

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 1 • M A R E C 2 0 0 7 • L E T N I K 5 8

NAMESTO UVODNIKA

Pred 130 leti je znani ameriški novinar madžarskega rodu Joseph Pulitzer, po katerem se imenuje najprestižnejša nagrada v novinarskem svetu, zapisal takole: »Ni pomembno, kaj je kdo naredil, pomembno je, kako je tak dosežek predstavljen«.

Naj bo to uvod v prvo številko Farmaceutskega vestnika v letu 2007, ki se za širšo farmacevtsko stroko in ožje lekarniško področje ni dobro začelo. Desetletja so si pionirji slovenske farmacije (prof. Karba, prof. Bohinc, mag. Benkič, mag. Predin, mag. Žemva, prof. Korbarjeva, prof. Kozjek, prof. Krbavčič, mag. Dobrovoljc, doc. Činč, mag. Lešnjakova, mag. Brenčičeva in veliko ostalih, ki jih nisem imenoval, so pa bistveno zaznamovali razvoj farmacije v minulih 50-ih letih) prizadevali za umestitev slovenskih farmacevtov v prostor in čas. Iz relativne nerazpoznavnosti smo postali vidni, strokovno močni in vplivni na področju zdravstva in farmacije, enakovredni in komplementarni z zdravniki in ostalimi zdravstvenimi delavci. Naj citiram vizionarski stavek, ki ga je velikokrat izrekel pokojni prof. Karba: »Farmacevti moramo biti strokovno odlični in poklicno samozavestni zdravstveni delavci, ki popolnoma obvladujejo zdravilo v najširšem smislu, torej nekakšni gospodarji zdravila, tako, kot so zdravniki gospodarji zdravljenja«. Kako naj bi to dosegli? Z odličnim osnovnim znanjem, ki ga moramo neprestano nadgrajevati s strokovnim izobraževanjem, izven stroke pa delovati odločno in strokovno samozavestno!

Ali delujemo v tej smeri? Kje je naša odločnost in poklicna strokovna samozavest, beremo v dnevnem časopisju. Da ne omenjam sicer skrajno provokativne TV oddaje Tarča, pa informativne TV oddaje Odmevi, ko smo nekateri komajda krotili silno jezo in bes! Kaj je že rekel Pulitzer? Spoštovane kolegice in kolegi, slovenska farmacija je z omenjenimi dogodki prešla Rubikon! Nazorno smo pokazali vso negativno nprav, ki jo premoremo: navznoter, v stroki, smo levi, navzven pa nebojgljene, poslušne pridne miške! Ali je to odraz neznanja? Dvomim! Velikokrat sem se prepričal o izjemnem strokovnem in praktičnem znanju, ki ga imamo farmacevti, ne glede na vso širino multidisciplinarnosti, ki jo pokriva farmacevtska stroka. Zakaj si ne upamo tega pokazati širši strokovni in laični javnosti? Ali res ne znamo povedati, da bomo zaradi nepoznavanja in zanemarjanja neželenih učinkov zdravil bistveno vplivali na celokupno zdravstveno ekonomiko zaradi naknadnega zdravljenja nastalih poškodb? Ali ne znamo povedati, da bo zaradi nepoznavanja dobre distribucijske prakse medicinski povoj, ki ga bo kupec vzel iz nakupovalne police, neuporaben kot sterilni material za rane? In ko omenjam izobraževanja, ali se res zavedamo, kako pomembno je ohraniti in nadgrajevati znanja? Seveda imam pri tem v mislih naporan visoko strokovna izobraževanja in ne tistih »prijetnih«, ki jih je sicer malo, pa še ta mečejo slabo luč na celo stroko! In ne morem razumeti posameznikov, ki so visoko v hierarhiji slovenske farmacije, pa močno cincajo, ko je potrebno odšteti relativno majhna sredstva za izobraževanje, milijoni evrov, ki so ustvarjeni z marljivim delom farmacevtov in bi se lahko vrnili v stroko za izboljšanje strokovnega dela, pa poniknejo v druge sklade in za druge namene, izven stroke! Seveda se vsi izgovarjamo na pravila in zakone, kar zopet kaže na našo benignost pri umeščanju farmacevtov v prostor in čas.

Slovenska farmacija potrebuje strateški svet, sestavljen iz predstavnikov vseh področij, ki sodijo v farmacijo. Strateški svet mora delovati predvsem navzven in se nemudoma aktivirati ob vseh dogodkih, predvsem pa takih, ki mečejo slabo luč na stroko. V svetu ne sme biti tistih posameznikov, ki trošijo svojo energijo in moč ostalih za jalove bitke znotraj stroke. Fizikalni zakoni so univerzalni: energije ni neskončno, več, ko jo bomo potrošili za napenjanje mišic znotraj stroke, manj jo bo ostalo za delovanje izven stroke!

Dovolite mi, spoštovane kolegice in kolegi, da ta prispevek, ki nadomešča običajni uvodnik, končam z nekoliko zgodovinsko obrabljenim, a še vedno aktualnim geslom:

«Združimo sile, dokler jih še lahko!«

Prof.dr. Borut Štrukelj

Vsebina

Originalni znanstveni članki – Scientific articles

Klemen Španinger, Martina Fink

Cirkadialni ritem in kronomedicina
Circadian rhythm and chronomedicine

3

Odon Planinšek

Nekatere metode stabilizacije amorfnih učinkovin
Some stabilization methods of amorphous drugs

8

Ana Torkar, Julijana Kristl, Sudaxhina Murdan

Novosti o dostavljanju učinkovin v nohte
Novel methods in drug delivery to the nail

15

Raziskovalni članek – Research article

Polonca Ferik, Teja Čelhar, Ksenija Geršak

Genetika sindroma policističnih jajčnikov - vloga mikrosatelitskega polimorfizma (TAAAA)_n v genu *SHBG*
Genetics of polycystic ovary syndrome - a role of microsatellite polymorphism (TAAAA)_n in the *SHBG* gene

21

Zanimivosti iz stroke

Novice iz sveta farmacije

3. simpozij *Izzivi laboratorijske medicine*

10 let delovanja Komisije za slovenski dodatek k Evropski farmakopeji

30

Osebne vesti

V spomin mr. ph. Špelci Gizeli Rupnik, roj. Pokorn

31

Iz društvenega življenja

2. Dan slovenskih lekarn

Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov

32

Cirkadijalni ritem in kronomedicina

Circadian rhythm and chronomedicine

Klemen Španinger, Martina Fink

Povzetek Cirkadijalni ritem je vpleten v številne fiziološke procese. Sodeluje pri uravnavanju telesne temperature, krvnega tlaka, izočanju hormonov, itd.. Motnje v sinhronizaciji cirkadijalnega ritma preko inhibicije sinteze melatonina vplivajo na razvoj raka. Poznavanje cirkadijalnega ritma je pomembno tudi pri kronomedicini, katere namen je zagotoviti uspešno zdravljenje bolezni s kar najmanjšimi možnimi stranskimi učinki in s prilagajanjem časa aplikacije zdravila.

Ključne besede: cirkadijalni ritem, kronomedicina, rak, melatonin, fiziologija

Abstract Circadian rhythm participates in numerous physiological processes. It is involved in regulation of body temperature, blood pressure, secretion of hormones ect.. Disorders in synchronisation of circadian rhythm directly influences growth of cancer cells through inhibition of melatonin synthesis. Knowledge of circadian rhythm is important also in chronomedicine, which purpose is to assure successfulness of disease treatment with minimum side effects.

Key words: circadian rhythm, chronomedicine, cancer, melatonin, physiology

1 Biološki ritmi

Biološki ritmi so prisotni v večini živih organizmov ter jim zagotavljajo prilagajanja na vedno spreminjajoče se okolje. Te spremembe so: cirkadijalno nihanje svetlobe, temperature in drugih bioloških faktorjev, kot so dostopnost do hrane in odsotnost/prisotnost plenilcev (1). Biološki ritmi so zelo podobni ciklom narave, tako npr. menstrualni cikel sledi ciklu lune, ritem spanja, budnosti, lokomotorna aktivnost, nihanje telesne temperature, izločanje adrenokortikalnih hormonov sledijo 24-urnemu ritmu dneva in noči. Izločanje rastnih hormonov in cikel spanja se uravnava urno. Dihanje, srčni utrip in peristaltika imajo še hitrejšo frekvenco (sekunde in minute), možganski valovi in živčni impulzi pa delujejo v območju stotink oziroma desetink sekunde (1). V rastlinah podobna notranja ura uravnava dnevno nihanje fotosinteze (2).

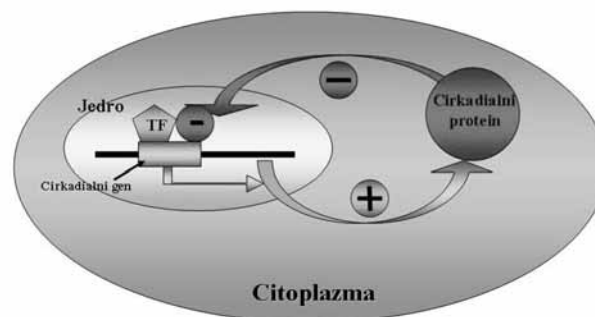
1.1 Cirkadijalni ritem

Od vseh bioloških ritmov je najbolj raziskan cirkadijalni ritem, ki ima periodo dolgo približno 1 dan in ima zelo velik vpliv na življenje skoraj vseh živih organizmov. Že ime *circa diem* (lat.) nam v prevodu pove, da perioda traja približno 24 ur. Cirkadijalni ritem je visoko evoliucijsko ohranjen in ga najdemo v že zelo preprostih organizmih, kot je gliva *Neurospora*, pri rastlinah in vinski mušici (*Drosophila melanogaster*), ter tudi pri evoliucijsko višje razvitih organizmih kot so sesalci.

Cirkadijalni ritem je fiziološko zelo pomemben, saj omogoča organizmu, da je podnevi v aktivni fazi, ponoči pa v stanju obnavljanja. To velja pri organizmih, ki so aktivni podnevi, pri nočnih pa je ritem obrnjen (3).

Danes je pri sesalcih znanih že več genov npr. *Clock*, *Bmal*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *ROR-α*, *Rev-α* in *Rev-β*, *DBP*, *Npas2...*, ki

sodelujejo pri uravnavanju cirkadijalnega ritma in so udeleženi v negativni povratni zanki regulacije cirkadijalnega ritma (slika 1). (4)



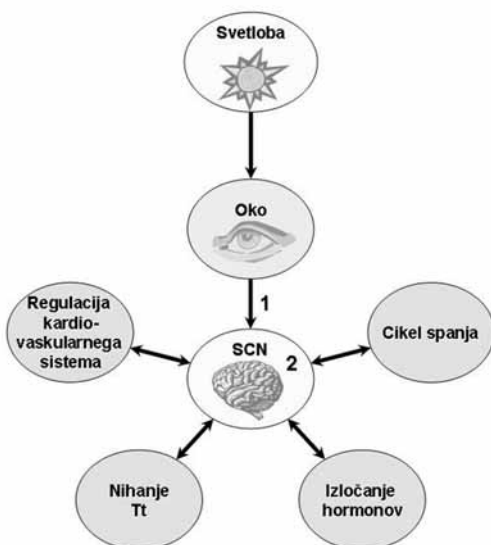
Slika 1: Osnovna shema cirkadijalne negativne povratne zanke. Ko pride do prepisovanja cirkadijalnih genov, se nastali cirkadijalni proteini iz citoplazme prenesejo v jedro, kjer se vežejo na promotorje ali pa vstopajo v interakcijo s transkripcijskimi faktorji (TF) in preprečijo njihovo vezavo na promotorje. S tem je prekinjeno prepisovanje genov in posledično sinteza cirkadijalnih proteinov. Prirejeno po Okamura, Yamaguchi.

Figure 1: Fundamental scheme of circadian negative feedback loop. Transcription of circadian genes leads to the circadian proteins, which are transferred into nuclei. In nuclei the circadian proteins bind to the promoters or interact with transcription factors and by this way prevent their binding to the promoter regions and by either way represses transcription of genes and consequently the synthesis of circadian proteins. Adapted by Okamura, Yamaguchi.



Slika 2: Glavne komponente molekularne ure. Ko zunanji dražljaji, ki predstavljajo vnos, po različnih poteh pripotujejo do centralnega vzodbujevalca, v našem primeru suprakiazmalnega jedra v možganih SCN, ta povzroči učinek, ki se kaže kot cirkadialno nihanje.

Figure 2: Main components of molecular clock. External stimuli, representing input, are by different ways transferred to the central pacemaker in the brain (in our case suprachiasmatic nuclei) leading to the effect or output, which is circadian oscillation.



Slika 3: Sesalski cirkadialni sistem; Cikel dneva in noči uravnava aktivnost glavnega vzodbujevalca, ki je v suprakiazmalnem jedru (SCN). Signal se prenaša v SCN preko očesne mrežnice in retino-hipotalamičnega trakta. SCN obdela vnešene signale in preko humoralnih in nevronskih poti uravnava periferne ure v perifernih tkivih (jetra, srce, itd.). Motnje se lahko pojavijo zaradi slepote (prekinjen je prenos signala z mrežnice v SCN - 1) ali pa zaradi mutacij cirkadialnih genov - 2. Tt-telesna temperatura.

Figure 3: Mammalian circadian system; Day and night cycles regulate activity of main pacemaker which is located in suprachiasmatic nuclei in the brain (SCN). Signal is transferred into SCN from retina by the retinal-hypothalamic system. SCN processes input signals and through humoral and neural paths regulates peripheral clocks in peripheral tissues. Disturbances can be caused because of blindness (there is no signal from retina into SCN - 1) or because of mutations in circadian genes - 2. Tt-body temperature.

1.2 Mehanizem cirkadialnega ritma

Molekularna ura je sestavljena iz treh komponent. Prva komponenta je vnos oziroma *input*. Ta povezuje notranji cikel z zunanjimi spremembami, kot so nihanja dneva in noči in nihanja v temperaturi. Druga je avtonomni *vzodbujevalec*. To je skupek celic, ki ohranjajo cirkadialno nihanje. Pri sesalcih je to suprakiazmalno jedro v možganih (SCN). Zadnja, tretja komponenta pa je učinek oziroma *output*. Ta komponenta prenese nihanje (*vzodbujevalca*) do perifernih tkiv preko sekundarnih oscilatorjev (slika 2). (2)

Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na delovanje SCN v živalih, je svetloba (slika 3). (3)

1.3 Pomen cirkadialnega ritma za življenje ljudi

Statistično se spontani porodi najpogosteje pričnejo po polnoči, sami porodi pa so najpogostejši dopoldne ali zgodaj popoldne. Kardiovaskularne, nevrološke in respiratorne težave imajo maksimum pojavljanja zjutraj. Popoldne pa je največ nesreč in zastrupitev. Če opravljamo nočno delo, imamo težave s spanjem, prebavili, plodnostjo in kardiovaskularnim sistemom. (5)

Ker je zjutraj krvni tlak najvišji, prav tako pa tudi koncentracije adrenalina, kortizona in testosterona, se večina kardiovaskularnih težav pojavi zjutraj. Ponoči se, zaradi zmanjšane izločanja noradrenalina ter povečanega izločanja citokinov ter posledično povečanja odziva zračnih poti, stanje astme poslabša. Zaradi povečane koncentracije citokinov so bolečine v sklepih najhujše zjutraj. Količine glukoze, insulina in leptina so visoke zjutraj, ponoči pa so zaradi nehranjenja nizke. Potenje in povišana telesna temperatura sta pri bolnikih obolelih za AIDS-om najvišji zvečer. (6)

Pomembno je tudi vedenje, da se naše psihofizične sposobnosti spreminjajo v teku dneva. Poznavanje optimalnega dnevnega časa, ko so naše psihofizične sposobnosti najvišje, je pomembno tudi pri načrtovanju delovnega časa, pri načrtovanju študija, preverjanja znanja, pa tudi pri načrtovanju športnih tekmovanj in treningov in ne samo pri aplikaciji zdravilnih učinkovin.

1.4 Motnje v cirkadialnem ritmu

Do motenj cirkadialnega ritma pride pri dolgih transmeridialnih letih (jet lag) in pri delavcih, ki delajo ponoči. Prav tako pa imajo porušen cirkadialni ritem tudi starostniki. Cirkadialni ritem je moten tudi pri nekaterih boleznih, kot so motnje spanja, Alzheimerjeva bolezen in različne oblike rakavih obolenj.

Mutacije v nekaterih cirkadialnih genih se izražajo kot različna bolezenska stanja. Posledično lahko mutacije genov povzročijo težave spanja, metabolizma in razvoj raka. Na nivoju celice so pomembne mutacije genov, ki sodelujejo pri cirkadialnem nihanju npr. *Clock* in *Per*. Polimorfizem v genu *Per3* je bil povezan z zgodnjo pojavnostjo raka na dojkah, zasvojenostjo z alkoholom, kokainom in drugimi poživili. Motnje v uravnavanju genov *Per1*, *Per2* in *Per3* so ugotovili v rakavih celicah. Homozigotne miši z izničnim genom *Clock* razvijejo metabolični sindrom (debelost, hiperlipidemija, hipoinzulemija, hiperglicemija). Mutacije cirkadialnih genov se povezujejo tudi z depresijo in nespečnostjo. Mutacija gena *Per2* je

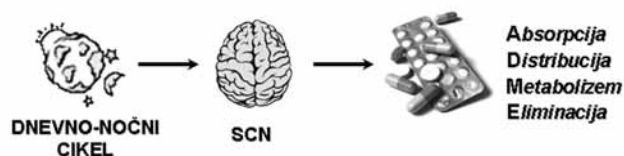
povezana z zmanjšanim izražanjem glutamatnega transporterja, kar lahko povzroči povečan vnos alkohola ter manično depresijo. (6)

2 Kronoterapija

Kronoterapija temelji na opažanju, da je metabolizem zdravilnih učinkovin podvržen cirkadijalnemu ritmu. Znano je, da se jedrna receptorja CAR (konstitutivni androstenski receptor) in PPAR α (s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor α) izražata cirkadijalno (7). CAR in PPAR α sta transkripcijska faktorja, ki uravnavata tudi izražanje citokromov P450. Večina zdravilnih učinkovin je podvržena učinku prvega prehoda, pri kateri ima pomembno vlogo razgradnja zdravilnih učinkovin. To pa večinoma poteče preko citokromov P450 v jetrih. Zato naj bi se zdravilne učinkovine aplicirale takrat, ko je izražanje citokromov P450 najnižje. Pri predzdravilih (ang. prodrug), pa ko je izražanje največje, saj se njihova aktivna oblika sprosti s pomočjo metabolizma. Podobno se že sedaj aplicirajo zdravilne učinkovine za zmanjševanje koncentracije holesterola zvečer, ker je sinteza holesterola dokazano podvržena cirkadijalnemu ritmu in je delovanje statinov najučinkovitejše ponoči. (8)

Kronofarmakokinetika raziskuje A(absorpcijo), D(distribucijo), M(metabolizem) in E(eliminacijo) kronoterapevtikov. Učinek zdravilne učinkovine se pogosto spreminja glede na časovne spremembe organizma na celičnem nivoju. Poleg poznavanja učinkov zdravilnih učinkovin, ki se čez dan lahko razlikujejo, je pomembno tudi poznavanje vpliva zdravilne učinkovine na biološke ritme organizma. (9)

Celotni sistem ADME je pod vplivom cirkadijalnega nihanja. Absorpcija je odvisna od pH-ja v želodcu in dvanajstniku, pretoka krvi, izločanja žolča, itd., ki nihajo cirkadijalno. Želodčni pH se spreminja tekom dneva, zjutraj je pH manj kisel, zvečer pa bolj kisel, s čimer se lahko spremeni raztapljanje gastrorezistentnih farmacevtskih oblik. Metabolizem v jetrih je prav tako podvržen cirkadijalnemu nihanju. Sekretacija zdravilnih učinkovin z urinom, je



Slika 4: Vpliv cirkadijalnega ritma na sistem ADME; zaradi dnevno-nočnega nihanja, niha tudi centralni vzpodbujevalec (SCN). Ta prenaša signale do perifernih tkiv, kot so želodec, jetra, ledvica ter tako vpliva na stopnjo absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije.

Figure 4: Influence of circadian rhythm to the ADME system. Oscillations of day and night lead to the oscillations of central pacemaker (SCN). SCN transfers circadian signals to the peripheral tissues (liver, stomach, kidney...) and by this way affect the level of drug absorption, distribution, metabolism and elimination.

odvisna od perfuzije ledvic, glomerularne filtracije in pH urina, ki tudi cirkadijalno nihajo. (5)

Pri kronomedicini je potrebno upoštevati tudi individualne razlike cirkadijalnega ritma med bolniki. Tako pri "nočnih ljudeh" lahko aplikacija zjutraj pomeni ob 9 uri zjutraj, pri "jutranjih ljudeh" pa ob 6 uri zjutraj. (5)

2.1 Zdravljenje bolezni in cirkadijalni ritem

Biološki ritmi vplivajo na razvoj bolezni. Pomembno pa je tudi vedeti, da aplikacija zdravila ob določenem času vpliva na učinkovitost zdravilnih učinkovin.

Če zdravilno učinkovino apliciramo v najbolj primernem času, je potrebna za doseg optimalnega terapevtskega učinka manjši

Tabela 1: Prikaz bolezenskih stanj in zapletov ter priporočljivi intervali zdravljenja glede na pojavnost simptomov

Tabele 1: Diseases and diseases complications and recommended intervals of treatment.

PATOLOGIJA	CIRKADIALNO OBNAŠANJE	ZDRAVILNA UČINKOVINA	APLIKACIJA
Agregacija trombocitov	Povečana zgodaj zjutraj	Antitrombotiki	Zjutraj
Alergijski rinitis	Simptomi se poslabšajo zjutraj	H1 antagonisti	Zvečer
Arterijski krvni tlak	Maksimum zjutraj	Antihipertenzivi	S podaljšanim sproščanjem zvečer
Astma	Simptomi imajo maksimum zjutraj, največja obstrukcija dihal ponoči	β -agonisti Kortikosteroidi	Zvečer Zjutraj
Rak	Proliferacija rakavih celic, ko je mitotična normalnih celic majhna		Odvisno od zdravila
Kardiovaskularni zapleti	Incidence angine pektoris, miokardnega infarkta in trombotične kapi so največje takoj po zburjanju	Nitro glicerinski obliži	Aplikacija zvečer in odstranitev zjutraj
Gastrični sistem, težave z želodcem	Izločanje želodčne kisline je največje zgodaj zjutraj	H2 antagonisti	Zvečer
Osteoartritis	Močnejše bolečine zjutraj	NSAID	Opoldne
Revmatoidni artritis	Močnejše bolečine zvečer	NSAID	Zvečer
Diabetes	Maksimum zvečer	Inzulini	Zvečer

odmerek. S tem se zmanjša verjetnost neželenih stranskih učinkov, prav tako pa se zmanjša tudi poraba zdravilnih učinkovin in s tem cena terapije. (5)

Kardiovaskularne bolezni, stabilna angina pectoris in srčni infarkti imajo izrazito cirkadialno nihanje z večjo pojavnostjo v jutranjih urah. Težave zaradi nestabilne angine pectoris se najpogosteje pojavijo ponoči med spanjem. (10) Bolniki z nestabilno angino pectoris naj bi si aplicirali nitroglicerinski obliž zvečer pred spanjem in ga zjutraj odstranili. Povišana pojavnost kardiovaskularnih zapletov v jutranjih urah, je povezana z jutranjim povišanjem koncentracij kateholaminov, simpatično aktivnostjo, srčnim utripom, agregacijo trombocitov, povečano viskoznostjo krvi, zmanjšano vagalno aktivnostjo in fibrinolitično aktivnostjo. Prav zato je priporočljivo jemati inhibitorje agregacije trombocitov (ASA) v jutranjih urah. Aplikacija dolgo delujočih beta blokatorjev zvečer pomaga zmanjšati incidenco srčne ishemije, ki se lahko pojavi v jutranjih urah. (11) Ker krvni tlak v jutranjih urah hitro naraste in s tem verjetnost kardiovaskularnih zapletov, bi bila aplikacija antihipertenzivov smiselna zvečer, vendar pa je težko zagotoviti normotenzijo med spanjem. To se poskuša zagotavljati z novo generacijo zdravil s podaljšanim sproščanjem. (5)

Cirkadialno nihanje kažejo tudi astmatični napadi ter alergijski rinitis. Najpogosteje se motnje dihanja pri pacientih z astmo pojavijo ponoči, pri pacientih z alergijskim rinitisom pa zjutraj. (12) Aplikacija večje koncentracije teofilina ponoči in manjše zjutraj ter administracija 2/3 doze kortikosteroidov zjutraj in 1/3 zvečer zmanjša verjetnost pojavljanja napadov astme pri teh bolnikih.

Izločanje želodčne kisline prav tako sledi cirkadialnemu nihanju z maksimumom zjutraj. Tako je pri bolnikih z duodenalnim ulkusom aplikacija histaminskih II antagonistov priporočljiva v jutranjih urah. (5)

Rakave celice izkazujejo cirkadialno periodičnost, ki se razlikuje od normalnih celic. Njihov cikel deljenja je manjši, zato naj bi se kemoterapevtiki aplicirali, ko je rast normalnih celic majhna, rast rakavih celic pa velika. S tem se poveča uspešnost kemoterapije in zmanjšajo neželeni učinki. (5, 13)

Kot že vsa zgoraj omenjena bolezenska stanja, tudi bolečine v sklepih pri revmatoidnem artritisu kažejo cirkadialno nihanje. Najmočnejše so v jutranjih urah, ko naj bi bila sekrecija citokinov in melatonina najvišja (proinflammatory delovanje), sekrecija kortizola, ki ima antiinflammatory delovanje, pa najnižja. (6)

3 Nočno delo, cirkadialni ritem in rak

Izmensko nočno delo vpliva na človeka na dveh nivojih. Prvič vpliva na zdravje in dobro počutje posameznika in drugič na zdravje drugih (družina, nesreče, itd), pa tudi delovna storilnost ponoči je manjša. Najpogostejše klinične težave pri ljudeh, ki delajo v nočni izmeni, so: nezmožnost spanja, skrajšan časovni interval spanja, prebavne motnje, kardiovaskularne težave, povečana verjetnost spontanega splava, prezgodnjega poroda in raka na dojkah. Slednji naj bi bil posledica izpostavljenosti delavk umetni svetlobi. Ljudje, ki delajo ponoči, pogosteje obiskujejo zdravnike in jemljejo zdravila, ki bodisi olajšajo spanje ali pa omogočajo budnost. (6)

Nočni delavci, ki so izpostavljeni umetni svetlobi ponoči (SP), imajo višjo incidenco raka na dojkah, na prostati in kolorektalnega raka. Eden od vzrokov je lahko zmanjšana sinteza melatonina. Samo izražanje melatonina je največje v jutranjih urah. Ob izpostavitvi mrežnice svetlobi se ta ustavi. Melatonin deluje kot supresor rasti rakavih celic. Minimalna količina svetlobe, ki ustavi sintezo melatonina pri podganah, je 0,2 lx (luks), kar je dvakratna intenziteta svetlobe polne lune. Najbolj problematična je modra svetloba, ki jo oddajajo tudi moderne žarnice v delovnih prostorih in žarnice, ki osvetljujejo objekte, reklamne panoje, itd. (14)

Najbolj občutljive za modro svetlobo so ganglijske mrežne celice (RGC), kontrolirajo človeški cirkadialni ritem tako, da pošiljajo signale po aksonih do SCN-a in s tem vplivajo na uravnavanje telesne temperature, izočasne hormonov, spanje in produkcijo melatonina. (14)

Epidemiološke študije nočnih delavk kažejo na povečan odstotek pojavnosti raka na dojkah. Študije so to pokazale pri delavkah v gostinstvu, stevardesah in bolnišničnih sestrah. Nočne delavke imajo tudi večjo verjetnost zapletov pri porodu, kot so spontani splav, premajhna teža novorojenčkov in zmanjšana plodnost. Podobno so študije pokazale povečano pojavnost raka na prostati pri pilotih, gasilcih, zdravnikih in policistih. (15)

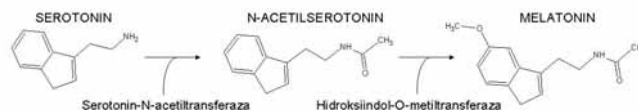
Slepe ženske, ki ne zaznavajo svetlobe, ki bi vplivala na sintezo melatonina, imajo nižjo pojavnost raka na dojkah, kot njihove vrstnice, ki zaznavajo vsaj del svetlobe (16). Stopnja pojavnosti raka je višja v industrializiranih državah, kjer je stopnja nočne osvetljenosti večja, kot v državah v razvoju. Ti dve trditvi lahko podpirata melatoninso hipotezo, ki je opisana v nadaljevanju. (14)

3.1 Melatonin in rak na dojkah

Melatonin deluje antioksidativno in antikancerogeno. Njegova sinteza je cirkadialno uravnavana. Normalno se melatonin sintetizira ponoči, najvišje vrednosti so dosežene med 2 in 4 uro zjutraj. Izločanje in sinteza melatonina prenehata, ko svetloba prekine temo. (14)

Najboljši način, da je naš cirkadialni ritem uravnan in, da telo sintetizira zadostno količino vitamina D, je vsaj 15 minutna jutranja izpostavljenost sončni svetlobi, saj ima vitamin D tudi antiproliferativne učinke na rakave celice. (17) Ponoči pa naj bi spali v popolni temi. (18)

Notranja ura mora biti sinhronizirana s solarnim dnem. To se doseže s tako imenovanimi »zeitgebrer«. "Zeitgeber" je izraz, ki pomeni dajalec časa, to je dejavnik, ki definira čas v organizmu. Za človeka je najpomembnejši dajalec časa dnevno-nočni cikel ter s tem posledično ciklično izločanje melatonina iz češerike v krvni obtok med temno fazo. Melatonin povzroči vazodilatacijo in s tem poveča oddajanje toplote. V



Slika 5: Sinteza melatonina iz serotonina v češeriki

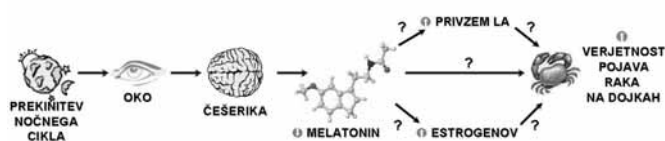
Figure 5: Synthesis of melatonin from serotonin in the pineal gland.

večernih urah temperatura pade zaradi povečane koncentracije melatonina, ter umirivite organizma. (19)

Melatoninska hipoteza govori o tem, da pojavnost raka na dojkah narašča v razvitih industrijskih državah zaradi umetne razsvetljave, ki povzroči zmanjšano sintezo melatonina. Zmanjšana sinteza melatonina naj bi povečala sintezo estrogenov, ki pa delujejo prokancerogeno. S tem se poveča verjetnost pojavnosti raka na dojkah.

Melatonin sodeluje v imunskem sistemu in preprečuje poškodbe DNA. Poškodovana DNA lahko mutira in s tem povzroči nastanek raka. Poleg tega melatonin sodeluje še v regulaciji cirkadialnega ritma metabolizma celic.

Melatonin inhibira privzem linolne kisline, ki je povezana z rakom na dojkah. Ta funkcija je izničena, če je organizem izpostavljen svetlobi ponoči. Poleg izpostavljenosti svetlobi, bi bile lahko vzrok za večjo incidenco raka na dojkah pri delavkah, ki delajo ponoči, tudi spremenjene prehrabne navade. Te so odločilne pri povečanem vnosu linolne kisline. (20)



Slika 6: Melatoninska hipoteza; zaradi prekinitve nočnega cikla med spanjem, ko svetloba pade na očesno mrežnico, se sinteza melatonina v češeriki zmanjša. Posledično naj bi se povečala sinteza estrogenov, ki delujejo prokancerogeno. Prav tako se poveča privzem linolne kisline, ki je povezana z rakom na dojkah.

Figure 6: Melatonin hypothesis; Interruption of night cycle during sleep, when light is hitting retina, the synthesis of melatonin in pineal gland is reduced, leading to the induced synthesis of estrogens, that act pro-cancerogenic. Adoption of linolic acid is also induced. Higher levels of linolic acid are related to breast cancer.

Povečana incidenca za raka na dojkah je opažena tudi pri ženskah, ki med periodo, ko se izloča melatonin, niso redno spale. Pri delavkah, ki so delale ponoči, se je verjetnost za pojav raka na dojkah povečevala z delovno dobo. (15)

4 Sklep

Raziskave na področju cirkadialnega ritma postajajo vse bolj pomembne saj je dokazano, da cirkadialni ritem vpliva na razvoj bolezni (rakava obolenja), na fizično in psihično sposobnost posameznikov, kar je pomembno predvsem pri športnikih in študentih. Pomembna veja raziskav je tudi kronomedicina, s katero poizkušamo doseči optimalno zdravljenje določene bolezni pri posameznikih. S tem se pogostnost neželenih učinkov in poraba zdravilnih učinkovin zmanjša.

Literatura

- Moser M, Fruhwirth M, Penter R et al. Why life oscillates--from a topographical towards a functional chronobiology. *Cancer Causes Control* 2006; 17(4): 591-599.
- Sassonecorsi P. Molecular clocks: Mastering time by gene regulation. *Nature* 1998; 392(6679): 871-874.
- Canaple L, Kakizawa T, Laudet V. The days and nights of cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7545-7552.
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1): 47-56.
- Turkoski BB. Medication timing for the elderly: the impact of biorhythms on effectiveness. *Geriatr Nurs* 1998; 19(3): 146-151.
- Klerman EB. Clinical aspects of human circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 2005; 20(4): 375-386.
- Lee SM, Hong Nga NT, Park MH et al. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF- κ B activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 320(4): 1087-1095.
- Hollister. Diurnal variation of serum lipids. *J Atheroscler Res* 1965; 5(5): 445-450.
- Wasielewski JA, Holloway FA. Alcohol's interactions with circadian rhythms. A focus on body temperature. *Alcohol Res Health* 2001; 25(2): 94-100.
- Pepine CJ. Circadian variations in myocardial ischemia. Implications for management. *Jama* 1991; 265(3): 386-390.
- Sandrone G, Mortara A, Torzillo D et al. Effects of beta blockers (atenolol or metoprolol) on heart rate variability after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1994; 74(4): 340-345.
- Pincus DJ, Beam WR, Martin RJ. Chronobiology and chronotherapy of asthma. *Clin Chest Med* 1995; 16(4): 699-713.
- Hrushesky WJ. Cancer chronotherapy: is there a right time in the day to treat? *J Infus Chemother* 1995; 5(1): 38-43.
- Pauley SM. Lighting for the human circadian clock: recent research indicates that lighting has become a public health issue. *Med Hypotheses* 2004; 63(4): 588-596.
- Davis SM, Mirick DK. Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control* 2006; 17(4): 539-545.
- Coleman MP, Reiter RJ. Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur J Cancer* 1992; 28(2-3): 501-503.
- Bouillon R, Eelen G, Verlinden L et al. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102(1-5): 156-162.
- Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC et al. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 2002; 112(8): 659-662.
- Waterhouse J, Reilly TE, Edwards B. The stress of travel. *J Sports Sci* 2004; 22(10): 946-965; discussion 965-966.
- Figueiro MG, Rea MS, Bullough JD. Does architectural lighting contribute to breast cancer? *J Carcinog* 2006; 5: 1-20.

Nekatere metode stabilizacije amorfnih učinkovin

Some stabilization methods of amorphous drugs

Odon Planinšek

Povzetek Poznamo veliko metod za amorfizacijo zdravilnih učinkovin. Najpogosteje uporabljamo mletje, liofilizacijo, sušenje z razprševanjem in hitro ohladitev taline. S temi postopki želimo predvsem povečati neravnotežno topnost in hitrost raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin in tako povečati njihovo biološko uporabnost. Amorfna oblika spojine je termodinamično nestabilna in jo moramo največkrat stabilizirati. V ta namen jo lahko hranimo pri nižji temperaturi, vsaj 50°C pod temperaturo steklastega prehoda (T_g), kar je uporabno le za spojine, ki imajo T_g nad 80°C. Iste tehnike kot za izdelavo amorfni učinkovin uporabljamo tudi za njihovo stabilizacijo tako, da dodamo pomožne snovi in izdelamo trdne disperzije, ki z učinkovino tvorijo fizikalne in kemijske vezi ali pa delujejo protimehčalno.

Ključne besede: amorfne zdravilne učinkovine, stabilizacija amorfni učinkovin, izboljšanje biološke uporabnosti

Abstract Many methods for preparation of amorphous drug are known. Milling, lyophilization, spray drying and melt quenching are used for this purpose. Using these procedures dynamic solubility and dissolution rate can be altered to improve bioavailability of an insoluble drug. Amorphous drug is thermodynamically unstable and it has to be stabilized in most cases. For this purpose it can be stored at lowered temperature at least 50°C below glass transition temperature (T_g), what is useful only for substances with T_g above 80°C. Identical methods as for preparation of amorphous drugs can be used for their stabilization. Excipients are added with the purpose to prepare solid dispersions that interact physically or chemically with the drug or have anti-plasticising effect.

Key words: Amorphous drugs, stabilization of amorphous drugs, bioavailability improvement

1 Uvod

Pred tremi leti je bil v tej reviji objavljen članek o načinih izdelave amorfni oblik spojin (1), tokrat pa obravnavamo metode za njihovo stabilizacijo, ki omogočajo izdelavo zdravila z ustreznim rokom uporabe. Zaradi nižje termodinamične stabilnosti amorfne snovi kristalizirajo. Od hitrosti te pretvorbe je odvisno, ali je potrebno amorfno strukturo stabilizirati. Poznavanje lastnosti amorfne oblike učinkovin in pomožnih snovi je pomembno predvsem zaradi uporabnih lastnosti (višja neravnotežna topnost, hitrejše raztapljanje), pogoste pojavnosti in fizikalnokemijske nestabilnosti v primerjavi s kristalno obliko. Amorfno trdno snov lahko definiramo v primerjavi s kristalno obliko. Amorfne snovi so lahko enako kot kristalne urejene na kratkih razdaljah (v odnosu do sosednjih molekul), na daljših razdaljah pa te urejenosti ni. Do tega pride pri molekulah, ki so konformacijsko dovolj fleksibilne. Ker zdravilne učinkovine in farmacevtske pomožne snovi večinoma ustrezajo temu pogoju, je pojavnost amorfov v farmaciji zelo pogosta (npr. sladkorji, peptidi, beljakovine, drugi polimeri in učinkovine). Praktično uporabnost amorfne učinkovine izkoriščamo predvsem, kadar je topnost kristalne oblike dovolj nizka. Tako lahko pričakujemo veliko izboljšanje biološke uporabnosti učinkovine, katere topnost v kristalni obliki znaša do 1mg/L.

2 Metode izdelave amorfni oblik spojin

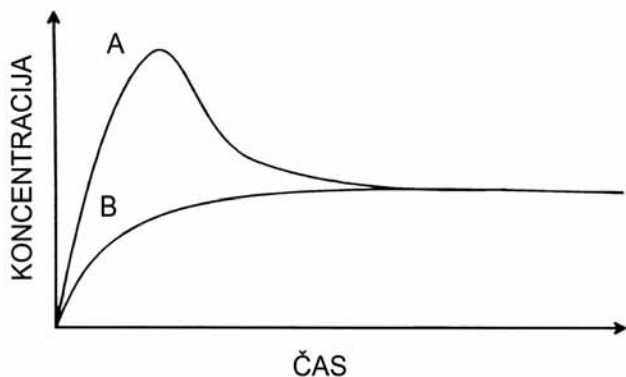
Najbolj znani načini priprave amorfni oblik spojin so hitra ohladitev taline, hitro obarjanje z dodatkom netopila, sušenje z zamrzovanjem,

sušenje z razprševanjem in dodatek nečistot (3-6). V procesih, pri katerih prihaja do mehanske ali kemijske aktivacije (mletje, vlažno granuliranje), lahko pride do popolne ali delne amorfizacije vzorca. Amorfne snovi lahko nastanejo tudi v trdnih disperzijah. Dehidracija kristalnih hidratov je eleganten način priprave amorfni oblik spojin. Saleki-Gerhardt in sodelavci so pokazali, da segrevanje rafinoze pentahidrata pri 60°C v vakuumu povzroči nastanek amorfne oblike, identične tisti, ki jo dobimo s sušenjem z zamrzovanjem (7). Li je ugotovil, da postane karbamazepin dihidrat amorfen ob sušenju pri 45°C v dušikovi atmosferi (8).

3 Uporabnost amorfni oblik spojin

Najpomembnejša lastnost amorfni učinkovin je njihova povečana neravnotežna topnost in hitrost raztapljanja, kar omogoča povečanje biološke uporabnosti v vodi težko topni spojin. S termodinamičnega ali kemijskega stališča je topnost spojine pri določenem tlaku, temperaturi in volumnu samo ena. Vrednost je definirana kot nasičena koncentracija spojine v raztopini, ko je v ravnovesju z najbolj stabilno kristalno obliko. V primeru, ko je ta koncentracija povišana, govorimo o metastabilni ali dinamični neravnotežni topnosti, ki po določenem času pade na ravnotežno vrednost (Slika 1) (9).

Na odstopanje od termodinamične ravnotežne topnosti lahko vplivajo nečistote, dodatek ionov, velikost delcev in kristalna oblika.



Slika 1: Raztapljanje amorfne (A) in kristalne oblike (B) učinkovine.

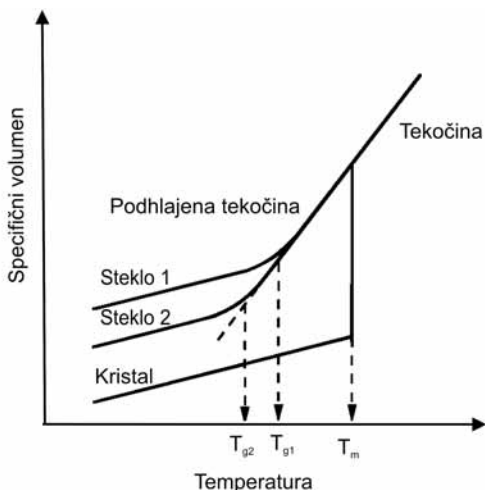
Figure 1: Dissolution of amorphous (A) and crystalline form (B) of a drug.

4 Stabilizacija amorfnosti

Neurejeno amorfnost stabiliziramo s hitrim sušenjem raztopine, ohlajanjem in/ali z dodatkom stabilizirajočih snovi, s katerimi preprečimo gibanje molekul, ki bi lahko povzročile nestabilnost v času uporabe zdravila.

4.1 Pravilo T_g-50K

Amorfnost spojine oziroma steklo pogosto izdelamo s hitro ohlajitvijo taline. Nad temperaturo tališča T_m so molekule neurejene in zelo gibljive. Pri ohlajanju se spojina lahko obnaša na dva načina. V prvem primeru se pri dovolj počasnem ohlajanju tekoče stanje pretvori v kristalno. Eksotermna reakcija kristalizacije vodi v nenadno spremembo specifičnega volumna in entalpije (Slika 2). Pod tališčem je z zniževanjem temperature zmanjševanje teh dveh



Slika 2: Shema odvisnosti specifičnega volumna od temperature pri tekočinah, ki lahko kristalizirajo in tvorijo steklo (10).

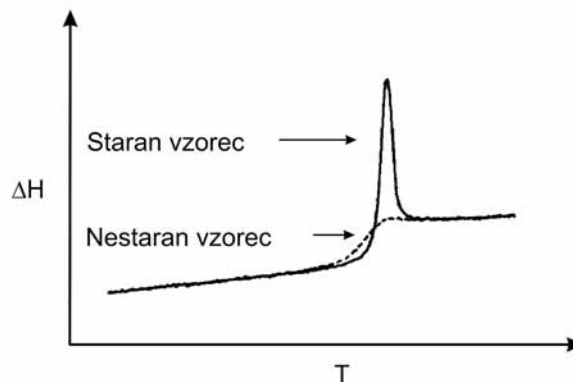
Figure 2: Schematic representation of the specific volume as a function of temperature for a liquids which can both crystallize and form a glass (10).

parametrov majhno. V drugem primeru se lahko s hitrim ohlajanjem izognemo kristalizaciji. Pri T_m v tem primeru ne pride do odmika od premice v diagramu volumen (entalpija) v odvisnosti od temperature. Pri nadaljnjem ohlajanju podhlajene tekočine narašča viskoznost. Molekule se gibljejo vedno manj tako, da se pri nadaljnjem ohlajanju več ne morejo preurejati. Temperaturno območje, kjer ravnotežje sistema izgine, imenujemo temperaturo steklastega prehoda. Pod to temperaturo je gibanje molekul zelo omejeno in govorimo steklastem stanju (1).

Stekla so tekočine, zamrznjene v času, ko izvajamo njihovo vrednotenje (eksperiment). Čeprav so s termodinamičnega stališča nestabilne, so lahko s kinetičnega stališča stabilne toliko časa, da lahko to izkoriščamo tudi v farmaciji. Kot je prikazano na sliki 2, obstaja več steklastih stanj in njihove lastnosti so odvisne od tega, kako jih pridobimo. Pri nižji hitrosti ohlajanja ostane vzorec v podhlajenem stanju do nižje temperature, medtem ko se pri višji hitrosti ohlajanja ravnotežje ohranja do višje temperature. Steklo 2 na sliki 2 je bilo pridobljeno pri nižji hitrosti ohlajanja od stekla 1. Sprememba hitrosti ohlajanja za desetkrat povzroči spremembo T_g za 3-5 K (10).

Medtem ko so amorfnosti pod temperaturo steklastega prehoda (T_g) relativno stabilne, so nad njo občutljive na mehanske in termične obremenitve, kar vpliva na njihove fizikalno-mehanske lastnosti. Mnoge imajo T_g nad sobno temperaturo, pri večini pa prisotnost ostankov topil oziroma relativna vlaga deluje mehčalno in vpliva na nestabilnost tudi pri nižji temperaturi od sobne. Znano je, da temperatura steklastega prehoda (T_g) ni dovolj dober indikator meje, pod katero molekule niso mobilne. Pod to temperaturo se molekule še vedno lahko dovolj gibljejo tako, da se s staranjem amorfnosti vzorec spreminja.

Pojav je značilen tako za polimerne kot tudi za majhne molekule, ki tvorijo stekla. Kako hitro potekajo te spremembe, opredeljujemo z računanjem konstante molekulske relaksacije (τ), ki je uporaben parameter za napovedovanje temperature shranjevanja amorfnosti vzorca. Ta časovna konstanta predstavlja povprečen čas za molekularni premik v vzorcu in jo lahko izračunamo z merjenjem entalpije relaksacije.



Slika 3: DSC krivulji staranega in nestaranega amorfnosti vzorca.

Figure 3: DSC scans of aged and nonaged amorphous samples.

Pri temperaturi pod T_g lahko prihaja do strukturnih sprememb ter znižanja specifičnega volumna in entalpije, kar imenujemo fizikalno staranje vzorca. DSC (diferenčna dinamična kalorimetrija) krivulja na sliki 3 prikazuje prisotnost endotermnega vrha katerega položaj in velikost sta odvisna od temperature in časa staranja vzorca. Daljši čas staranja omogoča večjo relaksacijo vzorca. Za vsako temperaturo, pri kateri shranjujemo amorfni vzorec (T_a), obstaja maksimalna entalpija relaksacije (ΔH_{∞}), katere vrednost pada z nižanjem temperature shranjevanja vzorca in jo opredelimo z naslednjo enačbo (11):

$$\Delta H_{\infty} = \lim_{t_a \rightarrow \infty} \Delta H_{t_a} = H(T_a, 0) - H_{\infty}(T_a) \quad (1)$$

$H(T_a, 0)$ in $H_{\infty}(T_a)$ sta entalpiji na začetku staranja (0) in po določenem času (a). V farmacevtski literaturi uporabljajo za izračun maksimalne entalpije relaksacije predvsem naslednjo enačbo (10-12)

$$\Delta H_{\infty} = (T_g - T) \Delta C_p \quad (2)$$

T = eksperimentalna temperatura

ΔC_p = sprememba toplotne kapacitete pri T_g

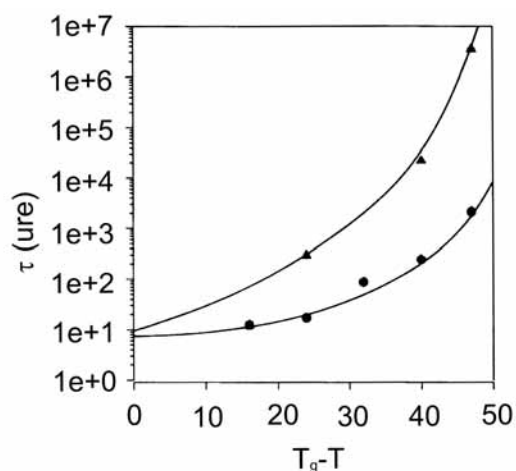
S poznavanjem ΔH_{∞} lahko izračunamo obseg deleža relaksacije v vzorcu (Φ_t) po določenem času hranjenja pri določeni temperaturi T :

$$\Phi_t = 1 - (\Delta H_t / \Delta H_{\infty}) \quad (3),$$

pri čemer je ΔH_t izmerjena entalpija prehoda pri teh pogojih. Ta podatek nato uporabimo za izračun vrednosti τ . Predpostavimo, da v vzorcu obstaja več relaksacijskih procesov s porazdelitvijo relaksacijskega časa tako, da predstavlja τ povprečno vrednost vseh gibanj in ga izračunamo iz naslednje enačbe:

$$\Phi_t = \exp(-t / \tau)^{\beta} \quad (4),$$

pri čemer je β porazdelitveni parameter relaksacijskega časa in znaša med 0 in 1. Enačbo 3 lahko rešujemo z uporabo različnih matematičnih pristopov obdelave eksperimentalnih rezultatov ter tako izračunamo τ in β . Parameter τ lahko podamo kot njegovo porazdelitev v odvisnosti od ($T_g - T$) (Slika 2) (12).



Slika 4: Konstanta molekulske relaksacije dveh modelnih učinkovin v odvisnosti od $T_g - T$ (12).

Figure 4: Relaxation time parameter of two model drugs with scaled temperature $T_g - T$ (12).

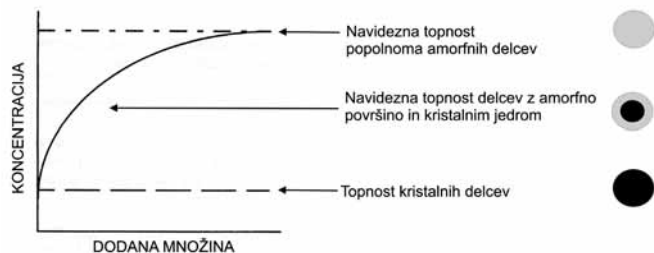
Eksperimentalna merjenja so pokazala, da lahko za določitev ničelne mobilnosti v mnogih primerih uporabimo tudi pravilo $T_g - 50$ (12). To pravilo lahko uporabimo pri večini učinkovin in organskih polimerov, ki jih uporabljamo v farmaciji, oziroma pri sistemih, ki jih opredeljujemo kot krhke. Zaradi šibkih neusmerjenih nekovalentnih interakcij med molekulami teh spojin je sprememba specifične toplote pri T_g velika in jo lahko s termično analizo relativno enostavno določimo. Pri čvrstih steklih (npr. SiO_2), pri katerih je sprememba mobilnosti molekul med steklastim prehodom majhna (s tem tudi majhna sprememba specifične toplote), so pravila za izračun temperature, pri kateri dosežemo ničelno mobilnost molekul, drugačna in prav tako opisana v literaturi (13-15). Med farmacevtsko pomembnimi spojinami sodijo k čvrstim steklom beljakovine, ki so vedno pogostejše predmet raziskovanja tudi s stališča stabilnosti amorfne oblike (16).

V večini primerov je temperatura, pri kateri je treba hraniti amorfni vzorec, da ostane stabilen, mnogo nižja od sobne in je s stališča stabilnosti zdravila neuporabna. Tako potekajo mnoge raziskave uporabe bolj primernih načinov stabilizacije amorfni spojin.

4.2 Amorfizacija in stabilizacija z mletjem

Ena prvih raziskav o vplivu mletja na kristaliničnost učinkovin je bila objavljena leta 1977 (17). Nakai in sodelavci so ugotovili, da mletje modelne učinkovine (benzojska kislina, salicilna kislina, acetilsalicilna kislina) v kombinaciji z mikrokristalno celulozo povzroči amorfizacijo. Amorfnost učinkovin so dokazovali z diferenčno dinamično kalorimetrijo in rentgensko praškovo analizo (17). Predpostavili so, da mletje povzroči nastanek molekulske disperzije učinkovine v nosilcu ali nastanek drobnih kristalov. Isti avtorji so v naslednji raziskavi ugotovili, da tudi mletje lahko hlapnih modelnih učinkovin (naftalen, kofeina, krezol) v kombinaciji z mikrokristalno celulozo povzroči njihovo amorfizacijo. Odporevanje teh učinkovin iz mletih zmesi je bilo pri povišani temperaturi in znižanem tlaku zanemarljivo majhno. Iste učinkovine so iz fizikalnih zmesi pri istih pogojih zelo hitro odparele. Predpostavili so, da se učinkovina v mletih vzorcih nahaja v obliki "entropijsko zmrznjene raztopine", razporejene v porah celuloze. Takšno stabilizacijo naj bi omogočale vodikove vezi. Ko so mlete disperzije izpostavili povišani relativni vlagi, je hitro prišlo do kristalizacije učinkovine, ker naj bi prekinitve vodikovih vezi povečala giljivost molekul (18).

V literaturi lahko najdemo veliko primerov mehanske aktivacije čistih učinkovin in porušenje urejene kristalne strukture (19-21). Spremembe večinoma vplivajo na fizikalno in kemijsko reaktivnost ter tako na hitrost raztapljanja (22). Tudi ti primeri kažejo, da so učinkovine v takšnih vzorcih nestabilne in da pri povišani temperaturi ali vlagi prehajajo v stabilno obliko. Absorbirana vlaga deluje kot mehčalo in poveča mobilnost molekul, kar povzroči rekristalizacijo. Med mletjem prihaja najprej do amorfizacije površine vzorca, medtem ko lahko sredica ostane kristalna (23). Topnost takšnih vzorcev bo pri snoveh z nizko topnostjo odvisna od množine, ki jo dodamo v medij za raztapljanje. Plato koncentracije, ki ga dosežemo s povečevanjem množine mletega vzorca v medij za raztapljanje, ustreza neravnotežni topnosti amorfne oblike te snovi. Primer je podan na sliki 5. Če v topilo dodamo le majhno množino mletega vzorca, se bo amorfna površina takoj raztopila tako, da bo za nadaljnje raztapljanje na voljo le kristalna



Slika 5: Topnost kristalnega, amorfnega vzorca in vzorca z amorfno površino kot funkcija dodane množine v medij za raztapljanje (23).

Figure 5: Solubility of a drug with totally crystalline, totally disordered and disordered surface structure, as a function of the amount added to the dissolution medium (23).

sredica delca in bo topnost vzorca v sorazmerju predvsem s topnostjo stabilne kristalne oblike. S povečevanjem množine mletega vzorca v raztopini bo na voljo več amorfnega vzorca tako, da topnost narašča do nasičene vrednosti neravnotežne topnosti.

Stabilizacijo amorfnе oblike učinkovine lahko dosežemo z dodatkom primerne pomožne snovi in mletjem fizikalne zmesi. Kot primerni pomožni snovi sta se pokazali predvsem polivinilpirolidon (PVP) in SiO₂. Izboljšano raztapljanje učinkovine v tako obdelani zmesi je posledica zmanjšanja velikosti delcev, izboljšanega močenja zaradi dodatka hidrofilne pomožne snovi in amorfizacije učinkovine (24). Splošno velja, da s krogličnim mlinom, ki so ga uporabljali v opisanih raziskavah, ne moremo izdelati delcev manjših od nekaj mikrometrov, zato je malo verjetno, da z mletjem učinkovine v disperziji s pomožno snovjo nastanejo premajhni kristali, ki jih z rentgensko praškovno analizo ne moremo detektirati. Pri proučevanju mletih trdnih disperzij glizentida in PVP so ugotovili, da je za amorfizacijo učinkovine v zmesi potreben mnogo krajši čas mletja kot pri čisti učinkovini. V tem primeru sta bila steklasti prehod in rekristalizacija, določena s termično analizo, dokaz amorfnе oblike učinkovine v mletih vzorcih. Ugotovili so tudi, da so bili amorfni vzorci v disperziji s PVP stabilni najmanj štiri mesece (24).

Natančno so bile proučevane mlete disperzije indometacina in SiO₂ (25). Podobno kot pri glizentidu je potekala amorfizacija učinkovine ob prisotnosti SiO₂ hitreje kot brez nje. Rekristalizacijo indometacina so spremljali z izotermično kalorimetrijo tako, da so merili čas za rekristalizacijo indometacina pri 30°C in relativni vlagi (RH) 11 %. Amorfnа struktura indometacina v mletih zmeseh je bila bolj stabilna kot pri čistem amorfnem indometacinu. Poleg tega so bile razlike v stabilnosti različno dolgo mletih zmesi zelo velike, saj naj bi prisotni mikrokristali učinkovine v ne dovolj zmletih vzorcih predstavljali jedra za kristalizacijo. Z jedrsko magnetno resonanco so proučevali mehanizme interakcij med SiO₂ in indometacinom, do katerih prihaja med mletjem. Ugotovili so, da mletje omogoča tvorbo tako imenovanih mehansko induciranih kemijskih interakcij površine indometacina s silanolnimi skupinami SiO₂ in mehansko poškodovanimi siloksanskimi vezmi. Na ta način pride do omejevanja mobilnosti molekul učinkovine in stabilizacije amorfnе strukture (25).

Poleg tega so s termično analizo ugotovili naraščanje temperature steklastega prehoda s podaljševanjem časa mletja, kar prav tako dokazuje prisotnost interakcij med učinkovino in pomožno snovjo. Za povečanje stabilnosti amorfnega indometacina so izdelali tudi trikomponentne zmesi tako, da so poleg SiO₂ za mletje uporabili še Mg(OH)₂. V tem primeru je prišlo do popolne amorfizacije učinkovine mnogo hitreje kot pri mletju zmesi indometacina in SiO₂. Proces so razložili z merjenjem kislosti mletega SiO₂, Mg(OH)₂ in zmesi teh dveh pomožnih snovi. Ugotovili so, da se s podaljševanjem časa mletja kislost zmesi SiO₂ in Mg(OH)₂ povečuje hitreje kot z mletjem posameznih komponent. Z IR spektroskopijo so pokazali, da pride z mletjem na medfazi obeh pomožnih snovi do mehanokemijske dehidracije, saj se zmanjšujeta vrhova proste OH skupine, značilna za vsako od komponent. Pri mletju obeh pomožnih snovi z indometacinom je tako prišlo do kemijske interakcije med karboksilnimi skupinami na površini učinkovine ter kisló površino, ki je nastala z mehansko inducirano kemijsko interakcijo med SiO₂ in Mg(OH)₂. Zmanjševanje vrhov v IR spektru, značilnih za OH skupino iz karboksilne skupine indometacina in prosto silanolno skupino, je bilo v primeru mletja trikomponentne zmesi najhitrejše. Te interakcije so preprečile kristalizacijo indometacina tako, da je ostal vzorec popolnoma amorfn tudi po dveh mesecih hranjenja pri 30°C in 11 % RH (26). Tudi z mletjem zmesi aluminijevega magnezijevega aluminosilikata in učinkovine so dosegli amorfizacijo in stabilizacijo amorfnе oblike ketoprofena, indometacina, naproksena in progesterona. Predlagani mehanizmi za stabilizacijo so povišanje temperature steklastega prehoda, tvorba vodikovih vezi med učinkovino in pomožno snovjo in mehansko inducirana kemijska interakcija med površinami (27). Z mletjem so v amorfnó obliko uspešno pretvorili naproksen z uporabo necikličnih analogov α in β -ciklodekstrina (28). V tem primeru mehanizmov stabilizacije amorfnе učinkovine niso proučevali.

4.3 Druge metode izdelave trdnih disperzij in stabilizacija amorfnе učinkovine

Čeprav se je mletje pokazalo kot zelo učinkovita metoda za stabilizacijo amorfnе oblike učinkovine, potekajo tudi raziskave učinkovitosti drugih metod izdelave trdnih disperzij. Najbolj znana pomožna snov za izdelavo trdnih disperzij je polivinilpirolidon (PVP). Uporabili so ga za izdelavo trdne disperzije v kombinaciji z več kot šestdesetimi učinkovinami (29). Veliko manj je člankov, ki proučujejo mehanizem stabilizacije amorfnе oblike učinkovine s tem polimerom. PVP uporabljamo za izdelavo trdnih disperzij, ker najpogosteje stabilizira amorfnó obliko učinkovine s protimehčalnim delovanjem. Pomožna snov z visokim T_g in učinkovina z nizkim T_g v zmesi imata višji T_g kot čista učinkovina. Na ta način je zmanjšana mobilnost molekul učinkovine in povečana fizikalna stabilnost zmesi. V primeru, da med komponentama zmesi ni interakcij, lahko T_g izračunamo z uporabo Gordon-Taylor/Kelley-Bueche enačbo (30, 31):

$$T_{g \text{ zmesi}} = \frac{(\omega_1 T_{g1}) + (K\omega_2 T_{g2})}{(\omega_1) + (K\omega_2)} \quad (5)$$

ω_1 in ω_2 sta masna deleža komponent v zmesi K izračunamo ob poznavanju gostote (ρ) obeh komponent iz enačbe 6:

$$K \approx \frac{\rho_1 T_{g1}}{\rho_2 T_{g2}} \quad (6)$$

Odstopanje od idealnega obnašanja zmesi, ki jo opisujemo z Gordon-Taylor/Kelley-Bueche enačbo pomeni, da so med komponentama prisotne medmolekulske interakcije. Protimehčalni učinek so v kombinaciji izkazale tudi citronska kislina (32), dekstroza (33) in vinilni alkohol (34)

Z metodo sušenja z razprševanjem so proučevali stabilnost amorfne laktoze v zmesih s PVP nizke in visoke molekulske mase. Rezultati so pokazali, da dodatek PVP stabilizira amorfno laktozo, s čimer se poveča kritična vrednost relativne vlage (RH), pri kateri poteče rekristalizacija. Ugotovili so, da je PVP z višjo molekulsko maso (K90) učinkovitejši od tistega z nižjo molekulsko maso (K17). Prav tako je učinkovitost večja v primeru, ko je delež PVP v zmesi velik. Kljub temu, da se je T_g pri uporabi PVP-K90 znižala le na 32°C, so bili ti vzorci tudi po šestih mesecih hranjenja pri 25°C in RH 43 % popolnoma amorfni. To pomeni, da je gibljivost molekul laktoze, kljub majhni razliki T_g -T, najverjetneje zaradi tvorbe vodikovih vezi v trdni disperziji s PVP, ustrezno zmanjšana (35). V drugi raziskavi, kjer so proučevali interakcije PVP s ketokonazolom, so ugotovili, da je razlog za povečano stabilnost trdnih disperzij, izdelanih s sušenjem z razprševanjem, odgovoren protimehčalni učinek polimera, ki povzroči dvig T_g učinkovine, poveča viskoznost binarne zmesi in tako zmanjša difuzijo molekul, ki je potrebna za tvorbo kristalne celice (36). ^{13}C jedrska magnetna resonanca in infrardeča spektroskopija sta pokazali, da med komponentama trdne disperzije ne pride do interakcij. Disperzije so bile stabilne en mesec pri temperaturi 30°C in relativni vlagi 52 %. Ta raziskava je pokazala, da naknadno dodani kristali učinkovine povzročijo pretvorbo čiste amorfne učinkovine v disperziji, ker predstavljajo kristalizacijska jedra, medtem ko je bila amorfna oblika učinkovine v disperziji s PVP stabilna tudi ob takšnem dodatku (36).

PVP se je izkazal kot učinkovita pomožna snov za stabilizacijo amorfne ketoprofena s tvorbo trdne disperzije. Z metodo odparevanja topila so izdelali disperzije z amorfno učinkovino, stabilno deset mesecev. Stabilizacijo amorfne učinkovine omogočajo vodikove vezi med karboksilno skupino dispergirane ketoprofena in keto skupino PVP. Poleg tega deluje PVP kot mehanska ovira, ki ločuje delce in molekule učinkovine med seboj in zaradi visoke viskoznosti zmanjšuje njihovo mobilnost (37).

Perng in sodelavci so proučevali vpliv PVP in PEG 8000 na stabilizacijo amorfne oblike učinkovine SB-210661 ((S)-N-hidroksi-N-(2,3-dihidroksi-6-2,3-difluorofenilmetoksi) 3-benzenfuranil)urea) v trdnih disperzijah (38). Te so izdelali z ohlajanjem taline ali mletjem zmesi s PEG in odparevanjem topila v zmesi s PVP. Ugotovili so, da je učinkovina v zmesih s PEG ne glede na način izdelave le deloma amorfna, medtem ko je v zmesih s PVP popolnoma amorfna. Kljub temu, da je bila začetna hitrost raztapljanja učinkovine iz vseh trdnih disperzij enako povečana glede na čisto učinkovino, so bile disperzije s PVP zaradi prisotnih vodikovih vezi med komponentama, ki so jih dokazali z infrardečo spektroskopijo, stabilne najmanj eno leto. Interakcije med PVP in učinkovino so dokazali tudi drugi raziskovalci (39, 40). Proučevali so razlike v IR spektrih fizikalnih zmesi in trdnih disperzij PVP in amorfne indometacina in ugotovili, da je za

povečanje stabilnosti amorfne oblike v trdni disperziji odgovorna tvorba vodikove vezi med hidroksilno skupino učinkovine in karboksilno skupino polimera (39). V disperzijah s PEG tovrstnih interakcij niso dokazali kar je razlog, da se je kristaliničnost učinkovine s časom povečevala, hitrost raztapljanja pa med enoletnim shranjevanjem bistveno znižala (38).

Za stabilizacijo beljakovin najpogosteje uporabljamo postopek sušenja z zamrzovanjem. Ustrezno stabilizacijo lahko dosežemo le z ohranitvijo amorfne strukture produkta. V ta namen uporabljamo predvsem sladkorje, aminokislino in površinsko aktivne snovi (41). Rezultati raziskav so pokazali, da so sladkorji in npr. hidroksipropil- β -ciklodekstrin bolj, aminokislino in manitol pa manj učinkovite spojine za stabilizacijo amorfne strukture zmesi. Pri manj učinkovitih pomožnih snoveh pride med shranjevanjem do kristalizacije in zmanjšanja interakcij z beljakovino, kar zmanjša njeno fizikalno in kemijsko stabilnost (42, 43).

4.4 Spontana amorfizacija učinkovine v fizikalni zmesi ali trdni disperziji

Konno in sodelavci so ugotovili, da se lahko učinkovina v fizikalni zmesi z ustrezno pomožno snovjo spontano pretvori v amorfno obliko (44-47). Tako lahko npr. acetijsalicylna kislina, fenacetin ali flufenaminska kislina v kombinaciji z magnezijevim aluminijevim silikatom ali aktivnim ogljem postanejo amorfne v nekaj dneh. Ugotovili so, da se z znižanjem tlaka hitrost amorfizacije poveča, medtem ko povečana relativna vlaga negativno vpliva na ta proces (47). Predpostavljajo, da proces prehoda učinkovine v amorfno stanje poteka preko parne faze in je odvisen od njenega parnega tlaka. Učinkovina sublimira ter s kristalnih delcev prehaja na površino in v pore pomožne snovi z veliko specifično površino. Hipotezo so potrjevali z izdelavo fizikalnih zmesi spojine z nizkim parnim tlakom (p-hidroksibenzojska kislina) in z visokim parnim tlakom (benzojska kislina) ter z merjenjem hitrosti amorfizacije. Benzojska kislina je postala amorfna mnogo hitreje (nekaj ur) kot p-hidroksibenzojska kislina (več dni) (44). Kasneje je Konno predlagal, da lahko verjetnost pretvorbe učinkovine v amorfno obliko napovemo na osnovi določanjem parnega tlaka učinkovin z uporabo parne destilacije njihovih vodnih raztopin (45).

Raziskave so pokazale, da se učinkovina v ustrezno staranih zmesih, kjer je prišlo do amorfizacije, sprošča mnogo hitreje kot iz kristalne oblike. Tudi stabilnost zmesi je bila ob vzdrževanju nizke vlage ustrezna. Le v primeru acetijsalicylna kisline se je stabilnost zmesi zmanjšala, kar je posledica katalitičnega delovanja adsorbenta, ki je pospešil hidrolizo učinkovine (45). Gupta in sodelavci so ugotovili, da se lahko topnost učinkovine iz trdnih disperzij, izdelanih z granuliranjem s taljenjem Gelucirja 50/13, PEG 8000 in Neusilina US2 (magnezijev aluminosilikat), s časom narašča. Predpostavili so, da lahko učinkovina, ki je proton donor, tvori vodikove vezi, migrira v disperziji in se adsorbira na amorfno pomožno snov Neusilin, ki je proton akceptor. Obstoj tega mehanizma so dokazali na primeru dveh učinkovin s proton donorskimi lastnostmi (BAY 12-9566 in naproksen) tako, da so med shranjevanjem vzorcev merili naraščanje vodikovih vezi z IR spektroskopijo in zmanjševanje kristaliničnosti učinkovin z rentgensko praškovo analizo. V primeru progesterona, ki ni proton donor, tovrstnih sprememb niso dokazali (48)

4.5 Stabilizacija učinkovin in drugih snovi v ozkih porah

Obarjanje spojin v amorfnih obliki lahko dosežemo tudi v ozkih porah oziroma v tankih plasteh. Potrditev takšnega načina amorfizacije in stabilizacije najdemo v elektronski industriji. Za izdelavo večkrat zapisljivih večslojnih optičnih diskov je potrebna dobra prepustnost svetlobe in zato čim tanjša plast aktivne snovi (snov, ki med zapisovanjem kristalizira) (49). Praktično so ugotovili, da snovi, ki jih uporabljajo za večkrat zapisljive zgoščenke (kvarterne zmesi, npr. Ge-Sn-Sb-Te), kristalizirajo v plasti debeline 6 nm ali več (50), medtem ko v tanjši plasti ostanejo amorfne. V primeru zlitin železa in cirkonija so ugotovili naraščanje debeline plasti, ki kristalizira, od 2 nm za čisto železo do 30 nm za železo, ki vsebuje 7 atomskih odstotkov cirkonija (51). Raziskave potekajo tudi na področju stabilizacije amorfnih učinkovin v ozkih porah. Nam in sodelavci so z namenom stabilizacije antioksidanta resveratrola izdelovali polimerne mikrosfere. Ugotovili so, da je učinkovina v mikrosferah z večjimi porami kristalna, medtem ko je v porah velikosti pod 3.9 nm amorfnina. (52). Maver in sodelavci so izdelovali gele silicijevega dioksida, ki so vsebovali nifedipin, z uporabo sol-gel metode. Na ta način so izdelali delce, iz katerih se je učinkovina več ur nadzorovano sproščala. Praktično in teoretično so pokazali, da je učinkovina v kserogelih silicijevega dioksida z velikostjo por od 2 do 3 nm amorfnina in v tej obliki tudi stabilizirana (53).

5 Sklep

Amorfno obliko učinkovine lahko uporabimo v disperzijah z namenom zadržanja ali pospešitve sproščanja glede na kristalno obliko. V primeru netopne učinkovine s tvorbo amorfnih oblik povečamo hitrost raztapljanja in biološko uporabnost. V primeru dobro topnih učinkovin lahko s tvorbo amorfnih oblik izboljšamo stik učinkovine z nosilcem (npr. polimerom) in tako izboljšamo nadzor nad profilom sproščanja. Tudi po več desetletjih raziskav je na tržišču le nekaj zdravil, ki vsebujejo amorfnobliko učinkovine (npr. zdravilo z učinkovino zafirlukast, s cefuroksim aksetilom, s kinapriljevimi hidrokloridom, z nelfiravin mezilatom, z cefpodoxim proksetilom in nekatera zdravila s statini). Na trgu najdemo tudi zdravilo, ki poleg kristalnega vsebuje še amorfnobliko inzulina, kar omogoča hitro in podaljšano delovanje. Izdelava trdnih disperzij je trenutno najbolj uporabljen način stabilizacije amorfnih učinkovin. Za njihovo izdelavo lahko uporabimo energijsko bolj zahtevne postopke, kot sta mletje in liofilizacija. Med energijsko manj zahtevne sodijo izdelava disperzij s taljenjem ($T = \text{do } 70^{\circ}\text{C}$), razprševanje raztopine učinkovine in pomožne snovi z uporabo organskih topil (npr. etanola) na nosilne delce. Kljub temu, da je pri teh postopkih potrebno upoštevati zahteve, kot so meja vsebnosti zaostalega organskega topila v produktu, recikliranje topila zaradi varovanja okolja in delo z eksplozijsko varno opremo, se tudi ti uporabljajo za izdelavo zdravil.

6 Literatura

1. Ferlan A, Vrečer F. Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin. Farm Vestn 2004; 55: 11-21.
2. Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. Adv Drug Del Rev 2001; 48: 27-42.
3. Pikal M. Freeze drying of proteins: process, formulation and stability. V: Cleland LJ, Langer R (urednika), ACS Symposium Series 567, Formulation and delivery of proteins and peptides, ACS, Washington DC 1994: 20-133.
4. Broadhead J, Rouan Edmond SK, Rhodes CT. The spray drying of pharmaceuticals. Drug Dev Ind Pharm 1992; 18: 1169-1206.
5. Niven RW. Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosols. Pharm Technol 1993; 17: 72-82.
6. Yu L, Mishra DS, Rigsbee DR. Determination of the glass properties of D-mannitol using sorbitol as an impurity. J Pharm Sci. 1998; 87: 774-777.
7. Saleki-Gerhardt A, Stowell JG, Byrn SR, Zogaei G. Hydration and dehydration of crystalline and amorphous forms of raffinose. J Pharm Sci 1995; 84: 318-323.
8. Li Y, Han J, Zhang GGZ, Grant DJW, Suryanarayanan. In situ dehydration of carbamazepine dihydrate: a novel technique to prepare amorphous anhydrous carbamazepine. Pharm Dev and Tech 2000; 5(2): 257-266.
9. Mosharraf M, Sebhatu T, Nystrom C. The effects of disordered structure on the solubility and dissolution rates of some hydrophilic, sparingly soluble drugs. Int J Pharm 1999; 177: 29-51.
10. Ediger MD, Angell CA, Nagel SR. Supercooled liquids and glasses. J Phys Chem 1996; 100: 13200-13212.
11. Monserat S. Physical aging studies in epoxy resins I. Kinetics of the enthalpy relaxation process in a fully cured epoxy resin. J Polim Sci 1994; 32: 509-522.
12. Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. Pharm Res 1995; 12(6): 799-806.
13. Slade L, Levine H. Glass transitions and water-food structure interactions. Adv. Food Nutr. Res 1995; 38: 103-269.
14. Angell CA. The old problems of glass and the glass transition and the many new twists. Proc Nat Acad Sci USA. 1995; 92: 6675-6682
15. Angell CA. Formation of glasses from liquids and biopolymers. Science 1995; 267: 1924-1935.
16. Craig DQM, Royall PG, Kett VL, Hopton ML. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. Int J Pharm 1999; 179: 179-207.
17. Nakai Y, Fukuoka E. et. al. Effects of grinding on physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose. I. Some physical properties of crystalline medicinals in ground mixtures. Chem Pharm Bull 1977; 25(12): 3340-3346.
18. Nakai Y, Fukuoka E. et. al. Effects of grinding on physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose. II. Retention of volatile medicinals in ground mixture. Chem Pharm Bull 1978; 26(10): 2983-2989.

19. Haleblan JK, Koda RT, Biles JA. Isolation and characterization of some solid phases of fluprednisolone. *J Pharm Sci* 1971; 60: 1485-1491.
20. Hersey JA, Krycer I. Biopharmaceutical implications of technological change *Int J Pharm Tech Prod Manuf* 1980; 1(2): 18-21.
21. Hüttenrauch R. Fundamentals of pharmaceuticals. *Acta Pharm Technol* 1988; 34(1): 1-10.
22. Gubskaya AV, Lisnyak YV, Blagoy YP Effect of cryogrinding on physico-chemical properties of drugs I. Theophylline: Evaluation of particle sizes and the degree of crystallinity, relation to dissolution parameters. *Drug Dev Ind Pharm* 1995; 21(17): 1953-1964.
23. Elamin AA, Ahlneck C, Alderborn G, Nyström C. Increased metastable solubility of milled griseofulvin, depending on the formulation of a disordered surface structure. *Int J Pharm* 1994; 111: 159-170.
24. Mura P, Cirri M, Faucci MT et al. Investigation of the effects of grinding and co-grinding on physicochemical properties of glisentide. *J Pharm Biom Anal.* 2002; 30: 227-237.
25. Watanabe T, Wakiyama N, Usui F et al. Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *Int J Pharm* 2001; 226: 81-91.
26. Watanabe T, Ohno I, Wakiyama N et al. Stabilization of amorphous indomethacin by co-grinding in a ternary mixture. *Int J Pharm* 2001; 241: 103-111.
27. Gupta MK, Vanwert A, Bogner RH. Formation of physically stable amorphous drugs by milling with neusilin. *J Pharm Sci* 2003; 92(3) 536-551.
28. Sorrenti M, Negri A, Betinetti P. DSC study of crystallinity changes of naproxen in ground mixtures with linear maltooligomers. *J Therm Anal.* 1998; 51: 993-1000.
29. Ford JL. The current status of solid dispersions. *Pharm Acta Helv* 1986; 61: 69-88.
30. Gordon M, Taylor JS. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers 1: Non-crystalline copolymers. *J Appl Chem* 1952; 2: 493-498.
31. Kelley FN, Bueche F. Viscosity and glass temperature relations for polymer diluent systems. *J Polym Sci* 1961; 50: 549-556.
32. Summers MP. Glass formation in barbiturates and solid dispersion systems of barbiturates with citric acid. *J Pharm Sci* 1978; 67: 1606-1610.
33. Timko RJ, Lordi NG. Thermal analysis studies of glass dispersion systems. *Drug Dev Ind Pharm* 1984; 10: 425-451.
34. Six K, Verreck G, Peeters J et al. Increased Physical stability and improved dissolution properties of itraconazole, a class II drug, by solid dispersions that combine fast- and slow-dissolving polymers. *J Pharm Sci* 2004; 93: 124-131.
35. Berggren J, Alderborn G. Long-term stabilisation potential of poly(vinylpyrrolidone) for amorphous lactose in spray-dried composites. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 209-215.
36. Van sen Mooter G, Wuyts M, Bleton N et al. Physical stabilisation of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12: 261-269.
37. Di Martino P, Joiris E, Gobetto R et al. Ketoprofen-poly(vinylpyrrolidone) physical interaction. *J Cryst Growth* 2004; 265: 302-308.
38. Perng CY, Kearney AS, Patel K et al. Investigation of formulation approaches to improve the dissolution of SB-210661, a poorly water soluble 5-lipoxygenase inhibitor. *Int J Pharm* 1998; 176: 31-38.
39. Taylor LS, Zoografi G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. *Pharm Res* 1997; 14: 1691-1698.
40. Khougaz K, Clas SD. Crystallization inhibition in solid dispersions of MK-0591 and poly(vinylpyrrolidone) polymers. *J Pharm Sci* 2000; 89: 1325-1334.
41. Izutsu K, Yoshioka S, Terao T. Decreased protein stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization. *Pharm Res* 1997; 10 (8): 1232-1237.
42. Pikal M.J. Freeze-drying of proteins. II. Formulation selection. *Biopharm* 1990; 3: 26-29.
43. Pikal MJ, Dellerman KM et al. The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone. *Pharm Res* 1991; 8: 427-436.
44. Konno T, Kinuno K. et al. Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. I. Effect of vapor pressure on the medicinals on changes in crystalline properties. *Chem Pharm Bull* 1986; 34(1): 301-307.
45. Konno T. Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. II. Application of reduced pressure treatment for the improvement of dissolution of flufenamic acid. *Chem Pharm Bull* 1989; 37(8): 2481-2484.
46. Konno T. Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. III. Determination of vapor pressure of solid drugs by steam distillation. *Chem Pharm Bull* 1990; 38(4): 1032-1034.
47. Konno T, Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. IV. Study on reduced-pressure mixing for practical use of amorphous mixtures of flufenamic acid. *Chem Pharm Bull* 1990; 38(7): 2003-2007.
48. Gupta KG, Bogner RH et al. Mechanism for further enhancement in drug dissolution from solid dispersion granules upon storage. *Pharm Dev Technol* 2002; 7(1): 103-112.
49. Hyot B, Poupinet L, Desré PJ Stabilization of the amorphous state of a thin layer sandwiched between two crystals. *Thin Solid Films* 2003; 2003: 290-294.
50. Kojima R, Yamada N. Acceleration of crystallization speed by Sn addition to Ge-Sb-Te phase-change recording material. *Jpn J Appl Phys* 2001; 40: 5930-5937.
51. Herr H, Geisler H et al. Polymorphic crystallization of interface stabilized amorphous Fe-Zr thin films under variable driving force. *Phys Rev B* 1999; 21: 13719
52. Nam JB, Ryu JH, Kim JW et al. Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres. *Polymer* 2005; 46: 8956-8963.
53. Maver U, Godec A, Bele M. et al. Novel hybrid silica xerogels for stabilization and controlled release of drug. *Int. J Pharm.* 2007; 30: 164-174.

Novosti o dostavljanju učinkovin v nohte

Novel methods in drug delivery to the nail

Ana Torkar, Julijana Kristl, Sudaxhina Murdan

Povzetek Za zdravljenje boleznih nohtov je še vedno najučinkovitejše sistemsko dajanje zdravil, čeprav je dolgotrajno in pogosto povezano z neželenimi učinki in interakcijami z drugimi zdravili. Pregled anatomije nohta in narave najpogostejših boleznih nohtov, onihomikoze in luskavice nam osvetli problem lokalne dostave učinkovin v noht. Najpomembnejši fizikalno kemijski parametri, ki vplivajo na permeacijo učinkovine skozi noht, so velikost, nabitost in hidrofilnost/lipofilnost molekule učinkovine. Šele s porušenjem kompaktne keratinske zgradbe nohta, pri čemer so najučinkovitejši reducenti disulfidnih vezi, je možno doseči zadostno količino učinkovine na mestu delovanja. Razvoj gre v smeri iskanja in opredeljevanja novih kemičnih pospeševalcev in fizikalnih metod, ki vplivajo na keratinsko strukturo, med katerimi so tudi keratinolitični encimi in ultrazvok.

Ključne besede: noht, boleznih nohtov, lokalno zdravljenje, permeabilnost

Abstract Frequent side effects and interactions with other drugs are very common in long-term systemic therapy of nail diseases. Ideally, nail diseases would be treated topically. Unfortunately, the poor permeability of the nail plate limits the efficacy of topical therapy. The nail unit and the two most common diseases affecting nail - onychomycosis and nail psoriasis - are briefly described to give an overview of the nature and scope of the problem of local drug delivery into the nail plate. The most important physico-chemical factor that affects drug permeation into the nail plate is the drug's molecular size, while charge and hydrophilicity/lipophilicity may also be important. To achieve sufficient drug concentration at the site of infection there is a need to reduce the integrity of the compact keratin nail plate. This can be done using chemical enhancers, the most effective of which are agents which split the disulfide linkages of keratin. Trends in the research in that field are the identification and characterisation of new chemical enhancers and physical methods to disrupt the keratin structure, such as keratinolytic enzymes and ultrasound.

Key words: nail, nail diseases, local treatment, permeability

1 Uvod

Nohti ščitijo distalni del prstov pred poškodbami, služijo kot orodje za prijemanje in upravljanje s predmeti, v današnjem času pa tudi estetskemu namenu (1). Bolezni nohtov pogosto spremljajo otrditev, zadebelitev, sprememba barve, distrofija, lomljivost ipd. Ker večinoma ne gre le za estetski problem in je prizadeta kakovost bolnikovega življenja, je potrebno zdravljenje. Zaradi slabe prepustnosti nohtne plošče, ki jo sestavljajo tesno zbite, kompaktne rožene celice in prisotnosti okužbe ali drugih bolezenskih sprememb v globljih plasteh nohta, lokalno zdravljenje ni dovolj učinkovito. Sistemsko zdravljenje je še vedno najuspešnejše pri huje izraženih kroničnih boleznih nohtov, čeprav je dolgotrajno, s pogostimi neželenimi učinki ter možnimi interakcijami z drugimi zdravili. Tudi možnosti za ponoven pojav boleznih so velike. Vse to daje prednost lokalnemu zdravljenju obolelih nohtov, ki ima še druge dobre lastnosti: ne-invazivnost, ciljano dostavo učinkovin in večje bolnikovo sodelovanje (2). Omejili se bomo predvsem na raziskave za povečanje dostave učinkovin v noht, še prej pa moramo spoznati zgradbo nohta, naravo njegovih najpogostejših boleznih in dejavnike, ki vplivajo na permeacijo učinkovine skozi nohtno ploščo.

2 Zgradba nohta

Nohtno enoto sestavljajo lateralna in proksimalna nohtna guba s tanko roženo plastjo (eponychium), nohtna matica (matrix unguis), nohtna posteljica in podnohtje (hyponychium), ki skupaj tvorijo nohtno ploščo (sliki 1 in 2).

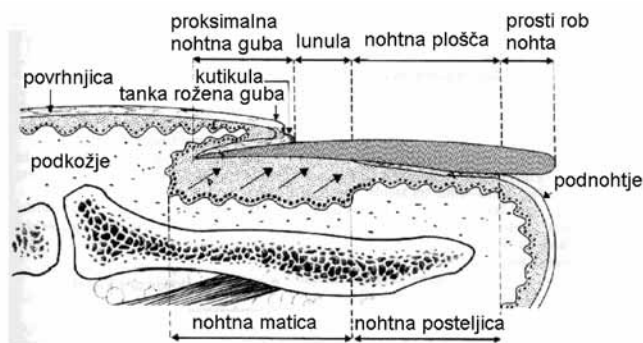
Nohtna matica je zarodni epitelij nohtne plošče, ki jo sestavljajo keratinociti, melanociti, Merkleve in Langerhansove celice (5). Del matice je tudi lunula, svetlejši, polmesečni del proksimalnega dela nohta, viden predvsem na palcih (1, 3). Najobsežnejše območje med distalnim koncem lunule in podnohtjem, pod nohtno ploščo, je nohtna posteljica. Ima tanek epitelij, ki nohtni plošči prispeva nekaj celic, kar omogoča neprekinjeno rast nohta, medtem ko se trdno drži nohtne posteljice (6). Podnohtje (hyponychium) je del vrhnjega epidermisa pod prostim robom nohtne plošče, ki preprečuje vdor snovi in mikroorganizmov pod noht (5). Noht obdajata proksimalna in lateralna nohtna guba, ki ga ščitita in mu dajejo oporo. Tanka rožena guba (eponychium) je epitelij proksimalne gube, ki ne vsebuje dlačnih foliklov niti lojnih žlez. Stratum corneum rožene gube, ki pokriva majhno površino nohtne plošče, se imenuje kutikula (5).



Slika 1: Konec prsta, kjer so prikazani glavni sestavni deli nohta (3)

Figure 1: Tip of the digit showing the component parts of the nail apparatus (3)

Nohtna plošča (slika 2) se razvija iz nohtne matice s postopnim zaroženevanjem in sploščanjem celic matriksa v distalni smeri, pri čemer celice izgubijo jedro in druge organele. Zveča se vsebnost tonofilamentov s kopičenjem, rastejo in tvorbo keratina, celice pa se močno povežejo med seboj z desmosomi in kompaktno medceličnino, ki deluje kot cement (5). Trdnost ter fizikalno in kemično stabilnost daje nohtu fibrilarni protein α -keratin. Kar 80 % keratina v nohtu je t.i. trdi ali lasni keratin, ki se od mehkega ali kožnega keratina razlikuje po visoki vsebnosti disulfidnih vezi, ki potekajo med globularnimi proteini z veliko vsebnostjo cisteina in keratinskimi vlakni. V keratinu so prisotne še druge vezi, kot so peptidne, polarne in vodikove (6). K trdnosti prispeva tudi majhna vsebnost vode (7 do 12 %), ki sicer določa elastičnost in prožnost nohta. Nohti so prepustnejši za vodo kot epidermis (7). Človeški noht se obnaša kot hidrofilna membrana, po čemer se razlikuje od drugih membran v telesu, kot so koža, vaginalna sluznica in sluznica v prebavilih (8). Nohtna plošča vsebuje le od 0,1 do 1 % lipidov (7) ter sledove mineralnih elementov, predvsem kalcija (njegov pomen je večkrat narobe razumljen ali uporabljen v oglaševanju izdelkov za nego nohtov), kar ne prispeva k trdnosti nohtne plošče (1, 3).



Slika 2: Shematski prikaz anatomske zgradbe nohta, prečni prerez prsta roke (4)

Figure 2: Schematic structure of the nail apparatus, longitudinal section of the digit (4)

Noht je pravzaprav specializiran roženi odrastek, ki se razlikuje od kože, ker se ne lušči, in od las, ker ne raste ciklično (3). Nohti na rokah rastejo s približno hitrostjo 3 mm/mesec, na nogah pa približno za polovico ali tretjino počasneje. Tako se nohti na rokah obnovijo v 4 do 6 mesecih, na nogah v 8 do 12 mesecih. Na hitrost rasti nohta vplivajo številni fiziološki in patološki dejavniki, a tudi okoljski dejavniki (2, 5, 6, 9).

3 Nohtne bolezni

Nohte lahko prizadenejo bakterijske, glivične (onihomikoza) ali virusne okužbe, starostne spremembe, nohtni tumorji, kot tudi nekatere kožne (luskavica, lichen planus, itd.) in sistemske bolezni. Nespecifične distrofije in barvne spremembe nastanejo zaradi nepravilne uporabe izdelkov za nego, okužb, nepravilnosti v proliferaciji nohtnih melanocitov ali proizvodnji melanina ter zunanjih vplivov (9). Največ raziskav na področju lokalnega zdravljenja nohtov vključuje onihomikozo in luskavico, ki sta najbolj pogostni bolezni nohtov.

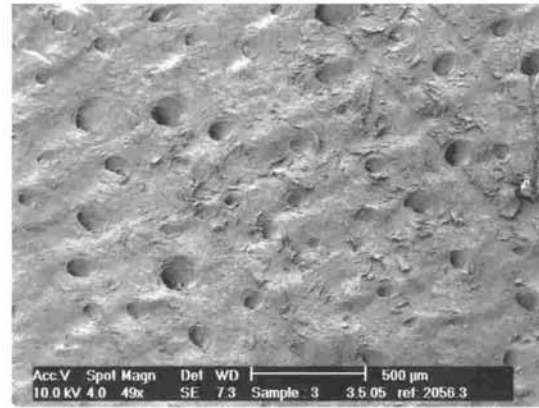
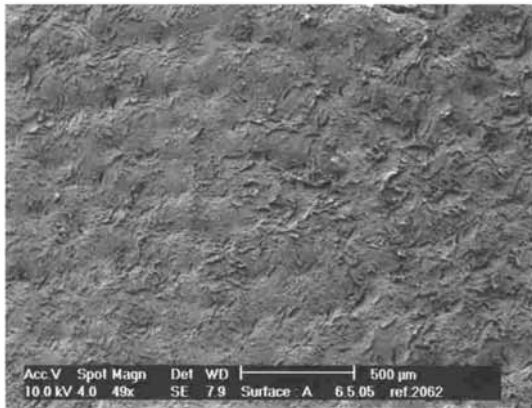
Onihomikoza je kronična glivična okužba nohtov, ki se pojavlja petkrat pogosteje na nogah kot na rokah. Ocenjujejo, da onihomikoza prizadene od 2 do 5 % evropske populacije, njena pojavnost narašča s starostjo (10). Poleg izpostavljenosti glivam pospešujejo okužbe še poškodbe nohtov, imunska neopornost, sladkorna bolezen, bolezni perifernega ožilja, podedovana individualna dovzetnost in čezmerno potenje (9, 10). Klinično se onihomikoze (slika 3) kažejo kot različne bolezenske spremembe: deformacija, zadebelitev in lomljivost nohtne plošče, belkaste drobljive lise na površini, rumenkasto obarvanje ter oniholiza (ločitev nohta od posteljice). Mikroorganizmi največkrat vstopajo skozi podnohtje ali lateralno nohtno gubo. Posledično je najprej okužena nohtna posteljica, za njo še spodnji del nohtne plošče (9).

Luskavica je vnetna kožna bolezen, pri kateri je povečana proliferacija celic bazalne plasti, celice rožene plasti pa se čezmerno luščijo. V severni Evropi in Ameriki prizadene od 1 do 3 % populacije. Več kot 50 % nohtne luskavice se pojavi pri bolnikih s klinično evidentno kožno luskavico (2, 9, 11). Patogeneza luskavice še vedno ni popolnoma znana in je verjetno posledica različnih genskih in imunskih dejavnikov ter okoljskih dejavnikov. Ločimo različne klinične slike. Pikčaste vdolbinice (parakeratotične celice na nohtni plošči, ki se kasneje nevidno oluščijo) so najpogostnejši znak luskavice, večje prečne brazde pa dlje trajajoče luskavice matriksa. Pojav madežev



Slika 3: Onihomikoza (9)

Figure 3: Onychomycosis (9)



Slika 4: Posnetek (SEM) površine membrane parkljev pred (a) in po (b) delovanju ultrazvoka (50 % jakost, 1 min) (26)

Figure 4: Scanning electron microphotographs of bovine hoof membrane surface before (a) and after (b) sonification (50 % intensity level, 1 min) (26)

lososove barve na nohtni plošči, drobne krvavitve in oniholiza so tudi lahko povezane z luskavico nohtne posteljice (9).

4 Zdravila za zdravljenje onihomikoze in nohtne luskavice

Zdravljenje je dolgotrajno in težavno zaradi prizadetosti globljih plasti nohta, trde, rožene, neprehodne nohtne plošče in počasne rasti nohta. Poleg vsega obstaja velika možnost, da bo prišlo do ponovnega pojava bolezni. Bolezni nohtov je mogoče zdraviti na več načinov, npr. sistemsko ali lokalno, z odstranitvijo nohtne plošče ter kombinacijami prvih treh.

4.1 Odstranitev nohta

Kirurška odstranitev nohtne plošče pride v poštev le izjemoma. Sprejemljivejša alternativa je odstranitev nohtne plošče s kemomehanično maceracijo nohta s keratinolitikami; ureo (20 do 40 %) v kombinaciji s salicilno kislino (10 %) (2) in glutaraldehidom (10) v mazilni podlagi pod okluzijo. Po odstranitvi bolnega nohta lahko stanje izboljšamo z lokalnim zdravljenjem (7, 9, 10, 11).

4.2 Zdravila za sistemsko zdravljenje

Za sistemsko zdravljenje onihomikoz so v preteklosti uporabljali griseofulvin in ketokonazol, ki so ju danes nadomestili novodobni antimikotiki: itrakonazol, terbinafin in flukonazol (9, 10, 12). Vsi so pri nas tudi registrirani. Itrakonazol in flukonazol spadata med t.i. azole, ki so pogojno hepatotoksične učinkovine in povzročajo potencialno nevarne interakcije z učinkovinami, ki se metabolizirajo prek jetrnega sistema s citokromom P-450 ter nekaterimi drugimi učinkovinami (9, 10, 12). Itrakonazol ima širok spekter protiglivičnega delovanja in visoko afiniteto do keratina. Po prenehanju zdravljenja ostane delujoča koncentracija učinkovine v nohtih tudi do nekaj mesecev, kar omogoča pulzno zdravljenje z manjšim celotnim odmerkom, ki dosega podobno učinkovitost kot nepretrgana uporaba pripravka (2, 9, 10, 13). Flukonazol premore ožji spekter delovanja, njegova uporaba v zdravljenju nohtnih glivičnih okužb pa je sorazmerno nova

(9). Alilamin terbinafin sam ali v kombinaciji z drugimi antimikotiki uporabljamo tako peroralno kot lokalno (10, 13). Peroralno dajanje terbinafina lahko povzroči številne neželene učinke ter hude zaplete, ki so sicer zelo redki, pojavijo pa se lahko tudi pri azolskih antimikotikih. To so različne vrste kožnih izpuščajev, Steven-Johnson sindrom in toksična epidermalna nekroliza. Terbinafin izkazuje nižjo frekvenco interakcij z drugimi učinkovinami, ki so omejene predvsem na rifampicin in cimetidin (12).

Sistemsko zdravljenje luskavice z antimetabolitom folne kisline metotreksatom, imunosupresivom ciklosporinom ali retinoidom etretinatom uporabljamo le za hude oblike nohtne luskavice (9).

4.3 Zdravila za lokalno zdravljenje

Zdravila za lokalno nanašanje v kombinaciji s sistemskim dajanjem povečajo učinkovitost, zmanjšajo pa trajanje in s tem morebitne neželene učinke sistema zdravljenja ter možnost ponovnega pojava bolezni (14).

Antimikotike najdemo v različnih nosilnih sistemih, kot so kreme, mazila, raztopine, pršila in laki. Zaradi nohtove zgradbe so najboljše inovativni laki za nohte, ki so sicer učinkoviti pri distalnih okužbah nohtne plošče (15, 16, 17). Nanašamo jih tako kot kozmetične lake za nohte. Na nohtu ostane polimerni film, ki po odparitvi topila vsebuje večjo koncentracijo učinkovine, katera pri povečanem difuzijskem gradientu bolje prodira v nohtno ploščo (18). V Sloveniji je registriran lak za nohte s 5 % amorolfinom, ki je na tržišču že od leta 1992 (19). V svetu je poznan še lak z 8 % ciklopiroksom, ki je na tržišču od leta 1991; leta 1995 ga je FDA odobrila za zdravljenje dermatofitnih onihomikoz (15). Klinične študije kažejo na učinkovitost raztopine za nohte z azolskim antimikotikom tiokonazolom (16).

Na tujem tržišču se pojavlja še nekaj zdravil, katerih učinkovitost ni splošno priznana. Novi pripravek na nemškem tržišču vsebuje 0,5 % pirolakton olamin v hidroksipropil hitosanskem ogrodju, ki deluje protiglivično ter hkrati utrjuje in ščiti noht (20, 21). Raztopina salicilne kisline ima keratolitične in protiglivične lastnosti (22). Proti onihomikozi naj bi delovala tudi raztopina klorobutanola, metil in propil undekanoata ter salicilne kisline in njenih estrov. Klorobutanol ima

protibakterijske in protiglivične lastnosti, undekanojska kislina in njene soli prav tako delujejo proti nekaterim glivam (22, 23).

Za zdravljenje luskavice pogosto uporabljajo kortikosteroidne pripravke. Biološko uporabnost lahko izboljša okluzija obolelih nohtov s celofanskim ovojem. Uporaba raztopine ali kreme antimetabolita fluorouracila na območju nohtne matice zmanjša pojav jamic in subungualne hiperkeratoze. Raztopina kalcipotriola, sinteznega analoga vitamina D₃, pomaga pri zmerni nohtni luskavici. Znana lokalna antipsoriatika sta še retinoid tazaroten in antralin (9, 11). Pri nas sta registrirana le dva lokalna antipsoriatika kalcipotriol in kalcitriol. Fototerapija, peroralno ali lokalno dajanje psoralena (metoksalena) in obsevanje z UVA žarki, to je t.i. PUVA, ki je zelo učinkovita metoda za zdravljenje kožne luskavice, lahko izboljša tudi nohtno v treh do šestih mesecih. Možno je tudi zdravljenje luskavice nohtov z intralezionalno injekcijo kortikosteroida v proksimalno, če je obolela matica, ali lateralno v nohtno gubo, kadar je bolna nohtna posteljica (2, 9, 11).

5 Raziskave za izboljšanje permeacije učinkovin skozi noht

Raziskave v zadnjih dvajsetih letih so usmerjene predvsem na opredeljevanje in izboljšanje permeacije učinkovin v globlje nohtove plasti, kjer so vnetja in okužbe pogostnejše.

5.1 Dejavniki, ki vplivajo na permeacijo učinkovine v noht

Med prodiranjem v noht se učinkovina najprej porazdeli med polimerno keratinsko mrežo, nato pride do difuzije. Potek je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovinske molekule (velikosti, oblike, nabitosti, hidrofobnosti), lastnosti nosilnega sistema (narave vehikla, pH, koncentracije učinkovine), prisotnosti pospeševalcev permeacije, nohtnih lastnosti (debeline, hidratacije) in interakcij med molekulo učinkovine in nohtnim keratinom. Hitrost permeacije molekule skozi membrano je obratno odvisna od velikosti molekule (24, 25). Kemična sestava nohta kaže na to, da so za prehod učinkovin najpomembnejše hidrofilne poti. Nabrekanje v vodi poveča razdaljo med keratinskimi vlakni, zato noht postane bolj elastičen. Vendar se permeabilnost zaradi hidratacije ne poveča. Vehiklov pH vpliva na disociacijo učinkovin. Tako nenabite molekule prehajajo membrano hitreje kot nabite, ker so slednje obdane z vodo, kar poveča njihovo velikost (24, 25). Ovirana permeacija nabitih učinkovin skozi noht je lahko tudi posledica t.i. Donnanovega učinka, elektrostatskega odboja med nabitim keratinom in enako nabito molekulo učinkovine (24, 25). Če vehikel ne spremeni nohtove barierne vloge, vpliva na prehod učinkovin skozi noht samo vrednost pH. Kadar del vehikla po nanosu odpari, nastane na površini nohta nasičena raztopina učinkovine, kjer koncentracijski gradient pospeši permeacijo učinkovine v noht in skozenj (2, 18).

5.2 Pospeševanje permeacije učinkovin v noht

Če hočemo doseči signifikantno koncentracijo učinkovin na mestu okužbe, moramo njihov prehod skozi nohtno ploščo povečati, kar lahko storimo na fizikalni ali kemični način.

Fizikalna odstranitev površine nohta s piljenjem ali striženjem okužene plasti, preden bomo topikalno nanegli učinkovino, se je izkazala za učinkovito metodo, kar podpirajo tudi izsledki kliničnih študij (2, 7). V literaturi ni zaslediti priljubljenih fizikalnih metod, ki jih uporabljajo za izboljšanje transdermalne permeacije učinkovin, kot so sonoforeza, elektroforeza in elektroporacija.

V našem raziskovalnem delu smo membrane govejih parkljev izpostavili ultrazvoku. Pred testom permeacije v modificiranih Franzovih celicah smo jih obdelali z ultrazvokom pri določeni frekvenci, jakosti, ciklusu in času uporabe, in ugotovili, da ostanejo v stanju visoke permeabilnosti kar nekaj časa (slika 4). Permeabilnost teh membran v primerjavi z neobdelanimi je bila signifikantno večja ($p < 0,05$). Da bi z večjo gotovostjo lahko govorili o učinkovitosti metode, bi jo bilo potrebno preizkusiti tudi na človeških nohtih (26).

Kemični pospeševalci

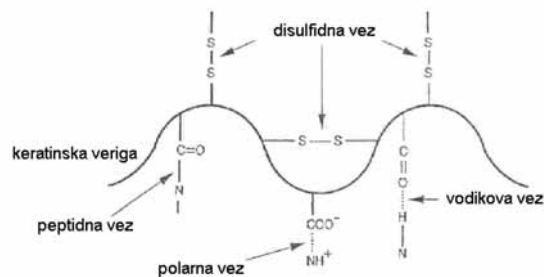
Kemični pospeševalci absorpcije učinkovin v noht morajo biti predvsem sposobni reagirati s komponentami keratina tako, da povzročijo spremembe v primarni ali višjih strukturah keratina. Tarčne vezi nohtnega keratina za potencialne pospeševalce prikazuje shematični diagram (slika 5).

Keratinolitiki

Salicilna kislina, urea in gvanidin (slika 6) vplivajo na terciarno strukturo, mogoče tudi sekundarne vezi (vodikove vezi) v keratinu (27). Poleg tega še hidratirajo in mehčajo nohtno ploščo, ki postane manj kompaktna in zato tudi bolj permeabilna za učinkovine (2). Omenili smo že, da keratinolitike uporabljajo tudi pri kemični odstranitvi nohtne plošče. Quintanar in sodelavci (1998) so raziskovali učinek keratinolitikov na permeabilnost treh imidazolnih antimikotikov in na podlagi slik vrstične elektronske mikroskopije ugotovili, da se v nohtni plošči izoblikujejo pore (28). Kljub vsemu so v številnih raziskavah dokazali, da so keratinolitiki učinkoviti le v sinergiji skupaj z drugimi kemičnimi pospeševalci, kot sta npr. N-(2-merkaptopropionil)glicin (27) in N-acetilcistein (29).

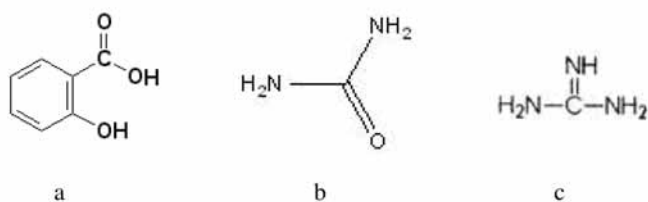
Merkaptani

Kemične spojine, ki vsebujejo skupino -SH, kot so derivati aminokislin, N-acetilcistein, cistein in merkaptoetanol (slika 7) z redukcijo disulfidnih vezi porušijo strukturo in povečajo prodiranje učinkovin v



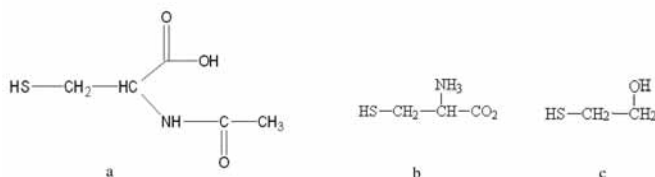
Slika 5: Vezi v keratinu, potencialne tarče kemičnih pospeševalcev penetracije (2, 7)

Figure 5: Bonds in keratin that could potentially be targeted by chemical penetration enhancers (2, 7)



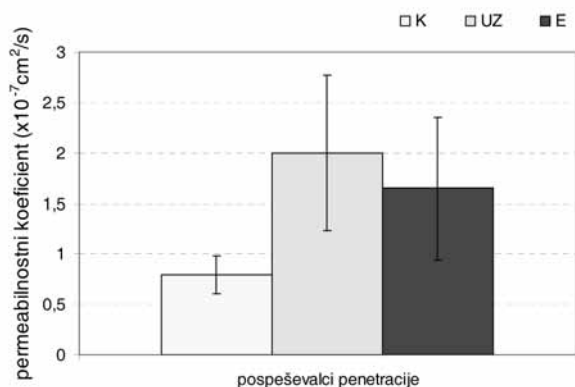
Slika 6: Salicilna kislina (a), urea (b) in gvanidin (c)

Figure 6: Salicylic acid (a), urea (b) and guanidine(c)



Slika 7: N-acetil-L-cistein (a), cistein (b) in 2-merkaptetoanol (c)

Figure 7: N-acetyl-L-cysteine (a), cysteine (b) and 2-mercaptoethanol (c)



Slika 8: Vpliv keratolitnega encima (E) in ultrazvoka (UZ) na permeabilnostni koeficient modelne učinkovine skozi membrane kravjih parkljev v primerjavi s kontrolo, kjer integriteta membrane ni bila spremenjena (K – kontrola). Permeabilnostni koeficient opisuje hitrost potovanja modelne učinkovine (metformina) skozi noht in je definirana kot produkt difuzijskega koeficienta in porazdelitvenega koeficienta, ki ju izračunamo po 2. Fickovem principu, deljeno z debelino membrane.

Figure 8: The effect of keratinolytic enzyme (E) and ultrasound (UZ) on permeability coefficient of the drug through bovine hoof membranes in comparison to the control where the membrane integrity was not disrupted (K – control). Permeability coefficient describes the rate of the model drug (metformin) transport through the nail per unit concentration and it is conventionally defined as the product of diffusion coefficient and partition coefficient (according to Fick's second law), divided by the membrane thickness.

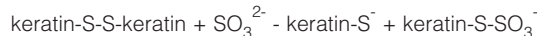
noht. Pri tem se sami oksidirajo, kot poenostavljeno ponazarja reakcija (2):



Učinkovitost sulfhidrilnih snovi so dokazali v številnih študijah. Sun in sodelavci (1997) so poročali o pospešeni permeaciji z acetilcisteinom in njegovem sinergističnem učinku z ureo (29). Kobayashi in sodelavci (1998) so pokazali, da acetilcistein in 2-merkaptetoanol učinkovito pospešita perungualno permeacijo, tako v vodnem kot lipofilnem vehiklu (30). Ker pa je 2-merkaptetoanol zdravju škodljiva in farmatcevska nesprejemljiva spojina z močnim vonjem, jo v študijah uporabljajo le za pozitivno kontrolo.

Sulfiti in bisulfiti

Sulfiti in bisulfiti, kot sta npr. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ali Na_2SO_3 , so znani reducenti disulfidnih vezi v keratinu. Uporabljajo jih tudi za trajno kodranje las. Mehanizem redukcije (27):



Keratolitni encimi

Keratine v naravi hidrolizirajo nekateri mikroorganizmi, ki sintetizirajo keratolitne encime, npr. patogene glive, ki povzročajo dermatofitije ali kandidoze. Keratolitni encimi spadajo med najaktivnejše proteinaze; so široko specifični, kar kaže na njihovo uporabo na različnih področjih, med drugim v medicini, kozmetiki, industriji usnja in detergentov (31). Keratinaze razgradijo keratin s cepitvijo peptidnih vezi. Prvič so poročali o redukciji disulfidnih vezi s keratinazami leta 1999 (32). Glede na njihovo hidrolitično aktivnost bi keratinaze lahko bile učinkovite tudi na nohtih. Po inkubaciji s keratinazo glive *Doratomyces microsporus* so dokazali hidrolitično aktivnost na roženi plasti kože, nohtih in parkljih (31, 32, 33, 34).

Keratolitni encim glive *Paecilomyces maraquandii* smo raziskovalno v poskusih permeacije v Franzovih celicah preizkušali na membranah kravjih parkljev, kjer je bila v primerjavi s kontrolo permeacija modelne učinkovine statistično signifikantno hitrejša (slika 8). Po inkubaciji z nohtnimi odrezki so bili pod vrstičnim elektronskim mikroskopom vidni razdiralni učinki na integriteto nohtne plošče (26, 35). Čeprav je bila učinkovitost encima v primerjavi z agresivnimi kemikalijami (2-merkaptetoanolom, N-acetilcisteinom) statistično manjša, je njegova prednost pred preostalimi pospeševalci predvsem neškodljivost za organizem. Težava pri keratinazah je njihova majhna obstojnost in posledično težavno vgrajevanje encimov v nosilne sisteme, kar pomeni poseben izziv farmacevtskim tehnologom.

6 Sklep

Ker bolezni nohtov ne pomenijo življenjske ogroženosti ljudi, jim farmacevtska industrija dolgo ni posvečala pozornosti. Raziskave zadnjih let kažejo pozitivne premike na tem področju. Zaradi mnogih zapletov ima lokalno zdravljenje prednost pred sistemskim, kar dokazujejo tudi klinične in farmakoekonomske raziskave. Prihodnost je usmerjena v iskanje in karakterizacijo novih kemičnih pospeševalcev, preizkušanje fizikalnih metod, sonoforeze in elektroforeze ter različnih kombinacij reducentov disulfidnih vezi, keratolitikov in keratinaz s fizikalnimi metodami.

7 Zahvala

Hvala dr. Jožici Friedrich in Martini Mohorčič s Kemijskega inštituta v Ljubljani za seznanitev s keratinazami.

8 Literatura

1. De Berker D, Forslind B. The structure and properties of nails and periungual tissues. V: Forslind B, Lindberg M, Norlen L. Skin, hair and nails. Marcel Dekker Inc. 2004: 409-464.
2. Murdan S. Drug delivery to the nail following topical application. *Int J Pharm* 2002; 236: 1-26.
3. Stojanovič L. Bolezni nohtov. V: Kansky A. Kožne in spolne bolezni. Združenje slovenskih dermatovenerologov. 2002: 311-318.
4. Peyrefitte G. Lehrbuch Anatomie und Physiologie der Haut für Kosmetikerinnen. Verlag Hans Huber Bern. 2001: 66-67.
5. Fleckman P. Basic science of the nail unit. V: Scher RK, Daniel CR. Nails: Therapy, Diagnosis, Surgery. WB Saunders. 1997: 37-54.
6. Dawber RPR, De Berker D, Baran R. Science of the nail apparatus. V: Baran R, Dawber RPR. Diseases of the nails and their management. Blackwell Scientific Publications. 1994: 1-34.
7. Sun Y, Liu JC, Wang JCT, De Doncker P. Nail penetration. Focus on topical delivery of antifungal drugs for onychomycosis treatment. V: Bronaugh RL, Maibach HIE. Percutaneous Absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. Marcel Dekker Inc. 1999: 759-787.
8. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and a keratin membrane from bovine hooves: influence of the partition coefficient octanol/water solubility of drugs on their permeability and maximum flux. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 30-34.
9. Rich P, Scher RK. An atlas of diseases of the nail. The Parthenon Publishing Group. 2003.
10. Niewerth M, Kortig HC. Management of onychomycoses. *Drugs* 1999; 58: 283-296.
11. Do CL in Scher RK. Psoriasis, Nails. <http://www.emedicine.com/DERM/topic363.htm> 2006.
12. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11 (3): 415-429.
13. Meis JFGM, Verweij PE. Current management of fungal infections. *Drugs* 2001; 61 Suppl.1: 13-25.
14. Gupta AK. Management of the toe onychomycosis: What is the potential for improving efficacy of treatment? *Clinics in Dermatology* 2002; 20: 607-609.
15. Gupta AK, Baran R. Ciclopirox nail lacquer solution 8 % in the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43 (4): 96-102.
16. Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. Guidelines for treatment of onychomycosis. *Brit J Derm* 2003; 148: 402-410.
17. Zaug M. Amorolfine nail lacquer: clinical experience in onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 1995; 4 (Suppl.1): 23-30.
18. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: penetration of chloramphenicol from lipophilic vehicles and a nail lacquer. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 241-245.
19. <http://www.penlac.com> 2006.
20. <http://www.tauruspharma.de> 2006.
21. Dubini F, Bellotti MG, Frangi A, Monti D, Saccomani L. In vitro antimycotic activity and nail permeation models of a piroctone olamine (octopirox) containing transungual water soluble technology. *Arzneimittelforschung* 2005; 55(8): 478-83.
22. Sweetman SC. Martindale 3-4Ed. Pharmaceutical Press. 2005.
23. <http://www.cerumol.com/mspc.htm> 2003.
24. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 866-872.
25. Kobayashi Y, Komatsu T, Sumi M, Numajiri S, Miyamoto M, Kobayashi D, Sugibayashi K, Morimoto Y. In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 471-477.
26. Torkar A. Vpliv keratinaze in ultrazvoka na permeacijo modelne učinkovine v noht. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, september 2005.
27. Malhotra GG, Zatz JL. Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. *Pharm Sci* 2002; 91: 312-323.
28. Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Tapia-Olguin P, Kalia YN, Buri P. The effect of keratolytic agents on the permeability of three imidazole antimycotic drugs through the human nail. *Drug Dev Ind Pharm* 1998; 24 (7): 685-690.
29. Sun Y, Liu JC, Kimbleton E in Wang, J. Antifungal treatment of nails. US Patent No. 5, 696, 164. 1997.
30. Kobayashi Y, Miyamoto M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolnaftate through the human nail plate. *Chem Pharm Bull* 1998; 46 (11): 1797-1802.
31. Friedrich J, Kern S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. *J Mol Cat Enzym* 2003; 21: 35-37.
32. Vignardet C, Guillaume YC, Friedrich J, Millet J. A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates. *Int J Pharm* 1999; 191 (2): 95-102.
33. Friedrich J, Gradišar H, Vrecl M, Pogačnik A. In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 36: 455-460.
34. Vignardet C, Guillaume YC, Michel L, Friedrich J, Millet J. Comparison of two hard keratinous substances submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Int J Pharm* 2001; 224 (1-2): 115-122.
35. Mohorčič M, Torkar A, Friedrich J, Kristl J, Murdan S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance unguinal drug delivery. *Int J Pharm* 2007; 322 (1-2): 196-201.

Genetika sindroma policističnih jajčnikov - vloga mikrosatelitskega polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG

Genetics of polycystic ovary syndrome - a role of microsatellite polymorphism (TAAAA)_n in the SHBG gene

Polonca Ferk, Teja Čelhar, Ksenija Geršak

Povzetek Sindrom policističnih jajčnikov (PCOS) je kompleksna bolezen, z izrazito heterogeno klinično sliko in verjetnim genetskim ozadjem. Hiperandrogenizem je ena od ključnih fenotipskih značilnosti PCOS. Med številnimi doslej predlaganimi kandidatnimi genetskimi polimorfizmi za PCOS je tudi mikrosatelitski polimorfizem (TAAAA)_n v promotorju gena *SHBG*. Gen *SHBG* nosi zapis za specifični vezavni globulin za spolne hormone (SHBG), kateri vpliva na delež biološko razpoložljivih androgenov, navedeni polimorfizem pa uravnava ekspresijo gena *SHBG*. V naši raziskavi na 118 bolnicah s PCOS in 108 zdravih prostovoljках smo ugotavljali morebitno povezavo polimorfizma (TAAAA)_n *SHBG* s serumskimi koncentracijami SHBG ter tako posredno s samim razvojem PCOS. Obe skupini preiskovank sta se značilno razlikovali po svojem biokemijskem in kliničnem profilu. Obravnavani polimorfizem se je izkazal za močan napovedni dejavnik serumskih koncentracij SHBG; daljši aleli so verjetno povezani z nižjimi serumskimi koncentracijami SHBG in s tem z večjim tveganjem za razvoj hiperandrogenizma pri PCOS. Polimorfizem (TAAAA)_n *SHBG* pa najbrž ni edini genetski dejavnik tveganja za razvoj celotnega spektra klinične slike PCOS, temveč gre verjetno za vpliv specifične kombinacije več različnih genetskih polimorfizmov v povezavi z nekaterimi dejavniki iz okolja.

Ključne besede: sindrom policističnih jajčnikov (PCOS), kandidatni geni za PCOS, polimorfizem (TAAAA)_n v genu *SHBG*

ABSTRACT: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex disease, with extremely heterogeneous clinical presentation and a possible genetic background. Hyperandrogenism is one of the key features in PCOS. Among numerous PCOS candidate genetic polymorphisms, the microsatellite polymorphism (TAAAA)_n in the promoter of the *SHBG* gene has also been proposed. The *SHBG* gene encodes for specific sex hormone binding globulin (SHBG), which influences the proportion of bioavailable androgens, and the polymorphism regulates the *SHBG* gene's expression. In the present study on 118 PCOS women and 108 healthy volunteers, possible associations of the (TAAAA)_n *SHBG* polymorphism with serum SHBG levels and with the development of PCOS were investigated. Both groups of patients differed significantly in their biochemical and clinical profiles. The polymorphism was ascertained to be a strong predictor for serum SHBG levels; longer alleles were associated with lower serum SHBG levels and thus with higher risks for hyperandrogenism in PCOS. Rather than the (TAAAA)_n *SHBG* polymorphism as the only genetic susceptibility factor, a specific combination of several genetic polymorphisms modified by environmental factors might be involved in the development of the whole spectrum of PCOS clinical picture.

Key words: polycystic ovary syndrome (PCOS), PCOS candidate genes, (TAAAA)_n *SHBG* polymorphism

1 Uvod

1.1 Klinična slika sindroma policističnih jajčnikov

Prva opredelitev sindroma policističnih jajčnikov (PCOS) sega v leto 1935, ko sta Stein in Leventhal opisala sočasno prisotnost morfološko policističnih jajčnikov (PCO) in amenoreje. Danes vemo, da se PCOS klinično ne odraža samo z motnjami v delovanju jajčnikov in s tem v reproduktivnem zdravju ženske, temveč da gre za kompleksno sistemsko bolezen, z izrazito heterogenim izražanjem (1).

Glede na najnovejše diagnostične kriterije (2) morata biti za postavitev diagnoze PCOS pri ženski izpolnjena (vsaj) dva od naslednjih treh kriterijev: (i) kronične oligoovulatorne ali anovulatorne motnje menstruacijskega ciklusa, ki se izražajo z oligomenorejo ali amenorejo, ter vodijo v zmanjšano plodnost oz. neplodnost; (ii) klinični hiperandrogenizem (čežmerna poraščenost po moškem tipu - t. i. hirsutizem, aknavost, plešavost po moškem tipu) in/ali patološko zvišane koncentracije androgenih hormonov v krvi (tj. biokemični hiperandrogenizem oz. hiperandrogenemija); (iii) PCO na ultrazvoku (3). Predhodno je potrebno izključiti druge možne etiologije:

hiperprolaktinemijo, Cushingov sindrom, neklasično kongenitalno adrenalno hiperplazijo, akromegalijo ter prisotnost tumorjev, ki prekomerno izločajo androgene.

Druge značilnosti klinične slike PCOS so tudi povišano razmerje serumskih koncentracij luteinizirajočega hormona (LH) in folikle stimulirajočega hormona (FSH) (razmerje > 2), presnovne motnje (inzulinska rezistenca, glukozna intoleranca, dislipidemije), debelost (zlasti trebušna) (4).

S prevalenco, ocenjeno na 5-10 % na različnih etničnih populacijah, je PCOS verjetno najpogostejša endokrina motnja pri ženskah v rodnem obdobju, medtem ko ima PCO (še) brez razvitih simptomov kar vsaka peta ženska v splošni populaciji. Poleg tega je PCOS vzrok za kar tri četrtine vseh primerov anovulatorne neplodnosti, pokriva pa tudi kar 90 % vseh vzrokov hirzutizma (1). Dolgoročne zdravstvene posledice bolnic s PCOS se odražajo predvsem z močno povečanim tveganjem za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 (5) ter srčno-žilnih obolenj (6) v kasnejšem življenjskem obdobju.

1.2 Patogeneza PCOS

Na molekularnem nivoju so za PCOS značilne naslednje patofiziološke spremembe: (i) v biosintezi, metabolizmu in/ali delovanju androgenov, (ii) v izločanju in/ali delovanju inzulina, (iii) na

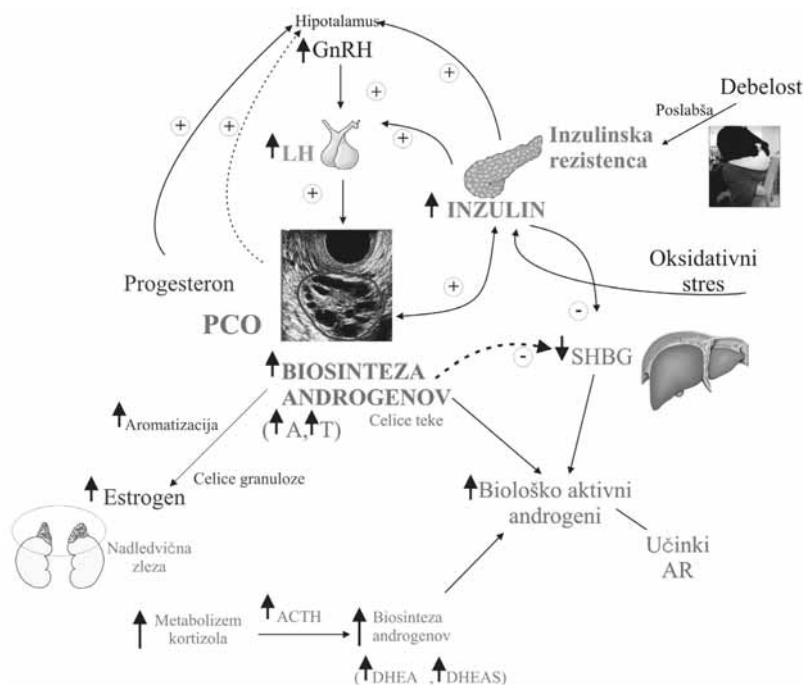
nivoju hipotalamično-hipofizne osi, (iv) v metabolizmu kortizola, (v) v metabolizmu lipidov, (vi) subklinični kronični vnetni procesi. Navedene biokemijske spremembe so medsebojno povezane (slika 1), izvor celotnega spektra motenj pa je najverjetneje v prekomerni biosintezi androgenov v jajčnikih (7).

Glede na ekstremno fenotipsko raznolikost in kompleksnost klinične slike PCOS je razvoj tega sindroma zelo verjetno posledica kompleksnega medsebojnega vpliva več različnih dejavnikov tveganja: genetskih dejavnikov (specifične genotipske kombinacije) in/ali dejavnikov okolja (način prehranjevanja, telesna dejavnost). Govorimo o multifaktorski patogenezi, ki pa kljub številnim raziskavam ostaja še vedno v veliki meri nepojasnjena (1).

1.3 Hiperandrogenizem pri PCOS

Na razvoj kliničnega hiperandrogenizma pri bolnicah s PCOS vplivajo: (i) hiperandrogenemija, (ii) povečan delež biološko razpoložljivih androgenov ter (iii) prekomerna odzivnost receptorja za androgene, zaradi česar so učinki androgenov lahko okrepljeni tudi v primeru njihovih normalnih krvnih koncentracij (1).

Hiperandrogenemija je pri bolnicah s PCOS v največji meri posledica prekomerne biosinteze androgenov v jajčnikih, delno pa tudi v nadledvični žlezi. Glede na to, da celice teke iz PCO ohranijo v



Slika 1: Patogeneza sindroma policističnih jajčnikov: A-androstendion; ACTH-adrenokortikotropni hormon; AR-androgeni receptor; DHEA-dehidroepiandrosteron; DHEAS-dehidroepiandrosteron sulfat; GnRH-sprostitutveni hormon za gonadotropine; LH-luteinizirajoči hormon; PCO-policistični jajčniki; SHBG-vezavni globulin za spolne hormone; T-testosteron; ↑-povišan, povečan; ↓-znižan, zmanjšan; črtkana črta-šibek učinek; znak + se nanaša na pozitiven, spodbujajoč učinek, znak - pa na negativen, zaviralni učinek.

Figure 1: Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: A-androstendione; ACTH-adrenocorticotropic hormone; AR-androgen receptor; DHEA-dehydroepiandrosterone; DHEAS-dehydroepiandrosterone sulfate; GnRH-gonadotropin-releasing hormone; LH-luteinizing hormone; PCO-polycystic ovaries; SHBG-sex hormone-binding globulin; T-testosterone; ↑-increased; ↓-decreased; broken line indicates weak influence; + indicates stimulatory effect; - indicates inhibitory effect.

pogojih *in vitro* stabilen biokemijski in molekularni fenotip (8), lahko gre za intrinzično motnjo na kateri od stopenj v procesu steroidogeneze. Nadalje je znano, da ima LH, katerega frekvenca in amplituda izločanja sta pri bolnicah s PCOS povečani, izrazito stimulirajoči učinek na biosintezo androgenov v jajčnikih. Steroidogenezo spodbuja tudi inzulin (ter inzulinu podobni rastni dejavniki), katerega koncentracije v krvi so pri ženskah s PCOS pogosto povišane. Učinek inzulina je neposreden ali preko okrepitev učinkov LH. Dodatni prispevek hiperinzulinemije h kliničnemu hiperandrogenizmu je tudi preko zaviranja biosinteze vezavnega globulina za spolne hormone (SHBG) v jetrih, kar posledično vodi do višjih koncentracij prostih androgenov v krvi. Presežek androgenov v lokalnem okolju jajčnikov prizadane dozorevanje jajčnih foliklov, kar pripelje do anovulacije. Krog biokemijskih sprememb se sklene, ko hiperandrogenija povratno spodbudi izločanje gonadotropinov iz hipofize (*slika 1*) (1).

Glede na najnovejšo predpostavko naj bi se hiperandrogeni fenotip za PCOS programiral že v predrojstnem obdobju, in sicer v primeru izpostavljenosti ploda presežku androgenov kot posledice lastnih (genetskih) dejavnikov tveganja in ne kot posledice metabolnih sprememb pri materi (9).

1.4 Genetika PCOS

Glede na pojavljanje PCOS v družinah imajo genetski dejavniki verjetno pomembno vlogo v patogenezi tega sindroma. Kompleksnost klinične slike PCOS podpira predpostavko o oligogenskem genetskem modelu (10).

Pod genetskimi dejavniki tveganja razumemo t. i. tvegane genetske polimorfizme, ki preko uravnavanja transkripcijske aktivnosti ciljnih genov, udeleženi v patogenetskih poteh pri PCOS, vplivajo na nivo izražanja teh genov. Doslej so že za številne genetske polimorfizme dokazali njihovo pomembno vlogo v patogenezi mnogih genetsko pogojenih boleznih pri človeku, s klasičnim primerom bolezni trinukleotidnih zaporedij. Tvegani genetski polimorfizmi so različnih tipov, najpogosteje polimorfizmi različnega števila tandemskih ponovitev (mikrosatelitski in minisatelitski polimorfizmi), v nekaterih primerih tudi polimorfizmi posameznih nukleotidov (11).

Na osnovi rezultatov analiz genske povezanosti so bili predlagani ter nato z asociacijskimi študijami ("primer-kontrola") in testi vezavnega neravnovesja v družinah analizirani že številni kandidatni geni in genetski polimorfizmi za PCOS (1, 12, 13). Najobetavnejši kandidatni geni za PCOS so navedeni v *preglednici 1*.

Kljub intenzivnim raziskavam genetskega ozadja PCOS in nekaterim obetajočim rezultatom ostaja z genetskega stališča velik delež kompleksnega spektra patofizioloških sprememb pri PCOS še nepojasnen. Doslej še za nobenega od predlaganih genetskih dejavnikov niso uspeli nedvoumno dokazati njegove vloge v nastanku PCOS. Prihodnost odkrivanja genetskih vzrokov PCOS je: (i) v študijah na čim večjem številu preiskovank (velike multicentrične študije) z natančno opredeljenimi kriteriji za vključitev v raziskavo, (ii) v uporabi statističnih metod, razvitih posebej za statistično obravnavo kompleksnih bolezni, kot je PCOS (14), (iii) v vrednotenju hkratnega vpliva več različnih kandidatnih genov na razvoj in posamezne fenotipske značilnosti PCOS ter (iv) v uporabi novih molekularno

genetskih pristopov, med katerimi trenutno največ obeta tehnologija mikromrež (15-19).

1.5 Mikrosatelitski polimorfizem (TAAA)n v promotorju gena SHBG

Gen *SHBG* (kromosomska lokacija 17p13-p12) nosi zapis za SHBG, specifičen plazemski prenašalni glikoprotein za spolne hormone. Serumske koncentracije SHBG vplivajo na biološko razpoložljivost in posledično na biološke učinke androgenov: pri nižji koncentraciji SHBG v serumu je delež prostih androgenov večji in biološki učinki androgenov močnejši. Na značilno raznolikost serumskih koncentracij SHBG med posamezniki vplivajo spol, starost, prehrabni, hormonski, metabolni dejavniki, v največji meri pa verjetno genetski dejavniki (20). Zvišane serumske koncentracije androgenov in inzulina znižujejo serumske koncentracije SHBG. Glede na rezultate dosedanjih študij so serumske koncentracije SHBG znižane (in s tem dostop prostih androgenov do tarčnih tkiv večji) pri bolnicah s hiperandrogenizmom, pri bolnicah s PCOS ter pri posameznikih, ki imajo večje tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 in za razvoj srčno-žilnih obolenj (21).

V neposredni bližini 5'- konca promotorja gena *SHBG*, znotraj zaporedja *Alu*, so nedavno odkrili mikrosatelitski polimorfizem

Preglednica 1 : Kandidatni geni za PCOS

Table 1: PCOS candidate genes

1) Geni, udeleženi v biosintezi, metabolizmu oz. delovanju androgenov
• geni za steroidogene encime (npr. geni <i>CYP11A</i> , <i>CYP17</i> , <i>CYP19</i> , <i>CYP21</i>)
• gen za androgeni receptor (gen <i>AR</i>)
• gen za vezavni globulin za spolne hormone (gen <i>SHBG</i>)
2) Geni, udeleženi v izločanju oz. delovanju inzulina
• gen za inzulin (gen <i>INS</i>)
• gen za inzulinski receptor (gen <i>INSR</i>)
• geni za substrate na inzulinskem receptorju (gena <i>IRS-1</i> , <i>IRS-2</i>)
• gen za kalpain 10 (gen <i>CAPN10</i>)
• gen za inzulinu podoben rastni dejavnik 2 (gen <i>IGF2</i>)
3) Geni, udeleženi v sproščanju, uravnavanju oz. delovanju gonadotropinov
• gen za luteinizirajoči hormon (gen <i>LH</i>)
• gen za receptor za LH
• gen za folistatin
4) Geni, vključeni v presnovne procese v maščobnem tkivu
• gen za leptin
• gen za receptor za leptin
• gen <i>PPARγ</i> (angl. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>)
• gen za adiponektin
• gen za inhibitor plazminogenskega aktivatorja 1 (gen <i>PAI-1</i>)
5) Drugi geni
• gen za receptor za dejavnik tumorske nekroze (gen <i>TNFR</i>)
• gen za paraoksonazo (gen <i>PON1</i>)
• geni za različne interlevkine

(TAAAA)_n, ki naj bi v povezavi z nekaterimi drugimi bližnjimi genetskimi označevalci uravnaval izražanje gena *SHBG* *in vitro* (22) in posledično vplival tudi na serumske koncentracije SHBG. Doslej so opisali šest alelnih različic (TAAAA)_n *SHBG*, in sicer alelne različice s 6, 7, 8, 9, 10 in 11 ponovitvami TAAAA (23, 24).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali mikrosatelitski polimorfizem (TAAAA)_n v promotorju gena *SHBG* vpliva na serumske koncentracije SHBG ter na razvoj PCOS v slovenski populaciji preiskovank. S tem smo želeli razširiti dosedanje znanje o genetskem ozadju hiperandrogenizma pri PCOS in dodati nov prispevek k razumevanju mehanizmov nastanka te bolezni.

2 Materiali in metode

2.1 Preiskovanke

V študijsko skupino smo vključili 118 bolnic s potrjeno diagnozo PCOS (2). Vse bolnice so imele motnje menstruacijskega ciklusa (oligomenoreja ali amenoreja), PCO na ultrazvoku (3), razmerje serumskih koncentracij LH/FSH > 2 in vse so bile biokemično in/ali klinično hiperandrogene. Klinično smo hiperandrogenizem opredelili s prisotnostjo hirzutizma (indeks po Ferriman-Gallwey \geq 8) in/ali aknavosti, biokemijsko pa z zvišanimi serumskimi koncentracijami celokupnega testosterona (Tsk), dehidroepiandrosteron sulfata in/ali androstendiona. Pri bolnicah, ki so imele serumske koncentracije Tsk višje od 4,8 nmol/L, so bili s predhodno klinično obravnavo izključeni drugi možni vzroki hiperandrogenizma (3).

Kontrolno skupino je sestavljalo 108 zdravih prostovoljk z izključeno diagnozo PCOS. V polovici primerov so bile ženske v kontrolni skupini zdrave nosečnice, ki so spontano zanosile (dokazana plodnost), v drugi polovici primerov pa ženske, sicer vključene v postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo, vendar izključno zaradi mehanskega vzroka neplodnosti ali zaradi neplodnosti moškega partnerja. Nobena od preiskovank v kontrolni skupini v preteklosti ni imela endokrinih in avtoimunskih bolezni ter operacij v medeničnem predelu.

Vse preiskovanke so bile mlade ženske (starost primerljiva med obema skupinama), kavkazijske rase in med seboj niso bile v sorodu. Obravnavane so bile v sklopu redne ambulantne dejavnosti, z rutinskimi postopki na Ginekološki kliniki v Ljubljani, v letih 2002-2005. V raziskavi so sodelovale prostovoljno, na podlagi pisne privolitve, po predhodni seznanitvi z namenom odvzema krvi za genetsko analizo in s potekom dela naše raziskave.

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 97/05/01).

2.2 Materiali in metode

Biokemijske analize

V serumskih vzorcih, odvzetih v zgodnji folikularni fazi menstruacijskega ciklusa oz. naključno pri bolnicah z amenorejo, smo določali koncentracije SHBG in Tsk (opravljeno na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani). Za merjenje koncentracij SHBG smo uporabili kemoluminiscenčno imunometrično reakcijo (SHBG-Immulate; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles,

ZDA), za Tsk pa radioimunski test s tržno dostopnim kompletom TESTO-CTK (DiaSorin, Saluggia, Italija). Koeficienti variacije znotraj posamezne serije ter med različnimi serijami so bili za oba analita v območju med 3 % in 11 %.

Za vse preiskovanke smo izračunali indeks telesne mase (ITM) po splošni formuli: $ITM = \text{telesna masa [kg]} / (\text{telesna višina})^2 [m^2]$.

Molekularno genetske metode

Preiskovankam smo odvzeli po 5 ml periferne krvi v sterilne epruvete z 1/10 antikoagulant EDTA. Genomsko DNA smo pri vseh preiskovankah izolirali iz levkocitov polne periferne krvi s pomočjo tržno dostopnega kompleta *FlexiGene DNA kit 250* (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija), v skladu z navodili proizvajalca. Reakcijska raztopina za reakcijo PCR je v končnem volumnu 15 μ L vsebovala naslednje komponente v navedenih končnih koncentracijah oz. količinah: 90 °C ng genomske DNA, 0,2 μ M vsakega od začetnih oligonukleotidov (5'-GAA CTC GAG AGG CAG AGG CAG CAG TGA-3' in 5'-AGA AAT CAC CCA CTC CCT GA-3'), 0,2 mM vsakega od dNTP-jev, 1-kratni pufer za PCR (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, ZDA), 1,5 mM MgCl₂ ter 1 enoto encima polimeraze DNA *AmpliTaq Gold™* (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Reakcijski pogoji so bili sledeči: začetni 10-minutni denaturaciji pri 95 °C je sledilo 30 ciklov s 45 sekund trajajočo denaturacijo pri 94 °C, 45-sekundnim prilaganjem začetnih oligonukleotidov pri 63 °C in podaljševanjem verige DNA 1 minuto pri 72 °C; zaključno podaljševanje na novo sintetizirane verige DNA pa je potekalo 7 minut pri 72 °C.

Različno dolge produkte reakcije PCR smo ločevali z elektroforezo na tržno dostopnih gelih *Spreadex™ EL400 Mini* v elektroforeznem aparatu *SEA 2000* (Elchrom Scientific, Cham, Švica), v skladu z navodili proizvajalca (pri 55 °C, 141 minut). Fragmente DNA smo obarvali z barvilom *Syber Gold* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) in rezultate preverili pod ultravijolično svetlobo. Na število ponovitev osnovnega motiva smo sklepali iz dolžin pomnoženih fragmentov DNA, izmerjenih glede na označevalec velikosti M3 (Elchrom Scientific, Cham, Švica) ter glede na notranji standard. Slednjega smo predhodno pripravili z neposrednim sekveniranjem šestih različno dolgih produktov reakcije PCR, dolžine 133 bp, 138 bp, 143 bp, 148 bp, 153 bp in 158 bp, kar ustreza številu ponovitev TAAAA 6-11 (opravljeno v Laboratoriju za molekularno genetiko na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani).

Statistična analiza

Test χ^2 smo uporabili za statistično vrednotenje razlik v frekvencah alelov in genotipov med študijsko in kontrolno skupino preiskovank ter v primeru ugotavljanja Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Za primerjavo povprečnih vrednosti ITM, serumskih koncentracij Tsk in SHBG med dvema različnima skupinama preiskovank smo uporabili Studentov t-test, za primerjavo povprečnih vrednosti serumskih koncentracij SHBG med tremi različnimi skupinami preiskovank pa test analize variance (ANOVA). Nelinearne povezave med posameznimi parametri smo opredelili s Spearmanovimi koeficienti korelacije, linearne povezave pa s Pearsonovimi koeficienti korelacije. Za napovedovanje serumskih koncentracij SHBG smo uporabili ustrezen linearni regresijski model, za napovedovanje statusa PCOS

(prisotnost/odsotnost PCOS) pa ustrezno logistično regresijsko analizo.

Vse statistične analize smo opravili z računalniškim programom za statistično analizo *SPSS for Windows*, verzija 12.0 (SPSS Inc., Illinois, ZDA). Merilo za statistično značilno različnost je bila vrednost $p < 0,05$.

3 Rezultati in razprava

3.1 Biokemijski in klinični profil preiskovank

Bolnice s PCOS so imele v primerjavi s preiskovankami v kontrolni skupini značilno nižje serumske koncentracije SHBG ($p < 0,001$). Značilno nižane serumske koncentracije SHBG pri ženskah s PCOS navajajo tudi v predhodnih študijah (23, 24). Nadalje so imele naše bolnice značilno višji ITM ($p < 0,001$) in značilne višje serumske koncentracije Tsk ($p < 0,001$), kar je potrditev značilnih lastnosti klinične slike PCOS. Rezultati so prikazani v preglednici 2.

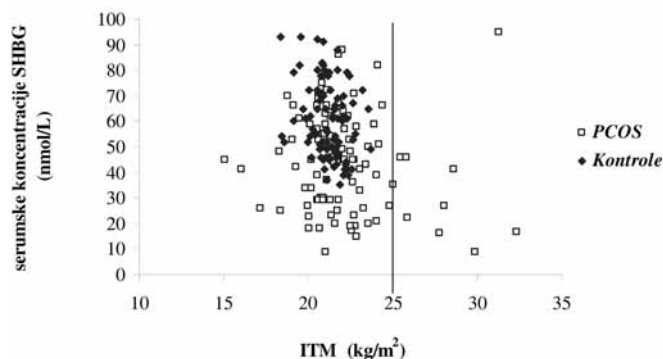
Vse ženske v kontrolni skupini so bile vitke ($18 \text{ kg/m}^2 \leq \text{ITM} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), medtem ko je 13,6 % bolnic imelo telesno težo prekomerno ($\text{ITM} > 25 \text{ kg/m}^2$), preostale bolnice pa so bile vitke. Glede na predhodna klinična opažanja debelost pri bolnicah s PCOS značilno poslabša klinično sliko (1), kar smo s preverjanjem povezanosti ITM-ja s serumskimi koncentracijami Tsk in SHBG poskušali delno opredeliti tudi za naše preiskovanke. V skupini bolnic sta bila parametra ITM in serumske koncentracije Tsk značilno pozitivno korelirana ($R = 0,276$; $p = 0,002$), medtem ko serumske koncentracije SHBG v splošnem niso bile značilno povezane z ITM niti v študijski niti v kontrolni skupini. Iz slike 2 je razvidno, da se pri ITM v normalnem območju serumske koncentracije SHBG v obeh skupinah gibljejo v relativno širokem razponu, medtem ko smo pri bolnicah s prekomerno telesno težo opazili težnjo k nižjim serumskim koncentracijam SHBG. Slednje opažanje, katerega zaradi premajhnega števila bolnic s prekomerno telesno težo sicer nismo mogli ustrezno statistično ovrednotiti, nasprotuje izsledkom predhodne študije na francoski populaciji bolnic s PCOS (s hirutizmom) (24), v kateri sicer ugotavljajo značilno negativno korelacijo med serumskimi koncentracijami SHBG in ITM, vendar je le-ta omejena na vitke bolnice (z $\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$).

Na osnovi zgornjih rezultatov ocenjujemo, da bi debelost pri naših bolnicah lahko bila pomemben dejavnik za poslabšanje tako

Preglednica 2: Povprečne vrednosti (\pm SD) nekaterih parametrov v skupini bolnic s PCOS ter v kontrolni skupini preiskovank

Table 2: Mean values (\pm SD) of some parameters in PCOS and control patients

	Bolnice	Kontrole	p
SHBG (nmol/L)	44,4 \pm 19,1	61,0 \pm 14,7	< 0,001
Tsk (nmol/L)	3,0 \pm 1,3	1,2 \pm 0,4	< 0,001
ITM (kg/m^2)	22,3 \pm 3,1	21,2 \pm 1,1	0,001



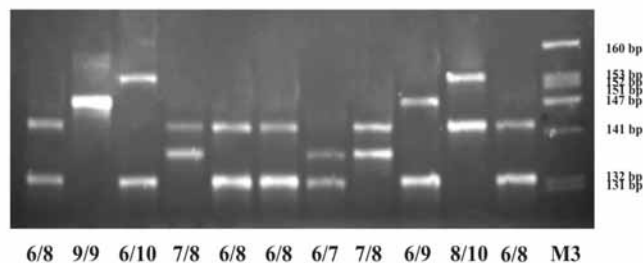
Slika 2: Odvisnost serumskih koncentracij SHBG od ITM

Figure 2: Serum SHBG levels in relation to BMI

biokemičnega kot tudi kliničnega hiperandrogenizma, vendar bi bilo za dokončne zaključke v raziskavo potrebno vključiti mnogo večje število preiskovank.

3.2 Molekularno genetska analiza polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG

Pri naših preiskovankah smo ugotovili prisotnost alelov SHBG s 6, 7, 8, 9, 10 in 11 ponovitvami TAAAA ter 18 različnih (od 21 možnih) genotipov (TAAAA)_n SHBG (preglednica 3). Genotipske frekvence v obeh skupinah preiskovank so bile v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Primer rezultata molekularno genetske analize polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Primer identifikacije genotipov (TAAAA)_n SHBG: Slikano pod ultravijolično svetlobo (254 nm) po elektroforezni ločitvi produktov PCR na gelih Spreadex™ EL400 Mini in barvanju z barvilom Syber Gold (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); genotipi SHBG so označeni kot število ponovitev TAAAA na obeh alelih SHBG; M3-označevalec velikosti (Elchrom Scientific, Cham, Švica).

Figure 3: An example of the (TAAAA)_n SHBG genotype identification: The picture was taken under the ultraviolet light (254 nm) after the electrophoresis of PCR products on Spreadex™ EL400 Mini gels and after the staining with Syber Gold dye (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); the genotypes are designated as the number of TAAAA repeats on both of the two SHBG alleles. M3-marker (Elchrom Scientific, Cham, Switzerland).

Preglednica 3: Frekvence alelov in genotipov (TAAAA)_n SHBG v skupini bolnic s PCOS ter v kontrolni skupini preiskovank: Aleli so označeni s 6-11, kar ustreza številu ponovitev TAAAA.

Table 3: The (TAAAA)_n SHBG allele and genotype frequencies in PCOS and control group of patients: The alleles are designated as 6-11, indicating the number of TAAAA repeats.

Frekvence alelov (TAAA) _n SHBG (%)						
	6	7	8	9	10	11
PCOS	27,1	4,9	31,1	27,1	9,8	0
Kontrole	31,4	6,4	30,9	20,4	9,1	1,8

Frekvence genotipov (TAAA) _n SHBG (%)																		
	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	7/8	7/9	7/10	7/11	8/8	8/9	8/10	8/11	9/9	9/10	9/11	10/10
PCOS	7,3	5,7	18,7	10,6	6,5	0	3,3	2,4	0,8	0	10,6	13	5,7	0	11,4	4,9	0	0,8
Kontrole	10,9	4,5	18,2	12,7	4,5	0,9	3,6	0,9	2,7	0,9	10	14,5	4,5	0,9	3,6	4,5	0,9	0,9

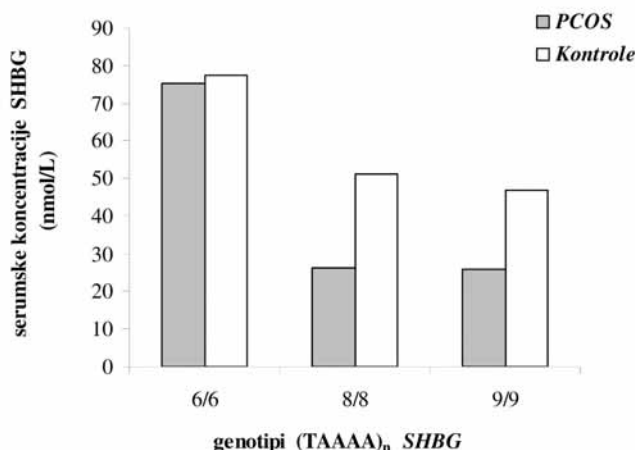
Medtem ko je v skupini zdravih preiskovank prisotnih več krajših alelov SHBG (alelov s 6 in 7 ponovitvami TAAAA), je v skupini bolnic prisotnih več daljših alelov SHBG (alelov z 8, 9 in 10 ponovitvami TAAAA), vendar pa med obema skupinama preiskovank razlika v porazdelitvi posameznih alelov ni dosegla statistične značilnosti ($p = 0,169$). Glede na pomanjkanje informacij v zvezi s tem, kateri od obeh alelov SHBG v paru se prednostno izraža (25-27), smo naredili logistično regresijo z napovednima parametroma SHBGk (število ponovitev TAAAA na krajšem od obeh alelov SHBG v paru) in SHBGd (število ponovitev TAAAA na daljšem od obeh alelov SHBG v paru) ter statusom PCOS (prisotnost oz. odsotnost PCOS) kot izidom. Pokazalo se je, da parametra SHBGk in SHBGd nista značilna za PCOS ($p = 0,225$ za SHBGk in $p = 0,860$ za SHBGd). Ob primerjavi porazdelitev povprečnih vrednosti števila ponovitev za vsak posamezen genotip (par alelov) (SHBGp) med študijsko in kontrolno skupino preiskovank prav tako nismo ugotovili statistično pomembnih razlik ($p = 0,628$). Sklepamo, da navedeni polimorfizem ni ključen dejavnik tveganja za sam razvoj PCOS oz. je njegov vpliv prešibek, da bi ga lahko zaznali pri naši velikosti vzorca preiskovank. Za razliko od naših rezultatov pa navajajo značilno večjo frekvenco alelov oz. genotipov SHBG z več kot 8 ponovitvami TAAAA za 185 Grkinj s PCOS (23).

3.3 Vpliv polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG na serumske koncentracije SHBG

Tako v študijski kot tudi v kontrolni skupini preiskovank je bila korelacija med serumskimi koncentracijami SHBG in genetskim parametrom SHBGp statistično značilno negativna ($p < 0,001$ za obe skupini preiskovank). Linearna regresija s serumskimi koncentracijami SHBG kot odvisno spremenljivko, genetskim parametrom SHBGp kot napovednim parametrom in ITM kot možnim motečim dejavnikom je pokazala, da tako pri bolnicah s PCOS kot tudi v kontrolni skupini preiskovank analizirani genetski parameter z visoko značilnostjo napoveduje serumske koncentracije SHBG ($p < 0,001$ v obeh skupinah); natančneje, genotipi SHBG z večjim številom ponovitev TAAAA na obeh alelih značilno napovedujejo nižje serumske koncentracije SHBG. Z uporabljenim regresijskim modelom smo uspeli pojasniti kar 55,3 % (prilagojena vrednost R^2) raznolikosti v serumskih koncentracijah SHBG v skupini bolnic ter 33,1 % v kontrolni

skupini. Rezultate o značilnem negativno koreliranem odnosu med polimorfizmom (TAAAA)_n SHBG in serumskimi koncentracijami SHBG pri bolnicah s PCOS navajajo tudi v študiji, v katero so bile vključene 303 Francozinje s hirutizmom, med katerimi je bilo 154 bolnic s PCOS (24), ter za 185 Grkinj s PCOS (23). Zanimivo je, da so rezultati naše študije in doslej objavljenih študij *in vivo* v nasprotju z rezultati študije *in vitro* na človeških hepatoblastomskih celicah HepG2; v slednji so namreč ugotovili, da imajo konstrukti SHBG s 6 ponovitvami značilno manjšo transkripcijsko aktivnost kot konstrukti s 7-10 ponovitvami TAAAA (22).

V nadaljevanju smo zaradi pomanjkljivih podatkov glede prednostnega izražanja alelov (TAAAA)_n SHBG (26-28) ter zaradi relativno nizkih frekvenc pojavljanja nekaterih genotipov obravnavali le homozigotne genotipe z relativno visoko pojavnostjo: tj. genotipe 6/6, 8/8 in 9/9. Frekvenca genotipa 6/6 je bila v skupini bolnic s PCOS



Slika 4: Serumske koncentracije SHBG v odvisnosti od homozigotnega genotipa (TAAAA)_n SHBG: Genotipi so zapisani kot število ponovitev TAAAA na obeh alelih SHBG.

Figure 4: Serum SHBG levels in relation to the (TAAAA)_n SHBG homozygous genotypes: The genotypes are designated as the number of TAAAA repeats on both of the two SHBG alleles.

opazno nižja, frekvenca genotipa 8/8 primerljiva in frekvenca genotipa 9/9 opazno višja v primerjavi z ustreznimi frekvencami v kontrolni skupini (preglednica 3). Za obe skupini preiskovank je odvisnost serumskih koncentracij SHBG od homozigotnega genotipa (TAAAA)_n SHBG prikazana na sliki 4. V primeru genotipa 6/6 v serumskih koncentracijah SHBG ni bilo značilnih razlik med bolnicami s PCOS in ženskami iz kontrolne skupine ($p = 0,756$), medtem ko je bila razlika značilna v primeru genotipov 8/8 ($p < 0,001$) in 9/9 ($p < 0,001$). Sklepamo lahko, da na serumske koncentracije SHBG pri PCOS v primeru genotipov z daljšimi aleli poleg genotipa v znatni meri vplivajo še drugi patogenetski dejavniki. Nadalje smo opazili, da so bile znotraj obeh skupin preiskovank razlike v serumskih koncentracijah SHBG med genotipi 6/6, 8/8 in 9/9 visoko značilne ($p < 0,001$ za obe skupini), in sicer v primeru genotipa 6/6 značilno višje glede na genotipa 8/8 in 9/9, med genotipoma 8/8 in 9/9 pa primerljive. Dejanski vpliv alelov SHBG z 8 ponovitvami TAAAA na serumske koncentracije SHBG bi lahko prikrila različica D327N v eksonu 8 gena SHBG, ki je v močnem vezavnem neravnovesju z alelom (TAAAA)₈ in za katero so ugotovili, da značilno podaljša biološko razpolovno dobo SHBG v serumu (24).

4 Sklep

V raziskavi na specifičnem vzorcu slovenskih bolnic s PCOS ugotovljamo, da je mikrosatelitski polimorfizem (TAAAA)_n v promotorju gena SHBG pomemben napovedni dejavnik serumskih koncentracij SHBG; daljši aleli so povezani z nižjimi serumskimi koncentracijami SHBG in s tem z večjim tveganjem za razvoj hiperandrogenizma pri PCOS. Čeprav je vpliv obravnavanega polimorfizma na serumske koncentracije SHBG značilno močnejši pri bolnicah, je izražen tudi pri zdravih ženskah v kontrolni skupini. Sklepamo, da polimorfizem (TAAAA)_n SHBG ni edini genetski dejavnik tveganja za razvoj klinične slike PCOS, temveč da gre najverjetneje za vpliv specifične kombinacije več različnih genetskih polimorfizmov v povezavi z nekaterimi dejavniki iz okolja.

Uspešno odkritje genetskih vzrokov PCOS obeta v prihodnosti vpeljavo novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov, možnost genetskega svetovanja in s tem izboljšanje celostne obravnave bolnic s PCOS, še zlasti možnost določanja individualnega profila genetskih dejavnikov tveganja in s tem prilagoditev klinične obravnave za vsako bolnico posebej (28). Za vse ženske v tej skupini je značilen urejen menstruacijski cikel s hkratno odstotnostjo kliničnih in biokemijskih znakov hiperandrogenizma ter z odstotnostjo PCO.

5 Seznam okrajšav

PCOS	sindrom policističnih jajčnikov (<i>angl. Polycystic Ovary Syndrome</i>)
PCO	policistični jajčniki (le morfološko) (<i>angl. Polycystic Ovaries</i>)
SHBG	vezavni globulin za spolne hormone (<i>angl. Sex Hormone – Binding Globulin</i>)
LH	luteinizirajoči hormon
FSH	folikle stimulirajoči hormon
Tsk	celokupni testosteron
ITM	indeks telesne mase

DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. DeoxyriboNucleic Acid</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. Polymerase Chain Reaction</i>)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (<i>angl. DeoxyriboNucleotide TriPhosphate</i>)
A, C, T, G	adenin, citozin, timin, gvanin
EDTA	etilendiamintetraoacetna kislina (<i>angl. EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
M	molarna koncentracija
SHBG	oznaka za gen, ki nosi zapis za vezavni globulin za spolne hormone
SHBGk	število ponovitev TAAAA na krajšem od obeh alelov SHBG v paru
SHBGd	število ponovitev TAAAA na daljšem od obeh alelov SHBG v paru
SHBGp	povprečno število ponovitev za posamezen genotip (par alelov) SHBG

6 Literatura

- 1) Fratantonio E, Vicari E, Pafumi C, Calogero AE. Genetics of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 713-720.
- 2) The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81: 19–25.
- 3) Balen A, Conway GS, Homburg R, Legro RS. Polycystic ovary syndrome: a guide to clinical management; Defining the polycystic ovary syndrome. Taylor & Francis group, 2005: 7-22.
- 4) Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol* 1989; 30: 459–470.
- 5) Legro RS, Kunselman A, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 165-169.
- 6) Orio F Jr, Palomba S, Spinelli L et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3696-3701. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5621.
- 7) Strauss JF 3rd. Some new thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 42-48.
- 8) Gharani N, Waterworth DM, Batty S et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 397-402.
- 9) Developmental origin of polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *J Endocrinol* 2002; 174: 1-5.
- 10) Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5: 69-76.
- 11) Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics; Instability of the human genome: mutation and DNA repair.* Garland Science (Taylor & Francis Group), 2003: 316-349.
- 12) Amato P, Simpson JL. The genetics of polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 707-718.

- 13) Urbaneck M, Legro RS, Driscoll DA et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 8573-8578.
- 14) Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 983-989.
- 15) Wood JR, Nelson VL, Ho C et al. The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* 2003; 278: 26380-26390.
- 16) Diao FY, Xu M, Hu Y et al. The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 59-72.
- 17) Jansen E, Laven JS, Dommerholt HB et al. Abnormal gene expression profiles in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 3050-3063.
- 18) Wood JR, Ho CK, Nelson-Degrave VL et al. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 2004; 63: 51-60.
- 19) Oksjoki S, Soderstrom M, Inki P et al. Molecular profiling of polycystic ovaries for markers of cell invasion and matrix turnover. *Fertil Steril* 2005; 83: 937-944.
- 20) Ukkola O, Rankinen T, Gagnon J et al. A genome-wide linkage scan for steroids and SHBG levels in black and white families: the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3708-3720.
- 21) [OMIM*182205](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM). On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- 22) Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)_n repeat element within an Alu sequence. *J Biol Chem* 2001; 276: 36383-36390.
- 23) Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikyriakidou A, Georgiou I. Association of the (TAAAA)_n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5976-5980.
- 24) Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H et al. Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 917-924.
- 25) Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M et al. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest* 2002; 109: 973-981.
- 26) Hilpert J, Vorum H, Burmeister R et al. Efficient eukaryotic expression system for authentic human sex hormone-binding globulin. *Biochem J* 2001; 360: 609-615.
- 27) Jänne M, Deol HK, Power SGA et al. Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 123-136.
- 28) Franks S. Genetic and environmental origins of obesity relevant to reproduction. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 526-531.

Novice iz sveta farmacije

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

Cepivo proti humanemu Papiloma virusu

Borut Štukelj

Po 11 letih intenzivnega raziskovanja je na tržišču EU cepivo proti humanemu papiloma virusu (HPV). S tem so dobile ženske možnost zaščite proti nekaterim sevom HPV in posledično proti prekomernemu razrastu (displazija) celic materničnega vratu, kar je pogosto vodilo do razvoja raka na materničnem vratu. Cepivo nudi dobro zaščito proti 4 tipom HPV (tipi 6, 11, 16, 18), ki so odgovorni za 70 % raka na materničnem vratu ter 90 % genitalnih bradavic. Pridobljeno je s tehnologijo rekombinantne DNA. Genski zapis za proteine L1 so izrazili v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, jih očistili, dodali adjuvans za povečanje imunskega odziva in pripravili končno obliko cepiva.

Cepivo priporočajo enajstletnim do dvanajstletnim dekletom, ob prvem vnosu cepiva pa je starost deklet lahko tudi samo 9 let, uporablja pa se lahko tudi za spolno aktivne ženske v starosti do 36 let, čeprav je optimalen čas cepljenja pred prvim spolnim stikom. Spolno aktivne ženske, ki še niso bile v stiku s HPV, bodo razvile popolno imunost na tipe 6, 11, 16 in 18, ostale pa, ki so že bile v stiku s katerikoli tipom HPV, razvijejo po aktivnem cepljenju imunost proti tipom HPV, s katerimi še niso bile okužene.

Zaenkrat še ni popolnoma jasno, ali je zaščita doživljenjska. Trenutno so znani rezultati le za obdobje petih let. Na osnovi poglobljenih kliničnih študij na 20.000 preiskovankah, lahko zatrdimo, da je cepivo varno. Najpogostejši neželeni učinek je rdečina in otekline na mestu vboda (običajno na ramenu), nekoliko redkejši neželeni učinek pa je glavobol, povišana telesna temperatura in bolečine v mišicah, z znaki, podobnimi kot pri nekaterih virusih. Med 8487 žensk, ki so bile cepljene s cepivom proti HPV, ni bilo nobenega primera displastičnih sprememb materničnega vratu hude stopnje, medtem, ko se je pri 8460 ženskah, ki so prejemale placebo pripravek, pri 0,6 % (v 53 primerih) razvila displazija. Podobne podatke lahko zasledimo pri kliničnih študijah, pri katerih so preiskovali pogostost nastanka bradavic na spolovilu: v skupini, ki je bila podvržena cepljenju, je med 7897 udeleženkami le ena razvila bradavice, v placebo skupni (7899 udeleženk študije), pa je obolelo v razdobju 4 let za bradavicami 91 žensk.

Cepljenje je potrebno izvajati trikrat: prva ponovitev sledi dva meseca, tretja pa šest mesecev po začetku cepljenja. V primeru alergije na snovi iz kvasnih celic ali v primeru nosečnosti se cepljenje ne izvaja.

In kako je s cepljenjem v okviru nacionalnih programov? Verjetno bo na eni od naslednjih sej Zdravstveni svet pri Ministrstvu za zdravje RS obravnaval tudi program cepljenja proti HPV, vprašanje pa je, kdaj bi se, glede na visoko ceno, cepljenje začelo zares izvajati. V okviru *Gold Coast City Council* programa bo Avstralska vlada aprila 2007

pričela s cepljenjem prvih 20.000 deklic v starosti med 11. in 12. letom. Cepivo je julija 2006 pridobilo dovoljenje za promet tudi v ZDA. Verjetno se bo večina razvitih držav kmalu odločila za sistematsko cepljenje, saj je trenutno na svetu 2,3 milijona žensk z rakom materničnega vratu, dnevno pa jih umre 800.

Viri:

1. Center for Disease Control and Prevention and Gynecologic Cancer Foundation, Press Release 12/2006
2. Povzetek EPAR za javnost: EMEA/H/C/703
3. National Cancer Institute, News, February 2007

3. simpozij »Izzivi laboratorijske medicine«: Dodana vrednost in spreminjajoča se vloga laboratorijske medicine«.

Milan Skitek

13. oktobra 2006 smo imeli v Kliničnem Centru 3. simpozij z mednarodno udeležbo »Izzivi laboratorijske medicine« z naslovom: Dodana vrednost in spreminjajoča se vloga laboratorijske medicine. Kot prejšnja dva simpozija v letih 2002 in 2004 je bil tudi ta simpozij posvečen spominu prof.dr. Nika Jesenovca v tradicionalni organizaciji Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) iz Kliničnega centra v Ljubljani, letos prvič pa tudi v sodelovanju s Katedro za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani, s Slovenskim združenjem za klinično kemijo in z Zbornico laboratorijske medicine Slovenije. Poleg uglednih predavateljev smo lahko med seboj pozdravili tudi generalno direktorico Kliničnega centra mag. Darinko Miklavčič, ki je pozdravila simpozij z uvodnimi mislimi o pomembnosti našega dela in prizadevanj za čimvišjo dodano vrednost. in državnega sekretarja odgovornega za investicije na Ministrstvu za zdravje prim. mag. Jožeta Arzenška.

Če sta bila prva dva simpozija bolj "ozko" usmerjena (prvi namenjen vlogi homocisteina in drugi zunanji presojo kakovosti) je bil 3. simpozij zastavljen zelo široko, ker smo se podali tudi na področje menedžmenta in spremenjene vloge naše stroke. V našem prostoru je laboratorijska medicina skladno z mednarodnimi trendi v zadnjih letih nedvomno tehnološko izredno napredovala in se kadrovsko okrepila. Problemi ostajajo na ravni njene povezanosti predvsem znotraj nje same. Prav v tej povezanosti in integraciji v zdravstveni sistem je iskati naše možnosti za prihodnost, ki v ekonomskem smislu ne bo prizanašala nikomur. 3. simpozij KIKKB se je vključil v izobraževanje in lasten doprinos na tem hitro razvijajočem se

področju z željo opredeliti mesto, vlogo in vizijo laboratorijske medicine v zdravstvenem sistemu. Cilj simpozija je bil povezati izvajalce in uporabnike laboratorijske medicine v smislu večje učinkovitosti stroke in boljše oskrbe bolnikov ter približati in afirmirati to dejavnost širši javnosti. Zato je bil namenjen predvsem zdravstvenim delavcem, sodelavcem in osveščeni javnosti kot tradicionalno srečanje in stičišče strokovnjakov ter stroke z mednarodnim obeležjem.

Program simpozija je zajemal praktično vsa področja laboratorijske medicine od menedžementa, etike, testiranja pri pacientu, avtomatizacije in konsolidacije laboratorijev, interpretacije rezultatov testiranj do uvajanja novih tehnologij na področju laboratorijske medicine. Spremljali smo odlična predavanja s priznanimi strokovnjaki na omenjenih področjih. Prav tako pa so bile zanimive razprave, ki so sledile 20 predavanjem in ki so se nadaljevale še v odmorih.

Simpoziju je prisostvovalo preko 150 udeležencev iz vseh regij Slovenije, med njimi so bili najštevilnejši predstavniki laboratorijske medicine in zdravniki, prisotni pa so bili tudi predstavniki industrije (farmacije in laboratorijske diagnostike). Zahvaljujemo se vsem poslovnim partnerjem, ki so omogočili naše druženje, ki prerašča iz skromnih začetkov v odmeven in osrednji dogodek na področju laboratorijske medicine v Sloveniji.

Simpozija se bomo spominjali ne samo po odličnih predavanjih (http://www.kclj.si/kikkb/izobrazevanje/izzivi/program_izzivi.htm), številni udeležbi in povezovalni funkciji, ampak tudi zato, ker je minil (navkljub datumu 13.10. in še petku po vrhu) v sproščenem in ustvarjalnem okolju. Ocene, ki smo jih dobili tako ustno kot pismeno, so bile izredno naklonjene (»nad vsemi pričakovanji«, »med najboljšimi dogodki zadnjih let«, drugačen in aktualen simpozij« itd.) in predstavljajo nagrado za vse sodelujoče. Predstavljajo pa ti pozitivni odzivi tudi obveznost za prihodnost, zato smo se vztrajni udeleženci v poznih petkovih večernih urah razšli z zaobljubo: Vidimo se na 4. dvodnevem simpoziju »Izzivi laboratorijske medicine«, še boljše od prejšnjih in z »višjo dodano vrednostjo«.

10 let delovanja Komisije za slovenski dodatek k Evropski farmakopeji

Mirjana Gašperlin

Več kot 10 let je že minilo od uveljavitve Evropske farmakopeje v Republiki Sloveniji. Slovenska komisija za farmakopejo, imenovana 1993, je sprejela odločitev, da bomo v Republiki Sloveniji uveljavili Evropsko farmakopejo hkrati z datumom uveljavitve njene 3. izdaje (Ph. Eur. 3rd Ed.), to je s 1. januarjem 1997. In ravno toliko časa v našem prostoru že deluje Komisija za pripravo nacionalnega dodatka k Evropski farmakopeji – Formularium Slovenicum (FS).

Komisija je nastala zaradi usklajevanja določil slovenske zakonodaje na področju zdravil s predpisi na ravni Evropske komisije. Prvo Komisijo za pripravo nacionalnega dodatka pri takratnem Uradu RS za zdravila Ministrstva za zdravje 1997 so sestavljali doma in v tujini

priznani strokovnjaki z različnih področij farmacevtske dejavnosti: prof. dr. Jelka Šmid Korbar, Nataša Anžič, mag. Liljana Čop, dr. Andrej Ferlan, Maja Florjanič, prof. dr. Danijel Kikelj, Breda Kosirnik, Ester Košiček, dr. Anton Kramarič, prof. dr. Julijana Kristl, Nežka Petek in Staša Kastelic. Za predsednico je bila imenovana prof. dr. Jelka Šmid Korbar. Komisija se je prvič sestala marca istega leta in po enem letu dela že izdala Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji, ki ga poimenovala Formularium Slovenicum. Člani komisije so opravili obsežno, zahtevno in za področje zdravil pomembno delo. Osnovni izdaji FS je vsako leto sledilo Dopolnilo, k prvi izdaji jih je izšlo 6. Leta 2005 je Komisija pripravila 2. izdajo FS, ki ji bo spet vsako leto sledilo novo Dopolnilo. Vsakoletno izdajo Dopolnila spremlja strokovno posvetovanje ob njegovi predstavitvi z zbornikom.

Katere teme prinaša FS v slovensko farmacevtsko stroko?

Predvsem dopolnjuje standarde evropske farmakopeje in navaja prevode naslovov, celotnih monografij ali njihovih posamičnih delov ter splošnih poglavij, ki so za farmacevtsko stroko najpomembnejši. Prinaša poglavje nacionalne monografije, ki jih evropska farmakopeja ne vsebuje, so pa za lekarniško prakso zanimive in uporabne. Zelo pomembno poglavje so Standardni izrazi za farmacevtske oblike, načine aplikacije in vsebnike. Standardni izrazi niso del Evropske farmakopeje, zato včasih prihaja do razlik v poimenovanju: novi standardni izrazi želijo predvsem slediti hitremu znanstvenemu in tehnološkemu razvoju in so običajno sprejeti pred samo vključitvijo monografije v Evropsko farmakopejo.

Pomembno delo Komisije je dosledno upoštevanje farmacevtske terminologije, ki jo tudi sama intenzivno razvija in oblikuje. V času globalizacije je ta njena vloga še posebej pomembna, kajti bati se je, da slovenski strokovni jezik izgublja bitko z enostavnejšimi tujimi jeziki, predvsem angleščino. Opazno delo Komisije na terminološkem področju in že izbrano strokovno izrazje je pripeljalo do tega, da je skupaj s strokovnjaki Sekcije za terminološke slovarje ZRC SAZU nastala skupina za pripravo Slovenskega farmacevtskega slovarja. Upamo, da bo luč zagledal prej kot v naslednjih 10-ih letih!

Rezultat 10-letnega dela Komisije za slovenski dodatek k Evropski farmakopeji sta 2 izdaji Formulariuma Slovenicuma s 7 že izdanimi dopolnili (vsebine za 2. dopolnilo k 2. izdaji FS, ki bo izšlo avgusta 2007, so tudi že pripravljene), 9 strokovnih posvetovanj ob omenjenih izdajah, 9 natisnenih zbornikov, ki omogočajo dostop do vsebine dopolnil skupaj z ustreznimi komentarji in drugimi aktualnimi temami širokemu krogu strokovnjakov, 92 rednih mesečnih delovnih sej članov komisije in brez števila ur diskusij, pregledovanja gradiva in konzultacij med člani komisije ter tudi drugimi strokovnjaki. Komisijo danes sestavljajo: prof. dr. Jelka Šmid Korbar – predsednica, Barbara Razinger Mihovec, mag. Simona Vučko Mole, Nežka Petek, mag. Liljana Zwitter Čop, Ester Košiček, Vladka Čahuk Vaupotič, mag. Evgen Tomazin, izr. prof. dr. Franc Vrečer, doc. dr. Aleš Obreza in izr. prof. dr. Mirjana Gašperlin.

Viri:

1. Cvelbar M, Šmid Korbar J, Budihna M. Farmacevtski zakoniki: Evropska farmakopeja in Formularium Slovenicum z dopolnili. Zdrav Vestn. 2003; 72: 25 – 265.
2. Šmid Korbar J, Cvelbar M. Uveljavljanje evropske farmakopeje in Formulariuma Slovenicuma v slovenski farmaciji. Farm Vestn. 2004; 55: 183–185.

V spomin mr. ph. Špelci Gizeli Rupnik, roj. Pokorn (2. 12. 1913-1. 2. 2007)



Dan po slovenskem kulturnem prazniku so se sorodniki, prijatelji in poklicni sodelavci na ljubljanskih Žalah poslovili od spoštovane gospe in kolegice Špelce Rupnik, magistre farmacije.

Po maturi na klasični gimnaziji v rojstni Ljubljani se je vpisala na farmaceutsko fakulteto v Zagrebu. Lekarniško prakso je kot obvezni del študijskega procesa pred tirocinijskim izpitom opravila v Škofji Loki.

Diplomirala je 21. januarja 1937 in s prvim februarjem tega leta začela poklicno pot, ki pa je imela mnogo postaj. Ni si jih mogla izbirati sama, saj so bila takrat ljudem delovna mesta dodeljena z dekreti. Na vsaki od poklicnih stopnic so od magistre zahtevali nekoliko drugačno znanje in sposobnosti.

Začela je v Celju, v lekarni magistra Posavca, nadaljevala pa v Ljubljani, v lekarni magistra Bohinjca na Rimski cesti (nekaj mesecev leta 1942), lekarni Splošne bolnice (1944 - 1945) ter v Centralni lekarni (1945 - 1947). V desetletju, ko je bila zaposlena na klasičnem delovnem področju za farmacevte, se ji je delovna doba dvakrat pretrgala za daljši čas, ko je 1941 rodila hčerko in 1943 sina.

V drugem obdobju, od 1947 do 1950, so ji z dekreti določali mesta v mladi farmacevtski industriji in v ustanovi, ki je na državni ravni odločala o tej industriji. Tako je magistra Rupnik za nekaj mesecev postala članica kolektivov v Galeniki v Zemunu in v Generalni direkciji za medicinsko proizvodnjo v Beogradu, 1948 pa je prišla v ljubljansko tovarno zdravil Lek.

V njenem personalnem listu so po letu 1950 vpisane tri zaposlitve v specializiranih zavodih v Ljubljani, v Zavodu za farmacevtske

raziskave (1950 - 1951), v Centralnem higienskem zavodu (1951 - 1955) ter Zavodu za farmacijo in kontrolo zdravil (1955 - 1959). Tej navidezni pestrosti je botrovala država z raznoterimi reorganizacijami; tako se je s spremembami od zunaj za skupine zaposlenih ali cele kolektive zamenjalo ime delodajalca, skoraj nič pa vsebina dela. Magistra je v omenjenih treh ustanovah delala v oddelkih za farmacevtsko-kemijske analize.

Zadnja postaja na strokovni poti gospe magistre je bila medicinska biokemija. Leta 1959 se je zaposlila v biokemičnem laboratoriju na ljubljanski Polikliniki. Našli smo zaznamek, da se je že v letu 1958 štiri mesece izpopolnjevala v biokemičnem laboratoriju na interni kliniki. Nove izkušnje, ki si jih je tu pridobila, je povezala z dotedanji iz farmacevtske analize kemije in s teoretičnim znanjem; vse to je koristno uporabila pri opravljanju nalog, ki jim je morala biti kos na novem delovnem področju. Leta 1965 je sledila soprogu, ekspertu Zduženih narodov za elektrifikacijo, v Etiopijo in nekaj let delala v laboratoriju v bolnišnici Haile Selassie Hospital v Adis Abebi. Ohranjena je fotografija, na kateri se rokuje s cesarjem ob njegovem obisku v tej bolnišnici. Po vrnitvi iz Afrike se je upokojila.

Sodelavci so cenili strokovno znanje magistre Rupnik in njene značajske odlike, delavnost, skromnost, strpnost, poštenost, tovarištvo. Bila je tihe narave, a notranje zbrana in pogumna. V hudih vojnih letih, ko sta jo prevevali odgovornost in skrb za njena malčka, je pomagala tudi Osvobodilni fronti. Medicinskim biokemičarkam, njenim sodobnicam, je ostala v posebnem spominu po vzornem poklicnem sodelovanju in pristnih kolegijskih odnosih, čeprav niso preživele veliko skupnih let. Po upokojitvi je magistra vestno skrbela za svoje zdravje in se trudila ohranjati samostojnost pri vsakodnevnih opravilih. V zadnjem letu je prestala mnoge telesne preizkušnje; ob tem ji je ves čas stala ob strani ljubeča hči z dejavno pomočjo in z nesebično skrbjo. Magistra Špelca Rupnik se uvršča med tiste slovenske farmacevte, ki jim je bilo dano doživeti častitljivo število let.

Drago kolegico bomo ohranili v lepem spominu.

Marta Kramberger

2. dan slovenskih lekarn

Jelka Dolinar

Drugi dan slovenskih lekarn je organiziralo Slovensko farmacevtsko društvo v sodelovanju z Lekarniško zbornico Slovenije, v torek, 26. septembra 2006. Dogodek je potekal pod sloganom o pravilni in varni uporabi zdravil. Cilj Drugega dneva slovenskih lekarn je bil uporabnike lekarniških storitev opozoriti na pomen pravilne in s tem varne uporabe zdravil. S tem lahko čas zdravljenja kar se da skrajšamo, se izognemo morebitnim zapletom zaradi neustrezne uporabe zdravil in hkrati veliko prispevamo k boljši kakovosti življenja vsakega posameznega bolnika.

O *pravilni in varni uporabi zdravil* je bil tudi naslov brošure, ki jo je pripravilo in izdalo Slovensko farmacevtsko društvo in je bila odlično ocenjena, za razliko od plakata, jabolk in medijskih nastopov, ki niso poželi toliko navdušenja. Rezultati ankete, ki jo je izvedlo SFD med lekarnami, kažejo, da obiskovalci lekarn najraje posegajo po revijah o zdravju, kot so Naša lekarna, ABC zdravja..., manjše je zanimanje za informativne lističe, za reklamna sporočila proizvajalcev je zanimanje zelo majhno, k prebiranju strokovnih informacij je obiskovalce lekarn najlaže vspodbuditi s pogovorom.

Ob drugem dnevu slovenskih lekarn so poleg brošure veliko pozornost vzbudile info točke oz. nastopi lekarniških delavcev v

javnosti, kjer so popularizirali farmacevtsko skrb. Zelo pozitiven je bil tudi odziv na obiske farmacevtov v javnih ustanovah (šolah, vrtcih, domovi upokožencev). Mediji so o dogodku poročali veliko več kot preteklo leto, po mnenju mnogih lekarn pa še vedno premalo. Anketa tudi kaže, da lekarne premalo poznajo stroške, ki so povezani z oglaševanjem, saj so vložek 2.500 €, kolikor je SFD plačalo za objavo naslovnice v Delovi prilogi ONA, ocenile kot previsok. V poplavi ponudbe izdelkov za varovanje zdravja in raznih tovrstnih storitev, ki se ponujajo izven lekarn, pa bo za ohranjanje konkurenčnosti lekarn v prihodnje verjetno potrebno obseg oglaševanja povečati.

Osrednja tema drugega dneva slovenskih lekarn je bila namenjena farmacevtskim oblikam. V brošuri smo predstavili peroralne farmacevtske oblike, ki jih najpogosteje uporabljamo, farmacevtske oblike za oko, za nos, za rektalno in vaginalno uporabo, za uporabo na koži, ter oblike za inhaliranje. Pripravo gradiva za obiskovalce lekarn ob 2. Dnevu slovenskih lekarn ter zbiranje in urejanje prispevkov za knjižico, tako z vsebinskega vidika kot tudi tehničnega, je vodila Tatjana Kogovšek Vidmar. Sodelovali pa so tudi Boštjan Debeljak, Jelka Dolinar, Tina Morgan, Lidija Pavlovič, Darja Potočnik, Nina Pisk in Mihaela Tršinar.

Drugi dan slovenskih lekarn je bil s finančnega vidika za Slovensko farmacevtsko društvo zelo velik zalogaj. Celotne stroške ocenjujemo na okoli 40.000 €, pokrili pa so jih: slovenske lekarne z donacijami in prispevki za nakup brošure, Sekcija farmacevtov javnih lekarn pri SFD, skoraj četrtino sredstev je prispevala farmacevtska družba LEK, preostalo četrtino pa, tako kot leto poprej KEMOFARMACIJA. Brez njihove podpore bi bila izvedba projekta nemogoča.

19. simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov

četrtek, 14. junij 2007
Lek Ljubljana
velika predavalnica v PIC-u

Voda v farmacevtskih oblikah: nujna, zelena ali neželena sestavina
Water in dosage forms: necessary, wanted or unwanted component

prof. dr. Slavko Pečar, mag. pharm.
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Voda – reaktivnost, interakcije in struktura

Matej Stergar, dipl. inž. kem.
Krka, d.d., Novo mesto
Določevanje vode v farmacevtskih sistemih

Andrej Mohar
Euromix d.o.o., Ljubljana, Slovenija
Naprave za določevanje vlage in vode v farmacevtskih sistemih

Dr. Frank Thielmann
Surface Measurement Systems Ltd., London, England, UK
Impact of moisture sorption on formulation of solid dosage forms

Sašo Resman, univ. dipl. ing. fiz.
Lek farmacevtska družba d.d., Ljubljana
Sorpcijske izoterme

mag. Sara Cesar, mag. pharm.
Lek farmacevtska družba d.d., Ljubljana
Voda v farmacevtsko-tehnoloških procesih

izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. pharm.
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv vode na stabilnost farmacevtskih sistemov

prof. dr. Stane Srčič, mag. pharm.
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Delikvescenca in kapilarna kondenzacija

Miha Vrbinc, mag. pharm.
Krka, d.d., Novo mesto
Vpliv vode na prehode amorfnih in kristalnih oblik

Informacije: www.sfd.si