Farm Vestn 2008; 59: 1-40
UDK 615 CODEN FMVTA, SLO ISSN 0014-8229

Farmacevtski vestnik

1

Š T 1 · M A R E C 2 0 0 8 · L E T N I K 5 9

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veledrogerija 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 lekarne 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 prihodnje!

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si

KEMOFARMACIJA

Farmacevtski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T. 1 • M A R E C 2 0 0 8 • L E T N I K 5 9

Odgovorni urednik
Borut Štrukelj

Častni glavni urednik
Aleš Krbavčič

Glavna urednica
Andrijana Tivadar

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

Izdajateljski svet
Stane Srčič
Simona Cencelj
Boštjan Debelak
Mirjana Gašperlin
Lili Grosek
Mirjam Hočevar Korošec
Anamarija Zega

Naslov uredništva / Adress of the Editorial Office:
Slovensko farmacevtsko društvo,
Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01
Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:
02010-0016686585.
Izhaja šestkrat letno.
Letna naročnina je 70 EUR.
Za tuje naročnike 100 US$.
Avtor fotografije na naslovnici, Maj Klemenčič
Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM
Naklada: 3.200 izvodov
Farmacevtski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 6 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US$ 100.
Farmacevtski vestnik is regulary abstracted in: BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica
Letnik 2008 sofinancira
Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.

UVODNIK

Prvo številko Farmacevtskega vestnika v letu 2008 sestavljajo štirje pregledni članki in izviren znanstveni prispevek. Pregledni članek dr. Nataše Karas Kuželički opozarja na evolucijsko napako v genu za laktazo, ki je sicer olajšala preživetje predvsem beli človeški rasi, povečala pa tveganje za razvoj nekaterih z galaktozo povezanih bolezni. V članku o sekretornih fosfolipazah avtorja opisujeta možne tarče in razvoj učinkovin, ki bi temeljile na zaviranju prekomernega delovanja nekaterih fosfolipaz. Doc.dr. Obreza v članku o molibdenu ugotavlja, da tega sicer pomembnega mikroelementa ni potrebno nadomeščati v obliki prehranskih dopolnil, saj ga dovolj zaužijemo s hrano. Sledi pregledni članek o razvoju novih antimikotikov, ki bi specifično zavirali glivne encime, vpletene v biosintezo pigmenta melanina in izvirno znanstveno delo avtorjev dr. Kravosa in doc.dr. Malešiča o hiperprolaktinemiji, ki je pogosto prisotna pri uporabi antipsihotikov. Zaključek njunih znanstvenih rezultatov je ugotovitev, da novejše atipične antipsihotične učinkovine zmanjšujejo pogostnost zapleta primerjalno s starejšimi, atipičnimi antipsihotiki. Odmevnost nekaterih znanstvenih in inovativnih dosežkov farmacevtov predstavljamo v rubriki »Zanimivosti iz stroke«. Še posebej smo ponosni na izjemen uspeh študentov univerzitetnega študija farmacije, saj so v zadnjih nekaj letih študentje ljubljanske Fakultete za farmacijo redno prejemniki najvišje univerzitetne Prešernove nagrade za študente, kar izpričuje visoko kakovost del in študentov. Letos sta dobitnika kar dva: Petra Ekar in Matevž Prijatelj. Ali zna slovenska farmacevtska stroka uporabiti odličnost študentov za dobrobit slovenske farmacije, ko se le-ti zaposlijo? Ali znamo izkoristiti vse nakopičeno znanje in sposobnosti, ki jih mladi strokovnjaki na področju farmacije osvojijo? Izkušnje kažejo, da bistveno manj, kot bi lahko in predvsem bistveno manj, kot ti perspektivni kadri od nas pričakujejo. Dajmo jim priložnost, slovenska farmacija bo s tem še močnejša.

Prof.dr. Borut Štrukelj

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Scientific review articles

Nataša Karas Kuželički
Toksični vidiki galaktoze – je mleko res zdrava hrana v vseh življenjskih obdobjih ?
Galactose toxicity – is milk a healthy food for all age groups? **3**

Borut Jerman, Jože Pungerčar
Sekretorne fosfolipaze A_2 in njihova (pato)fiziološka vloga
Secretory phospholipase A_2 enzymes and their (patho)physiological role **9**

Aleš Obreza
Molibden kot pomemben element v sledovih
Molybdenum as important trace element **16**

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan
Encimi vključeni v biosintezo glivnega melanina – potencialne tarče za razvoj novih antimikotikov
Enzymes involved in fungal melanin biosynthesis – potential targets for the development of new antimicotic drugs **21**

Raziskovalni članek – Research article

Matej Kravos, Ivan Malešič
Hiperprolaktinemija pri antipsihotični terapiji
Hyperprolactinemia in antipsychotic therapy **27**

Zanimivosti iz stroke

Novice iz sveta farmacije **34**

1. seminar Društva za laboratorijsko medicino **36**

Prof. dr. Borut Štrukelj – prejemnik Zoisovega priznanja za pomembne dosežke na področju farmacevtske biotehnologije **37**

Prejemnika Univerzitetne Prešernove nagrade – Matevž Prijatelj in Petra Ekar **37**

Izr. prof. dr. Janez Kerč – prejemnik Novartisove globalne nagrade za raziskave – VIVA **38**

Osebne vesti **39**

Toksični vidiki galaktoze – je mleko res zdrava hrana v vseh življenjskih obdobjih?

Galactose toxicity – is milk a healthy food for all age groups?

Nataša Karas Kuželički

Povzetek: Čeprav predstavlja mleko v populacijah belcev pomemben vir proteinov in kalcija, se pogosto pozablja, da je uživanje mleka v odrasli dobi globalno dokaj neobičajen pojav. Pri večini sesalcev pride v odrasli dobi do zmanjšanja aktivnosti encima laktaze, ki cepi laktozo do galaktoze in glukoze ter tako omogoča njuno absorpcijo v kri. Osebe z delnimi okvarami v presnovi galaktoze in hkratno visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi bi ob povečanem uživanju mleka lahko imele večje tveganje za razvoj nekaterih obolenj povezanih z galaktozno toksičnostjo, kot sta siva mrena in rak jajčnikov.

Ključne besede: *mleko, galaktoza, laktoza, katarakte, rak jajčnikov*

Abstract: Milk is an important source of proteins and calcium in most Caucasian populations. However, the ability of milk ingestion in adults is quite an unusual occurrence, globally. In most mammals the activity of lactase decreases drastically after childhood. Subjects with partial galactose metabolism disruptions and high lactase activity in adult period, could be at the increased risk of some galactose toxicity related conditions such as cataract and ovarian cancer, especially if their milk ingestion is high.

Key words: *milk, galactose, lactose, cataracts, ovarian cancer*

1 Uvod

Mleko že desetletja velja za dragocen vir proteinov in kalcija, pogosto pa se pozablja, da je uživanje mleka v odrasli dobi dokaj neobičajen pojav v živalskem svetu. Večina odraslih sesalcev ni zmožna prebaviti glavnega mlečnega sladkorja laktoze, izjema so nekatere človeške populacije, predvsem belci. Kljub temu da je mleko bogat vir kalcija in proteinov, se je v evoluciji ohranil mehanizem izklopa gena za laktazo pri odraslih sesalcih, visoka aktivnost laktaze v nekaterih človeških populacijah pa je posledica razmeroma nedavne mutacije v regulatorni regiji gena. Omenjena mutacija je izboljšala možnosti preživetja v živinorejskih skupnostih v obdobjih pomanjkanja hrane, vendar se postavlja vprašanje ali so osebe z visoko aktivnostjo laktaze bolj izpostavljene morebitnim škodljivim vplivom galaktoze, kar lahko vodi v nastanek obolenj v kasnejšem življenjskem obdobju.

2 Galaktoza

Galaktoza je aldozni monosaharid s šestimi ogljikovimi atomi. Skupaj z glukozo tvori disaharid laktozo, ki je prevladujoč ogljikov hidrat v mleku sesalcev. Galaktoza se v Leloirjevem ciklu lahko pretvori v glukozo. Študije na psih in miših so pokazale, da je galaktoza mogoče prednostni vir energije pri novorojenih sesalcih, saj se lažje vgrajuje v glikogen kot glukoza (1).

Galaktoza je sestavni del kompleksnih polisaharidov, ki so del glikoproteinov in glikolipidov. Glikoproteini v telesu nastopajo kot imunološki elementi, encimi, hormoni in sestavni deli celične membrane. Glikolipidi so pomembni strukturni elementi centralnega živčnega sistema kot sestavni deli mielina in sive snovi v možganih (2). Mleko in mlečni izdelki so glavni vir galaktoze v običajni prehrani. Laktozo v prebavnem traktu cepi encim laktaza. Človeško mleko ima zelo visoko vsebnost galaktoze (350mg/100ml), kravje pa je vsebuje nekoliko manj (227mg/100ml). Vsebnost galaktoze v sirih je manjša kot v mleku in se s staranjem sira zmanjšuje (95mg/100g po 15 dneh, 70mg/100g po 30 dneh in 43mg/100g po 78 dneh). Vsebnost proste galaktoze je velika v jogurtu, ker bakterijske kulture, ki so v njem prisotne, cepijo laktozo do galaktoze in glukoze (3).

3 Presnova galaktoze

Sistem za presnovo galaktoze predstavlja Leloirjev cikel, ki je povezan s presnovo glukoze in drugih ogljikovih hidratov, kot tudi s sintezo glikolipidov in glikoproteinov. Glavni encimi Leloirjevega cikla so galaktokinaza (GALK), galaktoza-1-fosfat-uridiltransferaza (GALT) in UDP-galaktoza-4`-epimeraza (GALE), sodeluje pa tudi encim UDP-glukoza pirofosforilaza (UGP) (Slika1). Odsotnost ali zmanjšanje aktivnosti kateregakoli izmed treh glavnih encimov Leloirjevega cikla (GALK, GALT, GALE) povzroči prirojeno presnovno motnjo galaktozemijo.

Prvi korak v presnovi galaktoze je fosforilacija galaktoze do galaktoza-1-fosfata ob prisotnosti GALK. Sledi premik uridilne skupine iz UDP-

dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm., Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

glukoze na galaktozo-1-fosfat ob prisotnosti GALT. Pri tem nastaneta UDP-galaktoza in glukoza-1-fosfat. Za vzdrževanje Leloirjevega cikla je nujno potrebna regeneracija UDP-glukoze. Epimerizacijo UDP-galaktoze v UDP-glukozo katalizira GALE. UDP-glukoza se lahko regenerira tudi v reakciji, ki jo katalizira UGP. Pri GALT-reakciji nastala glukoza-1-fosfat se pretvori v glukozo-6-fosfat, ki se vključi v glikolizo. Encim UDP-galaktoza-galaktoziltransferaza (UGGT) vgrajuje pri GALT-reakciji nastalo UDP-galaktozo v kompleksne polisaharide, ki sestavljajo glikolipide in glikoproteine (4).

Pri okvari katerega izmed treh encimov Leloirjevega cikla stopijo v ospredje alternativne presnovne poti, ki normalno niso prisotne ali pa potekajo le v manjši meri. Nakopičena galaktoza se reducira do galaktitola ob prisotnosti aldozne reduktaze (AR). Galaktitol je toksični presnovek galaktoze, ki je odgovoren za zaplete pri galaktozemiji, predvsem za nastanek katarakt. Toksični učinki galaktitola se najbolj izražajo v tkivih z visoko vsebnostjo AR (leče, Schwannove celice perifernih živcev in ledvice) (4). Druga alternativna pot za presnovo galaktoze je oksidacija do galaktonata ob prisotnosti galaktoza dehidrogenaze (GD). Produkti te presnovne poti niso toksični, zato imajo bolniki z galaktozemijo, ki imajo povečano sposobnost oksidacije galaktoze, manj izražene simptome bolezni in boljšo dolgoročno prognozo kar se tiče poznih zapletov (1, 4).

4 Galaktozemije

Fenotipi, v katerih se ta motnja izraža, so lahko zelo različni in so odvisni od tega, kateri izmed encimov je okvarjen in v kolikšni meri. Najpogostejše in najbolj raziskane so okvare GALT, okvare GALK in GALE pa so veliko redkejše in se pojavljajo v večji meri samo v izoliranih etničnih skupinah in posameznih družinah (4). Pri vseh vrstah galaktozemij je onemogočena ali zmanjšana presnova galaktoze, kar ima za posledico kopičenje le-te v različnih tkivih. Zaradi kopičenja galaktoze in njenih presnovkov (galaktitol, galaktoza-1-fosfat) ter zaradi pomanjkanja nekaterih galaktoznih presnovkov (UDP-galaktoza) v tkivih pride do kliničnih znakov značilnih za galaktozemije (4).

Slika 1: Presnova galaktoze v telesu.
Figure 1: Galactose metabolism.

4.1 Galaktozemija zaradi okvare GALT

Okvara GALT je najpogostejši in najbolj raziskan vzrok za galaktozemijo. Obstajata dve glavni vrsti galaktozemij zaradi okvare GALT.

Klasična galaktozemija je najbolj nevarna in je v večini primerov smrtna, če je ne odkrijemo v nekaj tednih po rojstvu in uvedemo brezgalaktozno dieto. Gre za popolno pomanjkanje aktivnosti GALT, v glavnem zaradi mutacij Q188R in K285N. Pri homozigotih za klasično galaktozemijo je aktivnost GALT praktično nezaznavna, medtem ko pri heterozigotih doseže 50% normalne aktivnosti. Pogostost klasične galaktozemije naj bi bila 1 : 62 000, vendar so razlike med rasami dokaj velike. Prvi klinični opis galaktozemije je dal Goppert leta 1917. Homozigoti za klasično galaktozemijo so ob rojstvu videti normalni, vendar že po nekaj dneh uživanja mleka (galaktoze) pride do jasnih simptomov kot so bruhanje, driska, zlatenica, hepatomegalija, upočasnjena rast in razvoj, poškodba ledvic in katarakte (5). Če nadaljujemo z vnosom galaktoze, skoraj v vseh primerih nastopi smrt, preživeli bolniki pa so hudo mentalno zaostali. Tudi galaktozemiki, ki so od rojstva na brezgalaktozni dieti, imajo v večini primerov dolgoročne zaplete: nizek IQ, motnje govora, katarakte in odpoved jajčnikov (hipergonadotropni hipogonadizem). Mena nastopi pri ženskah s klasično galaktozemijo v večini primerov že v zgodnjih dvajsetih letih ali že prej (5). Heterozigoti za klasično galaktozemijo so ob rojstvu asimptomatični, vendar se pri njih bolj pogosto pojavlja zgodnja mena in idiopatske presenilne katarakte, čeprav te povezave še niso popolnoma dokazane.

Katarakte nastanejo zaradi kopičenja galaktitola v lečah, kot posledica delovanja aldozne reduktaze (1). Glavni vzrok poškodbe leč je osmotsko delovanje galaktitola, kar vodi v kopičenje vode v celicah in spremembo prepustnosti celičnih membran (6). Poleg osmotske poškodbe igra pomembno vlogo tudi oksidativni stres zaradi nastanka reaktivnih kisikovih radikalov pri avtooksidaciji nakopičene galaktoze. Kisikovi radikali poškodujejo lečne proteine in povzročajo njihovo agregacijo kar povzroči zamotnitev leče (6, 7). Zamotnitev leče povzroča tudi galaktozilacija proteinov v leči (7).

Hipergonadotropni hipogonadizem se kaže kot zakasnitev v razvoju sekundarnih spolnih znakov, primarna ali sekundarna amenoreja, povišane koncentracije FSH in LH ter znižane koncentracije estrogenov. Ta zaplet se pojavlja pri 70 – 80% galaktozemičnih žensk (8). Do okvare in atrofije jajčnikov verjetno pride zaradi napačne oz. nezadostne galaktozilacije FSH, kar je posledica pomanjkanja UDP-galaktoze. Nepravilne izoforme FSH, se vežejo na receptorje v jajčnikih, vendar ne izzovejo želenega učinka (zorenje folikla), ampak delujejo antagonistično in povzročajo atrofijo jajčnika (1, 2).

Pri homozigotih za klasično galaktozemijo je nujna doživljenjska brezgalaktozna dieta. Za galaktozemike nesprejemljiva živila so: vse vrste mleka, maslo, sir, jogurt, smetana, mlečna čokolada, sladoled, drobovina, stročnice ter nekatere vrste sadja in zelenjave (9). Za galaktozemične novorojenčke so na voljo mleku podobni pripravki, ki ne vsebujejo galaktoze. To so lahko kazeinski hidrolizati ali sojini

proteinski izolati (9). Veliko zdravil vsebuje laktozo kot pomožno snov, na kar je treba biti pozoren predvsem pri dolgotrajnem jemanju nekega zdravila (9). Čeprav se stroga brezgalaktozna dieta priporoča do konca življenja, so nekateri avtorji mnenja, da zmerne količine galaktoze v hrani po tretjem letu ne vplivajo bistveno na dolgoročne zaplete pri galaktozemiji. Prav tako naj izključitev galaktoze iz prehrane noseče matere ne bi vplivala na izid pri galaktozemičnem fetusu (9).

Pri **galaktozemiji Duarte** ponavadi ni simptomov v neonatalni dobi, lahko pa se pojavijo dolgoročne posledice v odrasli dobi (npr. okvare jajčnikov). Gre za delno pomanjkanje aktivnosti GALT. Obstajata dve varianti galaktozemije Duarte: Duarte 2, za katero je značilna znižana aktivnost GALT in Duarte 1 (Los Angeles), pri kateri je aktivnost GALT normalna ali povišana. Homozigoti za galaktozemijo Duarte 2 imajo 50% encimske aktivnosti, heterozigoti pa 75%. Homozigoti za varianto Los Angeles (LA) imajo 110-130% normalne aktivnosti GALT, medtem ko imajo heterozigoti ponavadi normalno aktivnost (10). Za varianto Duarte 2 so poleg N314D mutacije značilne še tri intronske mutacije (IVS4nt-27g>c, IVS5nt+26g>a in IVS5nt-24g>a) in delecija štirih nukleotidov v 5` promotorski regiji, 119 nukleotidov navzgor od začetnega kodona (-119/-116delGTCA). Pri varianti Duarte 1 ali Los Angeles je poleg N314D mutacije v cis položaju prisotna še tiha mutacija L218L. Galaktozemija Duarte je v primerjavi s klasično veliko bolj pogosta. Alelska frekvenca za alele Duarte je v populacijah belcev okrog 8%, kar pomeni, da je približno 15% ljudi heterozigotov za galaktozemijo Duarte (11). Pri belcih je varianta Duarte 2 (AF=6%), bolj pogosta kot Duarte 1 (AF=2,8%) (11). Pri črni rasi je galaktozemija Duarte dosti manj pogosta (AF=2,7%), pri čemer sta varianti Duarte 2 in 1 približno enako pogosti. Še bolj redka je galaktozemija Duarte pri Azijcih (AF=1,75%), razmerje med varianto Duarte 2 in 1 pa je podobno kot pri belcih (11). Homozigoti in heterozigoti za galaktozemijo Duarte 2 so ob rojstvu asimptomatični. Brezgalaktozna dieta pri teh pacientih ni potrebna. Kljub benignosti galaktozemije Duarte v neonatalnem obdobju pri teh pacientih obstaja večja verjetnost pojava ovarijskega karcinoma v odrasli dobi. Povezava z endometriozo in idiopatsko presenilno katarakto pa je še nejasna. Kombinirani heterozigoti za obliko Duarte 2 in klasično galaktozemijo imajo 25% encimske aktivnosti in so ponavadi brez simptomov. Vendar so v nekaterih primerih takoj po rojstvu prisotni milejši simptomi klasične galaktozemije in v krvi lahko zaznamo povišano koncentracijo galaktoze-1-fosfata. Ponavadi so ti pacienti na dieti samo eno leto, nekateri pa se odločijo za doživljenjsko dieto. Glede potrebnosti brezgalaktozne diete pri teh pacientih si mnenja strokovnjakov nasprotujejo.

4.2 Galaktozemija zaradi okvare GALK

Okvare GALK so veliko bolj redke kot okvare GALT. V večini primerov so edini klinični znak katarakte. Odvisno od vrste okvare v GALK genu se katarakte lahko pojavijo v različnih življenjskih obdobjih; od najzgodnejšega otroštva do odrasle dobe (12).

Pri **popolni odsotnosti aktivnosti galaktokinaze** se pri homozigotih katarakte pojavijo že zelo zgodaj v otroštvu ali kmalu po rojstvu. Če pravočasno uvedemo brezgalaktozno dieto, katarakte izginejo. Domnevajo, da so heterozigoti bolj nagnjeni k razvoju katarakt v odrasli dobi. Katarakte nastanejo zaradi kopičenja galaktitola v lečah, ki nastane iz galaktoze, ki je substrat ustavljene GALK-reakcije. Redek zaplet pri popolni odsotnosti GALK je psevdotumor cerebri (12), ki prav tako nastane zaradi kopičenja galaktitola in s tem vode v možganskem tkivu. Nekateri povezujejo okvaro GALK tudi z mentalno retardacijo (12), vendar ta povezava ni dokazana (12). Popolna odsotnost GALK je v svetovnem merilu zelo redka (1 : 1 000 000), je pa dokaj pogosta pri nekaterih genetsko izoliranih etničnih skupinah kot so Romi (12). Mutacija P28T je najpogostejša mutacija, ki povzroča popolno odsotnost GALK. Omejena je skoraj samo na romsko populacijo. Najbolj pogosta je med bolgarskimi Romi, kjer je pogostost homozigotov od 1 : 1.600 do 1 : 2.500, frekvenca prenašalcev pa je 5% (108). Skupna incidenca homozigotov pri evropskih Romih je 1 : 10.000 ter incidenca heterozigotov 1 : 47 (12). Mutacijo P28T so našli tudi v petih begunskih družinah iz Bosne; dve družini sta imeli znano romsko poreklo (12).

Varianta Osaka (mutacija A198V) je delna okvara GALK. Pri homozigotih za to varianto je ohranjene 20% encimske aktivnosti. Alelska frekvenca za alel Osaka je najvišja na japonskem (4,1%). Pri belcih in črncih te variante niso našli. Za razliko od popolnega pomanjkanja GALK, se pri varianti Osaka katarakte pojavijo šele v odrasli dobi (12).

Varianta Philadelphia je prav tako delno pomanjkanje GALK; ohranjeno je 70% encimske aktivnosti. Ta varianta je zelo pogosta pri črncih, pri drugih rasah je niso našli. Zanimivo je, da je aktivnost GALK znižana samo v eritrocitih. Mutacije za to varianto še niso odkrili, domnevajo pa, da gre za spremembo v regulatornem območju gena (12).

5 Drugi dejavniki, ki vplivajo na količino galaktoze v tkivih

Poleg aktivnosti encimov Leloirjevega cikla na količino galaktoze v celicah vpliva tudi vnos galaktoze s hrano, predvsem z mlekom in mlečnimi izdelki v obliki laktoze. Tudi aktivnost laktaze, ki v sluznici tankega črevesa cepi laktozo do glukoze in galaktoze in tako omogoči njuno absorpcijo v kri, bi lahko imela pomemben vpliv na končno koncentracijo galaktoze v tkivih. Ker je laktaza pri odraslih sesalcih normalno neaktivna oz. malo aktivna, naj bi bili laktazno persistentni ljudje izpostavljeni večjim količinam galaktoze kot osebe z nizko aktivnostjo laktaze. Normalno imajo sesalci v neonatalnem obdobju visoko aktivnost laktaze, ki pri odraslih sesalcih močno upade. Ta obrazec velja tudi za večino ljudi, vendar nekateri ljudje ohranijo visoko aktivnost laktaze tudi v odrasli dobi. Velik delež takih oseb so opazili v populacijah, ki se intenzivno ukvarjajo z živinorejo (Severna Evropa, Subsaharska Afrika) in je bila sposobnost prebavljanja mleka v odrasli dobi ključnega pomena za preživetje v obdobjih pomanjkanja drugih virov hrane. Čeprav je zmožnost prebavljanja mleka v odrasli dobi očitno predstavljala evolucijsko prednost, pa je vprašljivo, kako uživanje mleka vpliva na pojav obolenj, ki se pojavljajo v poznejšem življenjskem obdobju in torej nimajo vpliva na evolucijski izbor.

6 Motnje v presnovi galaktoze in pojav poznih zapletov v odrasli dobi

Bolezenski stanji v odrasli dobi, ki ju najpogosteje povezujejo z galaktozo, sta siva mrena in rak jajčnikov.

Obe motnji naj bi bili bolj pogosti pri delnih okvarah encima GALT, katerih posledica je benigen fenotip v otroštvu in mladosti, vendar večje tveganje za razvoj bolezni v odrasli dobi. Eden izmed simptomov klasične galaktozemije je nastanek katarakt takoj po rojstvu ali v otroštvu. Katarakte lahko nastanejo pri homozigotih za klasično galaktozemijo v kateremkoli življenjskem obdobju, če se pacienti ne držijo striktno brezgalaktozne diete (13). Zanimiva je ugotovitev, da so zamotnitve očesne leče zelo pogoste tudi pri starših teh pacientov, ki so obligatni heterozigoti za klasično galaktozemijo (13). Te zamotnitve se pojavijo pozneje kot pri homozigotih, ponavadi v odrasli dobi. Ob tem se seveda postavlja vprašanje, ali tudi pogoste manjše okvare GALT lahko povečajo tveganje za nastanek idiopatskih presenilnih katarakt. Kar nekaj študij je že dokazalo povezavo med presenilno katarakto in znižano aktivnostjo GALT pri osebah brez znakov galaktozemije (14, 15, 16, 17, 18, 19).

Zgodnja odpoved jajčnikov je prisotna skoraj pri vseh ženskah s klasično galaktozemijo, vendar obstajajo dokazi, da imajo tudi sicer asimptomatične osebe z delno odsotnostjo encima GALT (heterozigoti za klasično galaktozemijo, galaktozemija Duarte) povečano tveganje za prezgodnji pojav menopavze (20). Ugotovili so tudi, da imajo ženske z rakom jajčnikov v povprečju nižjo aktivnost GALT, kot zdrave ženske v kontrolni skupini (21), dokazana pa je bila tudi povezava med mutacijami za galaktozemijo Duarte in večjim tveganjem za ovarijski karcinom (22, 23, 24). Zanimivo je, da dieta, ki vsebuje 50% galaktoze, pri miših povzroča ovulatorno disfunkcijo zaradi uničenja foliklov (25), medtem ko omenjena dieta pri brejih miših povzroči zmanjšano število oocitov pri fetusih ženskega spola (26).

Čeprav je pri homozigotih za GALK galaktozemijo katarakta glavni simptom, še vedno ni jasno, ali tudi delne okvare GALK lahko povzročijo nastanek sive mrene. Podatki o vplivu delnega pomanjkanja GALK na razvoj presenilnih katarakt so si namreč nasprotujoči. Nekatere študije niso odkrile povezave med znižano aktivnostjo GALK in kataraktami (14, 16), druge pa so to povezavo potrdile (17, 19, 27, 28). Do takih rezultatov je verjetno prišlo zaradi izredne redkosti okvar GALK v splošni populaciji. Verjetno bi bilo možno pozitivno povezavo dokazati samo v tistih populacijah, kjer so okvare GALK pogostejše kot v splošni svetovni populaciji, kot lahko vidimo na primeru japonske (27) in romske (28) populacije.

Ker je laktaza pri odraslih sesalcih normalno neaktivna oz. malo aktivna, naj bi bili laktazno persistentni ljudje izpostavljeni večjim količinam galaktoze, kot osebe z nizko aktivnostjo laktaze. Ena študija je ugotovila povezavo med visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi in večjim tveganjem za katarakte (29). Dve študiji pa sta potrdili povezanost laktazne persistence z rakom jajčnikov (30, 31). Zanimivo je, da so ugotovili tudi večjo pogostost laktazno persistentnih oseb v skupini bolnikov z diabetesom tipa I in II, kar je posledica večje izpostavljenosti glukozi. Vse to kaže na škodljive posledice visoke aktivnosti laktaze v odrasli dobi, verjetno zaradi povečane izpostavljenosti sladkorjem galaktozi in glukozi.

Možnost, da bi bilo lahko uživanje večjih količin laktoze povezano z večjim tveganjem za rak jajčnikov, je prvi predstavil Cramer s sodelavci. V študiji, ki je obsegala 27 držav, so ugotovili, da je incidenca raka jajčnikov odvisna od količine zaužitega mleka na prebivalca in aktivnosti laktaze (30). Sočasno so poročali tudi o povezanosti pogostega uživanja jogurta in skute, ki vsebujta veliko več proste galaktoze kot mleko, s povečanim tveganjem za rak jajčnikov (21). Ker so zgodnejše študije dokazale povezavo med rakom jajčnikom in polnomastnim mlekom, vendar ne z mlekom z manj maščobe (32), dolgo ni bilo jasno ali je za nastanek karcinoma odgovorna galaktoza ali pa gre za vpliv maščobe. V prospektivni deset let trajajoči študiji, ki je vključevala 29.083 postmenopavznih žensk (33), so ugotovili povezavo z rakom jajčnikov samo za mleko z manj maščobe. V tej populaciji žensk je bilo uživanje manj mastnega mleka veliko bolj pogosto (80%) kot uživanje polnomastnega. Vendar moramo biti pri interpretaciji omenjenih rezultatov previdni, saj številne študije niso ugotovile nobene povezave med uživanjem laktoze in rakom jajčnikov (22, 34, 35, 36, 37, 38, 39). Zanimivo je, da so 3 izmed navedenih študij preučevale populacije v katerih je pogostost visoke aktivnosti laktaze pri odraslih razmeroma nizka: Italija (37) 26%, Japonska (38) 10% in Kitajska (39) 6%. Populacije s povprečno nizko aktivnostjo laktaze pri odraslih bi bile lahko zaščitene pred škodljivimi vplivi galaktoze, zaradi manjše razgradnje laktoze v prebavnem traktu in posledično manjše absorpcije galaktoze v kri.

7 Sklep

Siva mrena je globalno gledano še vedno glavni vzrok slepote. Ocenjujejo, da je trenutno na svetu zaradi sive mrene na obeh očesih slepih 17 milijonov ljudi. Rak jajčnikov ima najvišjo stopnjo smrtnosti in je na tretjem mestu po pogostosti med ginekološkimi raki (33). Določen delež omenjenih bolezenskih stanj bi lahko preprečili s presejevanjem prebivalstva na endogene dejavnike, ki lahko vplivajo na količino galaktoze v tkivih, kot so aktivnost encimov Leloirjevega cikla in aktivnost laktaze. Z omejevanjem vnosa laktoze in galaktoze pri osebah z ugotovljenim povečanim tveganjem bi lahko zmanjšali incidenco raka jajčnikov in sive mrene ali vsaj premaknili pojavnost teh obolenj v poznejše življenjsko obdobje. Pomen mutacij v genu za GALT ni zanemarljivega pomena v slovenski populaciji, saj je približno 15% prebivalstva heterozigotov za galaktozemijo Duarte oz. 11% za galaktozemijo Duarte 2 (40). V slovenski populaciji je že bila dokazana povezava med heterozigotnostjo za klasično galaktozemijo in večjim tveganjem za sivo mreno (41). Mutacije v genu za GALK so v Sloveniji verjetno redke, vendar ne smemo pozabiti na razmeroma veliko romsko populacijo, v kateri bi lahko mutacije v tem genu predstavljale pomemben dejavnik tveganja za sivo mreno. Še večji epidemiološki pomen za nastanek sive mrene oz. raka jajčnikov bi lahko imela aktivnost laktaze v odrasli dobi. V Sloveniji kar 66% odraslih ohrani sposobnost prebave laktoze (42), kar bi ob povečanem vnosu laktoze in/ali zmanjšani aktivnosti katerega izmed encimov Leloirjevega cikla lahko povečalo tveganje za okvare očesnih leč in jajčnikov. Najbolj rizično subpopulacijo bi torej predstavljale osebe z delnimi okvarami GALT in hkratno visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. Čeprav mleko že desetletja velja za zdravo hrano v vseh življenjskih obdobjih, se je v luči teh podatkov potrebno vprašati, ali je mleko res koristno za vsakogar izmed nas.

8 Literatura

1. Leslie ND. Insights into the pathogenesis of galactosemia. Annu Rev Nutr 2003; 23: 59-80.
2. Petry KG, Reichardt JKV. The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. TIG 1998; 14(3): 98-102.

2. Petry KG, Reichardt JKV. The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. TIG 1998; 14(3): 98-102.
3. Acosta PB, Gross KC. Hidden sources of galactose in the environment. Eur J Pediatr 1995; 154(Suppl 2): S87-S92.
4. Disorders of galactose metabolism. In: Stanbury. The metabolic basis of inherited disease. 5th ed. McGraw-Hill, 1983: 167-185.
5. OMIM#230400. On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM.
6. Ohta Y, Yamasaki T, Niwa T et al. Cataract development in 12-month-old rats fed 25% galactose diet and its relation to osmotic stress and oxidative damage. Ophthalmic Res 1999; 31: 321-331.
7. Devamanoharan PS, Ali AH, Varma SD. Non-enzymatic glycation of lens proteins and haemoglobin-inhibition by pyruvate: an in-vivo study. Diabetes, Obesity and Metabolism 1999; 1: 159-164.
8. Guerrero NV, Singh RH, Manatunga A et al. Risk factorsnfor premature ovarian failure in females with galactosemia. The Journal of Pediatrics 2000; 137(6): 833-841.
9. Disorders of carbohydrate metabolism. In: Clinical Paediatric Dietetics. 2nd ed. Iowa State Press, 2001: 210-227.
10. Gitzelmann R, Bosshard NU. Partial deficiency of galactose-1-phosphate uridyltransferase. Eur J Pediatr 1995; 154(Suppl 2): S40-S44.
11. Suzuki M, West C, Beutler E. Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population. Hum Genet 2001; 109: 210-215.
12. OMIM#230200. On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM.
13. Beigi B, O'Keeffe M, Bowell R et al. Ophthalmic findings in classical galactosemia-prospective study. Br J Ophth 1993; 77: 162-164.
14. Stevens RE, Datiles MB, Srivastava SK et al. Idiopathic presenile cataract formation and galactosemia. Br J Ophth 1989; 73: 48-51.
15. Winder AF, Claringbold LJ, Jones RB et al. Partial galactose disorders in families with premature cataracts. Arch Dis Child 1983; 58: 362-366.
16. Kaloud H, Sitzmann FC, Schenker H et al. Enzymaktivitätswerte des galaktosestoffwechels bei der sogenannten Cataracta congenita. Dtsch Med Wschr 1975; 100: 873-876.
17. Vaca-Pacheco G, Medina C, Garcia-Cruz D et al. Identification of inborn errors of galactose metabolism in patients with cataracts. Arch Invest Med (Mex) 1990; 21(2): 127-132.
18. Auricchio G, Rinaldi E, Simonelli F et al. Red blood cells galactose-1-P-urydil transferase in senile and presenile cataracts. Metab Pediatr Syst Ophthalmol 1985; 8(4): 160.
19. Skalka HW, Prchal JT. Presenile cataract formation and decreased activity of galactosemic enzymes. Arch Ophthalmol 1980; 98(2): 269-273.
20. Cramer DW, Harlow BL, Barbieri RL et al. Galactose-1-phosphate uridyl transferase activity associated with age at menopause and reproductive history. Fertil Steril 1989; 51: 609-615.
21. Cramer DW, Harlow BL, Willett et al. Galactose consumption and metabolism in relation to the risk for ovarian cacer. Lancet 1989; 2: 66-71.
22. Cramer DW, Greenberg ER, Titus-Ernstoff L et al. A case-control study of galactose consumption and metabolism in relation to ovarian cancer. Cancer Epidemiol Prev 2000; 9: 95-101.
23. Cramer DW, Muto MG, Reichardt JKV et al. Characteristics of women with a family history of ovarian cancer. Cancer 1994; 74: 1309-1317.
24. Morland SJ, Jiang X, Hitchcock A et al. Mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase and its association with ovarian cancer and endometriosis. Int J Cancer 1998; 77: 825-827.
25. Schwartz WJ, Mattison DR. Galactose inhibition of ovulation in mice. Fertil Steril 1988; 49: 522-526.
26. Chen VT, Mattison DR, Feigenbaum L et al. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. Science 1981; 214: 1145.
27. Okano Y, Asada M, Fujimoto A et al. A genetic factor for age-related cataract: Identification and characterization of a novel galactokinase variant, »Osaka«, in Asians. Am J Hum genet 2001; 68: 1036-1042.
28. Kalaydjieva L, Perez-Lezaun A, Angelicheva D et al. A founder mutation in the GK1 gene is responsible for galactokinase deficiency in Roma (Gypsies). Am J Hum Genet 1999; 65: 1299-1307
29. Rinaldi E, Albini L, Costagliola C et al. High frequency of lactose absorbers among adults with idiopathic senile and presenile cataract in a poplation with a high prevalence of primary adult lactose malabsorption. The Lancet 1984; 1(8373): 355-357.
30. Cramer DW. Lactase persistence and milk consumption as determinants of ovarian cancer risk. Am J Epidemiol 1989; 130(5): 904-910.
31. Meloni GF, Colombo C, La Vecchia C et al. Lactose absorption in patients with ovarian cancer. Am J Epidemiol 1999; 150(2): 183-186.
32. Cramer DW, Welch WR, Hutchinson GB et al. Dietary animal fat in relation to ovarian cancer risk. Obstet Gynecol 1984; 83: 833-8.
33. Kushi LH, Mink PJ, Folsom AR et al. Prospective study od diet and ovarian cancer. Am J Epidemiol 1999; 149: 21-31.
34. Engle A, Musvat JE, Harris RE. Nutritional risk factors and ovarian cancer. Nutr Cancer 1991; 15: 239-247.
35. Risch HA, Jain M, Marett LD et al. Dietary lactose intake, lactose intolerance, and risk for epithelial ovarian cancer in souther Ontario (Canada). Cancer Causes Control 1994; 5: 540-548.
36. Herrinton LJ, Weiss NS, Beresford SA et al. Lactose and galactose intake and metabolism in relation to the risk of epithelial ovarian cancer. Am J Epidemiol 1995; 141: 407-416.
37. La Vecchia C, Decarli A, Negri E et al. Dietary factors and risk of epithelial ovarian cancer. J Natl Cancer Inst 1987; 79: 663-669.
38. Mori M, Harabuchi I, Miyake H et al. Reproductive, genetic and dietary risk factors for ovarian cancer. Am J Epidemiol 1988; 128: 771-777.
39. Shu XO, Gao YT, Yuan JM et al. Dietary factors and epithelial ovarian cancer. Br J Cancer 1989; 59: 92-96.
40. Lukač-Bajalo J, Marc J, Mlinar B et al. Frequencies of Q188R and N314D mutations and IVS5-24g>A intron variation in the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene in the Slovenian population. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 1109-1113.
41. Karas N, Gobec L, Pfeifer V et al. Mutations in galactose-1-phosphate uridyltransferase gene in patients with idiopathic presenile cataract. J Inherit Metab Dis 2003; 26: 699-704.
42. Karas N, Lukač-Bajalo J. Genetika laktozne intolerance odraslih in pogostost polimorfizma -13910C>T v slovenski populaciji. Farm Vestn 2005; 56: 183-187.

VARČEVANJE ZA STAROST
pri Kapitalski družbi

Najboljši recept za lepo starost.

Zaposleni v zdravstvu ste na dobri poti v prijetno starost. Kot člani sklada ZVPSJU ste že vključeni v kolektivno dodatno pokojninsko zavarovanje, kamor vaš delodajalec mesečno vplačuje sredstva za vas. Vendar pa boste za še bolj udobno starost morali varčevati tudi sami. Ker je višina pokojninske rente odvisna od višine vplačil, boste s samostojnim vplačevanjem premij v že obstoječe varčevanje poskrbeli, da bo višina rente zadostila vašim pričakovanjem.

Odločite se in poskrbite za svojo aktivno starost!

Brezplačna telefonska številka: 080 23 45

info.zvpsju@kapitalska-druzba.si
www.kapitalska-druzba.si

KAPITALSKA DRUŽBA

PRESTOP

Kapitalska družba pokojninskega in invalidskega zavarovanja, d.d., Dunajska cesta 119, 1000 Ljubljana

Sekretorne fosfolipaze A_2 in njihova (pato)fiziološka vloga

Secretory phospholipase A_2 enzymes and their (patho)physiological role

Borut Jerman, Jože Pungerčar

Povzetek: Fosfolipaze A_2 so encimi, ki katalizirajo cepitev estrske vezi na mestu *sn*-2 v glicerofosfolipidih, pri čemer se sprostijo proste maščobne kisline in lizofosfolipidi. Pri sesalcih je bilo doslej prepoznanih 29 fosfolipaz A_2, ki delujejo znotraj- in/ali zunajcelično. Večino slednjih predstavljajo sekretorne fosfolipaze A_2, ki so kot encimi ali pa ligandi za različne receptorje vpletene v številne fiziološke in patološke procese. To je spodbudilo farmacevtska podjetja k intenzivnemu razvoju specifičnih inhibitorjev za lajšanje, preprečevanje in zdravljenje obolenj, povezanih s sekretornimi fosfolipazami A_2, pri živalih in človeku.

Ključne besede: *encim, fosfolipaza A2, sekretorna fosfolipaza A2, patološki procesi, inhibitorji sPLA2*

Abstract: Phospholipases A_2 are enzymes that catalyze the hydrolysis of the *sn*-2 ester bond of phospholipids to form free fatty acids and lysophospholipids. In mammals, 29 enzymes with phospholipase A_2 activity, which act intra- and/or extracellularly, have been identified. Most of the latter are secretory phospholipases A_2. By their enzymatic activity or by binding to receptors, as ligands, $sPLA_2$s play an important role in a variety of physiological and pathological processes. This has attracted the interest of pharmaceutical companies in developing $sPLA_2$ inhibitors which could be helpful in $sPLA_2$ related diseases in animals and humans.

Keywords: *enzyme, phospholipase A2, secretory phospholipase A2, pathological processes, sPLA2 inhibitors*

1 Uvod

Fosfolipaze A_2 (PLA_2) so proteini, ki katalizirajo hidrolizo estrske vezi na mestu dva (*sn*-2) v molekuli glicerofosfolipida, pri čemer se sprostita prosta maščobna kislina in lizofosfolipid. Pri sesalcih je bilo doslej odkritih 29 encimov PLA_2, ki so razdeljeni v pet različnih skupin (1). 1) V skupino **sekretornih fosfolipaz A_2** ($sPLA_2$) uvrščamo vsaj 11 encimov, ki so večinoma majhne molekulske mase in potrebujejo Ca^{2+}-ion kot kofaktor (preglednica 1). Vključeni so v različne (pato)fiziološke procese, kot so npr. metabolizem fosfolipidov, produkcija eikozanoidov, vnetje in primarni obrambni odziv gostitelja. 2) Skupina **citosolnih fosfolipaz A_2** ($cPLA_2$) obsega 6 encimov, med katerimi je najbolje raziskana vloga encima $cPLA_2$, ki je ključen pri sproščanju arahidonske kisline (AA). Aktivacija $cPLA_2$ je tesno povezana s prisotnostjo Ca^{2+}-ionov in fosforilacijo. 3) V skupini **od Ca^{2+}-neodvisnih fosfolipaz A_2** ($iPLA_2$), ki so hkrati tudi transacilaze, je poznanih 7 encimov, ki imajo pomembno vlogo pri preurejanju membranskih fosfolipidov. 4) V skupini **PAF-acetilhidrolaz** (PAF-AH) so poznani 4 encimi, katerih edinstveni lastnosti sta substratna specifičnost za trombocitni aktivator (PAF; "platelet-activating factor") in oksidirane fosfolipide, ki imajo oksidirane maščobne kisline dolžine do 9 ogljikovih atomov. PAF-AH za razliko od ostalih PLA_2 ne delujejo učinkovito na površini lipidnih membran, temveč bolje hidrolizirajo monomerne substrate v raztopini. Cepitev PAF in oksidiranih fosfolipidov s PAF-AH lahko vodi do zaključka vnetja ali ateroskleroze. 5) V skupino **lizosomskih fosfolipaz A_2** je zaenkrat uvrščena le ena fosfolipaza, ki ima od Ca^{2+}-neodvisno fosfolipazno aktivnost in transacilazno aktivnost, podobno kot $iPLA_2$. Število znanih fosfolipaz A_2 morda še ni dokončno. V prispevku bodo predstavljena le najpomembnejša osnovna spoznanja o $sPLA_2$, njihovi vlogi v fizioloških in patoloških procesih ter možnostih uporabe inhibitorjev $sPLA_2$ za preprečevanje (pato)fizioloških procesov, ki jih izzovejo $sPLA_2$.

2 Struktura in encimsko delovanje $sPLA_2$

Na osnovi strukturnih značilnosti razdelimo $sPLA_2$ v tri večje skupine: I/II/V/X, III in XII (slika 1).

$sPLA_2$ skupine I/II/V/X so strukturno zelo sorodni encimi, velikosti 14–16 kDa, z visoko ohranjeno Ca^{2+}-vezavno zanko in katalitično regijo. Imajo 6 evolucijsko ohranjenih disulfidnih vezi in po dve disulfidni vezi na mestih, značilnih za posamezno (pod)skupino encimov. Omenjene disulfidne vezi pomembno prispevajo k relativno visoki stabilnosti teh encimov. Za encimsko katalizo je nujno potreben Ca^{2+} (kofaktor) v mikromolarni koncentraciji, učinkovita hidroliza substrata pa poteka v območju pH 7–9. Ca^{2+}-ion je preko omenjene kalcijeve vezavne zanke

Borut Jerman, univ. dipl. mikrobiol., Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana
prof. dr. Jože Pungerčar, univ. dipl. biol., Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

Preglednica 1: Značilnosti človeških $sPLA_2$. [a]Podobne $sPLA_2$ (skupina IA) so zasledili v strupih kač iz družine stupenih gožev (*Elapidae*). [b]Podobne (skupini IIA in IIB) so v strupih kač iz družine gadov (*Viperidae*). [c]V človeškem genomu je prisoten le psevdogen, zato so v oklepajih prikazane vrednosti za homologno mišjo $sPLA_2$-IIC. [d]$sPLA_2$, podobno osrednji domeni skupine III, so najprej odkrili v čebeljem strupu. [e]Histidinski ostanek v encimskem aktivnem mestu zamenjan z levcinskim, zato je ta $sPLA_2$ domnevno katalitično neaktivna. N.d., nedoločeno.

Table 1: Characteristics of human $sPLA_2$s. [a]Similar $sPLA_2$s (group IA) occur in snake venoms of the family *Elapidae*. [b]Similar $sPLA_2$s (groups IIA and IIB) occur in snake venoms of the family *Viperidae*. [c]Since only a pseudogene is present in the human genome, the values for a homologous mouse $sPLA_2$-IIC are shown. [d]A similar $sPLA_2$ has been previously identified in bee venom. [e]The active site histidine residue is substituted with a leucine residue, hence, this $sPLA_2$ is presumably catalytically inactive. N.d., not determined.

Skupina $sPLA_2$	Število aminokislin	Velikost (kDa)	Potreba po Ca^{2+}	Katalitično mesto	Kromosomska lokacija	Mesto odkritja oz. nahajanja; opomba
IB[a]	126	14	μM	His/Asp	12q23–24.1	trebušna slinavka
IIA[b]	131	14	μM	His/Asp	1p35	sinovialna tekočina, črevesje, srce, placenta
IIC[c]	(130)	(15)	(μM)	(His/Asp)	1p36.12	protein se ne izraža; prisoten npr. pri miški v testisih (v mejoznih celicah)
IID	125	14	μM	His/Asp	1p36.12	vranica, priželjc, trebušna slinavka
IIE	123	14	μM	His/Asp	1p36.13	možgani, srce, pljuča, placenta
IIF	148	16	μM	His/Asp	1p35	placenta, testisi, priželjc
V	118	14	μM	His/Asp	1p36–34	srce, placenta, makrofagi
X	123	14	μM	His/Asp	16p13.1–12	trebušna slinavka, črevesje, levkociti, pljuča
III[d]	490	55	μM	His/Asp	22q11.2–13.2	ledvice, trebušna slinavka, jetra, pljuča
XIIA	167	19	μM	His/Glu (?)	4q25	srce, skeletne mišice, ledvice, trebušna slinavka
XIIB	176	20	N.d.	Leu/Asp[e]	10q22.1	jetra, ledvice, srce; encimsko neaktivna

Slika 1: Shematski prikaz strukture človeških $sPLA_2$. Na sliki so prikazane nekatere osnovne značilnosti strukture različnih skupin $sPLA_2$. Označene so le disulfidne vezi, značilne za posamezno skupino. $sPLA_2$-IB ima edinstveno, t. i. pankreasno zanko dolžine 5 aminokislinskih ostankov. Nekatere druge $sPLA_2$ imajo kratek C-terminalni podaljšek. Slika je delno povzeta po ref. 13.
* Število disulfidnih vezi v $sPLA_2$-domeni; H, His; C, Cys.

Figure 1: Schematic representation of the structures of human $sPLA_2$s. Certain basic characteristics of different groups of $sPLA_2$s are shown. In the figure, only disulphide bonds typical for a particular group are presented. Members of group $sPLA_2$-IB have a unique 'pancreatic loop' of 5 residues. Some other $sPLA_2$s possess a short C-terminal extension. The figure is partly adapted from Ref. 13.
* Number of disulphide bonds in the $sPLA_2$-domain; H, His; C, Cys.

Slika 2: Prikaz možnih načinov delovanja $sPLA_2$ na celičnem nivoju. A) $sPLA_2$ se po sintezi izločijo iz celic (1). Po sekreciji lahko pride do vezave na topni ali membranski receptor tipa M (2), ali na heparan sulfatne proteoglikane (3) ali na plazemsko membrano (4). Do vnosa $sPLA_2$ v celico (5) pride na vsaj dva načina: preko vezave na membranski receptor tipa M (2) ali preko vezave na heparan sulfatne proteoglikane (3). Po vnosu lahko $sPLA_2$ delujejo na znotrajceličnih membranah (6) ali pa se razgradijo (7). Do sproščanja AA tako lahko pride med samo sekrecijo (8) ali po vezavi na zunanjo (4) ali na notranje membrane (6); mesto, kjer pride do sproščanja AA, pa je odvisno od lastnosti posamezne $sPLA_2$. Izražanje določene skupine $sPLA_2$ je vrstno, genotipsko in tkivno-specifično ter odvisno od (pato)fiziološkega stanja organizma. AA, arahidonska kislina; mt, mitohondrij. B) Predpostavljeni mehanizem katalitične reakcije $sPLA_2$ na površini membrane. Vezava $sPLA_2$-encima (E) na membrano agregiranih fosfolipidov ($E \rightarrow E^*$) je odvisna od afinitete vezave (K_d) na membrano in je ločena od afinitete vezave (K_s) fosfolipidne molekule v aktivnem mestu encima ($E^* + S^* \leftrightarrow E^*S$). S, fosfolipidni substrat; P, produkt; k_{cat}, pretvorbeno število.

Figure 2: Possible cellular actions of $sPLA_2$s. A) $sPLA_2$s are synthesized and secreted from the cell (1). Following secretion, $sPLA_2$s can bind either to the soluble or membrane-bound M-type $sPLA_2$ receptor (2), or to heparan sulphate proteoglycans (3) or to the plasma membrane (4). They are internalized into the cell (5) through at least two possible pathways: by binding to the membrane-bound M-type $sPLA_2$ receptor (2) or to heparan sulphate proteoglycans (3). When imported, $sPLA_2$s act on the inner cellular membranes (6) or are degraded (7). AA can be released during secretion of $sPLA_2$s (8), or after binding to the outer (4) or inner (6) cellular membranes. The cellular location of AA release is in a large part dependent on the enzymatic properties of a particular $sPLA_2$. The expression of each $sPLA_2$ group member is species-, genotype- and tissue-specific, and depends on the (patho)physiological state of an organism. AA, arachidonic acid; mt, mitochondrion. B) Presumed mechanism of the catalytic reaction of an $sPLA_2$ enzyme at the membrane surface. Binding of the $sPLA_2$ enzyme (E) to the membrane of associated phospholipids ($E \rightarrow E^*$) is dependent on the membrane binding affinity (K_d), and is different from the binding affinity of the phospholipid molecule (K_s) for the enzyme active site ($E^* + S^* \leftrightarrow E^*S$). S, phospholipid substrate; P, product; k_{cat}, the turnover number.

in Asp49 koordinativno vezan v bližini aktivnega mesta encima ter kot kofaktor sodeluje tako pri vezavi kot pri katalizi substrata (2). Aminokislinska ostanka His48 in Asp99 tvorita t. i. katalitično diado oz. skupaj z molekulo vode "funkcionalno triado". Kristalni strukturi $sPLA_2$-IB in -IIA sta odkrili, da aktivno mesto $sPLA_2$-encimov leži na dnu hidrofobnega kanala na N-koncu molekule (3, 4). Hidrofobni kanal veže posamezno molekulo fosfolipida, tj. substrata, neposredno po vezavi encima na fosfolipidno membrano (slika 2B). $sPLA_2$ delujejo na stični površini med lipidno plastjo in vodnim medijem. Zanje je značilno, da imajo večjo afiniteto do agregiranih fosfolipidnih substratov, kot so miceli, vezikli in celične membrane, ki jih hidrolizirajo veliko hitreje kot monomerne fosfolipide. Večina sesalskih $sPLA_2$ se bolje veže na negativno nabite (anionske) lipidne površine, sestavljene iz npr. fosfatidilglicerola ali fosfatidilserina, kot na električno nevtralne, npr. fosfatidilholinske površine, medtem ko imata $sPLA_2$ iz skupin V in X relativno visoko afiniteto tudi do električno nevtralnih fosfolipidnih površin (5, 6). Le $sPLA_2$-IB in -X se izločata iz celice v encimsko manj aktivni obliki kot proencima. N-terminalni propeptid, dolžine 7 oz. 11 aminokislin, se odstrani s proteolitično cepitvijo, pri čemer se tvori polno aktivni zreli encim (7, 8). $sPLA_2$-X je za razliko od ostalih N-glikoziliran, kar pa ni pogoj za encimsko aktivnost (8).

$sPLA_2$-III in **$sPLA_2$-XII** sta sorodni $sPLA_2$-encimom iz skupine I/II/V/X predvsem v strukturi kalcijeve vezavne zanke in katalitične regije, drugače pa se od njih jasno razlikujeta. $sPLA_2$-III je največji protein (55 kDa) znotraj družine $sPLA_2$, sestavljen iz treh domen, ki kaže večjo podobnost s $sPLA_2$, izolirano iz čebeljega strupa, kot pa s $sPLA_2$ iz skupine I/II/V/X (9). $sPLA_2$-XIIA je encim velikosti 19 kDa, ki ima – podobno kot predstavniki skupine I/II/V/X – His v aktivnem mestu, medtem ko je na mestu, kjer je običajno Asp99, prisoten ostanek Glu, kar po naše nakazuje na možno katalitično diado His/Glu. Primerjava ohranjenega segmenta kalcijeve vezavne zanke pri $sPLA_2$-XIIA z drugimi $sPLA_2$ je pokazala, da je drugi, običajno ohranjeni, ostanek Gly v kalcijevi zanki zamenjan s Pro. Od ostalih $sPLA_2$ se $sPLA_2$-XIIA dodatno razlikuje po tem, da so nekateri cisteinski ostanki, ki tvorijo disulfidne vezi, na drugih mestih (10, 11). V letu 2003 odkrit soroden protein, $sPLA_2$-XIIB, pa ima zamenjan His v aktivnem mestu z Leu, kar je verjetno glavni razlog za njegovo encimsko neaktivnost (12).

3 Fiziološka vloga $sPLA_2$

Z *in vitro* in *in vivo* raziskavami so pokazali na vključenost $sPLA_2$ v mnoge fiziološke in patološke procese. $sPLA_2$ preko encimske aktivnosti sodelujejo pri sproščanju AA v celicah (slika 2A). Sproščena AA je substrat za konstitutivno izraženo ciklooksigenazo 1 (COX-1) v takojšnem odzivu ali za inducibilno izraženo ciklooksigenazo 2 (COX-2) v zakasnelem odzivu organizma ali za lipoksigenazo, kar vodi v sintezo eikozanoidov pri vnetnih procesih. Drugi produkt encimske reakcije $sPLA_2$, lizofosfolipidi, kot npr. lizofosfatidna kislina, lizofosfatidilholin in njihovi metaboliti (npr. PAF), ki so močni bioaktivni mediatorji, delujejo preko ustreznih z G-proteini sklopljenih receptorjev. Predpostavljajo, da $sPLA_2$, ki sproščajo AA, prav tako regulirajo nastajanje mediatorjev, ki nastanejo iz lizofosfolipidov (8, 13). Tako lahko aktivirajo, preko produktov hidrolize, različne tarčne proteine, kot so: MAP-kinaza, PI3K, Akt, $cPLA_2$, COX-2 in sfingomielinaza (14–19). Na celični ravni sodelujejo $sPLA_2$ skupin IB, IIA, V in X pri proliferaciji, kontrakciji, migraciji, apoptozi celic ter pri sproščanju peptidov, hormonov in citokinov (20–25). Delujejo protimikrobno na bakterije, kot tudi zaviralno na parazite in viruse, zato predvidevajo, da $sPLA_2$ sodelujejo pri prirojenem imunskem odzivu gostitelja (13, 26, 27). Sodelujejo tudi pri metabolizmu lipidov, zaužitih s hrano (28).

Kasneje so ugotovili, da nekateri biološki učinki $sPLA_2$ niso posledica njihove katalitične aktivnosti, temveč posledica vezave $sPLA_2$ na specifične vezavne proteine v celicah (slika 2A). Tako npr. katalitično neaktivne mutante $sPLA_2$ pri določenih procesih delujejo prav tako učinkovito kot divji tip fosfolipaze, ki je encimsko aktiven (26). Pri sesalcih se $sPLA_2$ vežejo na $sPLA_2$-receptorje tipov M in N ter na glipikan, dekorin in verzikan (27, 29–31). Preko vezave na receptor se $sPLA_2$ lahko vnesejo v celico, kjer encimsko delujejo in interagirajo z znotrajceličnimi tarčami ali pride tam do njihove razgradnje (v lizosomih). Zato predvidevajo, da $sPLA_2$ ne delujejo le kot encimi temveč tudi kot ligandi. Znani proteini, ki lahko interagirajo s $sPLA_2$, so poleg prej omenjenih še: kalmodulin in 14-3-3-proteini, pentraksinu podobni protein in pentraksin vezavni proteini, krokalbin, pljučni površinski proteini, receptor 2 za vaskularni endotelijski rastni dejavnik in dejavnik strjevanja krvi Xa (pregledno v 26 in 32). Med $sPLA_2$-vezavnimi proteini je najbolje proučena interakcija fosfolipaz s $sPLA_2$-receptorjem tipa M, ki pri določenih (pod)skupinah $sPLA_2$ tudi inhibira njihovo fosfolipazno aktivnost (26). Receptor tipa M je strukturno podoben manoznemu receptorju makrofagov, ki ga uvrščajo v nadrdružino lektinskih receptorjev tipa C (33). Pri človeku sta prisotni topna in membranska oblika receptorja, ki nastaneta kot posledica alternativnega izrezovanja intronov na ravni mRNA. O pomenu interakcij $sPLA_2$ z vezavnimi proteini je relativno malo znanega in so zato le-te predmet intenzivnih raziskav.
Kljub vsemu povedanemu pa vloga posameznih $sPLA_2$ še ni v celoti pojasnjena. Modeli miši s posamično okvarjenimi (izbitimi) geni za $sPLA_2$ iz skupine I/II/V/X so izzvali dvome o nekaterih prej predpostavljenih vlogah posameznih $sPLA_2$ v (pato)fizioloških procesih. Kaže, da prihaja do redundance (presežnosti), pri čemer lahko določena $sPLA_2$ nadomesti vlogo druge, kar prikrije fenotip, povezan z odsotnostjo te druge $sPLA_2$. Nekateri mišji sevi imajo naravno okvaro gena za $sPLA_2$-IIA, vendar ni opaziti nenormalnosti, kar kaže na možnost nadomestitve funkcij $sPLA_2$-IIA z neko drugo skupino $sPLA_2$-encima (kompenzacija) (34).

4 Patofiziološka vloga $sPLA_2$

Sesalske $sPLA_2$ igrajo pomembno vlogo pri različnih patoloških spremembah, od katerih so najbolje raziskani vnetni procesi in ateroskleroza, omeniti pa velja tudi vlogo $sPLA_2$ pri različnih nevrodegenerativnih in rakavih obolenjih.

4.1 Vnetje

Med $sPLA_2$ je, kar se vnetja tiče, najbolje proučena vloga $sPLA_2$-IIA. Ta encim so zasledili v povečanih količinah v tekočini na mestu vnetja (35). Njeno izražanje sprožijo različni signali, povezani z akutnim in kroničnim vnetjem (36–38), kar kaže na to, da je $sPLA_2$-IIA eden od glavnih dejavnikov pri sproščanju lipidnih mediatorjev med vnetjem (39). Tako so povišane koncentracije $sPLA_2$-IIA izmerili v serumu in tkivih pri različnih vnetnih obolenjih, kot so: revmatoidni artritis, septični

šok, luskavica, Crohnova bolezen, ulcerativni kolitis, sindrom dihalne stiske in astma (13, 40).

4.2 Ateroskleroza

Vključenost $sPLA_2$-IIA v proces ateroskleroze so pokazali pri študijah z uporabo transgenih miši s povečanim izražanjem gena za $sPLA_2$-IIA (41, 42). Takšne transgene miši so imele povečane aterosklerozne poškodbe, okoli katerih je bila nakopičena $sPLA_2$-IIA (42). Pri človeku so na ateroskleroznih plakih zasledili povezavo med $sPLA_2$-IIA in dekorinom, majhnim glikoproteinom, ki ima kovalentno vezan hondroitin sulfat ali dermatan sulfat glikozaminoglikan. Ugotovili so, da se $sPLA_2$-IIA veže na dekorin. Pri vezavi na dekorin se njena encimska aktivnost poveča za 2 do 3-krat. Predpostavljajo, da tako povečana aktivnost $sPLA_2$-IIA vpliva na spremembe plazemskih lipoproteinov in na nastanek lipidnih mediatorjev na mestu tvorbe ateroskleroznih plakov (30). Novejše študije so pokazale, da pri razvoju ateroskleroze sodeluje tudi $sPLA_2$-V, in sicer na drugačen način, tako da bo potrebno njeno vlogo pri razvoju ateroskleroze še natančneje proučiti (43, 44).

4.3 Nevrodegenerativna obolenja

Vse več študij kaže tudi na vlogo različnih skupin $sPLA_2$ pri nevrodegenerativnih obolenjih, kot so: Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, multipla skleroza, epilepsija, shizofrenija in depresivne motnje (45). Fosfolipaze A_2 iz skoraj vseh skupin so prisotne v centralnem živčnem sistemu (46). Predpostavljajo, da se ob indukciji sinteze $sPLA_2$ s citokini in kemokini poveča sproščanje AA in s tem nastanek vnetnih mediatorjev, kar privede do vnetja v centralnem živčnem sistemu. Pri omenjenih nevrodegenerativnih obolenjih je značilno povišana raven citokinov in eikozanoidov (45).

4.4 Rakava obolenja

Novejše raziskave kažejo na vpletenost $sPLA_2$, AA in njenih metabolitov v razvoj kolorektalnega raka (47) in raka prostate (48). Pri tem se pojavi neravnovesje v izražanju $sPLA_2$ in neravnovesje v metabolizmu AA, kar pomembno vpliva na različne fiziološke procese v celici. Številne raziskave kažejo, da je povečano tudi izražanje COX-2 in s tem je povečana sinteza mitogenih prostaglandinov, kar pa je ključna značilnost različnih oblik rakavih obolenj, med drugimi kolorektalnega raka, raka prostate in raka dojke (49). Pomen $sPLA_2$, predhodnikov COX-2 v kaskadi pretvorbe AA, pri razvoju in napredovanju rakavih obolenj je priznan, a zaenkrat slabo raziskan patološki proces (50). Predpostavljajo, da bi $sPLA_2$ lahko bile primerne tarče za preprečevanje določenih rakavih obolenj (51).

5 Inhibitorji $sPLA_2$

Spoznanja o vlogi $sPLA_2$ pri vnetnih obolenjih in drugih patoloških procesih so spodbudila farmacevtska podjetja k razvoju inhibitorjev $sPLA_2$. V splošnem so najučinkovitejši inhibitorji na osnovi indolovih derivatov, kot so npr. indoksam, metilindoksam in LY311727 (52–54). Nekateri od teh so se izkazali za uspešne pri študijah na živalskih modelih vnetja, kar kaže na to, da so $sPLA_2$ morda ena od primernih tarč za preprečevanje vnetja, vendar pa podobnih uspehov pri študijah na ljudeh še ni (55, 56). Z odkritjem vse več novih skupin $sPLA_2$ se je pokazalo, da številni inhibitorji $sPLA_2$, vključno z metilindoksamom, niso selektivni le za določeno (pod)skupino $sPLA_2$ (52–54, 57). Še več, nedavno so pokazali, da nekateri inhibitorji ne inhibirajo le encimske aktivnosti $sPLA_2$, temveč tudi preprečujejo vezavo s $sPLA_2$-receptorjem tipa M (57). Ta novejša spoznanja zahtevajo, da se ponovno opravijo določene predklinične raziskave inhibitorjev, ki bi bili lahko ustrezni za preprečevanje in zdravljenje obolenj, izzvanih s $sPLA_2$. Ostaja tudi odprto vprašanje, ali inhibitorji prav tako preprečijo interakcijo $sPLA_2$ z nekaterimi drugimi vezavnimi proteini $sPLA_2$. Naravni proteinski inhibitorji endogenih $sPLA_2$ pri človeku še niso poznani, so pa znani nekateri naravni inhibitorji kačjih nevrotoksičnih $sPLA_2$ (58). Poleg iskanja specifičnih naravnih inhibitorjev tudi intenzivno proučujejo delovanje peptidnih inhibitorjev in peptidomimetikov, pridobljenih na osnovi proteinske strukture in molekulskega modeliranja, ki specifično inhibirajo aktivnost $sPLA_2$ (59).

6 Zaključek

Vloga posameznih skupin $sPLA_2$ v različnih patofizioloških procesih je predmet intenzivnih raziskav. Številčnost $sPLA_2$, njihova relativno nizka substratna specifičnost in vključenost v različne celične procese kažejo na veliko kompleksnost delovanja teh encimov, ki ga v celoti še ne razumemo. Spoznanje, da $sPLA_2$ delujejo kot encimi in kot ligandi, pa nedvomno odpira nov pogled na njihovo delovanje.

7 Zahvala

Zahvaljujeva se izr. prof. dr. Igorju Križaju za kritični pregled prispevka in dr. Rogerju H. Painu za pregled angleškega dela članka.

8 Literatura

1. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Biophys Acta 2006; 1761: 1246–1259.
2. Verheij HM, Volwerk JJ, Jansen EHJM, Puyk WC, Dijkstra BW, Drenth J, de Haas GH. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. Biochemistry 1980; 19: 743–750.
3. Dijkstra BW, Drenth J, Kalk KH. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2. Nature 1981; 289: 604–606.
4. Scott DL, White SP, Browning JL, Rosa JJ, Gelb MH, Sigler PB. Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A2 from inflammatory exudate. Science 1991; 254: 1007–1010.
5. Bezzine S, Bollinger JG, Singer AG, Veatch SL, Keller SL, Gelb MH. On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids. J Biol Chem 2002; 277: 48523–48534.
6. Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. J Biol Chem 2002; 277: 48535–48549.
7. Verheij HM, Slotboom AJ, de Haas GH. Structure and function of phospholipase A2. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1981; 91: 91–203.

8. Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H. Purified group X secretory phospholipase A2 induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. J Biol Chem 1999; 274: 34203–34211.
9. Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. J Biol Chem 2000; 275: 7492–7496.
10. Gelb MH, Valentin E, Ghomashchi F, Lazdunski M, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2. J Biol Chem 2000; 275: 39823–39826.
11. Ho IC, Arm JP, Bingham III CO, Choi A, Austen KF, Glimcher LH. A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. J Biol Chem 2001; 276: 18321–18326.
12. Rouault M, Bollinger JG, Lazdunski M, Gelb, MH, Lambeau G. Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity. Biochemistry 2003; 42: 11494–11503.
13. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002; 68–69: 3–58.
14. Tada K, Murakami M, Kambe T, Kudo I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. J Immunol 1998; 161: 5008–5015.
15. Balsinde J, Shinohara H, Lefkowitz LJ, Johnson CA, Balboa MA, Dennis EA. Group V phospholipase A2-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. J Biol Chem 1999; 274: 25967–25970.
16. Bidgood MJ, Jamal OS, Cunningham AM, Brooks PM, Scott KF. Type IIA secretory phospholipase A2 upregulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. J Immunol 2000; 165: 2790–2797.
17. Fuentes L, Hernandez M, Nieto ML, Sanchez Crespo M. Biological effects of group IIA secreted phosholipase A2. FEBS Lett 2002; 531: 7–11.
18. Beck S, Lambeau G, Scholz-Pedretti K, Gelb MH, Janssen MJ, Edwards SH, Wilton DC, Pfeilschifter J, Kaszkin M. Potentiation of TNFR-induced sPLA2-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving secreted phospholipase A2 and PPARR activation. J Biol Chem 2003; 278: 29799–29812.
19. Choi YA, Lim HK, Kim JR, Lee CH, Kim YJ, Kang SS, Baek SH. Group IB secretory phospholipase A2 promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol-3 kinase and Akt pathway. J Biol Chem. 2004; 279: 36579–36585.
20. Rizzo MT, Nguyen E, Aldo-Benson M, Lambeau G. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. Blood 2000; 96: 3809–3815.
21. Boilard E, Bourgoin SG, Bernatchez C, Surette ME. Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2. Blood 2003; 102: 2901–2909.
22. Jo EJ, Lee HY, Lee YN, Kim JI, Kang HK, Park DW, Baek SH, Kwak JY, Bae YS. Group IB secretory phospholipase A2 stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF-κB in human neutrophils. J Immunol 2004; 173: 6433–6439.
23. Lee C, Park DW, Lee J, Lee TI, Kim YJ, Lee YS, Baek SH. Secretory phospholipase A2 induces apoptosis through TNF-R and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells. Eur J Pharmacol 2006; 536: 47–53.
24. Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, Del Vecchio L, Gelb MH, Lambeau G, Marone G, Triggiani M. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. J Immunol 2005; 174: 464–474.
25. Granata F, Frattini A, Loffredo S, Del Prete A, Sozzani S, Marone G, Triggiani M. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A2 in human lung macrophages. Eur J Immunol 2006; 36: 1938–1950.
26. Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH, Lambeau G. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. Biochemistry 2007; 46: 1647–1662.
27. Valentin E, Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. Biochim Biophys Acta 2000; 1488: 59–70.
28. Richmond BL, Boileau AC, Zheng S, Huggins KW, Granholm NA, Tso P, Hui DY. Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice. Gastroenterology 2001; 120: 1193–1202.
29. Koduri RS, Baker SF, Snitko Y, Han SK, Cho W, Wilton DC, Gelb MH. Action of human group IIa secreted phospholipase A2 on cell membranes. Vesicle but not heparinoid binding determines rate of fatty acid release by exogenously added enzyme. J Biol Chem 1998; 273: 32142–32153.
30. Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Yamamoto S, Kuwata H, Kudo I. Functional association of type IIA secretory phospholipase A2 with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. J Biol Chem 1999; 274: 29927–29936.
31. Sartipy P, Johansen B, Gasvik K, Hurt-Camejo E. Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A2 and decorin in human atherosclerotic lesions. Circ Res 2000; 286: 707–714.
32. Pungerčar J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. Toxicon 2007; 50: 871–892.
33. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. Biochim Biophys Acta 2002; 1572: 364–386.
34. Kennedy BP, Payette P, Mudgett J,Vadas P, Pruzanski W, Kwan M, Tang C, Rancourt DE, Cromlish WA. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. J Biol Chem 1995; 270: 22378–22385.
35. Vadas P, Wasi S, Movat HZ, Hay JB. Extracellular phospholipase A2 mediates inflammatory hyperaemia. Nature 1981; 293: 583–585.

36. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: The relationship with associated disease states. J Lipid Mediat 1993; 8: 1–30.
37. Andreani M, Olivier JL, Berenbaum F, Raymondjean M, Bereziat G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A2. Biochim Biophys Acta 2000; 1488: 149–158.
38. Nevalainen TJ, Haapamaki MM, Gronroos JM. Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma. Biochim Biophys Acta 2000; 1488: 83–90.
39. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2: A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. Immunol Today 1991; 12: 143–146.
40. Minami T, Tojo H, ShinomuraY, Matsuzawa Y, Okamoto M. Increased group II phospholipase A2 in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Gut 1994; 35: 1593–1598.
41. Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, AJ. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis. Part 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIA phospholipase A2. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1284–1290.
42. Tietge UJ, Maugeais C, Cain W, Grass D, Glick JM, de Beer FC, Rader DJ. Overexpression of secretory phospholipase A2 causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. J Biol Chem 2000; 275: 10077–10084.
43. de Beer FC, Webb NR. Inflammation and atherosclerosis: Group IIA and Group V sPLA2 are not redundant. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1421–1422.
44. Rosengren B, Peilot H, Umaerus M, Jonsson-Rylander AC, Mattsson-Hulten L, Hallberg C, Cronet P, Rodriguez-Lee M, Hurt-Camejo E. Secretory phospholipase A2 group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1579–1585.
45. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. J Neurochem 2007; 101: 577–599.
46. Molloy GY, Rattray M, Williams RJ. Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. Neurosci Lett 1998; 258: 139–142.
47. Murakami M, Masuda S, Shimbara S, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A2. J Biol Chem 2005; 280: 24987–24998.
48. Dong Q, Patel M, Scott KF, Graham GG, Russell PJ, Sved P. Oncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer. Cancer Lett 2006; 240: 9–16.
49. Ulrich CM, Bigler J, Potter JD. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. Nat Rev Cancer 2006; 2: 130–140.
50. Nakanishi M, Rosenberg DW. Roles of cPLA2alpha and arachidonic acid in cancer. Biochim Biophys Acta 2006; 1761: 1335–1343.
51. Laye JP, Gill JH. Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? Drug Discov Today 2003; 8: 710–716.
52. Reid RC. Inhibitors of secretory phospholipase A2 group IIA. Curr Med Chem 2005; 12: 3011–3026.
53. Smart BP, Pan YH, Weeks AK, Bollinger JG, Bahnson BJ, Gelb MH. Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A2 by indole analogues: a structure-guided study. Bioorg Med Chem 2004; 12: 1737–1749.
54. Smart BP, Oslund RC, Walsh LA, Gelb MH. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A2: elucidation of sites for enhanced binding. J Med Chem 2006; 49: 2858–2860.
55. Bradley JD, Dmitrienko AA, Kivitz AJ, Gluck OS, Weaver AL, Wiesenhutter C, Myers SL, Sides GD. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A2, in the treatment of rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2005; 32: 417–423.
56. Zeiher BG, Steingrub J, Laterre PF, Dmitrienko A, Fukiishi Y, Abraham E; EZZI Study Group. LY315920NA/S-5920, a selective inhibitor of group IIA secretory phospholipase A2, fails to improve clinical outcome for patients with severe sepsis. Crit Care Med 2005; 33: 1741–1748.
57. Boilard E, Rouault M, Surrel F, Le Calvez C, Bezzine S, Singer A, Gelb MH, Lambeau G. Secreted phospholipase A2 inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor. Biochemistry 2006; 45: 13203–13218.
58. Šribar J, Kovačič L, Draškovič P, Faure G, Križaj I. The first phospholipase inhibitor from the serum of *Vipera ammodytes*. FEBS J 2007; 274: 6055–6064.
59. Thwin MM, Satyanarayanajois SD, Nagarajarao LM, Sato K, Arjunan P, Ramapatna SL, Kumar PV, Gopalakrishnakone P. Novel peptide inhibitors of human secretory phospholipase A2 with antiinflammatory activity: Solution structure and molecular modeling. J Med Chem 2007; 50: 5938–5950.

Molibden kot pomemben element v sledovih

Molybdenum as important trace element

Aleš Obreza

Povzetek: Molibden je prehodni element, ki zaradi svojih fizikalno-kemičnih lastnosti omogoča katalizo eno- in dvoelektronskih redoks reakcij. Molibdatni ioni so se zato že zelo zgodaj tekom evolucije vključili v nekatere metaloencime in jih zasledimo pri skoraj vseh organizmih, z izjemo nekaterih anaerobov, kjer je namesto molibdena prisoten volfram. Tudi pri sesalcih najdemo tri encime z molibdati v aktivnem mestu, med katerimi je zagotovo najbolj znana ksantin-oksidaza. Slednja katalizira pretvorbo purinov do sečne kisline in oksidacijo nekaterih drugih heteroaromatov. Za življenje je najpomembnejša sulfit-oksidaza, ki sodeluje v metabolizmu žveplo vsebujočih organskih spojin in preprečuje kopičenje toksičnih sulfitov v organizmu. Pri ljudeh je v strokovni literaturi opisan samo en primer pomanjkanja molibdena, zato jemanje njegovih spojin kot prehranskih dopolnil nima racionalne osnove, prav tako pa tudi niso nedvoumno opisani primeri zastrupitev pri koncentracijah molibdenovih spojin, ki jih običajno zaužijemo.

Ključne besede: *molibden, metaloencimi, esencialni element, toksičnost.*

Abstract: Molybdenum is a transition metal, which may act as a catalyst for one- and twoelectron redox reactions, due to its physicochemical properties. Molybdates became part of metalloenzymes early in evolution and may be still found in the majority of organisms, except some anaerobes where tungsten is present instead of molybdenum. In mammals three molybdoenzymes are found and xanthine oxidase which catalyses the oxidation of purines to uric acid and the oxidation of other heterocycles is best known. The other enzyme sulfite oxidase is essential for living as it catalyses the metabolism of sulfur containing organic compounds and prevents the accumulation of toxic sulfites in the organism. In humans there is only one case of molybdenum deficiency presented in professional literature, therefore the use of additives containing molybdenum has no rational base. Also the cases of poisoning with the ingested molybdenum compounds have not been clearly described.

Keywords: *molybdenum, metalloenzymes, essential element, toxicity.*

1 Naravni viri in kemizem molibdenovih spojin

S prispevkom o molibdenu se nadaljuje pregled kemijskih elementov, ki so pomembni za nemoten potek biokemijskih procesov v živih organizmih. Za razliko od vanadijevih in borovih spojin (1, 2), za katere še vedno ne moremo z gotovostjo trditi, ali so nujno potrebni za življenje vretenčarjev in človeka, pa je vloga molibdena kot mikroelementa znana že od tridesetih let prejšnjega stoletja. Kljub temu molibden kot mikroelement v slovenski strokovni literaturi še ni bil podrobneje obravnavan.

Molibden je odkril Carl Wilhelm Scheele leta 1778 in ga poimenoval zaradi zunanje podobnosti s svincem (gr. molybdos – podoben svincu). V naravi se molibden ne pojavlja v elementni obliki, pač pa v glavnem kot molibdatni(VI) ion (MoO_4^{2-}), vendar so njegove spojine v zemeljski skorji relativno redke (približno 1 ppm Mo). Povsem drugače je v morju, kjer je pred približno dvema milijardama let prišlo do pomembne spremembe. S pojavom kisika v atmosferi se je s pretvorbo netopnega MoS_2 v MoO_4^{2-} topnost molibdenovih spojin močno povečala, s čimer je bila poleg boljše biološke uporabnosti omogočena tudi uporaba molibdena v biokemijskih procesih (3). Zanimivo je, da je zaradi dobre topnosti enostavnih molibdatov, molibden v koncentracijah približno 10^{-7} mol/L najpogosteje zastopani prehodni element v morski vodi (4). Uporabnost posamezne kemične entitete v živem svetu ni določena zgolj z njeno dostopnostjo, pač pa so nujne tudi ustrezne fizikalno-kemične lastnosti. Pri molibdenu je najpomembnejša sposobnost katalize redoks reakcij, pri čemer ima kot element VI. stranske skupine sposobnost reverzibilnih eno- in dvoelektronskih oksidacij in redukcij, saj lahko prehaja med stanjema z oksidacijskima številoma +4 in +6, poleg tega pa je možno tudi vmesno stanje Mo(V). Sklopljenost eno- in dvoelektronskih redoks reakcij lepo ponazarja redukcija nitratov do nitritov **(R. 1, R. 2, R. 3)** (5, 6, 7). Omenjeni tip reakcij zasledimo pri vseh najpomembnejših molibden vsebujočih encimih, ki jih bomo obravnavali v tem prispevku.

$$MoO_3^{2-} + NO_3^- \rightarrow MoO_4^{2-} + NO_2^- \qquad Mo(IV) \rightarrow Mo(VI) \qquad \textbf{(R. 1)}$$
$$MoO_4^{2-} + H^+ + e^- \rightarrow MoO_3(OH)^{2-} \qquad Mo(VI) \rightarrow Mo(V) \qquad \textbf{(R. 2)}$$
$$MoO_3(OH)^{2-} + H^+ + e^- \rightarrow MoO_3^{2-} + H_2O \qquad Mo(V) \rightarrow Mo(IV) \qquad \textbf{(R. 3)}$$

Za molibden so značilni kompleksi z različnimi koordinacijskimi števili in geometrijo molekul (8). Najpogostejše je koordinacijsko število 6 z oktaedrično razporeditvijo ligandov, ki je prisotna tudi v večini

Aleš Obreza, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

encimov, srečamo pa tudi komplekse z nižjimi koordinacijskimi števili (4 pri molibdatih, 5 v nekaterih encimih). Od oksidacijskega števila molibdena, vrste in števila ligandov so odvisne tudi acidobazične lastnosti. Kislost je na splošno večja pri višjem oksidacijskem stanju in formalnem naboju centralnega iona ter pri kompleksih z nižjim koordinacijskim številom (3), kar je pomembno za stabilnost in delovanje posameznih encimov pri različnih vrednostih pH.

2 Molibdenove spojine v človeškem organizmu

Molibdenove spojine, ki jih vnesemo v telo, skoraj v celoti (90-99%) zaužijemo s hrano. Izdatni viri molibdena so zlasti razni oreški in žitarice, medtem ko je v hrani živalskega izvora, sadju in zelenjavi molibdenovih spojin manj. Za razliko od večine ionov prehodnih elementov se iz prebavnega sistema dobro in hitro absorbirajo. Stopnja absorpcije (20-95%) je odvisna od topnosti spojin, ki v primeru molibdatov ni problematična. Težave včasih nastopijo v primeru molibdenovih sulfidov, s katerimi lahko nastanejo netopni kompleksi z drugimi kovinskimi ioni, na primer Cu^{2+}, zato lahko pride do pomanjkanja slednjih. Dnevni vnos molibdenovih spojin znaša pri odraslem človeku ob raznovrstni prehrani 100-300 μg, kar več kot zadošča za pokritje dnevnih potreb, ki se gibljejo v intervalu 30-50 μg (9).

Pri ljudeh je bil opisan le en primer pomanjkanja molibdena pri 24-letnemu pacientu s Chronovim sindromom, ki je bil osemnajst mesecev izključno na parenteralni prehrani (10). Pacient je bil proti koncu omenjene študije zelo razdražljiv, opazili so izrazito tahikardijo in tahipnejo, z biokemičnimi preiskavami pa so ugotovili močno povečano plazemsko koncentracijo metionina in koncentracije ksantina, hipoksantina, sulfitov in tiosulfatov v urinu, znižana pa je bila serumska koncentracija sečne kisline. Vse skupaj je kazalo na motnjo v metabolizmu heteroaromatov in žveplo vsebujočih aminokislin, kjer sta udeležena tudi dva encima z molibdenom v aktivnem mestu, ksantin-oksidaza in sulfit-oksidaza. Pacientovo stanje se je normaliziralo po nekajdnevni parenteralni aplikaciji vodne raztopine amonijevega molibdata (300 μg/dan) (10).

Molibdenove spojine se po absorpciji dokaj enakomerno porazdelijo po celotnem organizmu. Koncentracije, preračunane na Mo, v večini tkiv znašajo približno 1 ng/g tkiva. Nekoliko nižje so plazemske koncentracije in koncentracije v centralnem živčevju. Podobno kot pri ostalih prehodnih elementih, so tudi koncentracije molibdenovih spojin najvišje v jetrih (7 ng Mo/g tkiva) in v ledvicah (3 ng Mo/g tkiva). Ledvica so tudi glavni organ za izločanje molibdenovih spojin, predvsem v obliki enostavnih molibdatov, nekoliko manj se jih izloči s fecesom, skoraj zanemarljivo pa je izločanje s potenjem (11).

3 Molibden kot esencialni mikroelement

Molibden je esencialni element za vse aerobne organizme, kjer je sestavni del več kot petdesetih, večinoma bakterijskih, encimov, pomembnih zlasti za metabolizem dušikovih in žveplovih spojin. Le v nekaterih enostavnih anaerobnih mikroorganizmih njegovo vlogo lahko prevzame volfram. Pri bakterijah in rastlinah je vgrajen v encima nitrat-reduktazo in nitrogenazo (12), ki omogočata redukcijo nitratov do nitritov **(R. 1)** in redukcijo elementnega dušika do amonijevih ionov, ki je energijsko zelo potratna in v običajnih pogojih brez učinkovitega katalizatorja ne poteka. Celokupno reakcijo, ki jo katalizirajo nitrogenaze, predstavlja spodnja enačba. Iz nje lahko razberemo, da je za reduktivno protoniranje molekule dušika potrebnih šest elektronov in energija, ki se sprosti ob hidrolizi dvanajstih molekul ATP **(R. 4)**. Pri nekaterih vrstah bakterij, ki živijo v simbiotskem odnosu z rastlinami, se v primeru pomanjkanja molibdena poveča ekspresija gena za vanadijevo nitrogenazo (1).

$$2\,N_2 + 12\,e^- + 14\,H^+ + 24\,MgATP \rightarrow 2\,NH_4^+ + 3H_2 + 24\,MgADP + 24\,HPO_4^{2-} \qquad \textbf{(R. 4)}$$

Pri sesalcih in ljudeh je molibden prisoten v treh encimih: ksantin-oksidazi, aldehid-oksidazi in sulfit-oksidazi. Za vse omenjene encime je značilno, da katalizirajo eno- ali dvoelektronske redoks reakcije, ki so pogosto sklopljene med seboj. Molibden je z izjemo nitrogenaz, kjer je vključen skupaj z železovimi(III) in sulfidnimi ioni v kofaktor molibdoferedoksin, v vseh encimih prisoten kot edini kovinski ion, vgrajen v specifični triciklični molibdenski kofaktor.

3.1 Molibdenski kofaktor

Molibdenski kofaktor je zgrajen iz delno nasičenega pirano[3,2-g]pterinskega obročnega sistema, na katerega je preko dveh sulfhidrilnih skupin na mestih 6 in 7 vezan molibdatni ion (Slika 1). Nekovinski del kofaktorja je edinstven v naravi in se je verjetno razvil tekom evolucije z namenom, da bi lahko organizmi čim bolj učinkovito izkoriščali fizikalno-kemične lastnosti molibdatnih ionov. Kofaktor omogoča ustrezno prostorsko umestitev molibdata v aktivnem mestu encimov, poleg tega pa tudi uravnava potek redoks reakcij, saj lahko pteridinski del služi kot prenašalec elektronov. S pomočjo rentgenske kristalografije so ugotovili, da se nekovinski del kofaktorja ne nahaja na površini encimov, pač pa v njihovi notranjosti, kjer je zaščiten pred vplivi okolja. Molibdenski kofaktor je namreč zelo nestabilna spojina, ki se ločena od encima zelo hitro ireverzibilno oksidira do neaktivnega produkta, prav tako pa se odstrani tudi molibdatni ion. Biosinteza molibdenovega kofaktorja je identična pri vseh evkariontih in predstavlja kompleksno večstopenjsko biokemijsko pot, ki izhaja iz molekule GTP (12, 13). Motnje v njegovi biosintezi, ki so posledica mutacije genov za ustrezne encime, so znane tudi pri ljudeh in so nezdružljive z življenjem, poleg tega pa terapija z vnašanjem

Slika 1: Struktura molibdenskega kofaktorja.
Figure 1: Structure of molybdenum cofactor.

molibdenskega kofaktorja zaradi njegove nestabilnosti ni možna. Zaradi neaktivnosti molibden vsebujočih encimov, zlasti sulfit-oksidaze, se močno zvišajo koncentracije toksičnih sulfitov, kar privede do ireverzibilnih poškodb centralnega živčevja (14).

3.2 Molibden vsebujoči encimi

Molibden vsebujoče encime lahko razdelimo glede na strukturo molibdenskega kompleksa v aktivnem mestu v tri skupine:

- ksantin-oksidazno, kamor uvrščamo tudi encima aldehid-oksidazo in ogljikov monoksid-dehidrogenazo,
- sulfit-oksidazno, kamor sodi tudi nitrat-reduktaza,
- DMSO-reduktazno skupino (5).

Strukture aktivnih mest posameznih skupin encimov so predstavljene v Sliki 2.

Najbolj znan predstavnik molibdenovih metaloproteinov je vsekakor ksantin-oksidaza, ki v organizmu opravlja številne naloge. Primarna fiziološka funkcija ksantin-oksidaze je kataliza zadnjih dveh stopenj v pretvorbi purinov (npr. adenina in gvanina) v sečno kislino. Reakcijo lahko poenostavljeno zapišemo kot **(R. 5)** in je značilna za celotno ksantin-oksidazno skupino encimov, dejanska reakcija pa je predstavljena v Sliki 3 (15, 16).

$$RH + H_2O \rightarrow ROH + 2H^+ + 2e^- \qquad \textbf{(R. 5)}$$

Opazimo lahko, da pride do prenosa kisikovega atoma iz molekule vode na ogljikov atom substrata. Za ksantin-oksidazo ni značilna velika substratna specifičnost, zato lahko v reakcije vstopajo tudi molekule, ki vsebujejo druge heteroaromate, predvsem pteridin. Zaradi pogostosti heteroaromatov v strukturah raznih ksenobiotikov je reakcija pomembna tudi pri oksidaciji raznih zdravilnih učinkovin, predvsem ksantinskih derivatov in purinskih antimetabolitov med protitumornimi učinkovinami.

V zadnjih letih je bila v številni znanstveni člankih predstavljena vloga ksantin-oksidaze pri nastajanju reaktivnih kisikovih zvrsti, predvsem vodikovega peroksida in superoksidnega radikala, posredno pa tudi NO in peroksinitrita. Ker je bila povečana aktivnost encima opažena zlasti ob vnetju, lahko sklepamo, da je udeležen pri imunskem odgovoru organizma, poleg tega se nahaja tudi na površini epitelijskih celic v gastrointestinalnem traktu, kjer je v tesnem stiku z bakterijami. Prekomerno nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti pa lahko privede tudi do patoloških stanj, kot so hepatitis, ishemija tkiv in kancerogeneza, ki so posledica oksidativnih poškodb posameznih tkiv (17).

Poleg dokazane vloge pri nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti, ima ksantin-oksidaza tudi antioksidativno delovanje. Sečna kislina, ki nastaja kot produkt metabolizma purinov, je plazemski antioksidant, ki se lahko oksidira do relativno stabilnih in netoksičnih produktov. Prisotna je v višjih koncentracijah kot ostali antioksidanti in lahko učinkovito ščiti biološke tarče pred oksidacijo povzročeno s hidroksilnimi radikali, hipokloriti in peroksinitriti (15).

Aldehid-oksidaza spada v isto skupino encimov in je tudi po mehanizmu katalize zelo podoben ksantin-oksidazi. Kot substrat lahko uporablja različne alifatske, aromatske oziroma heteroaromatske aldehide, ki jih oksidira do ustreznih karboksilnih kislin, poleg tega pa lahko katalizira oksidacijo različnih heteroaromatov, predvsem pirimidinov in purinov. Pri živalih se v glavnem nahaja v jetrih, še vedno pa ni popolnoma jasno, kaj je

Slika 2: Strukture aktivnih mest molibden vsebujočih encimov:
1 – ksantin-oksidazna skupina;
2 – sulfit-oksidazna skupina;
3 – DMSO-reduktazne skupina.

Figure 2: Active-site structures of molybdenum-containing enzymes:
1 – xanthine oxidase group;
2 – sulfite oxidase group;
3 – DMSO reductase group.

njegova osnovna fiziološka vloga, prav tako pa še ni bil zanesljivo ugotovljen nativni substrat pri živalih (mogoče retinal, ki se pod vplivom encima oksidira do retinojske kisline). Pri rastlinah je to skoraj zagotovo seskviterpenski aldehid 5-(1-hidroksi-2,6,6-trimetil-4-okso-2-cikloheksen-1-il)-3-metil-2,4-pentadienal, ki se oksidira do abscizinske kisline (Slika 4), rastlinskega hormona, ki zavira rast in omogoča prilagoditev rastlin na stresne pogoje (12, 18, 19).

Sulfit-oksidaza je pri ljudeh najredkeje omenjani, a verjetno edini za življenje nujno potreben molibdenov metaloencim. Katalizira zadnjo stopnjo razgradnje žveplo-vsebujočih aminokislin metionina in cisteina, to je oksidacijo sulfita do sulfata (Slika 4). Encim ima tudi pomembno vlogo pri zaščiti pred eksogenimi sulfiti in žveplovim dioksidom. Poškodbe centralnega živčevja, ki nastopijo pri pomanjkanju sulfit-oksidaze, so najverjetneje posledica kopičenja sulfitnih ionov, ki lahko kot močni nukleofili reagirajo z raznimi sestavinami celice, predvsem s proteini, kjer lahko cepijo disulfidne vezi in tiolne skupine cisteinskih preostankov pretvorijo v S-sulfonate, pri čemer se izgubita struktura in funkcija proteinov (20).

4 Toksičnost molibdenovih spojin

Zanesljivih podatkov o toksičnosti molibdenovih spojin pri ljudeh je malo in so omejene v glavnem na delavce v rudnikih, ki so izpostavljeni prašnim delcem. Pri dolgotrajnem vdihovanju se pojavijo klasične težave v dihalnem traktu, ki pa niso specifične za molibdenove spojine. V pomoč pri študijah so nam lahko živalski modeli, zlasti pri različnih vrstah goveda. Prehranjevanje s pritalnimi rastlinami bogatimi z molibdati sprva privede do povišanih koncentracij sečne kisline zaradi povečane aktivnosti ksantin-oksidaze. Sčasoma se zaradi tega pojavijo stanja, ki so podobna blagi obliki protina. Tudi pri rudarjih v ruskih rudnikih molibdena so z laboratorijskimi testi določili, da sta serumski koncentraciji molibdatov in sečne kisline za približno 30% višji kot pri ostali populaciji. Kliničnih znakov zastrupitve niso opazili pri nobenem preiskovancu. (21)

Pri govedu je najbolj znana povezava med metabolizmom molibdatov in bakrovih ionov. V prebavnem traktu lahko pri previsoki količini molibdatov nastanejo koordinativne spojine, ki vsebujejo poleg obeh ionov še sulfide in so praktično netopne. Posledično se bakrovi ioni iz

Slika 3: Reakcijski mehanizem ksantin-oksidaze.
Figure 3: The reaction mechanism of xanthine oxidase.

Slika 4: Primera reakcij, kataliziranih z aldehid-oksidazo in sulfit-oksidazo.
Figure 4: Examples of reactions, catalysed by aldehyde oxidase and sulfite oxidase.

prebavnega trakta počasneje in v manjši meri absorbirajo, pri čemer lahko pride do anemije, izgube apetita, poslabšanja vida in slepote. Motnja je vsaj v začetni fazi reverzibilna in se lahko popravi, če govedo preselimo na področje, kjer je v tleh prisotna nižja koncentracija molibdatnih ionov (22, 23).

Za enostavne anorganske spojine molibdena tudi ni dokazano kancerogeno oziroma citotoksično delovanje, čeprav so bile nekatere koordinacijske spojine z organskimi ligandi (metaloceni) testirane tudi na protitumorno delovanje (24).

5 Sklepi

Molibden spada med esencialne mikroelemente, ki ga praktično vsi organizmi na Zemlji nujno potrebujejo za nemoten proces biokemičnih reakcij. Zasledimo ga v približno petdesetih encimih, ki so v glavnem prisotni v mikroorganizmih, tri izmed njih pa najdemo tudi pri sesalcih. Zlasti sulfit-oksidaza, ki sodeluje pri metabolizmu žveplo vsebujočih organskih spojin (tudi aminokislin cisteina in metionina) je za življenje nujno pomemben, motnje v njegovi biosintezi pa privedejo do stanj, ki niso kompatibilna z življenjem. Molibdena, zlasti v obliki molibdatnih ionov, zaužijemo z vsakodnevno prehrano bistveno več, kot ga potrebuje organizem, zato dodajanje molibdenovih spojin osnovni prehrani ni smiselno. Pri ljudeh razen v enem dokumentiranem primeru namreč niso znani primeri pomanjkanja samega elementa, oziroma natančneje, njegovih ionov, prav tako pa pri koncentracijah, ki smo jim vsakodnevno izpostavljeni, niso bili opaženi specifični toksični učinki.

6 Literatura

1. Obreza A. Vanadij v živem organizmu in farmaciji. Farm Vestn 2003; 54: 713-718.
2. Obreza A. Terapevtski pomen anorganskih borovih spojin in njihova toksičnost. Farm Vestn 2004; 55: 463-468.
3. Williams RJP. The biochemistry of molybdenum. Stud Inorg Chem 1994; 19: 419-51.
4. Pyrzynska K. Determination of molybdenum in environmental samples. Anal Chim Acta 2007; 590: 40-48.
5. Hille R. Molybdenum and tungsten in biology. Trends Biochem Sci 2002; 27: 360-367.
6. Williams RJP, Frausto da Silva JJR. The involvement of molybdenum in life. Biochem Biophys Res Comm 2002; 292; 293-299.
7. Holm RH. The biological relevant oxygen atom transfer of molybdenum. Cooord Chem Rev 1990; 100: 183-222.
8. Bray RC. The nature of high pH – low pH transition in sulphite oxidase and nitrate reductase. Polyhedron 1986; 5: 591-595.
9. Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GI, et al. Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men during depletion and repletion. Am J Clin Nutr 1995; 61: 1102-1109.
10. Aburmad NN, Schneider AJ, Steel D, et al. Amino acid intolerance during prolonged total parenteral nutrition reversed by molybdate therapy. Am J Clin Nutr 1981; 34: 2551-2559.
11. Jelikić-Stankov M, Uskoković-Marković J, Holclajtner-Antunović I, et al. Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. J Trace Elem Med Biol 2007; 21: 8-16.
12. Mendel RR, Bittner F. Cell biology of molybdenum. Biochim Biophys Acta 2006; 1763: 621-635.
13. Kozmin SG, Schaaper RM. Molybdenum cofactor-dependant resistance to N-hydroxylated base analogs in Escherichia coli is independent of MobA function. Mutation Res 2007; 619: 9-15.
14. Reiss J, Johnson JL. Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2 and GEPH. Hum Mutat 2003; 21: 569-576.
15. Parks DA, Skinner KA, Skinner HB, et al. Multiple organ dysfunction syndrome: Role of xanthine oxidase and nitric oxide. Pathophysiology 1998; 5: 49-66.
16. Xia M, Ilich P, Dempski R, et al. Recent studies of the reductive half-reaction of xanthine oxidase. Biochem Soc Trans 1997; 25: 768-773.
17. Harrison R. Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. Int Dairy J 2006; 16: 546-554.
18. Rajagopalan KV, Fridowich I, Handler P. Hepatic aldehyde oxidase I. Purification and properties. J Biol Chem 1962; 237: 922-928.
19. Thapper A, Rivas MG, Brondino CD, et al. Biochemical and spectroscopic characterisation of an aldehyde oxidoreductase isolated from Desulfovibrio aminophilus. J Inorg Biochem 2006; 100: 44-50.
20. Feng C, Tollin G, Enemark JH. Sulfite oxidizing enzymes. Biochim Biophys Acta 2007; 1774: 527-539.
21. Internetna stran: http://www.imoa.info
22. Zatta P, Frank A. Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. Brain Res Rev 2007; 54: 19-33.
23. Xiao-yun S, Guo-zhen D, Hong L. Studies of a naturally occuring molybdenum-induced copper deficiency in the yak. Vet J 2006; 171: 352-357.
24. Wearn JB, Harding MM. Bioorganometallic chemistry of molybdocene dichloride. J Organomet Chem 2004; 689: 4655-4668.

Encimi vključeni v biosintezo glivnega melanina – potencialne tarče za razvoj novih antimikotikov

Enzymes involved in fungal melanin biosynthesis – potential targets for the development of new antimicotic drugs

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

Povzetek: Dematozne ali temno pigmentirane glive so vzrok za številne infekcije predvsem pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom. V celični steni vseh temno pigmentiranih gliv je prisoten melanin, ki je tako najverjetneje odgovoren za njihovo patogenost. Dokazano je, da melanin ščiti glivne celice, hkrati pa je povezan z njihovo virulenco. Infekcije, ki jih povzročajo dematozne glive, so feohifomikoze, kromoblastomikoze in micetomi. Kljub kombiniranemu zdravljenju z antimikotiki še vedno predstavljajo velik zdravstveni problem z visoko stopnjo umrljivosti. V članku predstavljamo biosintezno pot 1,8-dihidroksinaftalen melanina, vključno z encimi, ki katalizirajo posamezne reakcije. Ker sinteza melanina po 1,8- dihidroksinaftalenski poti v gostiteljevem organizmu ne poteka, so encimi v njegovi biosintetski poti zanimive tarče pri razvoju novih antimikotičnih učinkovin s selektivnim delovanjem.

Ključne besede: *pigmentirane glive, 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanin, mikoze, antimikotiki*

Abstract: Dematiaceous or dark-pigmented fungi are responsible for many infections, and especially in immunocompromised patients. These fungi contain melanin in their cell walls that protects them from environmental stresses and is considered to be an important virulence factor. Infections caused by dematiaceous fungi include phaeohyphomycosis, chromoblastomyciosis and mycetoma. Despite combined antimicotic therapies, these infections can still result in high overall mortality rates and represent an important health issue. We present here the 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthetic pathway and the enzymes involved. As 1,8-dihydroxynaphthalene melanin appears only in fungi, the enzymes involved in its biosynthesis represent interesting targets for the development of new selective antimicotics.

Key words: *dematiaceous fungi, 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin, mycosis, antimicotic drugs*

1 Uvod

V zadnjih letih se pojavlja vedno več glivičnih infekcij, ki so posledica razvoja rezistence na antimikotične učinkovine, vedno več pa je tudi novih vrst patogenih gliv, ki so se razvile iz nepatogenih. Poznamo številne dejavnike, ki vodijo do infekcij z glivami:

- razširjena uporaba antibiotikov s širokim spektrom delovanja, ki zavirajo normalno prisotne nepatogene bakterije v telesu, na račun katerih se potem razvijejo glive,
- uporaba imunosupresivnih učinkovin in kemoterapevtikov,
- povečano število bolnikov okuženih z virusom HIV (1).

Te infekcije so posledica slabše telesne odpornosti in se le redko pojavijo pri zdravih posameznikih. Zdravimo jih z antimikotičnimi učinkovinami, ki pa imajo poleg neželenih učinkov in razvoja rezistence, tudi nekatere druge slabosti. Slabo prehajajo v tarčna tkiva in imajo ozek antimikotični spekter delovanja (2). Zato se pojavlja potreba po razvoju novih antimikotičnih učinkovin z novimi prijemališči delovanja in s selektivnim delovanjem na glivne celice, ki ne bi povzročale stranskih učinkov v gostiteljevem organizmu. V članku predstavljamo glivni 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melanin in encime vključene v njegovo biosintezo kot zanimiva tarčna mesta za razvoj novih antimikotikov.

2 Infekcije, ki jih povzročajo temno pigmentirane glive

Številne glive, ki povzročajo infekcije pri ljudeh in živalih, uvrščamo v skupino temno pigmentiranih gliv. Zanje je značilna prisotnost melanina v celični steni, zato so njihove spore in hife značilno temne barve (3). Črno pigmentirane glive le redko povzročajo bolezni pri zdravih ljudeh, so pa vzrok za številne življenjsko nevarne infekcije pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom. Čeprav natančen mehanizem njihove patogenosti ni popolnoma znan, domnevajo, da je virulentni dejavnik melanin (4).

Mojca Brunskole, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana
izr. prof. dr. Tea Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana
prof. dr. Jure Stojan, dr. med., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

V razvoj bolezni pri človeku naj bi bilo vpletenih več kot 100 vrst iz 60 rodov dematoznih gliv. Nahajajo se v prsti in so razširjene povsod po svetu (5). V telo jih vnesemo predvsem z dihanjem ali skozi odprte rane. Povzročajo lahko površinske in globoke lokalne infekcije, diseminirano feohifomikozo, alergijske bolezni, pljučnico, možganski ognojek, itd. (4).

Infekcije, ki jih povzročajo pigmentirane filamentozne glive, razdelimo v tri skupine: kromoblastomikoze, micetome in feohifomikoze. Kromoblastomikoze povzročajo glive, ki tvorijo sklerotična telesa v tkivu in so značilne predvsem za tropske predele (5). V večini primerov so vzrok zanje glive iz petih vrst: *Fonseacea compactum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* in *Rhinocladiella aquaspersa*. Zdravljenje običajno zahteva kirurško odstranitev okuženega predela ter antimikotično terapijo (6). Micetomi so okužbe globokih tkiv, običajno spodnjih ekstremitet, ki jih označujejo podkožne otekline, vnetja, drenaža sinusov in prisotnost mikotičnih granul (5). Povzročajo jih lahko glive (eumicetomi) ali pa filamentozne bakterije (aktinomicetomi), ki se nahajajo v prsti in vstopijo v gostiteljski organizem skozi poškodbe na koži (7). Eumicetomi so kronične, granulomatozne, podkožne vnetne bolezni, ki zahtevajo agresivno kirurško zdravljenje v kombinaciji z antimikotiki. Ob neustreznem zdravljenju lahko privedejo do deformacij in amputacij prizadetih predelov ali celo do smrti (7). Vse ostale klinične sindrome uvrščamo med feohifomikoze (4).

Najpogostejše infekcije, ki jih povzročajo dematozne glive, so površinske infekcije in so povezane z manjšimi poškodbami kože. Čeprav le redko ogrožajo življenje, lahko v določenih primerih privedejo do smrti. Pri tem je odločilno mesto okužbe in odziv na protiglivno terapijo (4). Diseminirana feohifomikoza je razmeroma redka bolezen, ki jo povzročajo dematozne glive, vendar pa število infekcij zadnja leta narašča. V preglednem članku Revankarja in sodelavcev (5) je povzetih 72 primerov diseminiranih feohifomikoz, ki so se pojavile v letih od 1966 do 2001. Najpogostejši vzroki zanje so bili oslabljen imunski sistem, rakava obolenja, nevtropenija povezana s kemoterapijo, transplantacija kostnega mozga in drugih organov ter okužba z virusom HIV. Vendar pa je bila med njimi približno četrtina infekcij pri ljudeh z zdravim imunskim sistemom. Za bolezen so značilni izpuščaji in razjede na koži, povišana telesna temperatura, kronične bolezni dihal in centralnega živčnega sistema, gastrointestinalni simptomi in sepsa. Povprečna smrtnost je bila 79 %, in sicer 84 % pri ljudeh z oslabljenim in 65 % pri ljudeh z zdravim imunskim sistemom. Ugotovljena je bila tudi slaba odzivnost na amfotericin B in ostala antimikotična zdravila, prav tako pa tudi kombinirano zdravljenje ni pripomoglo k večjemu preživetju. Večina opisanih primerov je iz Severne Amerike in Evrope (5).

Pomemben oftalmološki problem, predvsem v tropskih predelih, predstavlja glivni keratitis. Približno polovica primerov je povezanih s predhodnimi poškodbami na očesu, posebej dovzetni pa naj bi bili posamezniki s sladkorno boleznijo, predhodnimi operacijami na očesu ter uporabniki kontaktnih leč. Kljub zdravljenju s peroralnimi in lokalnimi antimikotiki se številnim bolnikom ob koncu zdravljenja vid ne povrne v prvotno stanje (4). Med alergijskimi boleznimi so najpogostejše glivni sinusitis in alergijske bronhopulmonalne mikoze (4).

Čeprav prihaja do opisanih okužb najpogosteje pri bolnikih z oslabljenim obrambnim mehanizmom – predvsem zaradi okužbe z virusom HIV in kemoterapije, pa je primarna feohifomikoza centralnega živčnega sistema izjema. Med 101 opisanim primerom jih je več kot polovica pri ljudeh z zdravim imunskim sistemom in brez dejavnikov tveganja za glivne infekcije (8). Bolezen se največkrat kaže kot možganski ognojek s spremljajočim glavobolom in nevrološkimi motnjami, je redka, vendar pogosto smrtna (4).
Opisani primeri kažejo, da za številne infekcije s pigmentiranimi glivami še vedno ni primerne terapije. V prihodnje bodo potrebne dodatne preiskave in spremljanje teh infekcij, predvsem z namenom, da bi poiskali nove možnosti za zdravljenje in preizkusili nova prijemališča zdravilnih učinkovin.

3 Vloga melanina v glivnih celicah

V glivah imajo melanini zaščitno vlogo, delujejo pa tudi kot virulentni dejavniki. Ščitijo jih pred stresnimi dejavniki iz okolja ter gostiteljevim obrambnim mehanizmom in s tem omogočijo njihovo preživetje (9, 10).

3.1 Zaščitna vloga melanina

Ker se nahajajo melanini v glivni celični steni, delujejo kot nekakšen oklep na površini celice in jo varujejo pred zunanjimi vplivi. V primerjavi z nemelaniziranimi so melanizirane vrste gliv veliko

Slika 1: Prečni prerez apresorija divjega tipa Magnaporthe grisea. Melaninski sloj, ki obkroža celico, je prekinjen na mestu stika z gostiteljevo površino (med ▲), kar omogoči nastanek pore skozi katero lahko iz glive prehajajo večje molekule. (Ponatisnjeno z dovoljenjem Annual Review of Microbiology, Volume 50, ©1996 by Annual Reviews, www.annualreviews.org).

Figure 1: Cross-section of an appressorium of wild-type Magnaporthe grisea. The melanin layer surrounds the cell except for an area in contact with the host surface (between ▲), comprising the appressorium pore where the larger molecules can pass from the fungus. (Reprinted, with permission, from the Annual Review of Microbiology, Volume 50, ©1996 by Annual Reviews, www.annualreviews.org)

odpornejše na UV, X ali gama žarke, toploto in nizke temperature (9). Na pomembno vlogo melanina pri zaščiti pred sevanjem kaže tudi dejstvo, da je bil eden izmed reaktorjev v Černobilu kontaminiran s črnimi glivami (11). Pigmenti pa varujejo celice tudi pred hidrolitičnimi encimi kot so hitinaze, celulaze, β-1,3- in β-1,6-glukanaze in na ta način zavarujejo glivno celično steno pred razgradnjo (9). Predvidevamo, da melanin ščiti pigmentirane celice in tkivo, ki jih obkroža, tudi z adsorpcijo potencialno nevarnih substanc (številnih zdravilnih učinkovin in drugih kemikalij, kot so organski amini, kovinski ioni, policiklični aromati), ki se potem počasi sproščajo v netoksičnih koncentracijah (12). To naj bi bil tudi vzrok za odpornost pigmentiranih gliv na antimikotično terapijo. Inkubacija amfotericina B in kaspofungina z melaninom je značilno zmanjšala njuno protiglivno delovanje na *Cryptococcus neoformans*, kar kaže na to, da je lahko melanizacija vzrok za težave pri zdravljenju kriptokoknih okužb (11, 13). Vendar pa adsorpcija učinkovin ni edini vzrok za odpornost na protimikrobno terapijo, saj inkubacija melanina z itrakonazolom, flukonazolom in flucitozinom ni vplivala na njihovo protimikrobno delovanje. Kaže, da manjše molekule lahko prehajajo med zrnci melanina v glivni celični steni, medtem ko sta amfotericin B in kaspofungin prevelika (11).

Ko gliva vstopi v gostitelja, je izpostavljena njegovemu imunskemu sistemu, aktiviranim makrofagom in reaktivnim kisikovim in dušikovim radikalom, ki se sproščajo med oksidativnim stresom. Le-ti naj bi imeli fungicidno in fungistatično delovanje (14, 15). Melanin ščiti glive pred oksidativnim stresom in fagocitozo (16). Melanizirani konidiji glive *Sporothrix schenckii* na primer so bolj odporni na kisikove in dušikove radikale ter monocite in makrofage kot nemelanizirani (17). Tudi glivo *Cryptococcus neoformans* melanin varuje pred oksidirajočimi dejavniki, ki jih sprošča obrambni mehanizem in hkrati zavira s protitelesi posredovano fagocitozo (18, 19). Zaradi svojih elektrokemičnih lastnosti pa melanini ne delujejo le kot lovilci prostih radikalov, ampak tudi kot ionski izmenjevalci, ki vežejo železove ione in s tem preprečijo njihovo sodelovanje v t.i. Fentonovi reakciji, kjer nastane iz superoksidnega radikala in vodikovega peroksida izjemno reaktiven hidroksilni radikal (16). Melanini naj bi delovali tudi podobno kot superoksid dizmutaza in s tem še dodatno omejili oksidativni stres (16). Mehanizem odpornosti na fagocitozo še ni popolnoma pojasnjen, vendar pa naj bi bila osnova za rezistenco negativen naboj na površini celic. Ker so melanini negativno nabiti polimeri, njihova prisotnost v celični steni spremeni naboj na površini glivnih celic in s tem prepreči fagocitozo (11, 20).

3.2 Melanin kot virulentni dejavnik

Sposobnost gliv, da sintetizirajo melanin, je povezana tudi s prilagajanjem na parazitizem in virulenco. Številne za rastline patogene glive tvorijo melanizirane konidije ali apresorije – specializirane organe, ki sodelujejo pri adheziji na površino celice in penetraciji hif v gostiteljevo tkivo (slika 1) (16). Za nekatere rastlinske patogene je tvorba apresorijev nujna za njihovo invazijo v gostiteljeve celice (9). Apresorijske celice razvijejo zelo visoko rigidnost in mehansko odpornost. Njihov osmotski tlak lahko naraste na 8 MPa. Sila s katero deluje *Magnaporthe grisea* na rastlinsko celično steno doseže na apikalni strani apresorija 8 $\mu N/\mu m^2$, pri *Colletotrichum graminicola* pa celo 17 $\mu N/\mu m^2$, kar je približno toliko, kot če bi človeško dlan obremenili z osmimi tonami (16, 21). Tako visok osmotski tlak je dosežen zaradi izredno visoke koncentracije glicerola v apresoriju, ki je posledica velike zamreženosti celične stene in celične membrane (16). Melanin naj bi v celični steni zmanjšal velikost por pod 1 nm, zaradi tega lahko skozi prehaja samo voda, večje molekule pa ne – to omogoči influks vode, ko se v apresoriju naberejo osmotsko aktivni topljenci (21). Hkrati pa se z melaninom poveča tudi mehanska odpornost celične stene.

Apresorij se prilepi na kutikulo na površini gostitelja in vanjo naredi vdrtino, kar omogoča hifi penetracijo v gostiteljsko celico (9). Pri tem ima prisotnost melanina pomembno vlogo. Dokazano je bilo, da albino mutanti *Colletotrichum lagenarium*, ki nimajo gena za poliketidno sintazo (PKS, prvi encim pri biosintezi DHN melanina), v nasprotju z divjim tipom, niso bili sposobni inficirati listov kumaric in penetrirati skozi njihovo celulozno steno. Ta sposobnost pa se je

Slika 2: Biosinteza melanina po 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melaninski poti v Verticillum dahliae, Magnaporthe grisea in Curvularia lunata (1,3,6,8-tetra-HN: 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen; 1,3,8-tri-HN: 1,3,8-trihidroksinaftalen)

Figure 2: 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis in Verticillum dahliae, Magnaporthe grisea and Curvularia lunata (1,3,6,8-tetra-HN: 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene; 1,3,8-tri-HN: 1,3,8-trihydroxynaphthalene)

Slika 3: Komercialno dostopni fungicidi, ki inhibirajo biosintezo DHN-melanina
Figure 3: Commercial fungicides that inhibit DHN-melanin biosynthesis

ponovno vzpostavila po transfekciji z genom za PKS iz *Alternaria alternata*. Čeprav so bile takšne glive potem slabše infektivne, verjetno zaradi nižje vsebnosti melanina kot pri nemutiranih, je ta poskus potrdil pomembno vlogo melanina za parazitske lastnosti gliv (16). Albino mutanti *Pyricularia oryzae* tudi tvorijo apresorije, ki se prilepijo na kutikulo, vendar pa hife ne morejo penetrirati v gostiteljevo celico. Podobno so ugotovili tudi ob uporabi inhibitorjev sinteze melanina, kjer je prišlo do tvorbe hialinskih konidijev in apresorijev, ki so se prilepili na gostiteljevo celico, vendar pa hife niso mogle penetrirati (9). Poškodovano rastlinsko tkivo lahko inficirajo glive z melaniziranimi kot tudi nemelaniziranimi konidiji, kar kaže na to, da melanin olajša penetracijo v rastlinsko tkivo, ne vpliva pa na kasnejši razrast gliv (9). K rigidnosti apresorijev poleg melanina pripomorejo tudi hitin in drugi polimeri v glivni celični steni. V prisotnosti inhibitorja sinteze hitina apresoriji *Colletotrichum graminicola* niso dovolj rigidni, da bi razvili ustrezno visok tlak in zato počijo (21). Pri ljudeh in živalih pa je virulentnost melaniziranih gliv povezana z zaščitno vlogo melanina, ki zmanjša občutljivost na gostiteljev obrambni mehanizem in modificira imunski odziv (11).

4 Melanin

Melanini so negativno nabiti, hidrofobni pigmenti visokih molekulskih mas, ki nastajajo z oksidativno polimerizacijo fenolnih in/ali indolnih komponent in so navadno vezani s proteini, v nekaterih primerih pa tudi z ogljikovimi hidrati. Običajno so rjavi ali črni, čeprav obstajajo tudi melanini drugih barv (18, 22). Najdemo jih pri ljudeh, živalih, rastlinah in mikroorganizmih, kjer opravljajo številne funkcije, čeprav za rast in razvoj glivnih in drugih celic niso nujno potrebni (9, 22). Kljub razširjenosti melaninov pa je zaradi kompleksne polimerne zgradbe le malo znanega o njihovi kemijski strukturi (11). V splošnem lahko vse tipe prokariontskih in evkariontskih melaninov razdelimo v tri skupine (16):

- eumelanini: črni ali rjavi pigmenti, ki nastajajo z oksidacijo tirozina ali fenilalanina v o-dihidroksifenilalanin (DOPA) in dopakinon, ki v nadaljnih stopnjah ciklizirata v 5,6-dihidroksiindol (DHI) ali 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilno kislino (DHICA). Eumelanini so heterogene makromolekule DHI in DHICA (16, 23).
- feomelanini: rumeno-rdeči melanini, ki nastajajo podobno kot eumelanini, vendar pa se na DOPO direktno ali s pomočjo glutationa pripne cistein. Nastala cisteinil-DOPA nato polimerizira do različnih derivatov benzotiazinov (16, 23).
- alomelanini: heterogena skupina polimerov, ki nastanejo z oksidacijo in polimerizacijo di- ter tetrahidroksinaftalena v pentaketidni poti. Pri tem nastanejo številni pigmenti kot so DHN melanini, homogentinska kislina, γ-glutaminil-4-hidroksibenzen, kateholi ter 4-hidroksifenil-ocetna kislina. Alomelanini ne vsebujejo dušika (16).

Pri človeku in živalih nastaja melanin iz tirozina s pomočjo encima tirozinaze. Pri tem lahko nastanejo melanini iz skupine eumelaninov ali feomelaninov (24).

4.1 Sinteza melanina v glivnih celicah

Za razliko od živali, kjer poteka sinteza melanina v melanocitih, glive sintetizirajo melanine v citoplazmi, od koder se prenesejo v celično steno ali pa izločijo kot ekstracelularni polimeri (22). V številnih glivah in drugih mikroorganizmih nastaja melanin iz tirozina preko 3,4-dihidroksifenilalanina (DOPA), v *Bazidiomicetah* (prostotrosnice) preko γ-glutaminil-3,4-dihidroksibenzena (GDBH) ali kateholov in pri *Askomicetah* (odprtotrosnice) in sorodnih *Deuteromicetah* preko 1,8-dihidroksinaftalena (DHN) (22).

Čeprav obstaja več različnih tipov glivnih melaninov, številne temno rjavo in črno melanizirane glive, ki so patogene za rastline in/ali človeka, sintetizirajo pigmente iz acetata po 1,8-dihidroksinaftalen (DHN)-melaninski poti (9).

Sinteza melanina se začne s poliketidno-sintazo, ki v večstopenjski reakciji pretvori acetat v 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen (slika 2), le-tega pa tetrahidroksinaftalen-reduktaza reducira do scitalona. Scitalon scitalon-dehidrataza pretvori v 1,3,8-trihidroksinaftalen, čemur sledi redukcija do vermelona s trihidroksinaftalen-reduktazo. Z odcepom vode s pomočjo vermelon-dehidrataze nastane iz vermelona 1,8-dihidroksinaftalen (22). Sledi končna stopnja sinteze melanina - oksidacija 1,8-dihidroksinaftalena v melanin, ki naj bi jo kataliziral encim lakaza, vendar pa sam mehanizem polimerizacije še ni pojasnjen (25).

Poznane so številne za človeka patogene glive, ki sintetizirajo melanin po poliketidni poti: *Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Alternaria alternata, Cladosporium carionii, Curvularia lunata, Exophiala jeanselmei, Exophiala dermatidis, Fonsecaea compacta, Fonsecaea pedrosoi, Hendersonula toruloidii, Phaeoannellomyces werneckii, Phialophora richardsiae, Phialophora verrucosa, Sporothrix schenckii, Wangiella dermatidis* in *Xylohypha bantiana* (10, 17, 26).

4.2 Inhibicija biosinteze melanina

Magnaporthe grisea (anamorf *Pyricularia oryzae*) in *Bipolaris oryzae* sta znani povzročiteljici rje na rižu. Ker predstavlja omenjena bolezen velik ekonomski problem, so bile v preteklosti opravljene številne raziskave, ki so ugotavljale mehanizem nastanka te bolezni ter iskale

možne rešitve, ki bi zmanjšale njene razsežnosti. Za virulentnost teh gliv naj bi bil odgovoren melanin, ki ga sintetizirajo po 1,8-dihidroksinaftalenski poti (DHN-melanin) (27, 28, 29). Pri sintezi melanina po 1,8-dihidroksinaftalenski poti sodelujejo 4 encimi: poliketidna-sintaza, 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen-reduktaza, 1,3,8-trihidroksinaftalen-reduktaza (THNR) in scitalon-dehidrataza (22). Encimi, ki sodelujejo pri sintezi glivnega melanina, so zanimive tarče za razvoj novih antimikotičnih učinkovin, saj biosinteza DHN-melanina v gostiteljevih (rastlinskih oz. živalskih) celicah ne poteka in bi na ta način dosegli njihovo selektivnost.

Najbolj raziskani tarči v biosintetski poti melanina sta THNR in scitalon-dehidrataza, ki sodelujeta v dveh zaporednih reakcijah. Poznani so trije komercialno dostopni inhibitorji THNR – triciklazol, pirokvilon in ftalid (slika 3), v uporabi pa je tudi karpropamid, inhibitor scitalon-dehidrataze (22, 30).

Vsi našteti inhibitorji se uporabljajo kot fungicidi, na tržišču pa še vedno ni nobenega antimikotika. Triciklazol z inhibicijo sinteze melanina stanjša celično steno v glivnih apresorijskih celicah in s tem prepreči penetracijo v gostitelja, ko pa se enkrat penetracija začne, je učinkovitost triciklazola nižja. Inhibitorjem sinteze melanina zato pravimo tudi "antipenetranti".

5 Sklep

Potreba po novih protiglivnih učinkovinah se pojavlja predvsem zaradi razvoja rezistence na trenutno dostopne antimikotične učinkovine in zaradi njihovih številnih neželenih učinkov. Pojavlja se vedno več novih vrst patogenih gliv, ki so odporne tudi na kombinirano antimikotično zdravljenje. Zaradi naraščanja glivičnih infekcij so raziskave usmerjene v razvoj novih protiglivnih učinkovin vse bolj pomembne. Iščemo predvsem učinkovine z novim prijemališčem delovanja in selektivnim učinkom. Med njimi so tudi inhibitorji sinteze melanina.

6 Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. In: Pharmacology. 5th Ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 2003; 666-671.
2. Gubina M, Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002; 457-499.
3. http://microbiology.mtsinai.on.ca/mig/defungi/index.shtml (maj 2007)
4. Revankar SG. Therapy of infections caused by dematiaceous fungi. Expert Rev Anti Infect Therapy 2005; 3 (4): 601-612.
5. Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA et al. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin Infect Dis 2002; 34: 467-476.
6. Milam CP, Fenske NA. Chromoblastomycosis. Dermatol Clin 1989; 7 (2): 219-225.
7. Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. Trans R Soc Trop Med Hyg 2004; 98 (1): 3-11.
8. Revankar SG, Sutton DA, Rinaldi MG. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. Clin Infect Dis 2004; 38: 206-216.
9. Polak A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses 1989; 33 (5): 215-224.
10. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev 2000; 13 (4): 708-717.
11. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (11): 3519-3528.
12. Larsson BS. Interaction between chemicals and melanin. Pigment Cell Res 1993; 6 (3): 127-133.
13. Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its sucseptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38 (11): 2648-2650.
14. Yoshida K, Akaike T, Doi T et al. Pronounced enhancement of •NO-dependent antimicrobial action by an •NO-oxidizig agent, imidazolineoxyl N-oxide. Infect Immun 1993; 61 (8): 3552-3555.
15. Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors af macrophage-mediated cytostasis. Infect Immun 1991; 59 (7): 2291-2296.
16. Plonka PM, Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotehnological and medical aspects. Acta Biochim Pol 2006; 53 (3): 429-443.
17. Martinez RR, Wheeler M, Plata AG et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect Immun 2000; 68 (6): 3696-3703.
18. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol 2000; 3: 354-358.
19. Brakhage AA, Langfelder K, Wanner G et al. Pigment biosynthesis and virulence. Contrib Microbiol 1999; 2: 205-215.
20. Walter H, Graham LL, Krob EJ, Hill M. Correlation between phagocytic and membrane surface properties reflected by partitioning of human peripheral blood monocytes in two-polymer aqueous phases. Biochim Biophys Acta 1980; 602 (2): 309-322.
21. Deising HB, Werner S, Wernitz M. The role of fungal appressoria in plant infection. Micr Infect 2000; 2: 1631-1641.
22. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and funtions of fungal melanins. Ann Rev Phytopathol 1986; 24: 411-451.
23. Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. Pigment Cell Res 2006; 19: 572-594.
24. Westerhof W. The discovery of the human melanocyte. Pigment Cell Res 2006; 19 (3): 183-193.
25. Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: a review. Can J Microbiol 1998; 44: 1115-1136.
26. Lanišnik Rižner T, Wheeler MH. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). Can J Microbiol 2003; 49: 110-119.
27. Thompson JE, Basarab GS, Andersson A et al. Trihydroxynaphthalene reductase from *Magnaporthe grisea*: Realization of an active center inhibitor and elucidation of the kinetic mechanism. Biochemistry 1997; 36: 1852-1860.
28. Kihara J, Moriwaki A, Ito M et al. Expressin of *THR1*, a 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase gene involved in melanin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, is enhanced by near-ultraviolet radiation. Pigment Cell Res 2004; 17: 15-23.
29. Jordan DB, Basarab GS, Liao DI et al. Structure-based design of inhibitors of the rice blast fungal enzyme trihydroxynaphthalene reductase. J Mol Graph Model 2001; 19: 434-447.
30. Kurahashi Y, Sakawa S, Kinbara T et al. Biological activity of carpropamid (KTU 3616): A new fungicide for rice blast disease. Nipp Noy Gakka 1997; 22 (2): 108-112.

SALUS
SALUS, Ljubljana, d.d., Mašera-Spasićeva ul. 10, 1000 LJUBLJANA, tel. 01 58 99 100, faks: 01 56 81 022

Hiprerprolaktinemija pri antipsihotični terapiji

Hyperprolactinemia in antipsychotic therapy

Matej Kravos, Ivan Malešič

Povzetek: Hiperprolaktinemija je pogosta posledica zdravljenja z antipsihotičnimi zdravili oseb z duševnimi motnjami. V raziskavi smo vključili 128 oseb (90 moških in 38 žensk) s psihotično motnjo, ki so vsaj mesec dni prejemali isto(a) antipsihotično(a) zdravilo(a). Koncentracijo prolaktina smo določali z enkratnim odvzemom krvi ob 8 uri zjutraj z reagentnim kompletom firme Abbott Laboratories. Preiskovanci so izpolnili vprašalnik o spolnosti, zdravstveno stanje pa je bilo ocenjeno s pomočjo lestvic. Večina preiskovancev (80,5%) je prejemala eno antipsihotično zdravilo, največ olanzapin in risperidon. Povprečna vrednost prolaktina moških je bila 37,45mg/L in žensk 87,92mg/L. 71,09% preiskovancev je imelo zvišane vrednosti prolaktina, 30,47% celo nad 60 mg/L. Kot najmanj neugodna izbira glede hiperprolaktinemije so bili klozapin, kvetiapin in olanzapin. Vrnjenih je bilo le 28,1% vprašalnikov preiskovancev in ocenjevalcev. Zaradi preskromnega odziva bolj podrobne analize ni bilo mogoče izvesti. Hiperprolaktinemija je pogost zaplet zdravljenja z antipsihotičnimi zdravili, vendar novejša atipična antipsihotična zdravila že omogočajo njen boljši nadzor. Predlagamo redne kontrole koncentracije prolaktina v serumu ob pojavu kliničnih znakov v fazi akutnega zdravljenja in zaradi ugotovljene pogostnosti vsaj 2 krat letno kontrolo pri tistih na vzdrževalni terapiji. Potrebne so še nadaljnje, bolj poglobljene raziskave na tem področju.

Ključne besede: *hiperprolaktinemija, prolaktin, antipsihotično zdravilo, psihoza.*

Abstract: Antipsychotic drugs in persons with mental illness frequently cause hyperprolactinemia. Our research has been done on 128 psychotic subjects (90 male and 38 female) who were on the same antipsychotic drug(s) for at least one month. On the Abbott Laboratories reagent kit we have determined the prolactin concentration in serum from one blood draw at 8 o'clock in the morning. Subjects have filled the questionnaire about sexuality. For the evaluation of an overall functioning we have used psychiatric evaluation scales. The majority of subjects (80.5%) were medicated with one antipsychotic drug only, mostly on olanzapine and risperidone. The mean prolactin value was 37.45mg/L and 87.92mg/L in men and women, respectively. We have found increased prolactin levels in 71.09% of subjects, what is more, there were 30.47% of them with levels over 60 mg/L. Clozapine, olanzapine and quetiapine were the least problematic alternatives regarding hyperprolactinemia. Only 28.1% of questionnaires and scales were returned. We were unable to do a more precise analysis, because of a too moderate response. The newer atypical antipsychotic drugs give us a better control over hyperprolactinemia, one of most frequent side effects. We suggest regular serum prolactin level control in patients in the acute treatment phase and at least twice a year in those on maintenance antipsychotic therapy because of found out frequency. The further and more in-depth research is needed on the subject.

Key words: *hyperprolactinemia, prolactin, antipsychotic drug, psychosis.*

1 Uvod

1.1 Shizofrenija in ostale psihotične motnje

S pojmom shizofrenija danes pod isto streho opisujemo več kliničnih slik za katere se bo mogoče v prihodnosti izkazalo, da ne sodijo skupaj. Sedanja Mednarodna klasifikacija bolezni pozna naslednje tipe shizofrenije: paranoidno, hebefrensko, katatonično, nediferencirano, rezidualno, enostavno shizofrenijo in postshizofrensko depresijo (1). Prizadene od 0,5 – 1 % prebivalstva (2). Zdravljenje je dolgotrajno in se izvaja z antipsihotičnimi zdravili, izobraževanjem in psihoterapevtskimi ukrepi.

Nekateri psihotični simptomi se lahko pojavljajo izražajo samostojno ali v sklopu drugih duševnih motenj (npr. paranoidne blodnje, motnje razpoloženja s psihotičnimi simptomi in organske blodnjave motnje) (1).

Antipsihotična zdravila shizofrenije ne zdravijo, ker na simptome vplivajo supresivno (1).

Delimo jih na tipična in atipična, čeprav jasne ločitve v definiciji ni (2). Zaradi različnih mehanizmov delovanja se antipsihotična zdravila razlikujejo po svoji učinkovitosti in neželenih učinkih. Tako bolnik kot zdravnik pogosto spregledata težave povezane s hiperprolaktinemijo predvsem zaradi občutkov nelagodja pri pogovoru o spolnosti,

dr. Matej Kravos, dr. med., spec. psih., Psihiatrična bolnišnica Ormož, Ptujska cesta 33, 2270 Ormož
doc. dr. Ivan Malešič, mag. farm., Katedra za klinično biokemijo, Medicinska fakulteta v Mariboru, Univerza v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

vendar zvišane koncentracije prolaktina v serumu lahko privedejo do resnih kratko in dolgoročnih posledic (4).

1.2 Prolaktin

1.2.1. Vloga prolaktina

Prolaktin je polipeptid sestavljen iz 198 aminokislin. Molekulska masa je približno 21500. Kljub svoji velikosti lahko prehaja hematoencefalno bariero. Strukturno je podoben rastnemu hormonu. Na sproščanje prolaktina vplivajo serotonin, tireoliberin (TRH), gonadoliberin (GnRH), histamin, nevrotenzin in endogeni opiati (5). Glavni zaviralni mehanizem je tonično zaviralno delovanje dopamina (6).

Izločanje se uravnava s hipotalamično kratko povratno zvezo (6). Sproža izločanje mleka iz mlečnih žlez, vpliva na delovanje spolnih žlez in, v živalskem svetu, na vedenje samic. Pri moških je odgovoren za nadzor spolnega nagona (5).

Referenčna koncentracija prolaktina v serumu je do približno 20µg/L, ki je pri ženskah višja zaradi neposrednega vpliva estrogena na prolaktinske celice (6) in je odvisna od uporabljene metode določanja.

1.2.2. Hiperprolaktinemija

Vzroki za hiperprolaktinemijo so lahko telesni ali duševni stres, hipoglikemija, zmanjšana funkcija ščitnice, kirurški poseg, ciroza jeter, odpoved ledvic, epileptični napad, uživanje opiatov, draženje prsnih bradavic in čas nosečnosti ter dojenja (5).
Hiperprolaktinemija je najpogostejša endokrina motnja hipofizno – hipotalamične osi. Je funkcionalna motnja in lahko nastane kot posledica adenoma hipofize, primarne odpovedi ledvic ali uživanja antagonistov dopaminskih receptorjev (7). Čeprav akutno stresno stanje zviša raven prolaktina, pa se po dalj časa trajajočem stresu raven ponovno zniža (8). Posledice hiperprolaktinemije so opisane v razpredelnici.

Učinki hiperprolaktinemije:
Kronična hiperprolaktinemija lahko povzroča:
1. spolne motnje: zmanjšan libido, slabša spolna vzdražnost, motnje doživljanja orgazma, motnje erekcije
2. motnje reprodukcije: neredni menstruacijski ciklusi, amenoreja, neplodnost, nižji nivo estrogena, nižji nivo testosterona, izostanek ovulacije, slabša gibljivost semenčic
3. prsi: galaktoreja, povečanje dojk, rak dojk
4. hipogonadizem: poškodbe srčnožilnega endotela
5. duševne motnje: sovražnost, depresija, motnje spomina, poslabšanje psihoz
6. zmanjšana kostna gostota in pojav osteoporoze (2, 9, 10, 11).

1.2.3. Hiperprolaktineminja in shizofrenija: Pred uvedbo terapije z antipsihotičnimi zdravili so koncentracije prolaktina v serumu obolelih za shizofrenijo praviloma v fizioloških mejah in shizofrenija kot bolezen ne vpliva na izločanje prolaktina. Zviša jo šele delovanje antipsihotičnih zdravil. (4).

1.2.4. Hiperprolaktineminja in antipsihotična zdravila

Povezavo med hiperprolaktinemijo in antipsihotičnimi zdravili je leta 1974 prvi odkril Clemens (12). Odvisna je od odmerka in trajanja terapije z antipsihotičnimi zdravili zaradi različnih vezavnih sposobnosti antipsihotičnih zdravil na dopaminske D_2 receptorje hipofize (13).

Antipsihotična zdravila lahko sprožijo hiperprolaktinemijo samo z blokado D_2 receptorjev (14). Pojavi se šele, ko je zasedenih 55-79% D_2 receptorjev striatnega korpusa, medtem ko zasedenosti receptorjev v tuberoinfundibularnem traktu ni mogoče določati (15). Spodnja meja zasedenosti D_2 receptorjev za zdravljenje psihoz je še zmeraj 65% tako za tipična kot za atipična antipsihotična zdravila, ne glede ali so $5HT_{2A}$ receptorji blokirani ali ne (16).

Tipična antipsihotična zdravila (npr. haloperidol, flufenazin, flupentiksol…) imajo nižjo disociacijsko konstanto od dopamina in se trdno vežejo na dopaminske D_2 receptorje (16). Ziprasidon, kvetiapin in klozapin ne povzročajo hiperprolaktinemije (17), medtem ko olanzapin manj kakor haloperidol in risperidon (18). Pomembno višje vrednosti so ugotovili pri ženskah (19).

Po enkratnem podterapevtskem odmerku haloperidola (0,5–1,5mg) se koncentracija prolaktina v serumu lahko zviša že v roku 1–2 ur in se povrne na normalo v 6 urah (15). Pri rednem uživanju pa ostane raven prolaktina zvišana. Stopnja je premosorazmerna zasedenosti dopaminskih receptorjev nad 50% (20). Klozapin verjetno ne viša prolaktina, ker se šibko veže na D_2 receptorje (20-49% zasedenost) (21, 22).

Sulpirid je slabo topen v lipidih in težko prehaja hematoencefalno pregrado. Za doseganje zadovoljivega učinka in primerne blokade D_2 receptorjev je potrebno doseči relativno visoko koncentracijo le-tega v krvi. Ker se tudi hipofizni dopaminergični receptorji nahajajo izven hematoencefalne bariere so izpostavljeni višjim koncentracijam sulpirida. Podobno velja tudi za risperidon, ki ima visoko koncentracijsko razmerje plazma – možgani. Zato risperidon hitreje povzroči hiperprolaktinemijo kot npr. haloperidol, ki ima sicer večjo afiniteto do D_2 receptorjev, a lažje prehaja hematoencefalno pregrado (22).

Po prekinitvi zdravljenja z antipsihotičnimi zdravili ostane relativna hiposenzitivnost dopaminski receptorjev (23). Po ukinitvi dolgotrajnega zdravljenja se koncentracija prolaktina zniža na normalne vrednosti v 48 do 96 urah (6).

1.2.5. Hiperprolaktineminja in ostala zdravila

Nekateri triciklični antidepresivi in nekateri zaviralci ponovnega privzema serotonina s spodbujanjem serotoninskega učinka povzročajo hiperprolaktinemijo. Enak učinek s spodbujanjem dopaminergičnega sistema dosežejo opioidi, kokain in beta endorfini (2), vendar izločanje prolaktina lahko zvišajo tudi opiati, fenfluramin, estrogeni, amoksapin, metildopa in metoklopramid (24).

1.2.6. Hiperprolaktineminja in spolnost

Spolne motnje so pogosta tegoba v splošni populaciji, še posebno pri ljudeh z duševnimi motnjami. Raziskave o spolnih navadah in motnjah so, z izjemo o motnjah potence, pičle (25). Zdravljeni in nezdravljeni oboleli za shizofrenijo imajo manjšo željo po spolnosti in spolnem življenju v primerjavi z zdravimi (26). Oceno dodatno otežuje ločevanje med bolezenskimi znaki in neželenimi učinki zdravil.

Kljub temu pa je najpogostejši vzrok motenj spolnosti oseb s psihozo hiperprolaktinemija po antipsihotični terapiji (27). Motnje se pojavijo pri 80% zdravljenih z risperidonom (5,53mg/dan), olanzapinom (9,44mg/dan), klozapinom (115mg/dan) in haloperidolom (5,8mg/dan) (2) oziroma pri 50% zdravljenih s tipičnimi antipsihotičnimi zdravili, 67% z risperidonom in 27% z olanzapinom (28), 38% s haloperidolom in 18% s kvetiapinom. Izrazitost spolnih motenj je odvisna od odmerkov (haloperidol, olanzapin, risperidon), vendar manj pri atipičnih antipsihotičnih zdravilih. Podatki se med seboj razlikujejo predvsem zaradi prevelikih metodoloških razlik (25).

1.2.7. Hiperprolaktineminja in spolni hormoni

Devetdeset odstotkov žensk z antipsihotično terapijo ima moten menstrualni ciklus, od teh jih je 50% amenoroičnih (15), vendar menstruacijske in ovulacijske težave bolnic s shizofrenijo niso posledica izključno hiperprolaktinemije zaradi terapije z antipsihotičnimi zdravili (29). Amenoreja in anovulacija se načeloma razvijeta pri koncentracijah prolaktina v serumu nad 60 μg/L (24) zaradi zavrtega sproščanja estrogena (2). Rizični faktorji za nastanek galaktoreje so terapija z antipsihotičnimi zdravili, predhodna nosečnost in zdravila proti zanositvi (24), vendar se ta ne razvije pri vseh bolnicah s hiperprolaktinemijo in obratno (2).

2. Namen raziskave

Namen raziskave je bil ugotoviti in opozoriti na problem razširjenosti pojava hiperprolaktinemije pri bolnikih zdravljenih z antipsihotičnimi zdravili, ki so v uporabi pri nas in s pomočjo vprašalnikov oceniti težo, opredeliti posledice, primerjati pojavnost po posameznih zdravilih in predlagati možne rešitve.

3. Materiali in metode

3.1. Vključitveni kriteriji

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije. V raziskavo so bili vključeni bolniki s shizofrenijo, paranoidnimi blodnjami, depresijo s psihotičnimi simptomi in organske blodnjave motnje na zdravljenju v bolnišnici in ambulantno vodeni bolniki. Vključili smo bolnike, ki so vsaj mesec dni prejemali isto(a) antipsihotično(a) zdravilo(a). V raziskavo niso bili vključeni bolniki po kirurških posegih, s cirozo jeter, odpovedjo ledvic, po epileptičnih napadih in uživalci opiatov. Privoljenje so podali ustno, ker so bile preiskave izvedene v okviru rednih kontrol.

3.2. Metode dela

Bolniki so izpolnjevali vprašalnik o spolnosti (Arizona Sexual Expiriences Scale; od 1 – 6). Pri tistih, ki so vprašalnik vrnili je bilo zdravstveno stanje ocenjeno še po lestvicah Clinical Global Impressions (CGI; razpon od ni bolan = 1 do zelo hudo bolan = 7), Global Assessment Scale (GAS; razpon od bolnik potrebuje stalni nadzor = 1 do dobro funkcioniranje = 100) in prilagojeni obliki The Positive and Negative Syndrome Scale (PANNS) po vodilnih simptomih: pozitivni, negativni, afektivni in kognitivni (vsak v razponu od 1 – 7).

Odvzem krvi, za določitev koncentracije prolaktina v serumu, je bil enkraten v sklopu rednih klinično-biokemičnih pregledov. Odvzem krvi je bil po dogovoru izveden ob 8h zjutraj, praviloma je enako veljalo pri ambulantnih pregledih. Vzorce smo vzeli z vacoutainer – sistemom Beckton – Dickinson. Pri centrifugiranju smo v krvnem serumu določili koncentracijo prolaktina takoj ali pa smo jih shranjevali do preiskave pri temperaturi -20°C največ 14 dni.

Koncentracijo prolaktina v serumu smo določili v našem laboratoriju z reagentnim kompletom IM_X Prolactin na aparatu IM_X firme Abbott Laboratories. Princip uporabljenega kompleta je encimskoimunski test na mikrodelcih (Microparticle Enzyme Immunoassay – MEIA). Deklarirane referenčne vrednosti z navedeno metodo so: za moške 1,6 – 17,7μg/L in za ženske 1,4 – 24,2μg/L.

Ker se amenoreja in anovulacija ter večina kliničnih simptomov načeloma razvije pri vrednostih prolaktina v serumu nad 60 μg/L (24), smo dogovorno to mejo postavili kot kritično.

Podatki so bili analizirani in grafično predstavljeni s pomočjo programskega sistema, ki se nahaja v programu Microsoft Office Excel 2003. Izračunani so bili osnovni statistični podatki: frekvenca, srednja vrednost, mediana, standardni odklon, najnižja in najvišja vrednost ter izračunane pogostnost, specifičnost in občutljivost. Uporabljena sta bila parametrični Studentov t-test in χ^2-test.

4. Rezultati

V raziskavo je bilo vključenih 128 preiskovancev, od tega 90 moških in 38 žensk, starih 19 do 77 let. Povprečna starost je bila 39,3 leta, in sicer 39,2 za moške in 39,6 za ženske.

Večina preiskovancev (80,5%) je prejemala eno antipsihotično zdravilo, večina atipično, največ olanzapin oz. risperidon. Kombinacije antipsihotičnih zdravil so bile v večini primerov sestavljene iz tipičnega in atipičnega antipsihotičnega zdravila. Trije preiskovanci so prejemali 3 antipsihotična zdravila sočasno. Preiskovancev s kombinacijami je bilo premalo, da bi jih lahko delili v podskupine.

Povprečni odmerki antipsihotičnih zdravil so bili v sicer običajnih višinah predvidenih za zdravljenje psihoz, razen sulpirida, katerega povprečni odmerek je bil bistveno nižji, zadosten le za protitesnoben učinek. Odmerke smo primerjali tudi s preračunom na ekvivalent klorpromazina, da bi ovrednotili odmerke kombinacij antipsihotičnih zdravil. Odstopata nižji ekvivalent sulpirida ter risperidona in visok ekvivalent haloperidola. Uporabili smo lestvico, ki jo priporoča American Psychiatric Association (APA). V primerih kjer še ni

Tabela 1: Razporeditev preiskovancev po terapiji in povprečni odmerki antipsihotičnih zdravil
Table 1: The patients disposition regarding antipsychotic drugs and mean doses

Odmerki (v mg)	povprečni	SD	najnižji	najvišji	ekvivalent klorpromazina*
Sulpirid (n=7)	171,4	75,6	50	300	285,7
Haloperidol (n=2)	37,5	31,8	15	60	1875,0
Klozapin (n=9)	338,9	143,1	150	600	677,8
Flufenazin (n=5)	13,9	15,4	2	40	695,0
Risperidon (n=27)	4,1	1,6	0,5	8	164,0
Kvetiapin (n=16)	415,6	148	200	600	554,1
Olanzapin (n=37)	11,7	6	5	30	468,0
Kombinacija (n=25)					743,2

* preračunano po smernicah American Psychiatric Association (30)

Tabela 2: Povprečne vrednosti prolaktina glede na terapijo in spol
Table 2: The mean prolactin values according to therapy and sex between different treatment groups

	n- ž	P (SD) - ž	n- m	P (SD) - m	n - sk	P (SD) - sk
sulpirid	3	149,2 (91,6)	4	52,3 (33)	7	92,2 (75,4)
haloperidol	1	50,5	1	95,1	2	72,8 (31,5)
klozapin	2	8,3 (0,5)	7	27,8 (12,7)	9	23,4 (13,9)
flufenazin	1	200	4	33,75 (10,6)	5	67,0 (74,9)
risperidon	13	138,5 (47,8)	14	48,5 (25,7)	27	88,5 (58,3)
kvetiapin	7	33,3 (41,6)	9	20,9 (18,5)	16	26,3 (30,2)
olanzapin	8	48,3 (55,1)	29	24,3 (20,7)	37	29,6 (32)
kombinacija	4	90,1 (67,3)	21	52,1 (39,5)	25	59,0 (45,3)

n = število preiskovancev v posamezni skupini, P = povprečna vrednost prolaktina v µg/L, SD = standardni odklon,
ž = ženske, m = moški, sk = skupaj

Tabela 3:Razlike v serumskih vrednostih prolaktina med skupinami bolnikov zdravljenih z različnimi antipsihotičnimi zdravili
Table 3: The differences in prolactin serum values

t-test	sulpirid	klozapin	risperidon	kvetiapin	olanzapin	kombinacija
sulpirid	/	p<0,05	NS	p<0,05	p<0,05	NS
klozapin	p<0,05	/	p<0,001	p<0,05	NS	p<0,001
risperidon	NS	p<0,001	/	p<0,001	p<0,001	p<0,05
kvetiapin	p<0,05	p<0,05	p<0,001	/	NS	p<0,001
olanzapin	p<0,05	NS	p<0,001	NS	/	p<0,01
kombinacija	NS	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,01	/

NS = ni statistično značilne razlike

Tabela 4:Deleži zvišanih vrednosti prolaktina po posameznih antipsihotičnih zdravilih
Table 4: Percentage of increased prolactin values according to antipsychotic drug

	N	Z	Z (%)	Z>60mg/L	Z>60mg/L (%)
sulpirid	7	6	85,71	4	57,14
haloperidol	2	2	100	1	50,00
klozapin	9	4	44,44	0	0
flufenazin	5	5	100	1	20,00
risperidon	27	26	96,30	17	62,96
kvetiapin	16	7	43,75	3	18,75
olanzapin	37	21	56,76	4	10,81
kombinacija	25	20	80,00	9	36,00
vsi	128	91	71,09	39	30,47

N = število bolnikov zdravljenih s posameznim antipsihotičnim zdravilom, Z = število bolnikov z zvišano vrednostjo prolaktina, Z(%) = delež bolnikov z zvišano vrednostjo prolaktina, Z>60µg/L = število bolnikov z zvišano vrednostjo prolaktina nad 60µg/L, Z>60µg/L (%) = delež bolnikov z zvišano vrednostjo prolaktina nad 60µg/L

natančno določenih razmerij smo upoštevali srednje vrednosti (30). Rezultati so prikazani v tabeli 1.

Povprečna vrednost prolaktina v serumu vseh moških je bila 37,45μg/L, vseh žensk pa 87,92μg/L. Pri vseh skupinah preiskovancev glede na antipsihotična zdravila so bile povprečne vrednosti prolaktina v serumu zvišane. Najvišje smo ugotovili pri preiskovancih zdravljenih s sulpiridom, risperidonom in haloperidolom. V primerjavi med spoloma sta vrednosti prolaktina v serumu preiskovank zdravljenih s sulpiridom in risperidonom z odstopanjem več kot dvainpolkrat višji kakor pri preiskovancih. Samo pri preiskovancih zdravljenih s haloperidolom, klozapinom in flufenazinom smo ugotovili višje zvišane koncentracije kot pri preiskovankah. Štiri preiskovanke so imele vrednosti prolaktina v serumu nad 200 μg/L. Posamezne koncentracije so prikazane v tabeli 2.

Posamezne koncentracije prolaktina v serumu smo primerjali med preiskovanci glede na vrsto antipsihotičnega zdravila. Preiskovancev zdravljenih s haloperidolom in flufenazinom nismo vključili v primerjavo zaradi premajhnih vzorcev. Razlike povprečnih hiperprolaktinemij med preiskovanci zdravljenimi s posameznimi antipsihotičnimi zdravili so tudi statistično pomembno različne (t-test) (tabela 3).

Zvišane vrednosti prolaktina v serumu je imelo 91 preiskovancev (71,09%). Najvišje deleže so imeli preiskovanci zdravljeni s sulpiridom, risperidonom in flufenazinom, najmanj pa tisti zdravljeni s kvetiapinom. Tudi pri deležu preiskovancev, ki so imeli koncentracije prolaktina v serumu višje od 60 μg/L (30,47%) je bil ponovno najvišji delež pri zdravljenih s sulpiridom in risperidonom. Posamezni rezultati so prikazani v tabeli 4.

Deleži hiperprolaktinemij preiskovancev po posameznih antipsihotičnih zdravilih se statistično značilno razlikujejo med risperidon : kvetiapin ($p<0,0001$), risperidon : olanzapin ($p<0,0001$), kvetiapin : kombinacija ($p<0,018$) medtem ko med olanzapin : kombinacija ($p<0,056$), olanzapin : kvetiapin ($p<0,371$) ter risperidon : kombinacija ($p<0,9$) ne. Ostalih kombinacij s χ^2-testom ni mogoče primerjati zaradi premajhnih vzorcev.

Vprašalnik o spolnosti in oceno stanja po ocenjevalnih lestvicah CGI, GAS in PANSS je izpolnilo le 36 (28,1%) bolnikov, od tega 23 moških in 13 žensk. Vzorec je bil premajhen za statistično obdelavo. Od teh je imelo 26 (72,2%) preiskovancev zvišano vrednost prolaktina v serumu. Med skupinama preiskovancev, ki so imeli zvišano oz. referenčno koncentracijo prolaktina v serumu, v rezultatih ocenjevalnih lestvic CGI, GAS in PANSS ni bilo statistično pomembnih razlik. Veliko podatkov o spolnosti je bilo pomanjkljivih. Bolnišnični bolniki so imeli tudi manj možnosti za spolnost v primerjavi z ambulantno obravnavanimi bolniki.

Povprečna ocena po lestvici GAS za 25 preiskovancev je bila 58,6. Splošni klinični vtis (CGI) za 36 preiskovancev je bil povprečno ocenjen s 4,11. Podobni so bili tudi rezultati pri 36 preiskovancih za pozitivne (povprečje 2,86), negativne (povprečje 3,44), afektivne (povprečje 2,78) in kognitivne (povprečje 3,22) simptome. Neželene učinke terapije, razen tistih povezanih s hiperprolaktinemijo, je imelo 15 (41,7%) preiskovancev.

Od 9 preiskovank jih je 5 imelo reden menstrualni ciklus. Glede spolnih odnosov smo zbrali podatke za 28 preiskovancev od katerih jih je v tednu pred preiskavo imelo 8 (28,6%) spolne odnose (od 2 – 12 krat v tednu dni), medtem ko se jih je 6 (21,4%) samozadovoljevalo (od teh sta dva imela tudi spolne odnose). Na Arizona Sexual Experince Scale je 32 (88,9%) preiskovancev ocenilo, da je njihov spolni nagon v povprečju šibek (4,25), težko do zelo težko (4,5) se spolno vzburijo, voljnost oz. erekcija sta slabi do zelo slabi (4,5), orgazem dosežejo težko do zelo težko (4,5) in da jih orgazmi skoraj ne zadovoljijo (3,75).

5. Razprava

Raziskavo smo izvajali leto dni. Na letni ravni je v bolnišnici obravnavanih okrog 250 oseb s psihotičnimi motnjami. Z vključitvenim kriterijem, da morajo bolniki vsaj mesec dni prejemati nespremenjeno terapijo, smo poskušali doseči dovolj stabilno raven učinkovine in zmanjšati vpliv morebitnega predhodnega antipsihotičnega zdravila. Pričakovano je večina preiskovancev prejemala le eno antipsihotično zdravilo. V času izvajanja študije novejši zdravili ziprasidon in aripiprazol še nista imeli dovoljenja za uporabo.

Povprečni odmerki so v okviru priporočil in terapevtskih smernic za zdravljenje psihoz, le odmerki sulpirida so bili na ravni njegovega protitesnobnega delovanja. Višji odmerek haloperidola je bil predpisan preiskovancu z rezistentno obliko kronične duševne motnje. Povprečni odmerek risperidona je bil terapevtski, čeprav je bil njegov ekvivalentni klorpromazinski odmerek z odstopanjem najnižji. Nasprotno pa povprečen odmerek kombinacij ni odstopal od splošno uporabljane višine v klinični praksi.

Vrednosti prolaktina v serumu so bile zvišane pri vseh skupinah preiskovancev glede na antipsihotično zdravilo, kar je preseglo naša pričakovanja saj je večina prejemala novejša atipična antipsihotična zdravila. Kot najbolj neugodni so se izkazali sulpirid, risperidon in kombinacije antipsihotičnih zdravil. Pri klozapinu, kvetiapinu in olanzapinu smo ugotovili manjša zvišanja serumske vrednosti prolaktina. Najvišja zvišanja smo ugotovili pri preiskovankah zdravljenih s sulpiridom oziroma risperidonom, ki težko prehajata hematoencefalno pregrado in dosegata relativno visoko blokado D_2 receptorjev tuberoinfundibularnega sistema.

Najnižje tveganje za povišane ravni prolaktina predstavljajo klozapin, kvetiapin in olanzapin, čeprav so tudi med njimi statistično pomembne razlike v ravneh prolaktina.

Antipsihotična zdravila bistveno bolj zvišajo raven prolaktina pri ženskah kakor pri moških. Zvišanje je odvisno tudi od odmerka antipsihotičnega zdravila. Predpostavljamo, da so ženske tudi zato zdravstveno bolj ogrožene.

Več kot polovica preiskovancev zdravljenih s sulpiridom oz. risperidonom je imela vrednost prolaktina v serumu višjo od 60 μg/L.

To smo postavili kot laboratorijsko ločnico tveganja za pojav kliničnih znakov hiperprolaktinemije, saj se amenoreja načeloma pojavi pri koncentracijah nad 60 µg/L (15).

Ugotovili smo, da 7 antipsihotičnih zdravil oz. njihove kombinacije pri večini preiskovancev zviša koncentracijo prolaktina v serumu, vendar do različnih ravni, kar terapevta opozarja na nevarnost zapletov. Kljub temu pa daje možnost bolj preudarne odločitve, predvsem ob upoštevanju tudi drugih kriterijev za izbor najprimernejšega antipsihotičnega zdravila: ostali neželeni učinki, učinkovitost, oblika… Odzivnost prolaktina na terapijo z antipsihotičnimi zdravili je individualna in zahteva pozornost pri predpisovanju vseh preparatov. Čeprav je bil kvetiapin eden od varnejših antipsihotičnih zdravil, saj sta bila delež in povprečna koncentracija prolaktina v serumu med najmanj zvišanimi, so imeli 3 preiskovanci višjo od 60µg/L. Velja pa ponovno opozoriti na previdnost pri diferencialno diagnostičnem vrednotenju saj je, pri bolnikih zdravljenih z antipsihotičnimi zdravili vzrok za zvišano koncentracijo prolaktina v serumu lahko tudi sočasno obolenje.

Simptomi preiskovancev za katere smo imeli ocene so bili srednje izraženi kar pomeni, da je bilo v splošnem funkcioniranju nekaj težav (npr. malo prijateljev, motnje čustvovanja, depresivno razpoloženje ali nezaupanje v lastne sposobnosti…), vendar so bili preiskovanci na splošno sposobni za samostojno življenje z nekaj socialne pomoči.
Kljub pomanjkljivim podatkom o spolnosti pa lahko sklepamo, da je spolno življenje oseb z antipsihotično terapijo manj kvalitetno in jih dodatno stigmatizira. Vzorec je bil premajhen, da bi lahko sklepali koliko je k temu prispevala terapija. Spolnost je bila zavrta pri preiskovancih na vseh antipsihotičnih preparatih.

Bolj poglobljene analize povezav neželenih učinkov s posameznimi zdravili ni bilo mogoče podati, zaradi preskromnega odziva preiskovancev in zdravnikov na anketo in ocenjevalne lestvice. Izpolnjenih in vrnjenih je bilo le nekaj več kakor četrtina vprašalnikov in ocenjevalnih lestvic. Morda sta spolnost ter hiperprolaktinemija za preiskovance in zdravnike nelagodni in diagnostično pozabljeni temi, čeprav prolaktin zvišujejo vsa antipsihotična zdravila. Ker je bila velika večina preiskovancev v času izvajanja študije v bolnišnici, je razumljivo, da so bile njihove spolne navade v tem obdobju omejene. Če je še pred 10. leti, ob uvajanju atipičnih antipsihotičnih zdravil veljalo prepričanje, da vsa tipična antipsihotična zdravila zvišujejo koncentracijo prolaktina v serumu in je zato nima pomena kontrolirati smo danes prepričani o nasprotnem. Z antipsihotičnimi zdravili povzročena hiperprolaktinemija ni več nerešljiv zaplet. Kvetiapin, olanzapin in klozapin, ter glede na podatke iz literature tudi aripiprazol ter ziprasidon, so manj neugodna izbira. Pri tem pa je potrebno merjenje koncentracije prolaktina v serumu v serumu in nadzor nad pojavom posledic hiperprolaktinemije. Nadzor je toliko bolj pomemben, ker je zdravljenje z atipičnimi zdravili dolgotrajno, lahko traja tudi vrsto let. Prav tako bolniki pogosto opustijo predpisano terapijo, velikokrat prav zaradi neželenih učinkov. Verjetno sta marsikateri nepojasnjeni vznemirjenost in nasilnost, opredeljeni kot poslabšanje psihotičnega stanja, le posledici hiperprolaktinemije. Diferencialno diagnostično bi kontrola koncentracije prolaktina v serumu v podobnih stanjih morda pomagala k hitrejši in predvsem manj boleči umiritvi simptomov.

6 Sklep

Z antipsihotičnimi zdravili pogojena hiperprolaktinemija predstavlja pogost klinični problem, s katerim se sreča večina zdravnikov družinske medicine in psihiatrov. Nepojasnjeni pojav vznemirjenosti in nasilnosti v akutnih fazah zdravljenja ter pojav motenj spolnosti in reprodukcije v fazah preprečevanja ponovitev psihotičnih epizod zahtevajo diferencialno diagnostično obdelavo. Dokler ni bilo možnosti uporabe novih antipsihotičnih zdravil se niti ni poskušalo spremljati s hiperprolaktinemijo povezanih stranskih učinkov antipsihotikov, ker ni bilo ustreznih zamenjav. Ugotavljamo, da se hiperprolaktinemija pri nekaterih bolnikih lahko spregleda ali neustrezno obravnava. Zato na osnovi dobljenih podatkov predlagamo redne kontrole koncentracije prolaktina v serumu zdravljenih z antipsihotičnimi zdravili ob sumih na pojav znakov hiperprolaktinemije in vsaj 2 krat letno pri tistih na vzdrževalni terapiji zaradi ugotovljene pogostnosti.

Nadalje je potrebna tudi bolj obsežna in poglobljena raziskava o vplivu in posledicah hiperprolaktinemije pri bolnikih zdravljenih z antipsihotičnimi zdravili.

7 Okrajšave

APA - American Psychiatric Association, cAMP - ciklični adenozin monofosfat, CGI - clinical global impressions, D - dopamin, GAS - global assessment scale, GnRH - gonadoliberin, 5HT - 5 hidroksi-triptamin, PANSS - The Positive and Negative Syndrome Scale, TRH - tireoliberin.

8 Literatura

1. Žvan V. Shizofrenija, shizotipske in blodnjave motnje. V: Tomori M., Ziherl S. Psihiatrija. Ljubljana: Litera picta, Medicinska fakulteta, 1999: 169-205.
2. Halbreich U, Kinon BJ, Gilmore JA, Kahn LS. Elevated prolactin levels in patients with schizophrenia: mechanisms and related adverse effects. Psychoneuroendocrinology. 2003; 28 Suppl 1: 53-67.
3. Kores-Plesničar B. Antipsihotiki. V: Kores-Plesničar B. Osnove psihofarmakoterapije. Maribor: Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, 2007: 45-73.
4. Maguire GA. Prolactin elevation with antipsychotic medications: mechanisms of action and clinical consequences. J Clin Psychiatry. 2002; 63 Suppl 4: 56-62.
5. Werder v. K. Prolactin (PRL). In: Thomas L. Labor und Diagnose. 6. Aufl. Frankfurt/Main; TH – Books Verlagsgesellschaft Gmbh, 2005: 1472-1477.
6. Pfeifer M. Bolezni endokrinih žlez V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. Interna medicina. 3. izdaja. Ljubljana: Litera picta, 2005: 794-896.
7. Kinon BJ, Gilmore JA, Liu H, Halbreich UM. Hyperprolactinemia in response to antipsychotic drugs: characterization across

comparative clinical trials. Psychoneuroendocrinology. 2003; 28 Suppl 2: 69-82.
8. Arana G, Boyd AE 3rd, Reichlin S, Lipsitt D. Prolactin levels in mild depression. Psychosom Med. 1977; 39:193-197.
9. Crawford AM, Beasley CM Jr, Tollefson GD. The acute and long-term effect of olanzapine compared with placebo and haloperidol on serum prolactin concentrations. Schizophr Res. 1997; 26: 41-54.
10. Ataya K, Mercado A, Kartaginer J, Abbasi A, Moghissi KS. Bone density and reproductive hormones in patients with neuroleptic-induced hyperprolactinemia. Fertil Steril. 1988; 50: 876-881.
11. Becker D, Liver O, Mester R, Rapoport M, Weizman A, Weiss M. Risperidone, but not olanzapine, decreases bone mineral density in female premenopausal schizophrenia patients. J Clin Psychiatry. 2003; 64: 761-766.
12. Clemens JA, Smalstig EB, Sawyer BD. Antipsychotic drugs stimulate prolactin release. Psychopharmacologia. 1974; 40:123-127.
13. Turrone P, Kapur S, Seeman MV, Flint AJ. Elevation of prolactin levels by atypical antipsychotics. Am J Psychiatry. 2002; 159: 133-5.
14. Green AI, Brown WA. Prolactin and neuroleptic drugs. Endocrinol Metab Clin North Am. 1988; 17: 213-23.
15. Naidoo U, Goff DC, Klibanski A. Hyperprolactinemia and bone mineral density: the potential impact of antipsychotic agents. Psychoneuroendocrinology. 2003; 28 Suppl 2:97-108.
16. Seeman P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. Can J Psychiatry. 2002; 47: 27-38.
17. Goff DC, Posever T, Herz L, Simmons J, Kletti N, Lapierre K, Wilner KD, Law CG, Ko GN. An exploratory haloperidol-controlled dose-finding study of ziprasidone in hospitalized patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. J Clin Psychopharmacol. 1998; 18: 296-304.
18. Tran PV, Hamilton SH, Kuntz AJ, Potvin JH, Andersen SW, Beasley C Jr, Tollefson GD. Double-blind comparison of olanzapine versus risperidone in the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders. J Clin Psychopharmacol. 1997; 17: 407-418.
19. David SR, Taylor CC, Kinon BJ, Breier A. The effects of olanzapine, risperidone, and haloperidol on plasma prolactin levels in patients with schizophrenia. Clin Ther. 2000; 22:1085-1096.
20. Nordström AL, Farde L. Plasma prolactin and central D2 receptor occupancy in antipsychotic drug-treated patients. J Clin Psychopharmacol. 1998; 18: 305-310.
21. Markianos M, Hatzimanolis J, Lykouras L. Neuroendocrine responsivities of the pituitary dopamine system in male schizophrenic patients during treatment with clozapine, olanzapine, risperidone, sulpiride, or haloperidol. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2001; 251: 141-146.
22. Bowden CR, Voina SJ, Woestenborghs R, De Coster R, Heykants J. Stimulation by risperidone of rat prolactin secretion in vivo and in cultured pituitary cells in vitro. J Pharmacol Exp Ther. 1992; 262: 699-706.
23. Ettigi P, Nair NP, Lal S, Cervantes P, Guyda H. Effect of apomorphine on growth hormone and prolactin secretion in schizophrenic patients, with or without oral dyskinesia, withdrawn from chronic neuroleptic therapy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1976; 39: 870-876.
24. Hamner MB, Arana GW. Hyperprolactinemia in antipsychotic-treated patients. CNS Drugs 1998; 10: 209-222.
25. Bobes J, Garc A-Portilla MP, Rejas J, Hernandez G, Garcia-Garcia M, Rico-Villademoros F, Porras A. Frequency of sexual dysfunction and other reproductive side-effects in patients with schizophrenia treated with risperidone, olanzapine, quetiapine, or haloperidol: the results of the EIRE study. J Sex Marital Ther. 2003; 29: 125-147.
26. Coward DM. General pharmacology of clozapine. Br J Psychiatry 1992; 160 (suppl 17): 5-11.
27. Petty RG. Prolactin and antipsychotic medications: mechanism of action. Schizophr Res. 1999; 35 Suppl: S67-73.
28. Knegtering H, Blijd C, Boks M. Sexual dysfunction and prolactin levels in patients using classical antipsychotics, risperidone or olanzapine. Schizophr Res 1999; 35: 355-356.
29. Canuso CM, Goldstein JM, Wojcik J, Dawson R, Brandman D, Klibanski A, Schildkraut JJ, Green AI. Antipsychotic medication, prolactin elevation, and ovarian function in women with schizophrenia and schizoaffective disorder. Psychiatry Res. 2002; 111: 11-20.
30. Herz I, Lieberman RP, Lieberman LA, Marder SR, McGlashan TH, Wyatt RJ, Wang P. Practice guidelines for the treatment of patients with schizophrenia. In: McIntyre, Charles SC. American Psychiatric Association practice gudelines for the treatment of psychiatric disorders Compendum 2002. Washington: American Psychiatric Association, 2002: 349-461.

Novice iz sveta farmacije

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

Prvi izdelek za lajšanje laktozne intolerance?

Petra Slanc Može

Na nemškem trgu naj bi se kmalu pojavil prvi izdelek za lajšanje simptomov laktozne intolerance.

Laktoza je mlečni sladkor, laktaza pa encim, s pomočjo katerega se prebavi. Laktaza se pojavi v prebavilih človeškega plodu pozno v nosečnosti. Njene najvišje vrednosti se pojavijo drugi ali tretji dan po rojstvu. Njena raven ostane visoka v času, ko je mleko glavna sestavina prehrane. Pri sesalcih znatno pade, ko se prehrana postopoma spremeni, izjema smo ljudje, kjer laktaza ostane dejavna vse življenje ali pa njena dejavnost oslabi šele v odrasli dobi. Izraz laktozna intoleranca se uporablja za normalno znižanje laktazne aktivnosti pri odraslih, kar pa ni vzrokoslovno pravilno, saj gre za popolnoma normalno in celo prevladujoče stanje v globalni človeški populaciji (več o genetskih osnovah za nastanek laktozne intolerance: Nataša Karas Kuželički, Jana Lukač-Bajalo: Genetika laktozne intolerance odraslih in pogostost polimorfizma -13910C>T v slovenski populaciji. Farm Vestink 2005, 56: 183-187). Laktazna stopnja se določa na osnovi genetike. Ugotovili so namreč, da je njeno delovanje odvisno od etnične in rasne skupine, v katero človek spada. Tako imajo Afričani, Azijci, prebivalci Srednjega Vzhoda in Mediteranci kar 70 odstotkov možnosti, da postanejo laktozno intolerantni, Skandinavci in srednje Evropejci pa le 5 do 15 odstotkov. Večina laktozno intolerantnih oseb doživi znake po zaužitju 50 ali več gramov laktoze, vendar pa so pri nekaterih znaki odsotni tudi po zaužitju zelo velikih količin laktoze. Zaradi zmanjšanja zmožnosti prebavljanja laktoze se poveča tvorba želodčnih sokov, tvorba CO_2, kar lahko privede do bolečin v želodcu, simptomi pa se lahko kažejo tudi kot zaprtje ali pa driska.

Žvečilne tablete vsebujejo 2000 FCC (*Food Chemical Codex*) enot tilaktaze, naravo prisotnega encima, pridobljenega iz glive *Aspergillus oryzae*. Glede na zagotovilo proizvajalca naj bi ena tableta zadostovala za razgradnjo 10 g laktoze (ekvivalent 200 mL polnomastnega mleka). Priporočeni odmerek za odrasle in otroke do tretjega leta starosti pa naj bi znašal 1 do 5 tablet z vsakim obrokom. Tablete so pakirane po 25, 50, 100, 200 tablet, kar po preračunih, če upoštevamo maksimalen odmerek, pet obrokov na dan in največje pakiranje, zadostuje za 8 dni. V primeru, da upoštevamo, da bi zaužili le dva obroka, ki vsebujeta laktozo, pa 20 dni.

Viri

www.otcbulletin.com
N Karas Kuželički, J Lukač-Bajalo. Farm Vestink 2005, 56: 183-187

Statini ne ščitijo pred Alzheimerjevo boleznijo

Andrijana Tivadar

Statini spadajo danes med ene najpogosteje predpisanih in uporabljanih zdravil. Rezultati nekaterih bazičnih raziskav in presečni podatki dajejo vtis, da imajo statini zaščitni učinek pred Alzheimerjevo boleznijo (AB). Rezultati študije, v katero je bilo na začetku vključenih 929 ljudi, s povprečno starostjo 75 let in brez znakov demence, ki je bila opravljena v ZDA in objavljena 16. januarja 2008 *"online"* v reviji *Neurology*, pa kažejo na to, da statini nimajo vpliva na incidenco AB, zmanjšanje kognitivnih funkcij in patološke spremembe v možganih, ugotovljene po smrti. Študija je pokazala, da tudi hidro- oz. lipofilne lastnosti različnih vrst statinov nimajo vpliva na kognitivne funkcije. Udeležence v tej študiji so spremljali v povprečju 12 let, pri čemer so vsako leto ocenili kognitivni status z devetnajstimi nevropsihološkimi testi in uporabo statinov. Od 929 udeležencev jih je na začetku 119 jemalo statine (67 bolj lipofilne, 52 manj lipofilne) in 810 udeležencev ni jemalo statinov. V času trajanja študije je 191 udeležencev razvilo AB, od tega 16 iz skupine, ki je jemala statine. Z analizo, pri kateri so upoštevali starost, spol in izobrazbo ter uporabo statinov, so ugotovili, da statini niso povezani s tveganjem za razvoj AB. Tveganje za razvoj AB je ostalo isto tudi, če so upoštevali prisotnost žilnih bolezni ali prisotnost tveganja za razvoj žilne bolezni. Po smrti so opravili avtopsijo možganov pri 262 udeležencih študije, od katerih je 47 jemalo statine in 215 ne. Raziskovalci so ugotovili, da uporaba statinov v katerem koli obdobju med trajanjem študije (iz poročila o študiji ni razviden čas in trajanje jemanja statinov) nima vpliva na patologijo, značilno za AB, kakor tudi nima vpliva na zmanjšanje števila možganskih kapi.

Raziskovalci priporočajo, da se zdravniki vzdržijo predpisovanja statinov z namenom preprečevanja AB, ker trenutno ni dokazov, ki bi podpirali uporabo statinov v ta namen.

Ne pozabimo: Koristi vseh razpoložljivih statinov za zdravljenje ali preprečevanje srčno-žilnih bolezni so večje kot potencialno tveganje. Za bolnike, ki so bolj dovzetni za pojav neželenih učinkov (predvsem starejši in tisti, ki jemljejo več zdravil hkrati), so zdravniki dolžni preučiti tveganja pri uporabi statinov in morebitne interakcije z drugimi zdravili ter bolnika ustrezno spremljati. S pravilnim predpisovanjem, rednim spremljanjem bolnika in temeljitim izobraževanjem bolnika, se je mogoče izogniti številnim neželenim učinkom, ki so povezani z uporabo statinov.

Vir

Medscape Medical News, 17. 1. 2008

Odkrili novo visokoučinkovito antikancerogeno spojino

Marjetka Smolej

Skupina raziskovalcev iz Centra za raziskave rakavih obolenj v Kaliforniji je pod vodstvom Rebecce in Johna Mooresa identificirala novo učinkovino z močnim antikancerogenim delovanjem. Izolirali so jo iz strupene modrozelene alge iz Južnega Pacifika.

Učinkovino somocistinamid A (ScA) so izolirali iz cianobakterije *L. majuscula*, poznane tudi pod imenom »lasje morske deklice« iz obale Fidžija v Južnem Pacifiku. Učinkovina za samo cianobakterijo ni toksična, temveč se aktivira šele v naših celicah.

ScA zavira ožiljenje tumorja, istočasno pa ima tudi neposreden vpliv na razmnoževanje tumorskih celic. Ko se celice krvnih žil, ki prehranjujejo tumorje aktivirajo in se pričnejo razmnoževati, postanejo še posebej občutljive na ScA.

Dr. Wolf Wrasidlo, član Centra za raziskave rakavih obolenj v Kaliforniji dodaja, da edinstvena struktura učinkovine omogoča uporabo nanotehnologije za izdelavo farmacevtske oblike. Učinkovina se namreč spontano vgrajuje v nanodelce molekularnih velikosti, ki so pomembni za kombinirano, visokotarčno terapijo zdravljenja raka. Struktura učinkovine je dovolj enostavna, da jo znanstveniki lahko tudi sami proizvajajo. Pot do zdravila je sicer še dolga in raziskati bo treba vse učinke nove učinkovine.

Slika: Razpad mikrožilja pod vplivom ScA

Vir

http://www.sciencedaily.com/releases/2008/02/080211172554.htm

FDA opozarja na neželene učinke aplikacije botulinskega toksina A

Borut Štrukelj

Uporaba botulinskega toksina je iz leto v leto večja, saj se uporablja že petnajst let v medicini in korekcijski kirurgiji. Botulinski toksin blokira delovanje mišic in živčnih vlaken. Njegov učinek je reverzibilen in izzveni v treh do štirih mesecih po subkutani aplikaciji. V uporabi sta dve vrsti toksina, botulinski toksin A (Botox) in botulinski toksin B (Myobloc), ki sta tako po zgradbi, kot tudi delovanju zelo podobna. Uporabljata se v obliki podkožnih injekcij, predvsem v kozmetične namene. Ameriška agencija za zdravila FDA je sporočila, da so po natančnem pregledu večletnih aplikacij botulinskega toksina ugotovili povečano število primerov z neželenimi učinki, ki se kažejo predvsem kot težje požiranje sline in hrane, splošna telesna šibkost, nastopijo pa lahko tudi težave z dihanjem. Ti znaki nastanejo zaradi sistemskega učinka toksina in so značilni za zastrupitev z botulinskim toksinom. Agencija ugotavlja, da neželeni učinki niso povezani s slabšo kakovostjo učinkovine, pač pa verjetno s prevelikimi odmerki injiciranega botulinskega toksina. Najmočneje izražene neželene učinke so sicer ugotovili pri zdravljenju otroške spastičnosti, torej uporabe botulinskega toksina v medicinski namen, ki pa ni doktrinarno potrjen s strani FDA. Trenutno FDA še zbira podatke o neželenih učinkih botulinskega toksina, zato je FDA izdala le opozorilo o možnem pojavu neželenih učinkov, produkti pa niso umaknjeni s tržišča.

Vir

FDA Press Release, 7. februar 2008

Večja verjetnost samomorov zaradi antiepileptikov

Borut Štrukelj

FDA je potrdila opažanja in izdala opozorilo farmacevtom in zdravnikom, da lahko antiepileptiki, ki jih predpisujejo za zdravljenje epilepsije, migrenskih glavobolov in bipolarnih motenj, povečajo verjetnost samomorov. V študiji, nadzorovani s placebo pripravkom, so ugotavljali vpliv 11 antiepileptičnih učinkovin na pojav samomorilnosti pri bolnikih. Bolniki, ki jim je bil predpisan en od sledečih antiepileptikov: karbamazepin, felbamat, gabapentin, lamotrigin, levetiracetam, oksikarbazepin, pregabalin, tiagabin, topiramat, valproat in zonisamid, so dvakrat pogosteje izkazovali samomorilska dejanja kot preiskovanci v placebo skupini. Tako se je samomorilnost pojavila pri bolnikih, ki so jemali omenjene antiepileptike, v 0,43 odstotkih, pri placebo skupini pa je bil odstotek pol manjši (0,22 %). Marca leta 2005 je za podatke o neželenih učinkih, ki so povezani z večjo verjetnostjo samomorov, FDA zaprosila

proizvajalce vseh enajstih skupin učinkovin. Tako je bilo v nekaj letih izvedenih 199 s placebom nadzorovanih študij, ki so vključevale 27.863 bolnikov, ki so prejemali eno od zdravilnih učinkovin, in 16.029 preiskovancev v placebo skupinah. Vsota vseh študij skupaj je pokazala, da je v skupini bolnikov, ki so prejemali zdravila, prišlo do 105 poskusov samomorov (4 s smrtnim izidom) in 35 poskusov (brez smrtnega izida) pri preiskovancih v placebo skupinah. Največja nevarnost poskusov samomora se je pojavila po prvem tednu jemanja zdravil in se nadaljevala v prvih 24 tednih, ne glede na demografsko pripadnost, starost ali vrsto učinkovine. Bolniki, ki že jemljejo antiepileptike, morajo seveda z jemanjem nadaljevati, pomembno pa je, da se zdravniki in farmacevti zavedajo povečane nevarnosti samomorov in morajo terapijo temu primerno prilagoditi, oziroma porabiti več časa za pogovore z bolnikom in njegovo družino ter spremljajoče dejavnosti ob glavnem zdravljenju.

Vir

FDA Press Release, 31. 1. 2008

1. seminar Društva za laboratorijsko medicino Upravljanje (management) v laboratorijski medicini

Milan Skitek

Spomladi 2007 je bilo ustanovljeno Društvo za laboratorijsko medicino (v nadaljnem besedilu DLM) kot samostojna, prostovoljnain neprofitna rganizacija seb, ki opravljajo ali zastopajo nepridobitno laboratorijsko medicinsko dejavnost ali pa so zainteresirani za napredek in promocijo te pomembne dejavnosti oziroma so njeni uporabniki. DLM bo ščitilo in zastopalo interese laboratorijske medicine, skrbelo za ugled svojih članov in stroke v skladu s kodeksom deontologije v laboratorijski medicini. DLM si je zastavilo številne naloge v smislu:

- izboljšav in konsolidacije stroke,
- aktivnega delovanje pri izobraževanju in vključevanjem v vse pedagoške procese na področju laboratorijske medicine in zdravstva
- povezovanje vseh ključnih akterjev za dosego sinergističnih učinkov razvoja stroke z javnim delovanjem, promocijo, svetovanjem in lobiranjem za izboljšave sistema v smislu zagotavljanja smiselne in učinkovite mreže medicinskih laboratorijev.

7. decembra 2007 se je DLM predstavilo s 1. seminarjem »Upravljanje (management) v laboratorijski medicini«. Seminar je bil namenjen vsem profilom delavcev v laboratorijski medicini, še posebej tistim, ki upravljajo stroko na vseh nivojih. Prav tako je bil namenjen vsem, ki so povezani s to pomembno dejavnostjo, od pacientov do širšega zdravstvenega osebja in proizvajalcev-dobaviteljev IVD, da povedo, kaj pričakujejo od naše stroke. Cilji izobraževanja so bili v učinkovitejšem vodenju, inovativnem razvoju in racionalni organizaciji ter boljši povezavi z uporabniki laboratorijske medicine.

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

- upravljanje in vodenje medicinskih laboratorijev s povdarkom na inovativnih spremembah in izboljšavah ter aktivnejšem pristopu do uporabnikov,
- kadrovsko problematiko, vključno s praktičnim usposabljanjem in razvojem na vseh nivojih,
- obravnavo sistema delovanja laboratorijske medicine znotraj zdravstvenega sistema vključno z ekonomiko in financiranjem.

Predavatelji so bili strokovnjaki laboratorijske medicine, predstavniki zdravstvenega sistema in civilne družbe, uporabniki in predstavniki dobaviteljev. Povdarek je bil na interaktivni izmenjavi izkušenj. Simpoziju je prisostvovalo preko 60 udeležencev, med njimi so bili najštevilnejši predstavniki laboratorijske medicine, prisotni pa so bili tudi predstavniki industrije (farmacije in laboratorijske diagnostike). Zahvaljujemo se vsem poslovnim partnerjem, ki so omogočili naše druženje, še posebej Sanolaborju, ki nam je dal na voljo svoje prostore.

Simpozija se bomo spominjali po odličnih predavanjih (http://www.kclj.si/kikkb/seminar_dlm.pdf) in sproščenem ter ustvarjalnem vzdušju. Odzivi udeležencev so bili naklonjeni in predstavljajo nagrado za vse sodelujoče. Predstavljajo pa ti odzivi tudi obveznost za prihodnost, da bodo taki in podobni seminarji postali tradicionalni.

Prof. dr. Borut Štrukelj prejemnik Zoisovega priznanja za pomembne dosežke na področju farmacevtske biotehnologije

Doktor Borut Štrukelj je redni profesor za področje farmacevtske biotehnologije in rastlinske biokemije na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in sodelavec Instituta Jožef Stefan. Sodi med začetnike genskega inženirstva v Sloveniji. Skupaj s sodelavci mu je uspelo določiti zgradbo, to je nukleotidno zaporedje večjega števila genov iz živali, rastlin in gliv. Nekatere tujerodne gene so tudi uspešno vnesli v dednino bakterij in kvasovk ter tako dosegli, da so tvorile tujerodne beljakovine. S sodelavci z Univerze v Wageningenu na Nizozemskem je pripravil transgeno rastlino krompirja, ki je bila odporna proti koloradskemu hrošču in ki so jo mednarodno patentirali. Hkrati je tudi proučeval, kako uporabiti rastline kot bioreaktorje za proizvodnjo pomembnih bioloških zdravilnih učinkovin, na primer steroidnih hormonov. V zadnjem času je raziskovalna skupina profesorja Štruklja s pomočjo farmacevtske družbe Lek-Sandoz razvijala posebno metodo za odkrivanje novih bioloških zdravilnih učinkovin s pomočjo bakteriofagnega prikaza, tržno pa je zanimiva tudi proizvodnja tujerodne sladke beljakovine v mlečno-kislinskih bakterijah. Takšna sladka beljakovina bi kot novo sladilo lahko nadomestila pesni sladkor v prehrambni industriji.

Kot mednarodno priznan znanstvenik, odličen pedagog in organizator je profesor Borut Štrukelj cenjen strokovnjak v vrsti mednarodnih in domačih strokovnih institucij s področja farmacije in zdravstva, kot je na primer londonska Agencija za zdravila v Evropski uniji.

Prejemnika Univerzitetne Prešernove nagrade – Matevž Prijatelj in Petra Ekar

Matevž Prijatelj, mag. farm., je bil rojen 16. aprila 1982. Po končani osnovni šoli in gimnaziji Želimlje (1996-2000) je vpisal študij farmacije, ki ga je zaključil leta 2007. Poleg vestnega in uspešnega študija se je izredno aktivno udejstvoval z delom v študentskih in strokovnih organizacijah. V letu 2007 je opravil obvezno pripravništvo v lekarni in strokovni izpit na Ministrstvu za zdravje. Trenutno je zaposlen na Fakulteti za farmacijo, kjer je v študijskem letu 2007/08 vpisal enovit doktorski študij Biomedicine, smer Klinična biokemija in laboratorijska biomedicina.

Nagrajenec Matevž Prijatelj je raziskovalno nalogo z naslovom UPORABA FLUORESCENČNE MIKROSKOPIJE ZA UGOTAVLJANJE CELIČNEGA PROCESIRANJA REKOMBINANTNIH PROTEINOV opravljal na Fakulteti za farmacijo v sodelovanju s farmacevtsko družbo Lek d.d., Oddelkom za Razvoj rekombinantnih učinkovin, pod mentorstvom izr. prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan.
Namen raziskovalne naloge je bil doprinesti k reševanju kompleksnega vprašanja posttranslacijske modifikacije in celičnega procesiranja novega rekombinantnega proteina v farmacevtski proizvodnji.

Avtor je z uporabo najsodobnejših tehnologij celične biologije, kot je primer fluorescenčno mikroskopiranje v realnem času uspel dokazati subcelično lokalizacijo in kopičenje posameznih podenot rekombinantnega proteina.

Raziskava predstavlja aplikacijo najsodobnejših tehnologij v slovenskem prostoru, je aplikativno usmerjenja in doprinaša k aktivnemu sodelovanju med univerzo in industrijo.

Petra Ekar, mag. farm. se je rodila leta 1982 v Kranju, osnovno šolo obiskovala v Lescah in kot farmacevtski tehnik leta 2001 maturirala. Diplomirala je leta 2007 na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom asistentke Mojce Lunder. Še isto leto je opravila pripravništvo v Lekarni Ljubljana ter ga uspešno zaključila s strokovnim izpitom na Ministrstvu za zdravje. Trenutno je zaposlena v Lekarni Ljubljana.

OPTIMIZACIJA SELEKCIJE VISOKO-AFINITETNIH FAGNIH KLONOV IZ PEPTIDNO-PREDSTAVITVENE KNJIŽNICE

Bakteriofagne peptidno-predstavitvene knjižnice uporabljamo za iskanje novih zdravil, ki se vežejo na želeno tarčo. Nagrajenka je selekcije iz teh knjižnic izvajala s pomočjo modelne tarče – streptavidina, na katerega se dobro vežejo peptidi, ki vsebujejo zaporedje aminokislin HPQ. Kadar specifični ligand za izpodrivanje fagov iz tarče ni na voljo uporabljamo nespecifično elucijo. Nagrajenka je ugotovila, da niti ekstremno močna nespecifična elucija (pH 2,2), ki se običajno uporablja v tehnologiji bakteriofagnega prikaza, s tarče ne odstrani najmočneje vezanih fagov. Uvedla je nov način nespecifične elucije, ki združuje uporabo pufra z nizkim pH in ultrazvoka. Nova metoda izredno uspešno odstrani najmočneje vezane bakteriofagne klone, bodisi tako, da prekine interakcijo med fagom in tarčo, bodisi tako, da tarčo skupaj s fagom odstrani s trdne podlage. V kombinaciji z močnim predhodnim spiranjem šibko vezanih in nevezanih fagov ta nova metoda omogoči selekcijo ustreznega faga, z močno afiniteto do tarče, že v eni sami selekcijski stopnji.

Izr. prof. dr. Janez Kerč – prejemnik Novartisove globalne nagrade za raziskave – VIVA

Janez Kerč je eden od glavnih pobudnikov – pravzaprav gonilna sila – različnih inovativnih pristopov v Leku, ki so povezani z razvojem naprednih tehnoloških osnov in končnih farmacevtskih oblik. V Leku vodi področje NDS (Novi dostavni sistemi), odkar je bilo to leta 2002 ustanovljeno in je uvedel številne napredne tehnologije, ki vključujejo trdne disperzije, aglomeracijo s talinami, suhe mikroemulzije, nanotehnologije, posebne tehnike kapsuliranja in različne evalvacijske metode (npr. gama-scintigrafijo). Njegove inovativne ideje so bile realizirane v mnogih odličnih izdelkih, ki se zdaj tržijo po vsem svetu.

Osredotočen je predvsem na raziskave in razvoj novih tehnoloških osnov in razvoj farmacevtskih izdelkov na njihovi osnovi. Dosedanji dosežki teh raziskav vključujejo: plavajoče kapsule s podaljšano želodčno retencijo, obložene delce in mikrodelce, mikrokapsule, nanodelce in mikroemulzije.

Njegov znanstveni ugled je nesporen tako v Leku kot zunaj njega, v Sandozu in Novartisu, saj je uspešno sodeloval tudi pri nekaterih ključnih projektih Novartis Pharma. Pomembnost njegovega inovativnega dela se odraža v velikem številu prijavljenih patentov, pa tudi znanstvenih objav ter prispevkov in predavanj na konferencah.
Lek in Sandoz sta s pomočjo njegovega prispevka prepoznana kot resnično inovativna subjekta na visoko konkurenčnem generičnem trgu.

Za izredne znanstvene dosežke je 21. novembra 2007 v Holzkirchnu prejel Novartisovo globalno nagrado za raziskave VIVA (Vision/vizija, Innovation/inovacija, Values & Achievement/vrednote in dosežki), s katero že osmo leto zapored odlikujejo vodilne NovartisoveSandozove znanstvenike.

Prejemniki Novartisovih nagrad za izredne znanstvene dosežke, skupaj z vodstvom podjetja Sandoz (tretji z desne, Janez Kerč)

Slovensko farmacevtsko društvo
čestita vsem prejemnikom priznanj in nagrad

Jelki Brenčič, mag. farm., v slovo

Poslovili smo se od naše drage prijateljice, farmacevtke in upravnice, ki je vse življenje posvetila svoji domači - vrhniški lekarni.

Mag. farm. Jelka Brenčič, se je rodila 28. oktobra 1925 v uradniški družini na Vrhniki. Tu je obiskovala osnovno šolo. Gimnazijo je zaključila v Ljubljani. Po maturi se je 1945 vpisala na študij farmacije, ki je bil takrat prvič organiziran v Ljubljani. Tu je ostala le štiri semestre. Jeseni so študentje farmacije morali študij nadaljevati v Zagrebu. 14. marca 1950 je diplomirala in bila zaradi takratnega pomanjkanja kadrov že maja meseca istega leta z dekretom poslana v lekarno Solkan. V začetku 1951. leta je bila premeščena v Okrajno lekarno Dobrovo v Brdih. Novembra istega leta je nastopila delo farmacevtke v lekarni Sežana, kjer je ostala do aprila 1954. Takrat jo je Ministrstvo za zdravstvo poslalo na Vrhniko na mesto upravnice lekarne, kjer je ostala, vsa predana svojemu poklicu, vse do svoje upokojitve, 28. junija 1985. Po naključjih, ki so se ji v življenju večkrat dogajala, tudi njeno rojstvo, upokojitev in smrt sovpadajo na 28. dan v mesecu.

Magistra Brenčič spada v generacijo farmacevtov, ki so svoj študij farmacije začeli in končali po drugi svetovni vojni. Takrat so bile razmere težke in tudi ona se je v vrhniški lekarni srečevala z neštetimi kadrovskimi in prostorskimi problemi. Farmacevtov ni bilo dovolj in pogosto je ostajala sama z zadolžitvami, ki jih je reševala kot je vedela in znala, pogosto tudi v svojem prostem času in za ceno odpovedi lastnemu družinskemu življenju. Marsikatero nedeljo in praznik smo jo lahko našli v lekarni in ni bilo malo noči, ki jih je preživela v službenih prostorih. Poleg matične ustanove je morala skrbeti za lekarniško postajo v Borovnici in kasneje so ji v letu 1968 dodatne težave prinesle še pripojene lekarniške enote Cerknice in Logatca.

Bila je član SFD od njegove ustanovitve in še vse do zadnjih dni je zmeraj v Farmacevtskem vestniku z zanimanjem spremljala novice iz društvenega življenja.

Vsem težavam, s katerimi se je srečevala v 35 letih svoje delovne dobe, je bila kos kot zelo odgovorna in vestna upravnica. Svoje delo je rada in z veseljem opravljala. Dela in skrbi ni bilo malo, a ona je to zmogla. Tiha, delovna in razumevajoča je bila prava poosebljena skromnost. Vsi, ki smo jo poznali, vemo, da je svoje poslanstvo ves čas opravljala z dušo in srcem. Kot je bila tiha in skromna pri delu je tiho tudi odšla. » Napotila se je nekam daleč in zapustila za seboj vse solze, veter, dež, vse dvome…«

Veliko nam je dala kot strokovnjak in kot človek. V imenu kolegic in kolegov pa tudi v imenu vseh tistih, ki so kdaj koli bili deležni njene strokovne pomoči ali pa samo njene preproste človeške topline, iskrena hvala.

Tilka Jerič

Navodila avtorjem

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**, kar pomeni, da bodo avtorji oddali najmanj dve verziji besedila:

- prvo verzijo, ki jo uredništvo pošlje najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno in
- končno verzijo.

Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmacevtskem vestniku je zagotovljena tajnost.

Prva verzija

Predstavljajo jo:

- trije, na papir natisnjeni izvodi prispevka, na katerih avtorji niso imenovani, slike in preglednice pa so vključene v besedilo, ter
- prispevek v elektronski obliki.

Avtorji strokovnih člankov priložijo lastnoročno podpisan spremni dopis z naslednjimi podatki:

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi inštitucij, v katerih so zaposleni,
- telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe ter
- izjavo, 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. Rokopisi strokovnih člankov lahko obsegajo največ **20.000** znakov, vključno s presledki, obseg prispevkov za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja je 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.

Vsebina

naj bo sistematično strukturno urejena in **razdeljena na poglavja**. Izvirni raziskovalni članki naj imajo najmanj naslednja poglavja:

- Uvod,
- Materiali in metode,
- Rezultati in razprava,
- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed) in največ 5 ključnih besed v slovenskem in angleškem jeziku
- poglavje Sklep
- poglavje Literatura
- Kazalo vsebine, takoj za povzetkom in ključnimi besedami.

Besedilo

(Times New Roman 12, razmik vrstice 1,5) naj bo obojestransko poravnano.

Slike in preglednice

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

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.

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.
3. Pharm Res 2000; 17 (7): 887–890.
4. Doekler E. Cellulose derivatives. In: Peppas NA, Langer RS. Advances in polymer science 107; Biopolymers I. Springer-Verlag, 1993: 200–262.

Končna verzija

Avtor stokovnega članka prejme po opravljenem recenzijskem postopku najmanj dve strokovni oceni in navodila glede sprejetja v objavo in potrebnih popravkov. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva upošteval in **najkasneje dva tedna po prejetju recenzij** poslal popravljen prispevek v elektronski obliki ter eno natisnjeno verzijo besedila na naslov glavne urednice.

Slike

morajo biti shranjene v ustreznem slikovnem formatu (zaželeno v jpg, bmp), tudi v natisnjeni verziji je potrebno slikovni material priložiti ločeno od besedila, oštevilčeno in označeno s pripadajočimi podnapisi. Fotografije morajo biti posnete z visoko ločljivostjo, najmanj 250 do 300 dpi, v enakih velikostih, kot jih avtor želi objaviti oz. prilagojene obliki revije.

Naslov prispevka

(v slovenskem in angleškem jeziku) in **naslovi** poglavij in podpoglavij naj bodo napisani krepko, vendar z malimi črkami (kakor v stavku).

V končni verziji morajo biti pod naslovom prispevka v slovenskem in angleškem jeziku napisana **polna imena vseh avtorjev** brez nazivov. Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni, je potrebno navesti ločeno na prvi strani. Elektronska in natisnjena verzija morata biti identični.

Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v pisni in elektronski obliki avtorji **pošljejo na naslov**:

dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.
glavna urednica Farmacevtskega vestnika
Tacenska 133 A, 1000 Ljubljana
e-pošta: andrijana.tivadar@siol.net

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 spletni strani: www.sfd.si v pdf obliki.

FD

FARMACEVTIKA - DENTAL

Oskrbujemo lekarne, bolnišnice, zdravstvene domove in veterinarske ustanove po Sloveniji z zdravili, zdravstvenim materialom in dentalnimi izdelki

FARMADENT

FARMADENT d.o.o.
Minařikova ulica 6, 2000 Maribor
Telefon: +386 2 450 28 11
Fax: +386 2 462 20 52
E-mail: info@farmadent.si

Bilobil. In nič vam ne uide iz glave!

Bilobil in Bilobil Forte.
Razvili strokovnjaki iz Krke.

Za boljši spomin in večjo moč koncentracije.

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

www.krka.si

KRKA

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

Pred uporabo natančno preberite navodilo!
O tveganju in neželenih učinkih se posvetujte z zdravnikom ali farmacevtom.