacije/kategorije zdravil in označevanja o vplivu zdravil na vožnjo, predlagati klasifikacije/kategorije zdravil za posamezne terapevtske skupine zdravil, dosegljive na trgu (20). V juliju 2007 je bila na spletnih straneh Delovne skupina pri Mednarodnem svetu za zdravila in prometno varnost ([www.ICADTS.org](http://www.ICADTS.org)) objavljena razširjena lista zdravil, ki imajo lahko vpliv na psihofizične sposobnosti. Primerjava te razvrstitve zdravilnih učinkovin z listo registriranih zdravil v Sloveniji v Registru zdravil 2007, ki so opremljena z oznako polnega

rdečega trikotnika (III .kategorija) ali praznega trikotnika (II. kategorija), je pokazala, da se listi v precejšnji meri ujemata. Vsebujeja pa tudi določene razlike, o katerih bi veljajo razpravljati v okviru strokovne skupine. ICADTS na primer razvršča benzodiazepinske anksiolitike bromazepam, lorazepam in oksazepam ali antidepresive amitriptilin, doksepin, mianserin, trazodon, mirtazepin v III. kategorijo, v Sloveniji pa so zdravila označena s praznim trikotnikom. Po drugi strani pa na primer antihistaminik cetirizin v Sloveniji nima oznake, ICADTS pa ga razvršča v II. kategorijo (5, 13, 18).

Informacije o zmanjšani psihofizični sposobnosti kot posledici uporabe določenega zdravila, informacije o oznakah, ki naj bi bolnika na to opozarjale, ter informacije o možnih ukrepih in preprečevanju so pomembne za bolnika, saj danes za večino ljudi pomeni vožnja z avtomobilom oziroma delo s stroji svobodo in neodvisnost ali pa je del njihove službe. Vloga bolnika pa je upoštevanje podanih navodil in opozoril. Pomembno pa je tudi spremljanje in poročanje pojavljanja neželenih učinkov zdravil. Doslednejše izvajanje navedenih ukrepov bi pripomoglo k pravilnejši in varnejši uporabi zdravil ter s tem k večji varnosti udeležencev v cestnem prometu.

## 6 Sklep

Bolnik mora poznati vpliv zdravila na zmanjšanje psihofizičnih sposobnosti pri upravljanju vozil ali strojev. Pomembno je svetovanje ob prvem predpisovanju in izdajanju zdravil ne glede na oceno tveganja vpliva zdravila na sposobnost vožnje in upravljanja s stroji ter svetovanje ob pojavu neželenih učinkov. Potrebno je sodelovanje med zdravnikom, farmacevtom in bolnikom. V prihodnje bi lahko z raziskavo ugotavljali, ali bolnik dejansko razume in ob tem tudi dejansko upošteva navodilo zdravnika in farmacevta v zvezi z neželenimi učinki predpisanega zdravila.

## 7 Literatura

1. Bilban M. Ocenjevanje vozniške zmožnosti. Zdravila in prometna varnost. Zbirka prispevkov prikazanih na simpoziju Zdravila in prometna varnost 25.9.2007 v Ljubljani: 21-40
2. Zakon o varnosti cestnega prometa (ZVCP-UPB4), Uradni list RS 133/2006, 139/2006
3. Kuštrin Samba A. et al. Zdravila v cestnem prometu: Iz kazuis-tike inštituta za sodno medicino. Zdravila in prometna varnost. Zbirka prispevkov prikazanih na simpoziju Zdravila in prometna varnost 25.9.2007 v Ljubljani: 207-213
4. Pisk N, Frankič D. Ocena porabe zdravil z vplivom na psihofiz-ične sposobnosti bolnika v Sloveniji v letu 2006. Farmakon št. 27, december 2007: 5-6
5. Categorization system for medicinal drugs affecting driving per-formance, ICADTS List Version June 26th, 2006; [www.icadts.org](http://www.icadts.org). (spletna stran Mednarodnega sveta za alkohol, droge in promet-no varnost), dostopano junij 2007
6. EMEA. A GUIDEINE ON SUMMARY OF PRODUCT CHARAC-TERISTICS. 2005, <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuti-cals/eudralex/vol-2/c/spcguidrev1-oct2005.pdf>
7. Vrhovec B. in sod. Farmakoterapijski priručnik, Medicinska naklada, Zagreb 2003: 764-767
8. ROTE LISTE, Arzneimittel in Verkehr, ECV 2004: 347

9. Driving when you are taking medications, dostopano na [www.American Pharmacists Associations](http://www.AmericanPharmacistsAssociations.com), dostopano junij 2007
10. [http://www.fda.gov/cder/consumerinfo/driving\\_taking\\_meds\\_high.pdf](http://www.fda.gov/cder/consumerinfo/driving_taking_meds_high.pdf), dostopano junij 2007
11. <http://www.aponet.de/arzneimittel/strassenverkehr/index.html>, dostopano junij 2007
12. Arzneimittel und Fahrttaetigkeit. In H. Gebler, G. Kindl, Pharmazie fur die Praxis, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1998: 137-141.
13. Register zdravil RS, 2007, MZ – JAZMP in IVZ
14. Baza podatkov o zdravilih, Povzetki temeljnih značilnosti zdravil; dostopano julij 2007
15. Stanovnik L. Zdravila, ki vplivajo na psihofizične sposobnosti. Zdravila in prometna varnost. Zbirka prispevkov prikazanih na simpoziju Zdravila in prometna varnost 25.9.2007 v Ljubljani: 94-98
16. Pravilnik o označevanju zdravil in navodilu za uporabo, Uradni list RS 54/2006
17. Pravilnik o farmakovigilanci zdravil za humano uporabo, Uradni list RS 53/2006
18. Karlovšek Zorec M. Zdravila in prometna varnost. Zdravila in prometna varnost. Zbirka prispevkov prikazanih na simpoziju Zdravila in prometna varnost 25.9.2007 v Ljubljani: 41-46
19. Verstraete A, Raes E, Pijl K. The modern trends in alcohol, drugs and driving research. International Meeting on Forensic Medicine Alpe-Adria-Pannonia, Portorož, Slovenija, 7-10 May, 2008. Institute of Forensic Medicine, Medicinal Faculty, 2008: 7,8
20. Alvarez F.J. Medicinal drugs and driving: Progress in the categorization and labeling of medicinal drugs impairing driving ability. International Meeting on Forensic Medicine Alpe-Adria-Pannonia, Portorož, Slovenija, 7-10 May, 2008. Institute of Forensic Medicine, Medicinal Faculty, 2008: 9



# Novi doktorji znanosti

prof. dr. Julijana Kristl

**dr. Zrinka Abramović, mag. farm.**

## **Povečanje oksigenacije in učinkovitosti radioterapije kožnih tumorjev s topikalnim dajanjem vazodilatatorja**

Zrinka Abramović, mlada raziskovalka na Institutu Jožef Stefan in študentka podiplomskega študija Biomedicina je zaključila interdisciplinarni študij pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in dr. Marjete Šentjerc z doktorsko nalogo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Interes za oksigenacijo tkiv, ki vpliva na vrsto fizioloških in patofizioloških procesov, še vedno raste. Znano je, da nizka koncentracija kisika v koži signifikantno korelira s počasnim celjenjem ran, poveča nevarnost infekcij, nizka oksigenacija tumorjev pa je lahko vzrok za manjši odziv na obsevanje, kemoterapijo in tudi za večjo sposobnost metastaziranja.

V temi je doktorandka predpostavila, da je možno z nanosom vazodilatatorja na kožo razširiti žile, povečati oksigenacijo kože in kožnih tumorjev ter po obsevanju z rentgenskimi žarki upočasniti njihovo rast.

Za potrditev postavljenih hipotez je doktorandka v raziskovalnem delu uporabila različne tehnološke metode za vgraditev benzil nikotinata (BN), za njihovo vrednotenje pa fotonsko korelacijsko spektroskopijo, HPLC, oscilacijski reometer idr. Elektronska paramagnetna resonančna (EPR) spektroskopija in oksimetrija pa sta bili osrednji metodi za ugotavljanje sprememb v oksigenaciji tkiva in fluidnosti membran.

Dokazala je, da je oksigenacija odvisna od vrste nosilnega sistema benzil nikotinata. Liposomi in nanodelci spremenijo bazne linije  $pO_2$ , medtem ko jih mikroemulzije ne. Nosilec BN vpliva na permeacijo skozi kožo mišk in posledično na hitrost in povečanje koncentracije kisika v zdravi koži. Pod vplivom BN se  $pO_2$  spremeni po določenem času, doseže vrh in se zopet zmanjša zaradi homeostaze. Učinek BN se izrazi hitreje, če je le-ta vgrajen v liposome ali mikroemulzije, kot če je dispergirana v hidrogel. Pospeševalci perkutane absorpcije še dodatno

povečajo prehajanje in delovanje BN. Dokazala je, da je vzrok za to ugotovitev povečana fluidnost lipidne rožene plasti, ki jo spremenita pospeševalca.

V nadaljevanju je na dveh tumorskih modelih (RIF-1, radiation induced fibrosarcoma in LPB sarcom), ki se izrazito razlikujeta v ožiljenju, spremljala raven kisika v odvisnosti od rasti tumorja in potrdila, da se oksigeniranost tumorjev znižuje z rastjo tumorja, ne glede na začetni nivo kisika. BN nanešen na kožo nad RIF-1 tumorjem značilno poveča koncentracijo kisika v tumorju 20 do 30 minut po nanosu prve štiri dni (enako, kot pri zdravi koži). Tako je določila čas, ko je povečanje koncentracije kisika v tumorju največje in s tem, kdaj je lahko uspešnost radioterapije največja.

Zrinka Abramović je med študijem razvila kompetence, ki ji bodo omogočale uspešno načrtovanje in izvajanje raziskovalnih nalog tudi v kompleksnih situacijah. Naj navedem le nekatere: samostojnost, kreativnost, vztrajnost in delavnost. Ni se zbalala raziskovalnega dela v ZDA na Dartmouth Medical School, EPR Center for the study of viable systems. Objavila je 8 člankov v revijah z visokim faktorjem vpliva, predstavila raziskovalno delo na 19 mednarodnih konferencah, delala timsko pri treh domačih in tujih projektih, vodila 2 diplomantki, pa tudi sodelovala pri organizaciji in pripravi zbornika za mednarodno Regionalno srečanje biofizikov v letu 2005 idr. Prejela je dve nagradi - Krkino nagrado za študente in L'Oreal nagrado za ženske v znanosti v letu 2008. Po doktoratu se je zaposlila v Lek-u kot samostojna raziskovalka v Oddelku za nanotehnologijo.

Rektorica Univerze v Ljubljani prof. dr. Andreja Kocijančič je imenovala Zrinko Abramović, mag.farm., za doktorico znanosti s področja farmacije dne 17. junija 2008.

*Julijana Kristl*

**dr. Petra Kocbek, mag. farm.**

## **Razvoj nanosistemov za povečanje hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin in aktivno ciljanje tumorskih celic**

Petra Kocbek, mag.farm. je zaključila interdisciplinarni študijski program Biomedicina z doktorsko nalogo »Razvoj nanosistemov za povečanje hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin in aktivno ciljanje tumorskih celic« na Univerzi v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, ki jo je izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in jo zagovarjala v marcu 2008.

Področje doktorske naloge je nanotehnologija. Cilj naloge je bil, da preuči možnosti za pripravo nanosuspenzij in polimernih nanodelcev za vnos težko topnih učinkovin v telo ter oblikuje imunonanelce za ciljano dostavo proteinskih učinkovin v tumorske celice.

Za izdelavo nanosuspenzij ibuprofena je razvila emulzijsko-difuzijsko metodo in metodo emulgiranja taline. Z nadzorom tehnoloških parametrov je pripravila nanosuspenzije in s tem dosegla povečano hitrost raztapljanja delcev nanometrskih velikosti v primerjavi z mikronizirano učinkovino.

V nadaljevanju se je posvetila raziskovanju dveh novih, težko topnih učinkovin, sintetiziranih na FFA, ki sta inhibitorja 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 1 in tako potencialni učinkovini za zdravljenje raka. Ugotovila je, da sami spojini v raztopini oz. suspenziji v *in vitro* testih nista izkazovali biološkega učinka; poleg tega je bila stabilnost ene izmed učinkovin v vodnem mediju majhna. S pomočjo vgrajevanja v nanodelce iz poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) in testiranja na celični liniji T-47D, ki izraža tarčni encim, je določila zmanjšano proliferacijo in spremenjeno morfologijo celic kot odraz biološkega učinka vgrajenih inhibitorjev. Ti rezultati kažejo, da lahko z vgrajevanjem spojin v nanodelce dosežemo terapevtsko uporabno farmacevtsko obliko za vnos težko topnih učinkovin, ki same ne dosežejo mesta delovanja v zadostni koncentraciji in tudi ne farmakološkega učinka.

Aktivno ciljanje tumorskih celic je cilj razvoja zdravil za zdravljenje raka, saj na tak način povečamo učinkovitost zdravljenja in hkrati zmanjšamo neželene učinke. Z emulzijsko-difuzijsko metodo je izdelala nanodelce iz kopolimera mlečne in glikolne kisline in vanje vgradila modelno proteinsko učinkovino tj. kokošji cistatin, ki je inhibitor cisteinskih proteaz. Na površino nanodelcev je z adsorpcijo in kovalentno vezavo pripela monoklonsko protitelo CDI 315, ki prepozna specifični antigen na površini celic raka dojke. Ugotovila je, da je ustrezna le metoda izdelave imunonanelcev z adsorpcijo, saj je le tako protein ohranil biološko aktivnost in protitelesa sposobnost prepoznavanja in vezave na tarčni antigen. V kokulturi celic raka dojke MCF-10A neoT z enterociti Caco-2 oz. z diferenciranimi monociti/makrofagi U-937 so imunonanelci z vgrajenim cistatinom selektivno vstopili le v tarčne celice in povzročili inhibicijo znotrajcelične proteolizne aktivnosti. Rezultati potrjujejo uspešnost aktivnega ciljanja tumorskih celic in selektivnega vnosa biološko aktivne proteinske učinkovine z imunonanelci.

Doktorsko delo celovito prikazuje razvoj in vrednotenje nanosuspenzij in nanodelcev za ciljano zdravljenje od samih začetnih raziskav do končnega vrednotenja biološkega učinka na ciljnem mestu delovanja v celicah. Rezultate je objavila v 5 člankih s faktorjem vpliva in jih predstavila na 6 mednarodnih konferencah. Naj na tem mestu posebej poudarim njihovo odmevnost - objavljeni članki so bili citirani več kot tridesetkrat, dva članka pa sta bila že doslej v ScienceDirect med 25 najbolj odmevnimi, eden v International Journal of Pharmaceutics in drugi v Journal of Controlled Release.

Rektorica Univerze v Ljubljani prof. dr. Andreja Kocijančič je imenovala Petro Kocbek, mag.farm. za doktorico znanosti s področja farmacije dne 17. junija 2008.

*Julijana Kristl*

# Novice iz sveta farmacije

Urejšajo: dr. Andrijana Tivadar, dr. Petra Slanc Može, Marjetka Smolej, dr. Bojan Doljak, prof. dr. Borut Štrukelj

*Tokrat vam v rubriki Novice iz sveta farmacije ponujamo nekaj drugačnega, zanimivo branje, ki je v prvi vrsti našlo mesto v naši reviji zaradi pozitivnih vtisov Christine Kurz, študentke iz Nemčije, ki je v okviru projekta Erasmus preživela očitno nepozaben semester na ljubljanski Fakulteti za farmacijo. Ko je v obdobju od 1. oktobra do 28. februarja delala na Evropski agenciji za zdravila (EMA) in ugotovila, da tam ni mogoče srečati Slovence (razen delegatov, ki hodimo tja na sestanke različnih komisij in delovnih skupin), je bila milo rečeno začudena. Srečali sva se decembra 2008 na srečanju inšpektorjev, članov delovne skupine za dobro klinično prakso (GCP IWG = Good Clinical Practice Inspectors Working Group), spregovorili sva nekaj besed in spraševala me je, ali v Sloveniji sploh poznamo možnosti zaposlovanja na EMA. Zanimalo jo je, kako bi lahko vse skupaj naredili bolj zanimivo tudi za Slovence. Predlagala sem ji, da napiše članek za Farmaceutski vestnik, podobno pa jo je očitno vzpodbujal tudi prof. Kreft, pri katerem je delala v času, ko je bila v Sloveniji, in tako je nastal spodnji prispevek, ki ga je nato dodelal še uradnik na EMA gospod Fergal Cooney. Želim vam prijetno branje in pogumno novim izkušnjam naproti.*

Andrijana Tivadar

## Erasmus upgraded - my time as EMA trainee

Christine Kurz, Fergal Cooney

When I heard about European Medicines Agency (EMA) for the first time during my pharmacy studies in Germany, I could not quite picture what it is they actually do. It seemed to me that the majority of the EMA's work, even in the EU wide centralised procedure for the marketing authorisation of medicinal products, is done in the individual EU member state authorities. So when I read about the opportunity to apply for a five months paid traineeship it seemed the best way to find out for myself about the Agency's work and how life is here in London.

In case you are now wondering why a German pharmacist is writing this article in a Slovenian pharmacy journal, I was an Erasmus diploma student in Prof. Samo Kreft's lab in 2004 and brought back many happy memories and a deep affection for the country and its inhabitants. So I was quite disappointed to find not a single Slovenian staff member at EMA with whom I could test my meagre knowledge of the language. Prof. Kreft, who is a delegate for the Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) and other Slovenian delegates, encouraged me to write this article to promote information about the Agency and its traineeship programme.

I applied through a straightforward online application in June 2008 and successfully passed a telephone interview. I was offered a traineeship contract from 1<sup>st</sup> of October to the end of February 2009 in the Inspections Sector at EMA <http://www.ema.europa.eu/Inspections/index.html>.

The first two weeks in October were dedicated to training given by my Sector colleagues and also some general introductory training for new starters. With a much clearer view about the work of the Agency and its organisation, I started in my designated team. I worked under the supervision of the Scientific Administrators responsible for the Good Clinical Practice (GCP) and Pharmacovigilance (PhV) Inspection co-

ordination team. The majority of my tasks were to support the Scientific Administrators in their daily routine. This included validating Marketing Authorisation Applications (MAAs) from a GCP and PhV point of view and all aspects of Inspection coordination, including the preparation of Inspection Requests for the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) and correspondence to Inspectors, Rapporteurs and Applicants, as well as validation and circulation of Inspections Reports and attending clarification meetings with Inspectors, Rapporteurs and/or Applicants.

EMA does not directly conduct inspections as these are done by inspectors at the national authorities in the member states. The Inspections Sector is responsible for co-ordinating any inspection requested by the CHMP or Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) in connection with the assessment of MAAs and/or the assessment of matters referred to these committees in accordance with Community legislation. But this does not mean the work done by EMA staff is not of a scientific nature. Although it includes a lot of administrative work in coordinating inspections, the interaction with Inspectors, Rapporteurs and Applicants requires the Scientific Administrators to be fully aware of the ongoing assessment of the product and the issues raised by any inspection.

As a full inspection process from request to report to final CHMP opinion takes usually longer than a 5 month traineeship I was unable to follow one product through its cycle. On the other hand I saw many examples of each step in a variety of different applications with each containing its own challenges. In addition I was involved in several ad hoc statistical projects using Excel (I discovered I am rather fond of this type of work).

Another important duty of the Inspections Sector is to host the GCP and PhV Inspectors Working Group. It was very interesting to meet the Inspectors during breaks to get to know a little bit more about the actual inspection process and the differences in the national inspection legislation. Outside of my duties in the Inspections Sector I was able to attend several training sessions as well as other scientific and regulatory meetings held at the EMA. The helped me

broaden my understanding of the role and responsibility of EMEA and the Community legislation.

To conclude my traineeship at EMEA has been a very valuable and enriching experience on a professional and personal level. From a personal point of view I discovered the special multicultural environment working environment of a European Union bodies. This was a truly enriching experience which I very much enjoyed. I must also mention, of course, the opportunity to live in this exciting city and explore it together with the (nearly) 40 other trainees. The majority of trainees were recent undergraduates but there were others, like myself, who had already finished a PhD or a first short term work experience. The fact that trainees came from all over the EU contributed to that special "Erasmus feeling" and many new friends were made during the time here.

Professionally I had the opportunity to be actively involved in the daily work of the Inspections co-ordinators team. By attending scientific and regulatory meetings I was also informed about the current topics of the EMEA core business. I was able to further develop my knowledge and understanding of the European pharmaceutical legislation and its practical implementation at EMEA, giving me a much clearer view of the role and function of this European Agency. Now I can safely say I have a clearer picture of the work of EMEA.

I would now encourage Slovenian students of pharmacy to take an interest in the Agency's activities and the traineeship programme. If you wish to apply for a traineeship you should refer to the EMEA homepage <http://www.emea.europa.eu/htms/general/admin/recruit/trainees.htm>.

If you have any queries about the Agency or the traineeship, do not hesitate to contact one of the contact points of EMEA given below.

### Contact points:

EMEA homepage: <http://www.emea.europa.eu>

EMEA general information contact: [info@emea.europa.eu](mailto:info@emea.europa.eu)

EMEA trainee contact: [traineeship@emea.europa.eu](mailto:traineeship@emea.europa.eu)

Author of this article: [christina.kurz@uni-bonn.de](mailto:christina.kurz@uni-bonn.de)

### Useful information from the EMEA website

#### EMEA overview:

(<http://www.emea.europa.eu/htms/aboutus/emeaoverview.htm>)

<http://www.emea.europa.eu/htms/aboutus/organigramme.htm>The European Medicines Agency (EMA) is a decentralised body of the European Union with headquarters in London. Its main responsibility is the protection and promotion of public and animal health, through the evaluation and supervision of medicines for human and veterinary use.

- The EMA is responsible for the scientific evaluation of applications for European marketing authorisation for medicinal products (centralised procedure). Under the centralised procedure, companies submit a single marketing authorisation application to the EMA. Once granted by the European Commission, a centralised (or 'Community') marketing authorisation is valid in all European Union (EU) and EEA/EFTA states (Iceland, Liechtenstein and Norway).

- All medicinal products for human and animal use derived from biotechnology and other hightechnology processes must be approved via the centralised procedure. The same applies to all human medicines intended for the treatment of HIV/AIDS, cancer, diabetes, neurodegenerative diseases, autoimmune and other immune dysfunctions, and viral diseases, as well as to all designated orphan medicines intended for the treatment of rare diseases. Similarly, all veterinary medicines intended for use as performance enhancers in order to promote the growth of treated animals or to increase yields from treated animals have to go through the centralised procedure.
- For medicinal products that do not fall under any of the abovementioned categories, companies can submit an application for a centralised marketing authorisation to the EMA, provided the medicinal product constitutes a significant therapeutic, scientific or technical innovation, or the product is in any other respect in the interest of patient or animal health.
- The safety of medicines is monitored constantly by the Agency through a pharmacovigilance network. The EMA takes appropriate actions if adverse drug reaction reports suggest changes to the benefit risk balance of a medicinal product. For veterinary medicinal products, the Agency has the responsibility to establish safe limits for medicinal residues in food of animal origin.
- The Agency also plays a role in stimulating innovation and research in the pharmaceutical sector. The EMA gives scientific advice and protocol assistance to companies for the development of new medicinal products. It publishes guidelines on quality, safety and efficacy testing requirements. A dedicated office established in 2005 provides special assistance to small and medium-sized enterprises (SMEs).
- Five scientific committees, composed of members of all EU and EEA/EFTA states, conduct the main scientific work of the Agency: the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), the Committee for Orphan Medicinal Products (COMP), the Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) and the Paediatric Committee (PDCO). A sixth scientific committee – the Committee for Advanced Therapies (CAT) – will be established at the end of 2008.
- The Agency brings together the scientific resources of some 40 national competent authorities in 30 EU and EEA/EFTA countries in a network of over 4,000 European experts. It contributes to the European Union's international activities through its work with the European Pharmacopoeia, the World Health Organization, and the ICH and VICH trilateral (EU, Japan and US) conferences on harmonisation, among other international organisations and initiatives.
- The EMA is headed by the Executive Director and has a secretariat of approximately 470 staff members in 2008. The Management Board is the supervisory body of the EMA, responsible, in particular, for budgetary matters.
- The Agency is also involved in referral procedures relating to medicinal products that are approved or under consideration by Member States in noncentralised authorisation procedures.



### Traineeship:

(<http://www.emea.europa.eu/htms/general/admin/recruit/trainees.htm>)

The European Medicines Agency has an in-service training programme. The programme gives trainees an understanding of the Agency and its role within the activities of the European Union, enables them to acquire practical knowledge in one of the EMEA's Units and to obtain professional experience in the course of their work. The traineeships are organised twice a year, each for a period of five months, beginning in March and October. The programme is addressed to mainly young university graduates, without excluding those who - in the framework of lifelong learning - have recently obtained a university diploma and are at the beginning of a new professional career. Interested candidates should download the application form and use the "submit by email" function at the top of the form. Applications can also be sent by normal mail or fax. If a candidate is not recruited at the first attempt he/she may re-apply, however it is necessary to re-submit a full application afresh.

The EMEA receives approximately 400 traineeship applications per year of which around 40 candidates are offered a placement. Due to the large volume of applications EMEA is not in a position to reply to unsuccessful candidates. Candidates who are not contacted within the telephone contact period can assume they have not been chosen. Successful candidates will typically have a background relating to the activities of the EMEA, i.e. pharmacy, medicine, life sciences, healthcare, chemistry or information technologies. Recently qualified lawyers with an interest in pharmaceutical regulatory affairs and recently qualified candidates with an interest in human resources / budget / accounts are welcomed as well. Any candidate with the minimum requirements may apply.

Trainees are selected from nationals of the Member States of the European Economic Area (the Member States of the European Union, Iceland, Liechtenstein and Norway) and of candidate countries benefiting from a pre-accession strategy. Only a very limited number of nationals of non-Member States can be accepted. Trainees are responsible for making sure that they obtain the correct visa, where applicable, to enter the United Kingdom.

### Minimum Requirements:

- Possession of a university degree or equivalent at the time of applying;
- A good command of English and one or more other official Community languages.

### Training grant:

The Agency pays a maintenance grant of £1250 net per month and pays a travel allowance to compensate the expenses incurred at the beginning and at the end of the in-service training from the place of residence, which is normally the address provided for correspondence. It is recommended to read carefully the rules available on the website.

## EMEA in FDA izdali nujno opozorilo zaradi 3 smrtnih primerov, povezanih z zdravilno učinkovino efalizumab (raptiva)

Borut Štrukelj

Efalizumab je sodobna biološka zdravilna učinkovina iz skupine humaniziranih monoklonskih protiteles, ki se uporablja za srednje-močno do močno izraženo luskavico. Monoklonsko protitelo efalizumab se veže na LFA-1 receptor na limfocitih T in deluje kot imunosupresorska zdravilna učinkovina. Migracija limfocitov T v podkožje je zmanjšana in znaki luskavice se znatno izboljšajo. Daje se enkrat tedensko kot subkutana injekcija.

Nedavne farmakovigilancijske študije so potrdile, da izkazuje efalizumab močne neželene učinke, med katerimi je najbolj izražena napredovana generalizirana levkoencefalopatija, bistveno hitreje pa lahko pride tudi do bakterijske sepse, do meningitisa ali do invazivne glivične okužbe. Napredovana levkoencefalopatija nastane zaradi primarne virusne okužbe, ki se hitro širi v razna središča v možganih. Klinični znaki so: izrazita šibkost, izguba koordinacije, sprememba vidnega polja in zamegljen vid, težko sporazumevanje in govor ter sprememba osebnosti. Trenutno ne poznamo učinkovitega zdravljenja nastalih simptomov.

Do sedaj so ugotovili napredovano levkoencefalopatijo v štirih primerih, trije bolniki so umrli, vsi so se zdravili z efalizumabom vsaj tri leta in niso med zdravljenjem prejeli nobene druge imunosupresivne učinkovine.

Zaradi izrazitih in nevarnih neželenih učinkov EMEA in FDA svetujeta, da se efalizumab do nadaljnjega ne uporablja oziroma je potrebno natančno pretehtati prednosti zdravila pred njegovimi neželenimi učinki. Začasen odvzem dovoljenja za promet je izdala tudi Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke.

### Vir:

1. FDA Press Release, 19. Februar 2009
2. EMEA/CHMP/20857/2009

## Nove povezave med depresijo in boleznimi srca

Bojan Doljak

Znano je, da je pogostnost kardiovaskularnih bolezni (KVB) in srčnega infarkta (SI) večja pri bolnikih z depresijo, ki naj bi jih bilo v ZDA okrog 18 milijonov, oz. 9 % prebivalstva. Depresija po nekaterih ocenah spada med glavne dejavnike tveganja za nastanek KVB. Tveganje lahko poveča tudi za 2 do 3-krat, kar je celo več kot zaradi hipertenzije ali kajenja. Po najnovejših izsledkih bi vzrok za to lahko bilo kronično vnetje. V najnovejši študiji so namreč primerjali serumske vrednosti 5 vnetnih bioloških označevalcev (biomarkerjev) pri 22 bolnikih s hujšimi depresivnimi motnjami s serumskimi vrednostmi 17 prostovoljcev brez depresije. Normalne so bile vrednosti za C-reaktivni protein (CRP) in ligand celičnega antigena-40 (CD40L), povišane pa so bile vrednosti za dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), kemotaktični protein-1 za monocite (MCP-1). Prav za slednjega do sedaj ni bilo znano, da je povišan pri depresiji. Bolniki niso imeli kronarne arterijske bolezni, artritisa, diabetesa ali hipertenzije, ki bi lahko vplivali na izmerjene vrednosti vnetnih dejavnikov.

Bolniki z depresijo so nato 8 tednov prejeli venlafaksin, ki je v nižjih koncentracijah selektivni inhibitor privzema serotonina, pri višjih pa tudi inhibitor privzema noradrenalina. Po 8 tednih, se je razpoloženje pri vseh bolnikih, ki so prejeli venlafaksin, izboljšalo, vendar pa so ostale vrednosti TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  in MCP-1 še naprej povišane. Iz ekstrapoliranih rezultatov je razvidno, da bi se pri daljši uporabi omenjenega antidepresiva normalizirale tudi vrednosti omenjenih vnetnih dejavnikov, vendar bi po nekaterih ocenah za to bilo potrebno tudi do 6 mesecev dolgo jemanje, kar je do 3-krat dlje kot običajno. Izboljšanje razpoloženja in normalizacija bioloških označevalcev pri depresivnih bolnikih časovno ne sovpadata, zato bi bilo mogoče smiselno razmisliti o podaljšanju terapije z antidepresivi, tudi po dosegu primarnega terapevtskega cilja, to je odpravi depresivne motnje.

Vnetje je velikokrat posledica tudi kroničnega stresa, ki poruši občutljivo ravnovesje med simpatičnim in parasimpatičnim živčnim sistemom. Pri konstantnem vzdraženju simpatika, se zmožnost organizma, da nadzira vnetje bistveno zmanjša. Posledično se aktivirajo trombociti, ki se lepijo na žilni endotelij in sčasoma privedejo do nastanka plakov in ateroskleroze. Mogoče bo v prihodnje rutinsko določati status vnetnih dejavnikov v serumu in tako spremljati vpliv stresa na naše zdravje.

Hkrati z zgornjimi izsledki, v drugi študiji z 2028 depresivnimi ljudmi, poskušajo ovreči splošno sprejeto mnenje, da je povišan krvni tlak pri depresivnih ljudeh posledica depresije. V študiji so bolniki z depresijo, ki se niso zdravili, imeli nižje vrednosti krvnega tlaka kot zdravi ljudje, tisti, ki so prejeli antidepresive pa višje. Pri uporabi tricikličnih antidepresivov so bile vrednosti krvnega tlaka povišane za okoli 10%. Ali je depresija posledica nižjega krvnega tlaka ali obratno še ni znano.

Vir:

1. Piletz JE et al. Pro-inflammatory biomarkers in depression: Treatment with venlafaxine. World Journal of Biological Psychiatry, Dec 2008.
2. Licht CM et al. Depression Is Associated With Decreased Blood Pressure, but Antidepressant Use Increases the Risk for Hypertension. Hypertension, Feb 2009.

## 2. seminar z mednarodno udeležbo »Uporaba prokalcitonina in ostalih označevalcev sistemskih okužb v laboratorijski medicini in klinični praksi«

Milan Skitek

5. decembra 2008 je Društvo za laboratorijsko medicino (v nadaljnem besedilu DLM) organiziralo 2. seminar z mednarodno udeležbo »Uporaba prokalcitonina in ostalih označevalcev sistemskih okužb v laboratorijski medicini in klinični praksi«. Seminar je bil namenjen vsem profilom medicinskega osebja, še posebej tistim, ki se ukvarjajo s problematiko sistemskih bakterijskih okužb (SBO), sistema vneta odgovora (SIRS-a) in sepse pri odraslih in otrocih. Prav tako je bil seminar namenjen tudi vsem, ki so udeleženi in zagotavljajo podporo omenjeni dejavnosti, od širšega zdravstvenega osebja in pacientov do proizvajalcev-dobaviteljev IVD.

Cilji izobraževanja so bili v učinkovitejšem vodenju in racionalni diagnostiki SBO, soočenju različnih pogledov in usmeritev ter boljši povezavi med akterji v tem procesu.

Celodnevni program je bil sestavljen iz 3 delov, ki so zajeli:

Stanje in razvoj metod določanja označevalcev SBO s poudarkom na inovativnih spremembah in izboljšavah

Klinična problematika v povezavi z razvojem laboratorijske medicine

Priporočila in smernice, vključno z zagotavljanjem 24 urne laboratorijske službe, ekonomiko in financiranjem laboratorijske dejavnosti znotraj zdravstvenega sistema.

Program in izvedba seminarja:

8:30 – 9:00	Prijava udeležencev
9:00 – 9:10	Pozdrav udeležencem, otvoritev
9:10 – 9:30	Skitek M: Stanje laboratorijske medicine na področju SBO
9:30 – 9:50	Derganc M, Pavčnik Arno M, Grošelj Grenc M: Prokalcitonin in novi kazalci sistema vneta odgovora v diagnostiki sepse pri kritično bolnih novorojenčkih in otrocih
9:50– 10:10	Meisner M: Improvement of diagnosis of sepsis

	and guide of an individual, patient adapted antibiotic therapy using procalcitonin.
10:10 – 10:30	Jerin A: Določanje PCT in drugih vnetnih označevalcev pri sepsi
10:30 – 10:50	Nagode K: Primerjava metod določanja PCT
10:50 - 11:20	Diskusija&Odmor
11:20 – 11:40	Kremžar B, Stecher A: Klinične izkušnje in zapleti SBO v enoti intenzivne terapije
11:40 – 12:00	Makuc V: Kontrola infekta z rezistentnimi sevi v enoti intenzivne terapije
12:00 – 12:20	Kobe M, Prezelj M: POCT na področju SBO
12:20– 13:00	Diskusija&Odmor s prigrizkom
13:00 – 13:20	Skitek M, Jerin A: Priporočila in smernice za določanje PCT
13:20 – 13:50	Predstavniki IVD: Priporočila, smernice in razvoj IVD na področju SBO (certificiranje, licence, patenti)
13:50 – 14:20	Plenarna diskusija&zaključki

Predavatelji so bili strokovnjaki laboratorijske medicine in klinične medicine ter predstavniki dobaviteljev, gostili pa smo tudi

uveljavljenega strokovnjaka za SBO iz Nemčije prof.dr. Meisnerja. Poudarek je bil na pogovorih s predavatelji in izmenjavi izkušenj med udeleženci.

Simpoziju je prisostvovalo preko 80 udeležencev, med njimi so bili najštevilnejši predstavniki laboratorijske medicine.

Simpozija se bomo spominjali po odličnih predavanjih in sproščenem ter ustvarjalnem vzdušju. Optimizacija vodenja in racionalne diagnostike SBO predstavlja poseben izziv in zahteva nenehno spremljanje hitrega razvoja in učinkovitejše povezovanje novih znanj z obstoječimi laboratorijskimi in kliničnimi praksami. Ključno pa je seveda tudi dobro povezovanje medicinskega osebja in ostalih udeležencev na tem področju. Prav zato so bili odzivi udeležencev seminarja in širše javnosti zelo naklonjeni in predstavljajo nagrado za vse aktivno sodelujoče. Predstavljajo pa ti odzivi tudi obveznost za prihodnost, da bo naš tradicionalni seminar DLM postal eden izmed osrednjih dogodkov laboratorijske medicine v našem prostoru.

Zahvaljujemo se vsem poslovnim partnerjem, ki so omogočili naše druženje, še posebej Sanolaborju, ki nam je dal ponovno na voljo svoje prostore.

# 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 Marjan Držić; foto: skulpture Boles Gaberščak, travnik, Bojan Pergovnik; oblikovanje Eviča Lukež





# Bilobil. In nič vam ne uide iz glave!



## Za boljši spomin in večjo moč koncentracije.

Redno jemanje Bilobila izboljšuje prekrvitev. Vaši možgani bodo bolj oskrbljeni s kisikom in energijo. Za trajnejši učinek priporočamo vsaj trimesečno zdravljenje.

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

 KRKA

Pred uporabo natančno preberite navodilo!

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