

Farm Vestn 2009; 60: 293-352
UDK 615 CODEN FMVTA, SLO ISSN 0014-6229

Farmaceutski vestnik 6

Š T 6 . D E C E M B E R 2 0 0 9 . L E T N I K 6 0

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE . PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA



Pot do zdravja

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

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si



Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 6 • D E C E M B E R 2 0 0 9 • L E T N I K 6 0

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Petra Slanc Može

Uredniški odbor

Janja Marc

Lucija Peterlin Mašič

Alenka Rutar Pariš

Andrijana Tivadar

Jurij Trontelj

Matjaž Tuš

Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mirjana Gašperlin

Mojca Prah Klemenčič

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

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

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in:

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

UVODNIK

Še eno leto se bliža h koncu. Tudi na širokem področju farmacije smo začutili globalni vpliv ekonomskih sprememb in z rahlo skrbjo pričakujemo prihajajoče leto. Ali smo recesijo premagali? Ali prihajajo zopet leta, ki bodo tudi v farmaciji in zdravstvu pomenila blaginjo in s tem dobrobit za prebivalstvo? Če pogledamo sistem zdravstva v razvitem svetu zadnjih nekaj let pred uradno napovedano recesijo, vidimo, da se ni, kljub rasti bruto družbenega proizvoda, celokupna oskrba bolnikov bistveno spremenila. Torej nam tudi v letih suhih krav za razvoj in delovanje farmacije ni potrebno pretirano skrbeti, a le v primeru, če bomo obdržali sistem vrednot stroke pred sistemom vrednot preproste ekonomike, kjer se strokovno izobraževanje šteje kot strošek, če pa že vlagamo v izobraževanje, naj bo to izobraževanje v tržnem smislu, kako od bolnika oziroma uporabnika iztisniti še kakšen evro. Smo na razpotju in le od nas samih je odvisno, v katero smer bomo zapeljali farmacevtsko ladjo. V Sloveniji smo izgradili dober sistem lekarniške oskrbe, naše kolegice in kolegi v lekarniški farmaciji izkazujejo visoko strokovnost, slovenska farmacevtska industrija si je priborila svetovni sloves in je neposredno oziroma z izdelki prisotna v mnogih državah. Ali ne bi bilo škoda, da zaradi naše pasivnosti in vdanosti v usodo, v našem imenu odločajo drugi, da vse izgrajeno prepustimo neurejenemu toku in upamo, da se bo samo uredilo? Fizikalni zakoni nas učijo, da gre vsak sistem vedno proti neurejenosti, če ga prepustimo naključju. Ne dovolimo, da se drugi odločajo namesto nas, pa bomo nadaljevali uspešno zgodbo slovenske farmacije, kljub težki ekonomski situaciji, še vnaprej.

V tej številki Farmaceutskega vestnika boste lahko v sestavku o grelinu, ki ga je napisala doc.dr. Mojca Lunder, spoznali, kako zapleten je mehanizem uravnavanja telesne teže, a kljub temu si privoščite kakšen košček božične potice. Kolegica Mojca Brunskole s sodelavci predstavlja novosti na področju uporabe antimikotikov, nato pa sledi prispevek o ciljani dostavi učinkovin s pomočjo dostavnih peptidov. Kolegi tehnologi so pripravili dva prispevka s področja farmacevtske tehnologije, dr. Katarina Černe pa opisuje kompleksnost sestave in učinkov strupa čebel.

V imenu uredništva Farmaceutskega vestnika vam v prihajajočih praznikih želim nekaj mirnih uric, ki jih boste namenili prebiranju prispevkov v tej številki, kakor tudi veliko uspehov v strokovnem in zasebnem življenju v prihajajočem letu.

Prof.dr. Borut Štrukelj
Odgovorni urednik

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

Antimikotiki: sedanje in nove možnosti zdravljenja glivičnih okužb
Antimycotics: current and novel strategies for treatment of fungal infections

295

Mojca Lunder

Grelin - peptid, ki poveča apetit
Grelin - appetite enhancing peptide

303

Maja Anko, Matjaž Zorko

Dostavni peptidi in njihova uporaba
Cell-penetrating peptides and their application

307

Tina Ukmar, Gregor Mali, Odon Planinšek

Sistemi s prirejenim sproščanjem na osnovi mezoporoznih ogrodij
Controlled release drug delivery systems based on mesoporous matrices

313

Katarina Černe

Kompleksna sestava in učinki strupa medonosne čebele – od anafilaksije do toksičnosti
Complex composition and effects of the honeybee venom – from anaphylaxis to toxicity

319

Maja Bunjevac, Franc Vrečer, Ilija Ilič, Saša Baumgartner

Pomen Heckelove analize za proučevanje kompresibilnosti zmesi za tabletiranje
The meaning of Heckel analysis for studying the compressibility of powder mixtures for tableting

327

Novi doktorji znanosti

337

Razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2010

343

Zahvala

344

Letno kazalo

345

Navodila avtorjem

349

Antimikotiki: sedanje in nove možnosti zdravljenja glivičnih okužb

Antimycotics: current and novel strategies for treatment of fungal infections

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

Povzetek: Zaradi vse pogostejših invazivnih glivičnih infekcij postaja vse bolj pomembno tudi njihovo zdravljenje. Poznamo več skupin antimikotičnih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja, vendar njihovo uporabo velikokrat omejujejo neželeni učinki in rezistenca. Novi pristopi k zdravljenju glivičnih okužb obsegajo povečanje odmerkov učinkovin, izboljšanje njihovih farmakokinetičnih lastnosti, kombinirano antimikotično zdravljenje, izboljšanje imunske odpornosti gostitelja, največ raziskav pa je usmerjenih v razvoj novih protiglivnih učinkovin. Novi antimikotiki naj bi imeli selektiven učinek na glivne celice, majhno stopnjo rezistence, širok spekter delovanja, manjšo toksičnost ter večjo učinkovitost. Med njimi so najbolj obetavni tisti, ki vplivajo na sintezo komponent glivne celične stene, proteinov oz. na signalne poti.

Ključne besede: invazivne glivične okužbe, zdravljenje glivičnih okužb, antimikotiki, rezistenca, nove farmakološke tarče

Abstract: Antifungal treatment is becoming more and more important as the incidence of invasive fungal infections is increasing. Currently, several antimycotics with diverse mechanisms of action are available, but their usage is often limited by their adverse effects and resistance. Novel strategies for the treatment of fungal infections are as follows: high-dose therapy, modulation of the pharmacokinetic properties of the drugs, combination therapy, immune system enhancement, and the development of new antifungal agents. Ideal antimycotics would have selectivity to fungal cells, low rates of resistance, broad antifungal activity, reduced toxicity and improved efficacy. The most promising antifungals are those targeting fungal cell wall components, protein biosynthesis and signaling pathways.

Key words: invasive fungal infections, antifungal treatment, antimycotics, resistance, new pharmacological targets

1 Uvod

V zadnjih dveh desetletjih se pojavlja vedno več invazivnih glivičnih okužb, ki predstavljajo velik zdravstveni problem po celem svetu (1, 2). Do teh okužb prihaja predvsem pri ljudeh s slabšo telesno odpornostjo, ki je posledica vedno širše uporabe širokospektralnih antibiotikov, imunosupresivnih učinkovin in kemoterapevtikov, večjega števila bolnikov okuženih z virusom HIV ter prejemnikov kostnega mozga in drugih organov (3, 4). Če so bile v preteklosti vzrok za oportunistične invazivne glivične okužbe v večini glive vrst *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* in *Aspergillus fumigatus*, pa je v zadnjem času zaradi uporabe antimikotikov v preventivne namene vedno več novih vrst gliv, ki povzročajo tovrstne infekcije (1). Mednje uvrščamo predvsem ne-*albicans* vrste *Candida*, ne-*fumigatus* vrste *Aspergillus*, oportunistične kvasovkam podobne glive rodov *Trichosporum* in *Rhodotorula*, temno pigmentirane glive, zigomicete in hialinske plesni rodov *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium* in *Paecilomyces* (1, 5). Te glive so bolj odporne proti antimikotičnim učinkovinam, infekcije, ki jih povzročajo, pa so velikokrat smrtne (1).

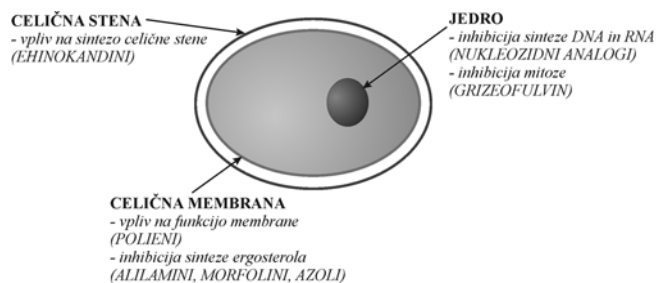
Nova diagnostična orodja, kot so določevanje komponent glivne celične stene in genomske DNA, boljše razumevanje epidemiologije in

prognostičnih dejavnikov okužb ter nove antimikotične učinkovine omogočajo boljši nadzor nad potekom invazivnih glivičnih infekcij, vendar pa je neuspela protiglivna terapija še vedno velik klinični problem (1, 2). Do neuspelega zdravljenja lahko pride zaradi napačnega prepoznavanja bolezni, razvoja rezistence patogenih gliv proti uporabljenim antimikotičnim učinkovinam, imunske pomanjkljivosti obolelih, prenizkega odmerka uporabljenih učinkovin ter njihovih neželenih učinkov oz. toksičnosti (2). Poznani so številni mehanizmi glivne rezistence: strukturne spremembe ali prekomerna tvorba prijemališč antimikotičnih učinkovin, spremembe biosintezne poti ergosterola, pretvorba/sprememba antimikotičnih učinkovin in črpanje učinkovin iz celic. Čeprav poznamo podobne mehanizme rezistence tudi pri bakterijah, obstaja med razvojem glivne in bakterijske rezistence pomembna razlika – intakne glivne celice ne privzemajo eksogene DNA, rezistenca se tako ne more razviti s horizontalnim prenosom genetskega materiala (plazmidov, virusov ali transpozonov) med vrstami. Zato obstaja tudi majhna verjetnost, da bi prišlo do nenadnega izbruha rezistence med glivami. Kljub vsemu pa je lahko široka uporaba antimikotikov in fungicidov v preventivne namene vzrok za pospešen razvoj rezistence (5).

Ločimo primarno ali intrinzično ter sekundarno ali pridobljeno rezistenco proti protiglivnim učinkovinam (4). O primarni rezistenci govorimo takrat, ko je gliva odporna na antimikotično učinkovino še preden je prišla v stik z njo, sekundarna rezistenca pa se lahko razvije po stiku glive z antimikotikom (4, 6). Čeprav poznamo več skupin antimikotičnih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja, se zaradi njihovih neželenih učinkov ali razvoja rezistence nanje pojavlja potreba po vedno novih načinih zdravljenja invazivnih glivičnih okužb. V članku predstavljamo pregled trenutno dostopnih antimikotičnih učinkovin, njihove najpogostejše neželene učinke in mehanizme rezistence ter nove možne načine zdravljenja invazivnih glivičnih infekcij, vključno s prijemašiči učinkovin, ki so zanimiva s stališča razvoja novih protiglivnih učinkovin.

2 Skupine antimikotičnih učinkovin in mehanizmi njihove rezistence

Glede na izvor antimikotičnih učinkovin poznamo antimikotike naravnega izvora (antimikotični antibiotiki) in sintezne antimikotike (3). Na osnovi njihove strukture jih razdelimo v sedem razredov: poliene, alilamine, morfoline, nukleozidne analoge, azole, ehinokandine in druge (7). Ti svoj antimikotični učinek dosežejo po različnih mehanizmih – z vplivom na sintezo celične stene, ergosterola, lanosterola oz. nukleinskih kislin ali z vplivom na funkcijo celične membrane (slika 1) (3). Razvoj protiglivnih učinkovin se je začel z odobritvijo amfotericina B s strani FDA leta 1957 (7).



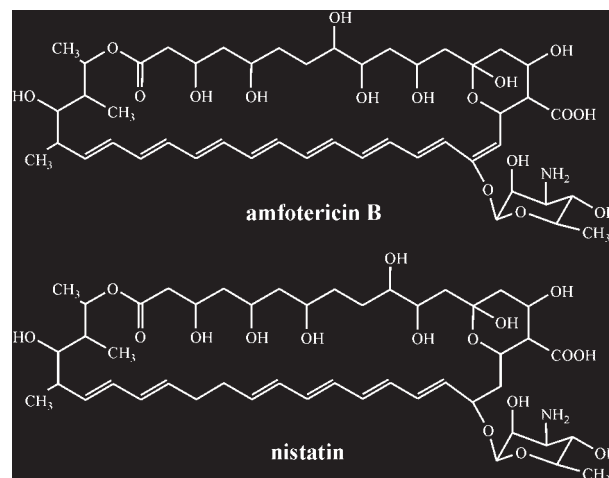
Slika 1: Mehanizmi delovanja trenutno dostopnih antimikotičnih učinkovin.

Figure 1: Mechanisms of action of currently available antimycotics.

Idealen antimikotik opisujejo naslednje lastnosti: širok antimikotični spekter, majhna možnost razvoja rezistence nanj, prilagodljive poti jemanja, malo neželenih učinkov in omejene interakcije z drugimi učinkovinami (7). Na tržišču še vedno ni nobene antimikotične učinkovine, ki bi ustrezala vsem naštetim zahtevam. Posebej pogosti pri zdravljenju glivičnih okužb z antimikotiki so neželeni učinki. Pri glivah in ljudeh (evkariontih) potekajo številni podobni celični in biokemični procesi in zato tarča delovanja antimikotikov niso le celice gliv, ampak tudi gostiteljeve celice (8). Zaradi neustreznega predpisovanja širokospektralnih antibiotikov in njihove uporabe v preventivne namene je postal hiter razvoj rezistence nanje globalni problem, ki pa ga ob uporabi širokospektralnih antimikotikov zaradi mehanizma razvoja glivne rezistence ni pričakovati v takšnem obsegu.

2.1 Polieni

Med polieneke antimikotike uvrščamo makrolidna antibiotika amfotericin B (AmB) in nistatin (slika 2). Njuno protiglivno delovanje temelji na interakcijah z ergosterolom v plazemski membrani. To vpliva na permeabilnost in transportne funkcije membrane – v membrani nastanejo pore, zato pride do povečane izgube intracelularnega kalija in prepuščanja številnih manjših molekul, kar vodi v celično smrt (3, 4). AmB je bil prvič izoliran leta 1955 iz *Streptomyces nodosus* iz Venezuele. Zaradi slabe topnosti v vodi je učinkovit le v intravenski obliki kot deoksiholat in ga uporabljamo za zdravljenje številnih resnih sistemskih mikoz (9). Čeprav ima AmB visoko afiniteto do glivnega ergosterola, se veže tudi na sesalske sterole (npr. holesterol), kar je po vsej verjetnosti vzrok za njegove neželene učinke (7). Zaradi visoke lipofilnosti AmB in povzročanja hude nefrotoksičnosti, ki lahko vodi do trajne okvare ledvic, so bile v devetdesetih letih razvite njegove lipidne oblike (LAMB), ki so manj nefrotoksične in imajo ohranjen širok antimikotični spekter (9, 10). Manjša toksičnost za ledvice je posledica visokih koncentracij LAMB v jetrih in vranici (pasivna ciljana dostava) in nižjih koncentracij v plazmi, ledvicah in pljučih. LAMB so v agregatni obliki in so tudi zato manj toksične od AmB-deoksiholata, ki je oligomer (9). Komercialno so dostopne tri LAMB: koloidna disperzija AmB, liposomalni AmB in lipidni kompleks AmB. Med seboj se razlikujejo po lipidni sestavi, obliki, velikosti, farmakokinetičnih lastnostih in kliničnih učinkih (10).



Slika 2: Strukturi amfotericina B in nistatina.

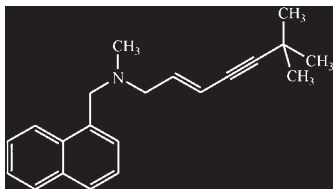
Figure 2: Structures of amphotericin B and nystatin.

Tudi nistatin je toksičen, zato ga uporabljamo le za zdravljenje lokalnih površinskih okužb (4). O rezistenci na AmB ni veliko znanega, saj se pri hitro delujočih, učinkovitih, širokospektralnih antimikotikih le-ta redko pojavi. Najverjetnejši mehanizem rezistence pri polienih so mutacije v biosintezni poti ergosterola in s tem spremenjena količina ergosterola v membranah glivnih celic (6).

2.2 Alilamini

Alilamini selektivno zavirajo skvalen-epoksidazo, ki sodeluje v zgodnji stopnji sinteze ergosterola (4). Inhibicija t.i. postskvalenske biosintezne poti ergosterola ima za posledico kopičenje endogenega skvalena v

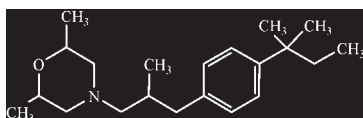
celicah, ki je toksično za organizem (3). Glavni predstavnik te skupine je terbinafin (slika 3), ki se v peroralni in topikalni obliki uporablja za zdravljenje infekcij z dermatofiti, filamentoznimi, dimorfnimi in temno pigmentiranimi glivami. Do sedaj je znanih le malo neželenih učinkov terbinafina (11). Čeprav je rezistenca nanj redka, je bilo dokazano, da imajo nekateri proti azolom rezistentni sevi s prekomerno izraženimi geni za transporterje, ki črpajo učinkovine iz celic, tudi navzkrižno rezistenco proti terbinafinu (4).



Slika 3: Struktura terbinafina.
Figure 3: Structure of terbinafine.

2.3 Morfolini

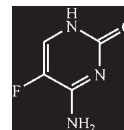
Predstavnik te skupine je strukturno poseben, lokalno delujoči antimikotik amorolfin (slika 4). V obliki laka za nohte in kreme se uporablja za zdravljenje okužb nohtov z dermatofiti, dimorfnimi, temno pigmentiranimi in filamentoznimi glivami ter nekaterimi kvasovkami (12). Njegov inhibični učinek temelji na preprečevanju biosinteze ergosterola z inhibicijo dveh encimov iz skupine citokromov-P450: delta-14-reduktaze in delta-7,8-izomeraze (7, 13).



Slika 4: Struktura amorolfina.
Figure 4: Structure of amorolfine.

2.4 Nukleozidni analogi

Nukleozidni analog flucitozin (slika 5) vstopa v glivne celice s pomočjo citozin-permeaze in se nato s citozin-deaminazo pretvori do 5-fluorouracila, antimetabolita, ki inhibira encim timidilat-sintetazo. S tem je onemogočena sinteza DNA (3, 4). Poleg tega se 5-fluorouracil vgradi namesto uracila v glivno RNA in s tem prepreči sintezo proteinov (14). Na sesalske celice flucitozin ne deluje, saj te nimajo encima citozin-deaminaze in zato ne pride do pretvorbe v 5-fluorouracil, ki se uporablja pri terapiji rakavih obolenj (8). Vendar pa nekateri podatki kažejo, da pri kroničnem jemanju flucitozina lahko pride do povišanih serumskih koncentracij 5-fluorouracila, kar naj bi bil tudi vzrok za njegova resna neželena učinka - hepatotoksičnost in moteno delovanje kostnega mozga (14). Pri samostojni terapiji s flucitozinom se navadno razvije rezistenca, zato ga v primeru resnih okužb, kot je npr. kriptokokni meningitis, kombiniramo z amfotericinom B. Rezistenca temelji na mutacijah genov za citozin-deaminazo in uracilfosforibozil-transferazo ter na povečani sintezi pirimidinov, ki tekmujejo s 5-fluorouracilom in s tem zmanjšajo njegov antimikotični učinek (4, 14).



Slika 5: Struktura flucitozina.
Figure 5: Structure of flucytosine.

2.5 Azoli

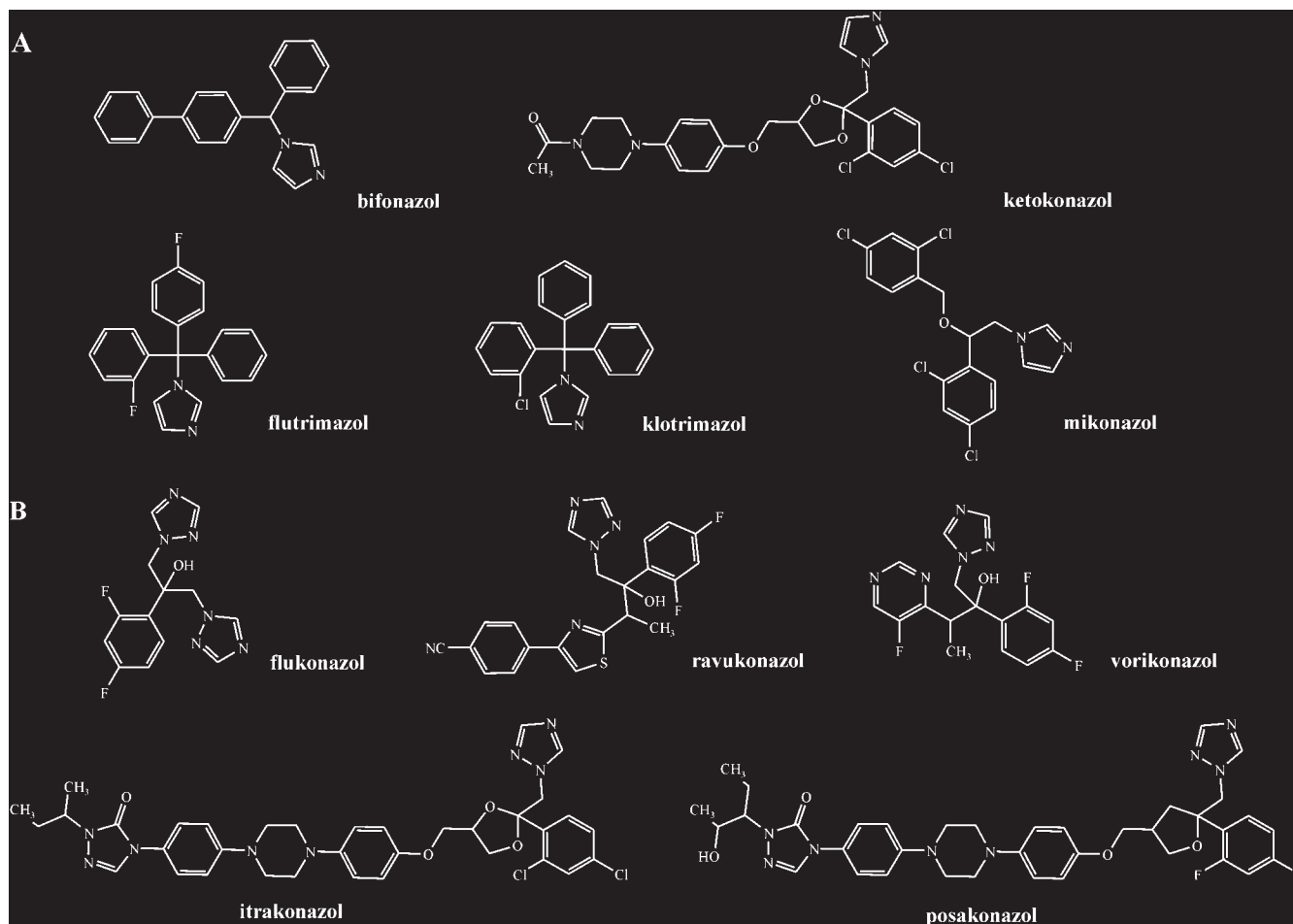
Azolni antimikotiki so skupina sinteznih fungistatičnih učinkovin s širokim spektrom delovanja (3). Razdelimo jih v dve skupini: imidazole (bifonazol, flutrimazol, ketokonazol, klotrimazol, mikonazol) in triazole (flukonazol, itraconazol, posakonazol, ravukonazol, vorikonazol) (slika 6) (7). Z inhibicijo 14 α -demetilacije lanosterola zavirajo biosintezo glivnega ergosterola (4). Vežejo se na hemsko skupino lanosterol-14 α -demetilaze in tako preprečijo oksidativno demetilacijo lanosterola v ergosterol. Zaradi pomanjkanja ergosterola je zmanjšana stabilnost glivne celične membrane, kar vpliva na prenos hranil in sintezo hitina, to pa poruši integriteto celične stene. Zaradi inhibicije sinteze ergosterola se kopičijo tudi toksični prekursorji, ki vplivajo na razvoj glivnih celic in povečajo njihovo občutljivost na gostiteljev obrambni mehanizem (5).

Neželeni učinki azolov so povezani s posameznimi učinkovinami – med drugim lahko pride do perifernih edemov, kongestivne odpovedi srca, povišanja vrednosti transaminaz, odpovedi delovanja jeter, nimajo pa nefrotoksičnih učinkov, kot je to značilno za amfotericin B (7). Zaradi boljših farmakokinetičnih lastnosti, varnosti in učinkovitosti pri zdravljenju sistemskih mikoz se za sistemsko uporabo namesto imidazolov v splošnem bolj uporabljajo triazoli. Tudi razvoj novih učinkovin poteka predvsem v smeri iskanja novih triazolnih učinkovin (7, 15).

Pri vrstah *Candida* poznamo tri osnovne mehanizme rezistence proti azolom:

- spremembe ali prekomerno izražanje lanosterol-14 α -demetilaze,
- druge mutacije v biosintezni poti ergosterola,
- aktivno izčrpavanje učinkovin iz glivnih celic (6).

Zaradi mutacije gena *ERG11* za lanosterol-14 α -demetilazo se zmanjša afiniteta azolov do tega encima (4). Pomnožitve *ERG11* gena lahko privedejo do prekomernega izražanja lanosterol-14 α -demetilaze. Do mutacij lahko pride tudi na drugih encimih (npr. *ERG3* oz. α -5,6-sterol-desaturazni gen) v biosintezni poti ergosterola, ali pa nastane ergosterol po alternativni sintezni poti. Vendar pa je mutacij *ERG3* gena relativno malo, saj naj bi bile le-te zaradi posledične zmanjšane sposobnosti tvorbe hif povezane z zmanjšano virulenco gliv (5). Azoli vstopajo v glivne celice s pasivno difuzijo, iz celice pa jih izločajo transmembranske črpalke (5). Povečano izražanje ABC («ATP-binding cassette») in MR («major facilitator») transporterjev vodi do črpanja učinkovin iz celic in je povezano z rezistenco na azole (4, 7). Do pojavnosti rezistence ne pride vedno le zaradi enega mehanizma, ampak lahko pripomore k njej sinergistični učinek večjih mehanizmov (5). Raziskave so pokazale, da so različne vrste gliv različno občutljive na azolne protiglivne učinkovine – razlike naj bi bile posledica različnih mehanizmov delovanja azolov in različnih mehanizmov rezistence proti



Slika 6: Strukture imidazolnih (A) in triazolnih (B) antimikotikov.
Figure 6: Structures of imidazole (A) and triazole (B) antimycotics.

njim. To tudi pojasni zakaj kljub strukturalni sorodnosti azolov ne pride do navzkrižne rezistence nanje (16).

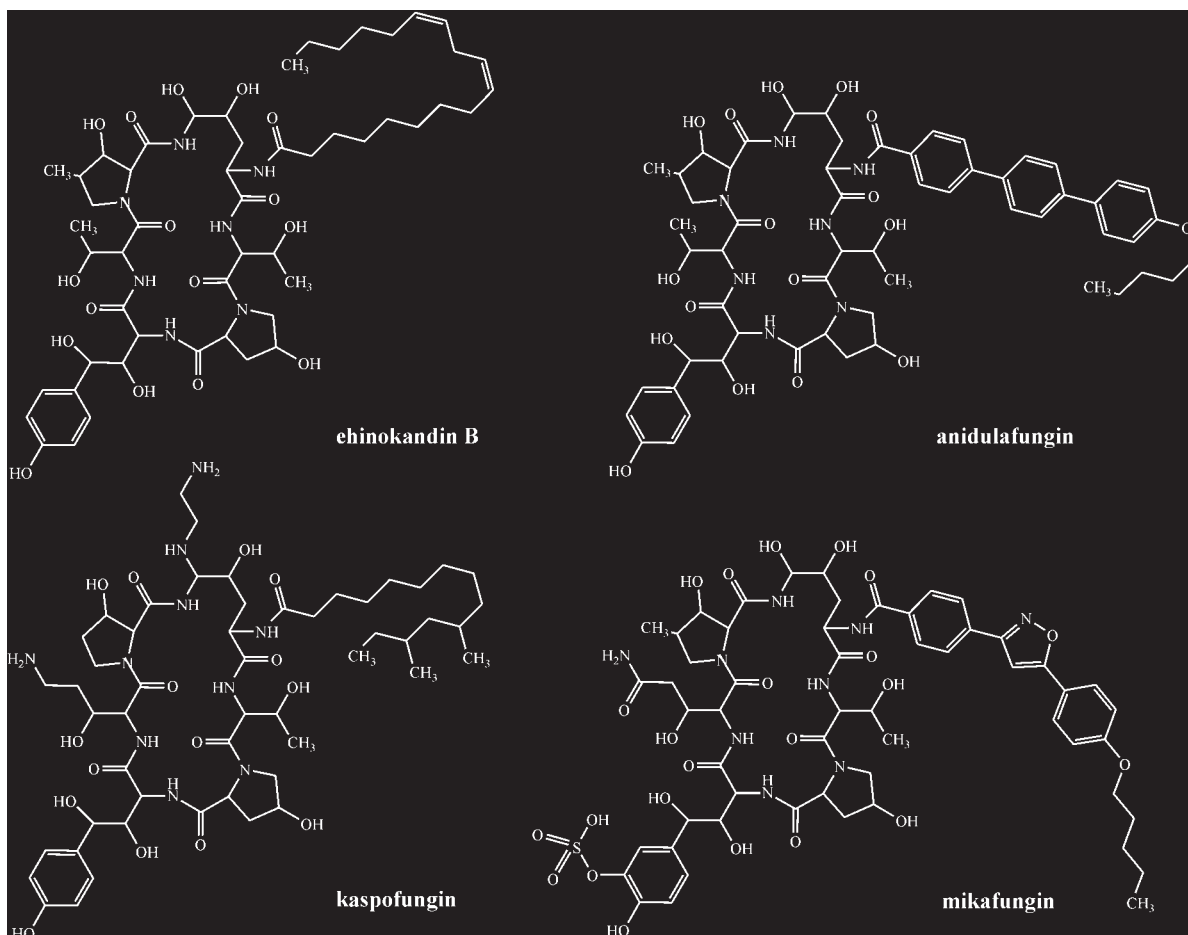
2.6 Ehinokandini

Ehinokandini predstavljajo nov razred protiglivnih učinkovin, ki inhibirajo 1,3- β -glukan-sintazo (4). Z inhibicijo sinteze glukoznega polimera 1,3- β -glukana, ki je nujen za vzdrževanje strukture glivne celične stene, celice izgubijo integriteto, kar vodi do lize. Učinkovine iz te skupine (anidulafungin, kaspofungin in mikafungin) so strukturalni analogi ehinokandina B (slika 7), naravne učinkovine, izolirane iz glive *Aspergillus nidulans* (3). Gre za polsintezne ciklične heksapeptidne učinkovine na katere je vezana lipofilna stranska veriga, ki deluje fungicidno na vrste *Candida* in fungistatično na vrste *Aspergillus* (3, 7, 17). Zaradi posebnega mehanizma delovanja so ehinokandini idealni za uporabo v kombinaciji z drugimi antimikotiki (17). V primerjavi z drugimi protiglivnimi učinkovinami so izjemno varni in le redko toksični. Ker imajo zelo nizko biološko uporabnost po peroralni aplikaciji, jih uporabljamo le kot parenteralne pripravke. S tem so povezani tudi nekateri njihovi neželeni učinki: rdečica, koprivnica, izpuščaji in

tromboflebitis na mestu injiciranja, lahko pa pride tudi do dviga nivoja jetrnih encimov (7). Rezistenca proti ehinokandinom zaradi pomanjkanja kliničnih podatkov ni bila podrobneje raziskana, vendar bi lahko bila posledica nižje afinitete do 1,3- β -glukan-sintaze (4).

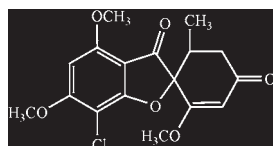
2.7 Drugi antimikotiki

Grizeofulvin (slika 8) je fungistatična učinkovina z ozkim spektrom delovanja, izolirana iz kultur *Penicillium griseofulvum* (3). V glivnih celicah se veže na mikrotubule in na ta način zavre celično mitozo ali sintezo nukleinskih kislin ter tako prepreči rast dermatofitov. Pri visokih odmerkih ima tudi protivnetne in vazodilatatorne učinke (18).



Slika 7: Strukture ehinokandinov.

Figure 7: Structures of echinocandins.



Slika 8: Struktura grizeofulvina.

Figure 8: Structure of griseofulvin.

3 Novi pristopi k zdravljenju glivičnih okužb

Zaradi vse pogostejših invazivnih glivičnih okužb, neuspelega zdravljenja, neželenih učinkov trenutno dostopnih protiglivičnih učinkovin in razvoja rezistence nanje je potreba po novih pristopih k zdravljenju glivičnih okužb vedno večja. Med obetavne nove pristope k boju proti glivičnim infekcijam uvrščamo:

- povečanje odmerkov učinkovin,

- uporaba novih dostavnih sistemov, ki izboljšajo terapevtski indeks že obstoječih protiglivičnih učinkovin,
- kombinirano antimikotično zdravljenje,
- uporaba učinkovin z vplivom na imunski sistem,
- razvoj novih antimikotičnih učinkovin (6).

Dokazano je bilo, da lahko z višjimi odmerki flukonazola dosežemo boljši terapevtski indeks učinkovine in boljše klinične rezultate (19). Prav tako lahko z visokimi odmerki LAmB dosežemo boljše rezultate kot z nelipidno obliko AmB (6). Vendar pa je uporaba večjih odmerkov antimikotičnih učinkovin omejena z njihovo toksičnostjo. Da bi učinkovina dosegla svoj farmakološki učinek, mora doseči mesto delovanja. Na farmakokinetične lastnosti učinkovine lahko vplivamo na različne načine. Absorpcijo nepolarnega, v vodi netopnega itraconazola povečamo z vgradnjo v β -ciklodekstrin. Itraconazol se vgnezdí v lipofilno sredino β -ciklodekstrina, medtem ko njegova hidrofilna zunanost omogoča transport do gastrointestinalne sluznice, kjer se itraconazol absorbira, β -ciklodekstrin pa ostane v lumnu. Da bi zmanjšali toksičnost AmB in povečali njegovo peroralno biološko

uporabnost, so bile v preteklosti razvite njegove lipidne dostavne oblike, najnovejši pristop pa je vgradnja AmB v lipidne nanodelce (19).

S kombinirano protiglivično terapijo želimo povečati učinkovitost protiglivnih učinkovin ter zmanjšati možnost nastanka rezistence in neželene oz. toksične učinke (6). Dosedanji podatki kažejo, da s kombinacijo AmB in ehinokandinov dosežemo aditivni ali celo sinergistični učinek, večjo učinkovitost dosežemo tudi s kombinacijo AmB in flucitozina oz. flukonazola in flucitozina, medtem ko *in-vitro* podatki kažejo, da s kombinacijo AmB in flukonazola dosežemo antagonistični učinek (19).

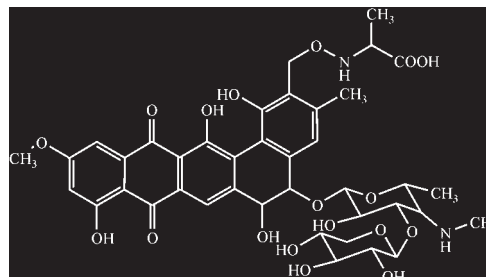
Ker so osebe z oslabljenim imunskim sistemom še posebej dovzetne za invazivne glivične infekcije, predstavlja poskus izboljšanja njihove imunske odpornosti zanimiv pristop k zdravljenju teh infekcij (7). *In-vitro* raziskave in raziskave na živalih so pokazale, da bi imunska odpornost proti patogenim glivam lahko povečali s komercialno dostopnimi rekombinantnimi človeškimi citokini: granulocitne (G-CSF), granulocitne-makrofagne (GM-CSF) in makrofagne (M-CSF) kolonije stimulirajočimi faktorji, pa tudi z eksogenimi interleukini (IL)-1, 12 in 15, interferonom (IF)- γ in tumor nekrotizirajočim faktorjem (TNF)- α (19). Dokazano je bilo, da jemanje rekombinantnih G-CSF in GM-CSF skrajša trajanje nevtropenije, jemanje G-CSF, M-CSF in GM-CSF pa izboljša fagocitne lastnosti nevtrofilcev, monocitov in makrofagov. Ena izmed možnosti za izboljšanje gostiteljeve imunske odpornosti je tudi uporaba cepiv. Poskusi razvoja cepiv z živimi oz. oslabljenimi glivami ter ekstrakti celične stene ali citoplazme se niso izkazali za uspešne, zato so raziskave usmerjene v odkrivanje antigenov v glivnih celicah, ki izzovejo imunski odgovor pri gostitelju ter v iskanje primernih pomožnih snovi. Eksperimentalni in klinični podatki kažejo, da naj bi bili pri zdravljenju glivičnih infekcij z vplivom na gostiteljev imunski sistem učinkoviti le v kombinaciji z antimikotičnimi učinkovinami. Prednosti takšnega zdravljenja so širši antimikotični spekter, minimalni toksični neželeni učinki in nezmožnost razvoja rezistence. Glavni slabosti pa sta vnetje, ki ga izzove in v primeru cepiv, pogoj, da mora imeti gostitelj zdrav, normalno delujoč imunski sistem (20).

Čeprav poznamo številne antimikotične učinkovine z raznolikimi mehanizmi delovanja, obstaja še vedno veliko potencialnih prijemališč za razvoj novih protiglivnih učinkovin. Raziskave so osredotočene v razvoj učinkovin, ki bi delovale po principu selektivne toksičnosti in bi bile bolj učinkovite od že dostopnih. Da bi z načrtovanjem novih učinkovin dosegli selektivno toksičnost, mora njihovo delovanje temeljiti na strukturnih in biokemičnih razlikah med glivnimi in gostiteljskimi celicami (7).

Glivna celična stena ima kljub svoji trdnosti dinamično strukturo. Zaradi njene pomembne vloge v številnih bioloških procesih predstavljajo njene komponente zanimiva tarčna mesta za selektivno ciljanje s specifičnimi protitelesi ali učinkovinami, ki bi vplivale na rast gliv (21). Potencialna prijemališča antimikotičnih učinkovin v glivni celični steni so: specifični encimi, melanini, manozidi, hitin, proteini toplotnega šoka, glikosfingolipidi, histonom podobni proteini, prehodni antigeni, integrinom podobni proteini, idr. (19, 21).

V celični steni številnih temno-rjavo in črno pigmentiranih gliv je prisoten 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanin, ki deluje kot oklep na površini glivne celice in jo varuje pred stresnimi dejavniki iz okolja in gostiteljevim obrambnim mehanizmom, hkrati pa je odgovoren tudi za

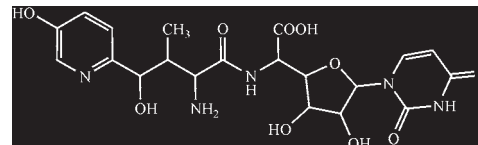
virulenco gliv. Ker sinteza melanina po 1,8-dihidroksinaftalenski poti v gostiteljevem organizmu ne poteka, so encimi v njegovi biosintezni poti zanimive tarče antimikotičnih učinkovin s selektivnim delovanjem (22). Tarča protiglivnih učinkovin so lahko tudi manozidi – nanje se vežejo pradimicini (slika 9), nastane ternarni kompleks D-manozid-pradimicin-kalcij, kar poruši integriteto glivne celične stene (19, 23).



Slika 9: Struktura pradimicina A.

Figure 9: Structure of pradimicin A.

Za vzdrževanje integritete glivne celične stene je pomemben tudi hitin, ki ga v vretenčarskih celicah ni. Nikomicini (slika 10) so učinkovine, ki inhibirajo sintezo hitina, a žal njihovo uporabo omejujejo majhna permeabilnost, različna občutljivost različnih vrst gliv nanje in spremenljivi odzivi živalskih modelov nanje (24).



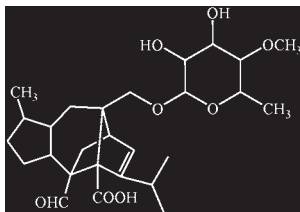
Slika 10: Struktura nikomicina Z.

Figure 10: Structure of nikkomycin Z.

Nekateri proteini toplotnega šoka (Hsp60, Hsp70, Hsp90 in Hsp150) se nahajajo v glivnih celičnih stenah in imajo pomembno vlogo pri razvoju glivnih celic (21). Izražajo se kot odgovor na stres in ščitijo celice pred njegovimi škodljivimi učinki (25). Efungumab je človeško rekombinantno monoklonsko protiteleso proti Hsp90, ki ima protiglivično aktivnost in v kombinaciji z AmB oz. kaspofunginom deluje sinergistično (25, 26). Pasivno zdravljenje s protitelesi v kombinaciji z AmB ima zelo dobre možnosti za uspeh, saj je sinergistični učinek dosežen na dva načina – uporaba dveh učinkovin z različnimi prijemališčema delovanja, poleg tega pa AmB poveča prepustnost glivnih celic in s tem olajša dostop efungumabu do intracelularnih Hsp90. Poleg proteinov toplotnega šoka so za razvoj terapevtsko uporabnih protiglivnih protiteles zanimivi tudi antigeni, kot so adhezini na površini celic, manoproteini toplotnega šoka in drugi (25). V glivnih celicah se nahajajo tudi številni glikozilceramidi, ki imajo pomembno vlogo pri rasti celic, znotrajceličnem signaliziranju, razvrščanju proteinov, adheziji in apoptozi. Ker se struktura glikozilceramidov med sesalci in glivami razlikuje, predstavljajo zanimivo tarčno mesto za delovanje protimikrobnih učinkovin s selektivnim učinkom (21).

Prijemališče nekaterih novih protiglivnih učinkovin je zaviranje sinteze proteinov. Elongacijski faktor 2 (EF2) je protein, ki sodeluje pri

premikanju ribosoma vzdolž mRNA med sintezo proteinov (27). Nanj se vežejo sordarini (slika 11), tetraciklične diterpenske učinkovine, ki stabilizirajo kompleks ribosom/EF2, in tako ustavijo podaljševanje novonastajajoče proteinske verige (27, 28). Čeprav je glivni EF2 visoko homologen z EF2 drugih evkariontov, se sordarini vežejo le na glivni EF2 (27).



Slika 11: Struktura sordarina.

Figure 11: Structure of sordarin.

Zanimivo je, da so lahko filamentozne glive same vir protiglivnih učinkovin, ki so del njihovega obrambnega sistema pred ostalimi glivami v okolju s katerimi se bojujejo za hrano (29). Poleg že omenjenih ehinokandinov, nikomicinov in sordarinov v to skupino med drugim uvrščamo tudi protiglivni protein (AFP), ki ga izloča *Aspergillus giganteus* (20, 29). AFP je majhen, bazičen, s cisteini bogat protein, ki ima v mikromolarnih koncentracijah izjemno dobro aktivnost proti filamentoznim glivam, na bakterijske, rastlinske in sesalske celice pa nima vpliva. AFP in homologni protiglivni proteini iz filamentoznih gliv se vežejo na plazemsko membrano in povzročijo lizo celic (29). Nekateri med njimi zavirajo rast celic z vplivom na signalizacijske kaskade ali pa inhibirajo sintezo glivne celične stene s tvorbo reaktivnih kisikovih radikalov oz. depolimerizacijo aktinskega citoskeleta (20, 29). Za AFP je bilo dokazano, da inhibira tudi sintezo hitina (29).

Pomembno vlogo pri odzivu glivnih celic na stres imajo signalne molekule. V signalizacijskih kaskadah pri odgovoru na oksidativni stres in pri rezistenci proti antimikotičnim učinkovinam sodelujejo oksidoreduktaze, glutation-peroksidaze, sfingozin-kinaze, fosfolipid-flipaze, kalcinevrin, (cAMP)-protein-kinazna A (PKA), protein-kinazna C (PKC) in MAP-kinazna signalna pot, idr. Učinkovine, ki bi delovale na posamezne komponente signalizacijskih kaskad in preprečile odgovor na stres oz. razvoj rezistence, so še ena izmed mnogih možnosti pri spopadanju z glivičnimi infekcijami (30).

4 Sklep

Kljub širokemu naboru antimikotičnih učinkovin z raznolikimi mehanizmi delovanja njihovo uporabo pogosto omejujejo neželeni učinki ali rezistenca. Za zdravljenje invazivnih glivičnih okužb zato poleg uveljavljenih metod uvajamo tudi številne nove. Med njimi je največ raziskav usmerjenih v izboljšanje imunske odpornosti gostitelja ter v razvoj protiglivnih učinkovin z novimi prijemališči delovanja, ki so izbrana na osnovi strukturnih in biokemičnih razlik med glivnimi in gostiteljevimi celicami. Največjo možnost potencialnih prijemališč predstavljajo komponente glivne celične stene ter encimi, ki sodelujejo v njihovi biosintezi: sintezo melaninov in s tem virulentnost gliv inhibirajo spojine z delovanjem na specifične encime, ki sodelujejo pri njihovi sintezi, medtem ko se pradimicini vežejo na manozide, nikomicini pa na hitin in tako porušijo integriteto celične stene.

Delovanje efungumaba, človeškega rekombinantnega protitelesa, temelji na interakcijah s proteinom toplotnega šoka Hsp90 in posledičnim preprečevanjem odgovora na stres. Sordarini z vezavo na glivni elongacijski faktor 2 preprečijo sintezo glivnih proteinov. Obetavna prijemališča novih protiglivnih učinkovin so tudi signalne molekule, ki sodelujejo pri odgovoru na stres in pri rezistenci. Našteti so le nekaj možnosti, ki dokazujejo, da se razvoju novih antimikotičnih učinkovin posveča veliko pozornosti. Nekatere ideje so še v povojih, medtem ko so druge že dale obetavne predklinične rezultate. Vendar pa je pot do novih učinkovin zelo dolga, saj ugodni *in-vitro* učinki ne vodijo vedno tudi do enakih *in-vivo* in kliničnih rezultatov.

5 Literatura

- Ching-Cheng L, Che-Kim T, Yu-Tsung H et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *J Infect Chemother* 2008; 14: 77-85.
- Nucci M, Perfect JR. When primary antifungal therapy fails. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1426-1433.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Antifungal drugs. In: *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003: 666-671.
- Rogers TR. Antifungal drug resistance: does it matter? *Int J Infect Dis* 2002; 6: S47-S53.
- Hof H. Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 327-334.
- Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-1144.
- Chapman SW, Sullivan DC, Cleary JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2008; 119: 197-216.
- Matos T. Značilnosti patogenih gliv. In: Gubina M, Ihan A. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002: 457-468.
- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP et al. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci* 2008; 97 (7): 2405-2425.
- Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Nivoix Y, Letscher-Bru V. The lipid formulations of amphotericin B. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4 (8): 1277-1287.
- Balfour JA, Faulds D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs* 1992; 43 (2): 259-284.
- Haria M, Bryson HM. Amorolfine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of onychomycosis and other superficial fungal infections. *Drugs* 1995; 49 (1): 103-120.
- Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* 2006; 19 (2): 130-139.
- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 (2): 171-179.
- Bennett JE. Antifungal agents. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2006: 1225-1240.
- Gupta AK, Tomas E. New antifungal agents. *Dermatol Clin* 2003; 21 (3): 565-576.
- Kauffman CA, Carver PL. Update on echinocandin antifungals. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29 (2): 211-219.
- Develoux M. Griseofulvin. *Ann Dermatol Venereol* 2001; 128 (12): 1317-1325.
- Neely MN, Ghannoum MA. The exciting future of antifungal therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 897-914.
- Hamad M. Antifungal immunotherapy and immunomodulation: a double-hitter approach to deal with invasive fungal infections. *Scand J Immunol* 2008; 67: 533-543.
- Nimrichter L, Rodriguez ML, Rodriguez EG et al. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect* 2005; 7: 789-798.

22. Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J. Encimi vključeni v biosintezo glivnega melanina – potencialne tarče za razvoj novih antimikotikov. *Farm Vestn* 2008; 59 (1): 21-25.
23. Walsh TJ, Giri N. Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16 (1): 93-97.
24. Ruiz-Herrera J, San-Blas G. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr drug Targets Infect Disord* 2003; 3 (1): 77-91.
25. Matthews RC, Burnie JP. Recombinant antibodies: a natural partner in combinatorial antifungal therapy. *Vaccine* 2004; 22: 865-871.
26. Hodgetts S, Nooney L, Al-Akeel R et al. Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 (5): 1132-1139.
27. Justice M, Hsu MJ, Tse B et al. Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *J Biol Chem* 1998; 273 (6): 3148-3151.
28. Liang H. Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action. *Beilstein J Org Chem* 2008; 4 (31): doi: 10.3762/bjoc.4.31.
29. Meyer V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78: 17-28.
30. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signalling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 2008; 7 (5): 747-764.

Grelin - peptid, ki poveča apetit

Grelin - appetite enhancing peptide

Mojca Lunder

Povzetek: Leta 1999 je japonski znanstvenik Kojima odkril in poimenoval peptidni hormon grelin, ki je vpleten v regulacijo izločanja ravnega hormona v hipotalamusu. Kmalu so odkrili, da ima pomembno vlogo tudi pri regulaciji apetita in energijskega ravnovesja. Grelin sestavlja 28 aminokislin. Njegova posebnost je oktanoilna skupina na hidroksilni skupini serina na položaju 3. Kljub temu, da je receptor za grelin v možganih (hipotalamus, hipofiza), je glavno mesto nastanka grelina v steni želodca. Gre torej za periferno signalno molekulo (kot leptin), ki sproži vnos hrane in obvešča centralno živčevje o prehranbenem stanju organizma. V zadnjem času mu pripisujejo tudi številne druge vloge kot je vpliv na izločanje želodčne kisline in praznjenje želodca, vpliv na delovanje srčno žilnega sistema in druge. Poznavanje delovanja grelina in njegovega receptorja, je povezano z različnimi možnostmi za farmakološko intervencijo.

Ključne besede: grelin, rastni hormon, energijsko ravnovesje

Abstract: In 1999 Japanese scientist Kojima discovered and named peptide hormone grelin, which is involved in regulation of hypothalamic growth hormone secretion. An important role in appetite regulation and energy balance was also soon discovered. It consists of 28 amino acids and is posttranslationally modified with an octanoyl group on serine at position 3. Although grelin receptor is found in the brain (hypothalamus, pituitary), grelin was surprisingly identified in the stomach wall. It is a peripheral signal molecule (like leptin) that initiates food intake and informs central nervous system about nutritional status of organisms. Recently new roles are emerging connected with new clinical applications, such as modulation of gastric acid secretion and gastric motility, diverse cardiovascular effects and others. Understanding the mechanism of grelin and its receptor leads to various possibilities for pharmacological intervention.

Keywords: grelin, growth hormone, energy balance

1 Odkritje

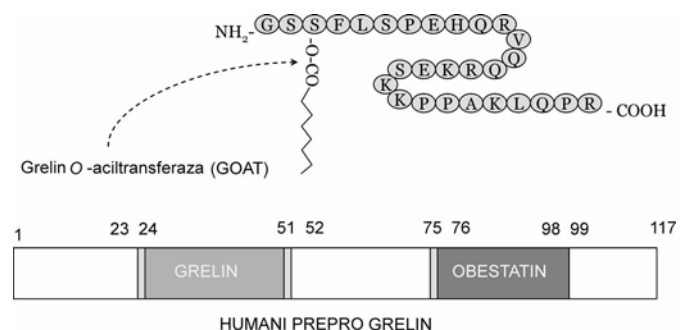
Pri iskanju učinkovin, ki poleg hormona somatoliberina spodbujajo sproščanje ravnega hormona (RH) iz hipofize, so leta 1977 raziskovalci naleteli na peptide, izpeljane iz endorfina. To je vodilo v razvoj peptidnih in nepeptidnih sinteznih molekul, ki so jih poimenovali sekretagogi ravnega hormona (1). Medtem ko mehanizem sproščanja RH zaradi delovanja somatoliberina poteka preko cAMP, delujejo sekretagogi RH preko inozitoltrifosfat/kalcijeve poti. In sicer preko receptorja, sklopljenega s proteinom G v hipotalamusu in hipofizi, ki so ga odkrili šele leta 1996 (2). Naravni ligand ni bil poznan vse do leta 1999, ko ga je odkril japonski znanstvenik Masayasu Kojima in ga poimenoval grelin («ghre» je proto-indoevropski koren besede »rasti«) (3). Čeprav se receptor nahaja v možganih, je najpomembnejše mesto nastanka grelina stena želodca. Od tam se izloča v kri in potuje na mesto delovanja v možgane.

2 Struktura

Grelin je sestavljen iz 28 aminokislin in oktanoilne skupine, ki je pripeta na hidroksilni skupini serina na tretjem mestu. Oktanoilna skupina je posebnost tega peptida in je obvezna za njegovo delovanje na receptor in za biološko aktivnost (4), čeprav lahko določene učinke sproži tudi neacilirana oblika grelina (5). Na serin pripne oktanoilno skupino membranski encim grelin O-aciltransferaza (GOAT), ki se nahaja v steni želodca in črevesja in so ga odkrili šele nedavno (6).

Po odcepitvi signalnega zaporedja z grelinskega prekursorja, nastane progrelin in peptidni hormon obestatin (Slika 1), ki nasprotno od grelina povzroči zmanjšanje apetita in vnosa hrane (7).

Kot posledica alternativnega izrezovanja, povezovanja intronov in eksonov ter postranslacijskih modifikacij, nastanejo v manjši meri tudi druge oblike grelina: des-Gln¹⁴-grelin, dekanoilgrelin (1-28), decenoilgrelin (1-28), oktanoilgrelin (1-27), dekanoilgrelin (1-27) in deacilirani grelin (1-27) (8).



Slika 1: Struktura grelina in njegovega prekursorja.

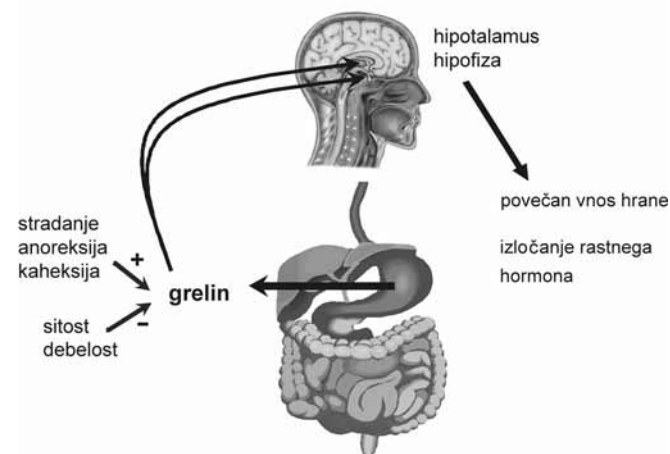
Figure 1: Structure of grelin and its precursor.

3 Izločanje in regulacija

Grelin nastaja pretežno v enteroendokrinih celicah podsluznice želodca, od koder se skozi steno kapilar izloča v plazmo. Stena želodca je torej glavni vir grelina v krvi, kar dokazuje tudi izrazit upad koncentracije, do katerega pride pri gasterektomiji. V manjši meri se njegovo nastajanje zasledili tudi v drugih delih prebavnega trakta (dvanajstnik, ozko črevo, debelo črevo) pa tudi v žlezah slinavkah, pljučih, srcu, jetrih, trebušni slinavki, ledvicah, placenti, testisih, nadledvični žlezi, ščitnici in centralnem živčevju (hipofiza, hipotalamus). Nivo izražanja v ostalih tkivih je precej nižji kakor v želodcu, zato je endokrino delovanje grelina, ki nastane izven prebavnega trakta, malo verjetno (5,9).

Struktura grelina pri različnih sesalskih vrstah je izredno ohranjena, še posebej 10 aminokislin na N-končnem delu. Tako se na primer človeški grelin od podganjega razlikuje le v dveh aminokislinah (8). Grelin ni prisoten le pri živalskih vrstah. Nedavno so podoben peptid našli tudi v rastlinah. Zaradi te obsežne prisotnosti v živih organizmih, mu pripisujejo pomembno vlogo v preživetju vrst (10).

Plazemski nivo grelina je pod nadzorom različnih dejavnikov, med njimi je najpomembnejši vnos hrane (Slika 2). Pri stradanju se plazemski nivo poveča in upade po obroku kot odziv na zvišano koncentracijo glukoze. Po obroku, bogatem z ogljikovimi hidrati, koncentracija grelina upade hitreje, kakor po maščobnem obroku, medtem ko beljakovinska hrana izzove različne, nasprotujoče si učinke. Koncentracija grelina v plazmi je obratno sorazmerna z indeksom telesne mase. Povišana je pri anoreksiji in kahesiji in znižana pri debelosti. Ob dosegu idealne telesne teže se normalizira. Edina izjema pri tem obratnem sorazmerju je sindrom Prader-Willi (genska bolezen, ki jo spremljata nenasična lakota in debelost), kjer je kljub debelosti nivo grelina v plazmi povišan.



Slika 2: Grelin je periferna signalna molekula, ki obvešča centralno živčevje o prehranbenem stanju organizma in ima pomembno vlogo pri regulaciji apetita, energijskega ravnovesja ter izločanja ravnega hormona v hipotalamusu.

Figure 2: Grelin is a peripheral signal molecule that informs central nervous system about nutritional status of organisms and has an important role in appetite regulation, energy balance and regulation of hypothalamic growth hormone secretion.

Poleg vnosa hrane zmanjša izločanje grelina tudi aktivacija somatostatinskih receptorjev. Tovrstna regulacija poteka po sistemu negativne povratne zanke, saj povečana koncentracija grelina poveča izločanje somatostatina. Nadalje je sproščanje grelina pod nadzorom holinergičnega sistema. Agonisti muskarinskih receptorjev stimulirajo, antagonisti pa zavirajo, njegovo izločanje. Na izražanje in/ali izločanje vplivajo tudi peptid YY, oksintomodulin, urokortin (peptidi, ki zmanjšajo apetit in vnos hrane), hormoni občitnice in steroidni hormoni (testosteron) (5).

4 Biološka vloga in mehanizem delovanja

4.1 Izločanje ravnega hormona

Sproščanje ravnega hormona je pod nadzorom somatoliberina, somatostatina in po novejših dognanjih tudi grelina. Na začetku je prevladovalo mišljenje, da je to tudi njegova glavna funkcija. Grelin še močneje stimulira izločanje RH kakor somatoliberin, skupaj pa delujeta sinergistično.

Čeprav deluje neposredno na celice hipofize, je za izrazito delovanje potrebno posredovanje hipotalamusa, saj se pri bolnikih z organskimi lezijami hipotalamusa, RH ne sprošča v zadostnih količinah kljub delovanju grelina. Eden izmed možnih mehanizmov je, da grelin sproži izločanje RH iz hipofize preko aferentnih vagusnih živčnih povezav, ki sprožijo sproščanja somatoliberina v hipotalamusu (11).

4.2 Vnos hrane in uravnavanje energijskega ravnovesja

Regulacija apetita in vnosa hrane je druga pomembna vloga grelina, ki je kmalu vzbudila pozornost. Grelin sodeluje pri začetku hranjenja, saj je tik pred tem njegova koncentracija v plazmi močno povišana, nato pa hitro upade. V arkuatnem jedru hipotalamusa grelin sproži izločanje oreksigenih peptidov (neuropeptid Y in agoutiju sorodni peptid) in zavre izločanje anoreksigenih peptidov (proopiomelanokortin), kar vodi v povečanje apetita in vnosa hrane.

Za razliko od ostalih oreksigenih peptidov hipotalamusa, je grelin učinkovit tudi kadar ga ne damo neposredno v možganske ventrikle. Tako pri živalih (12) kot pri človeku (13) sproži pri sistemskem vnosu občutek lakote in začetek hranjenja.

Povečanje apetita in sproščanje RH lahko sprožijo tudi periferni grelinški signali iz želodca preko vagusa v možgane, kar dokazuje prisotnost receptorjev za grelin na aferentnih nevronih vagusa in dejstvo, da vagotomija ali senzorna denervacija vagusnih živčnih končičev prepreči učinke grelina (14).

Kronični vnos grelina (v možganske prekate ali subkutano) povzroči povečanje vnosa hrane, zmanjšanje porabe energije, zmanjšanje izčrpavanja maščobnih zalog in povečanje izčrpavanja zalog ogljikovih hidratov, kar vodi v povečanje telesne mase predvsem na račun maščobnega tkiva (15). Vendar proti pričakovanju miši brez gena za grelin niso manjše in nimajo manjše telesne mase. Od normalnih miši se ne razlikujejo po velikosti, hitrosti rasti, vnosu hrane, telesni sestavi, razmnoževanju, splošnem obnašanju in tkivni patologiji, za kar verjetno poskrbijo neuroendokrini kompenzacijski mehanizmi (16).

Kljub temu pa lahko vnos hrane in povečanje telesne teže, ki ju sproži grelin (zaradi eksogenega vnosa ali endogenega izločanja ob stradanju), zavremo z različnimi farmakološkimi pristopi v njegovi signalni poti. Sem sodijo antagonisti receptorja za grelin (17), vnos protiteles proti grelinu v možganske prekate (18), protismiselni oligonukleotidi, usmerjeni proti mRNA grelinskega receptorja (19) in aptameri RNA (*L*-oligonukleotidi), ki z vezavo neposredno na grelin preprečijo njegove učinke (20).

4.3 Vpliv na prebavni trakt

Grelin sproži začetni vnos hrane in nadalje vpliva na izločanje želodčne kisline ter na praznjenje in krčenje želodca. Rezultati večine študij kažejo, da grelin spodbuja izločanje želodčne kisline. Kljub nekaterim manjšim odstopanjem, ki so posledica različnih eksperimentalnih pogojev in različnih živalskih modelov, študije kažejo, da grelin ne deluje direktno na parietalne celice (parakrino ali endokrino), temveč najverjetneje preko vagusnih eferentnih vlaken, pri čemer je povečano ali zmanjšano izločanje odvisno od količine grelina (21).

Praznjenje in krčenje želodca sproži peptidni hormon motilin, ki se izloča v tankem črevesu. Za biološko aktivnost je pomemben *N*-končni del, ki ima podobno aminokislinsko zaporedje kot grelin. Strukturno sta si podobna tudi receptorja za oba hormona, zato ni presenetljivo, da grelin pospeši krčenje in praznjenje želodca (22). Do učinka lahko pride preko centralne aktivacije eferentnih nevronov, preko aktivacije vagusnih aferentnih nevronov ali enteričnega živčnega pleteža.

4.4 Vloga v kardiovaskularnem sistemu

V zadnjem času postaja čedalje bolj jasno, da grelin in sekretagogi RH vplivajo na delovanje srčno-žilnega sistema. Mehanizem, s katerim grelin povzroči povečanje krčljivosti srčne mišice, še ni čisto razjasnjen in je lahko tudi sekundarna posledica vazodilatacije ali delovanja RH (23). *In vitro* so na celičnih linijah dokazali njegovo protivnetno delovanje ter povečano preživetje in proliferacijo miocitov. Vsi ti učinki so podlaga za kardioprotektivno delovanje pri ishemijskih poškodbah srca, ki so ga potrdil tudi pri ljudeh.

Na kardiomiocitih obstajajo posebna vezavna mesta za grelin in sekretagoge RH, kar dokazuje, da grelin in sekretagogi RH delujejo neposredno na srce in ožilje in ne preko povečanega izločanja RH. Tako predstavljajo obetajoče terapevtske učinkovine pri srčnem popuščanju in sočasni kaheksiji (24).

4.5 Druge vloge

V ospredje prihajajo še številne druge vloge grelina, med drugim vpliva na presnovo glukoze in lipidov (25), na delovanje trebušne slinavke (26), na povečanje mineralne gostote kosti (27), sodeluje pri regulaciji reproduktivnih mehanizmov (28), povezujejo pa ga tudi s protivnetnim delovanjem (29).

5 Možnosti za klinične aplikacije

Znotraj neuroendokrinega področja je grelin možno uporabiti kot diagnostično sredstvo za določanje pomanjkanja RH, saj skupen vnos grelina in somatoliberina sproži močno povečano izločanje RH. Kljub temu se grelin in analogi niso obnesli pri terapiji stanj, povezanih s pomanjkanjem RH (30).

Antagonisti grelina imajo pomembno mesto v razvoju terapije debelosti, agonisti pa pri terapiji kaheksije. Pri bolnikih s kaheksijo zaradi srčne odpovedi ali raka, je plazemska koncentracija endogenega grelina sicer kompenzatorno že povečana, a vnos eksogenega grelina še dodatno izboljša pridobivanje teže in vnos hrane (31). Po drugi stani pa antagonisti grelina in njegovi ligandi (*L*-oligonukleotidi) zmanjšujejo vnos hrane in telesno težo (20).

Zaradi vpliva na krčenje in praznjenje želodca (21), bi bil lahko uporaben pri paralitičnem ileusu in motnjah krčenja želodca po operacijah. Kardioprotektivni učinki grelina bi koristili pri kroničnemu popuščanju srca, aterosklerozi in preprečevanju poškodb srca, povezanimi z ishemijo med operacijami (24).

6 Zaključek

Odkritje grelina leta 1999 predstavlja prelomnico na področju poznavanja delovanja RH in nove vpogleda v regulacijo vnosa hrane, kopičenje telesne maščobe ter delovanje prebavnega trakta. Fiziološka vloga grelina pri rasti in energijski homeostazi še ni popolnoma razjasnjena, kar dokazujejo tudi miši brez gena za grelin, ki se ne razlikujejo od normalnih. Po tem se grelin pomembno razlikuje od leptina (debel fenotip pri miših brez leptina), vendar to še ne izključuje potencialne klinične uporabnosti grelina in njegovih analogov.

Zaradi širokega spektra učinkov, ki so jih dokazali za grelin, je potrebno njegovo fiziološko vlogo sistematično preučiti in razumeti, preden lahko zanesljivo govorimo o potencialnih terapevtskih možnostih pri boleznih.

7 Literatura

1. Feighner SD, Howard AD, Prendergast K et al. Structural requirements for the activation of the human growth hormone secretagogue receptor by peptide and nonpeptide secretagogues. *Mol Endocrinol* 1998; 12 (1): 137-45.
2. Howard AD, Feighner SD, Cully DF et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273 (5277): 974-7.
3. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402 (6762): 656-60.
4. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M et al. Ghrelin - a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25 (1): 27-68.
5. Ghigo E, Broglio F, Arvat E et al. Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62 (1): 1-17.
6. Yang J, Brown MS, Liang G et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008; 132 (3): 387-96.
7. Gualillo O, Lago F, Casanueva FF et al. One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 256 (1-2): 1-8.
8. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci* 2006; 100 (5): 398-410.
9. De Vriese C, Delporte C. Autocrine proliferative effect of ghrelin on leukemic HL-60 and THP-1 cells. *J Endocrinol* 2007; 192 (1): 199-205.
10. Aydin S. Ghrelin may be a universal peptide in all living organisms. *Turk J med Sci* 2007; 37 (2): 123-124.
11. Lengyel AM. From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50 (1): 17-24.
12. Wren AM, Small CJ, Ward HL et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141(11): 4325-8.

13. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (12): 5992.
14. Date Y, Murakami N, Toshinai K et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123 (4): 1120-8.
15. Nakazato M, Murakami N, Date Y et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409 (6817): 194-8.
16. De Smet B, Depoortere I, Moechars D et al. Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316 (1): 431-9.
17. Asakawa A, Inui A, Kaga T et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003; 52 (7): 947-52.
18. Carlson MJ, Cummings DE. Prospects for an anti-ghrelin vaccine to treat obesity. *Mol Interv* 2006; 6 (5): 249-52.
19. Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 2002; 109 (11): 1429-36.
20. Shearman LP, Wang SP, Helmling S et al. Ghrelin neutralization by a ribonucleic acid-SPM ameliorates obesity in diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2006; 147 (3): 1517-26.
21. Peeters TL. Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 2005; 54 (11): 1638-49.
22. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276 (3): 905-8.
23. Enomoto M, Nagaya N, Uematsu M et al. Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105 (4): 431-5.
24. Isgaard J, Barlund A, Johansson I. Cardiovascular effects of ghrelin and growth hormone secretagogues. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8 (2): 133-7.
25. Broglio F, Prodám F, Me E et al. Ghrelin: endocrine, metabolic and cardiovascular actions. *J Endocrinol Invest* 2005; 28 (5): 23-5.
26. Jaworek J. Ghrelin and melatonin in the regulation of pancreatic exocrine secretion and maintaining of integrity. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 (5): 83-96.
27. Lengyel AM. From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50 (1): 17-24.
28. García MC, López M, Alvarez CV et al. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 2007; 133 (3): 531-40.
29. Dixit VD, Taub DD. Ghrelin and immunity: a young player in an old field. *Exp Gerontol* 2005; 40 (11): 900-10.
30. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 2005; 20 (5): 790-8.
31. DeBoer MD, Zhu XX, Levasseur P et al. Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. *Endocrinology* 2007; 148 (6): 3004-12.

Dostavni peptidi in njihova uporaba

Cell-penetrating peptides and their application

Maja Anko, Matjaž Zorko

Povzetek: Odkritja terapevtsko učinkovitih molekul, ki težko prodirajo v tkiva in celice in zato ne pridejo v klinično uporabo, so povzročila iskanje novih učinkovitejših dostavnih sistemov. Med najnovejše nosilce učinkovin v celice spadajo tudi dostavni peptidi, ki lahko neinvazivno prehajajo membrane in prenašajo v celice najrazličnejše molekule. Danes se dostavni peptidi uspešno uporabljajo za vnos nizkomolekularnih učinkovin, peptidov, proteinov in nukleinskih kislin tako *in vitro* kot tudi *in vivo* na ravni raziskav, nekateri pa se že tudi klinično preizkušajo. V tem preglednem članku predstavljamo strukturo, funkcijo in celične mehanizme vstopa ter možnosti, ki jih dostavni peptidi odpirajo za dostavo farmacevtsko pomembnih učinkovin.

Ključne besede: dostavni peptidi, dostavni sistemi, proteinske transdukcijske domene, prenos v celico

Abstract: The discovery of potent therapeutic molecules that do not reach clinical application due to poor penetration into the tissues and cells have fuelled the investigations of new efficient delivery systems. Recently developed cell-penetrating peptides (CPP) non invasively penetrate cell membrane and are able to translocate different cargoes into the cells. Nowadays CPPs are successfully applied for *in vitro* and *in vivo* delivery of small-molecule drugs, peptides, proteins and nucleic acids in research work, but some of them are currently under clinical evaluations. In this review we highlight structure, function and cellular uptake mechanisms of CPPs and their potential applications for the delivery of therapeutic molecules.

Key words: cell-penetrating peptides, delivery systems, protein transduction domains, cell internalisation

1 Uvod

Eno od pomembnih ovir pri razvoju novih zdravil, ki so usmerjena na znotrajcelične tarče, predstavlja nizka biološka uporabnost hidrofilnih, velikih ali nabitih molekul. Molekule, ki se vežejo na znotrajcelične tarče, so učinkovite le, če lahko prehajajo lipidni dvosloj. Da bi omogočili učinkovitejšo uporabo učinkovin, ki imajo znotrajcelična tarčna mesta, so v zadnjem času razvili različne dostavne sisteme. Mednje spadajo virusni in nevirusni sistemi. Virusni vektorji so pogosto učinkoviti prenašalci, vendar lahko sprožijo imunski odziv, pri *in vivo* uporabi pa predstavlja tveganje tudi možna virusna rekombinacija (1, 2). Med nevirusne dostavne sisteme sodi uporaba liposomov, polipeptidov, nanodelcev, micelijev in dendrimerov. V zadnjih letih so se tem dostavnim sistemom pridružili peptidi, ki prehajajo celično membrano in lahko v celico prenesejo različne snovi. Za to skupino peptidov, ki so pomembno povečali nabor prenašalcev farmakološko učinkovitih snovi v notranjost celice, se je v tuji literaturi uveljavilo ime »cell-penetrating peptides« in okrajšava CPP, včasih pa jih imenujejo tudi »protein transduction domains,« okrajšano PTDs (3). Slovenska terminologija za te peptide je še v pripravi. V tem članku jih bomo v skladu z začasnimi priporočili Terminološke komisije Slovenskega biokemijskega društva imenovali dostavni peptidi in bomo ohranili mednarodno kratico CPP, prenašano molekulo pa bomo imenovali tovor (terminoloških priporočil za to molekulo še ni).

2 Dostavni peptidi: razvoj in vrste

Dostavni peptidi so dolgi od 10 do 30 aminokislin in imajo zelo različne strukturne značilnosti, večini pa je skupen pozitiven naboj pri fiziološkem pH in amfifilna narava (4). Mehanizem prehoda CPP skozi membrano še ni povsem pojasnjen, kljub temu pa vedno več raziskav kaže na njihovo uporabnost v raziskavah in potencialno tudi v medicinski klinični praksi.

2.1 Pomembni mejniki v razvoju dostavnih peptidov

Proteine, sposobne prehoda iz celice v celico, so prvič opazili pred dvema desetletjema, v večini primerov so bili ti proteini transkripcijski dejavniki. Prvi opisan je bil Tat transaktivator iz virusa HIV, ki prehaja membrano in lahko vstopi tudi v jedro (5). Kasneje so odkrili minimalno peptidno zaporedje Tat, ki še lahko vstopi v celico. Dolgo je 13 aminokislin imenovali pa so ga Tat-peptid, ki je danes eden najboljše ovrednotenih CPP (6). Prvi primer CPP, ki ne izvira iz virusa je 16 aminokislin dolgo zaporedje, ki izhaja iz tretjega heliksa homeoproteina, ki je produkt gena Antennapedia iz vinske mušice (*Drosophila sp.*) – ta CPP so imenovali penetratin (7). Pomemben mejnik v razvoju dostavnih peptidov kot farmakoloških prenašalcev pa

predstavlja prvi *in vivo* vnos. Langel in sod. so leta 1998 (8) za znotrajcelično dostavo PNA (peptide nucleic acid) uporabili penetratin in transportan (himerni amfifilen peptid, glej preglednico 1). PNA je oligonukleotidni analog pri katerem je ogrodje iz deoksiriboze in fosfata zamenjano z nenabitim poliamidnim ogrodjem, kar poveča stabilnost molekule, saj je nukleaze ne morejo razgraditi. Z vnosom PNA, ki je bila komplementarna mRNA za galaninski receptor tipa 1, so zavrli izražanje galaninskih receptorjev pri podgani. Leto kasneje (1999) so Schwarze in sod. pokazali, da se po intraperitonealnem vnosu biološko aktivni encim β -galaktozidaza vezana s Tat porazdeli po celem organizmu in vstopi v celice vseh tkiv, vključno z možgani (9). Od takrat so odkrili ali zasnovali še številne nove dostavne peptide (10-13). V zadnjem času gredo raziskave predvsem v smer povečanja tkivne oziroma celične specifičnosti pri dostavi učinkovin in kombiniranja CPP z molekulami lipidov (14).

2.2 Splošne značilnosti

Dostavni peptid predstavlja vsak peptid, ki lahko prehaja celično membrano, večino od njih sestavlja manj kot 30 aminokislin. Glede na izvor jih lahko razdelimo na tri skupine: (a) CPP, ki izvirajo iz naravnih proteinov, (b) himerni CPP, ki so sestavljeni iz dveh ali več proteinskih

domen, ki izhajajo iz različnih proteinov, lahko pa tudi delov peptidov - tak primer je transportan, ki je sestavljen iz peptida mastoparana na C terminalnem koncu, ter sestavnega dela peptida galanina na N terminalnem koncu molekule (15); in (c) modelni CPP, ki so *ab initio* načrtovani peptidi in niso homologni naravnim zaporedjem (4, 16). Pri klasifikaciji CPP lahko upoštevamo tudi strukturni vidik ter jih razdelimo na polikationske, ki v zaporedju vsebujejo več argininov in/ali lizinov (tako so npr. oligoarginini in pVEC) ter amfifilne kot je transportan. Nekateri najpogosteje uporabljeni CPP so predstavljeni v preglednici 1.

3 Mehanizem vstopa v celico

Mehanizem vstopa CPP v celice so različni in v nekaterih primerih slabo raziskani. Kljub temu pa se večina raziskovalcev strinja, da je za prvi stik med CPP in površino celice odgovorna elektrostatska interakcija s proteoglikani, medtem ko je mehanizem nadaljnega procesa vstopa v celico odvisen od naslednjih parametrov: (a) narave in sekundarne strukture CPP, (b) sposobnosti interakcije s celično površino in lipidnimi komponentami, (c) narave, vrste in koncentracije molekule, ki jo prenaša ter (d) vrste celice v katero vstopa in strukture njene membrane (2, 4).

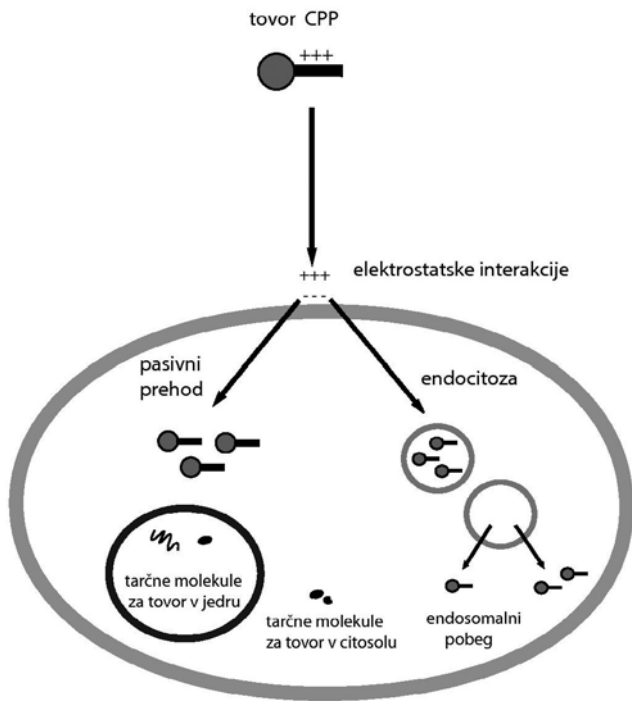
Preglednica 1: Primeri dostavnih peptidov.

Tabel 1: Examples of cell-penetrating peptides.

Ime Zaporedje	Skupina Izvor	Referenca
Tat ⁴⁸⁻⁶⁰ GRKKRRRQRPPQ	proteinski izvor HIV-Tat protein	(5)
penetratin (Antp) ⁴³⁻⁵⁸ RQIKIWFQNRRMKWKK	proteinski izvor homeodomena	(7)
pVEC LLIILRRRIRKQAHASK	proteinski izvor žilni endotelni kadherin	(17)
transportan GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	himerni CPP galanin / mastoparan	(15)
transportan10 AGYLLGKINLKALAALAKKIL	himerni CPP galanin / mastoparan	(13)
MPG GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRV	himerni CPP HIV-1 gp41 / SV40*	(18)
Pep-1 KETWWETWWTEWSQPKKKRV	himerni CPP s Trp bogat motiv / SV40**	(19)
oligoarginin Arg8 ali Arg9	modelni CPP	(20)
MAP KLALKLALKALKAAKLKLA	modelni CPP	(21)

* MPG je sestavljen iz hidrofobne domene, ki izhaja iz fuzijske sekvence HIV gp41 in hidrofilne domene, ki pa izhaja iz motiva za lokalizacijo v jedro SV40 T-antigena.

** Hidrofobno domeno Pep-1 predstavlja s Trp bogat dimerizacijski motiv HIV-1 reverzne transkriptaze, medtem ko je hidrofilna domena enaka kot pri MPG.



Slika 1: Mehanizmi prehoda v celico.

Figure 1: Mechanisms of uptake.

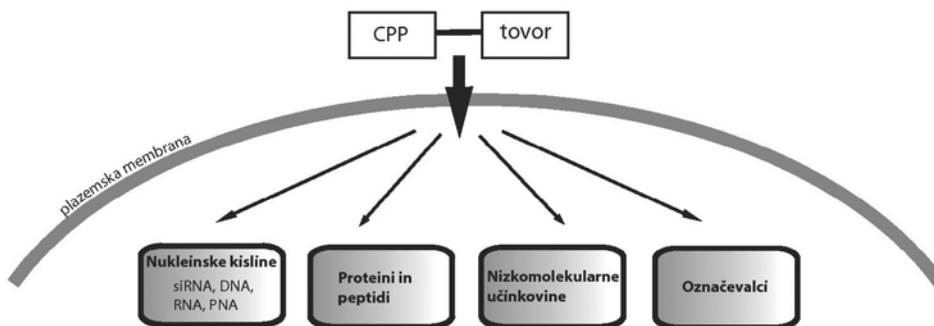
Dostavni peptidi lahko vstopajo v celico na dva načina: z vezikularnim transportom s porabo energije oziroma endocitozo ali pasivno s translokacijo preko lipidnega dvosloja (22), Slika 1. Vezava CPP na glikozaminoglikanske strukture na površini celice omogoča akumulacijo CPP, preko vpliva na membranske komponente (organizacija aktina, male GTPaze) pa olajša endocitozo, kot tudi pasiven prehod. Makropinocitoza je glavni način za internalizacijo kationskih peptidov, dostavni peptidi pa vstopajo v celice tudi z endocitozo odvisno od klatrina, lipidnih raftov ali kaveolina. Na način endocitotskega vstopa vplivajo poleg narave dostavnega peptida tudi lastnosti molekule tovora in tip celice. Več raziskav kaže na to, da je pri večini CPP istočasno prisotnih več različnih mehanizmov (2). To je še posebej značilno za amfifilne peptide, ki lahko v stiku z lipidnim okoljem spremenijo sekundarno strukturo in s tem destabilizirajo strukturo

membrane. Na osnovi tega raziskovalci sklepajo, da je sekundarna struktura in njena dinamika pomemben dejavnik pri prehajanju dostavnih peptidov preko membrane (23). Povišanje lokalne koncentracije CPP na površini celice olajša neendocitotski vstop, ki je verjetno povezan z lokalno in začasno destabilizacijo membrane. Med peptide, ki vstopajo pasivno sodita MPG in Pep-1, ki s svojimi hidrofobnimi deli vstopata v interakcijo z membranskimi lipidi ob tem pa tvorita začasne helikalne ali beta strukture. Za oba peptida v povezavi s tovorom so pokazali, da lahko spontano tvorita komplekse nanometrskih velikosti, ti pa omogočajo povišanje lokalne koncentracije peptida na celični površini. Kako tako veliki kompleksi prehajajo membrano brez negativnih stanskih učinkov, (na primer toksičnosti) še ni znano (24, 25).

Manj je znanega o znotrajceličnem transportu CPP, ki je ključen za to da molekula, ki jo CPP prenaša, doseže tarčno mesto. Po endocitoznem vstopu so CPP zaprti v endosomih. Sposobnost endosomalnega pobega je pomembna omejitev za dostavo učinkovin, v jedro ali citoplazmo. V primeru, ko se CPP predolgo zadrži v endosomih, konča v lizosomih, kjer ga proteaze razgradijo. *In vitro* lahko uporabimo snovi, ki povzročijo razpad endo/lizosomov kot je klorokvin in endosomolitični polimeri, vendar ti pristopi večinoma niso primerni za študije in uporabo *in vivo* (14). Endosomalni pobeg lahko omogočimo tudi z modifikacijo CPP, kar je potencialno uporabno *in vivo* saj s tem ne povzročimo lize celičnih organelov. Kadar želimo s CPP v celico dostaviti molekulo, npr. fragment nukleinske kisline, ki naj se vključi v celično DNA (transfekcija) ali vpliva na izražanje genov, je pomembno, da konstrukt CPP – tovor doseže celično jedro. Pri tem so zelo učinkoviti peptidi z motivom za lokalizacijo v jedro (»nuclear localization signal,« NLS) (2). Zne so še druge strategije za povečanje transfekcijske učinkovitosti, ki npr. pri peptidu Tat vključujejo tudi fuzijo tega CPP z domeno hemaglutinina - HA2, proteina iz virusa influenzae, C terminalno cisteamidacijo in stearilacijo (14).

4 Uporaba dostavnih peptidov

Prednosti CPP kot transportnih molekul so v njihovi majhni citotoksičnosti in dejstvu, da lahko prenašajo molekule zelo različnih velikosti in lastnosti od nizkomolekularnih učinkovin do terapevtskih proteinov ter fragmentov nukleinskih kislin, Slika 2. Z uporabo CPP lahko izboljšamo prehod učinkovin preko membrane, da v celici dosežemo višje koncentracije in močnejšo jakost delovanja. Vse več raziskav pa je usmerjenih v povečanje celično oziroma organelno



Slika 2: Uporaba dostavnih peptidov za prenos različnih vrst tovarnih molekul (prirejeno po (22)).

Figure 2: Applications of cell penetrating peptides for transport of different types of cargo molecules (modified from (22)).

specifične dostave. Poleg prenosa učinkovin so CPP uporabni tudi za specifično označevanje celic in znotrajceličnih tarč (4, 22).

Molekula tovora je na dostavni peptid lahko vezana kovalentno ali nekovalentno. Kovalentno vez lahko vzpostavimo kemično z uporabo stranske verige primerne aminokislina, na primer amino skupine lizina ali tiolne skupine cisteina (15). V primeru, da je tovor protein ali peptid lahko kompleks sintetiziramo ali eksprimiramo v tandemu kot fuzijski protein (26). Pri kovalentni povezavi se lahko uporabi tudi bifunkcionalne povezovalne molekule, ki se na eni strani vežejo na CPP, na drugi pa na molekulo tovora (4). Pri nekovalentni povezavi pogosto sodelujejo ionske interakcije. Odvisno od lastnosti obeh partnerjev lahko nastanejo skupki kompleksov, kar vodi v nastanek nanodelcev, to pa je pri kovalentni vezavi manj verjetno (25).

4.1 Vnos nizko molekularnih učinkovin

Dostavni peptidi se uporabljajo za dostavo učinkovin, katerih uporabo omejujejo nekatere lastnosti, kot je velika lipofilnost ali slab prehod in porazdelitev v tkiva (22). Primer predstavlja dermalni vnos protivnetne molekule ciklosporina A v povezavi s CPP, ki omogoča prodor učinkovine v globlje ležeča tkiva in prenos zadostne količine učinkovine za terapevtski učinek (27). CPP pa so se izkazali tudi kot dobri prenašalci učinkovin v rakave celice, ki so odporne na kemoterapevtike. Primer predstavlja doksorubicin v konjugaciji s Tat-peptidom in transferinom, ki deluje citotoksično na doksorubicin odporno celično linijo (28). Podobno CPP omogočijo prenos metotreksata v celično linijo raka na dojkah odporno na to učinkovino (29). Te učinkovine sicer lahko vstopijo v celico, funkcija konjugacije s CPP pa je, da onemogoči njihovo izčrpavanje iz celice.

4.2 Vnos nukleinskih kislin

Prednost nukleinskih kislin pred tradicionalno uporabljenimi nizkomolekularnimi zdravili je v zelo veliki specifičnosti za tarčne molekule in majhni pojavnosti neželenih stranskih učinkov. V primerjavi s proteini so praktično neimunogene. V konjugaciji s CPP so v celice uspešno vnesli plazmide, protismiselne oligonukleotide in male interferenčne RNA (siRNA, short interfering RNA) (16). siRNA je navadno 21-23 baznih parov dolga dvovertična RNA, ki se vključuje v utišanje genov preko uravnavanja razgradnje mRNA (30).

S pomočjo CPP so plazmidno DNA vnesli tako v celice v kulturi kot tudi *in vivo* (16). Zaradi velikosti plazmidov in posledično velikega negativnega naboja je navadno mogoča le kovalentna vezava. V primeru nekovalentne vezave plazmidov in tovora, namreč nastanejo zelo veliki kompleksi, ki pogosto ne prehajajo membrane. Več raziskav kaže na to, da je za *in vivo* študije prenosa plazmidov bolj primerna uporaba polimerov in kompleksnih sistemov v primerjavi s preprostimi CPP pristopi, kjer je prenašalec monomeren peptid. Pri polimernih oziroma kompleksnih sistemih gre za povezavo posameznih peptidov v večjo molekulo, ki omogoča bolj učinkovit prenos (16). Transfekcijsko učinkovitost Tat-peptida so na primer povečali s tvorbo di- in tetramerov ali z disulfidno povezavo v linearne polimere (12).

Protismiselna-RNA tehnologija je osnovana na zaporedno specifični interakciji vnešenih oligonukleotidov s komplementarnim zaporedjem mRNA v citosolu ali jedru. Hibridizacija mRNA z oligonukleotidom prekine proteinsko sintezo z onemogočanjem prevajanja genske

informacije, z vzpodbujanjem razgradnje mRNA z endogeno RNAzo H ali s preprečevanjem zorenja pre-mRNA v funkcionalno mRNA (31). Problem hitre razgradnje oligonukleotidov v celici so uspešno rešili z uporabo različnih sintetičnih analogov, npr. PNA. S konjugacijo protismiselnih oligonukleotidov s CPP so dosegli biološki odgovor tako *in vitro* kot *in vivo*. Primer je dostava s transportanom povezane protismiselne PNA, usmerjene proti elementu, ki je odgovoren za transaktivacijo (TAR element) genoma virusa HIV v celična jedra, s čemer se je zmanjšala transaktivacija HIV-1 v celični liniji. Ta uspešna aplikacija je odprla možnosti za razvoj zdravil proti virusu HIV (32).

Uspešnost utišanja genskega izražanja s siRNA, ki je bila konjugirana s Tat-peptidom, je primerljiva tisti, pri kateri so kot transfekcijski medij uporabili lipofektamin. Z uporabo modificiranega penetratina in transportana in kovalentno vezano siRNA so v različnih linijah sesalčjih celic dosegli utišanje izražanja reporterskih proteinov (zelenega fluorescentnega proteina (GFP) in luciferaze) za obdobje do sedmih dni (33). Vnos siRNA s pomočjo CPP je bil uspešen tudi *in vivo* pri zdravljenju tumorjev. S subkutanim vnosom siRNA nekovalentno povezane s holesterol-oligo-D-argininom so uspešno zavrli izražanje angiogenega rastnega faktorja (VEGF), s čemer se je tumor sedemkrat zmanjšal (34).

4.3 Vnos proteinov in peptidov

Uporaba eksogenih proteinov in peptidov je dragoceno orodje pri zdravljenju številnih bolezni, oviro pri uporabi proteinov pa predstavlja vnos velikih makromolekul v celico. Raziskave kažejo, da je CPP možno uporabiti za vnos proteinov velikosti med 30 kDa (npr. GFP) do 120-150 kDa (npr. IgG) (22). Tako so npr. s pomočjo Tat-peptida in penetratina uspeli vnesti v celice imunoglobuline, ki so po prenosu ohranili sposobnost vezave na antigen (35). Učinkovit vnos omogoča tudi nekovalentna povezava med CPP in proteinom, kar so pokazali s primerom Pep-1 v kompleksu s peptidi, proteini in protitelesi. Takšen pristop poenostavlja pripravo kompleksov, saj ne zahteva dodatnih kemijskih modifikacij (2).

4.3.1 Raziskave vnosa *in vivo*

V preteklem desetletju so s pomočjo dostavnih peptidov v sesalčje celične linije uspešno vnesli proteine in peptide za zdravljenje različnih bolezni kot so rak in astma ter bolezni, katerih posledica je apoptoza. V večini primerov gre za CPP (Tat-peptid, penetratin, poliarginin, VP22), ki so kovalentno vezani s peptidi ali proteini ali za fuzijske proteine (tovor in CPP sta izražena v tandemu) (2).

Tumorski supresor p53 je DNA vezavni protein, ki lahko sproži apoptozo ali izražanje genov, ki so vključeni v biologijo raka in zato predstavlja tarčno molekulo pri zdravljenju raka. Z vnosom CPP kovalentno vezanih s peptidi, ki izvirajo iz p53, se obnovi funkcija tega transkripcijskega dejavnika v rakavih celicah. Primer je vnos C-terminalnega dela p53, ki upočasnjuje rast tumorja po intraperitonealnem vnosu v miši z β -celičnim limfomom (36), podoben učinek pa ima PNC-28, ki izhaja iz vezavne domene MDM-2 p53 (10). Proliferacijo celic, kot posledico raka, so uspešno zavrli z uporabo peptida iz N-terminalnega dela Smac proteina, ki inaktivira inhibitorje apoptoznih proteinov in poveča občutljivost za pro-apoptozne signale (37). Še ena uspešna metoda pa vključuje vnos proteinskih in peptidnih domen

naravnih proteinskih inhibitorjev (p16^{ink}, p21, p15, p27^{kip}) od ciklina odvisnih kinaz, ki so vključene v uravnavanje celičnega cikla (38).

Deregulacija apoptoze je povezana s številnimi boleznimi, za regulacijo pa se pri raziskavah uspešno uporablja s CPP posredovan vnos peptidov in proteinov na ravni sesalčjih celičnih linij. Apoptozo so uspešno zavrlj z vnosom inhibitorja kaspaze 8 FLIP (39) in peptida iz Bcl2 (ki je vključen v regulacijo permeabilnosti zunanje membrane mitohondrija) (40). V obeh primerih so za prenos uporabili Tat-peptid, medtem, ko so s Pep-1 vnesli proteine za pospešitev apoptoze alveolarnih sten v pljučih miši oz. za popraviljanje napak pri delovanju protein kinaze A (41, 42).

Uporaba CPP za prenos učinkovin preko krvno-možganske bariere predstavlja novo možnost za izboljšanje izida ishemijskih stanj. Proteine in peptide, ki preprečujejo možgansko ishemijo pri poškodbah, npr. Tat-cJNK peptid ter Bclxl protein, ki zmanjša odmiranje živčnih celic v področju ishemičnih poškodb, so vnesli vezane na Tat-peptid (43). Poleg Tat-peptida, sta prenosa snovi preko krvno-možganske bariere sposobna tudi D-penetratin in Pep-1.

V celični liniji človeških eozinofilcev so s pomočjo dostavnih peptidov uspešno preprečili pretiran imunski odziv, kar je pomembno pri zdravljenju astme. Dominantno negativna oblika Ras ali fosfoinozitol 3 kinaza v povezavi s Tat-peptidom zavirata vnetni odgovor dihalnih poti (44). Proteini in peptidi vezani na Tat-peptid omogočajo vnos antigenskih molekul za zdravljenje alergij ali pripravo cepiv (45).

5 Tkivna specifičnost

Za uporabo učinkovine v terapevtske namene je ključna specifičnost za določena tarčna tkiva, v katera želimo dostaviti molekulo tovora. Specifičnost za tumorsko tkivo peptida pVEC so povečali s povezavo s peptidom PEGA, ki se akumulira v celicah raka dojke. PEGA sam po sebi ne prehaja celične membrane, v konjugaciji z dostavnim peptidom in zdravilom za zdravljenje raka klorambucilom pa omogoča 4-kratno povečanje učinkovitosti klorambucila v celičnih linijah rakavih celic (11).

Drugi pristop k povečanju specifičnosti dostavnega peptida za tarčno mesto je, da v kompleks CPP-tovor vključijo zaporedje, ki inaktivira sposobnost CPP za vstop v celico, a se na tarčnem mestu encimsko cepi. Tako kompleks CPP-tovor vstopa le v tkivo v katerem so specifični encimi, ki aktivirajo dostavni peptid. Tako so polikationske CPP inaktivirali s polianionskimi peptidnimi zaporedji, za reaktivacijo CPP pa so poskrbele metaloproteaze na tarčnem mestu (46).

6 Predklinične in klinične raziskave

Trenutno potekajo številne predklinične in tudi nekaj kliničnih raziskav, ki temeljijo na dermalnem ali sistemskem vnosu različnih zdravilnih učinkovin s CPP. Leta 2003 je bila opravljena klinična študija faze II, pri kateri gre za dermalni vnos kompleksa ciklosporin-poliarginin, ki učinkovito prodira v kožo, vstopa v kožne limfocite T in inhibira kožna vnetja (27). Poteka tudi študija faze II zdravljenja akutnega srčnega infarkta in cerebralne ishemije z inhibitorjem protein kinaze C v kompleksu s Tat-peptidom (47). Obetavne so študije vnosa

oligonukleotidov za popraviljanje sestavljanja pre-mRNA z oligoarginini v povezavi s 6-aminoheksanojsko kislino in zdravljenje različnih boleznih z vnosom nekovalentnega kompleksa Tat-siRNA (2).

7 Sklep

Dostavni peptidi predstavljajo novo inovativno orodje za povečanje biološke uporabnosti potencialno farmakološko učinkovitih molekul, ki vključujejo nizkomolekularne učinkovine, peptide, proteine in nukleinske kisline. Prednost uporabe dostavnih peptidov je v hitrem in zelo učinkovitem vnosu v celice, stabilnosti CPP v telesnih tekočinah ter netoksičnosti. Uspešnost predkliničnih študij je razkrila velike možnosti, ki jih imajo CPP za uporabo v terapevtske namene, pa naj si bodo z učinkovino povezani kovalentno ali nekovalentno. V bližnji prihodnosti lahko pričakujemo prva komercialno dostopna zdravila, ki temeljijo na uporabi CPP, za prihodnost pa ostane izziv povečanja specifičnosti vnosa v tarčno tkivo.

8 Literatura

1. Cegnar M, Kristl J. Dostavni sistemi nanometrskih velikosti za vnos proteinov in genov. *Med razgl* 2005; 44(4): 447-462.
2. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 2009; 157(2): 195-206.
3. El-Andaloussi S, Holm T, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Curr Pharm Des* 2005; 11(28): 3597-3611.
4. Zorko M, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(4): 529-545.
5. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988; 55(6): 1189-1193.
6. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997; 272(25): 16010-16017.
7. Derossi D, Joliet AH, Chassaing G et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269(14): 10444-10450.
8. Pooga M, Soomets U, Hallbrink M et al. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* 1998; 16(9): 857-861.
9. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A et al. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999; 285(5433): 1569-1572.
10. Bowne WB, Michl J, Bluth MH et al. Novel peptides from the RAS-p21 and p53 proteins for the treatment of cancer. *Cancer Ther* 2007; 5B(331-344).
11. Myrberg H, Zhang L, Mae M et al. Design of a tumor-homing cell-penetrating peptide. *Bioconjug Chem* 2008; 19(1): 70-75.
12. Rudolph C, Plank C, Lausier J et al. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 Tat protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 11411-11418.
13. Soomets U, Lindgren M, Gallet X et al. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1467(1): 165-176.
14. Mae M, El Andaloussi S, Lundin P et al. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* 2009; 134(3): 221-227.
15. Pooga M, Hallbrink M, Zorko M et al. Cell penetration by transportan. *FASEB J* 1998; 12(1): 67-77.
16. Veldhoen S, Laufer SD, Restle T. Recent developments in Peptide-based nucleic Acid delivery. *Int J Mol Sci* 2008; 9(7): 1276-1320.
17. Elmquist A, Lindgren M, Bartfai T et al. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* 2001; 269(2): 237-244.
18. Morris MC, Vidal P, Chaloin L et al. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(14): 2730-2736.

19. Deshayes S, Heitz A, Morris MC et al. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* 2004; 43(6): 1449-1457.
20. Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K et al. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(24): 13003-13008.
21. Oehlke J, Scheller A, Wiesner B et al. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1414(1-2): 127-139.
22. Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 2008; 6(13): 2242-2255.
23. Lundberg P, El-Andaloussi S, Sutlu T et al. Delivery of short interfering RNA using endosomalolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J* 2007; 21(11): 2664-2671.
24. Morris MC, Deshayes S, Heitz F et al. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell* 2008; 100(4): 201-217.
25. Munoz-Morris MA, Heitz F, Divita G et al. The peptide carrier Pep-1 forms biologically efficient nanoparticle complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(4): 877-882.
26. Lin YZ, Yao SY, Veach RA et al. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995; 270(24): 14255-14258.
27. Rothbard JB, Garlington S, Lin Q et al. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* 2000; 6(11): 1253-1257.
28. Liang JF, Yang VC. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(22): 5071-5075.
29. Lindgren M, Rosenthal-Aizman K, Saar K et al. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(4): 416-425.
30. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009; 457(7228): 426-433.
31. Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(5-6): 533-540.
32. Chaubey B, Tripathi S, Ganguly S et al. A PNA-transporter conjugate targeted to the TAR region of the HIV-1 genome exhibits both antiviral and virucidal properties. *Virology* 2005; 331(2): 418-428.
33. Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett* 2004; 558(1-3): 63-68.
34. Efimov V, Choob M, Buryakova A et al. PNA-related oligonucleotide mimics and their evaluation for nucleic acid hybridization studies and analysis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001; 20(4-7): 419-428.
35. Hu M, Wang J, Chen P et al. HIV-1 Tat peptide immunoconjugates differentially sensitize breast cancer cells to selected antiproliferative agents that induce the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF-1/CIP-1. *Bioconjug Chem* 2006; 17(5): 1280-1287.
36. Tang X, Molina M, Amar S. p53 short peptide (p53pep164) regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor/cytokine expression. *Cancer Res* 2007; 67(3): 1308-1316.
37. Fulda S, Wick W, Weller M et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 2002; 8(8): 808-815.
38. Hosotani R, Miyamoto Y, Fujimoto K et al. Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8(4): 1271-1276.
39. Krautwald S, Ziegler E, Tiede K et al. Transduction of the TAT-FLIP fusion protein results in transient resistance to Fas-induced apoptosis in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 44005-44011.
40. Sugioka R, Shimizu S, Funatsu T et al. BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene* 2003; 22(52): 8432-8440.
41. Maron MB, Folkesson HG, Stader SM et al. PKA delivery to the distal lung air spaces increases alveolar liquid clearance after isoproterenol-induced alveolar epithelial PKA desensitization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(2): L349-354.
42. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(5): 555-562.
43. Cao G, Pei W, Ge H et al. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 2002; 22(13): 5423-5431.
44. Myou S, Leff AR, Myo S et al. Activation of group IV cytosolic phospholipase A2 in human eosinophils by phosphoinositide 3-kinase through a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Immunol* 2003; 171(8): 4399-4405.
45. Rhyner C, Kundig T, Akdis CA et al. Targeting the MHC II presentation pathway in allergy vaccine development. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 4): 833-834.
46. Jiang T, Olson ES, Nguyen QT et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(51): 17867-17872.
47. Chen L, Harrison SD. Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 4): 821-825.

Sistemi s prirejenim sproščanjem na osnovi mezoporoznih ogrodij

Controlled release drug delivery systems based on mesoporous matrices

Tina Ukmar, Gregor Mali, Odon Planinšek

Povzetek: V zadnjih letih se je zanimanje za razvoj mezoporoznih silikatov kot dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin izredno povečalo. V članku so predstavljeni izbrani primeri iz literature, na osnovi katerih je pokazano, kako lahko z vgrajevanjem v vodi težko topnih zdravilnih učinkovin v mezoporozna silikatna ogrodja dosežemo pospešeno sproščanje tovrstnih zdravilnih učinkovin. Na primeru modelne zdravilne učinkovine itraconazole so na kratko pojasnjeni kritični dejavniki, ki regulirajo njegovo strukturo in sproščanje iz silikatnega ogrodja SBA-15. Možnost funkcionalizacije površine tudi pri bolj ostrih pogojih nudi bogato paleto na specifične stimuluse občutljivega sproščanja zdravilnih učinkovin. Na ta način lahko razvijemo inteligentne dostavne sisteme, iz katerih se zdravilna učinkovina selektivno sprošča ob določenem stimulu, kot je sprememba pH medija, prisotnost specifičnih ionov, reducentov, magnetnega polja ali UV svetlobe. Dokazana je tudi njihova biokompatibilnost in učinkovitost v *in vitro* poskusih.

Ključne besede: mezoporozni silikati, dostavni sistemi, prirejeno sproščanje

Abstract: Over the past few years the interest and consequently also the development of ordered mesoporous silicates as drug delivery devices have grown immensely. On hand of selected cases from the literature the power of such systems as delivery devices is thoroughly established. Specifically it is shown how it is possible to enhance the release kinetics of poorly soluble drugs by embedding them in mesoporous silicates. Further critical factors governing the structure and release of a model drug itraconazole incorporated in an SBA-15 matrix are briefly reviewed. The possibility to functionalize the surface of mesoporous matrices also at harsher conditions offers a broad platform for the design of stimuli-responsive drug release, including pH responsive systems and systems which respond to the presence of specific ions, reducing agents, magnetic field or UV light, whose efficiency and biocompatibility was established *in vitro*.

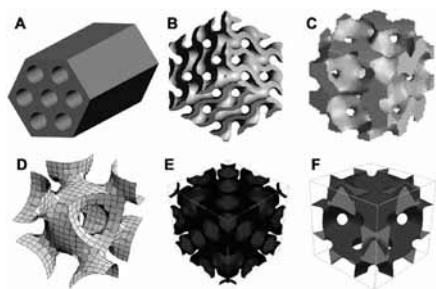
Keywords: mesoporous silicates, drug delivery, modified release

1 Uvod

Porozne materiale po IUPAC nomenklaturi delimo glede na velikostni razred por na mikroporozne, z velikostjo por med 0,3 in 2 nm (zeoliti in zeolitom podobni materiali), mezoporozne s porami dimenzij med 2 in 50 nm ter makroporozne materiale s porami velikosti nad 50 nm. Skupine mezoporoznih silikatov kot so MCM (**M**obil **C**omposition of **M**atter No. 41, 48) in SBA (**S**anta **B**arbara **M**aterial No. 1, 3, 15, 16) (1), s periodično geometrijsko ureditvijo por, postajajo zaradi bogatega nabora fizikalno-kemijskih lastnosti in široke uporabnosti čedalje bolj priljubljene. Njihova uporaba sega od katalizatorjev, do separacijskih sistemov, senzorjev do čistilnih naprav v ekologiji, prodirati pa so začeli tudi na področje medicine in farmacije. S farmacevtskega stališča so zanimivi zlasti kot ogrodja za vgrajevanje zdravilnih učinkovin in obetajo širok nabor možnosti nadziranja sproščanja. Mezoporozni nosilci v vodi ne nabrekajo in omogočajo funkcionalizacijo površine z najrazličnejšimi spojinami. V članku opisujemo materiale na osnovi SiO_2 , kot sta MCM-41 in SBA-15 (2, 3), zato so ti silikatni materiali v nadaljevanju označeni z besedo mezoporozni material oz. ogrodje.

Silikatni materiali (vključno z urejenimi mezoporoznimi silikati) niso toksični, nekateri literaturni podatki tudi potrjujejo njihovo biokompatibilnost (4, 5, 6, 7). Ob stiku z vodo se SiO_2 počasi razgradi v silicijevo kislino ($\text{Si}(\text{OH})_4$), ki vstopa v krvni ali limfni obtok in se izloča z urinom (8). Potrebno je poudariti, da je silicijeva kislina v visokih koncentracijah sicer citotoksična, vendar pa je izločanje prek ledvic dovolj učinkovito, da prepreči toksične koncentracije (9). Vzroke, da se v farmacevtski industriji urejeni mezoporozni silikati zaenkrat še ne uporabljajo kot nosilci zdravilnih učinkovin, velja iskati v (še vedno) nezadostnem številu predkliničnih ter kliničnih študij učinkov tovrstnih materialov ter splošni naklonjenosti farmacevtske tehnologije biokompatibilnim organskim polimerom (npr. mono-, oligo- ter polisaharidom in derivatom).

Porozna struktura je v teh materialih strogo urejena, tako da izkazujejo nekatere kristalom podobne lastnosti, kot so npr. ostri difrakcijski vrhovi pri majhnih kotih in visoka trdnost. Poroznost je lahko urejena v dveh ali treh dimenzijah.



Slika 1: Shematski prikaz različnih ureditev por mezoporoznih silikatov: (A) heksagonalna, (B) bikontinuirana kubična, (C)-(F) različice rešetkaste kubične ureditve. Uporabljeno z dovoljenjem iz ref. (2).

Figure 1: Schematic representation of mesostructure pore models: (A) hexagonal, (B) bicontinuous cubic, (C)-(F) spherical 'cage-type'. Reprinted with permission from ref. (2).

Najbolj uporabni skupini simetriji sta dvodimenzionalna heksagonalna (slika 1A) ter tridimenzionalna kubična (slika 1B-F). Za heksagonalno simetrijo so značilne paralelno usmerjene cilindrične pore, tipični predstavniki pa so MCM-41, FSM-16 (Folded Sheet Materials No. 16), SBA-3 in SBA-15 (2). Kubična simetrija se naprej deli na bikontinuirano kubično (slika 1B) in različne rešetkaste 'cage-like' mezoporozne strukture (slika 1C-F). Bikontinuirana kubična arhitektura je zelo redka in je definirana tako, da notranja površina (t.j. površina sten por) razdeli prostor na dva nasprotno usmerjena porozna sistema v obliki vijah, ki skupaj tvorita bikontinuirano fazo. Pri bolj pogostih rešetkastih strukturah pore tvorijo različne medsebojno povezane tridimenzionalne sisteme mezoskopskih cevi.

Arhitekturo por uravnavamo z ustreznim izborom izhodnih snovi ter s spreminjanjem sinteznih parametrov, nastalo strukturo poroznih sistemov pa določimo s kombinacijo rentgenske difrakcije (XRD), sorpcijske analize in transmisijske elektronske mikroskopije visoke ločljivosti (HR-TEM). Na površini (tako zunanji kot tudi na stenah por) teh mezoporoznih materialov se nahajajo reaktivne silanolne skupine (Si-OH), ki omogočajo pripenjanje raznih funkcionalnih spojin. Tako lahko npr. nanesimo disociirajoče funkcionalne skupine, spojine, občutljive na spremembo temperature, elektrostatsko ali magnetno aktivne spojine, ... Slabost študij funkcionaliziranih ogrodij pa predstavlja pomanjkanje študij zaostanka organskih topil, ki jih običajno uporabljamo pri reakcijah funkcionalizacije ali vgrajevanja zdravilnih učinkovin. Zaenkrat so raziskave dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin na osnovi urejenih mezoporoznih silikatov še v povojih in omejene na laboratorijsko raven. Pri proizvodnji je seveda potrebno upoštevati ICH (International Conference of Harmonisation) smernice Q3C, ki se nanašajo na topila (oz. zaostanke topil) (10). Smernice podajajo priporočila glede uporabe manj toksičnih topil in pri uporabi za zdravje škodljivih topil navajajo toksikološko sprejemljive odstotke.

V članku predstavljamo izbrane primere iz literature, na osnovi katerih je pokazano, kako lahko z vgrajevanjem zdravilnih učinkovin v osnovne ali funkcionalizirane mezoporozne materiale uravnavamo profile sproščanja.

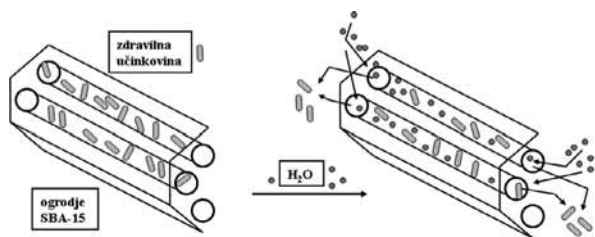
2 Primeri uporabe mezoporoznih ogrodij za nadzorovanje sproščanja

V novejši literaturi najdemo zelo pester nabor raziskav sproščanja zdravilnih učinkovin iz najrazličnejših mezoporoznih ogrodij, ugotovimo pa tudi, da področje ni zanimivo zgolj za farmacijo (11-14). V preteklosti je bilo narejenih tudi veliko raziskav na področju uporabe neurejenih poroznih silikatnih stekel kot ogrodij za dostavo zdravilnih učinkovin (15-20), vendar pa postopek priprave takšnih poroznih stekel ne omogoča načrtovanja arhitekture in ostalih lastnosti poroznega skeleta ter morfologije delcev, zato imajo ti materiali bistveno manjši volumen por in posledično polnilno kapaciteto. Urejeni mezoporozni silikati imajo v primerjavi s poroznimi silikatnimi stekli ozko porazdelitev in strogo ureditev por, veliko specifično površino ter velik volumen por, kar predstavlja bistveno prednost in jih uvršča med idealne kandidate za dostavne sisteme z nadzorovanim sproščanjem. Trenutno je splošno sprejeto mnenje, da na profil sproščanja zdravilnih učinkovin vpliva arhitektura (21) ter velikost por ogrodja (22), specifične interakcije med zdravilno učinkovino in steno por (23) ter struktura vgrajene zdravilne učinkovine (24). Ker ta ogrodja ne nabrekajo, je sproščanje običajno regulirano difuzijsko (torej ga lahko opišemo s Fickovima zakonom). Temu pa ni nujno tako, če so v sistemu prisotne močnejše in/ali specifične interakcije med steno por in zdravilno učinkovino, tako da v nekaterih primerih nad difuzijsko kontrolo prevlada kinetika tvorbe ali razpada (oz. stabilnost) kompleksov med funkcionalnimi skupinami na stenah por ter funkcionalnimi skupinami zdravilne učinkovine. Slednje velja predvsem za funkcionalizirana ogrodja, ki bodo predstavljena v zdajšnjem delu članka. Med opisi teh sistemov najdemo veliko empiričnih ugotovitev, ki pa v glavnem veljajo zgolj za specifične sisteme, splošno razumevanje strukture vgrajenih zdravilnih učinkovin in mehanizma sproščanja glede na strukturne lastnosti nosilca pa zaenkrat še izostaja. Še več, zgodi se tudi, da za strukturno sorodne zdravilne učinkovine s podobnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi v enakih ogrodjih avtorji ugotovijo enake trende profilov sproščanja, ki pa jih razlagajo s popolnoma različnimi mehanizmi (24, 25). Glede opisovanja kinetike lahko dokaj splošno ugotovimo, da je najpogosteje uporabljeni model za opisovanje kinetike Krosmejer-Peppas-ov potenčni model (26), ki običajno zadovoljivo opiše eksperimentalne rezultate, žal pa ne omogoča vpogleda v sam mehanizem sproščanja.

2.1 Nefunkcionalizirana ogrodja SBA-15

Mezoporozni materiali so bili v preteklosti običajno uporabljeni za upočasnitev kinetike sproščanja. Ker je sproščanje nadzorovano z difuzijo, je profil sproščanja mogoče dokaj natančno uravnati s spreminjanjem lastnosti materialov, npr. velikostjo por (21, 23, 27). V primeru hidrofobnega in v vodi slabo topnega itraconazola pa so avtorji ugotovili, da je sproščanje iz heksagonalnega SBA-15, v primerjavi z raztapljanjem nevgrajene kristalinične zdravilne učinkovine, pospešeno (25). Pripravili so mezoporozna ogrodja s premerom por od 4,5 do 9 nm, v katera so vgradili naraščajoče količine itraconazola z imerzijsko metodo iz raztopine klorometana. Strukturne lastnosti vgrajenega itraconazola so preučevali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Na DSC krivuljah vzorcev z vsebnostjo zdravilne učinkovine 24,6 % ali manj ni bilo vidnih prehodov, značilnih za katero od makroskopskih faz, na osnovi česar so avtorji sklepali, da je zdravilna učinkovina v ogrodju

molekularno dispergirana. Na osnovi površine ene molekule in celotne specifične površine ogrodja (ki so jo določili z BET analizo) so avtorji ugotovili, da je maksimalna kapaciteta ogrodja za tvorbo monosloja zdravilne učinkovine približno 22,9 %. Ta groba ocena kapacitete za tvorbo monosloja je, upoštevajoč napako pri tej oceni, dokaz o pravilnosti predpostavke avtorjev, da je zdravilna učinkovina pri vsebnosti pod 24,6 % molekularno dispergirana v ogrodju. *In-vitro* teste sproščanja iz ogrodja s premerom por 7,9 nm pri različnih vsebnostih zdravilne učinkovine ter profil raztapljanja nevgrajene kristalinične zdravilne učinkovine so avtorji izvajali v simuliranem želodčnem soku in ugotovili odlično ponovljivost. Hitrost sproščanja narašča z vsebnostjo zdravilne učinkovine do optimalne vrednosti 32,1 % in se pri nadaljnjem povišanju občutno zmanjša, vendar je še vedno bistveno večja od hitrosti raztapljanja nevgrajene kristalinične zdravilne učinkovine. Padec hitrosti sproščanja pri vsebnostih nad optimalno (> 32,1%), avtorji razlagajo s tvorbo kristalinične in amorfne oblike itrakonazola, ki se sproščata z difuzijsko kontroliranim raztapljanjem zdravilne učinkovine v porah. Naraščanje hitrosti sproščanja z vsebnostjo do optimalne količine vgrajene zdravilne učinkovine pa razlagajo z mehanizmom desorpcije. Zaradi hidrofilitnosti ogrodja je fizisorpcija hidrofobne zdravilne učinkovine šibkejša od fizisorpcije z vodo, zato voda izpodriva zdravilno učinkovino iz vezavnih mest. Pri večjih vsebnostih zdravilne učinkovine, kjer tvorba monosloja ni več mogoča, pa je sproščanje nadzorovano z raztapljanjem kristaliničnega oz. amorfne itrakonazola v porah, t.j. prekinitvijo hidrofobnih vezi med molekulami zdravilne učinkovine ter difuzijo hidratiranih molekul iz ogrodja v raztopino. V primerjavi s sistemi trdnih disperzij zdravilnih učinkovin in organskih hidrofilnih polimerov, kjer hitrost raztapljanja pada z naraščajočo vsebnostjo zdravilne učinkovine, hitrost sproščanja iz SBA ogrodja z naraščajočo vsebnostjo zdravilne učinkovine do optimalne vsebnosti narašča. Desorpcijski mehanizem je shematsko prikazan na sliki 2.



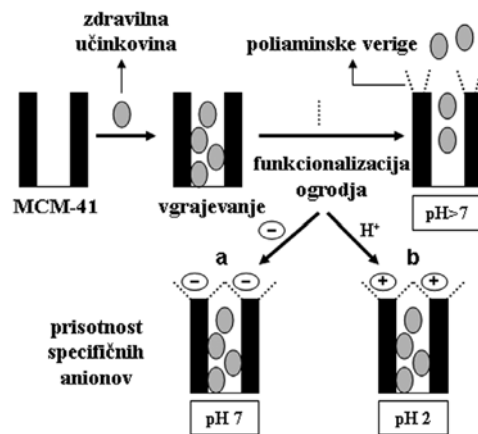
Slika 2: Shematski prikaz desorpcijskega mehanizma.
Figure 2: Schematic representation of desorption mechanism.

Na osnovi rezultatov so avtorji zaključili, da v primeru slabo topnih zdravilnih učinkovin lahko kinetiko raztapljanja oz. sproščanja optimalno pospešimo tako, da se izognemo raztapljanju delcev zdravilne učinkovine (torej prekinitvi hidrofobnih vezi med molekulami zdravilne učinkovine). Slednje lahko storimo tako, da pripravimo monosloj oz. molekularno disperzijo zdravilne učinkovine v ustreznem ogrodju. Glede na dejstvo, da hitrost sproščanja zdravilne učinkovine do optimalne vsebnosti narašča, so ogrodja na osnovi SBA-15 z optimalno velikostjo por odlično sredstvo za doseganje omenjenega cilja. Tudi v primeru, ko je vsebnost zdravilne učinkovine večja od kapacitete za tvorbo molekularne disperzije, je hitrost sproščanja bistveno večja od hitrosti raztapljanja nevgrajene kristalinične zdravilne učinkovine zaradi majhne velikosti delcev zdravilne učinkovine in

morebitnega obstoja amorfne faze, zato ugotavljanje optimalne vsebnosti za pospešitev sproščanja ni nujno. Da slednje ne velja zgolj za itrakonazol, temveč za poljubne slabo topne zdravilne učinkovine, so avtorji pokazali na večji skupini hidrofobnih zdravilnih učinkovin (karbamazepin, diazepam, fenofibrat, griseofulvin, indometacin, nifedipin, ketokonazol, ...)(24).

2.2 Funkcionalizirana mezoporožna ogrodja

Tudi na področju funkcionalizacije mezoporožnih ogrodij kot dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin je bilo objavljenih veliko zanimivih raziskav. Ena od novejših je pokazala uporabnost s poliamini funkcionaliziranega MCM-41 mezoporožnega silikata (s heksagonalno ureditvijo por) za dostavo vitamina B₂ (28). S pripenjanjem (oz. sidranjem) poliaminskega prekursorja na površino por MCM-41 so avtorji dosegli na pH in na vrsto aniona občutljivo sproščanje omenjenega vitamina (slika 3). Študije sproščanja so izvajali pri pH 2 in 7 ter prisotnosti različnih anionov (sulfata, fosfata, gvanozin-5'-monofosfata (GMP) ter adenozin-5'-monofosfata (ATP)). Ugotovili so, da pri pH 2 nastane odboj med poliaminskimi verigami zaradi protonacije amskih skupin, zato se te razprejo in zaprejo pore ter tako preprečujejo sproščanje vitamina, ne glede na vrsto prisotnega aniona (slika 3b). Pri pH 7 pa se vitamin sprošča zgolj v prisotnosti sulfata in GMP, medtem ko v prisotnosti fosfata in ATP pore ostajajo zaprte oz. je sproščanje zanemarljivo. Slednje so pojasnili s tvorbo kompleksov poliamin-anion, ki tudi v nevtralnem pH preprečujejo odpiranje por (slika 3a). Tak sistem je lahko uporaben v primeru peroralne aplikacije zdravilnih učinkovin, ki so v kislem želodčnem soku nestabilne.

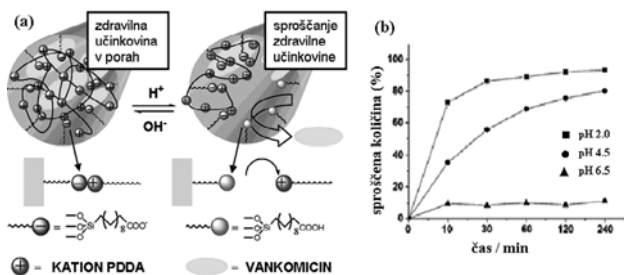


Slika 3: Shematski prikaz sinteze sistema ter mehanizma zapiranja por (a) ob prisotnosti specifičnih anionov ter (b) pri nizkem pH.

Figure 3: Illustration of the synthetic procedure of the system and the gate closing mechanism (a) in the presence of certain anions and (b) in the presence of protons.

Za zdravilne učinkovine, ki so občutljive na bazičen pH oz. je zaželeno, da se selektivno sproščajo zgolj v kislem mediju, so Yang *in sod.* (29) izdelali s karboksilnimi kislinami funkcionaliziran heksagonalni SBA-15, na katerega so preko ionskih mostičkov vezali poli(dimetildialilamonijeve

klorid) (PDDA). Pri nizkem pH se $-\text{COO}^-$ skupine protonirajo, ionske interakcije izginejo, makromolekule PDDA pa posledično oddifundirajo, odprejo pore ter tako omogočijo sproščanje zdravilne učinkovine (slika 4a). Profili sproščanja pri pH 2, 4,5 ter 6,5 so prikazani na sliki 4b.

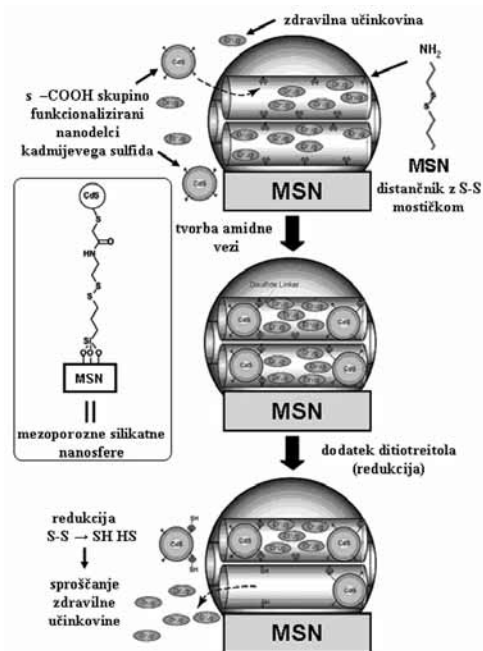


Slika 4: (a) Shematski prikaz strukture in delovanja na pH občutljivega sistema zapiranja por. (b) Profili sproščanja vankomicina pri različnih vrednostih pH. Uporabljeno z dovoljenjem iz ref. (29).

Figure 4: (a) Schematic representation of pH-responsive storage-release drug delivery system. (b) Release profiles of vancomycin at different pH values. Reprinted with permission from ref. (29).

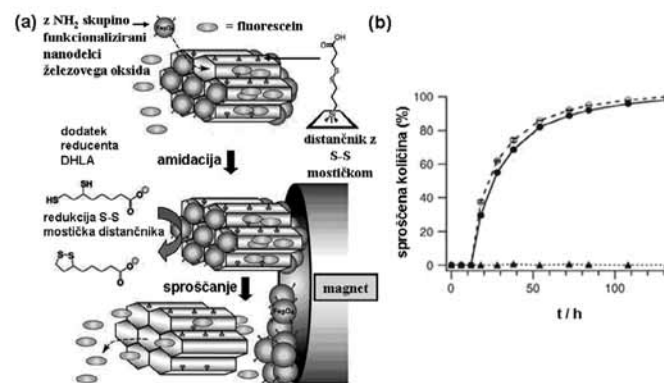
Lai in sod. (30) so pripravili mezoporozne silikatne nanosfere na osnovi MCM-41 in jih funkcionalizirali z molekulo (oz. distančnikom), ki je v strukturi vsebovala disulfidni mostiček s terminalno amino skupino (slika 5). Nato so v te nanosfere vgradili zdravilno učinkovino, čemur je sledilo nadaljnje kovalentno pripenjanje s COOH funkcionaliziranih nanodelcev CdS velikosti 2 nm preko amidne vezi z molekulo z disulfidnim mostičkom. Sproščanje so sprožili z redukcijo disulfidne vezi po dodatku ditioneitolu ali merkaptoetanola. Pokazali so, da je hitrost sproščanja regulirana s kinetiko redukcije $-\text{S}-\text{S}-$ vezi, ki je odvisna od koncentracije reducenta. Avtorji so s kultivacijo astrocitov tipa 1 ter dodatkom z ATP napolnjenih nanosfer MCM-41-CdS dokazali tudi učinkovitost ter biokompatibilnost pripravljenega dostavnega sistema. Po dodatku merkaptoetanola je prišlo do porasta znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} ionov zaradi vezave ATP na tovrstne receptorje.

Da bi omogočili ciljno dostavo zdravilnih učinkovin, so avtorji namesto nanodelcev CdS uporabili superparamagnetne nanodelce Fe_3O_4 velikosti 10 nm (31). Usmerjanje so tako dosegli preko interakcije z zunanjim magnetnim poljem, sproščanje pa so sprožili ponovno z uporabo reducenta (slika 6a). Učinkovitost ter biokompatibilnost pripravljenega dostavnega sistema so preizkušali na He-La celicah. Celice so inkubirali s suspenzijo nanosfer MCM-41- Fe_3O_4 z vgrajenim fluoresceinom. Temu je sledila aplikacija zunanjega magnetnega polja in reducenta ter študija s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. Avtorji so se osredotočili na plast celice v višini celičnega jedra in tako dokazali internalizacijo nanosfer s fluoresceinom ter sproščanje omenjenega fluorescenčnega barvila. Modelna zdravilna učinkovina fluorescein se je sproščala le ob dodatku reducenta (slika 6b), celice z internaliziranimi nanosferami MCM-41- Fe_3O_4 pa so se kopičile na mestu blizu magneta. Prednost superparamagnetnih nanodelcev je ta, da v odsotnosti zunanjega magnetnega polja delci nimajo magnetnih lastnosti, ob aplikaciji le tega pa jih lahko ciljno kopičimo na določenem mestu.



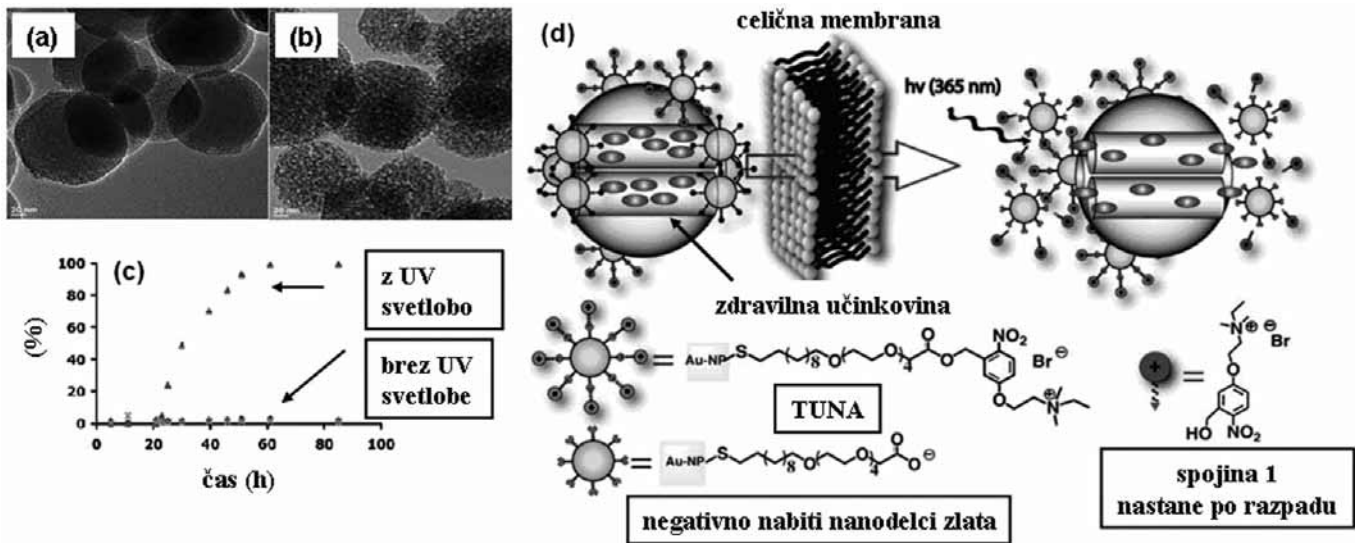
Slika 5: Shematski prikaz strukture nanosfere MCM-41-CdS-ATP ter mehanizma sproščanja zdravilne učinkovine po delovanju reducenta. Uporabljeno z dovoljenjem iz ref. (30).

Figure 5: Schematic representation of the MSM-41-DdS-ATP nanosphere and the drug release mechanism after the addition of the reducing agents. Reprinted with permission from ref. (30).



Slika 6: (a) Shematski prikaz strukture in mehanizma delovanja nanosfer MCM-41- Fe_3O_4 ; (b) Profili sproščanja fluoresceina brez dodatka reducenta (\blacktriangle), z dodatkom dihidrolipoične kisline (DHLA) (\bullet) ter z dodatkom ditioneitolu (\circ). Uporabljeno z dovoljenjem iz ref. (31).

Figure 6: Schematic of the stimuli-responsive delivery system and drug release mechanism of the MCM-41- Fe_3O_4 nanospheres. (b) Controlled release of fluorescein without the addition of the reducing agent (\blacktriangle), with the addition of the dihydrolipoic acid (DHLA) (\bullet) and dithiothreitol (\circ). Reprinted with permission from ref. (31).



Slika 7: (a) TEM posnetek nanosfer MCM-41. (b) TEM posnetek nanosfer MCM-41-TUNA-Au. (c) Profil sproščanja zdravilne učinkovine iz MCM-41-TUNA-Au brez in ob aplikaciji UV svetlobe ($\lambda=365$ nm). (d) Shematski prikaz sistema MCM-41-TUNA-Au z vgrajeno zdravilno učinkovino. Uporabljeno z dovoljenjem iz ref. (32).

Figure 7: (a) TEM micrograph of MCM-41 nanospheres. (b) TEM micrograph of MCM-41-TUNA-Au nanospheres. (c) Drug release profile from MCM-41-TUNA-Au without and after UV irradiation ($\lambda=365$ nm). (d) Schematic representation of drug loaded MCM-41-TUNA-Au. Reprinted with permission from ref. (32).

Analogno so Vivero-Escoto *in sod.* (32) pripravili foto-občutljiv dostavni sistem za znotrajcelično sproščanje paklitaksela. Nanosfere MCM-41 velikosti 100 nm z vgrajeno zdravilno učinkovino (slika 7a) so funkcionalizirali s foto-občutljivim mostičkom, ki je del tioundecil-tetraetilenglikolester-o-nitrobenziletildimetilamonijevega bromida (TUNA). Tako funkcionalizirane nanosfere MCM-41 pa so pripravili tako, da so najprej na nanodelce zlata velikosti 5 nm pripeli TUNA-o. Nato pa so te organsko modificirane nanodelce zlata (s pozitivnim površinskim nabojem) z elektrostatskimi interakcijami vezali na negativno nabito površino MCM-41 (slika 7b in d). Po aplikaciji svetlobe (z valovno dolžino 365 nm) se mostiček TUNA-e razcepi, kar povzroči nastanek negativnega naboja na nanodelcih zlata. Nastali elektrostatski odboj med nanodelci zlata in površino MCM-41 pa povzroči odcepitev nanodelcev zlata, kar posledično omogoči sproščanje zdravilne učinkovine (slika 7c in d).

Avtorji so učinkovitost in biokompatibilnost dostavnega sistema preučevali na celicah človeških fibroblastov ter jetrnih celicah. Ugotovili so, da brez aplikacije svetlobe ni sproščanja učinkovine (kar dokazuje varnost sistema-slika 7c) in da po aplikaciji svetlobe zaradi sproščanja citotoksičnega paklitaksela preživi zgolj 40 % celic (dokaz o učinkovitosti), medtem ko sama aplikacija delcev brez zdravilne učinkovine nima nobenega vpliva na celice (dokaz o biokompatibilnosti sistema).

3 Zaključek

Z izbranimi primeri iz literature smo predstavili uporabnost tako nefunkcionaliziranih kot funkcionaliziranih mezoporoznih silikatov kot dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin. V času sproščanja ti sistemi ne nabrekajo in ne erodirajo, tako da struktura ogrodja ostane

definirana in nespremenjena. Zaradi kemijske inertnosti pri fizioloških pogojih ter biokompatibilnosti predstavljajo dostavni sistemi na osnovi mezoporoznih silikatnih ogrodij privlačno alternativo klasičnim polimernim sistemom. Z vgrajevanjem v vodi slabo topnih zdravilnih učinkovin v mezoporožna silikatna ogrodja lahko dosežemo pospešeno sproščanje, kar je bilo pokazano pri večjem številu modelnih hidrofobnih zdravilnih učinkovin, ki so jih vgradili v mezoporožni SBA-15. Z izdelavo inteligentnih dostavnih sistemov z ustrezno funkcionalizacijo površine mezoporoznih struktur, lahko dosežemo selektivno sproščanje zdravilnih učinkovine ob določenih stimulusih, kot so sprememba pH medija, prisotnost specifičnih ionov, reducentov, magnetnega polja ali UV svetlobe.

4 Literatura

- Hartmann M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chem Mater* 2005; 17 (18): 4577-4593.
- Wan Y, Zhao D. On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chem Rev* 2007; 107 (7): 2821-2860.
- Wang S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Micropor Mesopor Mater* 2009; 117 (1-2): 1-9.
- Kortesuo P, Ahola M, Karlsson S et al. Sol-gel processed sintered silica xerogel as a carrier in controlled drug delivery. *J Biomed Mater Res* 1999; 44 (2): 162-167.
- Kortesuo P, Ahola M. In vitro release of dexmedetomidine from silica xerogel monoliths: effect of sol-gel synthesis parameters. *Int J Pharm* 2001; 221 (1-2): 107-114.
- Kortesuo P, Ahola M. Effect of synthesis parameters of the sol-gel-processed spray-dried silica gel microparticles on the release rate of dexmedetomidine. *Biomaterials* 2002; 23 (13): 2795-2801.
- Ahola M, Kortesuo P. Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. *Int J Pharm* 2000; 195 (1-2): 219-227.

8. Lai W, Ducheyne P, Garino J. Removal pathway of silicon released from bioactive glass granules in vivo. *Bioceramics* 1998; 11: 383–386.
9. Lai W, Garino J, Ducheyne P. Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone. *Biomaterials* 2002; 23 (1): 213–217.
10. ICH Guidance for Industry – Q3C Impurities: Residual Solvents (1997)
11. Hoffmann F, Cornelius M, Morell J et al. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angew Chem Int Ed* 2006; 45 (20): 3216-3251.
12. Vallet-Regi M, Ruiz-Gonzalez L, Izquierdo-Barba I et al. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *J Mater Chem* 2006; 16: 26-31.
13. Ho KY, McKay G, Yeung KL. Selective adsorbents from ordered mesoporous silica. *Langmuir* 2003; 19 (7): 3019-3024.
14. Wang X, Lin KSK, Chan JCC et al. Direct synthesis and catalytic applications of ordered large pore aminopropyl-functionalized SBA-15 mesoporous materials. *J Phys Chem B* 2005; 109 (5):1763-1769.
15. Rupprecht H, Unger K, Kircher W. Incorporation of drugs in polycondensates of polyethoxysiloxane for mediating release of the active substance. II. *Pharmazeutische Industrie* 1980; 2 (12): 1296-1299.
16. Unger K, Rupprecht H, Kircher W. Incorporation of drugs in polycondensates of polyethoxy siloxane for mediation of release of active substance. I. *Pharmazeutische Industrie* 1980; 42 (10): 1027-1030.
17. Unger K, Rupprecht H, Kircher W. Embedding of drugs in polyethoxysiloxane polycondensate for regulation of release. *Pharmazeutische Industrie* 1980; 42 (11): 1130-1134.
18. Kircher W, Rupprecht H, Unger K. Pharmaceutical embedding in condensation polymers of polyethoxy siloxane to control component release. III. Formulations with SiO₂ carrier. *Pharmazeutische Industrie* 1981; 43 (1): 73-76.
19. Unger K, Rupprecht H, Valentin B et al. The use of porous and surface modified silicas as drug delivery and stabilizing agents. *Drug development and industrial pharmacy* 1983; 9 (1-2): 69-91.
20. Sric S, Rupprecht H, Mrhar A et al. Chemiadsorbates of p-hydroxybenzoic acid methyl ester on silica as a new type of pro-drug. III. Modeling and simulation of drug release from chemiadsorbates to acid aqueous solution. *Int J Pharm* 1991; 73 (3): 221-229.
21. Andersson J, Rosenholm J, Areva S et al. Influences of material characteristics on ibuprofen drug loading and release profiles from ordered micro- and mesoporous silica matrices. *Chem Mater* 2004; 16 (21): 4160-4167.
22. Horcajada P, Ramila A, Perez-Pariente J et al. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Micropor Mesopor Mater* 2004; 68 (1-3):105-109.
23. Ramila A, Munoz B, Perez-Pariente J et al. Mesoporous MCM-41 as drug host system. *J Sol-Gel Sci Technol* 2003; 26: 1199-1202.
24. Speybroeck MV, Barillaro V, Do Thi T et al. Ordered mesoporous silica materials SBA-15: A broad spectrum formulation platform for poorly soluble drugs. *J Pharm Sci* 2008; 98(8): 2648-2658.
25. Mellaerts R, Aerts CA, Van Humbeeck J et al. Enhanced release of itraconazole from ordered mesoporous SBA-15 silica materials. *Chem Commun* 2007; 13: 1375-1377.
26. Bajpai AK, Bajpai J, Shukla S. Release dynamics of tetracycline from a loaded semi-interpenetrating polymeric material of polyvinyl alcohol and poly(acrylamide-co-styrene). *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14 (4): 347-357.
27. Vallet-Regi M, Ramila A, Del Real RP et al. A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem Mater* 2001; 13 (2): 308-311.
28. Bernardos A, Anzar E, Coll C et al. Controlled release of vitamin B₂ using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffolds. *J Control Rel* 2008; 131 (3): 181-189.
29. Yang Q, Wang S, Fan P et al. pH-responsive carrier system based on carboxylic acid modified mesoporous silica and polyelectrolyte for drug delivery. *Chem Mater* 2005; 17 (24): 5999-6003.
30. Lai CY, Trewyn BG, Jettinija DM et al. A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of neurotransmitters and drug molecules. *J Am Chem Soc* 2003; 125 (15): 4451–4459.
31. Giri S, Trewyn BG, Stellmaker MP et al. Stimuli-responsive controlled release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2005; 44 (32): 5038–5044.
32. Vivero-Escoto JL, Slowing II, Wu CW et al. Photoinduced intracellular controlled release drug delivery in human cells by gold-capped mesoporous silica nanosphere. *J Am Chem Soc* 2009; 131 (10): 3462-3463.

Kompleksna sestava in učinki strupa medonosne čebele - od anafilaksije do toksičnosti

Complex composition and effects of the honeybee venom - from anaphylaxis to toxicity

Katarina Černe

Povzetek: Medonosno čebelo (*Apis mellifera*) uporabljajo čebelarji po vsem svetu; zato je najpogostejša čebelja vrsta, ki lahko piči človeka. Razen takojšnje bolečine in rahle otekline, čebelji pik običajno mine brez resnih posledic. Smrt in klinično pomembne posledice so zelo redke in so skoraj vedno posledica anafilaktičnega šoka ali posledične zadušitve zaradi otekline grla in neprehodnih dihalnih poti. Manj običajno je smrt posledica toksičnega učinka zaradi velikega števila sočasnih čebeljih pikov, in sicer od več sto do več tisoč pikov. Ledvična odpoved in srčnožilni zapleti so najbolj resne posledice neposredne toksičnosti strupa. Ker je strup medonosne čebele mešanica številnih biološko aktivnih sestavin, je pomembno poznati ne samo učinke celega strupa, ampak tudi posamičnih sestavin. Glavna sestavina strupa je citotoksični polipeptid melitin (~50 %). V strupu je tudi nevrotoksični polipeptid apamin. Najpomembnejši encim in obenem glavni alergen je fosfolipaza A₂. Za otroke predstavlja veliko število sočasnih čebeljih pikov večjo nevarnost kot za odrasle. Specifičnega zdravljenja ni.

Ključne besede: strup medonosne čebele; sestava; anafilaksija; toksičnost; melitin

Abstract: The honeybee (*Apis mellifera*), is used throughout the world by beekeepers; therefore is the bee species most commonly involved in stinging accidents. Beside immediate pain and slight swelling, usually the bee sting has no serious consequence. Death or clinically important incidents are rare and most often are caused by anaphylactic shock or pharyngeal edema and respiratory obstruction. Less commonly, death occurs from the toxic effects of massive envenomation involving hundreds to thousands of stings. Renal failure and cardiovascular complications are most serious events due to direct toxicity. As the venom of honeybees is a mixture of many biologically active components, it is of interest to know the effects of individual components. The main venom component is cytotoxic polypeptide melittin (~50 %). Another polypeptide of the venom is neurotoxic apamin. The most important enzyme and allergen is phospholipase A₂. Children are risk-patients in multiple stinging events. Currently no specific therapy is available.

Keywords: honeybee venom; composition; anaphylaxis; toxicity; melittin

1 Uvod

Strup medonosne čebele je zmes raznolikih bioaktivnih snovi, kot so polipeptidi, hidrolitični encimi in nizkomolekularne organske snovi. Različne sestavine strupa mnogokrat izzovejo nasprotujoče si učinke (1, 2, 3, 4). Zato je pomembno poznati učinke posameznih sestavin strupa, ker lahko iz tega sklepamo na kompleksnost delovanja vseh sestavin strupa. Strup pri čebeljem piku lahko povzroči dve vrsti nezaželenega odziva (a) alergično reakcijo od nekaj minut do 1 ure po piku in (b) toksično reakcijo, ki se pojavi po več sočasnih pikih in nastopi v nekaj urah, medtem ko lahko smrt nastopi tudi šele po več dneh (5, 6, 7, 8). Redko pa nastane še tretji tip nepredvidljive, kasne reakcije, ki se odraža kot miokardni infarkt (9, 10). Histamin, ki se sprošča iz endogenih zalog, tako pri alergični kot pri toksični reakciji vpliva na funkcije različnih organov. Pri ožilju vpliva na tonus žil in prepustnost žilne stene (4). Toksičnost strupa za kardiovaskularni in

živčni sistem je opisana pri ljudeh in ugotovljena na poskusnih živalih (7, 11, 12, 13). Čeprav je v literaturi opisanih veliko primerov napadov čebel na človeka ali hišne živali, pa je znanstvena literatura o specifičnih vplivih na ljudi in mehanizmih toksičnosti relativno redka.

2 Medonosna čebela

Medonosno čebelo (*Apis mellifera*) uvrščamo v družino čebel (Apidae), kamor spadajo tudi čmrlji. Skupaj z osami, sršeni in mravljami spadajo v red kožokrilcev (Hymenoptera). Med prave medonosne čebele prištevamo več evropskih podvrst kot so slovenska avtohtona kranjska čebela (*A. m. carniolica*) (Slika 1), italijanska čebela (*A. m. ligustica*), kavkaška čebela (*A. m. caucasica*), temna čebela (*A. m. mellifera*) in makedonska čebela (*A. m. macedonica*). Izven Evrope med medonosne čebele štejemo afriško čebelo (*A. m. adansonii*) in afrikanizirano čebelo (*A. m. scutellata*) (14). Slednja je dobila vzdevek

čebela ubijalka "killer bee", ker je poznana po številnih množičnih napadih na ljudi s hudim ali celo smrtnim izidom, predvsem pri otrocih (7, 15). Afrikanizirana čebela je nastala s križanjem afriške in evropske čebele in je razširjena v Južni Ameriki, čeprav se meja vedno bolj pomika proti severu in sega v ZDA. Je zelo agresivna in že majhna motnja lahko sproži masovni napad. Njen napad traja dalj kakor pri drugih podvrstah, tudi do 30 minut. Poleg tega je v napad vključenih več čebel hkrati. V nasprotju z afrikanizirano je kranjska čebela miroljubna in piči le, ko se brani. Čebela pusti želo s strupenim mešičkom v koži, sama pa umre. Čebele žive v kolonijah s približno 40 000 delavkami (14).



Slika 1: *Apis mellifera carniolica*.

Figure 1: *Apis mellifera carniolica*.

Preglednica 1: Sestava nehlapnega dela strupa čebele.

Table 1: Composition of the non-volatile part of bee venom.

sestavina čebeljega strupa	% suhe teže celotnega strupa	delovanje
POLIPEPTIDI		
melitin	50	citotoksičnost, relaksacija oz. krčenje žil, depolarizacija in skrčenje mišic, kardioksičnost (veže se na membrano, sproži metabolizem membranskih fosfolipidov, povzroči nastanek membranskih por, micelinizacijo, detergentsko delovanje)
apamin	2	nevrotoksičnost (inhibitor od Ca ²⁺ odvisnih K ⁺ kanalčkov majhne prevodnosti)
mastocyte-degranulirajoči peptid (MCD)	2	sproščanje histamina iz mastocitov, hipotenzija (nizek odmerek), kratkodobna ekscitacija osrednjega živčevja s krči (visok odmerek) (inhibitor napetostno odvisnih K ⁺ kanalčkov)
minimin	3	zavre razvoj vrst <i>Drosophila</i>
HIDROLITIČNI ENCIMI		
hialuronidaza	3	alergeno delovanje z anafilaktičnim šokom; razgradnja beljakovin (odpre poti za delovanje drugih sestavin strupa)
fosfolipaza A ₂	12	alergeno delovanje z anafilaktičnim šokom; hidroliza strukturnih fosfolipidov (membrane, mitohondrijev, sestavin celice)
NIZKOMOLEKULARNE ORGANSKE SNOVI		
histamin	1,5	širjenje ožilje, krčenje gladkih mišic (bronhijev, tankega črevesa, maternice), izločanje eksokrinih žlez, nevrotansmitor v centralnem živčnem sistemu
dopamin	1	nevrotansmitor v centralnem živčnem sistemu
noradrenalin	0,7	nevrotansmitor simpatičnega živčevja, nevrotansmitor v centralnem živčnem sistemu
druge sestavine	5,5

3 Sestava in delovanje čebeljega strupa

Čebelji strup je kompleksna mešanica različnih bioaktivnih snovi (>20 že določenih), s katerimi se čebela brani pred različnimi sovražniki. Sestava nehlapnega dela čebeljega strupa je prikazana v tabeli 1. Poleg nehlapnega dela strupa, vsebuje strup v strupnem mešičku 88 % vode in od 4 do 8 % hlapnih sestavin (feromonov) (3). Glavna sestavina strupa je polipeptid melitin, glavni alergen pa je fosfolipaza A₂. Sestava strupa je pri različnih podvrstah medonosne čebele enaka. Glede vsebnosti fosfolipaze A₂ in histamina so ugotovili sezonske in s starostjo čebele povezane razlike. Vsebnost fosfolipaze A₂ je pri afrikanizirani čebeli višja kot pri evropski čebeli (6, 16).

4 Toksikološke lastnosti strupa medonosne čebele

4.1 Eksperimentalni podatki

Letalni odmerek strupa in njegovih sestavin

Vrednost letalnega odmerka (LD₅₀) za celoten strup je pri miškah 3,1 mg/kg, sc. oz. 1,75 mg /kg, iv. Miške takoj dobijo konvulzije, ki v nekaj minutah vodijo v smrt. Letalni odmerek celega strupa je pri evropskih podvrstah in pri afrikanizirani čebeli enak, medtem ko je letalni odmerek za indijsko čebelo (*A. indica*) dvakrat nižji. Letalni odmerek pri

miškah, *iv*, je za melitin je 3,5 mg/kg, za apamin 4 mg/kg in za fosfolipazo A₂ pa 7,5 mg/kg. Višji je letalni odmerek za mastocite-degranulirajoči peptid (MCD), več kot 40 mg/kg pri miškah, *iv*, čeprav močna cianoza nastopi pri podgani že pri odmerku 0,5 mg/kg, *iv*. Raziskave na poskusnih živalih so pokazale, da toksična reakcija celega strupa vključuje številne kompleksne fiziološke procese, ki so navedeni v predglednici 1. Kot kaže imajo živali vsaj dva obrambna mehanizma, ki jih varujeta pred toksičnostjo strupa, padec temperature in reakcijo kožnih mastocitov (3, 4, 6, 16).

Učinki melitina na celične membrane in transport ionov

Melitin je amfilin polipeptid zgrajen iz 28 aminokislin. Deluje na celično membrano in povzroči spremembe membranske organiziranosti in prepustnosti ter poruši ionsko homeostazo celice. Značilen učinek melitina je razkroj celične membrane (litičnost), za katerega primarni mehanizem še ni pojasnjen. Zaradi pozitivno nabitega C-konca molekule se melitin veže na negativno nabite fosfolipide v membrani in vpliva na električne lastnosti ekscitabilnih tkiv. V nizkih koncentracijah melitin najprej ali sproži metabolizem membranskih lipidov ali tvori začasne difuzijske motnje, zaradi katerih se poveča prevodnost membrane za Na⁺ in Cl⁻. V srednjih koncentracijah tvori anionsko selektivne pore. Višje koncentracije povzročajo reverzibilno micelizacijo, kar privede do razpada membrane (detergentsko delovanje). Hemolizo v poskusih *in vitro* povzroča pri koncentraciji > 1 µg/ml. Prek vezave na membrano vpliva tudi na delovanje membranskih encimov in proteinov, npr. fosfolipaze A₂, Na⁺/K⁺-ATPaze, Na⁺/Ca²⁺ izmenjevalnega sistema, Ca²⁺/kaldmodulina, encima kinaze lahkkih verig (17). Ker melitin deluje preko različnih mehanizmov, lahko s tem razložimo različne učinke na različne vrste celic. Vsaka prizadeta celica se odzove na specifičen način odvisno od koncentracije melitina in trajanje izpostavljenosti ter od fiziološkega oz. patološkega stanja celice.

Toksični učinki celega strupa in melitina na srčnožilni sistem

Celoten strup učinkuje na srčnožilni sistem, kjer povzroča hipotenzijo pri mačkah in podganah, spremembe EKG zapisa pri podgani (zvišanje vala T in znižanje veznice ST) in prenehanje spontanega bitja primarne kulture srčnomišičnih celic miške. Pri poskusu na srčnomišičnih celicah sprva strup sicer prehodno poviša utrip, nato pa ga zmanjša do popolnega prenehanja. Obenem strup povzroči morfološko degeneracijo srčnomišičnih celic. Enak učinek kot cel strup je imel tudi melitin. Poskusi s fosfolipazo A₂ so pokazali, da ta ne vpliva na kontraktilnost in na morfološke spremembe srčnomišičnih celic. Zato predpostavljajo, da je melitin tista sestavina v strupu, ki je odgovorna za toksičnost za srčnomišične celice. Predlagan mehanizem je povišanje znotrajceličnega kalcija. Melitin vpliva na Na⁺/Ca²⁺ izmenjevalni sistem in povzroči, da začne delovati v obratni smeri, tako da Ca²⁺ ioni ne izstopajo iz celice ampak se v celici kopičijo. Bepridil, inhibitor Na⁺/Ca²⁺ izmenjevalnega sistema, je popolnoma zaščitil mišje srčnožilne celice pred vplivi melitina (1).

Melitin izzove krčenje oz. relaksacijo žile, kar je odvisno od koncentracije melitina oz. od organa (3). Melitin izzove začasno relaksacijo izolirane aorte pri podgani ter zajcu in mezenterične arterije pri zajcu (18, 19, 20). Relaksacija žile vključuje predvsem mehanizme,

ki so odvisni od endoteljskih celic. Mehanizmi so odvisni od posameznega tipa žile in od živalske vrste. Vedno je prisotna od endoteljskih celic odvisna relaksacija, ki poteka prek dušikovega oksida. Pri mezenterični arteriji zajca je relaksacija delno odvisna od aktivacije fosfolipaze A₂ v endoteljski celici. Pri nekaterih tipih žil relaksacija poteka preko gladkih mišic, vendar mehanizmi še niso raziskani (19). Višja koncentracija melitina, pri kateri pride do morfološke degeneracije endoteljskih celic, povzroči krčenje izolirane aorte pri podgani (18).

Toksični učinki apamina

Apamin je bazični polipeptid zgrajen iz 18 aminokislin. V nasprotju z melitinom, deluje zelo specifično saj je inhibitor od Ca²⁺ odvisnih K⁺ kanalčkov majhne prevodnosti (SK). Inhibicija SK kanalov zavre izstopanje K⁺ ionov iz celice in s tem onemogoči hiperpolarizacijo membrane. Učinkuje kot nevrotoksin. Pri miškah so opazili, da odmerek 1mg/kg apamina močno moti koordinacijo kateri so sledili krči. Apamin tudi okrepi polisinaptične reflekse in poveča število ekscitatornih prilivov ter s tem aktivacijo večjega števila motoričnih enot. Čeprav je mehanizem delovanja različen, je klinična slika po intraduralni aplikaciji apamina in tetanus toksina na miškah podobna (nekoordinirani gibi repa, zadnje strani telesa in smrt), le da je delovanje apamina hitrejše. Miške, ki so preživele letalni odmerek apamina, so ostale hiperekscitabilne do 60 ur. Histopatološki pregled je izključil možnost poškodbe mišic ali perifernih živcev in potrdil centralno delovanje apamina (3, 12). S pomočjo apamina kot inhibitorja SK kanalov, ugotavljajo vlogo teh kanalov v centralnem živčnem sistemu. Tako so ugotovili, da SK kanali igrajo pomembno vlogo pri natančni notranji nastavitvi vzdražnih lastnosti nevronov in pri odgovoru na živčni impulz, ki pripotuje do sinapse (21). SK kanali igrajo pomembno vlogo tudi pri relaksaciji, ki poteka preko od endotelija odvisnega hiperpolarizacijskega faktorja (EDHF). Zato apamin kot inhibitor SK kanalov zavre relaksacijo žile. Mehanizem EDHF še ni razjasnjen (22).

Toksični učinki mastocite-degranulirajočega peptida (MCD)

Peptid MCD je bazični polipeptid zgrajen iz 22 aminokislin. Po strukturi je bolj podoben apaminu kot melitinu. Ime je dobil po svoji osnovnem učinku, to je degranulaciji mastocitov. Zato ga tudi uvrščamo med "48/80-podobne" snovi, kamor sodijo neimunološki sproščevalci mediatorjev vnetja iz mastocitov (npr. peptidi, citokini, lektini) (23). 10 µg peptida MCD zniža krvni pritisk pri podgani, verjetno zaradi sprostitve histamina. Višji odmerki povzročijo kratkodnelujočo vzdražnost s krči. Peptid MCD je tudi inhibitor napetostno odvisnih kalijevih kanalov (ugotovljena je selektivnost za Kv1 in Kv6) (24). Kv kanali imajo glavno vlogo pri določanju mirovnega membranskega potenciala. Njihova inhibicija lahko vodi v žilna obolenja kot so hipertenzija ter krč (25). Vpliv peptida MCD na žilna obolenja pa še ni preučen.

Toksični učinki fosfolipaze A₂

Strupi različnih živali vsebujejo fosfolipazo A₂. Fosfolipaze A₂ v čebeljem strupu se po aktivnosti razlikuje od tiste v strupu kač (26). Čebelja fosfolipaza A₂ deluje sinergistično z melitinom, tako da katalizira hidrolizo fosfolipidov v celični membrani. Če je membrana intaktna, sama fosfolipaza A₂ ne more začeti razkroja membrane. Zato

potrebuje melitin, ki encimu omogoči dostop do substrata. Melitin pa lahko deluje tudi sam, čeprav prisotni razgradni produkti fosfolipidov, njegove učinke na membrano še povečajo. Ker so fosfolipidi gradbeni deli celične membrane in celičnih organelov, njihova razgradnja privede do odpovedi celičnih funkcij. Produkti razgradnje fosfolipidov so lizofosfolipidi, ki kot melitin razkroje celično membrano (npr. lizofosfatidilholin) in arahidonska kislina. Metaboliti arahidonske kisline kot so leukotrieni in prostaglandini, so mediatorji vnetnih reakcij. (3, 5, 14).

Posredni učinki strupa

Posamezne sestavine strupa lahko posredno delujejo tako, da povzročijo sproščanje endogenih snovi, med drugimi tudi histamina iz mastocitov in tako pride do enakih posledic kot pri alergiji (13, 14). Degranulacijo mastocitov povzroči peptid MCD (15, 27). Tudi melitin lahko sam ali skupaj s fosfolipazo A₂ poškoduje membrano mastocitov in ravno tako privede do sproščanja histamina. Pri preprečevanju toksičnih učinkov je zato pomembna sposobnost celic, da privzamejo histamin ter s tem končajo njegov učinek. Predvsem celice v osrednjem živčevju, ravno tako pa tudi endotelijske celice so sposobne privzeti histamin (28, 29, 30). Melitin poškoduje membrano tudi pri drugih vrstah celic, kot so (a) levkociti ter njihovih lizosomi iz katerih se sprostijo encimi; (b) trombociti iz katerih se sprostijo serotonin ter (c) prečnoprogaste mišične celice iz katerih se sprostijo kalijevi ioni ter organski in anorganski fosfati (3).

4.2 Lastne raziskave

Ker so srčnožilni zapleti poleg ledvične odpovedi najbolj resni in življenjsko nevarni, predvsem v primeru večkratnih pikov, smo naše raziskave usmerili v učinke čebeljega strupa na srčnožilni sistem. Zanimal nas je odziv venčne arterije in mehanizmi, ki privedejo do odziva. Ugotovili smo, da čebelji strup povzroči krčenje venčne arterije v koncentracijskem območju od 0,35 do 70 µg/ml. Preskuse smo naredili na izolirani žili. Kot model smo izbrali levo sprednjo descendentno koronarno arterijo (LAD) pri prašiču, ki z oksigenirano krvjo oskrbuje velik del srca (31). Koncentracijsko območju pri katerem je strup v *in vitro* poskusih krčil LAD je v sorazmerju z najvišjo koncentracijo strupa (3,7 µg/ml) v krvi pacienta, ki ga je napadel roj afrikaniziranih čebel. Istočasno so pri pacientu med drugim ugotovili hipertenzijo, po nekaj dneh pa je umrl (5). Ugotovili smo tudi, da kalcijev antagonist lacidipin delno zavre krčenje LAD, ki ga izzove strup (31).

5 Škodljivi učinki čebeljega strupa za človeka

Učinki čebeljega strupa se glede na število pikov razlikujejo in so prikazani v preglednici 2 (4, 5). Količina strupa, ki ga vbrizga evropska medonosna čebela je 147 µg/pik (tudi primeri do 300 µg/pik), medtem ko afrikanizirana čebela, ki je nekoliko manjša, vbrizga tudi manj strupa, to je 94 µg/pik (6). Količina strupa je pri čebelah delavkah najvišja v poletnih mesecih, ko je panj na višku aktivnosti in ga stražijo relativno mlade čebele. Najvišja izmerjena koncentracija strupa, ki so jo določili pri 13-letnemu bolniku 2 uri po napadu afrikaniziranih čebel, je 3,8 µg/ml v serumu in 1,2 µg/ml v urinu. Nivo fosfolipaze A₂ je bil pri istem bolniku 0,81 µg/ml v serumu in 0,2 µg/ml v urinu. Pet-krat nižji

nivo fosfolipaze A₂ glede na cel strup je v skladu z njeno vsebnostjo v strupu. Če izmerjen nivo strupa preračunamo na celokupno količino strupa v krvi ugotovimo, da se je po več kot 1000 pikih (iz kože so potegnili 800 žel) absorbiralo v sistemski krvni obtok 27.36 mg strupa. To pomeni, da je bila absorpcija 29 % (7).

Najpogostejši škodljiv učinek čebeljega strupa pri človeku je alergična reakcija. Stopnja alergične reakcije je zelo različna od rahlega neugodja do anafilaktičnega šoka, pri katerem je pogost smrten izid (5). Zelo redki so primeri bolnikov, ko manj kot 10 čebeljih pikov povzroči nekrozo srčne mišice, ki jo spremljajo prehodne motnje EKG (znižanje/zvišanje ST veznice) s sinusno tahikardijo. Mehanizem tega škodljivega učinka ni pojasnjen. Lahko bi bila nekroza srčne mišice posledica močnega krča koronarne arterije ali /in sekundarne in situ tromboze, katere nastanek pospeši nagel padec krvnega tlaka (9, 10). Čebelji strup lahko podaljšuje protrombinski čas, aktiviran parcialni protrombinski čas in zmanjšuje število trombocitov (7, 32). Prehodne motnje EKG so lahko posledica lokalnih učinkov strupa na žile, kardiotoksičnosti strupa ali anafilaktične reakcije (6, 9, 11, 33). Pri velikem številu sočasnih pikov strup povzroči sistemsko toksičnost, lahko tudi s smrtnim izidom. Pri otrocih je manj jasno določeno najmanjše število pikov, ki že lahko povzroči sistemsko toksičnost (5, 8, 14). Pri pikih čebel, in sicer tako po nekaj sočasnih pikih kot po masovnih pikih, sta ledvična odpoved in srčnožilni učinki najbolj resna in življenjsko nevarna zapleta (5, 11). Za bolečino pri piku je odgovoren melitin (6).

Preglednica 2: Učinki čebeljega strupa glede na število pikov.

Table 2: Effects of bee venom in relation to the number of stings.

Število pikov	Učinek
1-10	alergična reakcija z možnostjo anafilaktičnega šoka, ko je pogost smrten izid (smrt: nekaj minut < 1 ura)
30-50	direktna toksična reakcija s smrtnim izidom pri otrocih
ca. 50	sistemska toksičnost
100-200	direktna toksična reakcija s smrtnim izidom pri starejših
ca. 500	direktna toksična reakcija s smrtnim izidom pri odraslih (smrt: nekaj ur – nekaj dni)

5.1 Anafilaksija

Najpogostejše je smrtni izid pri čebeljem piku posledica s protitelesi IgE povzročene takojšnje preobčutljivosti. Pogostost preobčutljivostnih reakcij po pikih žuželk se razlikuje od države do države. Pri približno 0,15 do 4 % populacije strup kožekrilcev povzroči sistemsko anafilaksijo; nižji odstotek je v krajih, ki leže v zmerno toplem pasu. Zaradi anafilaksije v ZDA vsako leto umre 20 do 50 ljudi. Za Evropo tovrstnih verodostojnih podatkov ni. Za Dansko poročajo o enem, za Nemčijo pa o desetih smrtnih primerih na leto (14). Skoraj 75% ljudi doživi ponovitev sistemske alergijske reakcije ob piku enake vrste žuželke. V primeru, da je bila predhodna reakcija le lokalna, se sproži sistemski alergijski odziv ob ponovnem piku pri 5-10% ljudi. Čebelji pik spada med dejavnike tveganja za sistemsko alergijsko reakcijo. Drugi

dejavniki tveganja so kratek interval med dvema pikoma z enakim insektom, manj kot 25 pikov na leto, huda sistemska reakcija ob predhodnem pikju, pridružene srčnožilne bolezni ali mastocitoza in zdravljenje z beta blokatorji. Tveganje za anafilaktično reakcijo po pikju insekta je manjše pri otrocih (34). Smrt običajno nastopi zaradi hipotenzije, laringealnega edema ali zaradi bronhokonstrikcije, in sicer v času od nekaj minut do 1 ure. Glavna dokazana alergena v čebeljem strupu sta fosfolipaza A₂ in hialuronidaza (14). Vloga melitina, apamina in peptida MCD v alergični reakciji ni razjasnjena (4).

5.2 Direktna toksičnost

Odkar je afrikanizirana čebela ušla leta 1957 iz laboratorija v Braziliji, se število primerov direktne toksičnosti strupa zaradi množičnih napadov teh čebel povečuje. Vsako leto zabeležijo več kot 100 napadov, med katerimi se nekateri končajo tudi s smrtnim izidom. Napadajo pa lahko tudi evropska čebela, vendar le če jo dovolj izzivamo. Kadar čebela napada najraje piči v glavo ali vrat. Za sistemske toksičnosti pri odraslem človeku je potrebnih 50 ali več pikov (5, 7, 15, 16, 17). Čeprav se večinoma toksični učinki pokažejo v nekaj urah po pikih (nekateri tudi v nekaj minutah), so včasih zakasneli in se pojavijo tudi po več kot 24 urah (7, 8, 17). Smrt običajno nastopi do 22 ur po pikih, včasih pa tudi po več kot 10 dneh (16, 17). Ocenjujejo, da je LD₅₀ za človeka količina strupa, ki se v telo vnese s do več kot 1000 pikov (5, 16). Pri starejših ljudeh so opisani primeri smrti že po 100 do 200 pikih (8, 16).

V primerih z masovnim pikju čebel (od > 200 do > 1000 pikov) so opisani naslednji toksični učinki: akutna ledvična odpoved, hemoliza in homeostatske motnje (ikterus, sistemske krvavitve), rabdmioliza, hipertenzija in poškodbe miokarda, sindrom dihalne stiske pri odraslem (ARDS), motnje v delovanju jeter, nevrološki učinki (konvulzije, motnje zavesti, koma) in lokalni učinki (edem, hemoragične nekroze). Vzrok za toksične učinke pripisujejo predvsem citotoksičnemu učinku melitina in fosfolipaze A₂. Posledica njunega delovanja so poškodbe različnih tkiv (skeletna mišica = rabdmioliza, srčna mišica, ledvični tubuli, jetra), hemoliza in lokalni učinki (hemoragična nekroza kože). Učinke

na osrednje živčevje pripisujejo delovanju melitina in apamina, ki lahko preideja krvno-možgansko pregrado. Lahko pa nastanejo tudi kot posledica hipoksije, hipovolemije in anafilaktičnega šoka (5, 6, 7, 8).

Odpoved ledvične funkcije z akutno tubularno nekrozo je dobro poznana posledica pri primerih z več sočasnimi pikji. Težko ločimo ali je odpoved posledica direktne toksičnosti strupa za ledvične tubule ali je posledica rabdmiolize in hemolize. Ne moremo tudi izključiti, da je ledvična odpoved lahko posledica močne hipotenzije preden bolnika sprejmejo v bolnico (5, 6, 7, 8).

Intravaskularna hemoliza je glavni učinek v večini primerov z več sočasnimi pikji. V večini primerov je bilo težko razlikovati med hemoglobinurijo in mioglobinurijo. Našli so dokaze o direktni intravaskularni hemolizi (neodvisni od komplementa) in methemoglobinemijo. Pri mnogih bolnikih je hemoliza vodila v anurijo, nezavest in smrt po 1 do 3 dnevih (5, 7).

Generalizirana rabdmioliza je tudi ena od glavnih toksičnih učinkov strupa. Pri bolnikih so našli mioglobin v krvi in urinu, povišani vrednosti kreatin-fosfokinaze in aspartat-aminotransferaze v serumu ter histopatološke dokaze o rabdmiolizi (5, 6, 7, 8).

Kardiovaskularne nenormalnosti kot sta hipertenzija in/ali histološki dokazi o subendokardialnem infarktu, so opisani v več primerih. Vzrok zanje so lahko sproščeni endogeni kateholamini, kar je posledica razgradnje celične membrane s pomočjo melitina in fosfolipaze A₂. Poleg tega melitin povzroča krčenje mišic (5, 7, 9, 10, 11, 33).

ARDS /pljučni edem s histološkim videzom hialine membrane je omenjen v nekaterih primerih. Sindrom se lahko razvije zaradi samega šoka ali zaradi toksičnih učinkov strupa na membrane pljučnih kapilar, in sicer direktno ali preko levkocitoze (5, 7).

Poškodbe jeter so sicer bolj znan toksičen učinek strupa os in sršenov, čeprav lahko nastane tudi kot posledica toksičnega učinka strupa čebel. Pri bolnikih so našli dokaze o nekrozi hepatocitov in povišan indirektni bilirubin. K tovrstnim spremembam lahko prispeva tudi šok. Sistemske krvavitve, katere so opazili pri nekaterih bolnikih zaradi

Preglednica 3: Shema nujne medicinske pomoči pri pikju čebele (5).

Table 3: Scheme of emergency treatment after bee sting.

Status	Nujno simptomatično zdravljenje	Protistrup
Slabost, bolečine v trebuhu, diareja, urtikaria, angionevrotski edem, bronhospazm, arterielna hipotenzija (sistemska alergična reakcija).	<ul style="list-style-type: none"> Ukrepi ob generalizirani alergični reakciji. 	N
Močan lokalni edem (močna lokalna alergična reakcija).	<ul style="list-style-type: none"> Ukrepi ob lokalni alergični reakciji. 	I
Močan lokalni edem – hipovolemija – hipovolemični šok (povečana prepustnost kapilar na določenem območju).	<ul style="list-style-type: none"> Ukrepi ob hipovolemiji / hipovolemični šok. 	N
Večkraten pik Ikterus, obarvan urin, akutna ledvična odpoved (hemoliza).	<ul style="list-style-type: none"> Ukrepi ob hemolizi, eventualno transfuzija. Preprečitev / ukrepi ob akutni ledvični odpovedi. 	A
Večkraten pik Mišična bolečina (spontano ali ob aktivnem / pasivnem gibanju), obarvan urin, spremembe EKG, mišična nemoč (rabdmioliza)	<ul style="list-style-type: none"> Ukrepi ob hiperkaliemiji. Preprečitev / ukrepi ob akutni ledvični odpovedi. Ukrepi ob respiratorni insuficienci / respiratorni odpovedi. Endotrahealna intubacija in umetna ventilacija. 	V O L J O

motenj v strjevanju krvi, so lahko posledica pomanjkanja koagulacijskih faktorjev zaradi poškodbe jeter (5,6,7).

6 Ukrepi

Osnovni ukrepi so v preglednici 3 in se razlikujejo glede na težo stanja in ali gre za imunsko ali toksično reakcijo. V obeh primerih pa moramo najhitreje odstraniti čebelje želo, da preprečimo nadaljnjo izpostavljenost strupu. Strup se skoraj popolnoma sprazni iz strupnega mešička v 20 do 30 sekundah po pikju. Če žela ne odstranimo v manj kot 1 minuti po pikju, s tem ne zmanjšamo vnos strupa v telo, preprečimo pa lokalni učinek strupa kot je poškodba na koži in tako zboljšamo bolnikovo počutje (6).

Pri anafilaktični reakciji na čebelji strup so ukrepi enaki kot pri drugih alergenih. Glede na stopnjo anafilaksije uporabimo antihistaminike, glukokortikoide, adrenalin, nadziramo in vzdržujemo življenske funkcije. Pri bolnikih, ki so alergični na čebelji strup, lahko izvajamo specifično imunoterapijo. Bolnike, ki jo potrebujejo, izberemo na osnovi podatkov o stopnji alergijske reakcije ter verjetnosti, da bo prišlo do ponovnega pika (6, 34).

Pri toksični reakciji bolnik potrebuje zelo intenzivne ukrepe. Protistrupa ni na voljo. Zaradi sprostite velikih količin histamina, uporabimo enaka zdravila kot pri anafilaksiji. Predvsem moramo okrepiti izločanje urina (furosemid, iv) ob intenzivni hidraciji, da zmanjšamo verjetnost z rbdomiolozo povzročene odpovedi delovanja ledvic. Hemofiltracija in hemodializa prideta v poštev v primeru akutne odpovedi ledvične funkcije. Zdravljene s kortikosteroidi je koristno v primeru nefrotskega sindroma. Za zdravljenje hiperkateholaminskega sindroma dajemo prazosin in nifedipin. Za bolnika, pri katerem se zelo kmalu po številnih pikih pojavijo resni učinki, prideta v poštev izmenjevalna transfuzija in plazmafereza. Antibiotike dajemo za preprečevanje infekcije kože na mestih z večim številom pikov. Z medicinsko oskrbo lahko prežive tudi bolniki, katere je napadlo več kot 1000 čebel (5, 6, 7, 8).

7 Sklep

Pri čebeljih pikih moramo ločiti alergično reakcijo od toksične. Pri anafilaktični reakciji na čebelji strup so ukrepi enaki kot pri drugih alergenih. Največje tveganje pri anafilaktični reakciji predstavljajo srčnožilne bolezni, mastocitoza in zdravljenje z beta blokatorji. Toksična reakcija nastane po več sočasnih pikih. Kadar pride do toksične reakcije zaradi velikega števila pikov je simptomatično zdravljenje večkrat neuspešno. Problem učinkovitega zdravljenja je kompleksna sestava čebeljega strupa. Glavno vlogo pri toksični reakciji igrajo direktni učinki melitina, peptida MCD in fosfolipaze A₂ na celično membrano. Tako vplivajo na celične funkcije, povzročijo celično smrt ali sproščanje endogenih snovi iz celic. Toksičnost čebeljega strupa predstavlja največje tveganje za otroke in starejše osebe. Pri čebeljih pikih je glaven problem, da za inaktivacijo njegovih toksičnih učinkov nimamo protistrupa.

8 Literatura

1. Okamoto T, Isoda H, Kubota K, et al. Melittin cardiotoxicity in cultured mouse cardiac myocytes and its correlation with calcium overload. *Toxicol Applied Pharmacol* 1994; 133: 150-163.

2. Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 180-184.
3. Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972; 177: 314-322.
4. O'Connor R, Peck ML. Venoms of apidae. In: *Arthropod venoms*. Berlin: Springer Verlag; 1978: 613-659.
5. Junghans T, Bodio M. *Notfall-Handbuch Gifttiere*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1996: 165-177.
6. Vetter RS, Vischer PK, Camazine S. Mass envenomation by honey bees and wasps. *WJM* 1999; 170: 223-227.
7. Franca FOS, Benvenuti HW, Fan DR, et al. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees - *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *Quarterly Journal of Medicine* 1994; 87: 269-282.
8. Betten DP et al. Massive honey bee envenomation-induced rhabdomyolysis in an adolescent. *Pediatrics* 2006; 117: 231-5.
9. Massing JL et al. [Myocardial infarction following a bee sting. Apropos of a case and review of the literature]. *Annale de Cardiologie et d'Angeiologie (Paris)* 1997; 46: 311-5.
10. Ceyhan C, Ertugrul E, Tarkan T, et al. Myocardial infarction following a bee sting. *International Journal of Cardiology* 2001; 80: 251-253.
11. Gueron M, Ilija R, Margulis G. Arthropod poisons and the cardiovascular system. *The American Journal of Emergency Medicine* 2000; 18: 95.
12. Habermann E. Neurotoxicity of apamin and MCD peptide upon central application. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1977; 300: 189-91.
13. Liu NK, Zhang YP, Tittsworth WL, et al. A novel role of phospholipase A(2) in mediating spinal cord secondary injury. *Ann Neurol* 2006; 23: 67-78.
14. Mebs D. *Venomous and Poisonous Animals*. Boca Raton: CRC Press; 2002. p. 209-218.
15. Tayler OR. Health problems associated with African bee. *Annals Int Med* 1986; 104: 267.
16. Jones RGA, Corteling RL, Bhogal G, Landon J. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 1999; 61: 361-366.
17. Kourie JI, Shorthouse AA. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *AJP Cell Physiology* 2000; 278: C1063-1087.
18. Rapoport RM, Ashraf M, Murad F. Effects of melittin on endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. *Circulation research* 1986; 64: 463-472.
19. Hutcheson IR, Griffith TM. Role of phospholipase A2 and myoendothelial gap junctions in melittin-induced arterial relaxation. *Europ J Pharmacol* 2000; 406: 239-245.
20. Forstermann U, Burgwitz K, Frolich JC. Effects of nonsteroidal phospholipase inhibitors and glucocorticoids on endothelium-dependent relaxations of rabbit aorta induced by different agents. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1987; 10: 356-64.
21. Bond CT, Maylie J, Adelman JP. SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Current Opinion in Neurobiology* 2005; 15: 305-11.
22. Rang HP et al. *Pharmacology*, sixth edition. Churchill Livingstone: London, 2007: 299-300.
23. Ferjan I. Regulatorna vloga Ca²⁺ ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov. *Farmaceutski vestnik* 2009; 60: 165-68.
24. Schmidt K, Eulitz D, Veh RW et al. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the *shaker* family Kv1 in oligodendrocyte progenitors. *Brain Research* 1999; 843: 14-60.
25. Shimizu S, Yoshikiki H, Sperelakis N, et al. Role of voltage-dependent and Ca(2+)-activated K(+) channels on the regulation of isometric force in porcine coronary artery. *Journal of Vascular Research* 2000; 37: 16-25.
26. Jerman B, Pungercar J. Sekretorne fosfolipaze A₂ in njihova (pato)fiziološka vloga. *Farmaceutski vestnik* 2008; 59: 9-15.
27. Buku A, Price JA, Mendlowitz M, Masur S. Mast cell degranulating peptides binds to RBL-2H3 mast cell receptors and inhibits IgE binding. *Peptides* 2001; 22: 1993-1998.
28. Krzan M, Schwartz JP. Histamine transport in neonatal and adult astrocytes. *Inflamm Res* 2006; 55: Suppl: S36-37.
29. Černe K, Irman-Florjanc T, Kržan M. Histamine uptake into human vascular endothelial cells and influence of three different antidepressant drugs. *Inflammation Research Suppl* 2008; 57: 37-8.

30. Lewis Baenziger N, Mack P, Jong I, Dalemar LR, et al. An Environmentally Regulated Receptor for Diamine Oxidase Modulates Human Endothelial Cell/Fibroblast Histamine Degradative Uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 14892-14898.
31. Černe K, Drevenšek G, Budihna MV. 2000. Lacidipine decreases the honey bee venom-induced vasoconstriction of the isolated porcine coronary artery. *Pflugers archiv* 2000; 440; Suppl: R139-140.
32. Ashley JR, Otero H, Aboulafia DM. Bee envenomation: a rare cause of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Southern Medical Journal* 2003; 96:588-91.
33. Magadle R *et al.* [Acute myocardial infarction after honeybee sting]. *Harefuah* 2000; 138: 543-5, 614.
34. Žitnik ES. Zgodnja imunoterapija alergijskih bolezni. In: Mitja Košnik ed. *Zgodnja terapija alergijskih bolezni: Zagotavljanje kakovosti v alergologiji*. Ljubljana, Slovensko zdravniško društvo. Alergološka in imunološka sekcija; 2006: 8-9.

Par je več kot dvojica – AstraZeneca vaš partner pri zdravljenju

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

avtor: skulptur Marjan Drey, foto: skulpture Bonif. Gabojski, kavnik Bojan Pergovnik; oblikovanje Evita Lukež



Pomen Heckelove analize za proučevanje kompresibilnosti zmesi za tabletiranje

The meaning of Heckel analysis for studying the compressibility of powder mixtures for tableting

Maja Bunjevac, Franc Vrečer, Ilija Ilić, Saša Baumgartner

Povzetek: V farmacevtski proizvodnji se pogosto srečujemo s slabo pretočnimi in slabo stisljivimi formulacijami z visokim deležem prašnih delcev ali zdravilne učinkovine. Takšne zmesi moramo praviloma predhodno obdelati z ustreznim načinom aglomeracije. Poznavanje poroznosti in primarnega mehanizma zmanjševanja volumna oziroma stisljivosti prahov je pomembno za ustrezno napoved lastnosti aglomeriranih prahov. Heckelova analiza preiskuje sposobnost zmanjševanja volumna prahov in deformacije delcev pri stiskanju posameznih snovi ali njihovih zmesi. Granuliranje prahov je najpogosteje uporabljena metoda izboljšanja njihove stisljivosti, saj z njihovo pretvorbo v kohezivne aglomerate običajno izboljšamo tako kompresibilnost kot kompaktilnost, in dosežemo tudi dobro pretočnost. Vse to se odraža v optimalnejšem procesu stiskanja. Primarni mehanizem zmanjševanja volumna prahov pri stiskanju, ki je pomemben za optimizacijo formulacije in nastavitev optimalne hitrosti tabletiranja, lahko napovemo na osnovi parametrov izračunanih iz Heckelove krivulje, ki temelji na eksperimentalnih podatkih. Heckelova analiza lahko do določene mere ponuja tudi odgovore, kakšno vrsto granulata moramo izdelati, da pri izdelanih tabletah ne bo prišlo do neželenega pojava laminacije tablet.

Ključne besede: Heckelova analiza, stisljivost, poroznost, plastična deformacija, fragmentacija, granulati, tabletiranje

Abstract: In pharmaceutical production we often deal with poorly flowable and poorly compressible formulations containing higher proportion of fine particles or the active substance. Such mixtures are usually necessary to be pre-processed with the appropriate agglomeration method. Basic knowledge of porosity and the primary mechanism of volume reduction or the compressibility of the powder, is important for the suitable prediction of the agglomerated powder characteristics. Heckel analysis, which examines the ability of volume reduction of powders and the deformation of particles under the compression pressure, is one of the most widely used analyses in evaluating the compressibility of the individual substances or their mixtures. The granulation of powders is mostly used method for improvement of their compressibility by changing fine particles into cohesive clusters, which usually show beside good compressibility and compactibility also a good flowability resulting in better compression process. Primary volume reduction mechanism of powder bed during compression, which is important for formulation optimization and setting of optimal compression speed resulting in required tablet hardness, can be predicted from the parameters derived from Heckel plot based on experimental results. Heckel analysis can to some extent provide also the answers to the raised question, which granulation method is the most appropriate to finally get tablets, where no lamination is observed.

Key words: Heckel analysis, compressibility, porosity, plastic deformation, fragmentation, granules, tableting

1 Uvod

Uspešen proces tabletiranja temelji na poznavanju osnovnih fizikalno-kemijskih lastnosti prahov, ki narekujejo obnašanje delcev med procesom stiskanja. Na podlagi znanih lastnosti zdravilne učinkovine (ZU), lahko izberemo takšne pomožne snovi, ki bodo pripomogle k boljši stisljivosti in višji trdnosti izdelanih tablet. Za uspešno tabletiranje sta nujni dve lastnosti tabletni zmesi: pretočnost in stisljivost. Pretočnost zmesi vpliva predvsem na enakomernost mase in posledično vsebnosti

zdravilne učinkovine v izdelanih tabletah. Medtem ko za merjenje pretočnosti obstajajo številne farmakopejske metode (pretočni čas, nasipni kot, Carrov indeks, Hausnerjevo razmerje, itd.) (1), pa je stisljivost zmesi bistveno težje ovrednotiti, še težje pa je doseči primerljivost med rezultati pridobljenimi z različnimi metodami. Z namenom jasnejše opredelitve stisljivosti lahko slednjo razdelimo na dva pojma, ki predstavljata lastnosti prahov in bistveno vplivata na kakovost izdelanih tablet: kompresibilnost in kompaktilnost. Kompresibilnost je opredeljena kot sposobnost zmanjševanja volumna

prahov oz. deformacije delcev pod tlakom, medtem ko pod pojmom kompaktilnost razumemo sposobnost tvorbe mehansko močnih kompakto s tvorbo vezi med delci (2, 3). Oba procesa med tabletiranjem potekata zaporedno. Najprej pride do zmanjševanja navideznega volumna zmesi za tabletiranje zaradi preurejanja delcev in posledično odstranitve prisotnega zraka med delci. Sledi tvorba vezi med delci. V praksi je proces stiskanja zmesi prahov v tablete zelo kompleksen in nepredvidljiv tehnološki proces (4).

Za študij kompresibilnosti posameznih snovi in zmesi se uporabljajo različni modeli in analize metode. Za kvantifikacijo kompresibilnosti je najpogosteje uporabljena Heckelova analiza, s katero spremljamo zmanjševanje poroznosti tablete v odvisnosti od naraščajočega tlaka stiskanja (5, 6). Razmerje med tlakom in poroznostjo nam daje osnovne informacije o kompresibilnih lastnostih preiskovane snovi, omogoča primerjavo kompresibilnosti različnih snovi in nenazadnje lahko napove, kakšne tlake moramo uporabiti med tabletiranjem, da dosežemo željeno poroznost in s tem trdnost tablet (7, 4).

Nekateri raziskovalci namreč menijo, da visoke vrednosti kompresibilnosti običajno pomenijo tudi visoke vrednosti kompaktilnosti (npr. mikrokristalna celuloza). Snov, ki izkazuje visoko tendenco k plastični deformaciji in je torej visoko kompresibilna, bo ob obremenitvi tvorila zaradi teh ugodnih lastnosti številne kontaktne površine med delci, kar bo posledično vodilo v nastanek tablet z višjo trdnostjo in kompaktilnostjo. V določenih primerih sta torej kompaktilnost in kompresibilnost lahko medsebojno v pozitivni korelaciji, vendar to pravilo ni splošno veljavno (8).

2 Proces stiskanja tablet

Da bi razumeli pomen stisljivosti posameznih snovi in njihovih zmesi, moramo razumeti proces stiskanja tablet, ki poteka skozi različne stopnje (6):

- 1) prerazporeditev delcev
- 2) deformacija zaradi elastičnih sprememb
- 3) plastična deformacija
- 4) lom delcev oziroma fragmentacija

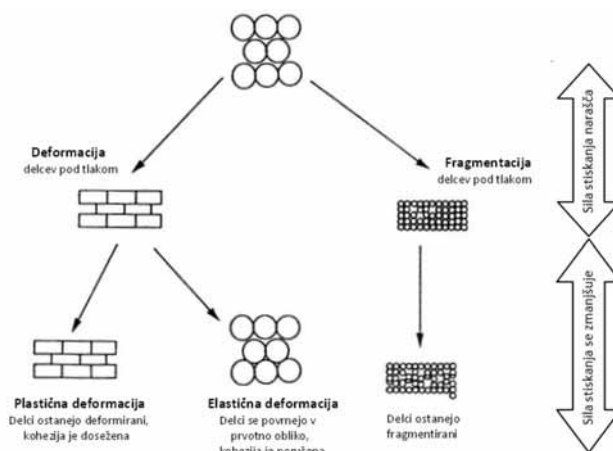
V začetni fazi tabletiranja med vsutjem delcev v matrično vdolbino in nato pri nizkem tlaku so prašni delci najprej podvrženi **začasni prerazporeditvi**. Manjši delci se prerazporejajo v prazne prostore med večjimi, pri čemer se povečuje gostota zmesi v matrični vdolbini. Na način in intenziteto prerazporejanja delcev v začetni fazi vplivajo: porazdelitev velikosti delcev, njihova oblika in površinske lastnosti. Način prerazporejanja delcev je pomemben predvsem zato, ker vpliva na kasnejše število stičnih točk in jakost vzpostavljenih vezi med delci ter posledično na trdnost tablet (9, 10).

Prerazporejanje v matrični vdolbini med stiskanjem je intenzivnejše v primeru delcev nepravilnih oblik, saj se sferično oblikovani delci ugodno prerazporedijo že ob tem, ko jih polnilni sistem vsuje v matrično vdolbino. Za tabletiranje je torej energetsko ugodnejše, če so delci bolj okrogli, kar pa najlažje dosežemo s procesom vlažnega granuliranja. Delci izrazito nepravilnih oblik namreč med stiskanjem v svoji okolici pogosto tvorijo prazne prostore, v katere je ujet zrak, kar lahko v

kasnejših fazah vodi v nižjo trdnost tablet, nastajanje kapic ali laminacijo tablet (9).

Ko zgostitev zaradi preurejanja ob nadaljnjem povečevanju sile stiskanja ni več možna, pride do deformacije delcev na stičnih točkah. Da bi se delci prilagodili naraščajoči obremenitvi, se najprej **prožno** oz. **elastično deformirajo**. Elastična deformacija je reverzibilna sprememba, kar pomeni, da se delci po prenehanju delovanja sile povrnejo v svojo prvotno obliko (9, 12).

Naraščajoča sila stiskanja postopoma postane močnejša od intermolekularnih sil v delcu, mejni tlak plastične deformacije je presežen in pride do zmanjšanja volumna delca v obliki ireverzibilne **plastične deformacije**, ki temelji na preurejanju molekul znotraj trdnih delcev snovi. Če sila narašča še naprej se pojavi **fragmentacija** oz. **lom** delcev (slika 1) (12). Pomembno je poudariti, da za enostavne toge delce na nivoju samega delca ti procesi potekajo zaporedno, torej pride najprej do elastične, potem plastične deformacije in končno do loma delca. Na nivoju zmesi z večkomponentno sestavo pa ti procesi potekajo sočasno in se med seboj prepletajo.



Slika 1: Različni mehanizmi deformacije delcev (9).

Figure 1: Different mechanisms of particle deformation (9).

Odvisno od vrste snovi pa se lahko fragmentacija pojavi že takoj po prerazporejanju delcev in ji nato sledi plastična in/ali elastična deformacija manjših delcev, ki so nastali s fragmentacijo. Krhke snovi se začnejo lomiti, nastali drobni delci zapolnjujejo prazne prostore med večjimi delci in s tem povzročajo dodatno zgostitev. Fragmentirani delci se lahko še nadalje deformirajo, pri čemer se gostota prahov še povečuje, vendar je v kasnejših fazah stiskanja fragmentacija delcev otežena, saj delci postajajo vse manjši in lom zahteva vse več energije. Plastični materiali prav tako lahko zapolnijo prazne prostore ob preseženju meji plastične deformacije. Plastična deformacija ireverzibilno poveča stično površino med delci in s tem možnost tvorbe vezi med delci v neposredni bližini, lomljenje delcev pa ustvari čiste, gladke površine, sposobne močnih povezav. Uspešna izdelava tablete je namreč v veliki meri odvisna od zadostnega nastajanja velikih stičnih ploskev s čistimi površinami. Nasprotno od tega pa elastična deformacija pri stiskanju prahov ni želena. Ta deformacija namreč po prenehanju delovanja sile teži k vzpostavitvi prvotne oblike, pri tem pa povzroči pretrganje nekaterih vezi, ki so nastale v fazi stiskanja. Na ta

način povzroča zmanjšanje trdnosti tablet, pogosto pa tudi laminacijo in nastanek kopic (9, 12).

Mehanizem zmanjševanja volumna snovi v farmaciji, ki so večinoma organskega izvora, pa se precej razlikuje od preprostega modela: elastična deformacija, plastična deformacija, fragmentacija. Pri mnogih snoveh uporabljenih v farmaciji se pojavlja fragmentacija delcev že pri nizki sili stiskanja, čemur ob zviševanju sile stiskanja sledi elastična in/ali plastična deformacija. Vzrok je verjetno v kompleksni strukturi mnogih farmacevtskih snovi, katerih osnovni delci so pogosto krhki ali sestavljeni iz skupkov manjših primarnih delcev, ali pa iz zelo poroznih delcev. Zato imajo sekundarni delci kot so koprociesirane snovi in granulirani prahovi navadno močno izraženo sposobnost fragmentacije in med stiskanjem tvorijo veliko število samostojnih manjših delcev. Šele ti delci imajo izraženo lastnost elastične in/ali plastične deformacije, pri dovolj visokih silah stiskanja pa lahko nastopi tudi končna fragmentacija oz. fragmentacija, ki pri dani sili stiskanja zmanjša delce do najmanjše možne velikosti. (9, 10).

Študij stisljivostnih lastnosti in razvoj modelov za njihov opis je izredno pomemben, saj izdelava kakovostnih tablet temelji ravno na ustreznosti stisljivosti posameznih snovi oz. zmesi za tabletiranje.

3 Heckelova analiza

Najpogosteje uporabljena metoda določanja mehanizma zmanjševanja poroznosti je Heckelova analiza, ki je bila prvič opisana leta 1961 in proučuje zmanjševanje poroznosti tablet pod vplivom tlaka stiskanja. Zmanjševanje poroznosti tablet določimo posredno preko ugotavljanja zmanjševanja volumna tablete v odvisnosti od sile stiskanja in poznavanja prave gostote prahov. Heckel je izpeljal enačbo, s katero je predpostavil, da proces zmanjševanja poroznosti med stiskanjem prahov sledi kinetiki I. reda, pri čemer ima poroznost vlogo reaktanta (enačba 1, slika 2) (5, 9).

$$-\ln \epsilon = \ln \left(\frac{1}{1-D} \right) = k \cdot P + A \quad (\text{enačba 1})$$

k ... konstanta, dobljena iz naklona premice

A ... konstanta, dobljena iz presečišča ekstrapoliranega dela premice z osjo y

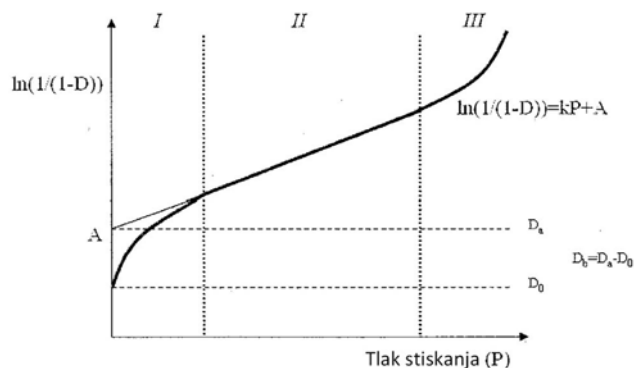
D ... relativna gostota tablete (razmerje med navidezno in pravo gostoto) pri tlaku P

ϵ ... poroznost (1-D)

Enačbo 1 imenujemo Heckelova enačba. Naklon k pri Heckel-ovi enačbi je empirično določena konstanta, ki predstavlja sposobnost plastične deformacije delcev zmesi pri stiskanju in je merilo za vrednotenje plastičnosti preiskovane snovi. Poznavanje vrednosti konstante k lahko olajša izbiro primerne veziva za določeno formulacijo tablet (7, 13).

Recipročna vrednost konstante k pa je znana kot kritični tlak tabletiranja ali mejni tlak plastične deformacije (P_y). Ta je definiran kot najmanjši tlak, pri katerem pride do plastične deformacije snovi med stiskanjem tablet (enačba 2):

$$P_y = \frac{1}{k} \quad (\text{enačba 2})$$



Slika 2: Hecklov diagram- odvisnost spreminjanja poroznosti od tlaka stiskanja (k - konstanta, ki je merilo za plastičnost snovi, A - konstanta, ki opisuje zgoščevanje prahov na račun prerazporeditve delcev, D - relativna gostota tablete pri tlaku P , D_0 - relativna gostota prašnih delcev v matrični vdolbini pred začetkom delovanja sile, D_a - relativna gostota v začetni fazi stiskanja, D_b - relativna gostota, ki opisuje prerazporeditev delcev v zgodnji fazi stiskanja) (7, 9).

Figure 2: Heckel equation- porosity as a function of compaction pressure (k - a constant describing the ability of the compact to deform plastically, A - a constant describing densification by particle rearrangement, D - the relative density of the compact by the applied pressure P , D_0 - the relative density of the powder bed at the point when the applied pressure equals zero, D_a - the relative density at zero and low pressures, D_b - the relative density describing the phase of rearrangement of particles in the early stages of compression) (7, 9).

Nizka vrednost tlaka P_y oz. visoka vrednost konstante k sta značilni za mehkejšo snovi, kar pomeni, da se snov plastično deformira že pri nizkih tlakih stiskanja. Snovi z višjim P_y so največkrat podvržene zgoščevanju delcev s fragmentacijo (9, 14). Dosežen tlak P_y je pogoj za nastanek koherentne tablete. Pogosto služi kot merilo za študij in primerjavo kompresibilnih lastnosti različnih snovi in sistemov (7, 9, 13).

Heckelov diagram omogoča tudi določanje stopnje prerazporejanja delcev v začetni fazi stiskanja. Iz vrednosti odseka na ordinati (A) (slika 2, enačba 3) lahko izračunamo relativno gostoto, ki jo označimo z D_a (enačba 4).

$$A = \ln \left(\frac{1}{1-D} \right) \quad (\text{enačba 3})$$

$$D_a = 1 - e^{-A} \quad (\text{enačba 4})$$

Relativna gostota prašnih delcev v matrični vdolbini (D_0) pred začetkom delovanja sile ($P=0$) predstavlja navidezno gostoto zmesi po začetnem preurejanju delcev po vsutju zmesi v matrično vdolbino (slika 2). Vrednost D_0 je enaka razmerju med nasipno gostoto prahov pred stiskanjem in njihovo pravo gostoto. D_0 lahko določimo eksperimentalno iz Heckelovega diagrama, kjer ta parameter predstavlja presečišče krivulje z ordinato oz. osjo $\ln(1/(1-D))$. Rahla povezava med delci v matrici pred stiskanjem načeloma pomeni nizke vrednosti D_0 (6, 7, 13).

Iz razlike vrednosti D_a in D_0 lahko izračunamo tudi relativno gostoto D_b (enačba 5), ki opisuje obseg prerazporeditve delcev v zgodnji fazi stiskanja. Velikost D_b je predvsem odvisna od začetne gostote in kasnejšega preurejanja delcev (6, 7, 13):

$$D_b = D_a - D_0 \quad (\text{enačba 5})$$

3.1 Praktična izvedba Heckelove analize

Praktične izvedbe Heckelove analize se lahko lotimo na dva načina in sicer z metodo izven ali v matrični vdolbini.

Metoda izven matrične vdolbine (»out-die« metoda) pomeni opredelitev poroznosti tablet stisnjenih pri različnih silah stiskanja po njihovem izmetu iz matrične vdolbine. Na osnovi izmerjenega premera in debeline tablete lahko izračunamo relativno gostoto tablete (D) ter poroznost (ϵ).

Metoda je dolgotrajna, saj je za merodajnost rezultatov potrebno obsežno eksperimentalno delo, kar pomeni izdelavo večjega števila tablet pri različnih tlakih. V Hecklovem diagramu tako dobimo za vsako tableto po eno točko in ne celotnega profila poroznosti od tlaka stiskanja, kar lahko štejejo kot slabšo stran te metode. Prednost metode je predvsem v tem, da upoštevamo vpliv elastične relaksacije po izmetu tablete iz matrične vdolbine. Naklon v tem primeru ne vsebuje elastičnega dela deformacije (9).

Metoda v matrični vdolbini (»in-die« metoda) omogoča, da s pomočjo ustreznih senzorjev na tabletki spremljamo višino praškastega stolpca v matrični vdolbini v odvisnosti od tlaka stiskanja v zelo kratkih časovnih intervalih (milisekunde). Na ta način lahko dobimo celoten profil stiskanja iz ene same tablete, ki ga lahko kvalitativno ovrednotimo v smislu opredelitve mehanizma zgoščevanja delcev (deformacija/fragmentacija). Metoda je bistveno hitrejša in enostavnejša od »out-die« metode, poleg tega pa je tudi sama poraba zmesi za analizo manjša. Glavna pomanjkljivost te metode je, da ne razlikuje med elastičnim in plastičnim delom deformacije tablete. Elastična deformacija namreč povzroči pozitiven odklon v Hecklovem diagramu, zaradi česar dobimo z »in-die« metodo nekoliko nižje vrednosti tlaka P_y kot pri »out-die« metodi (9).

Če želimo z »in-die« metodo dobiti bolj točne rezultate, moramo pri meritvah upoštevati tudi deformacijo zgornjega in spodnjega pečata pri visokih tlakih stiskanja (14). Velikokrat opazimo, da se izmerjene vrednosti P_y za iste snovi v različnih raziskavah razlikujejo med sabo. Vzrok bi verjetno lahko iskali v tem, da se deformacije pečatov največkrat ovrednotijo le na podlagi ocene in ne temeljijo na natančnih meritvah oz. niso izvedene na kalibriranih tabletkah.

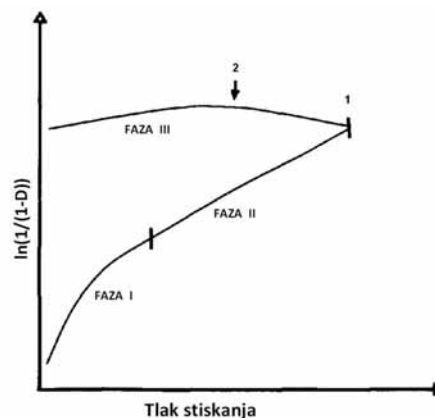
3.2 Pomen Heckelovega modela

Bistvena vrednost Heckelovega modela izhaja iz sposobnosti napovedovanja prevladujočega načina deformacije delcev med stiskanjem, zato je največkrat uporabljen:

- za razlikovanje med snovmi, ki se med stiskanjem zgoščujejo s fragmentacijo ali plastično deformacijo in
- za primerjavo različnih snovi, ki se med stiskanjem plastično deformirajo (9,15).

Pri kvantitativnem opredeljevanju zmanjševanja poroznosti tablet v odvisnosti od tlaka stiskanja moramo upoštevati predvsem dve glavni omejitvi. Začetna fragmentacija delcev bo namreč povzročila ukrivljenost prvega dela Hecklovega diagrama, druga omejitev pa je, da se iz drugega linearnega dela diagrama težko napove, ali gre v tem primeru za plastično ali elastično deformacijo snovi (predvsem če se meritve izvajajo z metodo v matrični vdolbini) (6).

Napakam pri interpretaciji rezultatov se najlažje izognemo, če Hecklov diagram obravnavamo kot celoto in sam proces stiskanja razdelimo na 3 osnovne faze (slika 3) (6).



Slika 3: Tri osnovne faze Hecklovega diagrama v ciklu stiskanja tablet (faza I- fragmentacija, faza II- plastična deformacija, faza III- dekompresija) (6).

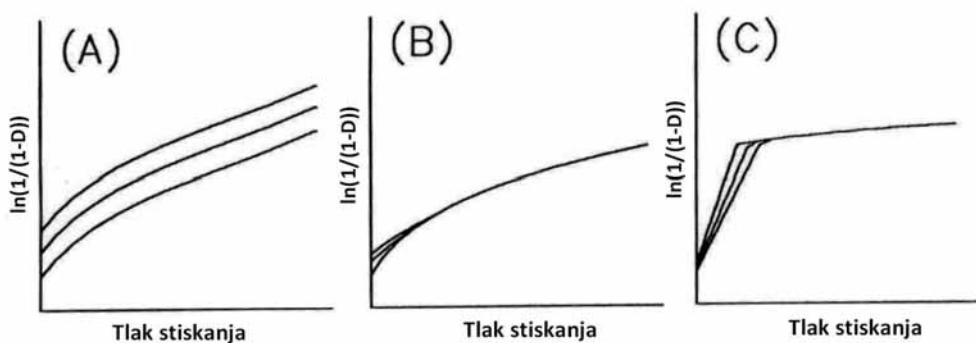
Figure 3: A compression cycle, evaluated using the Heckel function, separated into three phases (phase I: fragmentation, phase II: plastic deformation, phase III: decompression) (6).

Faza I: Ukrivljeni del Hecklove krivulje kaže na to, da v začetku stiskanja poroznost tablet pada na račun fragmentacije delcev (slika 3) (6). Če tudi pri višjih tlakih stiskanja ne moremo definirati linearnega dela krivulje, imamo opravka s pretežno fragmentirajočimi snovmi (snovi tipa B, slika 4), pri katerih lom prevlada nad plastičnostjo materiala. Snovi tega tipa so trše, slabše deformabilne in v praksi kažejo večji mejni tlak plastične deformacije (7,13).

Začetni linearni del krivulje kaže na snov, ki ne fragmentira. Za takšne snovi je značilen **plastičen** način zmanjšanja volumna prahov **brez** opažene **začetne fragmentacije** delcev (snovi tipa C, slika 4) (7,13).

Faza II: Pri višjih tlakih stiskanja sta prevladujoča mehanizma zmanjševanja poroznosti tablet elastična in/ali plastična deformacija. Krivulja v fazi II je praviloma linearna za snovi, ki se obnašajo plastično. Stopnjo plastičnosti snovi odraža recipročna vrednost naklona k oziroma mejni tlak plastične deformacije (P_y) (slika 3) (6).

Snovi tipa A na sliki 4 se v začetni fazi stiskanja prerazporedijo na račun fragmentacije delcev, pri naraščajoči sili stiskanja pa se plastično deformirajo. Za snovi tega tipa je značilen nizek P_y , zato so te snovi večinoma mehke, hitro podvržene plastični deformaciji in ohranjajo različno stopnjo poroznosti, odvisno od začetne fragmentacije delcev v matrični vdolbini. Slednja je v veliki meri odvisna od velikosti in oblike delcev (7,13).



Slika 4: Tri različne oblike Heckelovih krivulj, ki predstavljajo obnašanje različnih vrst snovi: tip A- snovi, ki pri nižjih tlakih stiskanja fragmentirajo, pri višjih tlakih pa se plastično deformirajo tip B- pretežno fragmentirajoče snovi, tip C – plastične snovi, za katere zmanjšanje volumna poteče brez opažene začetne fragmentacije delcev (13).

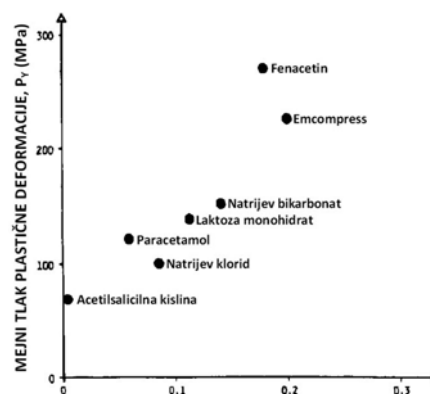
Figure 4: Three different types of compression behavior distinguished by the Heckel equation: type A: densification by plastic flow, preceded by particle rearrangement, type B: densification by particle fragmentation, type C: densification by plastic flow without initial particle rearrangement (13).

Faza III: Med dekompresijo, do katere pride po končanem stiskanju, lahko elastična relaksacija snovi pripomore k povečanju poroznosti tablete. Dekompresijska krivulja je vzporedna z osjo x takrat, ko je elastična relaksacija po stiskanju zanemarljiva. Poleg informacije o elastični deformaciji lahko iz faze III sklepamo tudi o prispevku plastične deformacije v linearnem delu faze II. To nam omogoča tako imenovani »time-lag«- časovni zamik od dosežene maksimalne sile stiskanja pa do največje gostote tablete (slika 3- razdalja od 1 do 2), ki odraža plastično deformacijo snovi. Tok plastične deformacije med delci se namreč ne ustavi takoj po prenehanju delovanja maksimalne sile stiskanja, ampak se zaradi dekompresije pečata nadaljuje še določen kratek čas po stiskanju. To lahko dodatno pripomore k zmanjšanju poroznosti tablete. Stopnjo elastične deformacije lahko napovemo iz stopnje elastične relaksacije (ER), ki jo izračunamo kot relativno povečanje debeline tablete po končanem stiskanju (6).

Na deformabilne lastnosti delcev pa vpliva tudi njihova oblika, zlasti kadar gre za plastične snovi. Pri mehkejših snoveh, lahko večjo stopnjo plastične deformacije in s tem manjši P_y zaznamo pri delcih nepravilnih oblik, k čemur pripomore še njihova hrapava površina. V primeru fragmentirajočih snovi se pri delcih nepravilnih oblik poveča lomljivost pod vplivom obremenitve, vendar pa pri teh snoveh sama oblika delcev bistveno ne vpliva na spremembo vrednosti P_y (13).

3.3 Praktični primeri in interpretacija rezultatov Heckelovih diagramov za različne snovi

Duberg in sodelavci (6) so v svoji študiji preiskovali kompresibilne lastnosti različnih snovi, s katero so dokazali skoraj premo sorazmernost tlaka P_y od poroznosti tablet pri maksimalni sili stiskanja (slika 5). Hkrati pa na primeru te študije lahko vidimo, kako različne snovi dajejo različne oblike Heckelovih krivulj (slika 6 a,b,c). Z metodo je možno tudi ločiti različne načine priprave materialov za direktno stiskanje (npr. aglomerirana in mleto laktoza ter laktoza sušena z razprševanjem) in primerjati njihovo kompresibilnost. Na ta način si lahko pomagamo z optimalno izbiro najboljših pomožnih snovi za naš izdelek (16).



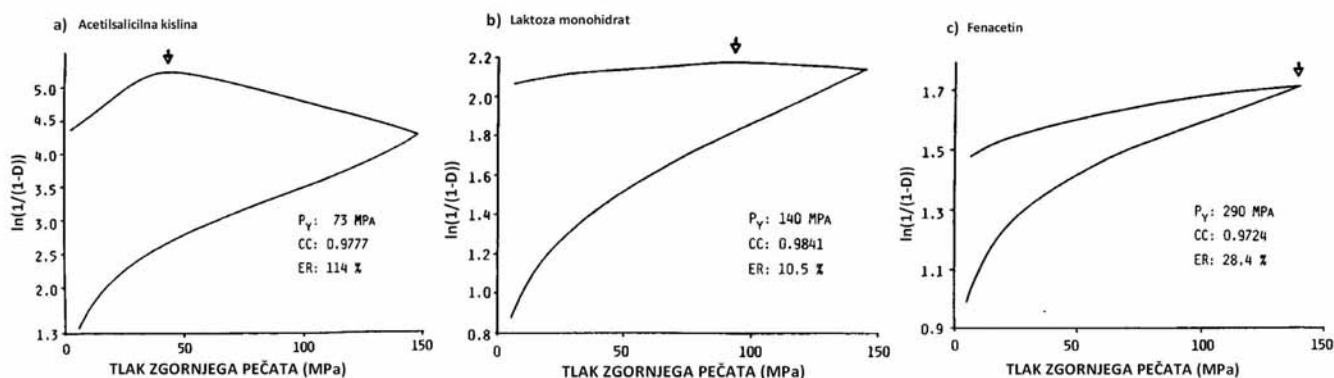
Slika 5: Mejni tlak plastične deformacije kot funkcija minimalne poroznosti pri največjem tlaku stiskanja (6).

Figure 5: Yield pressure as a function of minimum porosity for the materials tested (6).

Snovi z nizko vrednostjo tlaka P_y in nizko poroznostjo (acetilsalicilna kislina, slika 6a) so med stiskanjem podvržene plastični deformaciji. Ukrivljenost začetnega dela Heckelovega diagrama nakazuje tudi na intenzivno fragmentacijo delcev v začetni fazi stiskanja (slika 6a).

Za snovi iz osrednjega dela grafa na sliki 5 so v študiji dokazali večjo mero elastične relaksacije. To potrjuje Heckelova krivulja za laktozo monohidrat (slika 6b), kjer opazimo rahel padec krivulje (puščica na sliki 6b) v fazi dekompresije oz. rahlo povečanje poroznosti tablete. Povečanje poroznosti je torej posledica elastične relaksacije po končanem stiskanju (6).

Primer stiskanja fenacetina (slika 6c) kaže, da snovi z najvišjim P_y tvorijo tablete z najvišjo poroznostjo. Študije stisljivosti tovrstnih snovi so pokazale slabo deformabilnost delcev, ki nastanejo s fragmentacijo v začetku stiskanja. Zanemarljivo plastično deformacijo oz. visok delež elastične deformacije so potrdili tudi z obliko Heckelove krivulje (slika 6c), ki v nobeni točki dekompresije ne nakazuje na časovno zakasnitev. Slaba deformabilnost onemogoča tvorbo novih stičnih površin med delci. Posledično je tendenca po medsebojni vezavi delcev manjša,



Slika 6a, b, c: Hecklov diagram za (a) acetilsalicilno kislino, (b) laktozo monohidrat in (c) fenacetin (P_Y - mejni tlak plastične deformacije, CC: korelacijski koeficient, ER: stopnja elastične relaksacije) (6).

Figure 6a, b, c: Heckel plots of (a) acetylsalicylic acid, (b) lactose monohydrate and (c) phenacetin (P_Y - yield pressure, CC- correlation coefficient, ER- elastic recovery) (6).

poroznost tablete po končanem stiskanju pa večja na račun elastične relaksacije. Slednje potrjuje tudi dokaj velik padec dekompresijskega dela krivulje. Snovi tega tipa v veliki meri povzročajo tvorbo kopic in laminacijo tablet, zato načeloma niso primerne za direktno tabletiranje in jih moramo največkrat predhodno obdelati z granuliranjem (6).

4 Študij vpliva lastnosti izhodnih materialov na poroznost izdelanih tablet z metodo Heckelove analize

4.1 Poroznost tablet izdelanih z direktnim tabletiranjem

Med procesom stiskanja prahov najprej izginejo največje pore, velikost por se zmanjša in porazdelitev velikosti por se pomakne proti manjšim poram. Pri najvišjem tlaku stiskanja pride do tvorbe novih por na račun fragmentacije delcev, kar posledično prispeva k povečanju trdnosti tablet. Načeloma velja, da se trdnost tablet poveča, ko upade število por večjih od 500 nm in naraste število por manjših od 200 nm (17, 18). Teoretično naj bi bila največja trdnost tablet dosežena takrat, ko se poroznost tablete približa vrednosti nič (navidezna ničelna poroznost) (19).

Adolfsson in Nystroem (19) sta z metodo izven matrične vdolbine proučevala vpliv visokih tlakov direktnega tabletiranja na natezno trdnost in poroznost izdelanih tablet. V študiji sta dokazala, da se z višjim tlakom stiskanja natezna trdnost tablet povečuje do neke kritične meje, nad katero tudi z nadaljnjim poviševanjem tlaka stiskanja ni več mogoče doseči višje trdnosti. Ugotovila sta, da kljub doseganju zelo nizke poroznosti tablet, povečan tlak stiskanja ni vplival na vezi med delci. Kaže, da je minimalna količina zraka, ki je ostala v tablet med stiskanjem, onemogočila popolno približanje in dodatno povezavo delcev, kljub uporabljenemu visokemu tlaku stiskanja.

4.2 Poroznost tablet izdelanih iz granulata

Za razlago Heckelovih krivulj stiskanja granulata je potrebno ta proces razumeti, čeprav je bistveno bolj kompleksen kot proces stiskanja osnovnih praškastih delcev. Če med stiskanjem tablet prihaja do plastične deformacije poroznih granul, lahko to prispeva k postopnem zapiranju por med delci. Posledično je specifična površina tablet po stiskanju manjša. Če granulata stiskamo pri višji sili, prihaja do fragmentacije posameznih granul, kar prispeva k povečanju števila manjših por v tableti in k povečanju specifične površine tablet. Ker so granule največkrat porozni delci, je končna poroznost izdelanih tablet sestavljena iz intra- in interpartikularnih por (17,20). Stopnja fragmentacije granulata je odvisna od interakcij med prašnimi delci v granulah ter od njihove mehanske trdnosti in poroznosti. Granule z večjo poroznostjo so bolj krhke in zato bolj podvržene fragmentaciji med stiskanjem tablet, medtem ko so granule z nižjo poroznostjo trdnjše in med stiskanjem praviloma ne fragmentirajo (20). Prav tako pa o fragmentaciji granul odloča tudi njihova površina. Hrapava površina poveča fragmentacijo granul, gladka površina pa jih pred njo ščiti (21).

Wikberg in Alderborn (21) sta proučevala vpliv granulata z različno poroznostjo, izdelanih z metodo vlažnega granuliranja v hitro vrtečem mešalniku, na razporeditev por po stiskanju tablet. Trdnjše granule z nižjo poroznostjo, ki med stiskanjem ne fragmentirajo, so ohranile t.i. bimodalno razporeditev por v tabletah, ki vključuje intra- in interpartikularne pore. V nasprotju s tem pa granule z višjo poroznostjo med stiskanjem fragmentirajo, zato se z zapolnjevanem intergranularnega prostora s fragmenti granul le-ta zmanjša. Granule med stiskanjem preidejo torej na unimodalno razporeditev por, ko več ni možno razlikovati med intra- in intergranularnimi prostori.

Različno razporeditev por v tableti v odvisnosti od lastnosti vstopajočega granulata so dokazali tudi v študiji, kjer so granulate izdelali z valčnim kompaktiranjem pri različnih silah stiskanja in tako dobili različno trdne oz. porozne kompakte, iz katerih so pripravili suh

granulat (22). Manj porozen in trdnjši granulat je izkazoval bimodalno velikost por v tabletah, medtem ko so imele tablete izdelane iz poroznejšega granulata ožjo porazdelitev velikosti por in večjo trdnost. Do povečanja trdnosti tablet namreč pride na račun zmanjšane volumna velikih por in pomika porazdelitve velikosti proti manjšim poram. Ne glede na poroznost vstopajočih granul, poroznost tablet z višjo silo stiskanja pada, vendar imajo tablete izdelane iz bolj poroznih granul na koncu nižjo poroznost in večjo mehansko trdnost (21, 22).

Poleg deformabilnih lastnosti snovi, ki tvorijo granulat in poroznosti ter oblike samih granul, pa je za izdelavo tablet ustrezne kakovosti pomembna tudi velikost primarnih delcev vgrajenih snovi. Manjši delci vstopajoče snovi praviloma zagotavljajo manjšo lomljivost in povečano trdnost izdelanih tablet. Na račun manjših delcev vstopajočih snovi lahko v formulacijo dodamo tudi večjo količino učinkovine, ne da bi s tem bistveno vplivali na zmanjšanje natezne trdnosti tablet (23).

Herting in Kleinebudde (23) sta spremljala vpliv velikosti vstopajočih delcev v procesu valjčnega kompaktiranja na lastnosti samega granulata in iz njega izdelanih tablet. Prišla sta do zanimivih zaključkov, saj sta ugotovila, da velikost delcev vstopajoče surovine pogojuje pretočnost izdelanega granulata v odvisnosti od njegove poroznosti. Z manjšimi delci vstopajoče surovine in stiskanjem granulata do nižje poroznosti ($< 27\%$) so dobili večja in bolj pretočne granule in manjšo frakcijo manjših delcev. Manjši delci vstopajoče surovine, ki imajo večjo specifično površino, namreč omogočajo večjo stično površino med delci in močnejše medsebojne povezave, zato je tudi poroznost lahko manjša, delci so bližje drug drugemu. Posledično je natezna trdnost tablet večja. Z večjimi delci vstopne surovine pa so dobili manjše granule s slabšo pretočnostjo in manjšo natezno trdnost tablet. Pretočnost granul iz večjih delcev pa so lahko izboljšali, če so izdelali granulat z večjo poroznostjo ($> 27\%$). S tem so pozitivno vplivali tudi na natezno trdnost tablet. Avtorja sta torej ugotovila, da lahko visoko poroznemu suhemu granulat pretočnost izboljšamo, če za njegovo izdelavo uporabimo večje delce vstopajočih surovin.

Znotraj procesa granularanja lahko z variranjem procesnih parametrov vplivamo na želene lastnosti izdelanih granul, kar se odraža tudi na njihovi kompaktilnosti in kompresibilnosti (23). S procesom vlažnega granularanja dobimo trdnjše, sferične delce, ki imajo večji nasipni volumen in so bolj kompresibilni in bolj odporni na fragmentacijo med stiskanjem tablet v primerjavi s suhim granulat. Večjo kompresibilnost teh granulotov dosežemo z daljšim rezidualnim časom stiskanja (dwell time) oz. z manjšo hitrostjo tabletiranja. Granulat izdelan z valjčnim kompaktiranjem daje bolj krhke, zgoščene delce, nepravilnih oblik, kar se odraža v manjšem nasipnem volumnu ter v manjši kompresibilnosti v primerjavi z vlažnim granulat (23).

4.3 Primerjava direktnega tabletiranja in stiskanja granulata

Trdnost tablet iz stisnjenih granul fragmentirajočih snovi (npr. manitol, saharoza) je praviloma višja od trdnosti tablet, izdelanih z direktnim tabletiranjem, saj obdelava prahov z vlažnim granularanjem poveča njihovo kompresibilnost. Nasprotno od tega pa se kompresibilnost plastičnih snovi (npr. mikrokristalna celuloza, polietilenglikol) po vlažnem granularanju zniža v primerjavi s prašnimi delci, zato je trdnost tablet iz teh granul nižja v primerjavi s trdnostjo tablet izdelanih z

direktnim tabletiranjem. Poroznost tablet iz prahov plastične snovi se torej med stiskanjem zmanjša bolj kot poroznost tablet iz granulata z enako sestavo. Granule plastičnih snovi so namreč trdne, zgoščene in zelo nizkoporozne, njihova specifična površina pa je v primerjavi s prašnimi delci manjša. Med njihovim stiskanjem prihaja le do plastične deformacije in redko do fragmentacije. Pri granularanju snovi, ki fragmentirajo, pa nastanejo velike porozne granule, ki se med procesom stiskanja v začetku tudi plastično deformirajo, pri povečanju sile stiskanja pa pride v večji meri tudi do njihove fragmentacije. Pri tem nastajajo nove stične površine med delci, ki omogočajo trdnjše medsebojno povezovanje delcev in zmanjšanje njihovega volumna. Posledično je poroznost tablet izdelanih iz teh snovi manjša, njihova trdnost pa večja. Praviloma je porazdelitev velikosti por širša pri tabletah izdelanih iz granulata kot pri tabletah iz zmesi brez predhodne obdelave. Vzrok lahko iščemo v dvojni obdelavi delcev v smislu granularanja in stiskanja tablet (17, 22).

Pri direktnem tabletiranju brez predhodnega granularanja, kjer so šibke vezi med prašnimi delci prisotne enakomerno po celotni zmesi, je laminacija tablet bolj izražena. Granule izdelane z vlažnim granularanjem, kjer primarne delce povezujejo tako šibke kot močne vezi, imajo bolj hidrofilno površino z večjo afiniteto do tvorbe interpartikularnih vezi. Te granule zaradi svoje sferičnosti omogočajo boljše začetno prerazporeditev delcev in vzpostavijo več kontaktnih točk za tvorbo vezi. Tablete iz granulata izdelanega z vlažnim granularanjem zato že pri nižjih tlakih stiskanja lahko tvorijo večje, poroznejše tablete z večjo mehansko trdnostjo (24).

5 Dejavniki, ki vplivajo na obliko Heckel-ovega diagrama

Če bi želeli uporabiti Heckelovo analizo kot metodo izbora za proučevanje kompresibilnih lastnosti snovi, moramo poznati čim več dejavnikov, ki vplivajo na rezultat te analize. Pri proučevanju učinka hitrosti tabletiranja na kompresibilne lastnosti prahov je bilo ugotovljeno, da ima hitrost znaten učinek na Heckelovo enačbo in njene konstante. Kadar je poroznost odvisna od hitrosti tabletiranja, takrat vemo, da imamo opravka z materialom, ki je podvržen časovno odvisni deformaciji. Za snovi, ki se deformirajo plastično, je namreč ob povišani hitrosti tabletiranja značilno povečanje mejnega tlaka plastične deformacije (P_y) in zmanjšanje trdnosti tablet. In obratno, če hitrost tabletiranja zmanjšamo, imajo delci na razpolago več časa za deformacijo in vzpostavitev vezi na stičnih površinah. Posledično nastanejo trdnjše tablete. Pri snoveh z elastičnimi lastnostmi (visok P_y) lahko pri velikih hitrostih tabletiranja pride do nastanka kopic in laminacije tablet kot posledica močne elastične relaksacije po končanem stiskanju (9, 25). Nasprotno pa se pri snoveh, kjer deformacija nastane zaradi lomljenja delcev, visoke vrednosti tlakov (P_y) s hitrostjo tabletiranja ne spreminjajo (7).

Na Heckelov model pa poleg hitrosti tabletiranja, časa stiskanja in uporabljenega tlaka vplivajo še nekateri drugi dejavniki, ki jih moramo upoštevati pri interpretaciji rezultatov. To so same lastnosti trdne snovi in njihova kemijska struktura, razlike v pravih gostotah snovi, velikost delcev, spremembe v kristaliničnosti snovi (površinska amorfizacija) pri stiskanju, količina dodanega drsila in celo velikost matrične vdolbine. Iz literature je znano, da se ob dodatku drsila plastično

deformabilnim snovem trdnost tablet zniža. Drsililo namreč prekrije površino delcev in tako zmanjša jakost intermolekularnih vezi oz. zniža površinsko energijo delcev. V primeru snovi z izrazito fragmentacijo pa do znižanja trdnosti zaradi drsila ne pride, saj se med fragmentacijo tvorijo nove površine delcev, ki niso prekrite z drsilom. Izkazalo se je tudi, da s povečevanjem deleža veziva v formulaciji tablet povečujemo plastične lastnosti snovi in s tem sposobnost zgoščevanja delcev po mehanizmu plastične deformacije (9, 13, 26, 27).

Ko s pomočjo Heckelove analize na podlagi znanih kompresibilnih lastnosti posamezne snovi napovedujemo te lastnosti za zmes prahov, pa je potrebno upoštevati še nekatere pomanjkljivosti Heckelove analize. Če pomešamo dve plastični snovi, je mejni tlak plastične deformacije (P_y) binarne zmesi premo sorazmeren z deležem obeh snovi v zmesi. Ko pa zmešamo fragmentirajočo snov s plastično snovjo, ugotovimo, da Heckelova krivulja bolj posnema obnašanje plastične snovi in tako ne opiše dovolj natančno dejanskega mehanizma zmanjševanja volumna. Prav tako v območju visokih tlakov Heckelova krivulja ni več sposobna natančnega opredeljevanja kompresibilnosti, saj se gostota tablete že približuje vrednosti prave gostote delcev oz. se poroznost tablete približuje vrednosti nič. Odklon krivulje navzgor pri visokih tlakih stiskanja je viden na sliki 2 v fazi III (26).

Pri visokih tlakih stiskanja oz., ko se zgornji pečat približuje največjemu odmiku, je njegov odmik potrebno zelo natančno meriti. Dodatno je potrebno upoštevati deformacijo roke, v katero je pečat vpet, pa tudi deformacijo samega pečata. Napaka reda velikosti $\pm 10 \mu\text{m}$ na merjenju odmika lahko povzroči $\pm 5\%$ odstopanje v izmerjenem P_y (14).

Dodatno težavo predstavljajo matematične transformacije, ki so v primeru Heckelove analize trostopenjske: 1) pretvorba prostornine v gostoto; 2) recipročna transformacija gostote v poroznost in 3) logaritemska transformacija. Posledica številnih matematičnih operacij rezultira v veliki občutljivosti analize na meritve prave gostote, še zlasti, kadar se poroznost tablete približuje ničelni poroznosti. V določenih pogojih lahko že 1% napaka na pravi gostoti vodi v 10% napako v oceni P_y (14).

Opozoriti je potrebno tudi na nekaj manjših posebnosti pri Heckelovi analizi. V nekaterih raziskavah so ugotovili odsotnost linearnega dela v Heckelovem diagramu (Rue in Rees, 1978; York, 1979; Celik in Marshall, 1989), ali pa je linearni delež zelo majhen (Huffine, 1953; Birks, 1990; Konkel in Mielck, 1997). Lahko se zgodi tudi, da linearni del diagrama presega realne tovarniške proizvodne pogoje. Napake v izmerjenih P_y med različnimi laboratoriji so reda velikosti okoli 10% (Bateman, 1989). Zaradi omenjenih razlogov je najboljša relativna interpretacija rezultatov iz eksperimentov narejenih pri enakih pogojih (enaka tabletirka, pečati, snovi, itd), zato je pri medsebojni primerjavi rezultatov med različnimi raziskovalci treba upoštevati vse prej omenjene posebnosti Heckelove analize (14).

6 Sklep

Mehanizem stiskanja večine snovi uporabljenih v farmaciji je težko predstaviti z enim samim splošnim modelom. Njihova kompleksna struktura narekuje mehanizem zmanjševanja njihovega volumna med stiskanjem. Mehanizem zmanjševanja volumna snovi pa postane še

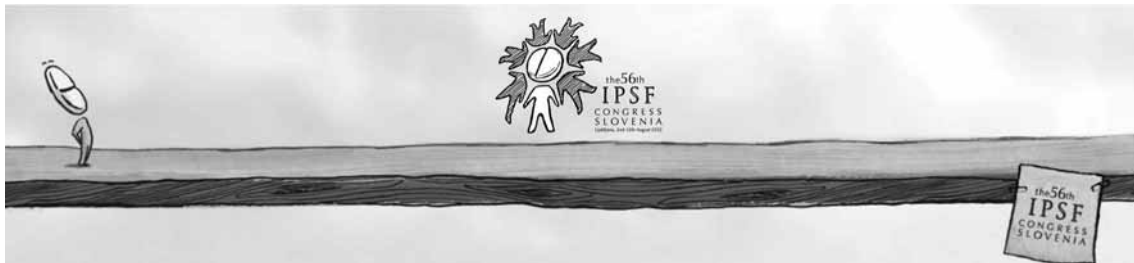
bolj zapleten, če delce obdelamo v granulatu. Pri tem moramo že pred obdelavo delcev prahov v granulatu znati predvideti obnašanje le-teh med stiskanjem in tehtno preučiti vse prednosti ali morebitne slabosti njihove obdelave bodisi z vlažnim ali s suhim granularanjem. Heckelove analize so nam sicer v veliko pomoč pri interpretaciji rezultatov o kompresibilnosti snovi, vendar moramo biti previdni in upoštevati tudi določene omejitve tovrstne analize.

Ker želimo Heckelovo analizo uporabiti predvsem kot metodo za napoved kompresibilnosti določenih snovi, granulata ali praškastih delcev, so nam pri tem v pomoč že nekatera splošna načela, ki vodijo v izdelavo kakovostnih tablet. Na osnovi predvidenega mehanizma zmanjševanja delcev lahko poleg ustreznih pomožnih snovi, ki vstopajo v formulacijo tablet in optimalnega procesa obdelave delcev, izberemo tudi najprimernejšo hitrost tabletiranja, ki hkrati zagotavlja ustrezno trdnost izdelanih tablet. Heckelova analiza lahko do določene mere ponuja tudi odgovore, kakšno vrsto granulata moramo izdelati, da bomo izdelali tablete s čim manjšo stopnjo laminacije. Heckelova analiza je vsekakor močno orodje pri razvoju tehnoloških procesov in z njeno širšo implementacijo v razvojno delo bi zagotovo hitreje prišli do kakovostnih izdelkov.

7 Literatura

1. European Pharmacopoeia 6th Edition. (2008b). Council of Europe. Strasbourg 01/2008. 2.9.36. powder flow (01/2008:20936)
2. Marshall K. Compression and consolidation of powdered solids. In: Lachman L, Lieberman HA and Kanig JL. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Lea & Febiger, Philadelphia, 1986: 66-99.
3. Bodga MJ. Tablet compression: Machine theory, design and process troubleshooting. In: Swarbrick J and Boylan J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel and Dekker Inc., 2002: 2669 – 2688.
4. Gibson M. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form. Engelwood: IHS^o Health Group, 2001: 390 – 403.
5. Heckel RW. Density-pressure relationships in powder compaction. Trans metal Socie 1961; 221: 671-675.
6. Duberg M, Nystroem C. Studies on direct compression of tablets: XVII., Porosity- pressure curves for the characterization of volume reduction mechanisms in powder compression. Powder Technol. 1986; 46: 67-75.
7. Oluwatoyin AO. The compaction of pharmaceutical Powders. Apre dica, Preclinical ADME Tox Research 2007; 5 (2): 1-16.
8. Sonnergaard JM. Quantification of the compactibility of pharmaceutical powders. Eur J Pharm Biopharm. 2006; 63: 270–277.
9. Zupančič Božič D. Optimizacija tabletiranja na osnovi študija plastično-elastičnih lastnosti delcev. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2008.
10. Nystroem C, Alderborn G, Duberg M, Karerhill PG. Bonding surface area and bonding mechanism- two important factors for the understanding of powder compactability. Drug Dev Ind Pharm. 1993; 19 (17&18): 2143-2196.
11. Sunil J. Mechanical properties of powders for compaction and tableting: an overview, PSTT. 1999; 2 (1): 20 – 31.
12. Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, Inc. 2002: 2703 – 2704, 2724 – 2732.
13. Alderborn G, Nyström C. Pharmaceutical Powder Compaction Technology. Marcel Dekker, Inc. 1996: 55 – 75.
14. Sonnergaard JM. A critical evaluation of the Heckel equation. Int J Pharm. 1999; 193: 63-71.
15. Busignies V, Leclerc B, Porion P, Evesque P, Couarrazze G, Tchoreloff P. Compaction behaviour and new predictive approach to the compressibility of binary mixtures of pharmaceutical excipients. Eur J Pharm Biopharm 2006; 64:66-74.

16. Ilić I, Kása P Jr, Dreu R, Pintye-Hódi K, Srčić S. The compressibility and compactibility of different types of lactose. *Drug Dev Ind Pharm* 2009; 35 (10): 1271-1280.
17. Westermarck S. Use of mercury porosimetry and nitrogen adsorption in characterisation of the pore structure of mannitol and microcrystalline cellulose powders, granules and tablets. Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology Division, 2000.
18. Westermarck S, Juppo AM, Kervinen L, Yliuusi J. Pore structure and surface area of mannitol powder, granules and tablets determined with mercury porosimetry and nitrogen adsorption. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 46(1): 61-68.
19. Adolfsson A, Nystroem C. Tablet strength, porosity, elasticity and solid state structure of tablets compressed at high loads. *Int J Pharm* 1996; 132: 95-106.
20. Wikberg M, Alderborn G. Compression characteristics of granulated materials II, Evaluation of granule fragmentation and porosity measurements. *Int J Pharm* 1990; 62: 214-229.
21. Wikberg M and Alderborn G. Compression characteristics of granulated materials: VI. Pore size distributions, assessed by mercury penetration, of compacts of two lactose granulations with different fragmentation propensities. *Int J Pharm* 1992; 84 (2): 191-195.
22. Freitag F, Reincke K, Runge J, Grellmann W and Kleinebudde P. How do roll compaction/dry granulation affect the tableting behaviour of inorganic materials? : Microhardness of ribbons and mercury porosimetry measurements of tablets. *Eur J Pharm Sci* 2003; 22 (4): 325-333.
23. Herting GM, Kleinebudde P. Roll comaction/dry granulation: Effect of raw material particle size on granule and tablet properties. *Int J Pharm* 2007; 338 (1-2): 110-118.
24. Bacher C, Olsen PM, Bertelsen P, Sonnergaard JM. Compressibility and compactibility of granules produced by wet and dry granulation. *Int J Pharm*, 2008; 358 (1-2): 69-74.
25. Tye CK, Sun CC, Amidon GE. Evaluation of the effects of tableting speed on the relationships between compaction pressure, tablet tensile strength and tablet solid fraction. *J Pharm Sci.* 2005; 94 (3): 465-472.
26. Zupančič Božič D, Dreu R, Vrečer F. Influence of dry granulation on compactibility and capping tendency of macrolide antibiotic formulation. *Int J Pharm* 2008; 357 (1-2): 44-54.
27. Nystroem C, Mazur J, Sjoegren J. Studies on direct compression of tablets II, The influence of the particle size of a dry binder on the mechanical strength of tablets. *Int J Pharm* 1982; 10: 209-218.



Organizator? **Društvo študentov farmacije Slovenije**

Kaj? **56. IPSF KONGRES**

Kje? **Ljubljana, Slovenija**

Kdaj? **2. – 12. avgust 2010**

Kdo? **Študenti farmacije iz vsega sveta**

International Pharmaceutical Students' Federation (v nadaljevanju IPSF) predstavlja približno 350.000 študentov farmacije in diplomirancev v 70 državah po vsem svetu, tudi v Sloveniji. Gre za nevladno, nepolitično in ne-versko organizacijo, ki je vodilna mednarodna organizacija pri izboljševanju javnega zdravja z informiranjem, izobraževanjem, združevanjem in z vrsto drugih strokovnih dejavnosti. (več o organizaciji na domači strani: <http://www.ipsf.org>)

Vsako leto po koncu študijskega leta poteka IPSF World Congress. Letošnji, že 56., bo potekal od 2. do 12. avgusta 2010 v Ljubljani v organizaciji Društva študentov farmacije Slovenije. Gre za mednarodni izobraževalno-družabni dogodek, na katerem se 300 študentov farmacije iz vsega sveta zbere na enem mestu, da bi se izpopolnili v znanju, da bi postali bogatejši za še eno življenjsko izkušnjo več in bi domov prinesli poln kovček doživetij, vtisov in poznanstev.

10 dni bo zapoljenih s predavanji, delavnicami in simpozijem, s katerimi se bomo vedoželjni bodoči farmacevti dodatno izobraževali o stvareh, ki jih v našem rednem študiju ne slišimo, pa so prav tako pomembne. Genska terapija (uporaba in zloraba), rak na materničnem vratu in tuberkuloza so le nekatere od tem, katerim se bomo posvečali med samim kongresom. Na naši domači strani (<http://www.ipsf2010.org>) se informacije dnevno posodablajo. Vabimo Vas, da jo obiščete in izveste o samem dogodku še več.

Naše društvo ima dolgo tradicijo in sposobne člane, ki kvalitetno in dosledno opravljamo svoje zadolžitve. Seveda pa se zavedamo, da vsega ne zmoremo sami, zato se obračamo na Vas! Imejte v mislih to, da bo vsakršna podpora vplivala na kakovost organizacije. Vse donacije bodo uporabljene premišljeno in odgovorno ter seveda v dobrobit udeležencev. Bodite del projekta, okusite kos IPSF-a in ne zamudite izjemne priložnosti za promocijo. V primeru, da razmišljate o sponzorstvu, se lahko obrnete na rc_chairperson@ipsf2010.org.

Novi doktorji znanosti

dr. Zvone Simončič, mag. farm.

Uporaba mikrokolorimetrije pri vrednotenju stabilnosti zdravilnih učinkovin in farmacevtskih oblik na primeru nekaterih zaviralcev angiotenzinske konvertaze

izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm., (mentor), izr. prof. dr. Ksenija Kogej, univ. dipl. kem. (somentorica)

Doktorska disertacija Zvoneta Simončiča sodi na področje obstojnosti zdravil t.j. na področje farmacevtskih raziskav, ki preverjajo in zagotavljajo, da bolnik znotraj predvidenih časovnih okvirov prejme zdravilo deklarirane učinkovitosti, varnosti in kakovosti. Zaradi izrednega pomena, kakor tudi zaradi kompleksnosti proučevanih sistemov, zahtevajo študije stabilnosti skrbno obravnavo možnih sprememb in temeljijo na razvoju ter uporabi primernih t.i. stabilnostno indikativnih analiznih metod.

Doktorsko delo Zvoneta Simončiča se osredotoča ravno na te aspekte podpore stabilnostnim raziskavam in umešča metodo mikrokolorimetrije (MC) v okvire celokupnega farmacevtskega razvoja. V uvodnem delu disertacije avtor najprej predstavi teoretične, praktične in regulatorne vidike stabilnostnih študij ter izčrpen pregled uporabe metode mikrokolorimetrije na področju farmacije. V eksperimentalnem delu nato v obliki objavljenih člankov, razprave in zaključkov poda sistematičen pristop optimizacije metode mikrokolorimetrije za namen

stabilnostnih študij, od obravnave obstojnosti zdravilne učinkovine do vrednotenja končne farmacevtske oblike. Ta razvoj avtor ilustrira na primeru študij stabilnosti nekaterih zaviralcev angiotenzinske konvertaze t.i. ACE inhibitorjev enalapрила, perindopрила, ramipрила, cilazapрила in Xprika. Pri tem se v ključnih ugotovitvah sklicuje na primerjavo z bolj selektivno metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), ki se trenutno najpogosteje uporablja na področju stabilnosti zdravil in s tem ovrednoti tiste prednosti mikrokolorimetrije, ki omogočajo širši pogled na obravnavano problematiko stabilnosti zdravil in s tem racionalnejši farmacevtski razvoj.

Ugotovitve, predstavljene v disertaciji in utemeljene na znanstveno sistematičen način, predstavljajo nov pristop pri reševanju problematike stabilnosti zdravil. S tem pomenijo hkrati tudi izhodišče za načrtovanje tovrstnih študij na bolj racionalen način, kar je danes še zlasti pomembno zaradi omejitev povezanih z industrijsko lastnino in strogih regulatornih zahtev.

dr. Miha Milek, univ. dipl. biokem.

Farmakogenetika tiopurin-s-metiltransferaze

izr. prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm. (mentorica)

Doktorska disertacija predstavlja aktualno vsebino s področja farmakogenetike, vede, ki proučuje genetske osnove posameznikovega odziva na zdravljenje. Miha Milek v svoji disertaciji izpostavi problem toksičnih stranskih učinkov citostatikov v terapiji raka. Namen doktorandovih raziskav je bil doprinesiti k razumevanju genetskih in biokemičnih dejavnikov pri presnovi tiopurinskih učinkovin, razviti diagnostične teste, jih uvesti v klinično uporabo in na ta način omogočiti individualizirano terapijo. Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT), osrednja molekula raziskav, je encim, ki z reakcijo S-metiliranja pretvori tiopurine v neaktivne metabolite in na ta način vpliva na učinkovitost zdravljenja in pojav neželenih učinkov.

V prvem delu disertacije je doktorand predstavil ugotovljene genotipske frekvence glavnih alelov in frekvenčne distribucije aktivnosti TPMT v slovenski populaciji, ter dokazal vzročno povezanost, kar je bila osnova za izdelavo farmakogenetskih smernic za identifikacijo bolnikov s spremenjenim odzivom na tiopurine.

V nadaljevanju je s pomočjo modelnih celičnih linij za akutno limfoblastno levkemijo (ALL) raziskoval mehanizme regulacije aktivnosti TPMT. Dokazal je, da ima metilni donor S-adenozilmetionin (SAM) ključno vlogo pri uravnavanju presnove tiopurinskih učinkovin v limfoblastnih celicah, saj stabilizira TPMT in posledično prispeva k deaktivaciji 6-merkaptopurina, kar vodi v nižjo citotoksičnost.

Z uporabo umetnih virusnih delcev (AVP) in drugih metod transfekcije je uspel pripraviti celične linije s stabilnim prekomernim izražanjem TPMT, ki jih je uporabljal za študij metabonih mrež, ter celičnih procesov, kot sta metioninski cikel in metilacije DNA.

Izsledki predstavljajo izviren doprinos k znanosti in so uspešen primer translacijske medicine, prenosa rezultatov bazičnih raziskav v klinično prakso.

Rezultati raziskav so bili že objavljeni v 6 člankih s faktorjem vpliva, ter na sedmih mednarodnih znanstvenih srečanjih.

dr. Branka Rozman, mag. farm

Dermaalne mikroemulzije z vitaminoma C in E: od optimiranja sestave do vrednotenja na modelu človeških keratinocitov

prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm. (mentorica)

Doktorska disertacija Branke Rozman sodi na področje farmacevtske tehnologije. Cilj naloge je bil razviti in ovrednotiti potencial mikroemulzij kot nosilnih sistemov za sočasno dostavo vitaminov C in E v kožo. Vitamin C je glavni in edini življenjsko potreben vodotopen antioksidant, medtem ko je vitamin E najpomembnejši lipofilni antioksidant, ki zagotavlja zaščito membran in je dokazano učinkovit pri preprečevanju lipidne peroksidacije. Krepitev endogenega antioksidativnega obrambnega sistema je obetaven pristop k zaščiti kože pred škodljivimi vplivi radikalov in s tem pri preprečevanju oz. zaviranju fotostaranja, vnetij in celo rakavih sprememb kože, ki so posledica oksidativnega stresa. Doktorska disertacija sodi po aktualnosti med področja, ki so danes v svetu predmet intenzivnih raziskav in bodo tudi v prihodnje eden ključnih stebrov razvoja novih dermalnih dostavnih sistemov.

V doktorski nalogi razvite, optimirane in preskušane ME so učinkoviti in neiritirajoči nosilni sistemi, ki omogočajo sočasno vgrajevanje dveh antioksidantov – hidrofilnega vitamina C in lipofilnega vitamina E, imajo primerno viskoznost za aplikacijo, kar je doktorandka dosegla z uporabo dveh pristopov: konvencionalnega – dodatek primernih

zgoščeval ter inovativnega – spontan nastanek transparentnega mikroemulzijskega gela ob večanju deleža vode. ME zagotavljajo ustrezno sproščanje in perkutano absorpcijo vanje vgrajenih vitaminov, pri čemer so ključni dejavniki struktura nosilnega sistema, lokacija vitaminov v ME, njuna mobilnost in afiniteta do nosilnega sistema. Optimizirane *in vitro* metode (koža prašičjega ušesa, tridimenzionalni model človeških keratinocitov, celične linije človeških keratinocitov) dobro korelirajo in omogočajo določitev perkutane absorpcije ter iritacijskega potenciala, zato je predstavljeni model lahko zanesljiv alternativni protokol *in vivo* testiranja na živalih.

Del raziskovalnega dela je kandidatka opravila na Faculty of Pharmacy, Univerze Claude Bernard v Lyon-u, v sodelovanju z L'Oreal-ovim podjetjem Episkin in bolnišnico Eduard Herriot. V Lyonu je vpisala tudi magistrski študijski program in ga uspešno zagovarjala v junija 2007 v francoskem jeziku.

Svoje dosedanje raziskovalno delo je doktorandka že objavila v 5 člankih; od tega v treh s faktorjem vpliva, še dva pa sta v postopku objave.

dr. Andrej Perdih, mag. farm.

Dinamični model encima MurD iz E.coli in in silico načrtovanje novih inhibitorjev

prof. dr. Tomaž Šolmajer, univ. dipl. kem. (mentor)

Dr. Andrej Perdih je v svoji doktorski disertaciji uvodoma predstavil pereč problem rezistence mikroorganizmov na obstoječe antibiotike. Peptidoglikan je bistven sestavni del bakterijskih celičnih sten in zato primeren tarčni sistem z vidika selektivne toksičnosti. Biosintezo peptidoglikana katalizirajo številni encimi, med njimi Mur ligaze, ki katalizirajo stopenjsko pripenjanje aminokislinskih ostankov na d-laktoilni del peptidoglikanskega prekursorja UDP-N-acetilmuraminske kisline.

Pomembna lastnost proteinov iz družine Mur ligaz je modularna tridimenska proteinska arhitektura, kjer položaj posameznih modulov omogoča selektivno prepoznavanje rastočega substrata. Za načrtovanje novih učinkovitih inhibitorjev je potrebno tudi razumevanje dinamičnih procesov v procesu prepoznavanja, konformacijske mobilnosti tarče in samega procesa katalize. Na osnovi v zadnjem času objavljenih tridimenzionalnih struktur apoencimov oziroma kompleksov encimov z različnimi ligandi, in z upoštevanjem eksperimentalnih kinetičnih in strukturnih študij je v disertaciji dr. Andrej Perdih na primeru ligaze MurD iz *E. coli* razvil kompleksen dinamični model encima, ki interpretira dinamiko premikanja domen in omogoča

ovrednotenje energetike vezave inhibitorjev z eksperimentalno določeno vezavno konformacijo.

Dr. Perdih je s soavtorji na osnovi simulacij z metodo tarčne molekulske dinamike postavil dinamične modele za vezavo ligandov ATP in UMA in proces zapiranja C-terminalne domene. Simulacije so uspešno reproducirale eksperimentalno dobljeno zaporedje vezave, kjer se na encim MurD najprej veže ligand ATP, ki mu nato sledi UDP-prekursor UMA. Pokazal je tudi, da se C-terminalna domena zavrti v zaprto strukturo kot togo telo in pri obratu sodeluje več aminokislinskih proteinske zanke, ki povezuje C-terminalno in centralno domeno. Nadalje je skupaj s soavtorji ugotovil, da so gibanja C-terminalne domene, ki so omejena na ravnino centralne in N-terminalne domene, energijsko manj zahtevna, kot gibanje izven te ravnine. Iz rezultatov simulacij je razvidno, da nizke energijske bariere za gibanje C-terminalne domene znotraj te ravnine nakazujejo verjeten obstoj večih konformacijskih stanj encima MurD, ki so na voljo za vezavo substratov. Ti rezultati predstavljajo pomemben korak za načrtovanje novih inhibitorjev z upoštevanjem fleksibilnosti proteinske tarče.

Z uporabo metode linearne interakcijske energije je izračunal prosto energijo vezave za serijo N-sulfonil glutaminskih inhibitorjev MurD. Z dekompozicijo interakcijske energije je pokazal, da so nepolarne van der Waalsove interakcije gonilna sila vezave teh inhibitorjev.

Z uporabo hibridnega kvantnomehanskega/molekulskomehanskega (QM/MM) pristopa je študiral tvorbo acilfosfatnega in tetraedričnega intermedata v reakciji, ki jo katalizira bakterijski encim MurD. Rezultati skladno z eksperimentalno določenim reakcijskim vrstnim redom kažejo, da najprej reagira substrat UMA z ATP molekulo v acilfosfatni intermediat. Energijska analiza reakcijskih poti je pokazala, da se D-glutaminska kislina najverjetneje pred reakcijo z acilfosfatnim intermedatom deprotonira, saj je prenos protona med samo tvorbo C-N vezi energijsko zahteven.

Izhajajoč iz dostopnih strukturnih podatkov za encima MurD in MurE iz *E. coli* je dr. Andrej Perdih razvil protokol virtualnega rešetanja (VS) in s kombinacijo trodimenzionalnih farmakoforov in molekulskega sidranja

preiskoval velike knjižnice virtualnih molekul. Nato je z eksperimentalnim testiranjem encimske inhibicije identificiral nov razred dualnih inhibitorjev encimov MurD in MurE, ki kot možni nadomestek glutaminske kisline vsebujejo benzen 1,3-dikarboksilatni fragment.

Pomembnost in originalnost raziskav potrjuje odmevnost znanstvenih člankov, ki jih je dr. Perdih objavil v priznanih mednarodnih revijah z visokim faktorjem vpliva. V času svojega študija se je tudi udeležil številnih mednarodnih kongresov in delavnic, kjer je aktivno predstavil svoje delo, kreativno pa sodeluje tudi pri nekaterih drugih raziskavah našega laboratorija, kar izkazuje s soavtorstvom pri publikacijah.

V splošnem načrtovanje novih zaviralcev na osnovi dinamičnega encimskega modela predstavlja zanimivo in uporabno novost v znanstveni literaturi. Disertacija pa je tudi pomembno izhodišče za načrtovanje novih antimikrobnih učinkovin in prispevek k razumevanju mehanizma inhibicije Mur ligaz.

dr. Mateja Kramer, univ. dipl. mikrobiol.

Novi pristopi k zagotavljanju kakovosti in obstojnosti probiotičnih izdelkov z mlečnokislinskimi bakterijami

izr. prof. dr. Vojko Kmetec (mentor),

viš. znanst. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašič, univ. dipl. živil. tehnol. (somentorica)

Doktorska disertacija Mateje Kramer sodi na področje zagotavljanja kakovosti in obstojnosti probiotičnih izdelkov. Ti so danes na evropskem trgu prisotni kot živila, prehranska dopolnila, zdravila brez recepta (OTC) ali dodatki živalski krmi. Vsi ti izdelki so izbrani na osnovi strogih selekcijskih kriterijev, ki upoštevajo varno uporabo in klinično dokazano učinkovitost ob stalnem zagotavljanju njihove kakovosti. Leta je pri teh izdelkih pogojena tako s številom, kot tudi z živostjo v njih prisotnih celic probiotičnih mikroorganizmov. Doktorsko delo Mateje Kramer se zato osredotoča na iskanje in utemeljevanje novih pristopov zagotavljanja kakovosti tovrstnih sistemov temelječih na sodobnih analitskih metodah, ki nudijo možnost objektivnejše ocene kakovosti izdelkov v času proizvodnje in med shranjevanjem.

V uvodnem delu disertacije avtorica najprej predstavi probiotike z vidika njihove uporabnosti in obstoječih pristopov zagotavljanja njihove kakovosti. Ob tem podrobno opiše tudi postopke in značilnosti v disertaciji uporabljenih analitskih metod kot so štetje kolonij na pretrijevih ploščah, kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (q-PCR), brez in v kombinaciji z obdelavo vzorcev s propidijevim monoazidom (PMA), fluorimetrija v kombinaciji s pretočno citometrijo (FC) ter ATP bioluminescenca. Prilagoditev teh metod v smislu zmožnosti ocenjevanja števila in živosti bakterij v probiotičnih izdelkih nato avtorica sistematično pojasni v eksperimentalnem delu na osnovi rezultatov lastnih raziskav ter sklicev na številne literaturne vire. Pri tem ugotavlja, da je za pridobitev najbolj celostne informacije o proučevanih sistemih smiselna uporaba kombinacije vseh obravnavanih metod, izbira posamezne metode pa nato zavisi od ciljev določene študije. Rezultati raziskav kažejo namreč na to, da na DNA

temelječe metode dajejo podatek o številu vseh bakterij skupaj, vključno z neživimi, oziroma tistimi z ohranjeno celično integriteto, metode štetja na ploščah o številu kultivabilnih bakterij, metoda ATP bioluminescence pa o številu aktivnih bakterij. Hkrati avtorica ocenjuje, da se je kot najbolj obetavna za rutinsko spremljanje kakovosti probiotičnih izdelkov izkazala metoda PMA PCR v realnem času. Omenjena metoda in pretočna citometrija v kombinaciji z barvili pa sta se v okviru izvedenih testov stabilnosti izkazali tudi za dovolj robustni in s tem primerni za uporabo pri raziskavah obstojnosti probiotičnih izdelkov.

Na ta način je Mateja Kramer v svojem doktorskem delu sistematično in celostno obdelala osnovno idejo disertacije v smislu razjasnitve stanja živosti mikroorganizmov v probiotičnih sistemih v času proizvodnje in med shranjevanjem in to s pomočjo prilagoditve sodobnih analitskih metod. Aktualnost in znanstven pomen obravnavane tematike in v okviru disertacije pridobljenih rezultatov potrjuje nenazadnje tudi dejstvo, da je avtorica s področja omenjenih raziskav objavila že dva članka v revijah s faktorjem vpliva.

Ugotovitve, predstavljene v disertaciji in utemeljene na znanstveno sistematičen način, predstavljajo nov pristop pri reševanju problematike nadzora in zagotavljanja kakovosti probiotičnih izdelkov, še zlasti v segmentu razvoja in aplikacije primerne analitske podpore. To je danes pomembno ne le z vidika razumevanja proučevanih sistemov, pač pa tudi zaradi vloge industrijske lastnine in regulatornih zahtev, zaradi česar predstavljajo rezultati disertacije tudi novo izhodišče za načrtovanje in izvedbo tovrstnih študij v bodoče.

dr. Marko Obradović, mag. farm.

Umeščanje novih strategij zdravljenja raka v zdravstveni sistem

prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm (mentor)

Prvi namen doktorske naloge je bil primerjalno proučiti umeščanje novih onkoloških zdravil v zdravstveni sistem v Sloveniji in ostalih evropskih državah.

Drugi namen naloge je bil ovrednotiti klinične in ekonomske izide na primeru cepljenja proti HPV za preprečitev pojava raka na materničnem vratu ter na primeru določevanja genotipa UGT1A1 za preprečitev pojava hudih nevtropenij pri zdravljenju bolnikov z rakom debelega črevesa in danke, ki prejemajo irinotekan.

Tretji namen naloge pa je bil proučiti, kako slovenska splošna populacija vrednoti korist podaljšanja življenja, kar je pomembna informacija pri odločanju o umeščanju novih strategij zdravljenja v zdravstveni sistem, pri katerih je podaljšanje preživetja ključnega pomena, kamor spada področje zdravljenja raka.

Kandidat je z uporabo ustreznih metodoloških pristopov identificiral in razložil razlike v umeščanju novih onkoloških zdravil v Sloveniji in

ostalih evropskih državah. Na ta način je s svojim delom prispeval pomembne informacije o potencialni potrebi po alokaciji dodatnih finančnih sredstev za določena nova zdravila za zdravljenje raka v Sloveniji.

Analizi stroškov in koristi cepljena proti HPV-ju in določevanja genotipa UGT1A1 pri zdravljenju z irinotekanom podpirata uvajanje teh dveh novih tehnologij v klinično prakso.

Raziskava kontingenčnega vrednotenja pa je po našem vedenju prva, ki je ocenila, kako določena splošna populacija vrednoti podaljšanje preživetja zaradi zdravstvene intervencije.

Rezultati dosedanjega raziskovalnega dela kandidata Marka Obradovića na področju farmakoepidemiologije in farmakoekonomike so mednarodni in domači raziskovalni sferi na voljo v obliki 5-ih člankov objavljenih v mednarodnih revijah z visokim faktorjem vpliva in 2-eh člankov objavljenih v vodilnih slovenskih revijah na področju zdravstva.

dr. Andreja Kovač, mag. farm.

Odkrivanje novih inhibitorjev bakterijskih ligaz z virtualnim rešetanjem in sintezo substratnih analogov

Izr. prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm. (mentor)

Pojav multi-rezistentnih sevov patogenih bakterij, ki so odporne na več protimikrobnih učinkovin hkrati, predstavlja resen problem v sodobnem zdravstvu. Iskanje novih tarč in sinteza novih protibakterijskih zdravilnih učinkovin z delovanjem na rezistentne bakterije je zato v bitki zoper infekcijske bolezni neizogibno. Eno od pomembnejših tarčnih mest za razvoj novih protibakterijskih učinkovin je še vedno bakterijski peptidoglikan. Zaviranje njegove sinteze vodi do lize celic in posledično do bakterijske smrti. V zadnjem desetletju je vse več raziskav usmerjenih v znotrajcelične citoplazemske faze biosinteze peptidoglikana, s katerimi se je v svoji doktorski disertaciji ukvarjala Andreja Kovač. Z različnimi metodami je iskala inhibitorje encimov iz družine Mur ligaz in D-alanil-D-alanil ligaze. Gre za od ATP odvisne ligaze (MurC-MurF, DdlB), ki katalizirajo zaporedno pripenjanje aminokislinskih ostankov na rastoč peptidoglikan.

V svojem doktorskem delu je Andreja Kovač najprej uvedla *in vitro* test z malahitno zelenim za določanje encimske aktivnosti. S testom spektroskopsko določimo koncentracijo fosfata, ki se sprosti pri encimsko katalizirani reakciji in nam tako omogoča ovrednotenje inhibitorne aktivnosti potencialnih inhibitorjev Mur ligaz in Ddl. Iskanja inhibitorjev se je doktorantka najprej lotila z virtualnim rešetanjem banke spojin Ameriškega nacionalnega inštituta za raziskovanje raka in z naključnim rešetanjem domače banke spojin. Pri virtualnem rešetanju je uporabila dostopne kristalne strukture encimov MurD

(*E.coli*), MurF (*S. pneumoniae*) in DdlB (*E. coli*) ter računalniške programe za virtualno rešetanje visoke zmogljivosti eHits 6.0 in AutoDock 4.0, ki nam s svojimi cenilnimi funkcijami omogočijo, da *in vitro* ovrednotimo le manjšo serijo tistih spojin, ki jim je program napovedal najmočnejšo vezavo. Tako je dobila nekaj strukturno povsem novih inhibitorjev vseh treh encimov z IC₅₀ v nizkem mikromolarnem območju. Nekateri so poleg inhibitornega imeli tudi protibakterijsko delovanje. S preučevanjem encimke kinetike je ugotovila, da je večina inhibitorjev DdlB kompetitivna napram ATP. Dobljeni rezultati so dobro izhodišče za optimizacijo in nadaljnji predklinični razvoj inhibitorjev encima DdlB.

Peptidoglikan se med rastjo in delitvijo bakterijskih celic stalno obnavlja in preoblikuje, pri čemer poleg omenjenih ligaz sodeluje še murein peptidna ligaza (Mpl). Ta encim je sicer neesencialen za preživetje bakterij, vendar zelo pomemben pri recikliranju peptidoglikana. Vloga Mpl kot encima, ki bi lahko vgrajeval lažne peptide kot t.i. trojanske konje, do sedaj ni bila proučena. Andreja Kovač je s kemijsko sintezo knjižnice tripeptidov s splošno formulo L-Ala-D-Glu-X, ki jih Mpl ni sprejel kot lažne substrate, ovrgla teorijo o muropeptidni ligazi kot tarčnemu encimu za razvoj novih protibakterijskih učinkovin.

Svoje izsledke je Andreja Kovač v soavtorstvu objavila v 11 člankih v revijah s faktorjem vpliva in dveh mednarodnih patentnih prijavih.

dr. Klemen Rojnik, mag. farm.

Vrednotenje stroškovne učinkovitosti posegov v zdravstvu: primer presejanja za rakom dojke

prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm. (mentor)

Kandidat Klemen Rojnik je v svoji doktorski disertaciji obravnaval problem stroškovne učinkovitosti mamografskega presejanja raka dojke. S pomočjo Bayesovega analitičnega modeliranja odločitve je odgovoril na dve bistveni vprašanji: ali je mogoče opredeliti, katere posege je upravičeno uvesti v standardno prakso, in ali je potrebno sredstva nameniti dodatnim raziskavam.

Prvo vprašanje se je nanašalo na stroškovno učinkovitost posega. Kot stroškovno najučinkovitejši program se je pri najbolj pogosto navajanih mejah vrednosti za dodaten QALY, ki je merilo za učinkovitost programa, izkazal program s presejanjem med 40. in 80. letom starosti na vsaka 3 leta, ki ima inkrementalno razmerje med stroški in učinki okoli 13.000EUR/QALY. V tem programu je doseženo najboljšo ravnovesje med pozitivnimi in negativnimi učinki mamografskega presejanja raka dojke.

Drugo vprašanje pa je vezano na problem obsega in kakovosti informacij. Kandidat je z analizo vrednosti informacij ocenil pričakovano vrednost popolnih informacij, ki je enaka stroškom napačne odločitve. S tem je postavil zgornjo mejo sredstev, ki bi jih bili še pripravljene investirati v pridobivanje novih informacij z dodatnimi raziskavami z namenom zmanjšati stroške napačne odločitve. Tako bi prevladale pričakovane koristi dodatnih raziskav le v primeru, če raziskava ne bi bila daljša od dveh let in bi bilo trajanje odločitve vsaj 30 let ter če bi upoštevali 200.000 žensk in mejno vrednost inkrementalnega razmerja med stroški in učinki 10.000 EUR/QALY.

Rezultati dosedanjega raziskovalnega dela kandidata Klemna Rojnika na področju ekonomike v zdravstvu in statistične analize so mednarodni in domači raziskovalni sferi na voljo v obliki 2-eh člankov objavljenih v mednarodni reviji z visokim faktorjem vpliva.

dr. Teja Čelhar Kenanove, mag. farm.

Vloga serinskih proteaz ter prostaglandinskega receptorja EP4 pri modulaciji apoptoze limfocitov B

Izr. prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm. (mentorica)

Doktorska disertacija zajema aktualne vsebine s področja razumevanja disfunkcije limfocitov B, kar lahko vodi v kancerogenezo ali avtoimunost.

Teja Čelhar Kenanova je v svoji disertaciji zagovarjala hipotezo, da imajo serinske proteaze in prostaglandinski receptor EP4 odločilno vlogo v regulaciji procesov celične proliferacije in smrti. K raziskavam vpletenih molekularnih mehanizmov je pristopila v dveh stopnjah:

V prvem delu je testirala nove inhibitorje serinskih proteaz, ki so bili sintetizirani na Fakulteti za farmacijo, predpostavila je namreč, da vodi inhibicija nekaterih serinskih proteaz v apoptozo. Testirane spojine je primerjala z že znanimi inhibitorji, ki se uporabljajo v terapiji raka npr. z bortezomibom.

Drugi sklop raziskav je obsegal razjasnitev vloge gena *Ptger4*, ki nosi zapis za prostaglandinski receptor EP4, v celicah limfoma B. Za razlago

molekularnih mehanizmov je uporabila farmakološki pristop. Pri raziskovalnem delu je uporabila metode in laboratorijske tehnike molekularne biologije, genetike, farmakologije in celične biokemije.

Izvirnost raziskovalnega dela je v odkrivanju novih tarčnih molekul, ki bi služile za ciljan razvoj učinkovin – modulatorjev apoptoze. Dokazala je anti-apoptotično vlogo serinskih proteaz ter identificirala inhibitorje, ki inducirajo apoptotično celično smrt in bodo služile kot spojine vodnice za optimizacijo induktorjev apoptoze.

Nadalje je Teja Čelhar Kenanova dokazala, da posreduje receptor EP4 inhibitorne učinke na celice limfoma B preko aktivacije NF- κ B signalne poti ter, da signaliziranje preko toll-u podobnega receptorja delno antagonizira te učinke, medtem ko ima inhibicija serinskih proteaz sinergistične učinke. Ta spoznanja omogočajo nove pristope k modulaciji aktivacije limfocitov oziroma načrtovanju terapije sepse.

dr. Zoran Trošt, mag. farm.

Proučevanje transkriptoma ostroblastov pri osteoporozi,

izr. prof. dr. Janja Marc, mag. farm.. (mentorica)

Osteoporoza je poligena in večfaktorska skeletna bolezen z močnim genetskim ozadjem, geni odgovorni za njen nastanek pa še zdaleč niso znani, kljub raziskavam, ki intenzivno potekajo že skoraj dve desetletji. Zelo verjetno je zato kriv tudi napačen pristop k izbiri t.i. kandidatnih genov, ki je v preteklosti baziral na trenutnem poznavanju kostne biologije. V pričujoči doktorski nalogi pa je Zoran Trošt uporabil nov pristop k identifikaciji potencialno vpletenih genov, in sicer vsegenomski pristop (WGA, Whole Genome Analysis), ki omogoča analizo vseh genov človeškega genoma sočasno. Kandidat je svoje raziskave osnoval na merjenju izražanja osteoblastnih genov in analiziral profile genskega izražanja v osteoblastih osteoporoznega tkiva v primerjavi z zdravim kostnim tkivom. Z uporabo najmodernejših računalniških programov in uvedbo različnih kriterijev je izselecioniral skupino približno 150 genov, ki se v osteoporoznem tkivu izražajo bistveno drugače kot v normalnem. Gene je rangiral in izbral 4 gene, ki jih je v nadaljevanju svojih analiziral v humanih tkivnih biopthih 70 bolnikov, da bi potrdil njihovo (realno) vlogo v kostnem tkivu pri človeku. V tretjem delu raziskav je kandidat pripravil in vitro model za proučevanje oksidativnega stresa na osteoblaste, saj so rezultati iz prve stopnje nakazali na relativno velike razlike v odzivu osteoblastov na oksidativni stres. Dokazal je da je se izražanje genov v osteoblastih spremeni v odvisnosti jakosti in trajanja oksidativnega stresa.

Na podlagi rezultatov doktorske naloge je kandidat Zoran Trošt potrdil hipotezo svoje naloge da so različno izraženi geni novi kandidatni geni za razvoj osteoporoze. Prav ti geni pa predstavljajo pomembno izhodišče tako za razvoj novih terapevtskih pristopov, prav kot tudi za razvoj novih diagnostične kazalcev s katerimi bi posameznike s povečanim

veganjem lahko odkrivali in tako uvajali preventivne ukrepe že v mladosti.

Rezultati doktorske naloge Zorana Trošta nesporno predstavljajo pomemben korak na poti iskanja in identifikacije genov, ki bi lahko bili odgovorni za nastanek osteoporoze, bolezni za katero že danes zbolijo vsaka druga žena po 65 letu starosti, v prihodnje zaradi staranja prebivalstva pa naj bi jih bilo še več. Metode raziskovanja, ki jih za izvedbo načrtovanega raziskovalnega dela kandidat uporabil, sodijo v sklop najmodernejših tehnologij. analize na izolirani celični vrsti in celovitosti mikromrež zagotavljajo visoko zanesljivost pri iskanju novih kandidatnih genov. Prav zaradi drugačnega pristopa, ki problematiko patogeneze osteoporoze osvetljuje z drugega zornega kota, predstavljajo rezultati, predstavljeni v naši raziskavi, novost na področju raziskovanja osteoporoze.

Rezultati doktorske naloge predstavljajo nov doprinos k znanosti na področju spoznavanja dogodkov na nivoju izražanja genov pri osteoporozi, kakor tudi k ugotavljanju novih kandidatnih genov, ki bi lahko postali tarča diagnostičnih in prognostičnih analiz ter seveda farmakoterapevtskih pristopov.

Rezultati dosedanjih raziskav kandidata Zorana Trošta, mag. farm. na področju klinično-biokemijske in molekularne diagnostike so pomembni in mednarodno primerljivi, kar je razvidno iz njegove bibliografije (5 člankov v revijah v SCI in 9 prispevkov na znanstvenih konferencah).

dr. Ivan Plantana, mag. farm.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje novih trinemskih profimikrobnih učinkovin

prof. dr. Uroš Urleb, mag. farm. (mentor)

Pojav in razvoj bakterijske rezistence na obstoječe antibiotike predstavlja velik problem v zdravljenju infekcijskih bolezni.

Trinemski beta-laktamski derivati so učinkovine, ki so kot strukturni razred že poznani, vendar le kot antibiotiki in ne kot zaviralci beta-laktamaz.

V okviru doktorske disertacije je Ivan Plantan načrtoval in sintetiziral nove spojine vodnice trinemskih beta-laktamskih derivatov in optimiral obstoječe spojine vodnice z namenom izboljšati ali spremeniti biološki učinek in fizikalno-kemijske in toksikološke lastnosti.

Hipoteza za optimizacijo spojine vodnice je bila osnovana na kristalu kompleksa encima beta laktamaza z zaviralcem tega encima.

Na osnovi in siliko študij in strukturnih interakcij med ligandom in encimom je kandidat načrtoval spojine, ki imajo spremenjene farmakokintetične lastnosti in jakost delovanja.

Pomemben rezultat disertacije je bil tudi razvoj novih sinteznih poti, ki so splošno uporabne za sintezo novih trinemskih beta-laktamskih derivatov z razvojem metod stereoselektivne sinteze, predvsem z uporabo kiralnih izhodnih spojin in/ali uporabo kiralnih katalizatorjev in reagentov.

V doktorskem delu je kandidat uspešno sintetiziral C4 in C13 substituirane derivate trinemov z odličnim inhibitorynim delovanjem na beta-laktamazah razredov A, C in D. Monofluoro derivat ima poleg

inhibitornih lastnosti na beta-laktamazah razredov A, C in D tudi antibiotični učinek, ki se lahko primerja z obstoječimi karbapenemi. Antibiotični učinek skupaj z inhibitornim beta-laktamaznim delovanjem poveča spekter delovanja antibiotika tudi na rezistentne seve bakterij, ki proizvajajo beta-laktamaze, predvsem tipa A in C, katerih je tudi subnanomolarni inhibitor.

S pomočjo modeliranja je kvalitativno ocenili vpliv substitucij na mestu C4 trinemskega skeleta, predvsem z vidika izboljšanja kritičnih farmakokinetičnih parametrov (biološka razpolovna doba). Pokazal je tudi na pomanjkljivosti uporabe klasičnih metod molekulskega

modeliranja, ki so namenjene predvsem za napovedovanje delovanja reverzibilnih inhibitorjev

Pri sintezi mono-fluoro trinemskega derivata, ki je nova in originalna spojina je v kompleksni totalni sintezi kot ključni intermediat sintetiziral fluoroacetoksiazetidion, ki predstavlja nov in zanimiv sinton za sintezo različnih karbapenemov in drugih beta-laktamskih antibiotikov. Ključna stopnja pri sintezi je bila uporaba asimetričnega transfer hidrogeniranja s katerim je dosegel odlične enantiomerne presežke (96%) ter dobra diastereoizomerna razmerja (80/20). Sinteza predstavlja novo in originalno sintezno pot do fluoro substituiranih trinemskih derivatov.

dr. Matej Sova, mag.farm.

Načrtovanje in sinteza hidrosietilaminskih inhibitorjev biosinteze peptidoglikana

izr. prof. Stanislav Gobec, mag.farm. (mentor)

Zaradi vedno bolj nevarnega razvoja rezistentnih sevov številnih patogenih bakterij postaja iskanje novih protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja neizogibno in predstavlja farmacevtski stroki resen izziv. Med mnogimi tarčnimi mesti, na katera delujejo sodobne protibakterijske učinkovine, je eno najpomembnejših bakterijski peptidoglikan. Biosintezo peptidoglikana katalizirajo številni encimi, od katerih jih večina predstavlja dobre tarče v boju z bakterijsko rezistenco. Med njimi smo svojo pozornost usmerili na Mur ligaze (MurC - MurF), D-alanil-D-alanin ligazo (DdlB) in D-alanil-D-laktat ligazo (VanA). Ti encimi sodelujejo v znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana, imajo podoben katalični mehanizem in podobne tridimenzionalne strukture.

Matej Sova je v okviru doktorske disertacije načrtoval in sintetiziral hidrosietilaminske analoge kot nove inhibitorje omenjenih ligaz. Pri načrtovanju si je pomagal s sodobno programsko opremo SPROUT za

»de novo« načrtovanje nizkomolekulskih inhibitorjev in orodjem za sidranje ligandov eHiTS. Razvil in optimiral je sintezno metodologijo za pripravo hidrosietilaminskega ključnega sintona, ki poteka preko oksidacije derivatov alilamina do epoksida, čemur sledi odpiranje oksiranskega obroča z N-nukleofilni ob prisotnosti kalcijevega trifluorometansulfonata kot katalizatorja. Sintetizirane spojine so zavirale delovanje ligaz DdlB in VanA v mikromolarnih koncentracijah. Najmočnejše inhibitorje pa je sintetiziral z uvedbo fosfatne skupine na prosto hidroksilno skupino hidrosietilamina. Ker je VanA odgovoren za rezistenco na antibiotik vankomicin, so dobljeni inhibitorji dobro izhodišče za razvoj učinkovin, ki bi preprečile rezistenco na vankomicin. V seriji sorodnih spojin je tudi obetaven inhibitor encima MurE z IC_{50} vrednostjo 6 M.

Rezultate svojega raziskovalnega dela je Matej Sova do sedaj objavil v 9 člankih v revijah s faktorjem vpliva.

Razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2010

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj objavlja razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2010. Podružnice in sekcije prijavijo kandidate skladno z določili Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj najkasneje do 31. januarja 2010.

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

Predlogi morajo biti pripravljeni na obrazcih, ki so sestavni del Pravilnika.

Predlog za podelitev društvenih priznanj mora predlagatelj poslati skupaj s prilogami v enem izvodu v elektronski obliki na naslov info@sfd.si in v enem izvodu v tiskani obliki tajništvu Slovenskega farmacevtskega društva najkasneje do **31. januarja 2010**.

V vsaki poslani pošiljki z oznako "Predlog za društveno priznanje v letu 2010" je lahko le ena prijava. Elektronsko oddane prijave, posredovane po elektronski pošti, morajo biti popolnoma enake kot pisne, poslane z navadno pošto.

Zahvala

Izvršni odbor Slovenskega farmacevtskega društva je sredi letošnjega leta imenoval na mesto glavne urednice Farmacevtskega vestnika dr. Petro Slanc Može.



Dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.



Dr. Petra Slanc Može, mag. farm.

To nalogo je od leta 2000 opravljala dr. Andrijana Tivadar. Postavila je osnove za urejen postopek recenzij. S široko strokovno razgledanostjo, veliko smisla za lep slovenski jezik ter jasno izražene trditve, ki morajo odlikovati prispevke z znanstveno vsebino, je veliko prispevala h kvalitetnemu dvigu Farmacevtskega vestnika.

Vodstvo Slovenskega farmacevtskega društva se iskreno zahvaljuje dr. Andrijani Tivadar za dolgoletno sodelovanje v vlogi glavne urednice.

Izvršni odbor SFD

Uredništvo Farmacevtskega vestnika se zahvaljuje vsem recenzentom, ki so sodelovali pri pregledu člankov in tako obogatili vsebino strokovnega glasila slovenske farmacije.

Andrijana Tivadar in Petra Slanc Može
glavni urednici

izr. prof. dr. Saša Baumgartner • dr. Aleš Berlec • izr. prof. dr. Borut Božič • doc. dr. Tomaž Bratkovič
dr. Mateja Cegnar • izr. prof. dr. Vladka Čurin Šerbec • doc. dr. Bojan Doljak • dr. Rok Dreu
Nataša Faganeli • prof. dr. Mirjana Gašperlin • doc. dr. Nataša Ihan Hren • dr. Tomaž Miha Jaklič • doc. dr. Damjan Janeš
izr. prof. dr. Janez Kerč • prof. dr. Danijel Kikelj • dr. Petra Kocbek • dr. Klemen Kočevar • doc. dr. Nataša Kopitar Jerala
dr. Metka Krašna • prof. dr. Aleš Krbavčič • izr. prof. dr. Samo Kreft • dr. Katjuša Kreft • prof. dr. Albin Kristl • prof. dr. Julijana Kristl
prof. dr. Jana Lukač - Bajalo • doc. dr. Mojca Lunder • dr. Boris Majaron • dr. Gašper Marc • izr. prof. dr. Janja Marc
izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan • doc. dr. Srdjan Novaković • doc. dr. Nataša Obermajer • doc. dr. Aleš Obreza
doc. dr. Barbara Ostanek • prof. dr. Slavko Pečar • izr. prof. dr. Odon Planinšek • prof. dr. Janez Plavec • dr. Jerica Sabotič
dr. Boris Simončič • dr. Petra Slanc Može • prof. dr. Borut Štrukelj • Urban Švajger • dr. Andrijana Tivadar • dr. Rihard Trebše
prof. dr. Tom Turk • mag. Katarina Verhnjak • izr. prof. dr. Franc Vrečer • dr. Natalija Zajc • doc. dr. Anamarija Zega
prof. dr. Janez Zorko • dr. Damijana Zupančič Božič

Farmaceutski vestnik

Letnik 60 - Vsebina

Pregledni znanstveni članki

Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma (Ostanek B)	3	Kognitivne storitve v lekarniški službi: Farmacevtske intervencije in pregled terapije (Pavšar H)	127
Membrane za <i>in vitro</i> testiranje dermalne absorpcije (Gosenca M, Gašperlin M)	8	Zadovoljstvo pacientov z lekarniškimi storitvami (Horvat N, Kos M)	135
Emulzije, stabilizirane s trdnimi delci – Pickering emulzije (Teskač K, Gašperlin M)	14	Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila (Švajger U, Jeras M)	143
Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka (Serša G)	43	Koencim Q10 kot prehransko dopolnilo in zdravilo (Žmitek J, Žmitek K)	150
Sintezne zdravilne učinkovine v onkologiji (Obreza A)	48	Encimi iz naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz kot nove farmakološke tarče (Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J)	159
Biološka zdravila pri raku (Kos J)	61	Regulatorna vloga Ca ²⁺ ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov (Ferjan I)	165
Klinični vidik uporabe sodobnih zdravil pri zdravljenju rakavih obolenj (Borštnar S)	67	Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo učinkovin (Planinšek O)	169
Prehranska dopolnila v onkologiji (Kreft S)	73	Farmakoterapija paradontalnih bolezni (Obermajer S)	177
Psihološka priprava bolnikov z rakom (Snoj Z)	77	Raznolikost in biološki pomen fosforiliranih derivatov inozitola (Draškovič P, Podobnik M)	195
Klinična prehrana rakavih bolnikov (Rotovnik Kozjek N)	80	Uporabnost bakterijskih beljakovinskih agregatov v farmaciji (Jalen Š, Peternel Š, Fidler K, Jevševar S)	201
Dostopnost novih onkoloških zdravil slovenskim bolnikom (Kos M, Obradović M)	85	Zdravila in mladostniki (Pal M, Stipovšek T)	205
Državni presejalni programi za raka (Primic – Žakelj M, Krajc M, Zadnik V)	90	Internet, e-lekarniške storitve in mladostniki (Kogovšek Vidmar T)	211
Akutna bolečina v klinični praksi (Požlep G)	95	Značilnosti in različni izidi zdravstvene socializacije v mladostništvu (Marčič R, Rus VS, Kobal Grum D)	215
NSAR in paracetamol: izzivi in pasti? (Locatelli I, Tršinar M, Stepanovič A)	98	Kazalniki zdravja mladostnic in mladostnikov (Truden Dobrin P)	223
Šibki opiodi: med NSAR in morfinom? (Jančar P)	105	Poraba zdravil pri mladostnikih (Pečar Čad S)	226
Morfin in fentanil: uporaba pri akutni bolečini? (Toni J, Knez L)	110	Uporaba zdravil na recept pri mladostnikih (Abazović M)	230
Toksičnost in zastrupitve s paracetamolom: Kako učinkovita je zakonodaja v Veliki Britaniji in kaj se lahko naučimo iz tega primera? (Peterlin Mašič L, Mrhar A)	115	Svetovanje v lekarni ob izdaji izdelkov brez recepta za mladostnike (Madjar B)	237
Vloga in ugled lekarniške službe – Lekarniška služba v Sloveniji danes in leta 2019 (Čufar A)	118	Hormon stradanja fibroblastni rastni dejavnik 21 - novo zdravilo za debelost in metabolni sindrom? (Fon Tacer K)	251
Slovenski zdravstveni sistem in poraba zdravil (Kramberger B)	123	Izzivi in možni tehnološki pristopi za doseganje kinetike 0. reda sproščanja učinkovin iz ogrodnih tablet (Klančar U, Baumgartner S)	257
Ambulantno prepisovanje zdravil v Sloveniji v letu 2008 (Pečar Čad S)	125		

Izoencimi aldo/keto-reduktaz iz poddruine 1C kot tarče za razvoj zdravilnih učinkovin (Brožič P, Gobec S, Lanišnik Rižner T)	265
Tabletiranje obloženih pelet – večletne farmacevtske oblike (Ilič I, Kerč J)	271
Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija (Španinger K, Debeljak N)	279
Preventiva infekcijskega endokarditisa v zobozdravstvu (Mulej Vedlin M)	286
Antimikotiki: sedanje in nove možnosti zdravljenja glivičnih okužb (Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J)	295
Grelin - peptid, ki poveča apetit (Lunder M)	303
Dostavni peptidi in njihova uporaba (Anko M, Zorko M)	307
Sistemi s prirejenim sproščanjem na osnovi mezoporoznih ogrodij (Ukmar T, Mali G, Planinšek O)	313
Kompleksna sestava in učinki strupa medonosne čebele – od anafilaksije do toksičnosti (Černe K)	319
Pomen Heckelove analize za proučevanje kompresibilnosti zmesi za tabletiranje (Bunjevac M, Vrečer F, Ilič I, Baumgartner S)	327

Izvirni znanstveni članki

Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu (Bilač Krašnja M, Černe D)	21
Poznavanje vpliva zdravil na psihofizične sposobnosti upravljanja vozil in strojev pri slovenskih bolnikih (Pisk N)	27

Novi doktorji znanosti	34, 35, 243, 337, 338, 339, 340, 341 342
-------------------------------	--

Novice iz sveta farmacije	36
----------------------------------	----

Društvene novice	185, 191, 244, 245
-------------------------	--------------------

Osebne vesti	192
---------------------	-----

Posebna izdaja – Farmacevtska znanost v Sloveniji, Junij 2009

Farmacevtski vestnik Volumen 60 – Content

Review scientific articles

Genetics and pharmacogenetics of Gilbert's syndrome (Ostaneč B)	3
Membranes for <i>in vitro</i> dermal absorption studies (Gosenca M, Gašperlin M)	8
Emulsions stabilized by solid particles – Pickering emulsions (Teskač K, Gašperlin M)	14
Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka (Serša G)	43
Synthetic drugs in oncology (Obreza A)	48
Biological drugs (Kos J)	61
Clinical point of view on use of new drugs in cancer treatment (Borštnar S)	67

Dietary supplements in oncology (Kreft S)	73
Psihološka priprava bolnikov z rakom (Snoj Z)	77
Clinical nutrition of cancer patients (Rotovnik Kozjek N)	80
Accessibility of Slovenian patients to oncology drugs (Kos M, Obradović M)	85
National cancer screening programs (Primic – Žakelj M, Krajc M, Zadnik V)	90
Acute pain in clinical praxis (Požlep G)	95
NSAID and paracetamol: challenges and pitfalls? (Locatelli I, Tršinar M, Stepanovič A)	98
Weak opioids: between NSAIDs and morphine? (Jančar P)	105

Morphine and fentanyl: use in acute pain? (Toni J, Knez L)	110	Pharmaceutical counselling when selling OTC products for adolescents (Madjar B)	237
Paracetamol toxicity and poisoning: How effective is legislation in the United Kingdom and what could we learn from this case? (Peterlin Mašič L, Mrhar A)	115	Fasting hormone fibroblast growth factor 21 – new therapy for obesity and metabolic syndrome? (Fon Tacer K)	251
Vloga in ugled lekarniške službe – Lekarniška služba v Sloveniji danes in leta 2019 (Čufar A)	118	Challenges and technological opportunities to achieve zero order drug release from matrix tablets (Klančar U, Baumgartner S)	257
Slovenski zdravstveni sistem in poraba zdravil (Kramberger B)	123	Aldo/keto reductase isozymes of the 1C subfamily as new drug targets (Brožič P, Gobec S, Lanišnik Rižner T)	265
Out-patient prescribing of drugs in Slovenia in 2008 (Pečar Čad S)	125	Tableting of coated pellets – multiple unit dosage forms (Ilič I, Kerč J)	271
Cognitive Services in Community Pharmacy: Pharmaceutical Interventions and Medication Review (Pavšar H)	127	Erythropoietin, epoetins and detection (Španinger K, Debeljak N)	279
Patient satisfaction with pharmacy services (Horvat N, Kos M)	135	Prevention of infective endocarditis in dentistry (Mulej Vedlin M)	286
Cell therapy using regulatory T cells – cells playing the role of drugs (Švajger U, Jeras M)	143	Antimycotics: current and novel strategies for treatment of fungal infections (Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J)	295
Coenzyme Q10 as a Dietary Supplement and Drug (Žmitek J, Žmitek K)	150	Grelin - appetite enhancing peptide (Lunder M)	303
Enzymes of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily s new pharmacological targets (Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J)	159	Cell-penetrating peptides and their application (Anko M, Zorko M)	307
The regulatory role of Ca ²⁺ ions in the secretion of inflammatory mediators from mast cells (Ferjan I)	165	Controlled release drug delivery systems based on mesoporous matrices (Ukmar T, Mali G, Planinšek O)	313
Contemporary approaches to solid dispersions production with improved drug bioavailability (Planinšek O)	169	Complex composition and effects of the honeybee venom – from anaphylaxis to toxicity (Černe K)	319
Pharmacotherapy of periodontal diseases (Obermajer S)	177	The meaning of Heckel analysis for studying the compressibility of powder mixtures for tableting (Bunjevca M, Vrečer F, Ilič I, Baumgartner S)	327
Diversity and biological significance of phosphorylated derivatives of inositol (Draškovič P, Podobnik M)	195	<i>Original scientific articles</i>	
Applicability of bacterial protein aggregates in pharmaceutical industry (Jalen Š, Peternel Š, Fidler K, Jevševar S)	201	Optimization of an analytical procedure of lipoprotein lipase activity measurement in cancer tissue (Bilač Krašnja M, Černe D)	21
Medicinal products and adolescents (Pal M, Stiplovšek T)	205	Slovenian patients' knowledge of the efficacy of drugs on their capacity to drive and operate machines (Pisk N)	27
Internet, E-pharmacy services and adolescents (Kogovšek Vidmar T)	211	<i>Special Issue – Pharmaceutical Science in Slovenia, June 2009</i>	
Characteristics and different outcomes of health socialization in adolescence (Marčič R, Rus V. S, Kobal Grum D)	215		
Health indicators for adolescents (Truden Dobrin P)	223		
The usage of perscription drugs (Pečar Čad S)	226		
Use of drugs on prescription at adolescents (Abazović M)	230		

Avtorsko kazalo - index of authors

Abazović M	230	Klančar U	257	Pisk N.	27
Anko M	307	Knez L	110	Planinšek O	169, 313
Baumgartner S	257, 327	Kobal Grum D	215	Podobnik M	195
Bilač Krašnja M	21	Kogovoeč Vidmar T	211	Požlep G	95
Borštinar S	67	Kos J	61	Primic Žakelj M	90
Brožič P	265	Kos M	85, 135	Rotovnik Kozjek N	80
Brunskole M	159, 295	Krajc M	90	Rus VS	215
Bunjevac M	327	Kramberger B	123	Serša G	43
Černe D	21	Kreft S	73	Snoj Z	77
Černe K	319	Lanišnik Rižner T	159, 265, 295	Stepanovič A	98
Čufar A	118	Locatelli I	98	Stiplovšek T	205
Debeljak N	279	Lunder M	303	Stojan J	159, 295
Draškovič P	195	Madjar B	237	Španinger K	279
Ferjan I	165	Marčič R	215	Švajger U	143
Fidler K	201	Mali G	313	Teskač K	14
Fon Tacer K	251	Mrhar A	115	Toni J	110
Gašperlin M	8, 14	Mulej Vedlin M	286	Tršinar M	98
Gobec S	265	Obermajer S	177	Truden Dobrin P	223
Gosenca M	8	Obradovi M	85	Ukmar T	313
Horvat N	135	Obreza A	48	Vrečer F	327
Ilič I	271, 327	Ostanek B	3	Zadnik V	90
Jalen Š	201	Pal M	205	Zorko M	307
Jančar P	105	Pavšar H	127	Žmitek J	150
Jeras M	143	Pečar Čad S	125, 226	Žmitek K	150
Jevševar S	201	Peterlin Mašič L	115		
Kerč J	271	Peternel Š	201		

Navodila avtorjem

Spodnja poglavja podajajo pomembne informacije za avtorje. Priporočamo, da si avtorji vzamejo čas in preberejo navodila preden prispevek pošljejo v uredništvo Farmacevtskega vestnika.

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

Strokovni članki so recenzirani. Uredništvo pošlje vsak strokovni članek najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno. Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmacevtskem vestniku je zagotovljena tajnost.

Sprejem prispevka v uredništvo

Prispevek je sprejet v uredništvo, kadar v uredništvo poleg rokopisa, v elektronski obliki vloga vsebuje tudi:

1 Spremni dopis:

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni,
- telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe.

2 Izjava:

Lastnoročno podpisana izjava, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo, ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji. V primeru ponatisa slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje založbe, ki ima avtorske pravice.

Prva verzija rokopisa

Prav verzija rokopisa je poslana v uredništvo v elektronski obliki v kateri:

- avtorji niso imenovani,
- slike in preglednice so vključene v besedilo,
- obsega največ **20.000** znakov, vključno s presledki.

1 Oblika rokopisa

Naslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak naslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

Podnaslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak podnaslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

Besedilo rokopisa

Times New Roman 12 pt, navadno, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

2 Vsebina rokopisa

Rokopis naj bo sistematično strukturno urejen in razdeljena na poglavja.

Izvirni znanstveni članki naj imajo najmanj naslednja poglavja:

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Uvod,
- Materiali in metode,
- Rezultati in razprava,
- Sklep,
- Literatura.

Pregledni članki pa

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Poglavja in podpoglavja, ki si smiselno sledijo,
- Sklep,
- Literatura.

Vsako trditev

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

3 Slike, preglednice in grafikoni

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

3.1 Slike

Slike naj merijo v širino in višino največ 18 cm. Dimenzijsko naj se slika čimbolj približa dejanski velikosti v tiskani verziji. Velikost besedila na sliki pa je lahko med 8 in 12 pt. (*opomba*: največkrat v tisku naletimo na velikost črk10 pt).

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika_1, slika_2, itd).

Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk!

Vsaka slika mora biti ustrezno označena z zaporedno številko slike in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor lastnik slike. Pripadajoče besedilo se mora navajati pod sliko.

Primer:



Slika 1. Logo Slovenskega Farmacevtskega društva (1).

Figure 1. Logo of Slovenian Pharmaceutical Society (1).

Objava slik je v črno-beli tehniki, kar naj avtorji upoštevajo pri pripravi slik. Objava barvnih slik je možna samo v primeru, da avtor zagotovi pokritje dodatnih stroškov barvnega tiska.

3.2 Preglednice

Vsaka preglednica mora biti ustrezno označena z zaporedno številko preglednice in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor preglednico pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad preglednico.

Primer:

Preglednica 1. Število objav v Farmacevtskem vestniku v letu 2009 (1).

Table 1. Number of publication in Journal of Pharmaceutical Society in 2009 (1).

Tip objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

3.3 Grafikoni

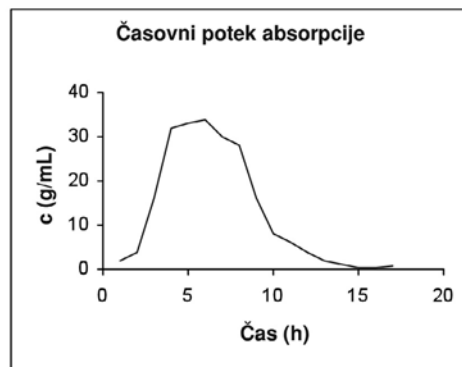
Vsaka grafikon mora biti ustrezno označen z zaporedno številko grafikona in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bil povzet, razen v primeru kadar je avtor grafikon pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad grafikonom.

Grafikoni iz Excela naj bodo uvoženi v besedilo kot »enhance metafile« z velikostjo teksta med 8 in 12 pt. Velikost pa naj ne presega v širino in višino 18 cm.

Primer:

Grafikon 1. Časovni potek absorpcije (1).

Graph 1. The time-course of absorption (1).



4 Poimenovanja in okrajšave

Poimenovanja in okrajšave je potrebno navajati skladno IUPAC, IUBMB in HUGO. Terminologijo izrazov pa tudi skladno s uveljavljenimi slovenskimi terminološkimi izrazi ter skladno s Formularium Slovenicum in SBD terminološkim slovarjem.

5 Primer navajanja literature

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

4. Slovensko Farmacevtsko Društvo. <http://www.sfd.si/>. Dostop: 10-12-2008. (avtor spletne strani. Naslov prispevka. Spletni naslov. Dostopano: datum dostopa.)

Končna verzija prispevka

Avtor strokovnega članka prejme po opravljenem recenzijem postopku obvestilo o sprejemu članka oz. navodila glede potrebnih popravkih. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva upošteval in **najkasneje dva tedna po prejetju recenzij** poslal popravljen prispevek v elektronski obliki na naslov glavne urednice.

Končna verzija rokopisa

1 Naslovna stran prispevka (prva stran rokopisa) mora vsebovati:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni
- Korespondenčnega avtorja z njegovimi kontakti

2 Rokopis (druga stran rokopisa) naj v nadaljevanju vsebuje:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev *brez z nazivov, imen in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni*, v pravilnem vrstnem redu
- Poglavlja rokopisa v vrstnem redu in obliki kot je navedeno zgoraj v katerih so razporejene slike, preglednice in grafikoni.

3 Spremljajoče slike

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika_1, slika_2, itd). Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk.

Ostali prispevki

Prispevki za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja imajo praviloma lahko največ **6.000 znakov** (vključno s presledki). Prispevki za rubriko osebne vesti ne smejo presegati **3.000 znakov** (vključno s presledki). Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubilejih, smrti ali za posebne dosežke v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v elektronski obliki korespondenčni avtorji pošljejo na naslov:

Uredništvo Farmacevtskega vestnika

Slovensko farmacevtsko društvo

Dunajska 184 A, 1000 Ljubljana

T.: 01 569 26 01, Fax: 01 569 26 02

e-pošta:

glavna urednica: urednica-fv@sfd.si

tajništvo: tajnistvo-fv@sfd.si

Korekture

Krtačne odtise prispevka je avtor dolžan natančno pregledati in označiti nujne popravke (tiskarske škrate), s katerimi ne sme posegati v vsebino prispevka. Korekture pošlje avtor v treh delovnih dneh na zgoraj navedi naslov.

Prvi avtor prejme tri izvode Farmacevtskega vestnika brezplačno. Članki so objavljeni tudi na spletnem mestu v pdf obliki.

Prreditve Slovenskega farmacevtskega društva v letu 2010

Strokovni dogodki

- Simpozij ob 35. letni skupščini SFD - Kongresni center Bernardin, 13. – 15. maj 2010
 - Satelitski simpozij - četrtek: DEPRESIJA IN ANKSIOZNOST – sodobni pristopi zdravljenja in klinična praksa
 - Plenarna tema - petek: MOTNJE PREHRANJEVANJA IN DEBELOST
 - Satelitski simpozij - sobota: GENERIČNO PREDPISOVANJE ZDRAVIL
- Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnikov - Rogla na Pohorju, 28. - 29. maj 2010
 - tema v pripravi
- Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov - Ljubljana, 10. junij 2010
 - QUALITY BY DESIGN
- Simpozij Študentske sekcije – 56. IPSF kongres - Ljubljana, 2. – 12. avgust 2010
- Simpozij sekcije farmacevtov javnih lekarn - Hotel Mons, Ljubljana, 23. september 2010,
 - STAROSTNIKI IN ZDRAVILA
- 6. Dan slovenskih lekarn, organiziran bo v ponedeljek - 27. septembra 2010
 - Tema: STAROSTNIKI IN ZDRAVILA

Družabni dogodki

FarmaSki 2010, Rogla, sobota, 30. januar 2010
Praznovanje 60-letnice SFD, Hotel Mons, četrtek, 18. marec 2010

doreta[®]

tramadol in paracetamol 37,5 mg in 325 mg
filmsko obložene tablete



Usklajeno
nad bolečino

Novo iz Krke

Doreta (tramadol & paracetamol)

Sestava Ena filmsko obložena tableta vsebuje 37,5 mg tramadolovega klorida, kar ustreza 32,34 mg tramadola, in 325 mg paracetamola. **Indikacija** Simptomatsko zdravljenje srednje močnih do močnih bolečin. **Odmerjanje in način uporabe** Odrasli in mladoletniki (12 let in starejši) Odmerek je treba individualno prilagoditi glede na jakost bolečine in bolnikovo odziv. Kot začeta odmerka se priporočata 2 tableti Doreta. Po potrebi bolnik lahko vzame dodatni odmerek, vendar ne več kot 8 tablet na dan. Med posameznimi odmerki naj ne mine manj kot šest ur. Odraci Pri otrocih, mlajših od 12 let, učinkovitost in varnost uporabe Doreta ni bila dokazana, zato zdravljenja z njo ne priporočamo. **Kontraindikacije** Preobčutljivost za zdravilni učinkovini ali katerikoli pomožni snov. Akutna zastrupitev z alkoholom; trisaviti, centralno delujoči analgetiki, opioidi ali psihotropni zdravili. Doreta ne smejo jemati bolniki, ki jemljejo zaviralce monoaminooksidaze (MAO) ali pa so jih prenehali jemati pred manj kot dvema tednoma. Huda jetrna okvara. Nežadnoalno zdravljenje epilepsije. **Previdnostni ukrepi** Doreta moramo uporabljati previdno pri bolnikih, odvisnih od opioidov, bolnikih s poškodovanim glasom, bolnikih, ki so nagnjeni h konvulzivnim motnjam, bolnikih z motnjami delovanja ledvičnega trakta, bolnikih v koku, bolnikih z motnjami žilnega sistema ali hipertenzije, z okvarami dihalnega centra ali dihalne funkcije ter pri bolnikih z zvišanim intrakranialnim tlakom. **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili in druge oblike interakcij** Odsvetujemo prijeto alkohola, posebno jemanje s karbamazepinom in drugimi encimskimi induktorji, z opioidnimi agonisti in antagonistmi (buprenorfinom, naltrexonom, pentazocinom). Interakcije lahko nastopijo pri sočasni

jemanju Doreta s serotoninergičnimi zdravili, z drugimi zaviralci osrednjega živčevja, z varfarinom podobnimi snovmi, z drugimi zdravili, ki zavirajo CYP3A4, in z zdravili, ki znižujejo prag za nastanek krčev. **Nosečnost in dojenje** Doreta vsebuje filmsko kombinacijo zdravilnih učinkovin, tudi tramadola, zato naj je ne bi jemale nosečnice in matere, ki dojajo. **Preveliko odmerjanje** Pri prevelikem odmerjanju se lahko pojavijo znaki in simptomi zastrupitve s tramadolom ali paracetamolom oziroma z obema zdravilnima učinkovinama. **Posebno opozorilo** Največji odmerki pri odraslih in mladoletnikih; starejših od 12 let, naj ne presežejo 8 tablet zdravila Doreta na dan. Da ne bi prišlo do nesamernega prevelikga odmerjanja, je treba bolnika opozoriti, naj ne presežejo priporočenega odmerka in naj brez posvetovanja z zdravnikom sočasno ne jemljejo nobenega drugega zdravila, ki vsebuje paracetamol/alkoholno z zdravili, ki se dobijo brez recepta ali tramadolovega klorida. **Neželeni učinki** Najpogostejše neželeni učinki, ki so se pojavili pri kliničnih preskušanjih, opravljenih s kombinacijo paracetamola in tramadola, so bili navzea, omotica in zaspanost. Pogosto se lahko pojavijo glavobol, tresenje, zmedenost, spremembe razpoloženja (anksioznost, nervoznost, ekforija), motnje spanja, prebavna motnja (bruhanje, zaprtje, suha usta, driska), bolečine v trebuhu, dispepsija, flatulenca, potenje in srbočica. **Način izdajanja** Zdravilo se izdaja samo na recept. **Oprema** 20 filmsko obloženih tablet. **Datum priprave besedila** December 2009.

KRKA

Svojo inovativnost in znanje posvečamo zdravju. Zato odločnost, vztrajnost in izkušnje usmerjamo k enemu samemu cilju – razvoju učinkovitih in varnih izdelkov vrhunske kakovosti.