

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 2 • J U L I J 2 0 0 6 • L E T N I K 5 7

Odgovorni urednik
Borut Štrukelj

Častni glavni urednik
Aleš Krbavčič

Glavna urednica
Andrijana Tivadar

Uredniški odbor
Tajda Gala Miharija
Stanko Gobec
Katja Gombač Aver
Iztok Grabnar
Janja Marc
Franc Vrečer

Izdajateljski svet
Stane Srčič
Mojca Kerec
Tatjana Kogovšek Vidmar
Mateja Malešič
Zofija Vitkovič
Anamarija Zega
Magda Zimic

Naslov uredništva / Adress of the Editorial Office:
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, 4 redne in 2 posebni številki.
Letna naročnina je 15.000 SIT, za člane SFD je vključena
v članarino.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Avtor fotografije na naslovnici, Samo Kreft

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3000 izvodov

Letnik 2006 sofinancira Javna agencija RS za
raziskovalno dejavnost.

Farmaceutski vestnik (Pharmaceutical Journal of
Slovenia) is published quarterly by the Slovenian
Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland
15.000 SIT other countries US\$ 100.

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

UVODNIK

Beseda, ki se v zadnjem letu zelo velikokrat pojavlja v različnih pomenih in povezavah, je tranzicija. Sprememba sistema, organizacije, delovanja. Tudi sistem reorganizacije oziroma tranzicije lekarniške mreže v Sloveniji je pogosto omenjen v povezavi s sistemom ureditve lekarniških mrež v Evropi oziroma neodvisno do ostalih članic Evropske skupnosti. Kateri model je za Slovenijo primernejši: nemški sistem 3 + 1 (tri ekonomsko dobro stoječe lekarne in ena z manjšim številom bolnikov oziroma slabše profitabilna)? Ali pa sistem regionalizacije mrež oziroma razdelitev enotne mreže na več podmrež, glede na parcelizacijo lastništva? Ali nek tretji model? Kaj pa je narobe s trenutno mrežo, ki je bila skrbno pripravljena in z leti preverjena kot učinkovita? Ne glede na pot, ki jo bomo izbrali, pa ne smemo ravnodušno opazovati, kako lokalno-politični interesi prevladujejo nad interesom stroke in farmacevtske vede. Počasi se bomo morali otresti dvojne subjektivitete, ki jo predstavljajo javni zavodi, kjer kolegice in kolegi mukotrpno ustvarjajo presežek prihodkov nad odhodki, s katerim pa kot dobri gospodarji ne morejo razpolagati neodvisno. In posledica: bližanje ekonomski entropiji po principu: »Če ne morem odločiti in nisem za to nagrajen, pa ne bom »pregorel« za službo.« Le ena stopnja je še slabša: » Nihče me ne more tako malo plačati, kot jaz lahko malo delam!«. No, zaradi velike osveščenosti farmacevtov se slednje, upam, ne bo zgodilo. V vsakem primeru pa ne dopustimo, da bodo drugi odločali namesto nas!

In kaj nam prinaša ta številka Farmaceutskega vestnika? Zaradi aktualnosti nadaljujemo s pregledom kliničnih vidikov zdravil v nosečnosti, o zdravilnih učinkovinah, ki delujejo na programirano celično smrt ali apoptozo, je narejenih veliko raziskav. Mag. Japelj in prof. Pečar opisujeta možnosti uporabe fotodinamičnega učinka za razvoj zdravil in doktrine zdravljenja, na koncu pa sledita članka iz področja farmacevtske tehnologije in razvoja dostavnih sistemov zdravil. To sodobno področje je predvsem za visokorazvito generično farmacevtsko industrijo ključnega pomena, saj lahko sodobni dostavni sistemi s primerljivo bioekvivalenco bistveno pripomorejo v konkurenčnem boju za tržišče zdravil.

Želim vam lepe in mirne počitniške dneve, ko bo čas tudi za poglobljeno branje Farmaceutskega vestnika.

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

Vsebina

Boštjan Japelj, Slavko Pečar Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja Basic Principles and Potentials of Photodynamic Therapy	131
Rok Frlan, Marija Sollner Dolenc Inhibitorji citokromov Cytochrome Inhibitors	140
Matej Avanzo, Alenka Šavc, Mojca Kerec Kos Zdravila v nosečnosti II: Klinični vidiki Drugs in pregnancy II: Clinical aspects	146
Iztok Vidic, Dušan Šuput, Irina Milisav Modulatorji apoptoze kot nova zdravila Modulators of Apoptosis in drug development	150
Odon Planinšek Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin Colloidal silicon dioxide as a drug carrier	155
Petra Kocbek, Julijana Kristl Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov – korak naprej v razvoju bioadhezivnih dostavnih sistemov Lectin-mediated drug delivery – a step forward in development of bioadhesive drug delivery systems	162
<i>Zanimivosti iz stroke</i>	
Novice iz sveta farmacije	169
Julijana Kristl Doktorska disertacija - Razvoj in vrednotenje polimernih nanodelcev za transport cistatina v tumorske celice	170
Albin Kristl Doktorska disertacija - Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih 'in vitro'	171
Borut Štrukelj Zmago Jelinčič Plemeniti doniral zbirko lekarniških eksponatov	172
<i>Iz društvenega življenja</i>	
Saša Baumgartner Poročilo - 5 th World Meeting on Pharamaceutics Biopharmaceutics and Pharamaceutical Technology	173
Jelka Dolinar 31. skupščina Slovenskega farmacevtskega društva	175
Anka Bratož Dolenjski farmacevti v Hemofarmu	180

Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja

Basic Principles and Potentials of Photodynamic Therapy

Boštjan Japelj, Slavko Pečar

Povzetek: Fotodinamično zdravljenje je zdravljenje z uporabo vidne ali bližnje infrardeče svetlobe, ki aktivira fotosenzibilizator in povzroči nastanek singletnega kisika, ki poškoduje okolišno tkivo. Do lokalno omejenih učinkov prihaja samo na področjih, ki jih osvetlimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine. Učinkovine, ki se uporabljajo kot fotosenzibilizatorji, morajo biti sposobne aktivirati kisik preko prenosa elektrona ali prenosa energije.

Ključne besede: fotodinamično zdravljenje, fotosenzibilizator, prenos elektrona, prenos energije, singletni kisik

Abstract: Photodynamic therapy is the treatment by the use of visible or near infrared light, which activates the photosensitizer and forms singlet oxygen. Singlet oxygen then causes damage to the living system. Photodynamic therapy is localized, as treatment is achieved only in the areas which are illuminated by the light of certain wavelength. Drugs which are used as photosensitizers activate oxygen by the mechanism of electron or energy transfer.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizer, electron transfer, energy transfer, singlet oxygen

1 Uvod

Ko v vsakdanjih pogovorih uporabljamo pojem "zdravljenje" (terapija), ga le redko uporabljamo v njegovem najširšem pomenu. Pojem obsega vse postopke, procese, načine in posege v organizem ali v njegovo okolico, ki vodijo do ozdravitve ali do izboljšanja stanja. Najčešče mislimo le na uporabo zdravil in na zdravilne učinkovine različnih farmakoloških učinkov (farmakoterapija) kot njihove bistvene sestavine. Redkeje pomislimo, da so zdravljenje tudi kirurški posegi, obsevanja z rentgenskimi žarki, obdelava s toploto (hladom), nadzorovana in usmerjena fizična aktivnost itd. V zdravilne namene tako uporabljamo bodisi snovi (zdravilne učinkovine) ali ustrezne posege z določeno obliko energije (obsevanje z elektromagnetnim valovanjem različnih valovnih dolžin itd.), ker se živ organizem odziva tako na vnos snovi kot na vplive različnih energij.

Farmacevtska stroka je v stalnem in neposrednem stiku z zdravilnimi učinkovinami in zdravili. V preglednem članku bomo z namenom širitve strokovnega obzorja, predstavili osnovne za razumevanje manj znanega fotodinamičnega zdravljenja (photodynamic therapy), možnosti tega zdravljenja in razumevanje delovanja učinkovin, ki jih pri tem uporabljamo.

Uporaba elektromagnetnega valovanja v zdravilne in diagnostične namene je že uveljavljena metoda od odkritja žarkov X (Röntgen) in od odkritij žarkov α , β in γ dalje. Uporaba svetlobe daljših valovnih dolžin (ultravijolična - UV in vidna svetloba - VS) se v terapiji pojavi kasneje. Izkoriščanje UV in VS v zdravilne namene strokovna literatura

obravnava na treh ravneh. Najširše področje zajema pojem "fototerapija", ki pomeni uporabo ultravijolične (UV), vidne in bližnje infrardeče svetlobe (IR) za zdravljenje bolezni, npr.: neonatalne hiperbilirubinemije (1).

Nekoliko ožje področje pokriva pojem "fotokemoterapija", ki pomeni uporabo UV, vidne in bližnje IR svetlobe skupaj s fotosenzibilizatorjem (fotokemoterapevtsko snovjo) za zdravljenje bolezni, npr.: fotokemoterapija psoriaze in drugih kožnih bolezni (2,3,4,5,6). Pri fotokemoterapiji z zunanjim energetskim vplivom (svetloba ustrezne valovne dolžine) pozročimo na učinkovini (fotosenzibilizator), ki se po aplikaciji porazdeli po telesu, kemične spremembe, ki jih izkoriščamo v terapevtske namene. Do teh sprememb in do zdravilnega učinka prihaja samo na področjih, ki jih osvetlimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine, kar pomeni, da s fotokemoterapijo dosežemo površinsko omejene učinke.

Najožje področje uporabe svetlobe za zdravljenje opisuje pojem "fotodinamično zdravljenje", kjer uporabljamo vidno ali bližnje IR svetlobo skupaj s fotosenzibilizatorjem in izkoriščamo prisotnosti molekularnega (tripletnega) kisika v tkivu (7). Tripletni kisik ($^3\text{O}_2$) je običajna oblika kisika in je sestavina atmosfere. Ker je razporeditev elektronov v zadnji razvezni orbitali takšna, da sta v molekuli dva elektrona z istosmernim spinom, je $^3\text{O}_2$ biradikal (8). Tak kisik zelo počasi reagira z organskimi spojinami, izredno hitro pa z radikali. Pri interakciji svetlobe in fotosenzibilizatorja v prisotnosti tripletnega kisika, se energija absorbirane svetlobe uporabi za pretvorbo $^3\text{O}_2$ v energetsko bogatejšo obliko - singletni kisik ($^1\text{O}_2$), to je oblika kisika,

Pregledni članki - Review Articles

kjer sta elektrona v zadnji razvezni π orbitali v paru. Singletni kisik zato zlahka reagira z večino organskih spojin in jih oksidira. Pri fotodinamični terapiji na mestu, kjer foton svetlobe zadene molekulo fotosenzibilizatorja, nastaja 1O_2 , ki poškoduje okolišno tkivo. Na teh poškodbah okolišnega tkiva temelji zdravilni učinek, ki ga izkoriščamo pri fotodinamični terapiji kožnega in nekaterih drugih oblik raka (9).

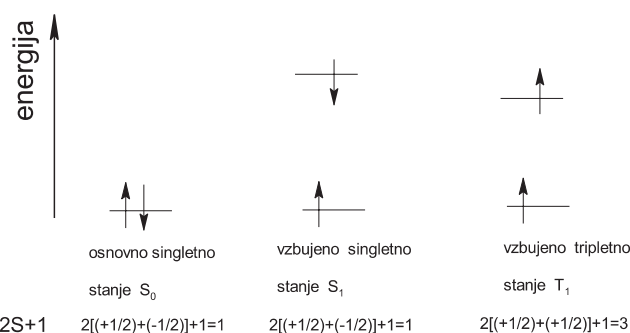
Pri fotodinamičnem zdravljenju gre za kombinacijo snovnega posega (sistemska aplikacija fotosenzibilizatorja) in obsevanja samo določene površine organizma: površine kože, žile, mrežnice. Na ta način uspešno rešujejo enega temeljnih problemov kemoterapije: kako doseči učinek samo v določenem predelu telesa. Sodobna tehnologija omogoča svetlobne vire z ustreznimi valovnimi dolžinami (različne energije) in ustrezno gostoto energije, ter uporabo optičnih vodil, s katerimi snop svetlobe usmerjamo na izbrano mesto. Sintezo lahko pripravimo fotosenzibilizatorje, ki absorbirajo v različnih področjih valovnih dolžin in imajo različne fizikalno-kemične (porazdelitvene) lastnosti. Z optimizmom lahko pričakujemo, da bo fotodinamično zdravljenje raka na koži in na nekaterih drugih organih (prostata, pljuča, prsi, požiralnik) kmalu dobilo ustrezno mesto med drugimi "klasičnimi" terapevtskimi pristopi (10). Posredni dokaz za omenjeno trditev so mnogi fotosenzibilizatorji, ki so bodisi že v uporabi ali pa so v različnih stopnjah kliničnega preizkušanja (7). S samim principom fotodinamičnega učinka se nehote srečujemo vsako leto. Zaradi nekaterih dodatkov v hrano (predvsem barvila) in nekaterih naravnih spojin (fotosenzibilizatorji), ki se kopičijo v podkožju, pride na s soncem obsevanih delih kože do značilnih izpuščajev, ki jih zaradi poenostavitve problema obravnavajo kot alergično reakcijo na sonce. Omenjene lastnosti pa se pojavljajo tudi pri zdravilnih učinkovinah, saj podrobnejši pregled postreže s podatki, da so nekatere učinkovine fototoksične. Te na obsevanih delih kože povzročajo neugodne reakcije, primarno zaradi lokalnega nastajanja 1O_2 .

2 Temelji fotodinamičnega zdravljenja

Molekula snovi lahko absorbira elektromagnetno valovanje ustreznih valovnih dolžin. Pri absorpciji pride do prehoda v energetsko bogatejša rotacijska, vibracijska ali elektronska stanja (11, 12).

Absorpcija svetlobe v UV in vidnem delu spektra povzroča prehode elektronov, če energija fotona ustreza energetski razliki med osnovnim in vzbujenim stanjem. Foton svetlobe z določeno energijo ($E = h\nu$, kjer je h Planckova konstanta, ν pa je frekvenca elektromagnetnega valovanja) interagira z molekulo substrata v osnovnem stanju (S_0) in povzroči prehod elektrona iz vezne ali nevezne orbitale v orbitalo z višjo energijo, v organskih molekulah največkrat v razvezno orbitalo. Takšno vzbujeno stanje ima lahko za posledico dve elektronski konfiguraciji z različno spinsko multipliciteto, ki je definirana kot $2S+1$, pri čemer je S celoten spin sistema (slika 1.)

Verjetnost prehoda med osnovnim in vzbujenim stanjem podaja molarni absorptivnostni koeficient. Povezan je s površino pod absorpcijsko krivuljo, vendar se večkrat uporablja vrednost ϵ_{\max} . Malo verjetnim prehodom pravimo "prepovedani". Na dovoljenost ali prepovedanost elektronskega prehoda vplivajo spin, prostor, simetrija, gibalna količina in vrtilna količina (7).



Slika 1. Spinska multipliciteta osnovnega (singletno stanje S_0) in vzbujenih (singletno S_1 in tripletno T_1) stanj.

Figure 1. Spin multiplicity of the ground (singlet state S_0) and excited (singlet state S_1 and triplet state T_1) states.

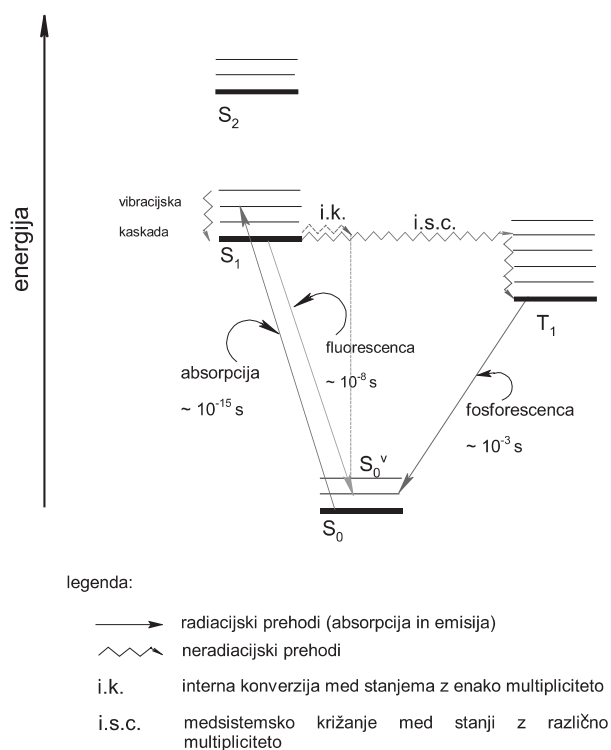
Molekula v vzbujenem stanju lahko:

- oddaja foton (seva svetlobo) in se vrne v osnovno stanje,
- preide v drugo (vzbujeno) stanje. Pretvorbo med stanjema z enako multipliciteto imenujemo **interna konverzija**: npr. prehod iz singletnega stanja prvega nivoja v enega od višjih vibracijskih nivojev osnovnega singletnega stanja $S_1 \rightarrow S_0^V$. Prehod v stanje z različno multipliciteto pa imenujemo **medsistemsko križanje** (intersystem crossing (i.s.c.)) npr. prehod: $T_1 \rightarrow T_1$.
- vstopi v kemijsko reakcijo: npr. fotoionizacija, fotoadiacija, fotociklizacija.
- prenese energijo vzbujenega stanja na drugo molekulo.

Emisijo fotona iz vzbujenega singletnega stanja imenujemo **fluorescenca**, iz tripletnega stanja pa **fosforescenca**. V obeh primerih vzbujena molekula preide v osnovno stanje S_0 , izsevana svetloba pa ima daljšo valovno dolžino kot absorbirana. Ker je fosforescenca prepovedan prehod ($T_1 \rightarrow S_0$), je življenjska doba tripleta daljša (v ms območju). Pri fluorescenci (dovoljen prehod, npr. $S_1 \rightarrow S_0$) pa je življenjska doba vzbujenega stanja bistveno krajša ($< \mu s$). Zaradi daljše življenjske dobe tripleta je ta pomembnejši pri fotokemičnih reakcijah. Na sliki 2 (Diagram Jablonskega) so shematsko prikazani dovoljeni in prepovedani prehodi.

Molekula, ki se prvotno nahaja v stanju S_0 , lahko absorbira foton in preide v vzbujeno elektronsko stanje (S_1 ali S_2 na sliki 2). Molekula v vzbujenem stanju je izpostavljena trkom s sosednjimi molekulami. Na ta način oddaja energijo in prehaja v nižje vibracijske nivoje vzbujenega elektronskega stanja (vibracijska kaskada na sliki 2). Prehodi med vibracijskimi nivoji so neradiacijski prehodi in potekajo dokler molekula ne pride v najnižji vibracijski nivo ($v=0$) vzbujenega elektronskega stanja. Emisija poteče iz najnižjega vzbujenega stanja. Prehod $S_0 \rightarrow T_1$ je strogo prepovedan, lahko pa poteče prehod v obratni smeri. Z medsistemskim križanjem lahko namreč preide

Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja



Slika 2. Modificiran diagram Jablonskega shematično prikazuje energije različnih stanj molekule. Elektronski ekscitacijski nivoji so dodatno razdaljeni v več vibracijskih nivojev, ti pa še dodatno na rotacijske podnivoje, ki pa na sliki niso prikazani.

Figure 2. Modified Jablonski diagram schematically shows the energies of different states of the molecule. Electron excitation levels are additionally divided into several vibrational and rotational sublevels (rotational sublevels are not depicted).

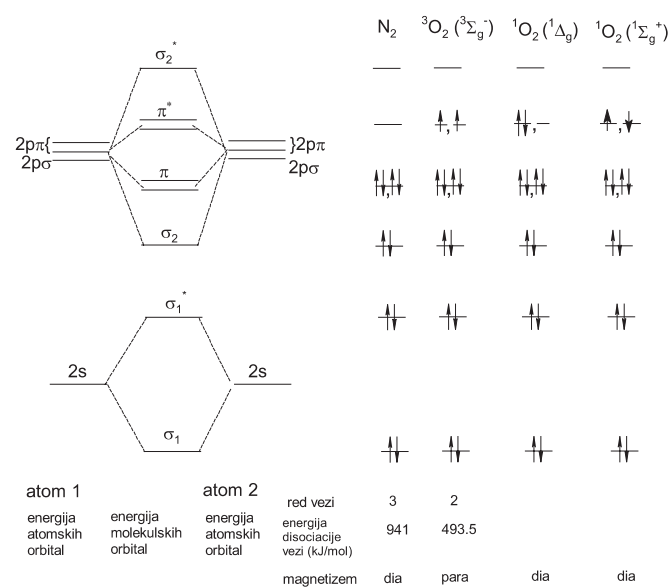
molekula iz $S_1 \rightarrow T_1^v$ stanje in z deaktivacijo v T_1^0 . Prehod $S_1 \rightarrow T_1$ je sicer formalno prepovedan, lahko pa se zgodi v določenih primerih (benzofenon), ker gre za prehod v energetsko nižje stanje. Prehod iz T_1^0 v S_0 je možen iz podobnega razloga kot pri medsystemskem križanju, ki dopušča kršitev selekcijskega pravila.

2.1 Mehanizem fotodinamičnega delovanja

Ker je osnovno stanje molekule kisika (3O_2) triplet, se ta pomembno razlikuje od drugih snovi, ki so v osnovnem stanju v obliki singleta. Če privzamemo, da je tripletno stanje osnovno, potem ima molekula kisika še dve vzbujeni stanji, ki sta energetsko bogatejši: osnovno singletno stanje in vzbujeno singletno stanje (Razpredelnica I).

Elektronsko stanje kisika. $^1\Sigma_g^+$ (vzbujeni singlet) ima zelo kratko življenjsko dobo (manj kot ps) in zelo hitro preide v nižje singletno stanje, $^1\Delta_g$.

Na sliki 3 je primerjalno prikazana razvrstitev elektronov v molekuli dušika (N_2) in kisika (O_2). Dva elektrona z istosmernim spinom v različnih orbitalah sta razlog, da je tripletni kisik pri običajnih pogojih relativno neaktiven do večine organskih spojin. Pri spajanju kisika s temi spojinami, bi moralo priti do spremembe spina enega elektrona, kar pa je kvantnomehansko prepovedan dogodek.



Slika 3. Elektronske konfiguracije molekule tripletnega kisika (3O_2) in molekule singletnega kisika (1O_2) v osnovnem ($^1\Delta_g$) in vzbujenem ($^1\Sigma_g^+$) stanju v primerjavi z molekulo dušika (N_2). Na levi je prikazan energetski diagram molekularskih orbital, ki bi ga dobili s prekrivanjem atomskih orbital obeh atomov, ki tvorita molekulo dušika in kisika, z metodo LCAO (linear combination of atomic orbitals) kot približkom za kemijsko vezavo. Na sliki niso prikazani štirje elektroni, ki so v linearnih kombinacijah 1s orbital.

Figure 3. Electron configurations of triplet oxygen (3O_2) and singlet oxygen (1O_2) molecule in ground ($^1\Delta_g$) and excited ($^1\Sigma_g^+$) state in comparison with nitrogen molecule (N_2). On the left energy diagram of molecular orbitals is shown obtained as an overlap of atomic orbitals using LCAO (linear combination of atomic orbitals) approximation for chemical bonding. Four electrons in the linear combination of 1s orbitals are not shown in the picture.

Pregledni članki - Review Articles

Razpredelnica I. Energije in življenjske dobe stanj O_2 (7)

Table I. Energies and lifetimes of different states of O_2 (7).

oznaka stanja	ime	relativna energija (kJ/mol)	življenjska doba v sekundah v kondenzirani fazi
$^1\Sigma_g^+$ vzbujeno singletno stanje	-	155	$<10^{-9}$ s
$^1\Delta_g$ osnovno singletno stanje	singletni kisik, 1O_2	94	~ 10 μ s
$^3\Sigma_g^-$ osnovno tripletno stanje	kisik, 3O_2	0	∞

Poznamo dva mehanizma po katerih lahko svetloba v prisotnosti fotosenzibilizatorja in kisika sproži kemijsko reakcijo v substratu in poškoduje tkivo: tip 1 in tip 2 (7). Globina do katere sega svetloba je odvisna od njene valovne dolžine (Razpredelnica II).

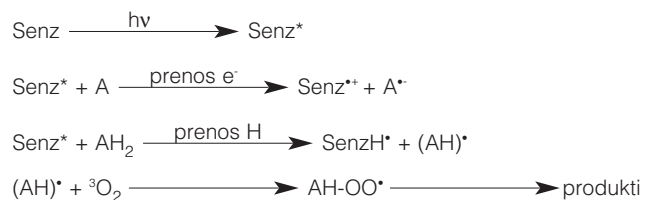
Razpredelnica II. Globina do katere sega svetloba različnih valovnih dolžin

Table II. The depth of penetration of light of different wavelengths.

valovna dolžina (nm)	globina (mm)
400	cca 2,2
500-550	cca 3,5
630-650	do 20

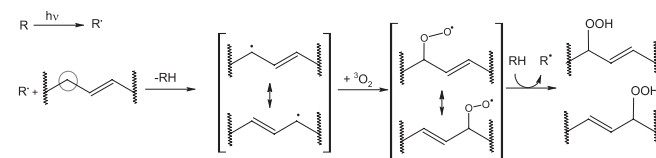
2.1.1 Tip 1 - prenos elektrona

Vzbujeno stanje fotosenzibilizatorja povzroči nastanek radikala zaradi prenosa elektrona iz substrata ali na substrat, oziroma zaradi izgube vodika. Nastali radikal reagira s 3O_2 molekulo, kar vodi do nastanka reaktivnih kisikovih intermediatov (superoksidni ali peroksidni ioni), ki napadejo celične tarče. Reakcija je formalno gledano fotokemijsko sprožena oksidacija (shema 1):



Shema 1. Nastajanje reaktivnih kisikovih intermediatov po zajetju fotona na molekuli fotosenzibilizatorja (Senz). Senz^* je vzbujeno stanje senzibilizatorja, Senz^{*+} je kationski radikal senzibilizatorja, A^- anionski radikal substrata.

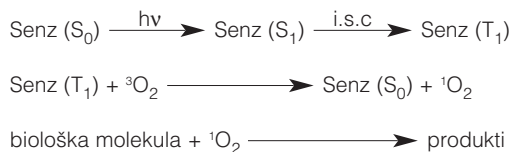
Kot primer navajamo fotokemični nastanek radikala, ki sproži lipidno peroksidacijo v tkivu in prenos elektrona na kisikovo molekulo. Pri lipidni peroksidaciji nastali primarni radikal odvzame H iz nenasičenega lipida, alilni radikal je resonančno stabiliziran in po reakciji s tripletnim kisikom nastane peroksidni radikal, po pritegnitvi vodikovega iona pa dva možna peroksida (shema 2) (13).



Shema 2

2.1.2 Tip 2 - prenos energije

Po tem mehanizmu se energija za vzbujanje elektronov prenese iz senzibilizatorja v tripletnem stanju na tripletni kisik, pri čemer senzibilizator in kisik preideta v singletno stanje. S pomočjo obsevanja ustreznih senzibilizatorjev lahko s pomočjo elektronske ekscitacije nastaja singletni kisik, kar je najpomembnejša reakcija pri fotodinamični terapiji. Fotosenzibilizator je torej posrednik, ki energijo svetlobe (fotona) preko lastnih vzbujenih stanj prenese na molekulo tripletnega kisika, pri tem pa nastaja singletni kisik (1O_2) (shema 3).



Shema 3. Nastajanje 1O_2 iz 3O_2 s posredovanjem vzbujenega fotosenzibilizatorja.

Scheme 3. Formation of 1O_2 from 3O_2 in the presence of photosensitizer in the excited state.

Pogoj, da senzibilizator lahko posreduje pri nastajanju 1O_2 je, da je energija (vzbujeno stanje senzibilizatorja) večja od 94 kJ/mol (energija singletnega kisika nad osnovnim tripletnim stanjem). Fotokemična učinkovitost, s katero različni fotosenzibilizatorji tvorijo 1O_2 , je kvantni izkoristek (quantum yield), ϕ , ki je definiran kot:

$$\phi_{\text{produkta}} = (\text{št. molekul produkta v sekundi v mL}) / (\text{št. fotonov, ki se absorbirajo v sekundi v mL})$$

Kvantni izkoristki za nekatere fotosenzibilizatorje so v razpredelnici II (14).

Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja

Razpredelnica III. Kvantni izkoristki nekaterih fotosenzibilizatorjev.
Table III. Quantum yields of certain photosensitizers.

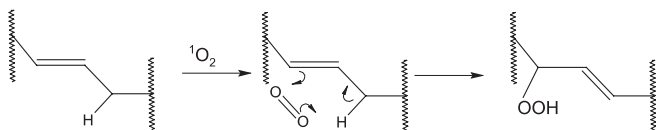
Skupina	Fotosenzibilizator	Topilo	ϕ_{Δ}
A. splošni			
	Akridin	C ₆ H ₆	0,83
	Benzofenon	C ₆ H ₆	0,35
B. porfirini in sorodne spojine			
	porfirin	CCl ₄	0,75
	Tetrafenilporfirin	C ₆ H ₆	0,66
C. ftalocianini			
	Mg kompleks ftalocianina	C ₆ H ₅ N	0,40

Razlikovanje med tipom I in II je težavno. Problem je v analitskih metodah, ki niso dovolj zanesljive in v številnih dejavnikih (topilo, substrat, valovna dolžina), ki lahko vplivajo na mehanizem, po katerem bo fotosenzibilizator reagiral. Mnogi reagirajo po obeh mehanizmih (7).

2.2 Reaktivnost ¹O₂

Singletni kisik običajno ni prisoten v naravi, ker takoj reagira z organskimi spojinami (15,16,17). Reagira tako, da:

- se adira na nenasičene spojine, npr. na maščobne kisline pri čemer v eni stopnji nastane hidroperoksid (shema 4):



Shema 4.

Velik del poškodb tkiva pri fotodinamični terapiji gre preko oksidacij nenasičenih maščobnih komponent biološke membrane in s tem povezanega propada celic.

- da reagira kot elektrofil, ki napada alkene bogate z elektroni. Z 1,3 dieni reagira kot dienofil po Diels-Alderjevi reakciji. S stališča toksičnosti (učinkovitosti) je pomembna reakcija ¹O₂ s purinskimi bazami (gvanin) in aminokislinami (Trp, His, Met ...), ki nepopravljivo poškoduje DNA oziroma prizadene funkcionalne lastnosti nekaterih encimov.

Zaradi možnih številnih interakcij v biološkem sistemu, je življenjska doba singletnega kisika 0,01–0,04 μ s z difuzijsko potjo med 0,01–0,02 μ m (38).

3 Zdravilne učinkovine pri fotodinamični terapiji

Učinkovina, ki je kot fotosenzibilizator uporabna v fotodinamični terapiji, mora zadoščati naslednjim pogojem:

- imeti mora kromofor, ki absorbira v vidnem ali bližnjem infrardečem delu spektra,
- če fotosenzibilizator posreduje pri nastajanju ¹O₂, mora molekula senzibilizatorja preiti v tripletno stanje z medsystemskim križanjem, energija tripletnega stanja senzibilizatorja (E_T) mora biti nekoliko večja od 94 kJ/mol (energija singletnega kisika nad osnovnim stanjem).
- prenos energije $\text{Senz}(T_1) \rightarrow {}^3\text{O}_2$ mora biti učinkovit,
- v primeru spojin, ki agregirajo, je monomerna (neasociirana) oblika bolj fotodinamično učinkovita (7).

3.1 Generacije fotosenzibilizatorjev

Fotosenzibilizatorje, ki posredujejo pri nastajanju aktivirane oblike kisika, delimo v tri generacije:

- v prvi generaciji so derivati hematoporfirina in sorodne spojine;
- v drugi generaciji so fotosenzibilizatorji, razviti iz porfirinov z večjo učinkovitostjo in selektivnostjo;
- v tretji generaciji so fotosenzibilizatorji, ki so še v razvojni fazi, in so kovalentno vezani na določena monoklonska protitelesa, s čimer bi lahko dosegli izredno prostorsko selektivnost nastajanja ¹O₂.

Glede na strukturo lahko fotosenzibilizatorje razdelimo v naslednje skupine:

- porfirini,
- klorini in bakterioklorini,
- ftalocianini in naftalocianini,
- drugi fotosenzibilizatorji: cianinska barvila, razširjeni kinoni, fenotiazini, ksanteni, porficeni, skvarini, teksapirini, konjugirani fotosenzibilizatorji (7).

3.2 Porfirini

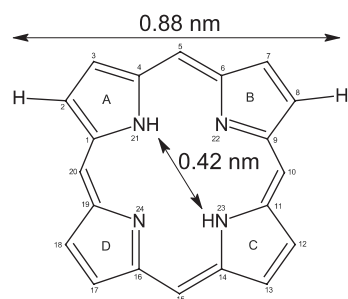
Porfirini, klorini in ftalocianini imajo kot fotosenzibilizatorji pri fotodinamični terapiji tri pomembne prednosti (18,19):

- dobro absorbirajo v vidnem delu spektra vsled česar je potrebno le malo materiala,
- so stabilni (aromska stabilnost) na svetlobi in
- nizko toksičnost v temi.

Porfirini in klorini so trenutno najbolj obetajoče fotosenzibilirajoče učinkovine druge generacije. Osnovni skelet je hidrofoben. Za povečanje topnosti v vodi uvajamo v molekulo dodatne sulfonske, karboksilne in hidroksilne funkcionalne skupine. Pridobivajo jih iz hemoglobina, s popolno sintezo in z manipulacijo biosintezne poti sinteze protohema.

Pregledni članki - Review Articles

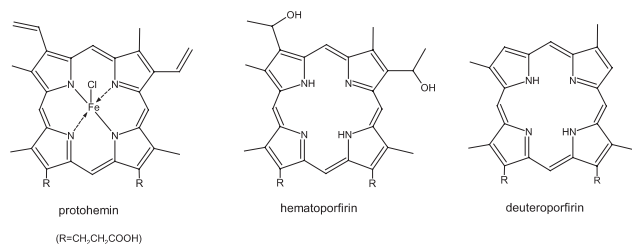
Porfirinski sistem je planaren in aromatičen 18- π elektronski sistem s premerom 0,88 nm. V notranjosti ima špranjo s premerom 0,42 nm, kamor se lahko vežejo različni kovinski ioni (slika 4). Za fotodinamično terapijo so primerni kompleksi z relativno dolgo življenjsko dobo z Al^{3+} ali Zn^{2+} .



Slika 4. Porfirinski sistem.
Figure 4. Porphyrin system.

3.2.1 Porfiri iz hemoglobina

Pridobivajo jih iz krvi, ki ji dodajo heparin za preprečitev koagulacije. Sledi hemoliza in centrifugiranje. Hemoglobin nato kristalizirajo. Protohemini (ali krajše hemin) alternativno pridobijo z dodatkom očetne kisline in NaCl čemur sledi kristalizacija (shema 5) (20, 21).



Shema 5.

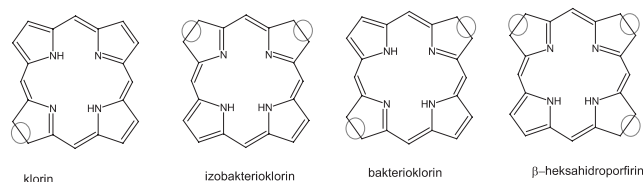
Protohemini, hematoporfirin in deuteroporfirin služijo kot najpogostejše začetne spojine za sintezo fotodinamičnih senzibilizatorjev iz hemoglobina (7).

3.2.2 Manipulacija biosintezne poti sinteze hema

Zanimiv pristop je endogeni nastanek protoporfirina z dodajanjem prekursorjev, ki so vključeni v naravno pot sinteze porfirina (22, 23). Kontrolni mehanizem biosintezne poti je koncentracija protohema, ki po sistemu povratne zveze vpliva na aktivnost encima ALA sintaza in na ta način regulira količino δ -aminolevulininske kisline (δ -ALA). Če dodamo δ -ALA ($NH_2CH_2COCH_2CH_2COOH$) v organizem, lahko na ta način pospešimo biosintezo porfirinogenov in protoporfirina. Ta metoda se je izkazala predvsem pri zdravljenju nekaterih površinskih tumorjev. Dokazano je tudi, da s pripravo alkilnih estrov (npr. heksilni ester δ -ALA) izboljšamo penetracijo skozi membrane.

3.3 Klorini in bakterioklorini

Klorini so β -dihidroporfirini, bakterioklorini pa β -tetrahidroporfirini. β -dihidroporfirini imajo samo enega predstavnika-klorin, znotraj skupine β -tetrahidroporfirinov pa ločimo izobakterioklorin in bakterioklorin. Obstaja tudi β -heksahidroporfirin (shema 6).



Shema 6

Vse spojine lahko prehajajo v porfirin s počasno avtooksidacijo. Dehidrogenacijo pospešimo z dodatkom kinonov. Ta skupina spojin ima zelo pomembno vlogo v bioloških sistemih. Kot se da sklepati že iz imena, je klorin kromofor klorofila a in klorofila b (7, 24). Bakterioklorin je kromofor bakterijskega fotosintetskega pigmenta bakterioklorofila a. Izobakterioklorin je intermediat v sintezi vitamina B_{12} , njegov železov kompleks sirohema pa je prostetična skupina v sulfidnih in nitritnih reduktazah rastlin in bakterij.

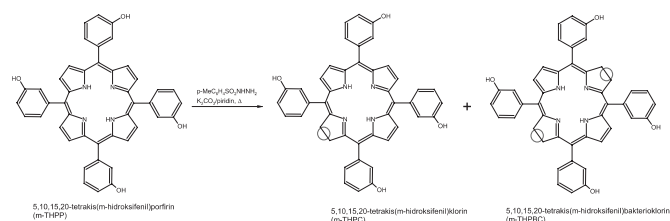
Spojine, ki spadajo v to skupino lahko dobimo na dva načina: z izolacijo in modifikacijo naravnih spojin ter s popolno sintezo.

3.3.1 Klorini in bakterioklorini, ki jih prodobimo iz naravnih virov

Eden izmed najpomembnejših fotodinamičnih fotosenzibilizatorjev, ki so izvedeni iz klorofila je monoaspartil klorin e_6 (MACE=monosparyl chlorin e_6) (35). Njegova prednost je v tem, da ima kratko dobo fotosenzibilizacije. Uporabljajo ga pri zdravljenju ponavljajočih se adenokarcinomov prsi, karcinomov bazalnih celic in karcinomov v koži.

3.3.2 Sintezni klorini in bakterioklorini

Obstajata dve glavni poti sinteze klorinov in bakterioklorinov: redukcija z natrijem v pentanolu in reakcija z diimidom ($NH=NH$). Diimid nastane *in situ* iz p-tolil hidrazida, kalijevega karbonata in piridina. Klorin in bakterioklorin dobimo z redukcijo m-THPP (m-THPP \rightarrow m-THPC \rightarrow m-THPBC) (shema 7):



Shema 7

Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja

Fotodinamični efekt se povečuje z redukcijo v seriji spojin m-THPP, m-THPC, m-THPBC. Odmerki fotosenzibilizatorjev, potrebni za približno 5 mm globoko nekrozo tumorja pri miškah so predstavljeni v razpredelnici IV.

Razpredelnica IV. Globina nekroze tumorja, ki so jo povročili m-THPP, m-THPC in m-THPBC. (37)

Table IV. Depth of tumor necrosis caused by m-THPP, m-THPC and m-THPBC.

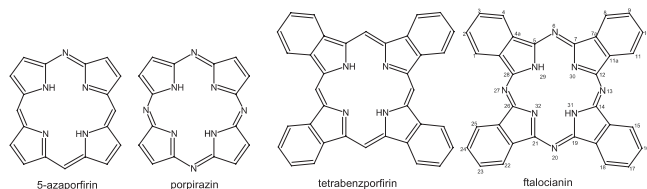
fotosenzibilizator	odmerek (μmol/kg)	globina nekroze tumorja (mm)	globina nekroze tumorja (mm)/ odmerek (μmol/kg)
m-THPP	6,3	4,6	0,7
m-THPC	0,8	5,4	6,8
m-THPBC	0,4	5,1	12,8

m-THPC in m-THPBC sta v fazi razvoja kot novi učinkovini, zaradi težje izdelave bakterioklorina je poudarek na m-THPC (Foscan). Že dve leti po odkritju m-THPC so s kliničnimi poskusi ugotovili učinkovitost te učinkovine pri mezoteliomu (rak v plevralni votlini, ki nastane zaradi izpostavljenosti azbestu). Učinkovina je sedaj v tretji fazi kliničnih testiranj za oblike rakov aerodigestivnega trakta in prostate. Ker je zelo učinkovit, se pojavljajo problemi z več dni trajajočo fotosenzibilizacijo kože (7).

Sintezno prodobljena učinkovina, ki je prav tako v tretji fazi kliničnih testiranj in spada v skupino klorinov in bakterioklorinov je tudi kositrov etiopurpurin (SnEt2) (shema 10). Uporablja se za zdravljenje raka na prostati in starostne degeneracije centralnega dela očesne mrežnice. Med fotosenzibilizatorje druge generacije spadajo tudi benzoklorin iminijeve soli (7).

3.4 Ftalocianini in naftalocianini

Z zamenjavo mezo ogljikovega mostička v porfirinu z dušikom nastane azaporfirin, z zamenjavo vseh štirih mezo ogljikovih mostičkov, dobimo porpirazin, če pa na vse štiri β,β'-vezi porfirina vežemo benzenove obroče, dobimo tetrabenzporfirin. Ftalocianin dobimo, če zadnji spojnini zamenjamo še vse štiri ogljikove mostičke z dušikom (shema 8) (25).



Shema 8.

Z naraščajočo zamenjavo ogljikovih mostičkov z dušikom narašča stabilnost kompleksov s kovinami.

3.4.1 Ftalocianini

Prisotni so v modrih in zelenih pigmentih in barvilih, v tonerju kopirnega stroja in kot posebne plasti na zgoščenkah. Zelena barvila dobijo z uvedbo klora na aromatske obroče. Topnost ftalocianinov povečajo s sulfoniranjem.

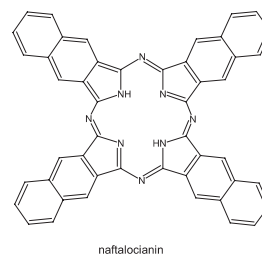
V zadnjih letih ftalocianine vse bolj uporabljajo zaradi elektroaktivnih lastnosti. V elektrofotografiji (kopiranje, tiskanje z laserskimi tiskalniki) uporabljajo fotoprevodne lastnosti titanovega ftalocianina in ftalocianina. Uporabljajo se tudi v "ink jet" tehnologiji in pri izdelavi zgoščenk.

3.4.1.1 Sulfonske kisline

S sulfoniranjem aluminijevih in galijevih ftalocianinov dobimo zmes mono, di, tri in tetra sulfonskih kislin, katerih hidrofilnost narašča v tem vrstnem redu. Disulfonirani derivati so pokazali največjo aktivnost v celičnih kulturah. Pri tem lahko nastane več izomer (36). Zmes di- in trisulfonskih kislin se uporablja za zdravljenje kožnega raka, raka na prsih in orofaringealnega raka. Biološke raziskave so pokazale da aktivnost derivatov pada v seriji $S_{2a} > S_{20}$ (derivati kjer sta sulfonski skupini na dveh sosednjih obročih so aktivnejše od derivatov, kjer sta sulfonski skupini na nasprotnih obročih), prav tako pa pada v seriji $S_2 > S_1 > S_3 > S_4$ (disulfonske kisline so bolj učinkovite kot mono-, tri- in tetrasulfonske kisline). Sposobnost agregacije narašča v seriji $S_4 < S_1$.

3.4.2 Naftalocianini

Če se število aromatskih obročev povečuje, se absorpcijski maksimum premika proti daljšim valovnim dolžinam. Naftalocianini tako absorbirajo v območju 770-800 nm (shema 9).



Shema 9.

Začetne študije fotodinamične terapije z uporabo naftalocianinov niso bile spodbudne, v zadnjem času pa so se pojavile možnosti uporabe teh spojin v zdravljenju melanomov. Shopova in Wöhrle sta namreč pokazala, da se Zn(II) kompleks naftalocianina kopiči v pigmentiranih celicah melanoma in tam povzroči fotoaktivacijo (26). Razlika v selektivni toksičnosti na celice, ki vsebujejo melanin in na tiste brez melanina nastopi, ker melanin deluje kot opični filter in ker je življenjska doba tripleta krajša v celicah z melaninom (17 μs) kot v celicah brez melanina (40 μs).

Pregledni članki - Review Articles

3.5 Drugi Fotosenzibilizatorji

Drugi fotosenzibilizatorji so strukturno zelo raznolika skupina (27). Mednje spadajo: cianinska barvila (28,29), razširjeni kinoni (30), fenotiazini, ksanteni, porfirceni, skvarini, teksapirini in konjugirani fotosenzibilizatorji.

Zanimivi predstavniki, ki tudi spadajo v skupino drugih fotosenzibilizatorjev so konjugirani fotosenzibilizatorji (31,32). Konjugacijo razumemo kot kovalentno pripojitev molekule na drugo molekulo, ki je lahko majhna ali velika in prinese v sistem neko novo lastnost. Primer je pripojitev fotosenzibilizatorja na monoklonska protitelesa, ki se vežejo na specifičen receptor na tumorski celici. Drugi primer je spojina, ki je derivat estradiola in se uporablja za zdravljenje raka na prsih. Pri tem izkoriščajo dejstvo, da je v takem tkivu povečano število receptorjev za estrogen. Spojina ima na estradiolski skelet vezan porfirinski sistem, ki je fotosenzibilizator, estradiol pa poskrbi za selektivno toksičnost. Zanimivi so tudi primeri učinkovin, kjer je porfirinski skelet pripet na oligonukleotid, ki se veže na nukleinske kisline. Ta tip spojin izkazuje protivirusno delovanje (33).

3.6 Pomembnejši fotosenzibilizatorji

5-aminolevulinska kislina /LEVULAN/ (Shema 10). 5-aminolevulinska kislina je predzdravilo. Iz nje v telesu nastane porfirin. Uporablja se predvsem v fotodinamični terapiji površinskih tumorjev (karcinom bazalnih celic, Bowenova bolezen in aktinska keratoza).

Metilaminolevulinska kislina /METVIX/ se uporablja za zdravljenje aktinske keratoze in nemelanomskih oblik raka na koži (karcinom bazalnih celic). Mehanizem delovanja je podoben kot pri 5-aminolevulinski kislini. Z esterifikacijo 5-ALA z alifatskimi verigami dosežemo večjo lipofilnost, kar poveča učinkovitost privzema v celice. Problem 5-ALA je namreč slaba penetracija v tkivo tumorja, lipofilni estri pa imajo močnejše izražen terapevtski učinek, kar pomeni, da potrebujemo manjše odmerke učinkovine za zdravljenje (34).

Porfimer natrij /PHOTOFRIN/ je mešanica oligomerov porfirinskih enot (lahko jih je do osem) povezanih z eterskimi in esterskimi vezmi. Uporablja se v fotodinamični terapiji tumorjev. Terapija poteka v dveh stopnjah. V prvi prašek zmešamo z raztopino dekstroze ali natrijevega klorida in ga injiciramo intravensko. Učinkovina se odstrani iz večine tkiv po 40 do 72 urah (klirens 0,051 mL/min/kg), kopiči pa se v tumorjih, koži in organih retikuloendotelijskega sistema. Po 40-50 urah na mesto tumorja posvetlino z laserjem z valovno dolžino svetlobe 630 nm (druga stopnja terapije). Uničenje tumorja je posledica tvorbe singletnega kisika, posledično pa se tvorijo tudi superoksidni in hidroksilni radikali. Njegovo učinkovitost so preizkušali v kliničnih študijah proti raku požiralnika in endobronhialnemu raku.

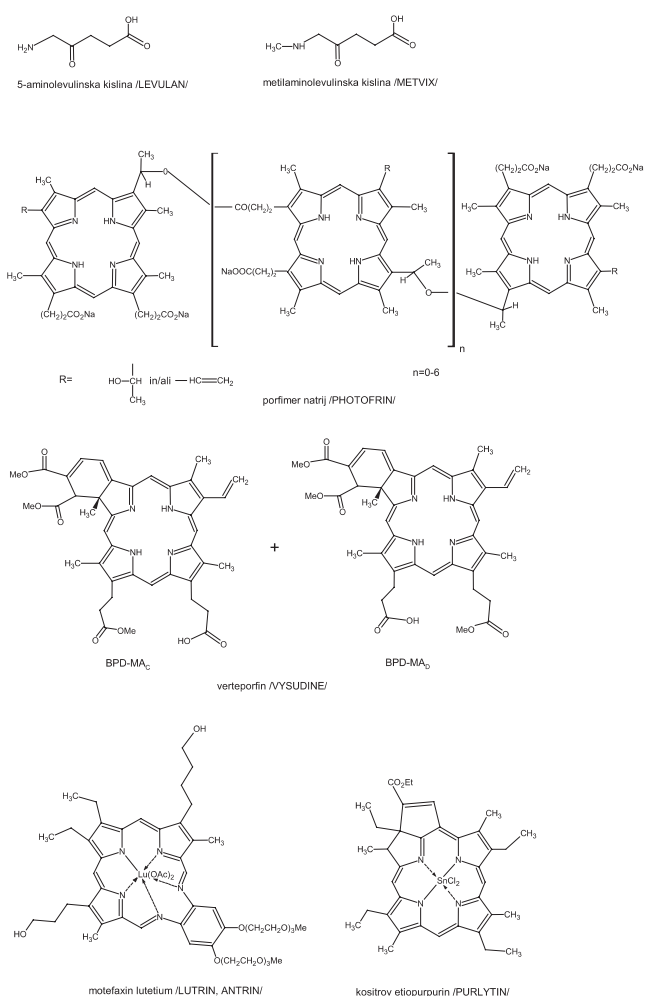
Verteporfin /VISUDYNE/. Uporablja se v obliki sterilnega praška za intravensko infuzijo. Obe strukturni izomeri, BPD-MA_C in BPD-MA_D (njuno razmerje v farmacevtski obliki je 1:1), sta enako učinkoviti. Terapija poteka v dveh stopnjah, podobno kot pri porfimer natriju. Razpolovna doba je pri bolnikih z normalno jetrno funkcijo 4,7 h. Problem pri verteporfinu in porfimer natriju je, da svetlobna aktivacija obeh učinkovin lahko povzroči poškodbe na neovaskularnem endoteliju, posledično se sproščajo prokoagulacijski in vazokonstriktivni faktorji, ki povzročijo agregacijo trombocitov in vazokonstrikcijo.

Uporablja se pri zdravljenju bolnikov s horoidalno neovaskularizacijo kot posledico z leti povezane makularne degeneracije (age-related macular degeneration) ali drugih makularnih bolezni.

Motexafin lutetium /LUTRIN, ANTRIN/ je v I/II fazi raziskav. Deluje proti raku na dojkah, melanomom in Kaposijevem sarkomu. DLI (drug-light interval) je 3h (osvetlino lahko torej že po treh urah).

Etiltiopurpurin. Ker je zelo hidrofoben, uporabljamo posebne sisteme za njegovo dostavo na mesto delovanja (emulzije, liposomi, lipoproteini in ciklodekstrin). Za etiltiopurpurin se uporabljajo biološko razgradljive cianoakrilatne nanosfere s premerom 150-250 nm.

V spodnji shemi (shema 10) so navedene strukture pomembnejših fotosenzibilizatorjev.



Shema 10

4 Sklep

Kjub temu, da je fotodinamična terapija v zadnjih dvajsetih letih naredila velik napredek v terapiji raka, se še vedno pojavljajo določeni

Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja

dvomi v zvezi z njeno uporabo. Prva odobritev njene uporabe s strani regulatornih agencij se je zgodila šele leta 1993 v Kanadi, v Veliki Britaniji pa šele leta 1999 in še to pod strogo določenimi pogoji uporabe. Najbolj učinkovita je v zgodnjih fazah detekcije in zdravljenja tumorjev. Prednosti njene uporabe so, da jo lahko izvedemo relativno varno, dostikrat ni potreben kirurški poseg, ima malo stranskih učinkov, ne uničuje kolagena in je relativno poceni. Njena slabost je v tem, da lahko povzroči fotoobčutljivost, ki traja več tednov, vendar se pri novejših učinkovinah temu skušajo izogniti. Intenzivne raziskave kažejo, da bo v prihodnosti fotodinamična terapija lahko postala pomembna za zdravljenje luskavice, artritisa, AMD (*age-related macular degeneration*), nekaterih avtoimunskih bolezni (arthritis), ateroskleroze in celo kot antimikrobna in antivirusna terapija.

5 Literatura

- Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. *Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants*. Lancet, 1958. **1**(7030): 1094-7.
- Parrish JA., Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. *Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light*. N Engl J Med, 1974. **291**(23): 1207-11.
- Calvert JG, Pitts JN. *Photochemistry*. 1996, Wiley, New York. 736.
- Bock G, Harnett S.. *Photosensitizing compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use*. Ciba Foundation Symposium 146, 1989.
- Braslavsky SE Houk KN. *Glossary of terms used in photochemistry*. Pure Appl. Chem., 1998. **60**: 1055.
- Hawk JLM, Parrish JA. *Responses of normal skin to ultraviolet radiation*. The Science of Photomedicine, ed. J.D. Regan and J.A. Parrish. 1982, New York: Plenum. 219-60.
- Bonnet R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Advanced Chemistry Texts. Vol. 1. 2000, Gordon and Brach Science Publishers. 1-305.
- Haliwell B, Gutteridge JMC., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2 ed. 1992, Oxford, UK: Clarendon Press. 86-186.
- Roche JVE, Whitehurst P, Moore JV, Krasner N. *Photodynamic therapy of gastrointestinal tumors: a new light delivery system*. Lasers Med.Sci., 1998. **13**: 137-142.
- Lane N. *New light on medicine*. Sci Am, 2003. **288**(1): 38-45.
- Koller J., *Struktura atomov in molekul: molekule, osnove spektroskopije*. 2000, Ljubljana, FKKT.
- Atkins W. *Physical chemistry*. 1997, Oxford University Press. 591-62.
- Watanabe T, Katayama S, Enoki M, Honda Y, Kuwahara M. Watanabe T. *Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from Ceriporiopsis subvermispora and Bjerkandera adusta*. Eur J Biochem, 2000. **267**: 4222-4231.
- Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. *Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution*. J.Phys. Chem. Ref. Data, 1993. **22**: 113-262.
- Keating B, Hinds MF, Davis SJ. *A Singlet Oxygen Sensor for Photodynamic Cancer Therapy*.in *Proceedings of the International Congress on Applications of Lasers and Electro-Optics*. 1999. Physical Sciences Inc. Andover, Massachusetts.
- Wasserman HH, Murray R.W. *Singlet Oxygen*. 1979, Academic Press.
- Ho RYN, Liebman JF, Valentine JS. *Overview of Energetics and Reactivity of Oxygen*. Active Oxygen in Chemistry., ed. C.S.V. Foote, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. 1995, Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Sternberg D, Dolphin D, Brückner C. *Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Tetrahedron, 1998. **54**: 4151-4202.
- Kadish KM, Smith KM, Guilars R., *The Porphyrin Handbook*. 2000. **1-10**.
- Bonnet R, Ridge RJ, Scourides PA, Berenbaum MC. *On the nature of hematoporphyrin derivative*. J. Chem. Soc., 1981. Perkin Trans I: 3135-3140.
- Kelly JF, Snell ME. *Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder*. J Urol, 1976. **115**(2): 150-1.
- Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. *Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results*. J Clin Laser Med Surg, 1996. **14**(5): 289-304.
- Peng Q, Warloe T, Berg k, Moan J, Kongshaug M, Giercksky K-E, Nesland JM. *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges*. Cancer, 1997. **79**(12): 2282-308.
- Scheer, H., *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton 1991.
- Leznoff CC, Lever ABP, *Phthalocyanines: properties and applications*. Vol. 1-4. 1989, 1993, 1993, 1996, New York, VCH Publishers.
- Shopova M, Wohrle D, Stoichkova N, Milev A, Mantareva V, Muller S, Kassabov K, Georgiev K., *Hydrophobic Zn(II)-naphthalocyanines as photodynamic therapy agents for Lewis lung carcinoma*. J Photochem Photobiol B, 1994. **23**(1): 35-42.
- Wainwright M. *Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine*. Chem. Soc. Rev., 1996. **25**: 351-359.
- Chen JY, Mak NK, Wen JM, Leung, WN, Chen SC, Fung MC, Cheung WHA. *A comparison of the photodynamic effects of temoporfin (mTHPC) and MC540 on leukemia cells: efficacy and apoptosis*. Photochem Photobiol, 1998. **68**(4): 545-54.
- Frickweiler S, Szeimies R-M, Bäuml W, Steinbach P, Karrer S, Goetz AE, Abels C, Hofstädter F, Landthaler M. *Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro*. J Photochem Photobiol B, 1997. **38**(2-3): 178-83.
- Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A, Koderhold G, Kreitner M. *Hypericin in phototherapy*. J Photochem Photobiol B, 1996. **36**(2): 113-9.
- Mew D, Lum V, Wat CK, Towers GHN, Sun CHC, Walter RJ, Wright W, Berns MW, Levy JG. *Ability of specific monoclonal antibodies and conventional antisera conjugated to hematoporphyrin to label and kill selected cell lines subsequent to light activation*. Cancer Research, 1995. **45**: 4380-4386.
- Vrouenraets MB, Wissner GWM, Stewart FA, Stigter M, Oppelaar H, Postmus PE, Snow,GB, van Dongen. *Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monooclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy*. Cancer Res, 1999. **59**(7): 1505-13.
- Boutorine AS, Brault D, Takasugi M, Delgado O, Helene C. *Chlorin-oligonucleotide conjugates: synthesis, properties, and red-light-induced photochemical sequence-specific DNA cleavage in duplexes and triplexes*. J. Amer. Chem. Soc., 1996. **118**: 9469-9476.
- Stepp H., *Principles of clinical photodynamic therapy*. 2003. **33**(4). <http://www.acta-endoscopica.com/a330401e.html>
- Nelson JS, Roberts WG, Berns JW. *In vivo studies in the utilisation of mono-L-aspartate chlorin (NPe6) for photodynamic therapy*. 1987.**47**:p.4681-4685
- Ambroz M, Beeby A, MacRobert AJ, Simpson MSC, Svensen RK, Phillips D. *Preparative, analytical and fluorescence spectroscopic studies of sulphonated aluminium phthalocyanine photosensitizers*. J. Photochem. Photobiol., 1991. **9**: 87-95
- Bonnett, R., White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. *Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers*. Biochem J, 1989. **261**(1): 277-80.
- Moan J, Berg K. *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. Photochem Photobiol, 1991. **53**(4): 549-53.

Inhibitorji citokromov

Cytochrome inhibitors

Rok Frlan in Marija Sollner Dolenc

Povzetek: Citokromi so membransko vezane monoooksigenaze, ki katalizirajo reakcijo oksidacije različnih endogenih snovi in v telo vnešenih ksenobiotikov. Različne snovi lahko inhibirajo ali inducirajo aktivnost posameznih izoform citokromov in posledično spremenijo farmakokinetični profil učinkovin, ki jih vnesemo v telo poleg modulatorja omenjene izoforme. Posledica so zmanjšan učinek ali celo neželeni in toksični učinki apliciranih učinkovin. Inhibitorje citokromov lahko razdelimo glede na mehanizem delovanja v kompetitivne, kompleksirajoče inhibitorje ter samomorilske substrate. Tudi mnogi pripravki rastlinskega izvora inhibirajo delovanje citokromov, zato lahko ob sočasnem jemanju zdravil in nekaterih rastlinskih pripravkov pride do spremenjenega farmakokinetičnega profila zdravilnih učinkovin.

Ključne besede: *Inhibitorji, citokromi, CYP450, modulatorji, rastlinski pripravki*

Abstract: Most of the cytochromes can be modulated with different chemicals that can induce or inhibit cytochrome activity and can interfere with the normal pharmacokinetic profile of a co-administered drug. Co-administered drugs can exhibit side effects, life threatening toxic effects or, on the other hand, diminished effect. Inhibitors can be divided on the basis of their mechanism of action into competitive, complex forming and mechanism-based inhibitors. Many natural products can have inhibitory effect on cytochromes. Therefore, changes in their pharmacokinetic profile can be observed when some of the natural products are co-administered with therapeutic drugs.

Keywords: *Inhibitors, cytochromes, CYP450, modulators, herbal preparations*

1 Uvod

Ljudje smo vsakodnevno izpostavljeni različnim snovem (ksenobiotikom) iz okolja, ki lahko predstavljajo nevarnost za človeški organizem. Večino ksenobiotikov biotransformacijski encimi pretvorijo v manj lipofilne snovi, ki se zato hitreje izločijo iz telesa. Oksidacija je verjetno najbolj pogosta reakcija biotransformacije ksenobiotikov, ki jo katalizirajo membransko vezane monoooksigenaze - citokromi P450 (CYP450). CYP450 aktivirajo molekularni kisik za oksidacijo različnih endogenih snovi in ksenobiotikov, ki bi se v odsotnosti omenjenih encimov počasneje odstranjevali iz organizma, kar bi lahko vodilo v njihovo povečano zadrževanje v telesu in toksičnost. CYP450 katalizirajo več kot 40 različnih tipov reakcij in so značilni za nekatere bakterije, glive, rastline, žuželke in sesalce.

Mnogi ksenobiotiki, ki jih vnašamo v telo, vplivajo na aktivnost CYP450 bodisi kot induktorji njihove sinteze ali/in kot inhibitorji njihove aktivnosti. Tako indukcija kot inhibicija imata pomemben vpliv v farmakoterapiji, saj lahko posredno ali neposredno vplivata na zmanjšano ali povečano plazemsko koncentracijo sočasno apliciranih zdravilnih učinkovin. V mnogih primerih so posledice takšnih sprememb v aktivnosti CYP450 klinično nepomembne, v nekaterih primerih pa lahko pride do zmanjšane učinkovitosti, povečanega izražanja stranskih učinkov ali toksičnosti zdravilnih učinkovin, ki je lahko tudi življenjsko ogrožujoča (1). Ker je tematika induktorjev in inhibitorjev CYP450 zelo obširna, bomo v nadaljevanju prispevka predstavili samo inhibitorje CYP450, medtem ko bomo induktorje opisali v eni izmed naslednjih števil.

2 Nomenklatura in polimorfizem citokromov

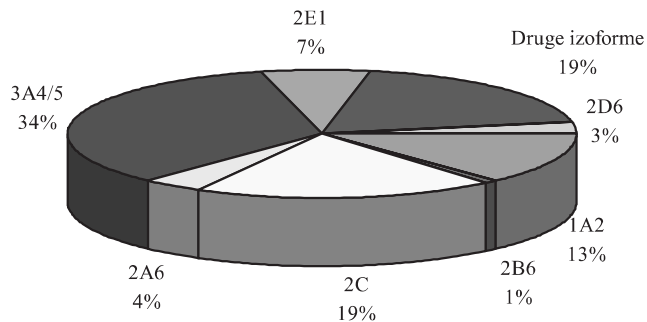
Trenutno je znanih več kot 40 različnih izoform CYP450, ta številka pa se lahko, glede na zadnja odkritja v genomu, v prihodnjih letih poveča vsaj za deset. Izoforme CYP450 poimenujemo tako, da je za oznako CYP z arabsko številko označena družina, naslednja črka pomeni poddružino, arabska številka za njo pa označuje gen za to izoformo (CYP3A4) (2). Encimi CYP450 so razdeljeni v družine in poddružine glede na homologijo v aminokislinskem zaporedju. V isto družino spadajo vsi encimi, ki imajo več kot 40-odstotno homologijo v aminokislinskem zaporedju, v isto poddružino pa spadajo vsi citokromi ene družine, ki imajo več kot 55-odstotno homologijo sekvenc aminokislins. Glede na navedeno delitev poznamo vsaj 17 izoform, od katerih je več kot polovica (devet) udeleženih v biotransformaciji holesterola in steroidnih hormonov. Le družine od CYP1 do CYP4 so udeležene v biotransformaciji ksenobiotikov (1).

Izoforme CYP450 izkazujejo genetski polimorfizem, ki je zelo pomemben, saj deli populacijo v dva fenotipa - v hitre in počasne metabolizatorje. Vzrok take delitve je v tem, da različne izoforme, tudi če spadajo v isto poddružino, metabolizirajo zdravilne učinkovine z različno hitrostjo - ene hitreje in druge počasneje (3). Pri hitrih metabolizatorjih zato včasih ne uspemo doseči terapevtskih plazemskih koncentracij učinkovin, medtem ko lahko pri počasnih metabolizatorjih včasih dosežemo celo toksične koncentracije. Genetski polimorfizem je poleg tega tudi odgovoren za različne interakcije med zdravilnimi učinkovinami, pojav različnih stranskih učinkov in nastanek kancerogenih produktov (4). CYP450, za katere

Inhibitorji citokromov

je značilen fenotipski in/ali genotipski polimorfizem so CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 in CYP2E1. Tudi za CYP3A4 je značilna visoka variabilnost, vendar pri tej izoformi še niso dokazali genetskega polimorfizma (1).

CYP450 izkazujejo, kot večina encimov, visoko regio in stereoselektivnost, poleg tega pa, za razliko od drugih encimov, izkazujejo substrati CYP450 veliko strukturno raznolikost. Razlog leži prav v velikem številu različnih izoform, ki so razporejene v različne družine in poddružine. Tako lahko za vsako od izoform rečemo, da morajo njeni substrati ustrezati določenim strukturnim karakteristikam (5). Zastopanost posameznih izoform v jetrih prikazuje slika 1.



Slika 1: Prisotnost izoform citokromov v jetrih (1)
Figure 1: Distribution of CYP450 isoforms in the liver (1)

Iz slike 1 je razvidno, da je najpomembnejša družina citokromov CYP3, saj predstavlja največji delež glede na zastopanost in delež substratov v biotransformaciji.

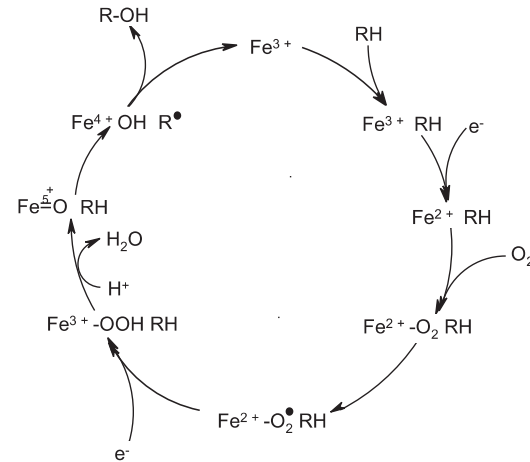
Večina spojin se v procesu biotransformacije pretvorijo v manj toksične spojine. Nekatere spojine pa se v procesu biotransformacije vseeno presnovijo v visoko elektrofilne produkte, ki so sposobni tvoriti kovalentne adukte z DNA. Tvorba epoksidov iz policikličnih aromatskih ogljikovodikov in metabolizem do nitrozaminov sta primera metabolizma s CYP1A, kjer prav tako nastanejo visoko reaktivni produkti (1).

3 Biokemične lastnosti citokromov

V evkariontskih celicah se CYP450 nahajajo kot membransko vezani hemoproteini, ki so zgrajeni iz dveh proteinskih komponent: iz hemskega proteina citokroma P450 in flavoproteina NADPH-CYP450 reduktaze, ki vsebuje kofaktorja flavin mononukleotid (FMN) in flavin dinukleotid (FDN). CYP450 je mesto vezave substrata in kisika ter njegove aktivacije, reduktaza pa skrbi za prenos elektronov iz NADPH na CYP450. Tretja komponenta je fosfolipid fosfatidilholin, ki pospeši prenos elektronov iz flavoprotein NADPH-CYP450 reduktaze na CYP450 (1).

Mehanizem reakcije, ki jo katalizira CYP450, še do danes ni v celoti pojasnjen. Predlagani mehanizem, ki je v veljavi, je predstavljen na

sliki 2. Gre za večstopenjski reakcijski mehanizem, kjer se substrat najprej reverzibilno veže v aktivno mesto CYP450 in se nato preko večjih intermediatov oksidira. Reakcijski cikel se lahko s pomočjo ksenobiotikov ustavi na stopnji kompleksa superoksid-železo, kar vodi v nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (2).



Slika 2: Predpostavljen katalitski mehanizem oksidacije s citokromom P450. RH = substrat (2)

Figure 2: Proposed mechanism of substrate oxidation by cytochrome P450. RH = substrate (2)

4 Inhibitorji citokromov

Ekspresija CYP450 je regulirana z vrsto faktorjev, med drugim tudi z učinkovinami, s snovmi v hrani in z ostalimi ksenobiotiki. Tudi nekatere zdravilne učinkovine spremenijo delovanje CYP450 in tako spremenijo farmakokinetični profil ostalih zdravilnih učinkovin, ki so aplicirane poleg omenjene zdravilne učinkovine. Interakcije med zdravilnimi učinkovinami lahko razdelimo v dve skupini: v tiste, pri katerih je kapaciteta presnovne poti povečana (induktorji) in v tiste, pri katerih je zmanjšana (inhibitorji). Aplikacija dveh zdravilnih učinkovin, od katerih je ena inhibitor izoforme CYP450, s katero se presnovi druga aplicirana učinkovina, poveča plazemsko koncentracijo slednje, medtem ko aplikacija induktora zmanjša plazemsko koncentracijo druge učinkovine (6, 7, 8).

CYP450 so potencialna tarča inhibitorjev, kar vodi v farmakokinetične interakcije, ki so lahko tudi klinično signifikantne in življenjsko ogrožujoče. Glede na mehanizem delovanja v grobem ločimo tri tipe inhibitorjev (2):

- Kompetitivni inhibitorji (npr. antimikotiki)

Tekmovanje za aktivno mesto med dvema učinkovinama je najpogostejši tip inhibicije. Ko zmanjka kompetitivnega inhibitorja je inhibicija končana in encimska aktivnost se obnovi. Inhibicija je takojšnja, že s prvim odmerkom učinkovine.

Pregledni članki - Review Articles

- Nekompetitivni kompleksirajoči inhibitorji (npr. makrolidni antibiotiki)

Po metabolični pretvorbi nastanejo spojine, ki tvorijo z aktivnim mestom CYP450 intermediate, ki so zelo stabilni (ireverzibilni).

- Samomorilski substrati (npr. etinilestradiol)

Učinkovina se med procesom oksidacije pretvori v aktivni intermediat, ki alkilira aktivno mesto istega ali drugega encima.

Zadnji dve obliki inhibicije sta ireverzibilni in trajata dlje kot kompetitivni tip inhibicije, kar pomeni, da se morajo po prenehanju aplikacije inhibitorja encimi na novo sintetizirati.

Največji efekt inhibicije je opazen pri CYP3A4, saj ta izoforma metabolizira največji delež učinkovin. Poleg tega je CYP3A4 pomemben za metabolizem endogenih snovi - testosterona, androstendiona in progesterona (9).

Posamezni tipi inhibitorjev glede na mehanizem delovanja in njihovi predstavniki so prikazani v preglednici 1, medtem ko so inhibitorji po posameznih izoformah prikazani v preglednici 2.

Med kompleksirajoče inhibitorje spadajo mnoge zdravilne učinkovine, najbolj značilni so metilendioksibenzeni, alkilamini in hidrazini, ki tvorijo po presnovni aktivaciji stabilne komplekse s prostetično skupino CYP450. Značilnost primarnih aminov je, da se

Preglednica 1: Predstavniki inhibitorjev citokromov razvrščenih glede na mehanizem delovanja (1, 2, 10, 11)

Table 1: Cytochrome inhibitors representatives divided on the basis of their mechanism of action (1, 2, 10, 11)

Kompetitivni inhibitorji	Kompleksirajoči inhibitorji	Samomorilski inhibitorji
antimikotiki	makrolidni antibiotiki	kloramfenikol
ciklosporin	nevroleptiki	ciklofosfamid
metirapon	triciklični antidepresivi	etinilestradiol
indinavir	selektivni zaviralci privzema serotonina	desogestrel
nikotinska kislina	lidokain	gestoden
nikotinamid	izoniazid	noretisteron
fluorokinoloni		paroksetin
makrolidni antibiotiki		

Preglednica 2: Prikaz inhibitorjev (učinkovin) različnih izoform citokromov (11, 15, 16, 17)

Table 2: Drugs that are inhibitors of various cytochrome isoforms (11, 15, 16, 17)

Izoencim	Inhibitor
CYP1A1	ketokonazol
CYP1A2	cimetidin, fluorokinoloni (ciprofloksacin, enoksacin, levofloksacin, ofloksacin), fluvoksamin, tiklopidin, mikonazol, eritromicin, klaritromicin, kofein, izoniazid, lansoprazol, lidokain, fenacetin
CYP2A6	8-metoksipsoralen, pilokarpin
CYP2B6	tiotepa, mikonazol 8-metoksipsoralen
CYP2C8	trimetoprim
CYP2C9	sulfametoksazol, NSAID (diklofenak), amiodaron, izoniazid, tiklopidin, azoli (ketokonazol, flukonazol), itrakonazol, cimetidin, sulfonamidi, varfarin
CYP2C19	TCA (amitriptilin, nortriptilin, imipramin, desipramin), antidepresivi (fluoksetin, fluvoksamin), azoli (mikonazol, ketokonazol), inhibitorji H ⁺ črpalke (lansoprazol, omeprazol), tiklopidin, kloramfenikol, felbamat, flurbiprofen
CYP2D6	amiodaron, kinidin, cimetidin, H1-antagonisti (klorfeniramin, difenhidramin), SSRI (fluoksetin, paroksetin, amitriptilin) citalopram, desmetilcitalopram, inhibitorji MAO (sertralin), nevroleptiki (haloperidol, tioridazin), metadon, ritonavir, TCA (amitriptilin, nortriptilin, imipramin, desipramin, klomipramin), ranitidine, celekoksib, mikonazol, β-antagonisti (acebutolol, betaksalol), amiodaron, nevroleptiki (klorpromazin, haloperidol), citalopram, flekainid, propafenon, flufenazil, fluvastatin
CYP2E1	disulfiram
CYP3A4, 5, 7	HIV protivirusne učinkovine (delavirdin, indinavir, nelfinavir, ritonavir, sekvinavir), amiodaron, cimetidin, makrolidi (klaritromicin, eritromicin), diltiazem, fluvoksamin, grenivkin sok, itrakonazol, imidazoli (ketokonazol, klotrimazol, flukonazol, itrakonazol), nefazodon, troleandomicin, zaviralci kalcijevih kanalčkov (verapamil, nifedipin, felodipin), kloramfenikol, inhibitorji HMG-CoA reduktaze (atorvastatin, fluvastatin), kanabinoidi, klemastin, TCA (klomipramin, desipramin), ciklosporin, glibenklamid, ifosfamid, midazolam, propoksifen, rivastatin, tamoksifen

N-hidroksilirajo in nato N-oksidirajo do nitrozo funkcionalne skupine, ki kelira železo v hemu in stabilizira fero obliko (12). Pri aminih, ki so substituirani z alkilno skupino, pride ponavadi do dealkiliranja in nato do nadaljnje pretvorbe v nitrozo spojino (2, 13).

Samomorilski inhibitorji imajo ponavadi funkcionalne skupine, ki se oksidirajo do reaktivnih produktov. Sem spadajo predvsem učinkovine z nenasičenimi C-C vezmi, obročni sistemi s furanom, kloramfenikol, spironolakton in nekatere spojine z dušikom (2). Reaktivni intermedii, ki nastanejo z biotransformacijo, alkilirajo prostetično hemsko skupino ali proteinski del CYP450 (14).

4.1 Rastlinski inhibitorji

Pripravke iz rastlin mnogokrat uporabljamo v kombinaciji z zdravilnimi učinkovinami, kar lahko vodi v možne farmakokinetične ali farmakodinamične interakcije. V klinični praksi poznamo mnogo poročil o interakcijah med rastlinskimi pripravki in zdravilnimi učinkovinami, katerih posledica je bil spremenjen učinek in/ali stranski učinki. Ugotovimo lahko spremenjeno absorpcijo, presnovo, porazdelitev in izločanje učinkovin. Spremenjena plazemska koncentracija učinkovin je lahko posledica indukcije ali inhibicije predvsem CYP450 v jetrih (16).

Preventiva pred kancerogenimi snovmi postaja v današnjih časih vse pomembnejša. Med potencialnimi kemopreventivnimi snovmi so tudi naravnimi fenoli, med katere spadajo enostavni fenoli, fenolne kisline, derivati hidroksicimne kisline in najpomembnejši - **flavonoidi**, ki so antioksidanti s protikancerogenim delovanjem. Flavonoide najdemo v sadju, zelenjavi, oreščkih, pijačah iz sadja, kot sta zeleni čaj in vino pa tudi v nekaterih zdravilnih rastlinah, npr. *Ginkgo biloba*. Hrana, bogata s flavonoidi, ščiti pred različnimi oblikami raka predvsem z antioksidativnim delovanjem in preko inhibicije CYP1A1 ter CYP2E1, ki sta odgovorna za biotransformacijo nekaterih prokancerogenov (benzo[a]pireni) v kancerogene. Mehanizem inhibicije še ni poznan, domnevajo pa, da nekateri flavonoidi vplivajo na redukcijsko aktivnost CYP450 in blokirajo prenos elektronov. Najbolj raziskan flavonoid je kvercetin (slika 3), ki se nahaja v visokih koncentracijah v sadju, zelenjavi, čaju in vinu. Flavonoidi imajo lahko dvojno delovanje in so lahko inhibitorji ali induktorji CYP 450 ter, odvisno od strukture, modulirajo encime druge faze. Znano je, da so flavonoidi s hidroksi substituenti inhibitorji, brez hidroksi substituentov pa induktorji CYP450 (18, 19).

Poleg flavonoidov so v rastlinah pogosto prisotni tudi **furanokumarini**. Le-ti se v manjših količinah nahajajo v družinah *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Moraceae* in *Leguminosae* in ravno tako kot flavonoidi inhibirajo ali inducirajo CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A5, CYP2A6, CYP2B1, CYP6B1/3, CYP6B4 ali CYP6D1. Zaradi različne porazdelitve inhibitornih furanokumarinov po družinah imajo različne vrste rastlin različne učinke. Poročajo pa, da je inhibicija neizrazitejša pri furanokumarinih iz soka grenivk. Že enkratna izpostavitve standardnim odmerkom grenivkinega soka inhibira intestinalni CYP3A4 za 3 dni. Pri ljudeh je interakcija soka grenivke z zdravilnimi učinkovinami posledica reverzibilne in ireverzibilne inhibicije intestinalnega CYP3A4 z geraniloksi derivati furanokumarinov, predvsem z 6', 7'-dihidroksibergamotinom (DHB), bergamotinom (slika 3) in z dimeroma furanokumarinov, GF-I-1 in GF-I-4. Furanokumarini so substrati za CYP450, nastali epoksidni

derivati furanokumarinov (epoksidi) pa se ireverzibilno vežejo z apoproteinom. Ker učinek soka traja več kot 24 ur, pogosto uživanje značilno poveča AUC in c_{max} številnih učinkovin. Inhibicijo izoforme CYP3A4 lahko pričakujemo ob uživanju soka grenivke skupaj z ciklosporinom, imidazolom, midazolomom, triazolomom, verapamilom, sekvinavirom, triazolomom, metadonom ter kalcijevimi antagonistami. Posledice so bile številni stranski učinki (20, 21).

Furanokumarin **8-metoksipsoralen** (slika 3), ki se nahaja v peteršilju in pastinaku, je tudi inhibitor CYP450 in se uporablja v terapiji psoriazze, vitiliga in v kombinaciji z UV obsevanjem. Je močan ireverzibilni inhibitor CYP2A6 in CYP2B1 pri glodalcih in pri ljudeh (16).

Izotiocianati, ki se sprostijo po encimski aktivaciji, se nahajajo v zelju, cvetači in brokoliju v obliki glukozinolatov. Izotiocianati kompetitivno in ireverzibilno inhibirajo CYP1A1, CYP1A2, CYP2A1 in CYP2B1, ki so odgovorni za aktivacijo prokancerogenov. Aktivirajo se lahko do izocianatov ali aldehidov, ki so reaktivni in reagirajo s hemom. Feniletilizotiocianat (slika 3) zato zavira pljučno kancerogenezo, ki jo povzročajo nitrozamini iz tobačnega dima (ni znano, da že tobak vsebuje N-nitrozamine, ti nastajajo pri gorenju/tlenju), benzilzotiocianat (slika 3) pa učinkovito zavira nastajanje pljučnih tumorjev, povzročenih z benzo[a]pirenom. Opisani učinki niso samo posledica zaviranja CYP450 temveč tudi aktivacije encimov 2. faze (16).

Česen (*Allium sativum*) je pogosto uporabljena začimba in zdravilo. **Organožveplove spojine**, ki se tvorijo encimatsko po poškodbi celic, so glavna aktivna sestavina česna. Ekstrakti česna inhibirajo različne izoforme CYP450, medtem ko so pri študijah na podganah in miših največkrat opazili indukcijo encimov. Najbolje raziskana učinkovina iz česna je **dialilsulfid** (odgovoren za značilen vonj in okus česna, slika 3), ki ga CYP2E1 oksidira do dialilsulfoksida in naprej do dialilsulfona. Vse te spojine se oksidirajo na eni izmed terminalnih dvojnih vezeh do monoalilepoksida, ki se kovalentno veže na hem ali apoprotein. Inhibicija CYP2E1 učinkovito inhibira metabolizem paracetamola, tetraklormetana, tioacetamida, benzopirena, in N-nitrozodimetilamina do kancerogenih metabolitov ter posledično preprečuje mnoge oblike raka (pljučnega adenoma, raka požiralnika, raka kolona hepatocelularnega karcinoma itd.) (16, 22)

Znano je, da **rdeče vino** inhibira CYP3A4 in podvoji AUC ter c_{max} cisaprida, ki je substrat CYP3A4. Učinek pripisujejo resveratrolu (slika 3) in njegovemu dimeru, ϵ -viniferinu (slika 3), polifenolnemu derivatu, ki ga najdemo v rdečem vinu, grozdju in arašidih in se sintetizira kot odgovor na infekcijo s plesnijo (16, 23).

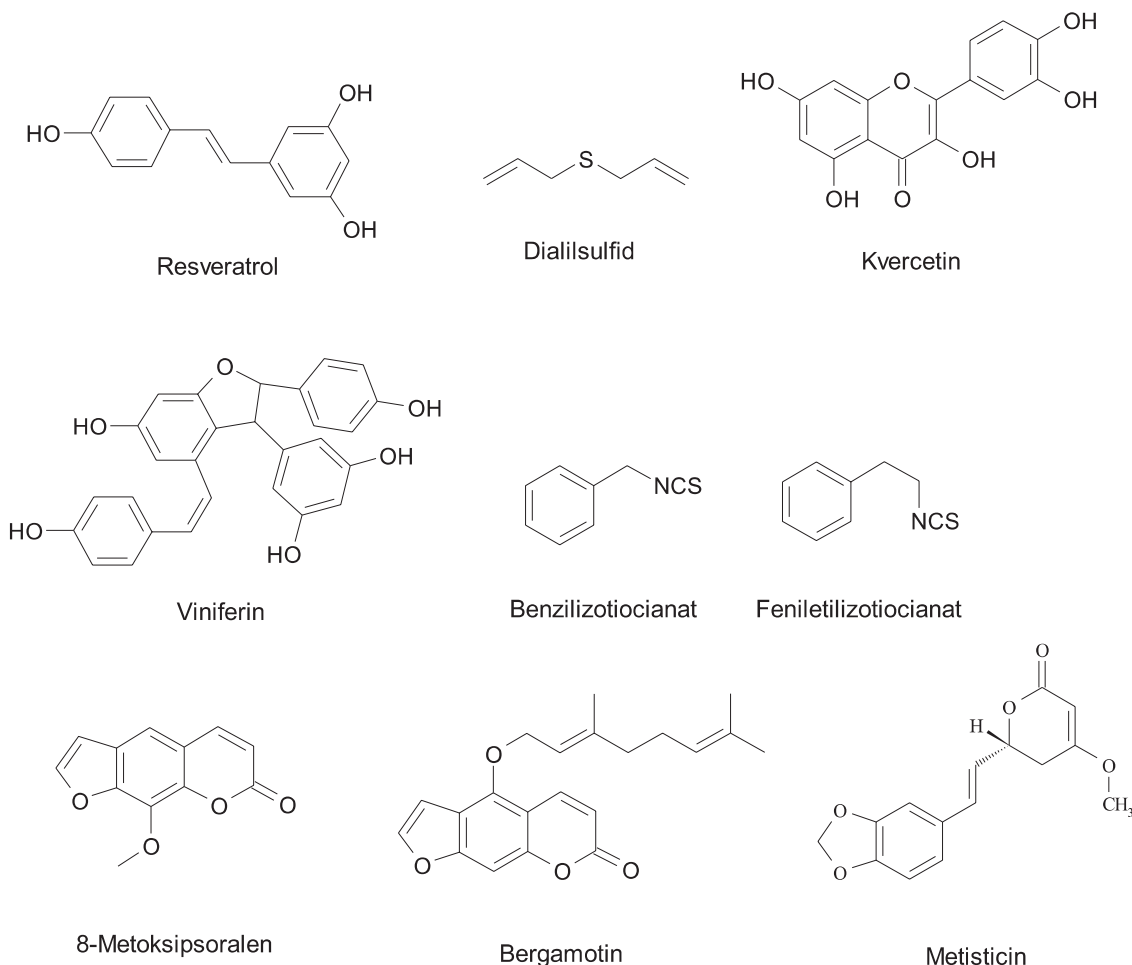
Za **ginkolne kisline** iz ginka (*Ginkgo biloba*) so v *in vitro* poskusih dokazali, da inhibirajo CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 in CYP3A4, hkrati pa je bil v poskusih na živalih dokazan tudi inducirajoči učinek na nekatere izoforme. Zaenkrat še ni jasno, če je učinek ginka tudi klinično signifikanten, čeprav v literaturi poročajo o nekaterih stranskih učinkih (spontane krvavitve), za katere še ne vemo, če so posledica inhibicije CYP450 (24).

Kava kava (*Piper methysticum*) je rastlina iz področja Polinezije, Malezije in Mikronezije, ki se učinkovito uporablja za zdravljenje anksioznosti in nespečnosti. Inkubacija ekstraktov kave z jetrnimi

Pregledni članki - Review Articles

mikrosomi inhibira CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 4A9/11, kar pripisujejo glavnima učinkovinama metisticinu (slika 3) in dihidrometisticinu, ki spadata med kavalaktone in imata v svoji strukturi metilendioksibenzensko strukturo. Zaradi resnih stranskih učinkov je bila uporaba droge prepovedana v Švici in Nemčiji (19, 20).

Zgoraj naštetje spojine, ki se nahajajo v rastlinah, so samo najpomembnejše od tovrstnih spojin, ki inhibirajo CYP450. V literaturi smo našli številna poročila inhibicije CYP450, vendar naštevanje teh primerov zaradi nejasnega delovanja ali majhnega vpliva na CYP450 presega obseg tega članka.



Slika 3: Glavne učinkovine v rastlinah, ki so odgovorne za inhibitorni učinek
Figure 3: Main substances present in herbs, which are responsible for the inhibitory effect

5 Sklep

Mnogi ksenobiotiki lahko inhibirajo delovanje CYP450 in tako vstopajo v interakcije s sočasno vnešenimi zdravilnimi učinkovinami, endogenimi snovmi ali s potencialnimi karcinogenimi snovmi. Za uspešno izvajanje terapije je poznavanje interakcij med učinkovinami zelo pomembno, saj je istočasna aplikacija dveh različnih zdravil v vsakodnevni klinični praksi povsem običajen pojav. Inhibitorje in induktorje CYP450 s svojim delovanjem povečajo možnost neželenih ali toksičnih učinkov oziroma zvečajo ali zmanjšajo terapevtski učinek.

Presnovo zdravilnih učinkovin lahko modulirajo tudi sestavine zdravilnih rastlin in vsakdanje prehrane, česar se še vedno premalo zavedamo. Med laično populacijo namreč še vedno prevladuje prepričanje, da so rastlinski pripravki varni in brez neželenih učinkov, kar je seveda daleč od resnice. Leta 1999 () je bil objavljen podatek, da v ZDA kar 18 odstotkov odrasle populacije poleg zdravil na recept jemlje rastlinske ali vitaminske pripravke, kar lahko bistveno vpliva na potek terapije. Poznavanje interakcij zdravilnih učinkovin z drugimi učinkovinami, snovmi iz zdravilnih rastlin ali sestavinami prehrane postaja tako vse pomembnejše za ustrezno terapijo pacienta.

6 Literatura

1. Hasler AJ, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig V, Falck JR, Farrell G, Kaminsky LS, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. Human Cytochromes. *Mol Aspects Med* 1999; 20: 1-137.
2. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th Ed. Vol. 1. Principles and practice., M. E. Wolff ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995: 135-144.
3. Hu Y, Oscarson M, Johansson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arinco S, Albano E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of human CYP2E: Characterisation of two variant alleles. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 370-376.
4. Mamiya K, Iairi I, Shimamoto J. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenitoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: Studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia* 1998; 39: 1317-1323.
5. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 1991; 266: 13469-13472.
6. Morgan ET. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 207-212.
7. <http://medicine.iupui.edu/flockhart>.
8. <http://www.anaesthetist.com/physiol/basics/metabol/cyp/cyp.htm>.
9. Usmani KA, Rose RL, Hodgson E. Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 384-391.
10. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics, 11th ed., L. L. Brunton, J.S. Lazo, K. L. Parker eds., New York : McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2006: 71-91.
11. www.medscape.com.
12. Shinn AF. Clinical relevance of cimetidine drug interactions. *Drug Saf* 1992; 7: 245-267.
13. Murray M, Hetnarski K, Wilkinson CF. Selective inhibitory interactions of alkoxymethylenedioxybenzenes towards monooxygenase activity in rat hepatic microsomes. *Xenobiotics* 1985; 15: 369-367.
14. Roberts ES, Hopkins NE, Foroozesh M, Alworth WL, Halpert JR, Hollenberg PF. Inactivation of cytochrome P450s 2B1, 2B4, 2B6 and 2B11 by arylalkynes. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 1242-1248.
15. Park JY, Kim K.A, Kim SL. Cloramphenicol Is a Potent Inhibitor of Cytochrome P450 Isoforms CYP2C19 and CYP3A4 in Human Liver Microsomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3464-3469.
16. Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJD. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences* 2004; 74: 935-968.
17. Branch RA, Adedoyin A, Frye RF, Wilson JW, Romkes M. *In vivo* modulation of CYP enzymes by quinidine and rifampin. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 401-411.
18. Schwarz D, Kisselev P, Roots I. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *Eur J Cancer* 2005; 41: 151-158.
19. Galati G, O'Brien P. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolic significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 287-303.
20. Guo LQ, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25: 129-136.
21. Ho PC, Saville DJ. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2001, 4, 217-227.
22. Yang CS, Chhabra SK, Hong JY, Smith TJ. Mechanisms of Inhibition of Chemical Toxicity and Carcinogenesis by Dialyl Sulfide (DAS) and Related Compounds from Garlic. *J Nutr* 2001; 131: 1041S-1045S.
23. Piver B, Berthou F, Dreano Y, Daniele L. Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ϵ -viniferin, the dimer of resveratrol: a comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sci* 2003; 73: 1199-1213.
24. Izzo AA, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs* 2001; 61:2163-2175.
25. Smolinske SC. Dietary supplement-drug interactions. *J Am Med Womens Assoc* 1999; 54: 191-195.

Zdravila v nosečnosti II:

Klinični vidiki

Drugs in pregnancy II: Clinical aspects

Matej Avanzo, Alenka Šavc, Mojca Kerec Kos

POVZETEK: Pri uporabi zdravil v nosečnosti se moramo zavedati, da skoraj vse učinkovine v določeni meri prehajajo iz materinega krvnega obtoka skozi placento v krvni obtok ploda. Nekatere učinkovine dosežejo na strani ploda farmakološko pomembne koncentracije. Za večino zdravilnih učinkovin njihov neškodljiv vpliv na plod ni dokazan, kar zelo oteži ocenitev razmerja med tveganjem in koristjo pri uporabi določene učinkovine med nosečnostjo. V prispevku predstavljamo posamezne skupine zdravilnih učinkovin, ki jih nosečnice najpogosteje uporabljajo in varnost njihove uporabe med nosečnostjo.

Ključne besede: nosečnost, zdravila, neželeni učinki, plod

ABSTRACT: When using drugs in pregnancy, it is necessary to be aware of the fact that almost all drugs enter into fetal blood from maternal blood system by crossing the placenta. Some drugs reach pharmacologically significant concentrations in a fetus. As for most drugs their harmless effect on a fetus is not proved, the evaluation of the risk – benefit ratio of drug administration during pregnancy is difficult. In the contribution for the drugs most often used by pregnant woman their safety during the pregnancy is indicated.

Keywords: pregnancy, drugs, adverse effects, fetus

1 Uvod

Leta 1957 se je na trgu pojavil talidomid, uspavalo in pomirjevalo, ki so ga še posebej priporočali za uporabo v nosečnosti. Pred prihodom na trg so testirali le njegovo akutno toksičnost, ne pa kronične toksičnosti in teratogenosti. Neka snov je teratogena, če lahko povzroči nepravilen razvoj plodovih organov, kar se kaže z motnjami v strukturi in/ali funkciji teh organov. Posledice teratogenosti so lahko upočasnjena rast ali smrt ploda, nastanek in razvoj malignih novotvorb (karcinogeneza) ali pa strukturne ali funkcionalne okvare plodovih organov (malformacija). Talidomid so uspešno tržili in leta 1961 so v zahodni Nemčiji prodali približno milijon tablet dnevno. V istem letu so ugotovili povezavo med talidomidom in novorojenčki z izraženimi malformacijami ušes, nog in rok ter zdravilo umaknili s tržišča. Kot posledica uživanja talidomida se je rodilo približno 10.000 otrok s prirojenimi okvarami (1, 2).

Izkušnja s talidomidom opozarja na možne nevarnosti in zaplete povezane z jemanjem zdravil med nosečnostjo. Verjetnost, da neka teratogena učinkovina povzroči okvare ploda, je povezana tudi s stopnjo razvoja ploda oz. s tem kdaj v nosečnosti ženska jemlje zdravilo. V obdobju približno 16 dni po oploditvi lahko učinkovina povzroči okvaro vseh celic zarodka, kar lahko sproži njegovo smrt in splav. Med 17. in 60. dnevom poteka rast in razvoj organov (organogeneza) in to obdobje je najbolj občutljivo za delovanje teratogenih učinkovin. Pojavijo se lahko funkcionalne in morfološke malformacije. Od 60. dneva po oploditvi ter vse do rojstva je plod

relativno bolj odporen na vplive teratogenih snovi, ki pa vseeno lahko povzročijo motnje v velikosti in številu celic, kar vodi do deformacij ploda (1, 3).

Marsikatera nosečnica mora zaradi akutnih težav ali določenih kroničnih bolezni jemati zdravila kljub znanemu tveganju za plod. V raziskavi, narejeni na Finskem, so ugotovili, da je od 43.470 nosečih žensk 46,2% žensk prejelo med nosečnostjo vsaj eno zdravilo na recept, 12,7% pa tri ali več različnih zdravil. Najpogosteje uporabljena zdravila so bili sistemski antibiotiki. V študiji niso upoštevali zdravil brez recepta in potencialnega zdravljenja v bolnišnici. Z razvojem nosečnosti se znotraj vseh ATC skupin poraba zdravil zmanjšuje, medtem ko uporaba zdravil za zdravljenje kroničnih bolezni (astma, epilepsija, diabetes) ostaja enaka (4). Tudi v raziskavi, ki je zajela 41.293 nosečih žensk v Nemčiji, so ugotovili, da je 85,2% žensk med nosečnostjo prejelo vsaj eno zdravilo na recept in to brez upoštevanja vitaminov, mineralov, joda in železa. Zaskrbljujoče je, da je 9,4% nosečnic prejelo sedem do devet zdravil, 4,1% pa celo deset ali več. V nosečnosti je naraslo število receptov za antacide, antiemetike ter za protimikrobne učinkovine namenjene ginekološkim infekcijam, zmanjšalo pa se je predpisovanje analgetikov, protivnetnih in protirevmatičnih učinkovin ter mišičnih relaksantov (5).

V nadaljevanju prispevka je za skupine učinkovin, ki se nosečnicam najpogosteje predpisujejo za zdravljenje akutnih in kroničnih obolenj, podana varnost njihove uporabe v nosečnosti.

Matej Avanzo, mag. farm., Lek farmacevtska družba d. d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana, Slovenija
Alenka Šavc, mag. farm., Lek farmacevtska družba d. d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana, Slovenija
dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm., Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

2 Zdravila za zmanjšanje ravni serumskih lipidov

Holesterol in drugi produkti, ki nastanejo pri njegovi biosintezi, so esencialni za plodov razvoj, saj omogočajo sintezo steroidov in celičnih membran. Zaviralci HMG-CoA reduktaze (statini) zmanjšajo nastajanje holesterola in njegovih derivatov, zato ima lahko njihova uporaba med nosečnostjo škodljive posledice za plod. Uporaba statinov je zato med nosečnostjo kontraindicirana. Varne alternative ni. Prekinitev jemanja zdravil za zmanjšanje serumskih lipidov med nosečnostjo naj ne bi imela pomembnega vpliva pri dolgotrajnem zdravljenju primarne hiperholesterolemije (8, 12, 13).

3 Nesteroidne protivnetne učinkovine

Nesteroidne protivnetne učinkovine so pogosto uporabljene v nosečnosti. Prostaglandini imajo pomembno vlogo pri regulaciji krvnega obtoka matere in ploda, pri kontrakciji maternice ter sprožitvi poroda. Acetilsalicilna kislina, diklofenak in indometacin dobro prehajajo skozi placento. Za nobeno nesteroidno protivnetno učinkovino ni jasnih dokazov o potencialni teratogenosti za človeka. Ugotovljeno je, da se zaradi inhibicije trombocitov poveča verjetnost neonatalnih krvavitev, vpliva pa lahko tudi na ledvično funkcijo ploda. Uporaba večjih odmerkov acetilsalicilne kisline, predvsem v tretjem trimesečju, lahko povzroči motnje v hemostazi matere in ploda, predčasno zaprtje plodovega arterioznega duktusa ter podaljša nosečnost in porod. Majhni odmerki (50–150 mg dnevno) naj bi preprečevali razvoj gestacijske hipertenzije. Po FDA sistematiki spada acetilsalicilna kislina v skupino C, v tretjem trimesečju pa v skupino D (6, 14–17). Indometacin se jemlje z namenom preprečevanja prezgodnjega poroda (16). Paracetamol (skupina B) je varen v vseh treh trimesečjih nosečnosti, v ustreznih odmerkih in v krajšem časovnem obdobju. Večji odmerki skozi daljši čas povzročajo kraniofacialne nepravilnosti ter okvare prstov, jeter in ledvic. Selektivni COX-2 inhibitorji (npr. celekoksib in rofekoksib) so potencialni tokolitiki, ki zaustavijo ali ublažijo popadke in s tem preprečijo predčasen porod. Povzročajo podobne neželene učinke za plod kot neselektivni COX inhibitorji, le da naj bi bili ti manj pogosti. Zaradi majhnega števila raziskav s to skupino učinkovin se njihova uporaba v nosečnosti ne priporoča (6, 8, 14).

4 Antiemetiki

Slabost in bruhanje spremljata kar 70 do 85% nosečnosti. Kot antiemetiki se pri nas uporabljajo antagonisti serotonina ter antagonisti histaminskih receptorjev H₁. Zadnji so v lekarnah na voljo brez recepta (difenhidramin - Dramina). Nekateri podatki nakazujejo možnost povezave med jemanjem difenhidramina v prvem trimesečju in neznačilnim vzorcem prirojenih nepravilnosti (urogenitalni sistem, oči, ušesa, volčje žrelo, srčne napake, cerebralna hipoplazija). Pri njegovem dolgotrajnem jemanju se lahko pojavijo znaki odtegnitvenega sindroma pri novorojenčkih, pri nedonošenčkih pa retrolateralna fibroplazija. Nevarnost uporabe teh učinkovin sicer ni potrjena (14, 18).

5 Zdravila za kislinsko pogojene bolezni

Gastroezofagealni refluks in peptična razjeda se pojavljata pri 45 do 85% žensk med nosečnostjo (5). Če sprememba prehrane in načina življenja ne pomagata, je potrebna terapija z zdravili. Priporoča se zdravljenje z antacidi ali sukralfatom, ki praktično ne predstavljajo tveganja za plod tudi ob uporabi v prvem trimesečju nosečnosti. Uporaba aluminijevih, magnezijevih in kalcijevih spojin v normalnih terapevtskih odmerkih naj ne bi bila problematična s stališča povzročanja poškodb ploda, natrijevemu hidrogenkarbonatu pa naj se nosečnice izogibajo, saj lahko povzroči metabolno alkalozo. Terapija z antagonisti histaminskih receptorjev H₂ je smiselna v primeru, ko simptomov ne uspemo odpraviti z antacidi. Priporoča se predvsem uporaba ranitidina, saj je edini antagonist histaminskih receptorjev H₂ z dokazano varno uporabo med nosečnostjo, tudi v prvem trimesečju. Dolgotrajna uporaba cimetidina je lahko problematična zaradi njegovega potencialnega antiandrogenega delovanja, kar so opazili predvsem pri živalih. Uporaba zaviralcev protonske črpalke, npr. omeprazole, je med nosečnostjo relativno varna. Zaradi posameznih poročil o povečani toksičnosti za plod, ugotovljeni v študijah na živalih, ter povečani nevarnosti za srčne malformacije pri ljudeh, omeprazol sodi v FDA kategorijo C. Uporaba novejših zaviralcev protonske črpalke (npr. lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol) zaradi pomanjkanja podatkov o varnosti uporabe pri nosečnicah ni priporočljiva, še zlasti v prvem trimesečju nosečnosti (19, 20).

6 Anksiolitiki in antidepressivi

Med anksiolitiki se najpogosteje uporabljajo benzodiazepini. Večinoma dobro prehajajo placento. Ob daljši uporabi so njihove plazemske koncentracije celo večje pri plodu kot pri nosečnici. Podatki o teratogenosti benzodiazepinov so si nasprotujoči. Če je njihova uporaba res nujna, priporočajo benzodiazepine, ki so že dalj časa na tržišču in to v najnižjih učinkovitih odmerkih. Zdravljenje naj bo tudi čim bolj kratkotrajno in naj se proti koncu nosečnosti prekine. Jemanje benzodiazepinov tik pred porodom lahko povzroči hipotonijo in depresijo dihanja ter odtegnitveni sindrom pri novorojenčku (21–23).

Pri zdravljenju depresije se pojavljajo tri skupine učinkovin. Pri neselektivnih zaviralcih prevzema monoaminov niso našli povezav z neonatalnimi abnormalnostmi. Priporoča pa se, da se terapija prekine pred pričakovanim porodom, ker lahko njihova uporaba v zadnjem trimesečju nosečnosti vodi v nespečnost, cianozo, zaprtje in zastajanje urina pri novorojenčkih. Med selektivnimi zaviralci prevzema serotonina je največ raziskav narejenih s fluoksetinom. V raziskavi njegove uporabe v prvem trimesečju, pojavljanje nekaterih opisanih motenj kot so malformacije, spontani splav in predčasni porod, niso mogli povezati z omenjeno terapijo. Ob jemanju v drugem in tretjem trimesečju so opisani pojavi s perinatalnimi zapleti npr.: premajhna porodna teža, pljučna hipertenzija in slabša neonatalna adaptacija. Zaviralci monoamino oksidaz so v nosečnosti kontraindicirani, saj so teratogeni in lahko povzročijo hipertenzijo ter hujše žilne okvare tako pri nosečnici kot pri plodu (16, 22–24).

Pregledni članki - Review Articles

7 Zdravila za zdravljenje diabetesa

Prva generacija sulfonamidnih antidiabetikov (klorpropamid) prehaja skozi placento in stimulira plodovo trebušno slinavko. To poveča koncentracijo insulina v krvnem obtoku ploda, kar lahko vodi do škodljivih učinkov za plod. Pri drugi generaciji sulfonamidnih derivatov (glibenklamid, glipizid, gliklazid) so podatki o prehodu skozi placento nasprotujoči. Ostale skupine peroralnih antidiabetikov so manj raziskane in je njihova uporaba v nosečnosti odsvetovana. Tako je pri nosečnicah z diabetesom, ki jemljejo peroralne antidiabetike, le-te nujno potrebno zamenjati z insulinom, ki zaradi velike molekulske mase ne prehaja skozi placento in ni teratogen (11, 25).

8 Zdravila za sistemsko zdravljenje bakterijskih infekcij

Ta skupina učinkovin se med nosečnostjo uporablja za zdravljenje infekcij pri nosečnici in pri plodu, zato je potrebno vedeti ali uporabljena učinkovina prehaja skozi placento in v kakšni meri. Betalaktamski antibiotiki, penicilini in cefalosporini prehajajo skozi placento, vendar doslej zbrani podatki ne kažejo na povezavo med jemanjem v prvem trimesečju in zvečanim teratogenim delovanjem ali kasnejšim fetotoksičnim učinkom. Pri določenih cefalosporinih (cefaklor, cefaleksin, ceftriakson, cefuroksim) nekatere ugotovitve nakazujejo možnost povezave med jemanjem v prvem trimesečju ter nastankom kardiovaskularnih nepravilnosti in volčjim žrelom, vendar je število zbranih primerov premajhno za ustrezne sklepe. Eritromicin, makrolidni antibiotik, prehaja skozi placento, vendar do sedaj zbrani podatki ne kažejo na možnost, da bi v običajnih terapevtskih odmerkih povečal tveganje za nastanek malformacij in se tako lahko uporablja med nosečnostjo. Med nosečnostjo je uporaba penicilinov, cefalosporinov in eritromicina varna in predstavlja ustrezno alternativo ostalim skupinam protimikrobnih zdravil.

Raziskave na živalih so pokazale, da fluorokinoloni lahko okvarijo sklepni hrustanec. Omenjenih neželenih učinkov na plod pri nosečnicah še niso opazili, vendar do nadaljnjih raziskav uporaba fluorokinolonov med nosečnostjo ni priporočljiva. Tudi aminoglikozidni antibiotiki lahko prehajajo skozi placento. Večina do sedaj zbranih podatkov ne kaže na povečano tveganje za teratogeno delovanje ob jemanju terapevtskih odmerkov, vendar je količina podatkov nezadostna za dokončno oceno tveganja. Za aminoglikozidne antibiotike je znano, da lahko povzročijo okvaro sluha in ravnotežja, zato jih uporabimo le v primerih, ko pričakovana korist za mater opravičuje tveganje za otroka. Kombinacija sulfametoksazola in trimetoprima v prvem trimesečju poveča tveganje za nastanek večjih prirojnih nepravilnosti, pri čemer prevladujejo motnje v zapiranju nevrnalne cevi, pri dodajanju folne kisline pa kardiovaskularne in urogenitalne nepravilnosti. Uporaba je odsvetovana tudi v zadnjem mesecu nosečnosti, ker lahko povzroči zlatenico, hemolitično anemijo in kernikerus pri novorojenčku. Uporaba tetraciklinov je med nosečnostjo kontraindicirana. Pri plodu lahko povzročijo trajno obarvanost zob, hipoplazijo sklenine ter upočasnjeno rast kosti in nohtov. Možen je tudi hepatotoksičen učinek pri nosečnici (6–14, 32–33).

9 Antihipertenzivi

V nosečnosti je zdravljenje z zdravili nujno pri hudi hipertenziji, medtem ko pri milejši hipertenziji to pogosto ni potrebno še zlasti zato, ker pride v prvem in drugem trimesečju nosečnosti pogosto do fiziološkega znižanja krvnega tlaka. V Veliki Britaniji in Združenih državah Amerike hipertenzijo med nosečnostjo najpogosteje zdravijo z metildopo, predvsem zaradi dolgoletnih pozitivnih izkušenj s to učinkovino. Zaviralci kalcijevih kanalčkov so relativno varni za zdravljenje hipertenzije v pozni nosečnosti, zaradi pomanjkanja podatkov o varnosti pa se njihova dolgotrajna uporaba zlasti v prvem trimesečju ne priporoča. Pri uporabi zaviralcev adrenergičnih receptorjev beta brez intrinzične simpatikomimetične aktivnosti, predvsem pri atenololu, se lahko pojavi zastoj v znotraj maternični rasti, neonatalna depresija dihanja, bradikardija in hipoglikemija. Pojav neželenih učinkov je pogostejši ob uporabi atenolola v zgodnjih fazah nosečnosti, povezan pa je tudi z dolžino zdravljenja. Uporaba ostalih zaviralcev adrenergičnih receptorjev beta v nosečnosti je manj problematična, a podatki o varnosti so pomanjkljivi. Diuretiki se nosečnicam ne predpisujejo pogosto, ker njihova uporaba vodi do spremenjenih koncentracij elektrolitov v organizmu ter do zmanjšane volumna plazme, kar lahko vodi do motenj rasti pri plodu. Še posebej je odsvetovana uporaba triamterena, ki vpliva na metabolizem folne kisline, in spironolaktona, ki ima poleg vpliva na folno kislino tudi antiandrogene efekte na plod. Uporaba ACE inhibitorjev in antagonistov receptorjev za angiotenzin II je v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti kontraindicirana, saj lahko te učinkovine povzročijo pri plodu številne okvare, predvsem ledvične. Uporaba ACE inhibitorjev v zgodnji nosečnosti naj bi bila za plod sicer manj tvegana, a se zaradi pomanjkljivih podatkov o varnosti njihova uporaba tudi v tem obdobju nosečnosti ne priporoča (3, 7–9, 13, 16, 26–29).

10 Antiepileptiki

Pri otrocih, katerih matere imajo epilepsijo in se zdravijo s katerimkoli antiepileptikom, je pogostost prirojnih okvar dva do trikrat večja kot pri normalni populaciji, vendar tudi nezdravljena epilepsija predstavlja veliko tveganje za okvare ploda. Fenitoin, natrijev valproat in karbamazepin hitro prehajajo skozi placento ter so teratogeni. Povzročijo lahko poškodbe nevrnalne cevi, centralnega živčnega sistema, obraza in kardiovaskularne poškodbe. Pri novejših antiepileptikih kot sta lamotrigin in gabapentin teratogenosti na živalih niso dokazali, vendar je premalo podatkov o varnosti njihove uporabe pri nosečnicah, da bi lahko izključili teratogene učinke. Pri nosečnicah se tako priporoča monoterapija z najmanjšim učinkovitim odmerkom antiepileptika ter spremljanje koncentracije učinkovine v krvi. Sočasno je priporočljivo jemanje folne kisline, saj antiepileptiki povzročijo njeno pomanjkanje, ta pa je bistvena za normalen razvoj ploda (6–9, 11–13, 30).

11 Zdravila za obstruktivne pljučne bolezni

Nenadzorovana astma pri nosečnicah lahko povzroči zaplete in celo smrt matere ali ploda, zato je korist nadzorovanega zdravljenja vsekakor večja od tveganja. Bronhoselektivni agonisti adrenergičnih

receptorjev beta-2 (salbutamol, salmeterol, formeterol) v dosedanjih raziskavah niso pokazali jasnih znakov nevarnosti za plod, a o njihovi uporabi ni veliko podatkov. Ob pogosti uporabi salbutamola v tretjem trimesečju se lahko pojavijo motnje srčnega ritma pri plodu (bradikardija) in prehodna hipoglikemija. V primeru velikih odmerkov salmeterola in formeterola so pri živalih opazili zapoznelo zakostenitev ploda. Te učinkovine se največkrat uporabljajo skupaj z nižjimi odmerki glukokortikoidov. Slednji naj ne bi predstavljali velikega tveganje za plod, vendar zasledimo poročila o pojavu prirojenih napak (poškodbe ušes, volčje žrelo) ob uporabi v prvem trimesečju nosečnosti. Med glukokortikoidi namenjenimi inhaliranju je največ raziskav opravljenih z budezonidom. Pojavljanje prirojenih napak ob njegovi uporabi ni večje od siceršnjih pričakovanih vrednosti. Teofilin bi bil kljub redkim raziskavam in nasprotujočim rezultatom lahko povezan s pojavom kardiovaskularnih napak in nepravilnostmi v zapiranju nevrnalne cevi ploda. Uporaba velikih odmerkov teofilina proti koncu nosečnosti lahko pri novorojenčku povzroči tahikardijo, razdražljivost in bruhanje. Antagonisti levkotrienskih receptorjev (montelukast in zafirlukast) se uporabljajo za zdravljenje blagih oblik obstruktivne pljučne bolezni. Redki opisani primeri njihove uporabe ne kažejo potencialnega tveganja za plod, prav tako tega ne kažejo raziskave na živalih (14, 31).

12 Sklep

Od nesreče s talidomidom je zdravljenje z zdravili med nosečnostjo postalo razlog za zaskrbljenost. Različne raziskave kažejo, da med nosečnostjo večina žensk uporablja vsaj eno zdravilo, ki je lahko namenjeno akutnemu ali kroničnemu zdravljenju. Za nekatere skupine zdravil ni na voljo absolutno varnih alternativ in tako je na tehnično postavljena morebitna teratogenost učinkovin in z njimi povzročene prirojene okvare ploda ter tveganje za mater in plod ob nezdravljeni bolezni. Velik problem pri uporabi zdravil v nosečnosti predstavlja pomanjkanje zanesljivih informacij o varnosti uporabe učinkovin. V nosečnosti je tako zelo pomembna preiščena izbira zdravila, ki prepreči okvare ploda ter omogoči uspešen zaključek nosečnosti.

13 Literatura

- Rang HP, Dale MM, Ritter JM et al. Pharmacology, 5. izdaja, Churchill Livingstone, 2003: 724–737.
- Koren G, Pastuszak A., Ito S. Drugs in pregnancy. N Engl J Med 1998; 338 (16): 1128–1137.
- Khedun SM, Maharaj B, Moodley J. Effects of antihypertensive drugs on the unborn child; What is known, and how should this influence prescribing? Paediatr Drugs 2000; 2 (6): 419–436.
- Malm H, Martikainen J, Klaukka T et al. Prescription drugs during pregnancy and lactation—a Finnish register-based study. Eur J Clin Pharmacol 2003; 59: 127–133.
- Egen-Lappe V, Hasford J. Drug prescription in pregnancy: analysis of a large statutory sickness fund population. Eur J Clin Pharmacol 2004; 60: 659–666.
- Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. Clin Pharmacokinet 2004; 43 (8): 487–514.
- Pacifici GM, Nottoli R. Placental transfer of drugs administered to the mother. Clin Pharmacokinet 1995; 28 (3): 235–269.
- Shehata HA, Nelson-Piercy C. Drugs to avoid. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001; 15: 971–986.
- Vickers M, Brackley K. Drugs in pregnancy. Curr Obstet Gynaecol 2002; 12: 131–137.
- Niebyl JR. Antibiotics and other anti-infective agents in pregnancy and lactation. Am J Perinatol 2003; 20: 405–414.
- Physicians' desk reference. 58th ed. Montvale: Thomson PDR, 2004.
- Scheinfeld NS, Davis A. Teratology and drug use during pregnancy.
- Baza podatkov o zdravilih
- Geršak K, Bratanič B. Zdravila v nosečnosti in med dojenjem. Ljubljana, 2005
- Ostesen M. Optimisation of antirheumatic drug treatment in pregnancy. Clin Pharmacokinet 1994; 27 (6): 486–503.
- Jacqz-Aigrain E, Koren G. Effects of drugs on fetus. Semin Fetal Neonatal Med 2005; 10: 139–147.
- TERIS; Teratogen Information System: Aspirin. <http://depts.washington.edu>.
- Davis M. Nausea and vomiting of pregnancy; An evidence-based review. J Perinat Neonat Nurs 2004; 18 (4): 312–328.
- Broussard CN, Richter JE. Treating Gastro-Oesophageal Reflux Disease During Pregnancy and Lactation. Drug Saf 1998; 19(4): 325–337.
- Richter JE. Review article: The management of heartburn in pregnancy. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22: 749–757.
- Iqbal MM, Sobhan T, Ryals T. Effects of commonly used benzodiazepines on the fetus, the neonate, and the nursing infant. Psychiatr Serv 2002; 53 (1): 39–49.
- McGrath C, Buist A, Norman TR. Treatment of anxiety during pregnancy; Effects of psychotropic drug treatment on the developing fetus. Drug Saf 1999; 20 (2): 171–186.
- Gjere NA. Psychopharmacology in pregnancy. J Perinat Neonat Nurs 2001; 14 (4): 12–25.
- McElhatton PR, Garbis HM, Elefant E, et al. The outcome of pregnancy in 689 women exposed to therapeutic doses of antidepressants. A collaborative study of the European network of teratology information services (ENTIS). Reprod Toxicol 1996; 10 (4): 285–294.
- Merlob P, Levitt O, Stahl B. Oral antihyperglycemic agents during pregnancy and lactation. Pediatr Drugs 2002; 4 (11): 755–760.
- Olesen C, de Vries CS, Thrane N, et al. Effect of diuretics on fetal growth: A drug effect or confounding by indication? Pooled Danish and Scottish cohort data. Br J Clin Pharmacol 2001; 51 (2): 153–157.
- Magee LA. Antihypertensives. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001; 15 (6): 827–845.
- Rosenthal T, Oparil S. The effect of antihypertensive drugs on the fetus. J Hum Hypertens 2002; 16: 293–298.
- Antolič G, Novak-Antolič Ž. Zdravila za srce v nosečnosti. Farm Vestn 2003; 54: 5–9.
- Lowe S. Anticonvulsants and drugs for neurological disease. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001; 15: 863–876.
- Gluck JC, Gluck PA. Asthma controller therapy during pregnancy. Am J Obst Gynec 2005; 192: 369–380.
- Czeizel AE, Rockenbauer M, Sorensen HT, Olsen J. A population-based case-control teratologic study of oral erythromycin treatment during pregnancy. Reprod Toxicol 1999; 13: 531–536.
- Micromedex® Healthcare Series (2005): Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado

Modulatorji apoptoze kot nova zdravila

Modulators of Apoptosis in drug development

Iztok Vidic, Dušan Šuput, Irina Milisav

Povzetek: Vzrok mnogih bolezni, za katere še ne obstajajo učinkoviti načini zdravljenja, so napake v regulaciji programirane celične smrti (apoptoze). Mnoge raziskave razvoja zdravil za te bolezni so zato osredotočene na možnosti uravnavanja aktivnosti beljakovin, ki so udeležene v apoptozi, npr. kaspaz, proteinskih kinaz, inhibitorjev apoptotskih beljakovin IAP, beljakovin družine Bcl-2 in drugih. Spodaj so navedeni nekateri primeri uporabe modulatorjev apoptotskih beljakovin kot zdravila. V 2. fazi kliničnih preizkusov je uporaba široko spektralnega inhibitorja kaspaz za zdravljenje kroničnega hepatitisa C. V fazi predkliničnih raziskav je inhibitor kaspaze-3, ki je potencialno uporaben za zdravljenje Huntingtonove bolezni. Od leta 2001 je v uporabi inhibitor tirozinske kinaze, ki ga uporabljajo za zdravljenje levkemije in nekaterih gastrointestinalnih tumorjev. Vse pomembnejša v sodobnem pristopu k razvoju zdravil postaja tudi tehnika uporabe nasprotnosmiselnih oligonukleotidov (ang. *antisense*). Med najuspešnejšimi pristopi je utiňanje gena za protein BCL-2, ki je v zaključnih fazah kliničnih preizkusov in ga že vrednotijo na Evropski agenciji za zdravila. Poznavanje funkcij beljakovin v apoptozi in njihovih modulatorjev je ključno za razvoj novih zdravil s katerimi lahko prožimo ali zavremo potek apoptoze v skladu z etiologijo bolezni.

ključne besede: *apoptoza, razvoj zdravil, Bcl-2, IAP, proteinske kinaze*

Abstract: Defects in regulation of apoptosis result in a number of human diseases for which there are no adequate medical or pharmacological treatments. Many drug discovery studies have focused on small molecular modulators of apoptosis-relevant proteins, like caspases, protein kinases, inhibitors of apoptotic proteins (IAP), Bcl-2 family proteins and others. For example, preclinical studies of reversible caspase-3 inhibitor have shown its potential neuroprotective role in animal models of Huntington disease. An irreversible broad spectrum caspase inhibitor for chronic hepatitis C virus infection is in the phase II clinical trials. An inhibitor of tyrosine kinase involved in the regulation of cell proliferation is being used for the treatment of chronic myeloid leukaemia and some gastrointestinal tumours since 2001. Modern drug development strategies involve also the use of antisense mRNA in cancer treatment. Among the most successful is the antisense targeting of BCL-2, which is currently being reviewed for the approval by the European Medicines Agency. The knowledge about the functions of proteins involved in apoptosis and of their modulators is therefore crucial for designing new drugs, which promote or suppress apoptosis according to the aetiology of disease.

key words: *apoptosis, drug development, Bcl-2, IAP, protein kinase*

1 Uvod

Apoptoza je pomemben proces med organogenezo, saj iz tkiva odstrani odvečne, nepotrebne in okvarjene celice, ključna pa je tudi v preostalem obdobju življenja s fiziološkim pomenom v samoobnavljajočih se tkivih, kot so koža, črevesna sluznica in kostni mozeg (1).

Motnje in okvare apoptoze zato vodijo v številna patološka stanja in se odražajo v mnogih pomembnih boleznih. Po nekaterih ocenah naj bi bilo premalo ali preveč apoptoze vpleteno v več kot polovico vseh bolezni, za katere še ne obstajajo učinkoviti načini zdravljenja (2). Tako je izguba telesnih celic zaradi prekomernih apoptotskih procesov povezana s kapjo, oslabitvijo in zastojem delovanja srca, nevrološki motnjami, nevrodegeneracijo ter s sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS). Nezmožnost odstranitve

okvarjenih in mutiranih celic zaradi napak v (ne)poteku apoptotskih procesov pa je značilnost avtoimunih ter malignih obolenj (1). Pri tem je spoznavanje biokemičnih mehanizmov in molekularnih osnov uravnavanja apoptoze podlaga za izdelavo novih načinov zdravljenja teh bolezni.

2 Razvoj zdravil

Eksperimentalno dokazane nepravilnosti v uravnavanju apoptoze so vpletene v nastanek in razvoj bolezni, kot so AIDS, Alzheimerjeva, Huntingtonova in Parkinsonova bolezen, avtoimunske bolezni (sistemski lupus eritematodes, diabetes melitus tipa I in II, revmatoidni artritis, rakasta obolenja ter možganska kap in ishemična bolezen srca (povzeto v 1). Veliko zanimanje strokovne javnosti je zato usmerjeno v raziskave novih terapevtskih strategij preko obetajočih možnosti farmakološkega uravnavanja apoptotskih mehanizmov.

2.1 Kaspaze

Apoptotsko značilne morfološke in biokemične spremembe so posledica aktivacije predstavnikov proteinske družine cisteinskih proteaz, ki cepijo za aspartatom. Ti encimi se imenujejo kaspaze (ang. *caspases* = *aspartate-specific cysteine proteases*) (povzeto v 2). Obstajata dva pomembna načina njihove aktivacije. Pri prvem (t. i. ekstrinzična pot) kaspaze aktivirajo izvencelični signali, ki se prenesejo v celico preko receptorjev za ligande Fas, TNF ali TRAIL. Ti receptorji so transmembranski proteini, ki imajo receptorsko domeno za vezavo liganda izpostavljeno na površini celice. Vezava liganda na receptor povzroči vezavo nekaterih proteinov na citosolno stran receptorja. Med temi proteini je tudi prokaspaza-8 (povzeto v 1). Mitohondriji so vključeni v drug tip aktivacije kaspaz (t. i. intrinzična pot), pri katerem se ob signalu za sproženje apoptoze iz medmembranskega prostora mitohondrijev v citosol sprosti citokrom c. Vezava citokroma c na citosolni protein Apaf-1 (ang. apoptotic protease activating factor-1) v odvisnosti od ATP povzroči oligomerizacijo Apaf-1 in nastanek multimernega kompleksa med Apaf-1, citokromom c in prokaspazo-9 (povzeto v 1). Ta kompleks se imenuje apoptosom, aktivira prokaspazo-9, kaspaza-9 pa lahko nato aktivira kaspazi -3 ter -7. Ker kaspazi -8 in -9 delujeta na začetku proženja kaspazne kaskade, sta zanimivi tarči za razvoj novih zdravil, ki bi delovala na ekstrinzično ali na intrinzično pot v najzgodnejših stopnjah proteaznih kaskad.

2.1.1 Majhni molekularni inhibitorji

Kaspaze prepoznavajo specifična tetrapeptidna zaporedja proteinov in cepijo peptidno vez na C-terminalni strani aspartatnega ostanka znotraj tetrapeptidnih zaporedij. Pri tem ima velik pomen za specifičnost proteolize aminokislinski ostanek na prvem mestu v tetrapeptidnem zaporedju (4). Odkrite tridimenzionalne strukture aktivnih mest nekaterih kaspaz in njihove tetrapeptidne specifičnosti omogočajo razvoj majhnih molekularnih inhibitorjev, ki bi jih lahko uporabili za zdravljenje nekaterih bolezni. Tako je podjetje IDUN Pharmaceuticals (ZDA) v 2. fazi kliničnih preizkusov uporabe široko spektralnega ireverzibilnega inhibitorja kaspaz IDN-6556 pri zdravljenju kroničnega hepatitisa C (5), potekajo pa tudi predklinične raziskave tega zdravila za zdravljenja akutne odpovedi jeter pri transplantacijah le teh (6). Družba Merck & Co. (ZDA) pa je v fazi predkliničnih raziskav uporabe inhibitorja M826 za kaspazo-3, ki je potencialno uporaben za zdravljenje Huntingtonove bolezni (7).

2.1.2 Utišanje kaspaznih genov

Učinkovito orodje za zmanjšanje ekspresije genov v sesalskih celicah predstavlja tehnika utišanja genov s siRNA (ang. small interfering RNA). Zender in sodelavci so proučevali *in vivo* utišanje gena za kaspazo-8 s siRNA pri akutnem virusnem hepatitisu (8). siRNA proti kaspazi-8 inhibira ekspresijo te kaspaze, kar zaščiti celice pred apoptozo, posredovano z vezavo adenovirusnega liganda (AdFasL) na receptorje Fas (8). Ta predklinična raziskava odpira upanje v uspešno uporabo tehnike utišanja genov s siRNA pri mnogih boleznih, katerih vzrok je pretirano proženje apoptoze zaradi povečane ekspresije in aktivacije različnih iniciacijskih kaspaz.

2.1.3 Kaspaze in virus HIV

Glavno oviro pri zdravljenju AIDS-a predstavljajo rezervoarji virusa

HIV v latentno okuženih pomagalnih limfocitih T ter drugih potencialnih rezervoarjih, npr. v makrofagih in dendritskih celicah (9). Virus HIV povzroča citopatološke učinke preko mnogih mehanizmov, med katere sodi tudi apoptoza. Za adenovirusni protein E1B 19K so ugotovili, da inhibira apoptozo limfocitov T, inducirano z virusom HIV (10). Pri tem pa se je pokazalo, da inhibicija apoptoze limfocitov T z E1B 19K ne zmanjša replikacije virusa HIV in ne omogoči dovzetnosti inficiranih celic za učinkovit imunski odziv. Takšna terapija proti virusu HIV se je zato izkazala za neučinkovito (3).

Alternativno pot k zdravljenju infekcije s HIV predstavlja popolno izkoreninjenje z virusom okuženih celic. Vocerco-Akbani in sodelavci so predlagali način za doseg tega s konstruiranjem prokaspazi-3 analognega proteina (11). Ta je sestavljen iz kaspaze-3, združene s sekvenco TAT, ki nadomešča prodomeno kaspaze-3 in hkrati omogoči prehod proteinov iz zunajceličnega prostora preko plazmaleme v citosol. V fuzijskem proteinu TAT-kaspaza-3 so med domeno TAT in domeno za kaspazo-3 vstavljena specifična aminokislinska zaporedja, ki jih prepoznajo in cepijo proteaze virusa HIV. S proteolitično cepitvijo na teh mestih pride do aktivacije kaspaze-3, ki nato povzroči apoptozo z virusom HIV inficiranih celic (11). Rešitev je zelo domiselna, vendar so v dostopni literaturi zaenkrat objavljene raziskave le na celičnih kulturah.

2.2 Inhibitorji apoptoznih proteinov

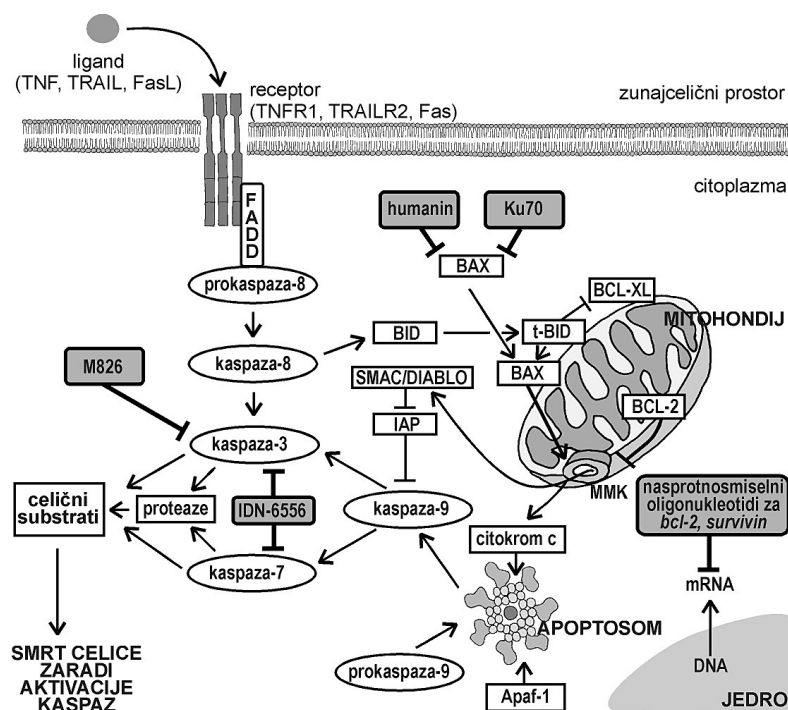
Inhibitorji apoptoznih proteinov IAP (ang. inhibitors of apoptotic proteins) imajo mnoge funkcije, najpomembnejša pa je njihova vezava na aktivirane kaspaze (ponavadi sta to efektorski kaspazi-3 in -7 ter iniciacijska kaspaza-9), s čimer jih inaktivirajo. Proteini IAP so vpleteni tudi v bolezni – npr. ekspresija proteina survivina je lahko povečana v rakastih celicah (12). Utišanje gena za survivin z nasprotnosmiselno mRNA je trenutno v 1. fazi kliničnih preizkusov (Isis Pharmaceuticals Inc., ZDA) (13, 14), potekajo pa tudi predklinične raziskave zdravljenja raka z inhibicijo proteinov IAP z uporabo majhnih molekularnih antagonistov (15, 16).

Ker delovanje proteinov IAP inhibira protein Smac/DIABLO, ki se med apoptozo tako kot citokrom c sprosti iz mitohondrijev (17, 18), so predvideli možnost razvoja novih zdravil na osnovi mehanizma vezave med proteini IAP in Smac/DIABLO. Chai in sodelavci (2002) so ugotovili, da je N-terminalni del proteina SMAC zadosten za inhibicijo proteinov IAP, kar povzroči njihovo ločitev od aktiviranih kaspaz (19). To spoznanje odpira možnost razvoja zdravil za nekatere bolezni, katerih vzrok je zmanjšano proženje kaspaz, s konstruiranjem majhnih peptidnih inhibitorjev za proteine IAP na osnovi aminokislinskega zaporedja proteina Smac/DIABLO, vendar tovrstne raziskave na kliničnem nivoju zaenkrat niso objavljene v dostopni literaturi.

2.3 Družina proteinov Bcl-2

Družina proteinov Bcl-2 združuje tako pro- kot tudi antiapoptotske proteine, ki imajo v sekvenčnem zaporedju do štiri konzervativne Bcl-2 homologne domene (BH₁, BH₂, BH₃ in BH₄). Domene BH kodirajo α -vijačnice in na osnovi njihovega števila ter funkcije proteinov Bcl-2 lahko slednje razdelimo v 3 razrede: (i) antiapoptotski proteini, ki imajo ohranjene vse štiri domene BH (npr. BCL-2, BCL-xL, BCL-w); (ii) proapoptotski proteini, ki vsebujejo tri domene BH₁-BH₃ (npr. BAK, BAX) in (iii) proapoptotski proteini Bcl-2 z eno domeno BH, ki so

Pregledni članki - Review Articles



Slika 1 Modulatorji apoptoze – potencialna zdravila

Dve osnovni poti proženja apoptoze: s celične površine z aktivacijo kaspaze-8 in prek mitohondrija z aktivacijo kaspaze -9. Modulatorji apoptoze – potencialna zdravila – so na temno sivem ozadju, ob proteinu, katerega inhibirajo. MMK: mitohondrijski mega kanal.

(POTENCIALNE) UČINKOVINE	MESTO IN NAČIN DELOVANJA	BOLEZEN	STADIJ RAZISKAV
IDN-6556	inhibitor kaspaz -3 in -7	kronični hepatitis C	Faza II kliničnih preizkusov (IDUN Pharmaceuticals - ZDA)
M826	inhibitor kaspaze-3	Huntingtonova bolezen	predklinična (Merck & Co. - ZDA)
siRNA za kaspazo-8	utišanje mRNA za kaspazo-8	nevrodegenerativne bolezni, avtoimuna obolenja	predklinična (Medical School Hannover - Nemčija)
fuzijski protein TAT-kaspaza 3	sprožitev apoptoze po razcepu s proteazami virusa HIV	AIDS	predklinična (Howard Hughes Medical Institute – ZDA)
nasprotnosmiselna RNA za survivin	utišanje mRNA za survivin	različni malignomi	faza II kliničnih preizkusov (Isis Pharmaceuticals Inc. - ZDA)
peptidi Ku70	inhibicija proteina BAX	nevrodegenerativne bolezni	predklinična (The Blood Center of South Eastern Wisconsin - ZDA)
nasprotnosmiselna RNA za bcl-2	utišanje mRNA za protein BCL-2	levkemija, maligni melanom, multipli mielom	faza III kliničnih preizkusov (Genta Inc.- ZDA)
Glivec®	inhibitor tirozinske kinaze	levkemija, gastrointestinalni tumorji	odobreno leta 2001 pri FDA (Novartis Pharma GmbH - Nemčija)
Iressa	inhibitor kinaze FGF-R	pljučni rak	faza III kliničnih preizkusov (AstraZeneca – Velika Britanija)
Tarceva™	inhibitor kinaze FGF-R	pljučni rak	faza III kliničnih preizkusov (OSI Pharmaceuticals Inc. - ZDA)
flavopiridol	inhibitor od ciklina odvisnih kinaz (Cdks)	kronična limfocitna levkemija	faza III kliničnih preizkusov (Chronic Lymphocytic Leukemia Research Consortium - ZDA)

Tabela 1: Preizkušanje modulatorjev apoptoze za zdravljenje bolezni, katerih vzrok ali posledica so napake v regulaciji apoptoze

Modulatorji apoptoze kot nova zdravila

homologi ostalim predstavnikom le v domeni BH₃ (npr. BAD, BID, BIM) (20). Pri ljudeh so našli 23 predstavnikov te družine proteinov, kar bi lahko omogočilo tkivno-specifično selekcijo tarčnih mest za razvoj zdravil (1).

Odkrivanje sekundarne in terciarne strukture proteina BCL-2 je razkrilo, da je domena BH₄ ključna za heterodimerizacijo proteinov BCL-2 in BAX, kar prepreči sprostitvev citokroma c in proteina Smac/DIABLO iz mitohondrijev v citosol, s tem pa je preprečena tudi intrinzična pot sproženja apoptoze. Zato obstaja možnost zdravljenja malignomov s preprečevanjem delovanja proteina BCL-2 s pomočjo agensov, ki bi se vezali z njegovo domeno BH₄ (21).

Znižanje nivoja ekspresije proteina BCL-xL, kakor tudi drugih negativnih regulatorjev (supresorjev) v procesu apoptoze zmanjša sposobnost preživetja celic. Novi načini zdravljenja raka na osnovi zniževanja intracelularnih koncentracij antiapoptotskih dejavnikov danes vedno bolj vznikajo z biotehnološko uporabnostjo DNA, ki kodira nasprotnosmiselne oligonukleotide za utišanje mRNA supresorjev apoptoze (22).

Protein BAX najdemo v normalnih celicah v neaktivni obliki v citoplazmi, kjer je v kompleksu s proteini (npr. Ku70, 14-3-3 in peptid humanin), ki preprečujejo njegovo translokacijo v mitohondrije (23). Hidrofobna C-terminalna transmembranska domena proteina BAX, s katero se ta protein vsidra v zunanjo mitohondrijsko membrano, je v neaktivni citosolni konformaciji ujeta v hidrofoben žep proteina (24), ki ga sestavljajo domene BH₁, BH₂ in BH₃ (25). Aktivacija proapoptotskih proteinov Bcl-2, ki so homologi ostalim predstavnikom le v domeni BH₃, sprosti protein BAX iz proteinskega kompleksa (24) in povzroči njegovo translokacijo iz citosola do mitohondrijev (23). Pri tem se C-terminalna transmembranska domena sprosti iz hidrofobnega žepa, kar omogoči vezavo proteina BAX v zunanjo mitohondrijsko membrano, kjer homo-oligomerizira in s sodelovanjem še nekaterih drugih proteinov tvori perforacije (mitohondrijske mega kanale) v mitohondrijskih membranah (24). C-terminalna transmembranska regija proteina BAX je zato obetajoča tarča za razvoj terapevtikov, ki bi vplivali na mitohondrijsko posredovano sproženje apoptoze. Terapevtiki, ki bi izzvali sprostitvev C-terminalne regije iz hidrofobnega žepa proteina BAX, bi s tem sprožili apoptozo in bi zato lahko bili potencialno uporabni za zdravljenje rakastih obolenj. Po drugi strani pa bi lahko terapevtike, ki bi ovirali sprostitvev C-terminalne regije iz hidrofobnega žepa in s tem inhibirali translokacijo proteina BAX iz citosola v zunanjo membrano mitohondrijev, uporabili za zdravljenje neurodegenerativnih in drugih bolezni, ki so povezane z izgubo telesnih celic zaradi prekomernih apoptotskih procesov (25). Taki terapevtiki za neurodegenerativne bolezni bi lahko bili 5-aminokislinski peptidi BIP (ang. BAX-inhibiting peptides), ki so jih izdelali na osnovi homologije vezavnega mesta proteina Ku70 za protein BAX (23). Predklinične raziskave uporabe peptidov Ku70 potekajo na Centru za raziskave krvi v Wisconsinu (ZDA) (26).

Tzung in sodelavci so odkrili, da majhni peptidi, ki oponašajo domeno BH₃, inducirajo apoptozo preko inhibicije antiapoptotskih proteinov Bcl-2 (27). Tako oblikovane peptide bi zato lahko uporabili kot obetavno antitumorsko terapijo, saj je povečana ekspresija antiapoptotskih proteinov BCL-2 in BCL-xL povezana z rezistenco rakastih celic na mnoga zdravila (27), npr. cisplatin, bleomicin idr.

Podjetje Genta Inc. (ZDA) pa uspešno zaključuje 3. fazo kliničnih preizkusov zdravljenja nekaterih oblik raka (levkemija, maligni melanom in multipli mielom) z utišanjem gena za protein BCL-2 s pomočjo nasprotnosmiselnega oligonukleotida, ki se veže na prvih 6 kodonov sekvence mRNA za človeški *bcl-2* in s tem povzroči njegovo degradacijo (28, 29).

2.4 Proteinske kinaze

Proteinske kinaze so v procesu apoptoze vpletene v prenos apoptotskih ali antiapoptotskih signalov, kot tudi izvršitev samouničevalnega procesa, zato so tako proteinske kinaze kot tudi njihovi inhibitorji zanimiva tarčna mesta za razvoj novih zdravil pri zdravljenju raka. Najobetavnejši pristop k razvoju tovrstnih terapij predstavlja konstruiranje specifičnih ATP-kompetitivnih inhibitorjev, ki bi se vezali v žepe za vezavo ATP ob kinaznih aktivnih centrih (30). Od leta 2001 je v uporabi Glivec® (Novartis Pharma GmbH, Nemčija), inhibitor v kontrolo proliferacije vpletene tirozinske kinaze, ki ga uporabljajo za zdravljenje levkemije in nekaterih gastrointestinalnih tumorjev (31). V 3. fazi kliničnih preizkusov zdravljenja pljučnega raka pa sta dva inhibitorja tirozinskih kinaz povezanih z receptorjem epidermalnega rastnega faktorja: Iressa/ZD1839 (AstraZeneca, Velika Britanija) (30, 32) in Tarceva™/OSI-774 – zaključena 3. faza (OSI Pharmaceuticals, Inc., ZDA) (33). V začetnih fazah kliničnih poskusov za zdravljenje različnih malignomov je flavopiridol – inhibitor od ciklina odvisnih kinaz (Cdks, 34). V kliničnih preizkusih so še mnogi drugi inhibitorji proteinskih kinaz in po številu teh raziskav predstavljajo proteinske kinaze drugo najpomembnejšo skupino celičnih proteinov kot tarčnih mest za razvoj novih zdravil, takoj za receptorji, ki so sklopljeni z G-proteini (35).

3 Sklepi

Napake v izražanju ali funkciji proteinov povezanih s proapoptotskimi ali antiapoptotskimi učinki negativno vplivajo na potek ali pa so vzrok za razvoj mnogih bolezni. Ideje za razvoj zdravil in terapevtski pristopi za te bolezni šele vznikajo z novimi spoznanji o poteku procesa apoptoze. Pri tem so osnova odkrivanja novih zdravil raziskave vseh v apoptozo vključenih proteinov, vključno z njihovimi biokemijskimi in molekularno-biološkimi mehanizmi delovanja ter tridimenzionalno zgradbo. Šele razjasnitev teh odnosov s pomočjo obstoječih in tudi modernih raziskovalnih tehnik s področja biomedicine bo postopno privedlo do odkritja vse večih farmakoloških pristopov k zdravljenju teh bolezni. Predklinične raziskave regulacije apoptoze potekajo v smereh zdravljenja neurodegenerativnih bolezni, nekaterih virusnih okužb (tudi HIV) in različnih tumorskih obolenj. Najdlje v fazah kliničnih preizkusov sta trenutno zdravili za kronični hepatitis C (široko spektralni inhibitor kaspaz IDN-6556 – IDUN Pharmaceuticals) in različne oblike rakastih obolenj (utišanje gena za protein BCL-2 – Genta Inc.). Od leta 2001 dalje je v uporabi inhibitor tirozinske kinaze Glivec® (Novartis Pharma GmbH, Nemčija), ki ga uporabljajo za zdravljenje levkemije in nekaterih gastrointestinalnih tumorjev. Zanimanje za nova, učinkovita zdravila za bolezni, ki so danes težko ali celo neozdravljive in katerih vzrok so nepravilnosti v poteku apoptoze, je zelo veliko, zato lahko z optimizmom upamo, da bodo mnoge predklinične raziskave v nekaj letih prešle v klinične, če bodo uspešne, pa tudi v splošno klinično prakso.

Pregledni članki - Review Articles

Zahvala

Zahvaljujemo se Vanji Marvin za pomoč pri izdelavi slike 1.

Literatura

- 1 Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 2001;7:314-319.
- 2 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
- 3 Phenix BN, Badley AD. Influence of mitochondrial control of apoptosis on the pathogenesis, complications and treatment of HIV infection. *Biochimie*. 2002;84:251-264.
- 4 Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:17907-17911.
- 5 <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00088140?order=1>
- 6 Natori S, Higuchi H, Contreras P et al. The caspase inhibitor IDN-6556 prevents caspase activation and apoptosis in sinusoidal endothelial cells during liver preservation injury. *Liver Transpl*. 2003;9:278-284.
- 7 Toulmond S, Tang K, Bureau Y et al. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol*. 2004;141:689-97.
- 8 Zender L, Hutker S, Liedtke C et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7797-7802.
- 9 Chun TW, Fauci AS. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10958-10961.
- 10 Antoni BA, Sabbatini P, Rabson AB et al. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. *J Virol*. 1995;69:2384-2392.
- 11 Vocero-Akbani AM, Heyden NV et al. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med*. 1999;5:29-33.
- 12 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:239-252.
- 13 Holmlund JT. Applying antisense technology: Affinitak and other antisense oligonucleotides in clinical development. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1002:244-251.
- 14 Isis Pharmaceuticals. http://www.isispharm.com/product_pipeline.html. Accessed January 2006.
- 15 Wu TY, Wagner KW, Bursulaya B et al. Development and characterization of nonpeptidic small molecule inhibitors of the XIAP/caspase-3 interaction. *Chem Biol*. 2003;10:759-767.
- 16 Oost TK, Sun C, Armstrong RC et al. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 2004;47:4417-4426.
- 17 Du C, Fang M, Li Y et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
- 18 Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
- 19 Chai J, Du C, Wu JW et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;406:855-862.
- 20 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:1899-1911.
- 21 Hirota M, Zhang Y, Fujita N et al. NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *Biol Chem*. 1999;274:20415-20420.
- 22 Lebedeva I, Rando R, Ojwang J et al. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res*. 2000;60:6052-6060.
- 23 Qin Q, Patil K, Sharma SC. The role of Bax-inhibiting peptide in retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve transection. *Neurosci Lett*. 2004;372:17-21.
- 24 Kaufmann T, Schinzel A, Borner C. Bcl-w (edding) with mitochondria. *Trends Cell Biol*. 2004;14:8-12.
- 25 Schinzel A, Kaufmann T, Schuler M et al. Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *J Cell Biol*. 2004;164:1021-1032.
- 26 Sawada M, Sun W, Hayes P et al. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol*. 2003;5:320-329.
- 27 Tzung SP, Kim KM, Basanez G et al. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol*. 2001;3:183-191.
- 28 Genta Technology Platforms: Antisense. http://www.genta.com/Genta/InvestorRelation/2005/press_20060103.html. Accessed January 2006.
- 29 Genta: Ongoing Clinical Programs. <http://www.genta.com/genta/ClinicalProgram/programs1.html>, Accessed January 2006.
- 30 Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E et al. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther*. 2002;93:79-98.
- 31 http://www.glivec.com/content/about_glivec/index.jsp
- 32 Iressa <http://www.iressa-us.com/prof.asp>. Accessed: January 2006.
- 33 (Osi)Pharmaceuticals: Tarceva. <http://www.osi.com/OSI/products.asp?id=171>, Accessed: January 2006.
- 34 <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00098317?order=1>
- 35 Cohen P. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1:309-15.

Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin

Colloidal silicon dioxide as a drug carrier

Odon Planinšek

Povzetek: Sinteza silicijevega dioksida s sol-gel postopkom, ki poteka z izdelavo koloidne suspenzije (sola) in geliranjem sola v gel, omogoča vgrajevanje termolabilnih učinkovin v različne strukture. Izdelamo lahko monolite, vlakna, obloge, mikrodelce ali nanodelce. Na področju farmacije poteka razvoj predvsem v smeri uporabe kserogela silicijevega dioksida kot nosilca učinkovin za peroralno uporabo. Uporabnost se kaže tudi pri izdelavi oblik za implantacijo (monoliti) in za injiciranje biorazgradljivih mikrodelcev za nadzorovano sproščanje učinkovine.

Ključne besede: porozni silicijev dioksid, sol-gel tehnologija, mezoporozni nosilci učinkovin

Abstract: The synthesis of silicon dioxide by a sol-gel technique through the formation of colloidal suspension (sol) and gelation of the sol into the gel enables incorporation of heat-sensitive active substances into the different structures. Monoliths, fibers, coatings, microparticles or nanoparticles can be formed. In pharmaceutical applications use of xerogel as a drug carrier for oral applications is under development. Sol-gel derived silica can be used also as implantable (monoliths) or injectable (microparticles) biodegradable carrier for controlled drug delivery.

Key words: porous silica, sol-gel technology, mesoporous drug carriers

1 Uvod

Porozne snovi z veliko specifično površino uporabljamo kot adsorbente, katalizatorje ali nosilce katalizatorjev ter v mnoge druge namene. Po nomenklaturi IUPAC jih delimo na mikroporozne (premer por <2 nm), srednjeporozne (2-50 nm) in makroporozne (>50 nm) snovi (1). Nekatere porozne anorganske snovi so se v zadnjih letih pojavile tudi kot potencialni nosilci učinkovin, s katerimi želimo izboljšati biorazpoložljivost, doseči dostavo do mesta delovanja, nadzorovano sproščanje in drugo. Sintetične snovi, ki jih uporabljamo v te namene, so zeolit, kserogel silicijevega dioksida in porozna keramika (2-5). Največ raziskav poteka na področju amorfne silicijevega dioksida, izdelanega s sol-gel postopkom.

Silicijev dioksid obstaja v dveh osnovnih oblikah, kristalni in amorfni. V kristalni obliki je eden izmed najbolj razširjenih mineralov na Zemlji kamor spadajo kvarz, kristobalit in tridimit. Medtem ko je kristalni toksičen (večina bolezni - silikoz, povezanih s kristalnim silicijevim dioksidom, je posledica vdihavanja delcev), se amorfna oblika uporablja tudi v farmacevtske namene. Amorfne oblike silicijevega dioksida so: steklo, diatomejska prst in silikagel.

Steklo obravnavamo kot fizikalno amorfno stanje snovi. Kot čisti silicijev dioksid lahko steklo pridobivamo iz kristalnega kvarza, ki ga talimo pri 1900 °C v vakuumu, s katerim odstranimo mehučke zraka, ter s hitrim ohlajanjem. Staljeni (*fused*) silicijev dioksid pridobimo s plamensko hidrolizo silicijevega tetraklorida nad 1500 °C. Diatomejsko prst sestavljajo fosilni depoziti mikroskopskih skeletov alg diatomej. Amorfni silicijev dioksid, pridobljen iz tekoče faze, imenujemo oborjeni ali koloidni. Za izdelavo lahko uporabimo

Kistlerjevo reakcijo natrijevega silikata (vodno steklo) in klorovodikove kisline:



Za izdelavo porozne strukture (aerogela) lahko poteka odstranjevanje vode pri kritičnih pogojih, temperaturi 374 °C in tlaku 221 bar. Če pa zmesi dodamo metanol, ki se z vodo meša, so ti pogoji nekoliko blažji ($T_{kr \text{ MeOH}} = 243 \text{ °C}$, $P_{kr \text{ MeOH}} = 63,8 \text{ bar}$, 6). Razvit je bil tudi postopek, kjer lahko aerogel izdelamo tudi pri sobnih pogojih (7).

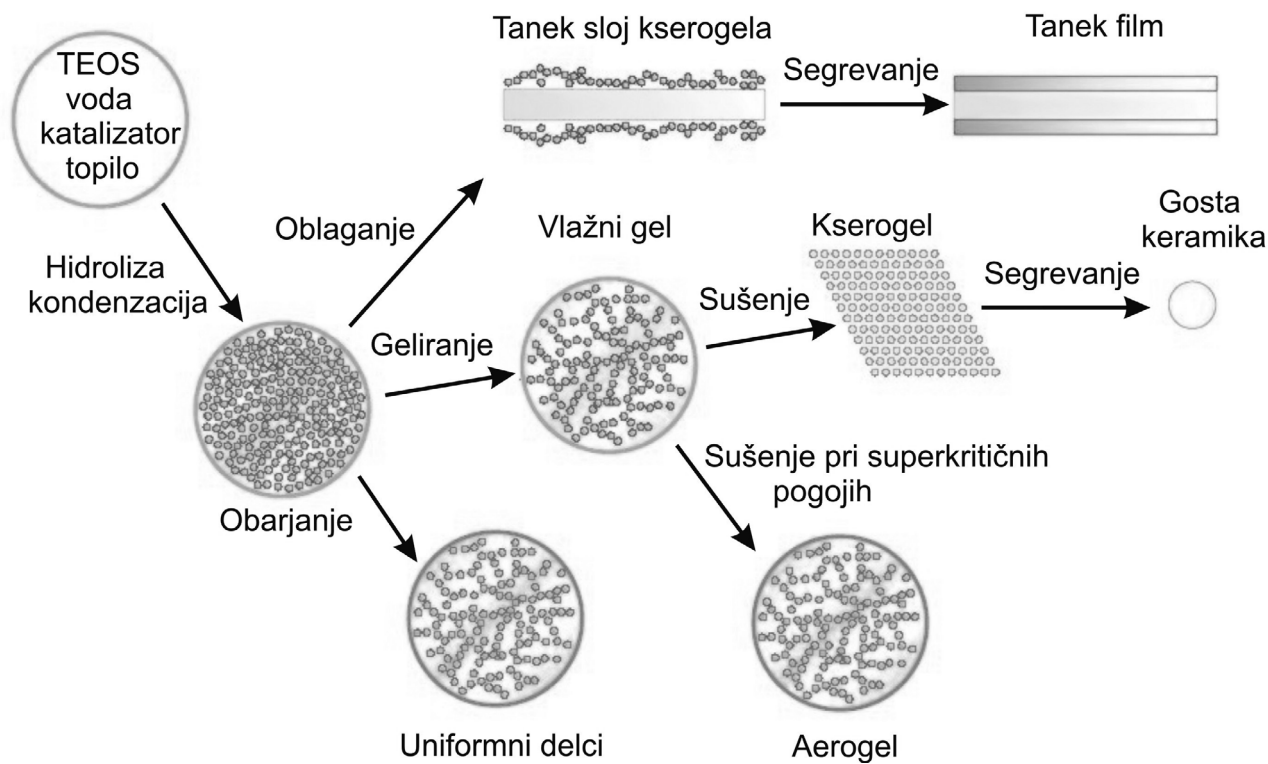
Druga možnost izdelave silikagela je sol-gel postopek z uporabo tetraalkilortosilikata (8).

Raziskave različnih silikagelov potekajo na osnovi poznavanja silicijevega dioksida, ki se že uporablja v farmaciji. V evropski farmakopeji najdemo tri monografije za silicijev dioksid: Silica ad usum dentalem (silikagel, dentalni), Silica colloidalis anhydrica (silikagel, koloidni brezvodni), Silica colloidalis hydrica (silikagel, koloidni hidratirani).

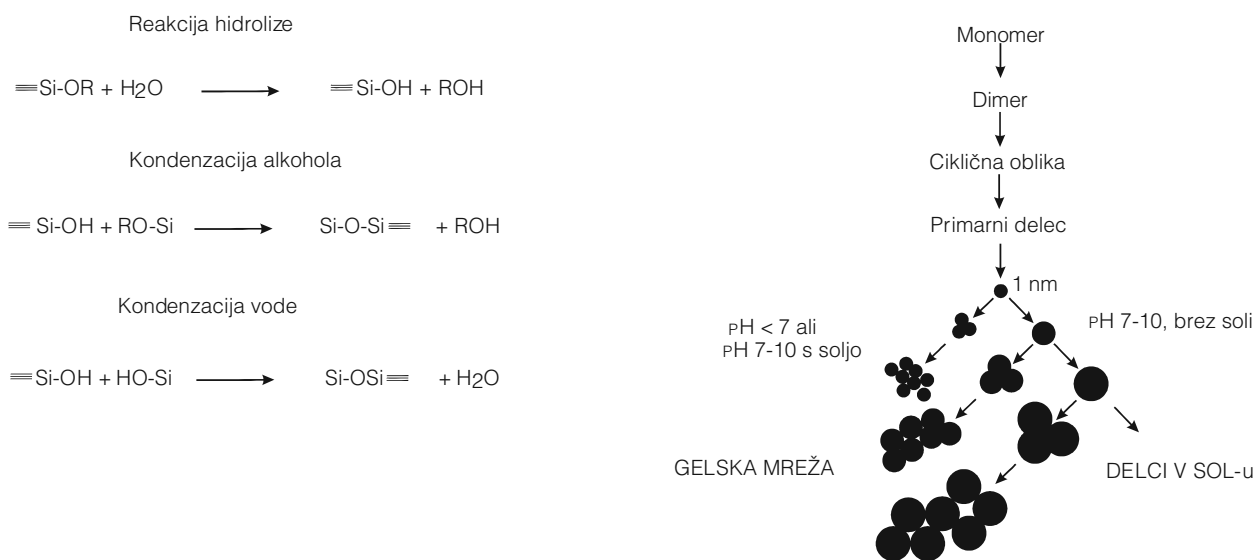
2 Sol-gel tehnologija

Okside, sintetizirane s sol-gel postopkom, uporabljamo za izdelavo delcev, vlaken, tankih filmov, monolitov in poroznih membran (slika 1) (5). V gelsko strukturo lahko vključimo učinkovino ali celo celice. Raziskave so pokazale, da beljkovine (tripsin, glukozna oksidaza in hidrogen peroksidaza) in mnoge druge učinkovine. vgrajene v kserogel silicijevega dioksida, obdržijo aktivnost.

Pregledni članki - Review Articles



Slika 1: Pregled sol-gel postopka z nekaterimi aplikacijami (9).
 Figure 1: An overview of sol-gel processing together with some general applications (9).



Slika 2: Reakcije alkoksilanov (10) in tvorba silicijevega dioksida iz sol-gel postopka s TEOS (11).
 Figure 2: Reactions of alkoxysilanes (10) and the formation of silica from the sol-gel processing of TEOS (11).

3 Sinteza in lastnosti silicijevega dioksida

V zadnjih desetletjih tudi na farmacevtskem področju narašča število raziskav uporabnosti silicijevega dioksida, pridobljenega s sol-gel postopkom. Ime je povezano z metodo, ki poteka pri nizki temperaturi z uporabo prekursorjev, s katerimi izdelamo homogene keramike in stekla. Najprej izdelamo koloidno suspenzijo (sol), sledi geliranje sola in tvorba vlažnega gela. V večini sol-gel postopkov uporabljamo vodo kot topilo in nizkomolekulske alkilsiloksane kot sta tetraetoksilan (TEOS) ali tetrametoksilan (TMOS) kot prekursorja silicijevega dioksida. Alkoksidi hidrolizirajo z vodo tako, da tvorijo silanole ob prisotnosti bazičnega ali kislega katalizatorja. Reakcije alkoksilanov lahko povzamemo v obliki treh stopenj (slika 2):

- hidroliza alkoksida,
- silanol-silanol kondenzacija,
- silanol ester kondenzacija.

Hidroliza poteče z nukleofilnim napadom kisika iz vode na silicijev atom. S kondenzacijskimi reakcijami, ki sledijo, se tvorijo siloksanse vezi. Polimerizacijske korake lahko delimo na (slika 2):

- polimerizacija monomerov v polimere,
- kondenzacija polimerov v primarne delce,
- rast ali aglomeracija primarnih delcev v večje ali v verigo,
- povezovanje delcev v verige in tridimenzionalno mrežo.

Mreža verig, ki se tvori v tekočem mediju, povzroči krčenje v gel. V zadnji stopnji voda in alkohol odparita, kar povzroči krčenje ali lomljenje monolitnega gela (10).

4 Dejavniki, ki vplivajo na strukturo kserogela silicijevega dioksida, pridobljenega s sol-gel postopkom

Osnovni značilnosti silicijevega dioksida, pridobljenega s sol-gel postopkom, sta poroznost in amorfna struktura. Pomembna lastnost je tudi njegova reaktivnost, ki jo omogočajo proste hidroksilne skupine. Mikrostrukturo kserogela silicijevega dioksida lahko nadzorujemo s spreminjanjem razmerja voda/alkoksid v reakcijski zmesi, vrsto katalizatorja in njegovo koncentracijo, s sintranjem pri povišani temperaturi, uporabo alkil substituiranih alkoksidov ali dodatkom drugih snovi.

4.1 Vpliv razmerja voda/alkoksid na lastnosti kserogela

Molarno razmerje voda/alkoksid ima zelo velik vpliv na mikrostrukturo kserogela silicijevega dioksida (10). Pri nizkem razmerju prevladuje reakcija kondenzacije, zaradi česar je čas nastajanja gela podaljšan in nastane mikroporozna struktura. Geli, ki so jih izdelali z razmerjem voda/alkoksid > 4 , so imeli večje pore od gelov, izdelanih z razmerjem < 4 (12). Pri razmerju voda/alkoksid nad 10 je bila mikrostruktura kserogela skoraj neodvisna od vsebnosti vode v reakcijski zmesi. Poleg tega so ugotovili, da imajo geli, ki vsebujejo malo vode, veliko

nezreagiranih alkoksi ligandov in tvorijo linearne strukture (13). Pri veliki vsebnosti vode se tvorijo bolj razvejani polimeri. Pri nizkem razmerju voda/TEOS in nizkem pH lahko izdelamo vlaknaste strukture (14).

4.2 Vpliv katalizatorja na lastnosti kserogela

Katalizator vpliva na pH reakcijske zmesi, ta pa na relativno razmerje hitrosti reakcij hidrolize in kondenzacije, tako da lahko nastanejo različni produkti v sol obliki (od razvejanih verig do koloidne raztopine) (10). Iler deli procese polimerizacije glede na tri pH območja, v katerih potekajo: $\text{pH} < 2$, $\text{pH} 2-7$, $\text{pH} > 7$ (11). $\text{pH} = 7$ je meja, ker sta topnost in hitrost raztapljanja silicijevega dioksida pri tej vrednosti največja. Od pH vrednosti je odvisen tudi mehanizem rasti delcev. V kislem mediju se rast delcev ustavi pri velikosti 2-4 nm. Pri pH nad 7 je rast delcev odvisna predvsem od temperature. Nastanejo lahko delci, večji od 100 nm. Pri pH nad 7 so delci negativno nabiti in se odbijajo, kar preprečuje njihovo agregacijo. Pri nizkem pH, v bližini izoelektrične točke, se delci več ne odbijajo in tvorijo mrežo, ki vodi v nastanek gela (slika 2).

Relativne hitrosti hidrolize in kondenzacije določajo tudi morfologijo končnega kserogela. Delci silicijevega dioksida so pri nizkem pH pozitivno nabiti in pri visokem pH negativno nabiti. Šibko bazični sol vsebuje velike množine deprotonirane silanolne skupine (SiO^-), ki pospešijo hitrost kondenzacije, nastanejo razvejane strukture. Geliranje teh struktur vodi v nastanek mezoporoznih področij z velikostjo por 2-50 nm. Z nižanjem pH do izoelektrične točke ($\text{pH} = 2-3$) se podaljšuje čas geliranja, kar vodi v nastanek linearnih in razvejanih mikroporoznih struktur (premer por < 2 nm) (15). Pri zelo kislem pH pod izoelektrično točko so posušeni geli spet mezoporozni, saj protoniranje silanolnih skupin do SiOH^+ , ki so dobro izstopajoče skupine, pospeši reakcijo kondenzacije (10).

4.3 Vpliv kemijske modifikacije na lastnosti kserogela

Organsko modificirani silikati predstavljajo hibridne sisteme, v katerih kombiniramo več prekursorjev. Kserogeje, kjer so organske verige kovalentno pripete na atom silicija, imenujemo tip II (16). Te kemijsko vezane skupine spremenijo notranjo strukturo tako, da zmanjšajo stopnjo premreženja. Na površini se zmanjša število silanolnih skupin, s čimer se spremeni reaktivnost in hidrofobnost (14). Z uravnavanjem razmerja tetraalkoksilana in alkil substituiranega alkoksida vplivamo na hidrofobnost silikagela. Velikost por in specifična površina naraščata s podaljševanjem alkilne skupine reagenta. Te spremembe v strukturi gela vplivajo tudi na hitrost sproščanja učinkovin (3).

V kserogelih tipa I so modifikatorji (površinsko aktivne snovi, anorganske soli, beljakovine, nabiti polimeri) organske snovi vezani z van der Waalsovimi ali hidrofobnimi interakcijami. Prisotnost teh spojin vpliva na velikost por in specifično površino silikagela (17).

Veliko silikagelov, ki jih raziskujemo v terapevtske namene, vsebuje neurejene pore s široko porazdelitvijo velikosti. S sintezo MCM (*Mobil Composition of Matter*) 41 nastane mezoporozna silika z urejeno porozno notranjo strukturo s porami, ki tvorijo heksagonalni vzorec (slika 3).

6 Biokompatibilnost amorfne silicijevega dioksida

Biokompatibilnost definiramo kot ustrezen lokalni ali sistemski učinek biosnovi na gostitelja (32). Pričakujemo odsotnost stranskih učinkov, kot so toksično, karcinogeno, imunogeno ali vnetno delovanje. Silicij je eden izmed esencialnih elementov. Kristalinični silicijev dioksid je citotoksičen v makrofagih in povzroča spremenjeno rast granulacijskega tkiva (33, 34). Kserogeli, pridobljeni s sol-gel postopkom, so biokompatibilni in bioaktivni, saj tvorijo kemijske vezi s tkivom in stimulirajo rast kosti (35-37). Raziskave so pokazale, da po subkutani aplikaciji kserogel silicijevega dioksida obdajo kolagenska vlakna, ki po štirih tednih vsebujejo le malo vnetnih celic (35, 38, 39). Prav tako so raziskovali proliferacijo kultur murinskih fibroblastov in aktivacijo polimorfonuklearnih levkocitov s sol-gel pridobljenimi kserogeli. Kserogeli niso inhibirali rasti fibroblastov niti niso povzročili vnetne reakcije s tvorbo polimorfonuklearnih levkocitov (40, 41). Čeprav je narejenih še premalo raziskav, lahko predvidevamo, da so s sol-gel postopkom pridobljeni kserogeli netoksični, saj inducirajo normalno rast različnih celic.

Po izpostavitvi vodi se kserogel začne s hidrolizo siloksanskih vezi razgrajevati v Si(OH)_4 (10). Ta difundira v lokalno tkivo npr. okrog implantata, vstopa v krvni in limfni obtok ter se izloča z urinom, skozi jetra ali pa ga fagocitirajo makrofagi (42). Med absorpcijo koncentracija Si ostaja v fiziološkem območju. Akumulacije v perifernih organih ni bilo zaznati, kar pomeni, da se silicij v topni obliki neškodljivo izloči skozi ledvica.

7 Nekatere druge farmacevtske aplikacije silicijevega dioksida kot nosilca učinkovin

Poleg monolitov in delcev silicijevega dioksida, pridobljenega s sol-gel postopkom, potekajo raziskave pri razvoju tudi drugih, tehnološko bolj zahtevnih farmacevtskih oblik.

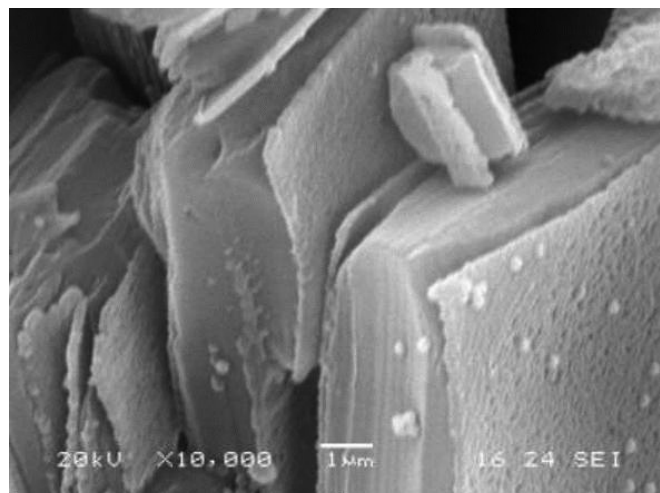
7.1 Oblaganje delcev

Z oblaganjem lahko vplivamo na hitrost sproščanja učinkovine, jo zaščitimo pred vplivi okolja ali prikrijemo neprijeten okus učinkovine. Na Kemijskem inštitutu in Fakulteti za farmacijo v Ljubljani smo za prikrivanje okusa in nadzorovano sproščanje sol-gel postopek uporabili za oblaganje kristalov klaritromicina in bili pri tem relativno uspešni (slika 4) (43).

Pogosto želimo izdelati delce učinkovine nanometerskih velikosti pravih oblik, kar je z obarjanjem težko doseči. Kadar nam uspe oboriti okrogle delce učinkovine, lahko pričakujemo uspešno oblaganje s silicijevim dioksidom (44). Učinkovina je lahko tudi sestavni del obloge, sestavljene iz silicijevega dioksida, iz katere se nadzorovano sprošča.

7.2 Mikrosfere iz silicijevega dioksida za parenteralno aplikacijo učinkovin

Izdelava mikrosfer omogoča izdelavo delcev z ozko porazdelitvijo velikosti, izboljšanimi pretočnimi lastnostmi učinkovine in ustrezno



Slika 4: Elektronsko mikroskopska slika klaritromicina, obloženega s silicijevim dioksidom.

Figure 4: SEM micrographs of silica-coated clarithromycin particles.

poroznostjo ter ohranitev aktivnosti termolabilnih učinkovin. Kortesuo in sodelavci so izdelali mikrosfere z raztapljanjem učinkovine v hidrolizirani sol, ki so ga sušili z razprševanjem (4). Izdelali so mikrosfere, ki so vsebovale toremifen citrat ali deksomedetomidinijev klorid, velike nekaj deset mikrometrov. Kljub temu, da je bil izkoristek relativno nizek (20-78 %), gre za obetaven postopek, ki omogoča izdelavo oblike z nadzorovanim sproščanjem učinkovine. V primerjavi z monolitnimi delci silikagela so bili ti delci manj porozni z manjšo površino. Zaradi tega je tudi delež vgrajene učinkovine v delcih manjši kot pri izdelavi monolitnih delcev. Po začetni hitri raztopitvi učinkovine s površine delcev je in vitro nadzorovano sproščanje trajalo od 7 do 50 dni. Razgradnja silikagela je potekala počasneje od sproščanja učinkovine, zato je bilo raztapljanje posledica tako difuzije kot erozije delcev.

7.3 Implantati za kosti

Silicijev dioksid, ki vsebuje ustrezno učinkovino, lahko uporabimo tudi kot material za polnjenje in regeneracijo odmrlih prostorov, povzročenih s kirurškim posegom ali pri poškodbah kosti. Pri uporabi uveljavljenih klasičnih bioaktivnih materialov za ta namen (npr. biopolimerni cement, na SiO_2 temelječe bioaktivno steklo) pride ponavadi do vnetnih procesov, povzročenih zaradi prisotnosti pirogenih mikroorganizmov, ki jih zdravimo sistemsko z antibiotiki. Negativnim učinkom sistemske aplikacije se lahko izognemo s polnjenjem mezoporoznega silicijevega dioksida z ustrezno učinkovino (npr. antibiotikom), ki deluje kot rezervoar za lokalno nadzorovano sproščanje (45). Z uporabo sol-gel tehnologije ter postopkom emulgiranja in odparitve topila so izdelali tudi tako imenovano hibridno strukturo, sestavljeno iz mezoporoznega silicijevega dioksida in PLGA (kopolimer mlečne in glikolne kisline). Na ta način so zmanjšali delež učinkovine, ki se sprosti na začetku

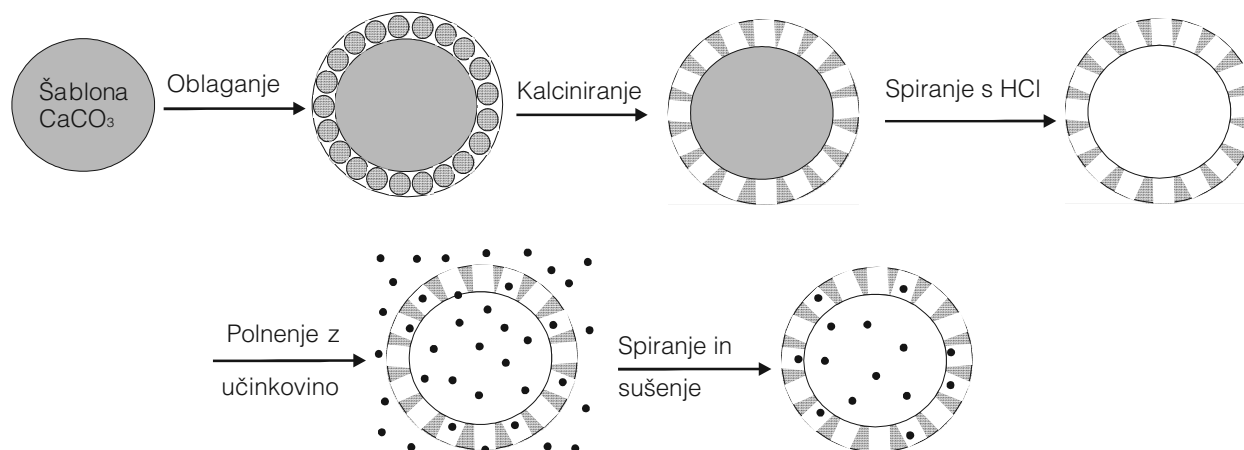
Pregledni članki - Review Articles

raztapljanja ("burst" učinek) in podaljšali čas sproščanja glede na delce, ki niso vsebovali PLGA (46). V gelsko strukturo lahko razen antibiotika vgradimo tudi peptide (npr. TGF- α 1-človeški rastni faktor), ki stimulirajo rast kosti (22).

7.4 Nanodelci kot nosilci učinkovin

Chen in sodelavci so izdelali votle nanodelce silicijevega dioksida s premerom 60-70 nm in debelino stene 10 nm (slika 5). Kot šablono so uporabili delce kalcijevega karbonata premera 40 nm, ki so jih s kemijsko sintezo obložili z SiO_2 . Kompozit so nato kalcinirali pri 700 °C, da je nastala porozna skorja. Odstranitev CaCO_3 so dosegli z

raztapljanjem v raztopini HCl. Specifična površina izdelanih delcev je bila skoraj 900 m²/g. Votle delce so nato polnili z učinkovino (Slika 5). Zmešali so jih z vodno raztopino učinkovine ter spirali z acetonom. Sledilo je sušenje. Večina učinkovine se je adsorbirala na površini delcev. Raztapljanje adsorbirane učinkovine je bilo pospešeno, delež, ki je prešel pore in dosegel votlino delca (25 %), pa se je sprostil z zamikom (30). V drugem primeru so votle nanodelce polnili z etanolno raztopino brilliant modrega (modelna učinkovina) pri superkritičnih pogojih. Na ta način so dosegli boljše polnjenje votline. Na začetku se je ponovno raztopila na površini adsorbiran delež modelne učinkovine (60 %), medtem ko je bilo raztapljanje preostalega dela (40 %) počasnjeno (do 19 ur) (46).



Slika 5: Stopnje izdelave votlih nanodelcev silicijevega dioksida in polnjenje z učinkovino.
Figure 5: Procedures for preparing hollow silica nanoparticles and loading with the drug.

8 Zaključek

Koloidni silicijev dioksid izdelan s sol-gel postopkom je porozen biokompatibilen material z mnogimi možnostmi uporabe v farmaciji. Izdelava monolitov, mikrododelcev ali nanodelcev in drugih struktur omogoča nadzorovano sproščanje učinkovine in ciljno terapijo. Uporabljamo jih za izdelavo farmacevtskih oblik za peroralno aplikacijo, s katerimi se izognemo predsistemskemu metabolizmu učinkovine, in za parenteralno aplikacijo, ne da bi prišlo do procesov vnetja. Poleg tega je koloidni silicijev dioksid, izdelan s sol-gel postopkom, bioaktiven, saj se veže na kosti in stimulira njihovo rast. Pričakujemo lahko, da se bo s sol-gel postopkom pridobljeni amorfni silicijev dioksid kmalu pojavil v farmacevtskih izdelkih, ki bodo omogočali bolj učinkovito in pacientu prijazno zdravljenje.

9 Literatura

1. Ciesla U, Schüth F. Ordered mesoporous materials. *Micropor Mesopor Matter* 1999; 27: 131-149.
2. Charnay C, Begu S et al. Inclusion in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57: 533-540.
3. Unger K, Rupprecht H et al. The use of porous and surface modified silicas as drug delivery and stabilizing agents. *Drug Dev Ind Pharm* 1983; 9: 69-91.
4. Kortusuo P, Ahola M et al. In vitro evaluation of dol gel processed spray dried silica gel microspheres as carrier in controlled drug delivery. *Int J Pharm* 2000; 200: 223-229.
5. Ahola M, Kortusuo P et al. Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. *Int J Pharm* 2000; 195: 219-227.
6. Kistler SS. Coherent expanded aerogels and jellies. *Nature* 1991; 127, 741-747.

Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin

7. Schwertfeger F, Frank D, Schmidt M. Hydrophobic waterglass based aerogels without solvent exchange or supercritical drying. *J non-Crystalline Solids*. 1998; 225: 24-29.
8. Peri JB. Infrared study of OH and NH₂ groups of a dry silica aerogel. *J.Phys.Chem.* 1966; 70: 2937-2945.
9. The Sol-Gel research program at AWE. *Discovery Magazine* 2002; 5. http://www.awe.co.uk/main_site/scientific_and_technical/publications/discovevery_july_2002/index.html
10. Brinker CJ, Scherer GW, 1990. *The physics and chemistry of sol-gel processing*. Academic Press Inc, San Diego, CA, USA.
11. Iler RK. 1979. *The chemistry of silica*. John Wiley & Sons, New York.
12. Ro JC, Chung, I. J., 1991. Structures and properties of silica gels prepared by the sol-gel method. *J Non-Cryst. Solids* 1991; 130: 8-17.
13. Kusakabe K, Sakamoto S et al. Pore structure of silica membranes formed by a sol-gel technique using tetraethoxysilane and alkyltriethoxysilanes. *Separation and Purification Technology* 1999; 16: 139-146.
14. Lev O, Tsionsky M et al. Organically modified sol-gel sensors. *Anal. Chem* 1995; 67: 22-30.
15. Meixner DL, Dyer PN. Influence of sol-gel synthesis parameters on the microstructure of particulate silica xerogels. *J Sol-Gel Sci Technol* 1999; 14: 223-232.
16. Baker GA, Pandey S et al. Toward tailored composites: Local dipolarity and nanosecond dynamics within binary composites derived from tetraethylorthosilane and ORMOSILs, oligomers or surfactants. *J Sol-Gel Sci Techn* 1999; 15: 37-48.
17. Vong MSW, Bazin N, Sermon PA. Chemical modification of silica gels. *J Sol-Gel Sci Techn* 1997; 8: 499-505.
18. Charnay C, Begu S, et al. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57: 533-540.
19. Sieminska L, Zerda TW. 1996. Diffusion of steroids from sol-gel glass. *J Phys Chem* 1996; 100: 4591-4597.
20. Ahola M, Kortesus P, Kangasniemi I et al. In vitro release behaviour of toremifene citrate from sol-gel processed sintered silica xerogels. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25: 955-959.
21. Otsuka M, Tokumitsu K, Matsuda Y. Solid dosage form preparation from oily medicines and their drug release. Effect of degree of surface modification of silica gel on the drug release from phytonadione-loaden silica gels. *J Control Release* 2000; 67: 369-384.
22. Nicoll SB, Radin S et al. In vitro release kinetics of biologically active transforming Growth factor- α 1 from a novel porous glass carrier. *Biomaterials* 1997; 18: 853-859.
23. Eckert-Lill C, Lill NA et al. Chemiadsorbates of drugs on silica: A new approach to drug release modification. *Drug Dev Ind Pharm*. 1987; 13: 1511-1532.
24. Böttcher H, Kallies KH, Haufe H. Model investigations of controlled release of bioactive compounds from thin metal oxide layers. *J Sol-Gel Sci Techn* 1997; 8: 651-654.
25. Aughenbaugh W, Radin S, Ducheyne P. 2001. In vitro controlled release of vancomycin from silica xerogel. In 27th Annual Meeting of Society for Biomaterials 2001; 1: 54.
26. Ahola M, Sailynoja E et al. In vitro evaluation of biodegradable ϵ -caprolactone-co-D,L-lactide/silica xerogel composites containing toremifene citrate. *Int J Pharm* 1999; 181: 191-199.
27. Rich J, Kortesus P et al. Effect of the molecular weight of poly(ϵ -caprolactone-co-DL-lactide) on toremifene citrate release from copolymer/silica xerogel composites. *Int J Pharm* 2000; 212: 121-130.
28. Süß W, Slowik P, Böttcher H. Embedding of nifedipine in silica-xerogels by the sol gel technique. *Pharmazie* 1999; 54: 513-516
29. Ahola M, Kortesus P et al. Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. *Int J Pharm* 2000; 195: 219-227.
30. Chen J, Ding H et al. Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application. *Biomaterials* 2004 ; 25: 723-727.
31. Ohta KM, Fuji M et al. Development of a simple method for the preparation of a silica gel based controlled delivery system with a high drug content. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26:87-96.
32. Williams DF. *Implant materials in biofunction*, Advances in biomaterials Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1988.
33. Allison AC, Harrington JS, Bibeck M. An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J Exp Med* 1966; 124: 141-161.
34. Absher MP, Trombley L et al. Biphasic cellular and tissue response of rat lungs after eight-day aerosol exposure to the silicon dioxide cristobalite. *Am J Pathol* 1989; 134: 1243-1251.
35. Hench LL, Wilson J 1986. In *Silicon Biochemistry*. Vol. 121. Wiley, Chichester, pp. 231-246.
36. Li P, Ohtsuki C et al. Apatite formation induced by silica gel in simulated body fluid. *J Am Ceram Soc* 1992; 75: 2094-2097.
37. Klein CPAT, Li P et al. Effect of sintering temperature on silica gels and their bone bonding ability. *Biomaterials* 1995; 16: 715-719.
38. Radin S, El-Bassyouni G et al. Tissue reactions to controlled release silica xerogel carriers. *Bioceramics* 1998; 11 (Eds, LeGeros, R. Z. and LeGeros, J. P.). Proceeding of the 11th International symposium on Ceramics in Medicine. World Scientific Publishing, New York, NY, USA, pp. 529-532.
39. Kortesus P, Ahola M et al. Sol-gelprocessed sintered silica xerogel as a carrier in controlled drug delivery. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 162-167.
40. Wilson J, Pigott GH et al. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *J Biomed Mater Res* 1981; 15: 805-817.
41. Palumbo G, Avigliano Let al. Fibroblast growth and polymorphonuclear granulocyte activation in the presence of a new biologically active sol-gel glass. *J Mat Sci Mat Med* 1997; 8, 417-421.
42. Lai W, Ducheyne P, Garino J. Removal pathway of silicon released from bioactive glass granules in vivo. *Bioceramics* 1998; 11 (Eds, LeGeros, R. Z. and LeGeros, J. P.). Proceeding of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., New York, NY, USA, pp. 383-386.
43. Bele M, Dmitrašinovič Đ et al. Silica coatings on clarithromycin. *Int J Pharm* 2005; 291: 149-153.
44. Škapin s, Matijevič E. Preparation and coating of finely dispersed drugs 4. Loratadine and danzol. *J Coll Interface Sci.* 2004; 272: 90-98
45. Xue JM, Shi M. PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. *J Contolled Release* 2004; 98: 209-217.
46. Li ZZ, Wen L et al. Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control. *J Control. Relelase* 2004; 98: 245-254.

Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov - korak naprej v razvoju bioadhezivnih dostavnih sistemov

Lectin-mediated drug delivery - a step forward in development of bioadhesive drug delivery systems

Petra Kocbek, Julijana Kristl

Povzetek: Razvoj novih sistemov za dostavo učinkovin je dandanes velik izziv farmacevtske tehnologije. Sodoben in obetajoč pristop predstavlja uporaba lektinov. Lektini so proteini ali glikoproteini, ki imajo v strukturi vsaj eno domeno s katero prepoznajo in se reverzibilno vežejo na specifični mono- ali oligosaharid. Interakcije med lektini in sladkorji so specifične, saj jih lahko primerjamo z interakcijami encim-substrat ali antigen-protitelo. Za dostavo učinkovin imajo velik pomen bioprepoznavne lastnosti lektinov, ki interagirajo s specifičnimi sladkorji glikoproteinov mukusa ali glikokaliksa celic in vodijo do mukoadhezije, citoadhezije in/ali citoinvazije. Tako predstavlja uporaba lektinov možnost ciljanega dostavljanja učinkovin v tarčne celice in tkiva po različnih poteh dajanja (oralno, peroralno, pulmonalno, okularno). Uporaba lektinov nudi perspektivno možnost za dostavo proteinskih učinkovin, vakcin in terapevtskih genov. Ciljanje dosežemo tako, da pripravimo konjugate učinkovine z lektini tj. lektinizirano predzdravilo, ali pa modificiramo površino nanodelcev, mikrosfer ali liposomov tako, da nanje pripnemo molekule lektina. Kljub številnim prednostim lektinov, pa moramo biti pri izbiri lektinov za dostavo učinkovin pozorni na toksičnost in imunogenost določenih lektinov.

Ključne besede: lektini, bioadhezija, ciljano dostavljanje, predzdravila, nosilni sistemi

Abstract: Very promising and up-to-date approach in development of new drug delivery systems represents an application of lectins. Lectins are proteins or glycoproteins which have in structure at least one carbohydrate recognition-domain that is capable to bind reversibly to specific mono- or oligosaccharide. Interactions between lectins and sugars are highly specific, comparable to those between the enzyme and substrate, or antigen and antibody. Great importance of lectins in bioadhesive drug delivery arises from their biorecognition properties making them possible to interact with specific sugars in the mucus or cell glycocalix, leading to the mucoadhesion, citoadhesion and/or citoinvasion. Furthermore, lectins can be used as ligand molecules directing various delivery systems to specific cells and tissues following different routes of application such as oral, peroral, pulmonal, or ocular. They offer possibility for delivery of protein drugs, vaccines and therapeutic genes. Targeting can be achieved by conjugating lectins to specific drugs (lectinized prodrugs) or attaching them to the surface of nanoparticles, microspheres or liposomes. Despite many advantages lectins should be used by caution since some of them might attest with toxicity or immunogenicity.

Keywords: lectins, bioadhesion, drug targeting, prodrugs, carrier systems

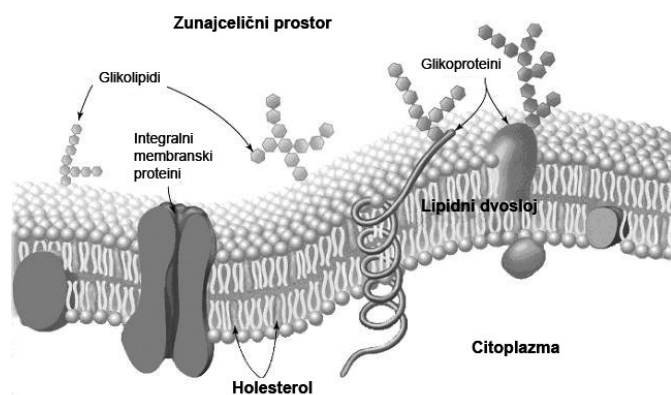
1 Uvod

Začetki lektinologije segajo v leto 1888, ko je Stillmark ugotovil, da izvleček iz ricinusovih semen povzroči aglutinacijo eritrocitov (1). Nato so snovi s podobno biološko aktivnostjo, ki so jih izolirali iz rastlin, poimenovali hemaglutinini (2). Ko so opazili, da nekateri hemaglutinini selektivno aglutinirajo krvne celice glede na krvne skupine AB0, so te hemaglutinine poimenovali lektini. Beseda lektini izvira iz latinske

besede »legere«, kar pomeni izbrati; torej lektini selektivno izberejo vezalno mesto na glikoziliranih površinah (3, 4). Dandanes so lektini definirani kot proteini ali glikoproteini, ki imajo v strukturi vsaj eno domeno s katero prepoznajo in se reverzibilno vežejo na specifični mono- ali oligosaharid. Ali drugače, lektini so receptorji za sladkorne molekule (2, 3, 5, 6). Nekateri lektini so zgrajeni iz podenot z različnimi vezalnimi mesti za sladkorje. Lektini so v naravi zelo razširjeni. Izolirali so jih iz mikroorganizmov, rastlin in živali, virusov, bakterij, alg, gliv,

Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov

telesnih tekočin vretenčarjev in celičnih membran sesalcev (7). Interakcije med lektini in sladkorji so zelo specifične, saj jih lahko primerjamo z interakcijami encim–substrat ali antigen–protitelo (5, 8). Lektini se lahko vežejo na proste sladkorje ali na določene sladkorne komponente polisaharidov, glikoproteinov ali glikolipidov, prostih ali vezanih v celičnih membranah (slika 1).



Slika 1: Zgradba celične membrane, kjer so sladkorji vezani na membranske proteine in lipide zunanje strani celične membrane.

Figure 1: Schematic presentation of cell membrane structure. Sugars are bound to membrane proteins and lipids on the extracellular side of the cell membrane.

Interakcije med sladkorji in lektini na celični površini imajo pomembno vlogo v človeškem organizmu pri procesih kot so opsonizacija mikrobov, fagocitoza, aktivacija in diferenciacija celic, adhezija in migracija celic, apoptoza idr.. Tudi patogene bakterije in bakterije, ki so del normalne mikrobne flore, se pritrjujejo včasih na zelo specifičen del črevesa preko interakcij med lektini in določenimi sladkorji (5, 6). Tovrstne možnosti izkoriščajo za razvoj lektiniziranih dostavnih sistemov (DS).

2 Vloga lektinov pri ciljani dostavi učinkovin

Zelo specifične interakcije med lektini in sladkorji so temelj uporabe parov lektin-oligosaharid za ciljano dostavo učinkovin. V osnovi ločimo dva načina takšnega ciljanja. Pri prvem načinu t.i. neposrednem ciljanju je oligosaharid del DS. Endogeni lektini na površini celic prepoznajo sladkorni del DS, ki je neke vrste »naslov« za ciljano dostavo učinkovin v tarčne celice. Na podlagi sladkorne kode lahko lektini tarčnih celic prepoznajo, vežejo in internalizirajo lektiniziran DS (9). DS pripravimo s kovalentno vezavo sladkorjev na polimere in druge aglikone. Namenjeni so predvsem zdravljenju virusnih obolenj, imunski terapiji, nadomestnemu encimskemu zdravljenju in genskemu zdravljenju (5).

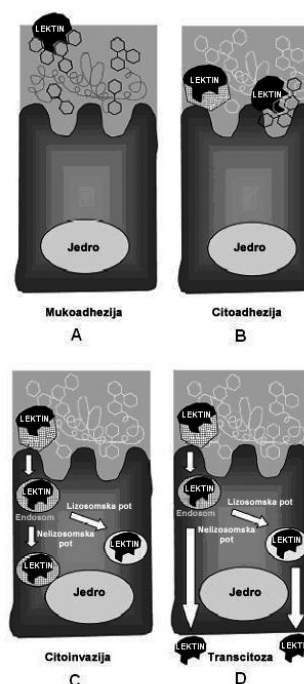
Drugi način t.i. reverzno ciljanje predstavlja obratni mehanizem prvega. DS je na površini prekrit z molekulami eksogenega lektina s specifičnostjo za določen sladkor. V ta namen se večinoma uporabljajo rastlinski lektini. Takšen DS lahko vstopa v interakcije s sladkornimi deli endogenih proteoglikanov, glikoproteinov ali glikolipidov na površini celic (9).

Glede na literaturne podatke je mnogo bolj poznano in raziskovano pripenjanje lektinov na DS, ki specifično prepoznata sladkor na ciljnem mestu, kot pripenjanje sladkorjev na DS, ki jih specifično prepoznajo endogeni lektini na tarčnem mestu. Tako je tudi vsebina tega članka usmerjena k t.i. reverznemu ciljanju.

3 Bioadhezija, mukoadhezija in citoadhezija

Razvoj lektiniziranih DS temelji na natančnem poznavanju interakcij med sladkornimi ligandi na površini celic in lektini. Za dostavo učinkovin imajo velik pomen bioprepoznavne lastnosti lektinov preko interakcij s specifičnimi sladkorji, rezultat česar so mukoadhezija, citoadhezija in/ali citoinvazija (9).

Bioadhezija je sposobnost medsebojne vezave dveh komponent od katerih je vsaj ena biološka (10). Tako definiran izraz je zelo širok in obsega mukoadhezijo in citoadhezijo. Mukoadhezija pomeni vezavo na mukus, ki prekriva sluznice, citoadhezija vezavo neposredno na celično površino (slika 2).



Slika 2: Interakcije lektinov s celicami, vstop v celice in prehod skozi enterocite (9).

Figure 2: Lectin interactions with cells, entry into the cells and crossing through the enterocytes (9).

Pregledni članki - Review Articles

Ideja o bioadhezivnih dostavnih sistemih sega kakšnih dvajset let nazaj (11) in še vedno predstavlja izziv za številne raziskovalce. Kljub prednostim poznanih bioadhezivnih polimerov, le-ti niso brez pomanjkljivosti, saj se vežejo na ciljno mesto z nespecifičnimi fizikalno-kemijskimi interakcijami kot so Van der Waalsove in vodikove vezi. Takšni polimeri, kot so hitosan, natrijev alginat, karboksimetilceluloza, hidroksipropilceluloza idr., pri vezavi ne ločijo med slojem mukusa, ki prekriva celično površino, in med mukusom, ki je že odluščen, ter med površinami drugih komponent črevesne vsebine. Ciljano vezavo mukoadhezivnega DS na tarčno mesto na površini sluznic lahko tako preprečijo predhodne interakcije z drugimi komponentami. Pomanjkljivost takšnega DS je poleg nespecifičnih interakcij tudi vezava na sloj mukusa, ki prekriva sluznice, in ne neposredna vezava na površino epitela, kjer poteka absorpcija. Čas zadrževanja takšnega mukoadhezivnega pripravka na vezalnem mestu je omejen s časom obnavljanja mukusnega sloja (1–3 ure) (6).

V nasprotju z mukoadhezijo (slika 2A), ki temelji na nespecifičnih interakcijah med verigami mukoadhezivnih polimerov in mukusom, predstavljajo interakcije med lektini in sladkorji na površini celic korak naprej pri dostavi učinkovin, saj je vezava lektinov na tarčno mesto zelo specifična (slika 2B) (6, 9). Za proces citoadhezije lektinov je značilno, da so interakcije zelo specifične in jih lahko primerjamo s specifičnostjo interakcij med antigenom in protitelesom. Prednost citoadhezije pred mukoadhezijo je neposredna vezava na površino celic, kar pomaga pri prehajanju epiteljskih absorpcijskih barier. Prednosti takšnih DS so:

- (I) podaljšano zadrževanje neposredno na površini celic, neodvisno od obnavljanja mukusnega sloja,
- (II) sprožanje in sodelovanje pri vezikularnih transportnih procesih (endo- in transcitoza) in
- (III) sprememba permeabilnosti epitela z receptorsko posredovanjem odpiranjem tesnih stikov med epiteljskimi celicami (8).

3.1 Mukoadhezivne lastnosti rastlinskih lektinov

Prebavni trakt sesalcev prekriva sloj mukusa, ki deluje kot drsilo; lajša gibanje himusa in ščiti pod njim ležeče tkivo pred delovanjem želodčnega soka, proteazami, patogenimi mikroorganizmi in tudi pred mehanskimi poškodbami (12). Pri človeku je debelina mukusnega sloja v različnih delih prebavnega trakta zelo različna in se giblje od 50–500 μm v želodcu do 50–150 μm v kolonu (13). V povprečju tvori mukus v prebavnem traktu človeka sloj z debelino 192 μm (3). Mucini so glikoproteini z molekulsko maso večjo od 2×10^6 . Da in so tvorilci gela (9). Glikoproteini črevesnega mukusa vsebujejo 77,5 % ogljikovih hidratov sestavljenih iz N-acetil-galaktozamina, N-acetil-glukozamina, galaktoze, fukoze in sialične kisline (3). Mucini predstavljajo le 0,5–4,0 % mase mukusa. Poleg mucinov in vode (~ 95 %) vsebuje mukus tudi soli (0,5–1 %), proste beljakovine (1 %), lipide in odlučene epiteljske celice (14).

Značilnosti interakcij med lektini in mucini so specifičnost, pH-odvisnost in reverzibilnost. Pri proučevanju interakcij med fluorescenčno označenimi analogi rastlinskih lektinov in glikoproteini želodčnega mukusa prašičev so ugotovili, da vpliva na vezalno kapaciteto mucinov za lektine pri nevtralnem pH poleg števila

specifičnih vezalnih mest tudi njihova sterična dostopnost. Ugotovili so, da imajo prašičji želodčni mucini največjo vezalno kapaciteto med preskušanimi lektini za aglutinin iz pšeničnih kalčkov (»wheat germ agglutinin«, WGA), saj se le-ta veže na sialično kislino, ki je pogosto terminalni del linearnih ali razvejanih glikoproteinov (12).

Vsebnost nativnih glikoproteinov je v želodčnem mukusu prašičev primerljiva z vsebnostjo glikoproteinov v črevesnem mukusu človeka, zato želodčni mukus prašičev uporabljajo v *in vitro* študijah za proučevanje interakcij med lektini in mukusom. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo na interakcije med mucini in lektini v prebavnem traktu človeka (12). Rezultati interakcij med WGA in prašičjimi želodčnimi mucini so pokazali največjo stopnjo vezave pri pH 5, kar pomeni, da se po peroralnem dajanju večina WGA veže v zgornjem delu duodenuma. Tako lahko sklepamo, da se le majhen delež lektiniziranega DS zaradi vezave na želodčni mukus ne adsorbira na mukus v tankem črevesu (9).

Čeprav predstavlja mukusni sloj difuzijsko bariero, so lahko mucini »lovilci« za lektinizirane DS zaradi specifičnih interakcij z lektini. Mukoadhezija lektiniziranih DS predstavlja prvo stopnjo v procesu cilijane dostave učinkovin. V raziskavah so ugotovili, da so interakcije med mucini in WGA reverzibilne, zato se lahko lektini sprostijo z mucinov in se specifično vežejo na prosta vezalna mesta na površini celičnih membran (6, 12).

3.2 Citoadhezivne lastnosti rastlinskih lektinov

Klasični polimerni mukoadhezivni DS se vežejo na mukus, kjer se učinkovina sprosti. Lektinizirani sistemi ciljajo dostavo učinkovin neposredno na celično površino enterocitov, kjer poteka absorpcija. Specifične interakcije med lektini in sladkorji glikokaliksa skrajšajo difuzijsko razdaljo, ki jo mora preiti učinkovina v procesu absorpcije. Hkrati pa velika lokalna koncentracija učinkovine na samem mestu absorpcije poveča koncentracijski gradient in s tem hitrost absorpcije ter zmanjša razgradnjo učinkovine z encimi v svetlini prebavnega trakta (5, 15).

Z namenom, da bi ocenili vezalno kapaciteto za lektine in proučili vzorec glikozilacije humanim enterocitom podobnih celičnih linij (Caco-2, HT-29, HCT-8), celic karcinoma prostate (Du-145) in celic karcinoma mehurja (5637) so s pretočno citometrijo in fluorimetrijo ugotavljali interakcije določenih lektinov z različnimi sladkorji (16, 17). Ugotovili so, da imajo celične linije največjo vezalno kapaciteto za lektin iz *Triticum vulgare*. WGA se ne veže le na rakave celice kolona, ampak tudi na humane kolonocite. Le-ti imajo petnajst krat manjšo vezalno kapaciteto za WGA, še zmeraj pa nudijo veliko število vezalnih mest za lektinizirane DS (17).

Raziskave vezave WGA na izolirane receptorje za epidermalni rastni faktor (»epidermal growth factor«, EGF) in na *in vitro* model intestinalnega epitela (monosloj Caco-2 celic) so potrdile, da EGF-receptorji sodelujejo pri citoadheziji WGA (19). Ključna vloga EGF-receptorja pri vezavi lektinov odpira dve zanimivi področji za uporabo WGA pri dostavi učinkovin (15):

1. EGF-receptor je prekomerno izražen pri številnih rakavih obolenjih (npr. rak jeter, prsi, pljuč, mehurja), zato lahko pričakujemo, da bodo

Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov

z WGA lektinizirana predzdravila ali DS primerni za ciljano dostavo protitumornih učinkovin.

2. Celice, ki imajo izražen EGF-receptor so prisotne tudi v večini zdravih tkiv, zato lahko citoadhezivne lastnosti vezanega lektina omogočijo receptorsko pot privzema učinkovin in s tem povečanje njihove biološke uporabnosti.

4 Modificirana dostava učinkovin z lektini

Sluznice prebavnega, dihalnega in urogenitalnega trakta ter očesna sluznica, nudijo dve tarčni mesti za dostavo učinkovin s pomočjo lektinov: gelski sloj mukusa in glikokaliks epitelijskih celic. Mukus prekriva večino epitelov, kjer poteka absorpcija, in je prvo tarčno mesto za lektinizirane sisteme. Kadar lektiniziran DS preide sloj mukusa, je glikokaliks celic sekundarno tarčno mesto. Glikokaliks sestavljajo sladkorni deli proteoglikanov, glikolipidov in glikoproteinov, ki so zasidrani v lipidni dvosloj celičnih membran (15). Različne vrste celic imajo na površini izražene različne sladkorje. Prav tako se po vzorcu glikozilacije med seboj razlikujejo zdrave od obolelih celic (npr. rakavih). Tako lahko z uporabo lektinov dosežemo ciljano dostavo učinkovin v specifične celice in tkiva (1, 6).

4.1 Privzem lektinov v celice

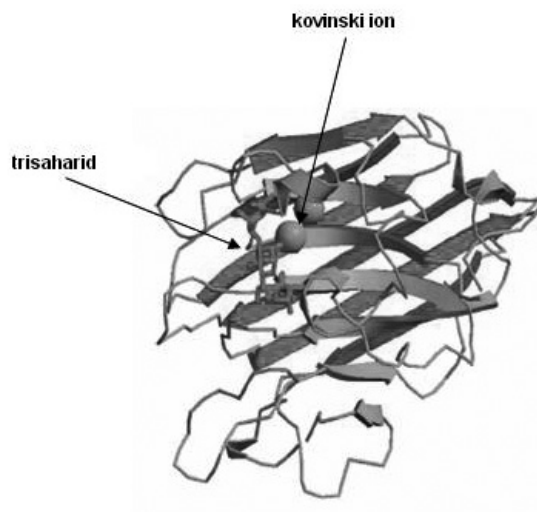
Vezavi lektiniziranih DS na membrane celic lahko sledi citoinvazija, ki jo sprožijo lektini. Privzem lektiniziranih DS v celice povzroči sprostitve vezalnih mest za lektine na površini celic. Rezultat je lahko pospešen intracelularni privzem lektiniziranih DS (6, 12), ki se lahko v celici razgradijo ali pa sledi transcelularni transport (3). V nasprotju s citoadhezijo, ki je konstantna in neodvisna od temperature, sta za proces privzema v celice potrebna povišana temperatura in daljši čas, kar so ugotovili v *in vitro* študijami vezave WGA na Caco-2 celice. Povečana fluidnost celičnih membran igra ključno vlogo pri privzemu lektinov v celice (3, 15). Glavna značilnost citoinvazije (slika 2C), ki jo sprožijo lektini, je aktiven transport. V skladu z ugotovitvijo, da je receptor za EGF vezalno mesto za lektine, lahko privzem lektinov pripišemo receptorski endocitozi. Kar 60 % WGA se po vstopu v celice nahaja v lizosomih. Ta lizosomska pot (slika 2 C in D) v celici je primerna za dostavo učinkovin, ki so stabilne v kislem. Učinkovina se iz lektiniziranega DS sprosti, ko pride do razgradnje ogrodja DS v lizosomih tarčnih celic (3). Receptorska pot privzema v celice omogoča premostitev epitelijske absorpcijske bariere po peroralnem dajanju, lahko pa jo izkoristimo tudi za prevajanje signalov v celice z namenom sprožanja vezikularnih transportnih procesov v ali skozi polarizirane epitelijske celice (2).

Receptorsko posredovan privzem učinkovin, vključno z lektinizacijo in ciljanjem glikoziliranih zunajceličnih domen membranskih receptorjev, je obetajoč pristop za povečanje absorpcije učinkovin z majhno biološko uporabnostjo. Veliko raziskovalnega dela pa je še potrebno, da bi ugotovili prednosti in slabosti takšnega ciljanja v *in vivo* pogojih.

4.2 Transcitoza lektinov

Na Caco-2 celicah so proučevali transport fluorescenčno označenih delcev z velikostjo 50 nm, ki so imeli na površini vezane lektine. Ugotovili so, da s pripenjanjem WGA na površino nanodelcev

dosežejo povečanje transcitoze za 20 %. Podobne izsledke so dobili tudi v raziskavah s konkavalinom A (slika 3) (20). Rezultati torej kažejo, da lektinizacija površine koloidnih dostavnih sistemov poveča njihov transcelularni transport (slika 2D) v *in vitro* pogojih. Nekateri strokovnjaki menijo, da tudi v *in vivo* pogojih pride do transcitoznega transporta lektinov, kar potrjuje detekcija aglutinina iz arašidov (lektin prisoten v prehrani) v periferni venski krvi (2).



Slika 3: Struktura kompleksa konkavalina A s trisaharidom manoze (7).

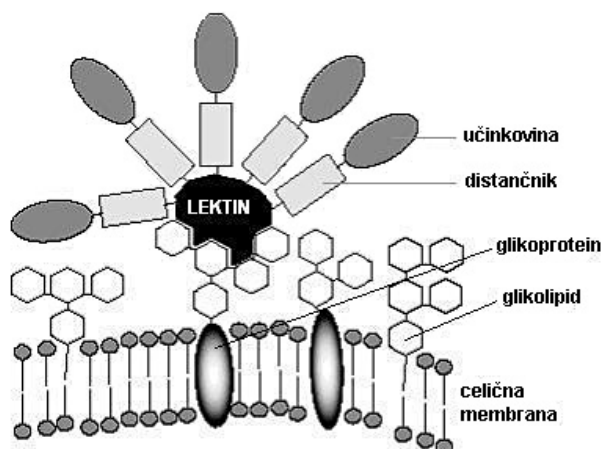
Figure 3: Structure of concavalin A in complex with the trisaccharide of mannose (7).

5 Lektinizirana predzdravila

Lektinizirano predzdravilo je zgrajeno iz lektina kot dela namenjenega ciljanju specifičnih sladkorjev, učinkovine kot aktivnega dela in distančnika, ki povezuje oba dela (slika 4). Topnost takšnega predzdravila v vodnem okolju je pogoj za njegovo absorpcijo. Kadar lektiniziramo lipofilne učinkovine, zagotavlja topnost konjugata v vodi hidrofilni del, ki ga predstavlja lektin. Z izbiro ustreznega distančnika, ki povezuje molekulo učinkovine in lektin, lahko dosežemo sproščanje učinkovine pod točno določenimi pogoji (9). Kot primer lahko navedemo konjugat doksorubicina in WGA s cis-akonitinskim distančnikom, ki je nestabilen v kislem. Učinek ciljanja rakavih celic kolona s takšnim predzdravilom je posledica velike vezalne kapacitete rakavih celic kolona za WGA in sproščanja citostatika šele, ko le-ta doseže kislo okolje v lizosomih tarčnih celic (21).

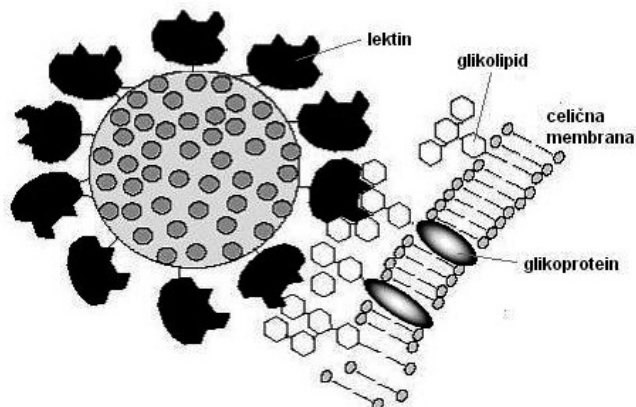
Za učinkovito peroralno dostavo proteinov so potrebne oblike, ki preprečujejo inaktivacijo in izboljšajo absorpcijo takšnih učinkovin. Da bi odkrili, ali z lektini posredovana citoadhezija in citoinvazija poveča absorpcijo proteinov, so s stabilno amidno vezjo povezali fluorescenčno označen goveji serumski albumin in WGA ter spremljali vezavo in vstop takšnega konjugata v Caco-2 celice. Izsledki kažejo,

Pregledni članki - Review Articles



Slika 4: Shematski prikaz lektiniziranega predzdravila in njegovih interakcij z glikokaliksom enterocitov (3).

Figure 4: Schematic presentation of lectin-grafted prodrug and its interactions with the glycocalyx of enterocytes (3).



Slika 5: Shematski prikaz lektiniziranega nosilnega sistema z vgrajeno učinkovino in njegovih interakcij z glikokaliksom enterocitov (3).

Figure 5: Schematic presentation of lectin-grafted carrier system with incorporated drug and its interactions with the glycocalyx of enterocytes (3).

da WGA vpliva na privzem proteinov velike molekulske mase v celice in da lahko z uporabo lektinov premostimo membransko bariero pri dostavi proteinskih učinkovin (22).

6 Nosilni sistemi

Lektinizirani nosilni sistemi so DS pri katerih je površina rezervoarja (kot so mikrodcelci (23), nanodcelci (24) ali liposomi (25)) z vgrajeno učinkovino prekrita z lektini. Lektini na površini tako vodijo rezervoar z učinkovino na samo mesto absorpcije (slika 5).

Vgrajevanje učinkovin v ustrezne nosilne sisteme zaščiti učinkovine pred škodljivimi vplivi okolja (pH-vrednost, encimi). Hkrati je količina vgrajene učinkovine v nosilnem sistemu večja v primerjavi s količino učinkovine v predzdravilu, zato z dajanjem učinkovine vgrajene v mikrodcelce, nanodcelce ali liposome lažje dosežemo terapevtske koncentracije kot pri dajanju učinkovine v obliki predzdravila. Nadalje lahko ogrodje nosilnega sistema, omogoča nadzorovano sproščanje učinkovine (3). Modifikacija takšnega »trojanskega konja« z lektini pa lahko pripelje učinkovino neposredno na glikozilirano površino epiteljskih celic in sproži privzem DS v celice.

V procesu specifičnega ciljanja oligosaharidov z lektini so mucini prvo tarčno mesto. V kakšnem obsegu prevlada mukoadhezija nad ciljanjem sladkorjev glikokaliksa je odvisno od velikosti dostavnega sistema. Nanodcelci preidejo skozi sloj mukusa, medtem ko mikrodcelce večje od 1 μm zadrži sloj viskoznega mukusa (13, 26, 27). Po drugi strani so reverzibilne interakcije med mucini in lektini lahko prednost, saj zadrževanje DS v gelskem sloju mukusa upočasni hitrost potovanja lektinizirane oblike skozi prebavni trakt (9).

Prednost lektiniziranih koloidnih pred večjimi DS so tudi citoinvazivne lastnosti, ki so posledica lektinskega plašča. Osnovni pogoj, da lahko pripravimo lektinizirane nosilne sisteme, je prisotnost reaktivnih funkcionalnih skupin na površini delcev na katere lahko kovalentno vežemo izbrane lektine (28). Sinteza novih biorazgradljivih polimerov z reaktivnimi funkcionalnimi skupinami predstavlja tako korak naprej v razvoju lektiniziranih DS (29).

V študijah so proučevali možnost uporabe različnih lektinov (npr. WGA, konkavalina A) za izboljšanje transporta nanoddelcev iz črevesa v krvni obtok. Ugotavljali so vpliv velikosti, gostote lektinov na površini delcev in prisotnosti inhibitorjev na privzem lektiniziranih nanoddelcev (20). Raziskave so pokazale, da ima največji vpliv na stopnjo privzema gostota lektinov na površini delcev, manjši vpliv pa imata velikost in vrsta vezanega lektina (5).

Zanimivo je, da izkazujejo lektini vezani na nanodcelce večjo stopnjo transcitoze kot prosti lektini. Stopnja transcitoze se poveča z naraščajočo gostoto lektinov na površini nanoddelcev (20). Ta ugotovitev kaže, da lektinizirani nanodcelci verjetno sprožijo drugo pot prehoda skozi celice kot pa prosti lektini. Znanstveniki menijo, da lahko vezava lektinov na površino koloidnih delcev povzroči organizacijo receptorjev v skupke (klastre), kar vodi v povečan transcitozni prenos (3).

Z lektini modificirana dostava učinkovin, ki vključuje aktivne transportne procese epiteljskih celic, lahko postane učinkovit način za povečanje biološke uporabnosti učinkovin z majhno permeabilnostjo.

7 Dejavniki, ki omejujejo peroralno uporabo lektinov

7.1 Vpliv hrane in prebavnih encimov

Ciljanje tarčnega mesta z lektini lahko ovirajo ogljikovi hidrati prisotni v običajni prehrani ljudi. Obseg takšne neželene vezave je odvisen od specifičnosti uporabljenih lektinov. Tako lahko pričakujemo, da bodo DS z vezanimi lektini s specifičnostjo za glukozo ali galaktozo v veliki meri inaktivirale komponente hrane preden dosežejo tarčno mesto, medtem ko bodo DS z vezanimi lektini s specifičnostjo za sladkorje, ki jih je v prehrani le malo ali jih ni, pripeljali takšen DS na tarčno mesto (9).

Drug pomemben dejavnik povezan s peroralnim dajanjem je prisotnost proteolitičnih encimov v prebavnem traktu. Lektini kot del DS morajo biti odporni na encimsko razgradnjo, da lahko ohranijo sposobnost vezave na specifične sladkorje (9). Nekateri lektini (npr. WGA in lektin iz paradižnika) so odporni na kislno okolje in prisotnost proteolitičnih encimov v prebavnem traktu, kar sta dva temeljna pogoja za peroralno uporabo (3).

7.2 Imunogenost lektinov

Uporabnost lektinov v razvoju novih farmacevtskih oblik lahko zmanjšajo njihove antigenske lastnosti. Lektini so organizmu tuji proteini z veliko molekulsko maso in rigidno strukturo, zato lahko pričakujemo, da bodo v telesu izzvali lokalni in/ali sistemski imunski odgovor (9). Rastlinski lektini se med seboj močno razlikujejo v imunogenosti. Na primeru lektina iz paradižnika so dokazali, da peroralno zaužitje povzroči tvorbo specifičnih protiteles tako pri miših kot pri človeku (30). Posledično lahko prisotna protitelesa IgG in IgA nevtralizirajo tisti del lektiniziranega DS, ki predstavlja »naslov« za specifično ciljanje, in tako zmanjšajo privzem lektiniziranih predzdravil ali nosilnih sistemov (9).

Pri uporabi lektinov za dostavo učinkovin se moramo zavedati, da so že v krvi zdravih ljudi prisotna protitelesa proti proteinom v prehrani (tudi proti rastlinskim lektinom). Ugotovili so, da so interakcije protein-protein in ne interakcije ogljikov hidrat-protein tiste, ki so vključene v interakcije med protitelesi in lektini. Ker vezava protiteles na lektine ne vpliva na aglutinacijske lastnosti lektinov, lahko sklepamo, da sta vezavno mesto, ki predstavlja antigensko determinanto, in vezavno mesto za ogljikov hidrat, različni (9).

Običajno je del lektina, ki se specifično veže na določen oligosaharid, le majhen del celotne lektinske molekule. Ta ugotovitev kaže perspektivno pot za razvoj (s tehnologijo rekombinantne DNA) veliko manjših, lektinom podobnih molekul (lektinomimetikov), ki bodo manj toksični in/ali imunogeni kot nekateri naravni lektini, ohranili pa bodo sposobnost specifične citoadhezije in/ali citoinvazije (9).

Medtem ko je imunogenost nezaželen stranski učinek pri dostavi učinkovin, je imunostimulativni učinek nekaterih lektinov cilj peroralnega cepljenja. Vrsta imunskega odgovora, ki ga na tak način izzovemo, je močno odvisna od mesta absorpcije. Privzem antigena skozi Peyerjeve ploščice lahko povzroči lokalni imunski odgovor (IgA), medtem ko transport antigena skozi enterocite izzove sistemski imunski odziv (IgG) (3). Pri peroralnem cepljenju lahko vgradimo cepiva oz. antigene, ki povzročijo imunski odziv, v ustrezen DS.

Imunski odziv pri dajanju takšnega pripravka je odvisen od deleža absorbiranega antigena. S pripenjanjem lektinov na površino DS lahko povečamo transport v točno določen tip celic, kar sproži večji imunski odgovor.

Glikokaliks M celic se močno razlikuje od glikokaliksa enterocitov. Površino M celic prekriva tanjši sloj mukusa kot površino enterocitov kar olajša nanodelcem dostop do površine celic in omogoči povečanje transcitoznega transporta nanodelcev (13).

7.3 Toksičnost lektinov

Pred uporabo lektinov pri oblikovanju farmacevtskih oblik so nujne tudi študije varnosti le-teh. 30 % prehrane človeka, surove in kuhane, vsebuje sestavine z znatno hemaglutininsko aktivnostjo in v 53 užitnih rastlinah najdemo lektine. Tako so nekateri lektini (npr. lektin iz paradižnika, WGA iz pšeničnih kalčnov) sestavni del človekove prehrane. Ti lektini naj bi bili z vidika toksičnosti za človeka varni. Obstajajo pa tudi podatki o znanih toksičnih učinkih določenih lektinov. Zelo znan primer povezan s toksičnostjo lektinov se je zgodil leta 1973 v Londonu. Sovjetska tajna služba je ubila tajnega agenta s konico dežnika, ki je bila prepojena z ricinom (3). Ricin (slika 6) je citotoksični protein iz semen rastline *Ricinus communis*, ki specifično in ireverzibilno blokira sintezo proteinov na ribosomih eukariotskih celic (31).



Slika 6: Struktura kompleksa prve domene podenote B ricina z laktozo (7).

Figure 6: Structure of the first domain of the B-subunit ricin in complex with lactose (7).

Dandanes še ni dokazana (ne)toksičnosti uporabe lektinov za ciljano dostavo učinkovin. Večina razpoložljivih podatkov je rezultat spremljanja uživanja lektinov v prehrani. Tako strokovnjaki menijo, da mikrogramske količine lektinov, ki so potrebne za z lektini posredovano dostavo učinkovin, nimajo toksičnih učinkov. Ta trditve izhajajo iz razpoložljivih podatkov uživanja WGA v običajni prehrani (9).

Pregledni članki - Review Articles

Toksične učinke lektinov pa lahko izkoriščamo v terapevtske namene npr. v terapiji raka. Tako lahko lektin s toksičnim učinkom deluje kot molekula za specifično ciljanje določenega mesta oz. celic s specifičnim vzorcem glikozilacije, hkrati pa ima citotoksičen učinek (32).

8 Zaključek

Kljub številnim vprašanjem, ki še zmeraj ostajajo neodgovorjena, je ideja uporabe lektinov pri dostavi učinkovin več kot aktualna. Ker lektini selektivno prepoznajo določene sladkorje, ki so sestavni del glikokaliksa epitelijskih celic, predstavlja oblikovanje lektiniziranih DS možnost selektivnega ciljanja določenega dela črevesa ali celo ciljanja določene vrste celic (npr. M celic). Citoadhezija in citoinvazija sta predpogoj za transcelularno absorpcijo, kar vodi v uspešno dostavo učinkovin, ki imajo drugače majhno biološko uporabnost.

Poleg specifičnega prepoznavanja sladkorjev lahko lektini izboljšajo dostavo učinkovin v sistemski krvni obtok s sprožanjem receptorske endo- ali transcitoze. Z lektini konjugirane učinkovine ali lektinizirani DS povečajo dostavo učinkovin skozi sluznice tako, da podaljšajo čas zadrževanja na mestu absorpcije in vzpodbujajo privzem v enterocite.

Koncept lektiniziranih dostavnih sistemov je aktualen zadnjih deset let. Omejitvam uporabnosti naravnih lektinov se lahko izognemo z modifikacijo lektinov z genskim inženiringom in biotehnologijo. Ekspresija rekombinantnih proteinov, ki imajo v strukturi vezavne domene za ciljanje absorpcijskega okna in sprožanje specifične endo- in transcitoze so možnosti, ki jih nudijo in izkoriščajo nove tehnologije za oblikovanje učinkovitejših in varnejših dostavnih sistemov.

9 Literatura

- Kennedy JF, Palva PMG, Corella MTS et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr Polym* 1995; 26: 219–230.
- Bies C, Lehr M, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56: 425–435.
- Gabor F, Wirth M. Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives. *S.T.P. Pharma Sciences* 2003; 13: 3–16.
- Irache JM, Durrer C, Duchêne D et al. Bioadhesion of lectin-latex conjugates to rat intestinal mucosa. *Pharm Res* 1996; 13: 1716–1719.
- Minko T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56: 491–509.
- Lehr CM. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J Control Release* 2000; 65: 19–29.
- Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 198–208.
- Haltner E, Easson JH, Lehr CM. Lectins and bacterial invasion factors for controlling endo- and transcytosis of bioadhesive drug carrier systems. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 44: 3–13.
- Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A et al. The lectin–cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 459–480.
- Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Del Rev* 2005; 57: 1556–1568.
- Peppas NA, Buri PA. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J Control Release* 1985; 2: 257–275.
- Wirth M, Gerhardt K, Wurm C et al. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. *J Control Release* 2002; 79: 183–191.
- Zang N, Ping QN, Huang GH et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int J Pharm* 2005; 294: 247–259.
- Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through the mucus. *Adv Drug Del Rev* 2001; 48: 173–193.
- Wirth M, Kneuer C, Lehr CM et al. Studying cellular binding and uptake of bioadhesive lectins. V: Cell culture models of biological barriers. Taylor & Francis, New York, 2002.
- Gabor F, Stangl M, Wirth M. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *J Control Release* 1998; 55: 131–142.
- Gabor F, Klausegger U, Wirth M. The interactions between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *Int J Pharm* 2001; 221: 35–47.
- Gabor F, Wirth M, Jurkovich B et al. Lectin-mediated bioadhesion: proteolytic stability and binding-characteristics of wheat germ agglutinin and *Solanum tuberosum* lectin on Caco-2, HT-29 and human colonocytes. *J Control Release* 1997; 49: 27–37.
- Lochner N, Pittner F, Wirth M et al. Wheat germ agglutinin binds to the epidermal growth factor receptor of artificial Caco-2 membranes as detected by silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Pharm Res* 2003; 20: 833–839.
- Russell-Jones GJ, Veitch H, Arthur L. Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *Int J Pharm* 1999; 190: 165–174.
- Wirth M, Fuchs A, Wolf M et al. Lectin-mediated drug targeting: preparation, binding characteristics and antiproliferative activity of wheatgerm agglutinin conjugated doxorubicin in Caco-2 cells. *Pharm Res* 1998; 15: 1031–1037.
- Gabor F, Schwarzbauer A., Wirth M. Lectin-mediated drug delivery: binding and uptake of BSA-WGA conjugates using the Caco-2 model. *Int J Pharm* 2002; 237: 227–239.
- Kim BY, Jeong JH, Park K et al. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery systems. *J Control Release* 2005; 102: 525–538.
- Mo Y, Lim LY. Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. *J Control Release* 2005; 107: 30–42.
- Ponchel G, Irache JM. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv Drug Del Rev* 1998; 34: 191–219.
- Hussain N, Jaitley V, Florence AT. Recent advances in understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Rev* 2001; 50: 107–142.
- Desai MP, Labhasetwar V, Walter E et al. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; 14: 1568–1573.
- Montisci MJ, Giovannuci G, Duchêne D et al. Covalent coupling of asparagus pea and tomato lectins to poly(lactide)microspheres. *Int J Pharm* 2001; 215: 153–161.
- Rodrigues JS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB et al. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *J Control Release* 2003; 92: 103–112.
- Naisbett B, Woodley J. The potential use of tomato lectin for oral drug delivery. 4. Immunological consequences. *Int J Pharm* 1995; 120: 247–254.
- Roberts LM, Smith DC. Ricin: the endoplasmic reticulum connection. *Toxicol* 2004; 44: 469–472.
- Heinrich EL, Welty Lily, Banner LR et al. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. *Acta Histochem* 2005; 107: 335–344.

Novice iz sveta farmacije

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

FDA odobrila novo cepivo proti raku materničnega vratu

Marjetka Smolej

FDA je 8. junija odobrila Gardasil® (v Sloveniji se bo tržil pod imenom Silgard®), prvo cepivo, ki preprečuje raka materničnega vratu, preprečuje predrakave spremembe na materničnem vratu, ženskem zunanjem spolovilu in nožnici ter genitalne bradavice, ki so lahko posledica okužbe s humanim papiloma virusom (HPV) tipa 6, 11, 16 in 18. Cepivo je učinkovito proti HPV tipa 16 in 18, ki povzročita približno 70 % primerov raka materničnega vratu in proti tipoma 6 in 11, ki povzročita okrog 90 % primerov genitalnih bradavic.

Gardasil® je rekombinantno cepivo, odobreno za uporabo pri dekletih in ženskah od 9 do 26 let, ki ga kot injekcijo aplicirajo trikrat z razmakom šestih mesecev. Prepreči večino primerov raka na materničnem vratu, ki so posledica okužbe s tipi HPV, prisotnimi v cepivu. Pri ženskah, ki so bile okužene pred cepljenjem, te zaščitite ni, zato je

cepljenje smiselno pred potencialno možnostjo izpostavljenosti virusu. Prav tako cepivo ne zaščiti pred manj običajnimi tipi HPV, ki niso prisotni v cepivu. Redni PAP-testi tako še vedno ostajajo najpomembnejša metoda za odkrivanje predrakavih sprememb na materničnem vratu.

Humani papiloma virus je zelo pogost virus, ki povzroča nenormalne spremembe celic na koži nog, rok, ust in spolnih organov. V svetu je okužba s humanim papiloma virusom ena najpogostejših spolno prenosljivih bolezni. Je primarni vzrok razvoja raka materničnega vratu. Obstaja več kot 100 različnih tipov HPV, ki večinoma niso nevarni, okrog 30 tipov se prenaša s spolnimi kontakti. Ti se delijo na visokorizične in nizkorizične. Visokorizični tip lahko povzroči predrakave spremembe celic, iz katerih se lahko razvije rak materničnega vratu, vulve, nožnice, anusa ali penisa in se kaže kot nenormalen PAP-test. Nizkorizični tip lahko povzroči genitalne bradavice ali pa se kaže le kot nenormalen PAP-test. Bradavice, ki nastanejo na področju genitalij, so običajno neboleče, lahko povzročajo srbenje, pekočo bolečino ali rahle krvavitve. Predrakave

spremembe se lahko po več letih razvijejo v rakavo tkivo, če jih pravočasno ne zdravimo.

Genitalne bradavice je možno odstraniti z raztopinami, kirurško ali z laserjem in so nenevarne. Bolj problematične so spremembe na materničnem vratu, ki jih na rednih ginekoloških pregledih odkrije ginekolog z jemanjem PAP-brisa. Začetne spremembe je moč odstraniti z relativno enostavno operacijo, kadar pa ženske pridejo prepozno, se lahko že razvije rak. Zdravil, ki bi dokončno zavrta papiloma viruse, še ne poznamo. Pri večini žensk pa imunski sistem sam odstrani virus in le-ta ne povzroči nobenih zdravstvenih težav.

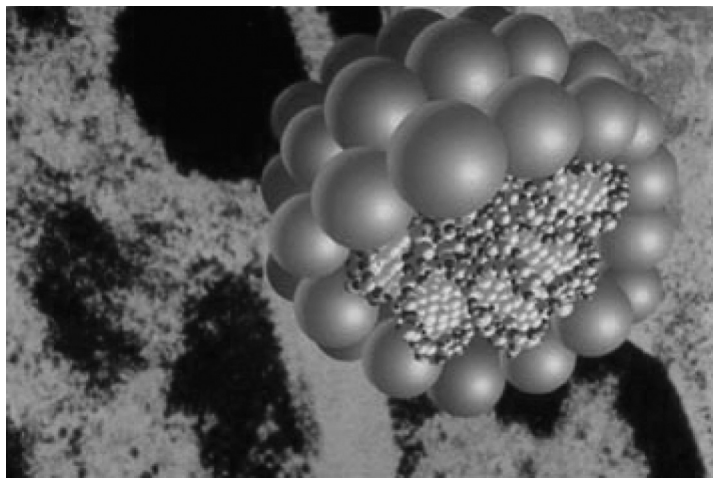
Viri:

<http://www.nlm.nih.gov/cgi/medlineplus/leavemedplus.pl>

<http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html>

<http://obgyn.uihc.uiowa.edu/Patinfo/Adhealth/hpv.htm>

<http://meditrade.si/slo/index.php?cid=288>



Humani papiloma virus

Doktorska disertacija - Razvoj in vrednotenje polimernih nanodelcev za transport cistatina v tumorske celice

Julijana Kristl

Poročilo o doktorski disertaciji Mateje Cegnar, mag.farm., ki jo je zagovarjala pred komisijo v sestavi prof.dr. Albin Kristl (predsednik), prof. dr. Borut Štrukelj, prof. dr. Julijana Kristl, izr. prof. dr. Janko Kos in izr. prof. dr. Mirjana Gašperlin kot člani, dne 22. decembra 2005 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Načrtovanje in oblikovanje nanodelcev kot naprednih dostavnih sistemov za vnos proteinskih učinkovin predstavlja največje raziskovalno področje oblikovanja zdravil. Proteini zahtevajo specifičen pristop, saj se strukturno in funkcijsko bistveno razlikujejo od klasičnih nizko molekularnih učinkovin, še posebej kadar gre za tehnološko zahtevne sisteme kot so nanodelci. Kljub določenim smernicam, ki so pregledno predstavljene v nalogi, temelji tovrstno oblikovanje na inovativnih in empiričnih pristopih, ki posebej obravnavajo specifičnost posameznega proteina in možnosti njegove vgradnje v nosilni sistem. Doktorsko nalogo sestavlja načrtovanje, izdelava in vrednotenje biokompatibilnih nanodelcev (ND) s proteinsko učinkovino. Vgrajevanje proteinov v ND predstavlja edinstven pristop, tako z vidika pridobitve zelenih lastnosti nosilnega sistema kot ohranitve biološke aktivnosti vgrajene proteinske učinkovine. Cistatin je izbrala z namenom, da bi zmanjšala metastaziranje rakavih celic zaradi proteaznih encimov, ki jih celice tumorskega tkiva pospešeno sintetizirajo in izločajo v okolno tkivo, kar omogoča razgradnjo zunajceličnega ogrodja in bazalne membrane. Aktivnost cisteinskih proteaz regulirajo njihovi endogeni inhibitorji cistatini, stefini, kininogeni idr., kateri tvorijo novo skupino proučevanih spojin, ki bi lahko učinkovito zavre razvoj rakavih obolenj.

Raziskave je izvedla v več fazah. Najprej je izolirala modelno proteinsko učinkovino kokošji cistatin iz jajčnega beljaka s homogeniziranjem, obarjanjem s spremembo pH, centrifugiranjem, afinitetno kromatografijo, ultrafiltriracijo, izključitveno ali gelsko kromatografijo ter sušenjem z liofilizacijo. Končni produkt, kokošji cistatin, je okarakterizirala glede na biokemijske lastnosti in določila inhibitorno aktivnost z encimskim testom na substratu BANA. Za vgrajevanje cistatina v polimerne ND iz poli(mlečne in glikolne kisline) (PLGA) je izbrala dvojno emulzijsko metodo z difuzijo izbranih organskih topil. Tako z vidika stabilnosti cistatina kot s pridobitvijo zelenih lastnosti ND je preizkusila različne tehnološke postopke in izbrala najboljšo kombinacijo proizvodnih spremenljivk, kot so: organsko topilo, čas in jakost strižnih sil ali ultrazvočnega valovanja, dodatek krio- in lioprotektantov v fazi sušenja idr. Na ta način je razvila najustreznejši postopek za izdelavo polimernih ND, predvsem z namenom, da učinkovina - protein ni signifikantno izgubil biološke

učinkovitosti. Ker lastnosti polimera odločilno vplivajo na nastanek ND, je raziskovala različne derivate PLGA polimera, in dokazala vpliv molekulske mase ter substituent na vgrajevanje, aktivnost in sproščanje cistatina iz ND.

Z uporabo celičnih kultur je nanodelce vrednotila z biološkega vidika. Proučevala je vpliv izdelanih nanodelcev na celično linijo transformiranih epitelnih celic raka dojke, MCF-10A neoT, ki povečano sintetizirajo in izločajo cisteinske proteaze, katere predstavljajo tarčo za cistatin. Preživetje in rast celic iz linije MCF-10A neoT v prisotnosti nanodelcev je ovrednotila z uporabo MTT testa. Vstop ND v celico je spremljala s fluorescenčno mikroskopijo tako, da je predhodno označila cistatin s fluorescenčnim barvilom, ga vgradila v ND in jih inkubirala določen čas s celicami. V primerjavi s prostim cistatinom je z nanodelci pospešen in povečan vnos proteinske učinkovine v celice. Rezultati so pokazali, da nanodelci vstopajo v celice in da je proces odvisen od koncentracije ND in časa inkubiranja. V začetku inkubiranja so se nanodelci nahajali na perifernem delu celic in se kasneje pomikali v perinuklearno področje, kjer so se združevali. Možno je, da so ciljali lizosome, ki so polni cisteinskih proteaz. Vzorci, kjer je celice inkubirala s prostim označenim cistatinom v enakih koncentracijah kot pri ND, so bili obarvani mnogo manj. To kaže, da je difuzija prostega cistatina skozi celično membrano mnogo počasnejša kot endocitoza nanodelcev.

Naslednji bistveni vidik pri vnosu učinkovine v celico je njena učinkovitost na mestu delovanja. Učinkovitost cistatina, prostega ali dostavljenega z nanodelci, za inhibicijo znotrajcelične cisteinske proteaze katepsina B je določala s proteoliznim testom s specifičnim substratom Arg₂ krezil vijolično. Učinkovitost cistatina v inhibiciji znotrajceličnih encimov je dokazala z zmanjšanjem intenzitete v fluorescenci glede na kontrolni vzorec, kar je dokazala z inhibicijo razgradnje fluorogenih substratov specifičnih za cisteinske proteaze.. Rezultati so pokazali, da je cistatin dostavljen z ND, učinkovito inhibiral proteolizno aktivnost katepsina B, medtem ko prost cistatin v pufrni ratopini takega delovanja ni izkazal.

Zaključki doktorskega dela so izvirni: velika odvisnost biološke aktivnosti proteinske učinkovine od tehnološkega postopka in parametrov izdelave, podaljšana aktivnost proteina pri sproščanju iz nanodelcev, povečana stabilnost proteina v nanodelcih v suhi obliki (liofilizat), odvisnost citotoksičnosti nanodelcev od njihove koncentracije in površinskih lastnosti, večji vnos proteinske učinkovine v celice z uporabo nanodelcev kot s prosto učinkovino iz

raztopine, časovno in koncentracijsko odvisen vstop nanodelcev v celice, ohranjena biološka aktivnost proteina po dostavi z nanodelci v celici, izražen učinek proteina na znotrajceličnem tarčnem mestu delovanja.

Doktorsko delo dodaja nov korak v vrednotenju farmacevtskih oblik z biološkega stališča. Delna ponazoritev *in-vivo* stanja je predstavljena z uporabo celičnih modelov, ki omogočajo sprotno, hitrejše in bolj ekonomično preverjanje učinkov v razvoju nove farmacevtske oblike (citotoksičnost, vnos v celice, inhibicijo encimov).

V doktorski disertaciji je razvit inovativen pristop za izdelavo nanodelcev s proteinsko učinkovino in predstavlja izviren in samostojen znanstveni prispevek na področju oblikovanja naprednih dostavnih sistemov za proteinske učinkovine. Iz navedenega raziskovalnega področja je Mateja Cegnar skupaj s soavtorji že objavila tri članke v mednarodnih revijah z visokim faktorjem vpliva, štiri pa v domačih recenziranih revijah. Za tehnološki postopek je že podeljen slovenski patent, mednarodni pa je v postopku.

Mentorica prof. dr. Julijana Kristl in somentorizr. prof. dr. Janko Kos

Doktorska disertacija - Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih 'in vitro'

Albin Kristl

Mladi raziskovalec Simon Žakelj je na Fakulteti za farmacijo izdelal in zagovarjal doktorsko disertacijo z naslovom Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih "in vitro".

V "in vitro" pogojih lahko prehod zdravilnih učinkovin skozi steno tankega črevesa preučujemo v dvoprostornih difuzijskih celicah, v katerih ohranjamo vitalne izolirane segmente črevesa podgane. Med drugim je za ohranjanje vitalnosti tkiva v "in vitro" pogojih pomembna uporaba primerne inkubacijske raztopine. Vse znane inkubacijske raztopine, ki jih uporabljamo v ta namen vsebujejo tudi dvovalentna kationa Ca^{2+} in Mg^{2+} . Znano pa je, da v gastrointestinalnem traktu lahko dvo in večvalentni kovinski ioni, kot npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} idr., interagirajo z nekaterimi učinkovinami kot so fluorokinoloni, bisfosfonati, tetraciklini... Klinično se te interakcije kažejo kot bistveno zmanjšana biološka uporabnost naštetih učinkovin ob sočasni uporabi z antacidi in drugimi pripravki oz. ob uživanju hrane, ki vsebuje te ione. Zaradi tovrstnih interakcij je oteženo oz. onemogočeno tudi preučevanje permeabilnostnih lastnosti prej naštetih učinkovin ter vpliva teh učinkovin na vitalnost ter integriteto izoliranega tkiva.

V doktorski disertaciji je opisan razvoj izvedbe poskusov z dvoprostornimi difuzijskimi celicami po postopku s katerim se lahko izognemo prisotnosti dvovalentnih kationov v inkubacijski raztopini na eni strani dvoprostorne difuzijske celice. Ta postopek je omogočil študijo vpliva bisfosfonata (klodronata) na vitalnost in integriteto epitelija tankega črevesa ter preučevanje permeabilnostnih lastnosti modelnega fluorokinolona (ciprofloksacina). Obe učinkovini spadata med tiste, ki lahko v gastrointestinalnem traktu interagirajo z nekaterimi dvo in večvalentni kovinski ioni.

Rezultati raziskav opisanih v disertaciji kažejo, da v terapevtski koncentraciji klodronat zaradi sposobnosti vezave Ca^{2+} ionov povzroči odprtje tesnih stikov med celicami epitelija tankega črevesa in s tem vpliva na barierne lastnosti tega epitelija. Vpliv klodronata na

integriteto epitelija tankega črevesa podgane je bil, resda v drugem koncentracijskem območju, primerljiv z vplivom EDTA, ki pa je sicer znana kot modelni pospeševalec paracelularne permeabilnosti "in vitro". Klodronat (zdravilna učinkovina, ki se že daljše obdobje uporablja ob za paciente sprejemljivem tveganju) torej povzroča reverzibilno povečanje prepustnosti epitelija tankega črevesa za hidrofilne spojine. To spoznanje pomeni, da bi lahko bilo varno tudi vključevanje spojin, katerih edini namen je povečanje permeabilnosti hidrofilne zdravilne učinkovine skozi epitelij tankega črevesa, v zdravilne pripravke za peroralno uporabo.

V disertaciji so opisane tudi permeabilnostne lastnosti modelnega fluorokinolona (ciprofloksacina) skozi jejunum podgane. V "in vitro" pogojih smo pokazali, da prisotnost dvo in večvalentnih kovinskih ionov v raztopini ciprofloksacina ni vplivala na sam prehod tega fluorokinolona skozi epitelij tankega črevesa. Podrobno so opisane tudi značilnosti aktivne eliminacije ciprofloksacina skozi epitelij tankega črevesa. Izkazalo se je, da je izločanje ciprofloksacina skozi steno tankega črevesa najbolj izrazito v spodnjem delu tankega črevesa (ileumu) ter v rahlo kislih eksperimentalnih pogojih ($\text{pH} = 6,5$). Poznavanje značilnosti aktivne eliminacije je pripomoglo tudi k identifikaciji prenašalnega proteina, preko katerega poteka eliminacija fluorokinolonov skozi epitelij tankega črevesa. Z dodatnimi testi inhibicije različnih sekretornih prenašalnih proteinov smo ugotovili, da se ciprofloksacin (in najverjetneje tudi mnogi drugi fluorokinoloni) skozi steno tankega črevesa izloča predvsem z OCT1 (organic cation transporter 1) - prenašalnimi proteini, ki se nahajajo v bazolateralni membrani enterocitov.

Dr. Simon Žakelj, mag. farm., je zagovarjal doktorsko disertacijo 3. januarja 2006 na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.
Mentor: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm., Fakulteta za farmacijo

Iz društvenega življenja

Zmago Jelinčič Plemeniti doniral zbirko lekarniških eksponatov

Borut Štrukelj

Fakulteta za farmacijo je bogatejša za zbirko lekarniških eksponatov, ki jih je doniral g. Zmago Jelinčič Plemeniti. Zbirko, ki se nahaja v vitrini predprostora glavne predavalnice P1, sestavljajo eksponati iz začetka lekarniškega delovanja na področju Slovenije, veliko primerkov pa sodi v dobo prvega industrijskega oblikovanja in trženja zdravil v Evropi. Del zbirke, povezan z zdravilnimi rastlinami, bo po restavriranju razstavljen na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Zmago Jelinčič Plemeniti je že desetletja povezan s farmacijo v najširšem smislu. Po končani osnovni šoli in gimnaziji Poljane je nadaljeval s študijem na ljubljanski Univerzi – na Fakulteti za farmacijo. Je član Ameriške farmacevtske zveze (AphA).

Kot poznavalec naravnega zdravilstva je osnoval prvo privatno podjetje za proizvodnjo naravnih zdravil v bivši SFRJ. Leta 1989 se je vključil v politično dogajanje in sodeloval v osamosvojitveni vojni za Slovenijo. Kot politik je vodja poslanske skupine, sicer pa neprestano v stiku z umetnostjo, naravo in farmacijo. Rezultat njegovega znanja je knjiga z naslovom "Kozmetika iz rastlin". Prav tako se že desetletja ukvarja z zbirateljstvom. Kot poznavalec na področju grboslovja je priznan v širokem evropskem prostoru. Mimogrede, Rodbina Jelinčič nosi plemiški naslov od septembra 1756. leta, ki ji ga je v dedno posest podelila cesarica Marija Terezija. Poleg izjemne numizmatične zbirke in znanja iz tega področja, krasijo vitrine Jelinčičevega domovanja številni lekarniški eksponati. Del te zbirke je g. Jelinčič doniral tudi Fakulteti za farmacijo, za kar se mu sodelavci fakultete najlepše zahvaljujemo.



Poročilo - 5th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Saša Baumgartner

Osrednji znanstveni dogodek na področju farmacije v letu 2006 je bil 5. svetovni kongres iz farmacije, biofarmacije in farmacevtske tehnologije v Ženevi od 27. do 30. marca. Tema srečanja je bila **Approaching new interfaces**. Ta naslov ni bil izbran po naključju, kot je na otvoritveni slovesnosti poudaril predsednik Združenja za farmacevtsko tehnologijo v Nemčiji - APV prof. P. Kleinebudde. Približevanje mejnim površinam je mišljeno na treh različnih nivojih in sicer predstavlja srečanje:

1. Nov način organizacije tovrstnega svetovnega srečanja. Poleg APV in APGI se je k organizaciji pridružilo še 9 drugih društev, med njimi tudi SFD (kot polni član).
2. Približevanje in stične točke med različnimi farmacevtskimi znanstvenimi področji.
3. Povečevanje interesa univerz za industrijsko uporabnost znanstvenih izsledkov.

Večino aktivnosti iz slovenskega prostora je vodila prof.dr. Julijana Kristl, ki je bila tudi članica mednarodnega znanstvenega odbora. Poleg nje je v tem odboru aktivno sodeloval tudi prof.dr. Stane Srčič, magistra Jelka Dolinar pa je vršila koordinacijo v organizacijskem odboru.

Pripravljalni sestanki za to veliko srečanje so se začeli že v letu 2004. Prvega se je udeležila prof.dr. Julijana Kristl kot predsednica Znanstvene sekcije pri SFD. Na tem sestanku so izdelali program srečanja, načrtovali število plenarnih in vabljenih predavanj ter število prostih tem. Naredili so tudi finančno konstrukcijo celotnega projekta, ga terminsko opredelili in organizacijo peljali s švicarsko natančnostjo. Že s tega sestanka je prof.dr. Julijana Kristl prinesla veliko idej, kako se da dobro organizirati tako veliko

srečanje in da je primerno in pomembno, da pri tem dogodku vidno sodeluje tudi Slovensko farmacevtsko društvo.

Na konferenci je bilo okoli 1000 udeležencev iz več kot 50 držav. Ker je srečanje pomembno tudi za širjenje prepoznavnosti Slovenije in predvsem tehnologov, smo se tudi na Izvršnem odboru Tehnološke sekcije odločili, da na srečanje pošljemo 3 svoje delegate: prof.dr. Julijano Kristl, prof. dr. Staneta Srčič in doc.dr. Sašo Baumgartner. Poleg nas so se iz Slovenije konference udeležili še: izr.prof. dr. Mirjana Gašperlin, asist.dr. Rok Dreu, prof.dr. Albin Kristl, asist. dr. Mojca Kerec-Kos in asist. Jurij Trontelj kot predstavniki fakultete in izr.prof.dr. Franc Vrečer iz Krke.

Srečanje se je začelo z uvodnim predavanjem prof. M Kerna, ki je predstavil svoje poglede na globalne trende za izboljšanje zdravja človeštva, predvsem v smislu primerne prehrane. Na tem področju lahko v bodočnosti pričakujemo velike spremembe, saj se kot nova znanstvena veda oblikuje nutrigenomika, ki teži k prilagajanju prehrane posamezniku.

Pomembno je k svetovnemu napredku na področju nosilnih sistemov učinkovin prispeval prof. A.T. Florence, ki je za svoje življenjsko delo dobil nagrado »APGI Research Award for outstanding achievements in the pharmaceutical sciences«. Nagrado mu je na otvoritveni slovesnosti svečano izročil predsednik Združenja za galensko in industrijsko farmacijo iz Francije - APGI prof. E. Fattal. Nagrado nemškega združenja APV je iz rok njegovega predsednika prof. P. Kleinebuddeja dobil prof. C.M. Lehr iz Saarbrückna, in sicer za izjemne dosežke na področju študija permeabilnosti skozi biološke membrane. Možnosti, da bo

napredek v farmaciji takšen tudi v bodoče, vsekakor zagotavljajo današnji doktorandi, zato so na otvoritveni slovesnosti podelili nagrado tudi za najboljši doktorat v letu 2004/2005.

Znanstveni program konference je pokrival 36 različnih področij farmacevtske tehnologije, predavanja so hkrati potekala v treh paralelnih sekcijah različnih znanstvenih področij: biomateriali, nanodelci, karakterizacije snovi v trdnem, procesne analize tehnologije (PAT) in stabilnost, ciljana dostava učinkovin, dostavni sistemi za vnos genov in oligonukleotidov, farmacevtske oblike za inhaliranje, dostava proteinov in peptidov, dermalne in transdermalne farmacevtske oblike, peroralne farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem, transport skozi membrane, tehnološki procesi, idr.

Vsak dan smo poslušali tudi plenarna predavanja, od katerih so izstopala naslednja: S. Benita iz Izraela - Immunoconjugate colloidal carriers for drug targeting; K. Hostettmann iz Švice - The potential of plants as source of new drugs ter W. Arlt iz Nemčije - Innovative support materials for drug delivery. Vsak od prej naštetih vrhunskih strokovnjakov je po svoje, inovativno in vizionarsko pristopil k predstavitvi svojega področja. Izkazala se je zlasti potreba po povezovanju različnih področij znanosti. Interdisciplinarnost je in bo imperativ napredka.

Poleg krajših ustnih predstavitev so v posameznih sekcijah sodelovali tudi vabljeni predavatelji. Vsi udeleženci iz Slovenije smo nekako dobili vtis, da je bil znanstveni nivo ustnih predstavitev dostikrat pod pričakovani. Po drugi strani pa so bila zelo odmevna nekatera vabljenega predavanja in to predvsem večjih raziskovalnih skupin. Vodja

Iz društvenega življenja

takšne večje skupine je pregledno predstavil področje, ki se je vsebinsko dopolnjevalo še s posterji ali krajšimi predavanji. Tovrstna predstavitev posamezne raziskovalne skupine bi tudi nam lahko služila kot vzorec za boljšo prepoznavnost in odmevnost slovenske farmacije na velikih kongresih.

Predstavljenih je bilo tudi okrog 600 posterjev iz različnih področij, ki so bili v povprečju ustrezne zahtevnosti in inovativnosti. Vendar znova lahko ugotavljamo, kako pomembno je za prepoznavnost enotno nastopanje. Tudi v barvi in obliki posterja, ne le v predstavljeni vsebini. Udeleženci iz Slovenije smo se predstavili z 10-imi različnimi prispevki v obliki posterjev. Obisk pri posterjih je bil zadovoljiv, razvijale so se zanimive diskusije, reševali in odpirali so se novi problemi ter porajale nove ideje.

Poleg strokovnega in znanstvenega pomena ima vsaka takšna konferenca velik pomen tudi širše. Prof. Kristlova je tako vzpostavila veliko novih kontaktov z eminentnimi profesorji iz tujih držav in seveda utrdila že utečene povezave. Tako bosta k nam prišla na obisk in podala predavanje profesor H. Junginger in letošnji nagradenec prof. A.T. Florence. Profesor Junginger prihaja k nam že maja, medtem ko prof. Florence načrtuje obisk jeseni. O vseh predavanjih boste obvestila lahko prebrali na spletnih straneh Fakultete za farmacijo.

Tudi prof. Srčič je zelo aktivno navezoval stike s tujimi strokovnjaki. S prof. P. Kleinebuddejem je dorekel organizacijo APV seminarja na temo peletiranja in granuliranja, ki bo v Ljubljani letos septembra. Tudi o tem boste kmalu lahko kaj prebrali na domači fakultetni strani. Imel je še pogovore o nadaljnjem poglobljenem sodelovanju s fakulteto iz Graza, Helsinkov, Budimpešte in Szegeđa (Madžarska): izmenjava diplomantov, študentov v okviru Erasmus programa in »post doc« gostovanja.

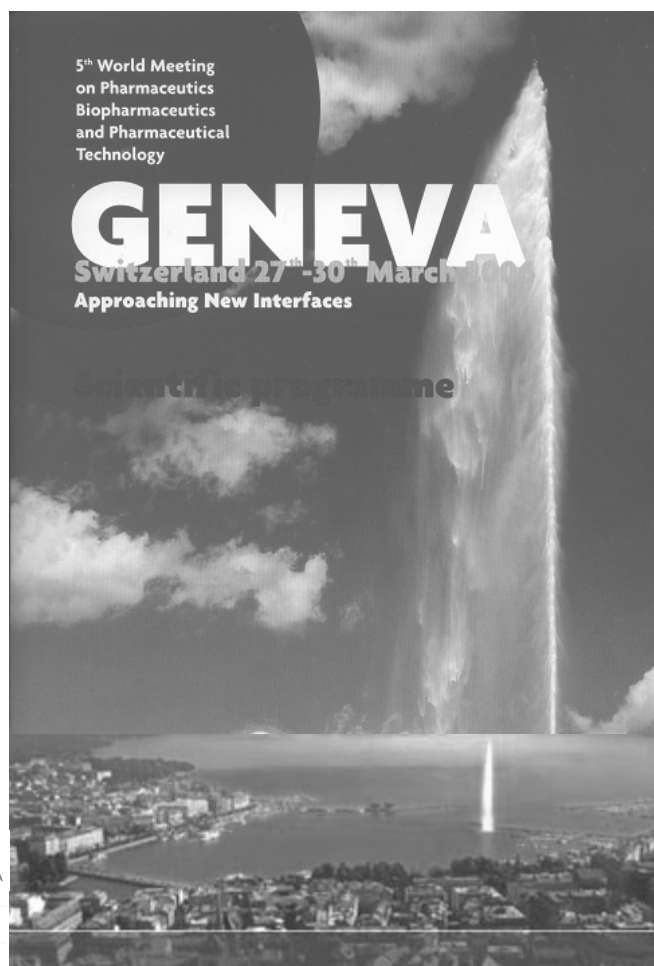
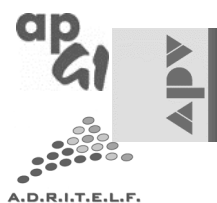
Mislím, da je skupina iz Slovenije reprezentativno predstavljala našo stroko. Hkrati si želim, da bi v prihodnje tako množične udeležbe načrtovali prej in nastopili še bolj enotno. Udeležba na konferenci je pokazala, da slovenski farmacevti raziskovalno na zastopanih področjih sledimo novostim in trendom znotraj farmacevtske tehnologije in bio-

farmacije ter tehnološko ne zaostajamo za najbolj razvitimi. Sklep, ki ga lahko izpeljemo iz udeležbe na konferenci je tudi ta, da je danes za doseganje odmevnih znanstvenih dosežkov nujen interdisciplinarni pristop, ki na področje farmacije vpeljuje ljudi s področja medicine, kemijskega in strojnega inženirstva, fizike ter matematike. S tem farmacevti lahko operiramo z novimi orodji in tehnologijami, ki omogočijo, da se spoprímemo s stopnjo kompleksnosti znanstvenega problema v farmaciji.

Kongres v Ženevi je bil dobro organiziran, z inovativno vsebino, vrhunskimi predavatelji in znanja željnimi udeleženci. Najti je bilo mogoče seveda tudi nekaj pomanjkljivosti, ki jih Ljubljana, če bi bila naslednja organizatorica tega kongresa, gotovo ne bi storila! Izpadli smo le zato, ker smo majhni in

zato za nekatere nezanimivi. Morda res manj kot Španci, ki so z Barcelono prireditelji naslednjega srečanja leta 2008!

In na koncu: *Quo vadis scientia pharmaceutica?* Na to je najbolje odgovoril profesor Elias Fattal iz Francije s stavkom, ko je ugotavljal, da bodo dosežki na področjih novih tehnologij, genetike, umetne inteligence, robotike in nanotehnologije bistveno vplivali na razvoj farmacevtske tehnologije. Upam, da bomo tem trendom mogli slediti tudi mi, pa ne samo kot opazovalci, pač pa kot aktivni igralci. O tem bo odločalo tudi zavedanje in uspešnost lokalne farmacevtske industrije, tudi domače. Upati je, da pri tem kratkoročni interesi dnevne politike ne bodo delali prevelike škode.



31. skupščina SFD

Portorož, 19. maj 2006

Jelka Dolinar

Letošnje srečanje članov SFD, povezano z 31. skupščino je potekalo dva dneva, od 19. do 20. maja. Namenjeno je bilo obravnavi problematike lekarniških mrež in zdravljenju kožnih bolezni. Zanimiva predavanja in živahne razprave so napolnile dvorano Avditorija.

Organizatorji so redno letno skupščino uvrstili v program prvega dneva srečanja, po končanem satelitskem simpoziju o lekarniških mrežah. Predstavniki društva so podali izčrpna poročila o delu in poslovanju ter predstavili načrtovane aktivnosti.

Predsednik SFD je poročilo o delu predstavil po posameznih dejavnostih, s katerimi se je SFD v minulem letu ukvarjalo. Izpostavil je strokovne prireditve, založniško dejavost, sodelovanje z drugimi strokovnimi združenji doma in v svetu ter opisal prizadevanja v zvezi z razvojem farmacevtskega informacijskega centra.

Sekretarka se je v poslovnem poročilu osredotočila na predstavitev stroškov pisarne SFD, ki omogočajo izvajanje osnovnih društvenih dejavnosti. Ti stroški so lansko leto znašali 29.271.602 SIT letno oz. 20 % celotne realizacije in so obsegali: stroške dela zaposlenih (47 %), izhajanje Farmacevtskega vestnika in Farmakona (20 %), vzdrževanja prostorov in opreme SFD (18 %), stroške delovanja FIC-a (5 %), funkcionarjev SFD in študentskega servisa (4 %), stroške članarin za mednarodne organizacije (3 %) ter davke od dohodka (3 %).

Društvo je te stroške pokrilo s prihodki od članarin, z javnimi sredstvi za sofinanciranje dejavnosti Društva, z oglasi v Farmacevtskem vestniku ter s prihodki od storitev pri profitnih projektih. Struktura poslovanja SFD dokazuje, kako pomembno je, da se društvo ukvarja s profitnimi projekti, sicer bi bil program neprofitnih dejavnosti zelo osiromašen. Ohranjanje ravnotežja med profitnim in neprofitnim delom poslovanja,

omogoča uresničevanje poslanstva SFD in interesov mnogih članov SFD.

Predsednik nadzornega odbora dr. Janez Kerč je povzel poročilo, ki je bilo priloženo delegatskemu gradivu. Poudaril je, da morajo biti vsi projekti društva načrtovani racionalno s ciljem doseganja čim boljših rezultatov, čeprav je določena solidarnost znotraj SFD možna. Vključevanja predstavnikov SFD v izvedbo strokovnih prireditev drugih organizacij je zaželeno, vendar pod pogojem, da le-ti zagotovijo ustrezne strokovne standarde.

Dr. Kerč je natančno poročal o ugotovitvah nadzornega odbora pri pregledu poslovnega poročila.

Poslovanje Društva je bilo približno enako uspešno kot leta 2004, če ga ocenjujemo z vidika ostanka prihodka, ki je bil celo višji od načrtovanega. Tako prihodkov kot odhodkov pa je SFD realiziralo okoli 12 % manj kot leto poprej.

Posebnost bilance 2005 je bila negativna realizacija podružnic in sekcij. Sekcija farmacevtov javnih lekarn je ustvarila največjo negativno razliko, ker je konec septembra izpeljala projekt Dan slovenskih lekarn, ki je bil vreden okoli 3,7 miliona. Financirala ga je iz ostanka prihodka iz preteklih let, s simpozijem o Astmi pa ni uspela ustvariti zadostnega prihodka za pokritje negativne razlike. Glede na to, da je Društvo razpolagalo z rezervami, je bil sprejet dogovor, da sekcija primanjkljaj nadomesti v tem letu, da ne bi po nepotreben večali celokupnega dobička društva. Velik del ostanka prihodka iz preteklih let je porabila tudi sekcija tehnikov za izvedbo izleta v Beograd, Ljubljanska podružnica za izvedbo proslave ob 50-letnici delovanja ter Celjska podružnica za izvedbo teniškega turnirja.

Delegati 31. skupščine so soglasno potrdili poročila o delu, poslovanju in poročilo nadzornega odbora.

Predsednik društva je na kratko predstavil plan dela za leto 2006. Vsebinsko je dopolnila predsednica organizacijskega odbora 5. skupnega simpozija iz farmacevtske kemije (5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry) doc. dr. Lucija Peterlin Mašič, na katerem sodeluje 6 centralnoevropskih držav. Simpozij bo potekal od 17. do 21. junija 2007 v Portorožu v organizaciji Sekcije za farmacevtsko kemijo pri SFD. Organizatorji pričakujejo okrog 400 udeležencev.

Predsednik strokovno organizacijskega odbora za pripravo 7. Centralnoevropskega simpozija iz farmacevtske tehnologije in biotehnologije, prof. dr. Aleš Mrhar, je delegate seznanil s pripravami na simpozij, ki je za slovenske strokovnjake zaradi svoje odmevnosti in pomena v tem delu Evrope, zelo pomemben. Prihodnje leto bo simpozij potekal v hotelu Mons v Ljubljani, od 21. do 22. septembra 2007.

Predsednica Sekcije farmacevtov javnih lekarn Lidija Pavlovič je poročala o pripravah na organizacijo Drugega dneva slovenskih lekarn, ki bo 26. septembra 2006 in bo namenjen varni uporabi farmacevtskih oblik. Za ta namen bodo organizatorji izdelali brošuro, ki jo bodo prejeli vsi obiskovalci lekarn. Cilj Sekcije je, da dogodek postane tradicionalen in eden od pomembnih promotorjev lekarniške stroke. Čez dober mesec, 5. oktobra bo sledil 4. simpozij Sekcije.

Delegati so potrdili načrtovane dejavnosti društva, finančni načrt in višino društvene članarine ter naročnine na Farmacevtski vestnik. Prav tako so delegati potrdili članarino za leto 2007, ki jo bo tajništvo društva obračunavalo spomladi 2007, takrat že v evropski valuti.

Iz društvenega življenja

članarina, vpisnina, naročnina	Članarina 2006	Članarina 2007
članarina zaposleni farmacevti	7.000 SIT	30 EURO
članarina tehniki	5.500 SIT	24 EURO
članarina seniorji	3.500 SIT	15 EURO
članarina študenti	3.500 SIT	15 EURO
članarina vpisnina	1.000 SIT	5 EURO
naročnina na Farmaceutski vestnik	15.000 SIT	65 EURO

Podelitev društvenih priznanj v letu 2006

Največja slovesnost, ki vsako leto spremlja redno letno skupščino SFD, je podelitev društvenih priznanj. Letos je tradicionalno potekala v Tartinijevem gledališču v Piranu.

Izvršni odbor ni prejel nobenega predloga za Minařikovo odličje, podelil pa je 7 Minařikovih priznanj. Nagrajencem sta listino izročila predsednik SFD, doc. dr. Matjaž Jeras in predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj, prof. dr. Aleš Mrhar.

Priznanja so prejeli:

Breda Bernot, mag. farm.

Anka Bratož

Linda Čičigoj, mag. farm., spec.

Silvo Koder, mag. farm., spec.

Marinka Kregar, mag. farm.

Meta Milovanovič, mag. farm., spec.

Slavko Rataj, mag. farm., spec.

Utemeljiteljve

Magistra **Breda Bernot** je gradila slovensko lekarniško farmacijo v težkem povojnem obdobju. Bila je med prvimi farmacevti, ki so leta 1950 podprli ustanovitev Slovenskega farmacevtskega društva, postala je aktivna članica in mu ostala zvesta do danes. V šestdesetih letih je bila blagajničarka društva, več let je bila članica upravnega odbora in kasneje nadzornega odbora. O njeni predanosti stroki pričajo številna priznanja, ki jih je prejela za svoje delo v lekarni Miklošič in za sodelovanje s SFD. Izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje magistri Bredi Bernot za njen prispevek k razvoju lekarniške farmacije.

Vedoželjnost je vspodbujala **Anko Bratož** k nenehnemu izpopolnjevanju na področju oblikovanja zdravil. Bogate izkušnje ji omogočajo tvorno vključevanje v raziskovalno skupino razvojnega oddelka v Krki pri uvajanju novih tehnologij v proizvodnjo poltrdnih farmacevtskih oblik. Z optimizmom

in strpnostjo nenehno prispeva k vzdrževanju pozitivnega komunikacijskega vzdušja in ima veliko zaslug za ohranjanje čvrstih in dobrih odnosov med člani Dolenjske podružnice. Brez tehnične podpore, ki jo gospa Anka Bratož nudi Dolenjski podružnici, bi bila realizacija zastavljenih ciljev veliko težja. Za zavzeto organizacijsko delo podeljuje izvršni odbor gospe Anki Bratož Minařikovo priznanje.

Magistra **Linda Čičigoj** sodi med tiste farmacevte, ki svoj poklic opravljajo kot obvezno dolžnost in ljubiteljsko dejavnost hkrati. Odlikuje jo umirjen in zaupljiv odnos do bolnikov in mladih lekarniških kadrov, ki jih kot mentorica že več let vodi. Na podlagi izkušenj in znanj, ki si jih je pridobila na različnih strokovnih izpopolnjevanjih o homeopatiji, si prizadeva za njeno priznavanje znotraj zdravstvene zakonodaje. S predavanji strokovni in laični javnosti ter z organizacijskim delom za Primorsko podružnico in Homeopatsko sekcijo, ki ju je vodila kar dva mandata, je magistra Linda Čičigoj veliko prispevala k promociji poklica farmacevta, za kar ji izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.

Magister **Silvo Koder**, ki si je delovne izkušnje nabiral v bolnišnični lekarni v Mariboru, sprva kot farmacevt receptar, potem kot analitik in nazadnje kot predstojnik lekarnje, ima velike zasluge za prepoznavnost bolnišničnega farmacevta in njegovo vključevanje v zdravstveni team. Mesto asistenta za farmakologijo na novi Medicinski fakulteti v Mariboru, potrjuje strokovni ugled,



Prejemniki Minařikovih priznanj v letu 2006 v dvorani



Prejemniki Minařikovih priznanj

ki si ga je pridobil kot bolnišnični farmacevt v Mariborski bolnišnici. Magister Koder goji pripadnost Slovenskemu farmacevtskemu društvu tudi na neformalni ravni z organizacijo odmevnih smučarskih tekmovanj. Za njegovo zavzeto strokovno delo in povezovalno vlogo mu IO podeljuje Minařikovo priznanje.

Magistra **Marinka Kregar** že 20 let tvorno sodeluje pri tehnološkem razvoju Krke. S sodelavci ji je uspelo uveljaviti mnoge novosti v proizvodnem procesu, s čimer je veliko prispevala k širjenju trga Krkinih izdelkov.

Svoje izkušnje prenaša z zgledi in prek predavanj na mlade strokovne kadre v vlogi mentorice. Službene obveznosti je vedno povezovala z delom v SFD. Dva mandata je vodila Dolenjsko podružnico in ima velike zasluge za povezovanje kolegov iz industrije in lekarništva. Za njeno strokovno in organizacijsko delo v Krki in v Dolenjski podružnici ji izvršni odbor podeljuje Minařikovo priznanje.

Magistro **Meto Milovanovič** poznajo številne generacije še iz obdobja, ko je bila

zaposlena na IVZ in je s prispevki s področja predpisovanja zdravil sodelovala v strokovnih časopisih. Poleg upravljanja zasebne lekarne se danes ukvarja tudi z mentorskim delom, preko LZS vodi projekt farmacevtske skrbi za bolnike z hipertenzijo, sodeluje v okviru CINDI programa, o izkušnjah v tujini in doma je večkrat tudi predavala in objavila več člankov. Sodeluje v strokovnih organih LZS, MZ in SFD. Za obsežno strokovno in publicistično delo, podeljuje IO Minařikovo priznanje magistri Meti Milovanovič



Častni gostje simpozija
(z leve: Aleš Süßinger, Borut Štrukelj,
Uroš Urleb, Martina Cvelbar, Julijana Kristl,
Aleš Mrhar in Matjaž Jeras).

Iz društvenega življenja



Številka 5, zmagovito omizje šaljivega kviza.

Magistra **Slavka Rataja** odlikuje izjemna vsestranskost, ki jo najbolj cenijo njegovi kolegi iz Celjske podružnice in javnega zavoda Celjske lekarne. Uspel je organizirati kontrolno analizni laboratorij, z občasnim delom v oficini pa ohranja neposredni stik z lekarniško službo. Aktivno sodeluje v strokovnih organih LZS in MZ, je avtor številnih strokovnih prispevkov, na Srednji zdravstveni šoli v Celju že deset let predava farmakologijo, svojo ljubiteljsko nagnjenost do zgodovine je najbolj prepričljivo izrazil ob 50-letnici Celjske podružnice. V vlogi predsednika, tajnika ali pa samo člana odbora Celjske podružnice je s predanim delom obogatil strokovno dejavnost

podružnice in veliko prispeval za ugled stroke, zato mu izvršni odbor podeljuje Minařnikovo priznanje.

Čustveno prevzet, se je z izbranimi besedami, v imenu prejemnikov priznanj, zahvalil **Slavko Rataj**:

»Spoštovani gospod predsednik Slovenskega farmacevtskega društva, spoštovani gospod Predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj, spoštovane kolegice, dragi kolegi!

V veliko čast mi je, da se Vam lahko zahvalim v imenu prejemnikov društvenih priznanj za leto 2006. Semel tantum in anno ridet Apolo, enkrat v letu se smeje Apolon, je

kot pripovedujejo dovtipno povedala Katarina Schweighofer, mati skladateljev in zdravnikov Ipavcev iz Šentjurja, ko je kot mlada deklica na Dunaju ugotovila, da je priložnosti za praznovanje v življenju malo. Vsako leto se nasmeje Apolon tudi nam, ko se zberemo tu na obali v razcvetu pomladne svežine. Sedem nas je letošnjih prejemnikov priznanj. Število sedem po starem izročilu predstavlja celovitost, popolnost. Tudi slovenska pesem poje o sedmih rožah, ki jih je ljuba povezala v šopek svojemu ljubemu. Trije smo tudi študijski kolegi. Iz javnih in bolnišničnih lekarn prihajamo in iz farmacevtske industrije. Proti poldnevu življenja gremo, ko se človek že rahlo umiri in bolj trezno sprejema odločitve in življenjski modrosti, ki se je tekom ustvarjalnih let osebnega in poklicnega življenja izkristalizirala v osebnost spoštovane kolegice Brede Bernot, ki ji pripada častno mesto med nami in ki svežini šopka letošnjih nagrajencev dodaja posebno žlahtnost. S hvaležnostjo se ob naših učiteljih spominjam profesorja Karbe, ki nas je štipendiste Zavoda za farmacijo znal tako prepričljivo navduševati za farmacevtski poklic, za znanost, za stroko in nam s svojim neuničljivim optimizmom vlival pogum. Imel je vizijo in poznal je pot. Dandanes smo tudi zato lahko ponosni na našo farmacevtsko fakulteto in Slovensko farmacevtsko društvo, ki je v preteklosti uspelo odigrati vidno vlogo pri razvoju in promociji stroke in poklica, ki ga je potrebno promovirati vsaki generaciji.

Da bi to zmogli tudi v času, ki prihaja in v katerem so, kot pravijo, spremembe edina stalnica v življenju človeka in stroke je potrebno spoštovati prednike in misliti na potomce!

Spoštovani!

Zato na svoj način in s svojimi prizadevanji gradimo naš čas in z našimi medčloveškimi odnosi dajemo vsebino in kakovost času, v katerem živimo. Saj podobne ptice letimo skupaj. Dobljena priznanja nam pri tem predstavljajo vzpodbudo in obvezo za nadaljne delovanje v korist nas vseh.

Hvala vam !«



Šaljivi kviz je poživil družabni del programa ob 31. skupščini SFD. Povezovala sta ga dr. Aleš Mlinarič in prof. dr. Samo Kreft, pobudnik tega dogodka.



V avli Avditorija so se spletale nove vezi in utrjevala stara znanstva.

DRUGI DAN SLOVENSКИH LEKARN 26. september 2006

organizator
Sekcija farmacevtov javnih lekarn pri SFD

26. septembra praznujemo Dan slovenskih lekarn. Ob tej priložnosti bo Slovensko farmacevtsko društvo pripravilo knjižico s koristnimi nasveti in informacijami o varni uporabi različnih farmacevtskih oblik:

za peroralno uporabo,
za uporabo na koži,
za rektalno in vaginalno uporabo,
za oko, nos in uho,
za inhaliranje.

Dolenjski farmacevti v Hemofarmu

Anka Bratož

Po lanski nepozabni ekskurziji v Sarajevo smo člani Dolenjske podružnice za letos izbrali Beograd in Vršac. Prijetno smo združili s koristnim in obiskali farmacevtski koncern Hemofarm.

Sprejela nas je direktorica Centra za PR ga. Gordana Lazić Velovan v avli, ki jo imenujejo Galerija Hemofarma in v kateri so dan prej odprli razstavo z imenom Pariz v Vršču. Razstavljene slike so umetnine največjih srbskih umetnikov, ki so živeli ali še živijo in delajo v Parizu.

Hemofarm je zelo uspešna srbska farmacevtska tovarna, ki je začela delati leta 1960 s 60 ljudmi in ima danes 3000 zaposlenih. Vsako leto 1. junija praznujejo Dan firme, ko povabijo svoje nekdanje sodelavce in nagradijo sodelavce za stalnost, to je za 10, 15, 20, 25, 30, 35 in 40 let dela. Letos so imeli tudi Dan odprtih vrat, ko je tovarno obiskalo nad 750 ljudi. Zelo so ponosni na poslovanje, lani so povečali izvoz za 42 %, njihove delnice stalno rastejo. V avgustu bodo odprli novo tovarno v Obninsku v Rusiji, s proizvodnjo trdnih oblik za respiratorne, kardiovaskularne in gastrointestinalne bolezni.

Po dobrodošlici smo si ogledali del skladišča in proizvodnje. O našem obisku je poročala osrednja lokalna televizija.

Popoldne smo si ogledali mesto Vršac, ki ima bogato kulturno in duhovno dediščino, večer pa preživeli na turistični kmetiji v vinorodni Gudurici ob dobri domači hrani in pijači in ob zvokih starogradskih pesmi. Naslednji dan smo spoznavali srbsko prestolnico, ki je pravo evropsko mesto, dan pa zaključili na znameniti Skadarliji v restavraciji Tri šešira.

Zadnji dan smo Beograd spoznavali z ladjice, ki nas je vozila po narasli Donavi in kljub deževnemu vremenu uživali na splavu na Savi, kjer smo imeli kosilo.

Trije dnevi preživeti v odličnem razpoloženju so nas napolnili z energijo, novimi prijateljstvi in nepozabnimi doživetji, za kar ima zasluge tudi naša vodička Marjana Antič.



Pred vhodom v podjetje

Sprejem v podjetju Hemofarm

