Farm Vestn 2008; 59: 113-164
UDK 615 CODEN FMVTA, SLO ISSN 0014-8229

Farmacevtski vestnik

3

Š T 3 · J U L I J 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. 3 • J U L I J 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

Tretjo številko Farmacevtskega vestnika boste nekateri že brali na dopustu, drugi pa tik pred zasluženimi počitnicami, zato je tudi del vsebine namenjen novim strokovnim spoznanjem v povezavi s poletjem: dva sestavka opisujeta vpliv svetlobe in radikalov na človeški organizem, kakor tudi uporabo varovalnih kozmetičnih izdelkov. Dva prispevka sta namenjena uporabi bioloških dostavnih sistemov za lajšanje in preprečevanje bolezni. Tako lahko v člankih dr. Berleca in dr. Bratkoviča s sodelavci beremo o probiotičnih gensko spremenjenih mlečnokislinskih bakterijah s sposobnostjo dostave bioloških zdravil ali cepiv, kakor tudi o virusih iz skupine bakteriofagov, ki jih kot biološki dostavni sistem lahko uporabimo pri zdravljenju nekaterih bakterijskih okužb. V sestavku o interpolimernih kompleksih bomo spoznali nove tehnološke pristope, dr. Šuškovič pa nas v članku seznanja z obravnavo astme v Sloveniji.

Upam, da se boste z navedenimi patološkimi pojavi in boleznimi seznanjali le v teoriji, z branjem Farmacevtskega vestnika in v miru uživali v dopustniških dnevih in si tako nabrali sveže moči za nove kvalitetne premike v celostnem razvoju slovenske farmacije.

Prof. dr. Borut Štrukelj
Odgovorni urednik

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Reviwe scientific articles

Aleš Berlec, Borut Štrukelj
Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila
Genetically modified lactic acid bacteria as delivery systems for biopharmaceuticals **115**

Matej Pavli, Franc Vrečer, Saša Baumgartner
Interpolimerni kompleksi
Interpolymer complexes **121**

Tomaž Bratkovič, Andrej Preželj
Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi
Bacteriophage therapy **129**

Slavko Pečar
Svetloba, radikali in fotodinamična terapija **135**

Matejka Kumperščak Duh
Uporaba in vrednotenje varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem **138**

Raziskovalni članek – Research article

Nadja Plazar, Barbara Ostanek
Primerjava alelnih frekvenc mutacij ključnih encimov presnove homocisteina med vzorci Slovencev in drugih narodov
Allele frequency of mutations of homocysteine metabolism key enzymes in Slovene population in comparison to that in other populations **143**

Stanislav Šuškovič
Obravnava astme v Sloveniji – prospektivna opazovalna raziskava
Managing of asthma in Slovenia – prospective observational study **151**

Novice iz sveta farmacije **155**

Iz društvenega življenja

33. skupščina SFD **157**

10. jubilejni FarmaSki **161**

Osebne vesti

In memoriam Vladu Vebletu, mag. farm. **163**

Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila

Genetically modified lactic acid bacteria as delivery systems for biopharmaceuticals

Aleš Berlec, Borut Štrukelj

Povzetek: Mlečnokislinske bakterije so že stoletja sestavni del človeške prehrane, zato je njihova varnost splošno priznana. Poleg tega so se v novejšem času visoko razvile tehnike, ki omogočajo rekombinantno izražanje proteinov tudi v mlečnokislinskih bakterijah. Zaradi teh razlogov imajo velik potencial kot poceni in učinkoviti dostavni sistemi za dostavo rekombinantnih proteinov na telesne sluznice, predvsem v prebavnem traktu. V razvoju in študijah na živalih so sistemi za dostavo antigenov (cepiv), dostavo proteinov s fiziološko funkcijo in dostavo DNA z namenom cepljenja. Dostava interlevkina IL-10 pri kronični vnetni črevesni bolezni se je izkazala za najbolj obetavno in je bila uspešno testirana v 1. fazi klinične študije na ljudeh. Pred splošno uporabo bo potrebno odgovoriti na vprašanja o varnosti vnosa genskega materiala, ker gre za gensko spremenjene organizme, ki ne uživajo podpore javnosti.

Ključne besede: *mlečnokislinske bakterije, Lactooccus lactis, rekombinantno izražanje, dostavni sistem, cepivo, IL-10, gensko spremenjeni organizmi.*

Abstract: Lactic acid bacteria have been a part of human diet for centuries and their safety is therefore generally recognised. Apart from that, the techniques that enable recombinant protein expression in lactic acid bacteria have recently developed. This is why lactic acid bacteria could serve as a cheap and efficient delivery system for recombinant protein delivery to body mucosa, especially in gastrointestinal tract. Systems for antigen (vaccine) delivery, delivery of proteins with physiological function and for DNA delivery are under development and in animal testing. The delivery of interleukin IL-10 in inflammatory bowel disease is the most promising and was successfully tested in phase I human clinical trial. Before the widespread use, questions regarding safety of genetic material introduction will have to be answered, since these are genetically modified organisms, which are not well accepted by the general public.

Key words: *lactic acid bacteria, Lactococcus lactis, recombinant expression, delivery system, vaccine, IL-10, genetically modified organisms.*

1 Mlečnokislinske bakterije in rekombinantno izražanje proteinov

Mlečnokislinske bakterije v fermentiranih mlečnih, rastlinskih in mesnih izdelkih že stoletja predstavljajo normalno sestavino človeške prehrane in so poleg kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) industrijsko najpomembnejši mikroorganizmi (1). Zaradi dolgotrajne dokumentirane varne uporabe imajo status GRAS (»splošno priznani kot varni«). Poleg tega številna poročila potrjujejo njihovo dobrodejno delovanje v prebavnem traktu, zato se pogosto dodajajo hrani kot probiotiki. Med mlečnokislinske bakterije uvrščamo rodove *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactococcus in Streptococcus* ter nekoliko bolj obrobne *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Teragenococcus, Vagococcus* in *Weisella (2).* Po fizioloških značilnostih lahko mednje uvrstimo tudi rod *Bifidobacterium,* ki je sicer genetsko nesoroden. V naravi jih pogosto najdemo na razpadajočih rastlinah ali v prebavilih živali.

Mlečnokislinske bakterije spadajo v skupino gram pozitivnih bakterij. So anaerobni ali mikroaerofilni koki ali bacili in ne tvorijo spor. Ker zasedajo isto ekološko nišo, so razvile nekatere skupne metabolne in fiziološke značilnosti. Pomembna značilnost, po kateri so dobile ime je, da kot končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov tvorijo mlečno kislino. Glede na končni produkt metabolizma jih razdelimo v dve skupini. Homofermentativne mlečnokislinske bakterije tvorijo mlečno kislino kot edini ali glavni produkt metabolizma glukoze. Heterofermentativne tvorijo enako množino mlečne kisline, ogljikovega dioksida in etanola. Med fermentacijo pH gojišča zaradi tvorbe mlečne kisline pada. Mlečnokislinske bakterije so relativno odporne

dr. Aleš Berlec, mag. farm., Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija
Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm., Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija; Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

na rast v gojišču s kislim pH. Pri večini vrst se rast ustavi pri pH 4,5. Imajo tudi podobno temperaturno toleranco in ne preživijo pri temperaturi višji od 45 °C. So avksotrofne za številne aminokisline, ki jih morajo zato pridobiti iz okolja. Mlečnokislinske bakterije pogosto proizvajajo antibakterijske peptide bakteriocine, ki predstavljajo prednost pred ostalimi mikroorganizmi, saj so bakterije proizvajalke nanje imune, hkrati pa so toksični za kompetitivne bakterije. Skupna značilnost je tudi, da imajo v nukleotidnem zaporedju genomov nizek delež gvaninov in citozinov (GC), za razliko od nekaterih gram negativnih bakterij (*E. coli)*, kar je pomembno pri heterolognem izražanju genov.

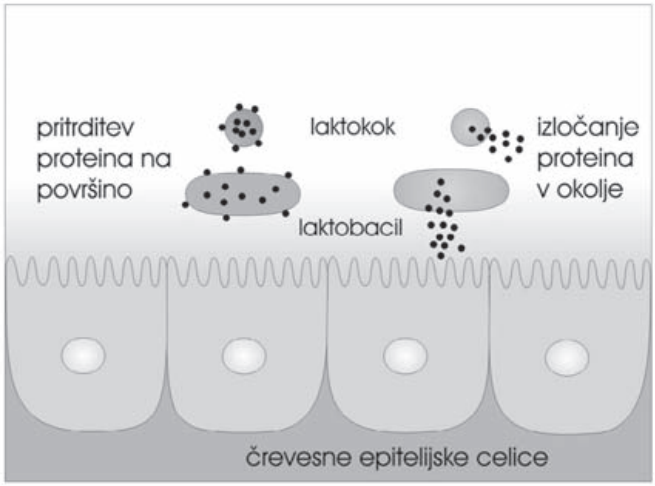
Lactococcus lactis je splošno priznan kot modelna mlečnokislinska bakterija. Zanj obstajajo dobro razvita orodja za gensko manipulacijo (3). V laboratoriju se najpogosteje uporabljata seva *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, ki imata tudi določen genom (4, 5). *L. lactis* je tudi industrijsko pomemben mikroorganizem, zlasti je pomemben v sirarstvu.

Za rekombinantno izražanje proteinov v mlečnokislinskih bakterijah se uporabljajo različni sistemi. Heterologni geni se nahajajo bodisi na plazmidih bodisi so vstavljeni v bakterijski kromosom in so pod nadzorom konstitutivnih ali inducibilnih promotorjev. Konstitutivni promotorji zagotavljajo enakomerno izražanje daljši čas, a običajno v manjših količinah. Pri inducibilnih promotorjih lahko izražanje nadzorujemo in je običajno močnejše. Izražanje lahko sprožimo z ogljikovimi hidrati, fagno infekcijo, bakteriocini, toplotno ali pH- spremembo (1). Najpogosteje uporabljan in najbolj proučen sistem je z nizinom nadzorovan ekspresijski sistem NICE (6), kjer se izražanje inducira z dodatkom bakteriocina nizina. Razviti so tudi sistemi, ki omogočajo usmerjanje proteinov v bakterijah (ciljanje). Za izločanje proteinov v gojišče se tako najpogosteje uporablja zaporedje Usp45, za pritrditev proteinov na površino bakterij (celično steno) pa C-terminalno zaporedje avtolizina AcmA (1).

2 Dostava biološko aktivnih makromolekul

Zaradi varnega statusa in zaupanja, ki ga uživajo mlečnokislinske bakterije, predstavljajo privlačen vektor za dostavo bioloških makromolekul v organizem. Cilji njihovega delovanja so sluznice, najpogosteje v prebavnem traktu, kot je shematsko prikazano na sliki 1. Delujejo lokalno, lahko pa povzročijo tudi sistemske učinke. Način aplikacije je ponavadi peroralni ali nazalni, možen pa je tudi vaginalni. Laktokoki in laktobacili preživijo prehod skozi prebavni trakt, nekateri laktobacili pa so ga sposobni tudi kolonizirati. Sposobnost preživetja v prebavnem traktu je pomemben dejavnik, saj peroralna aplikacija proteina ni mogoča predvsem zaradi razgradnje v kislem želodčnem okolju. Dodatna prednost dostave s pomočjo bakterij je, da nista potrebni draga izolacija in čiščenje proteinov. Sistemi dostave biološko aktivnih makromolekul se zaenkrat večinoma testirajo na živalskih modelih, kjer se dosegajo spodbudni rezultati. Znan je en primer klinične študije na ljudeh, ki bo opisan v nadaljevanju.

Dostavo biološko aktivnih makromolekul lahko po načinu uporabe razdelimo na dostavo cepiv (antigenov), dostavo proteinov s fiziološko vlogo in dostavo DNA.



Slika 1: Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije v prebavnem traktu lahko izločajo heterologne proteine ali pa jih predstavljajo na površini.

Figure 1: Genetically modified lactic acid bacteria can secrete heterologous proteins or present them on the surface in the instestinal tract.

2.1 Dostava cepiv

Peroralna dostava cepiv (antigenov) je zaželena zaradi prijetnejšega načina aplikacije v primerjavi s parenteralnim. Poleg tega bi peroralna dostava poceni cepiv pomenila veliko prednost zlasti v manj razvitih deželah. Mlečnokislinske bakterije predstavljajo ugoden vektor za dostavo cepiv, ker (7):

- imajo status GRAS,
- lahko delujejo kot adjuvans,
- so sposobne adhezije na mukozo,
- imajo nizko intrinzično imunogenost.

Zaradi velikosti se proteinske molekule načeloma ne absorbirajo in ne prehajajo v krvni obtok. Vendar pa črevesno limfoidno tkivo, ki je del mukoznega imunskega sistema, omogoča prehod preko specializiranih M celic na Peyerjevih ploščah in predstavitev antigenov bazalno ležečim imunskim celicam. To posledično sproži izločanje IgA, glavnega razreda protiteles iz epitelija, v lumen prebavnega trakta in s tem lokalni imunski odziv (8). Hkrati lahko takšen vnos antigenov sproži tudi sistemski imunski odziv in pojav IgG v krvi.

Različne vrste antigenov, ki so bili predstavljeni s pomočjo mlečnokislinskih bakterij, so predstavljeni v preglednici 1.

Cepiva so usmerjena proti bakterijskim in virusnim patogenom, pa tudi praživalim (*Plasmodium falciparum*). Največ študij je bilo opravljenih na fragmentu C tetanus toksina (10), ki zaradi močne imunogenosti služi tudi kot modelni antigen. Večina študij je bila opravljenih na miših. Običajno so opazili zvečan lokalni imunski odziv in izločanje IgA, pa tudi zvečan sistemski imunski odziv. Kar nekaj študij je uspelo dokazati klinično uspešnost cepljenja, saj se po izpostavitvi patogenu bolezen ni razvila npr. v primeru cepiva proti človeškemu papilomavirusu, ki povzroča raka materničnega vratu (19) ali v primeru cepiva proti enterotoksigeni *E. coli* (7). Učinkovitost

Preglednica 1: Primeri uporabe mlečnokislinskih bakterij pri dostavi antigenov.
Table 1: Example of usage of lactic acid bacteria in antigen delivery.

PATOGEN	DOSTAVLJENI ANTIGEN	MLEČNOKISLINSKA BAKTERIJA	REF.
	Bakterije		
Streptococcus mutans (karies)	Površinski protein PAc	*L. lactis*	(9)
Clostridium tetani (tetanus)	Fragment C tetanus toksina	*L. lactis, Lb. plantarum*	(10), (11)
Streptococccus pneumoniae	Kapsularni polisaharid tipa 3, PsaA, PspA	*L. lactis, Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. helcveticus*	(12)
Helicobacter pylori	UreB, Cag12	*L. lactis, Lb. plantarum*	(13)
Brucella abortus	L7/L12 ribosomalni protein, GroEL protein topotnega šoka	*L. lactis*	(14)
Streptococcus pyrogenes (faringealna infekcija)	Območje C-ponovitve M proteina	*L. lactis*	(15)
Proteus mirabilis	MrpA fimbrijski protein	*L. lactis*	(16)
enterotoksigena *Escherichia coli*	Toplotno stabilni enterotoksin in toplotno labilni enterotoksin B	*Lb. reuteri*	(17)
streptokoki (širokospektralno)	GBS pilus (iz skupine B streptokokov)	*L. lactis*	(18)
	Virusi		
človeški papilomavirus tip 16 (rak materničnega vratu)	Protein E7, protein L1	*L. lactis, Lb. plantarum, Lb. casei*	(19), (20)
HIV	Ovojni protein	*L. lactis*	(21)
SARS-koronavirus	Nukleokapsidni protein, peplomerni protein - segmenta SA and SB	*L. lactis, Lb. casei*	(22)
Rotavirus	VP7 protein iz zunanjega plašča	*L. lactis*	(23)
Koronavirus (prenosni gastroenteritis)	Peplomerni glikoprotein S	*Lb. casei*	(24)
	Praživali		
Plasmodium falciparium (malarija)	Fuzijski protein GLURP-MSP3, MSP1, MSA2	*L. lactis*	(25)

Preglednica 2: Primeri uporabe mlečnokislinkih bakterij pri dostavi proteinov s fiziološko vlogo.
Table 2: Example of usage of lactic acid bacteria in delivery of proteins with physiological function.

OBOLENJE / MOTNJA	DOSTAVLJENI PROTEIN	MLEČNOKISLINSKA BAKTERIJA	REF.
Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB)	IL-10	*L. lactis*	(27), (28)
Ulcerozni kolitis	mTFF (triperesni (trefoil) faktor)	*L. lactis*	(29)
Ulcerozni kolitis	LcrV iz *Yersinia pseudotuberculosis* – stimulacija izločanja IL-10	*L. lactis*	(30)
Ulcerozni kolitis	MnSOD iz *Streptococcus thermophilus*	*Lb. gasseri*	(31)
HIV	Cianovirin iz *Nostoc elipsosporum*	*L. lactis, Lb. plantarum, Lb. jensenii*	(32)
Modulacija alergijskega imunskega odziva	Bet v 1 antigen iz brezovega peloda	*L. lactis, Lb. plantarum*	(33)
Modulacija alergijskega imunskega odziva	Anti-idiotipski scFv ali IgE mimotop	*Lb. johnsonii*	(34)
Karies	scFv proti S. mutans (antigen I/II)	*Lb. zeae*	(35)
Pomanjkanje lipaze pri pankreasni insuficienci	Lipaza iz *Staphylococcus hyicus*	*L. lactis*	(36)

predstavitve antigena so v nekaj primerih povečali s hkratno dostavo interlevkinov (IL-2, IL-6) (26). Mlečnokislinske bakterije, ki predstavljajo antigene, naj ne bi kolonizirale prebavnega trakta, saj bi to lahko vodilo k toleranci do antigena. *L. lactis* je zato najugodnejši in najpogostejši kandidat za peroralno cepivo, čeprav so se laktobacili nekajkrat izkazali za učinkovitejše (11). Klinične študije na ljudeh še niso bile opravljene.

2.2 Dostava proteinov s fiziološko vlogo

Poleg dostave antigenov je mlečnokislinske bakterije moč uporabiti tudi kot vektor za dostavo proteinov, ki delujejo lokalno v prebavnem traktu. Na ta način dostavljeni proteini so predstavljeni v preglednici 2.

Iz preglednice 2 je razvidno, da je najpogostejša tarča dostave proteinov v prebavni trakt kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB), kamor uvrščamo ulcerozni kolitis in Crohnovo bolezen. Dokazano je, da interlevkin IL-10 igra pomembno vlogo pri regulaciji vnetnih kaskad in da njegovo pomanjkanje vodi v razvoj kolitisa. Dostava IL-10 lahko omili simptome in predstavlja najuspešnejši primer dostave proteinov z mlečnokislinskimi bakterijami. Uspešno so jo testirali na mišjem modelu kolitisa (27). Sledil je razvoj seva *L. lactis* z okvarjeno timidilat sintazo, ki je zato odvisen od zunanjih virov timidina ali timina, kar preprečuje preživetje gensko spremenjenega seva v naravi (37). To je omogočilo uporabo v 1. fazi klinične študije na 10 ljudeh za zdravljenje Crohnove bolezni (28). Študija je bila uspešna z minimalnimi stranskimi učinki in z olajšanjem simptomov bolezni. Podobne učinke so na živalskih študijah dosegli z uporabo triperesnih faktorjev (29) in dostavo proteina LcrV (30) iz *Y. pseudotuberculosis*, ki stimulira izločanje IL-10. Drugačen pristop predstavlja intestinalno izločanje superoksidne dismutaze (MnSOD), ki nastopa kot lovilec reaktivnih kisikovih spojin, ki prispevajo k vnetnemu delovanju (31).

Mlečnokislinske bakterije bi se lahko uporabljale za dostavo prebavnih encimov pri določenih anomalijah npr. pankreasni insuficienci. Tako je bil razvit sistem za dostavo lipaze (36).

Na podoben način, kot je bilo v prejšnjem poglavju opisano za dostavo antigenov z namenom spodbujanja imunskega odziv, bi se mlečnokislinske bakterije lahko uporabljale tudi za modulacijo imunskega odziva. Tako so s senzitizacijo zmanjšali imunski odziv na antigen iz brezovega peloda (33). Drugačen pristop predstavlja dostava fragmenta variabilne regije protitelesa (scFv) proti IgE, ki so odgovorni za pretiran imunski odziv, ali IgE mimotopov, ki stimulirajo tvorbo IgG proti IgE (34). Tudi fragmenti variabilne regije protitelesa scFv, usmerjeni proti *S. mutans*, so bili dostavljeni s pomočjo mlečnokislinskih bakterij in uporabljeni za oralno zdravljenje kariesa (35).

Poleg uporabe v prebavnem traktu, je mlečnokislinske bakterije mogoče uporabiti tudi na drugih sluznicah, npr. vaginalni. Razvit je sistem izražanja močnega protivirusnega proteina cianovirina v mlečnokislinskih bakterijah, ki kolonizirajo vagino, kar predstavlja način za zmanjšanje možnosti okužbe s HIV predvsem na ogroženih, manj razvitih območjih.

2.3 Dostava DNA

Dostava DNA z namenom cepljenja (DNA cepivo) je najnovejši način uporabe mlečnokislinskih bakterij in zato zaenkrat najmanj razvit. Dostavljena DNA izkoristi celične mehanizme za prepis v protein, ki potem služi kot antigen. Prednost DNA cepiva je zmožnost aktivacije celične imunosti in ne samo humoralne, kar posledično omogoča tudi zdravljenje kroničnih bolezni in zahtevnih virusnih infekcij, težava pa je uspešen vnos DNA v celice. Z mlečnokislinskimi bakterijami so uspeli dokazati vnos DNA v sesalske celice s pomočjo proteina internalina (38, 39), ki poveča prepustnost celic za *L. lactis*. Dosegli so tudi aktivacijo imunskega odziva pri miših po vnosu gena Vp1 virusa slinavke in parkljevke (40). Primeri so prikazani v preglednici 3.

3 Prednosti in slabosti

Mlečnokislinske bakterije so že stoletja sestavni del človeške prehrane, zato njihova varnost ni vprašljiva. Možnost sistemske okužbe z mlečnokislinskimi bakterijami obstaja le pri močno imunokomprimitiranih posameznikih. Dostava rekombinantnih proteinov na sluznice oz. predvsem v prebavni trakt s pomočjo mlečnokislinskih bakterij pomeni relativno poceni način dostave biološko aktivnih makromolekul v organizem, saj odpade potreba po nadaljnji izolaciji in čiščenju. To je pomembno predvsem v manj razvitih deželah, kjer je cena glavna ovira za npr. množično cepljenje. Prednost mlečnokislinskih bakterij pri dostavi cepiv je tudi, da posnemajo pot vnosa številnih patogenov v organizem in imajo lahko intrinzične lastnosti adjuvansa. Vnos fiziološko aktivnih proteinov v npr. prebavni trakt pomeni prednost predvsem pri lokalnih obolenjih, saj pri sistemski aplikaciji proteinov le majhen del dospe do želenega mesta delovanja, povečana pa je tudi možnost stranskih učinkov.

Med slabosti lahko uvrstimo težave z natančnim odmerjanjem, v primeru da prihaja do izražanja proteina na mestu delovanja (in ne že pred vnosom v organizem) in pa nejasne posledice ob morebitni kolonizaciji prebavnega trakta. Glavna šibka točka uporabe mlečnokislinskih bakterij pa je v tem, da gre za gensko spremenjene orga-

Preglednica 3: Primeri uporabe mlečnokislinkih bakterij pri dostavi DNA.
Table 3: : Example of usage of lactic acid bacteria in DNA delivery.

CILJ TERAPIJE	DOSTAVLJENI GEN	MLEČNOKISL. BAKTERIJA	REF.
Vnos gena proti modelnemu proteinu	*gfp* (zeleni fluorescentni protein)	*L. lactis*	(38)
Vnos gena proti modelnemu proteinu	*blg* (beta-laktoglobulin)	*L. lactis*	(39)
Cepivo proti virusu slinavke in parkljevke (FMDV)	*vp1*	*Lb. acidophilus*	(40)

nizme, ki so v javnosti deležni izrazito odklonilnega odnosa. Pred dejansko uporabo bi bilo zato potrebno odgovoriti na številna vprašanja, povezana s sproščanjem rekombinantnih organizmov v okolje (41, 42). Prvi sklop vprašanj je povezan s samim rekombinantnim sevom in možnostjo njegovega preživetja v naravi. To je v veliki meri moč odpraviti z uporabo metabolnih mutant, ki onemogočajo preživetje brez določenih hranil, kar je bilo že uspešno prikazano na primeru seva *L. lactis* z odstranjenim genom za timidilat sintazo (37). Drugi sklop vprašanj je povezan z vnesenim proteinom in njegovo potencialno alergenostjo in toksičnostjo. Tretji sklop vprašanj pa se nanaša na sam genski material. Potrebno je preprečiti horizontalen prenos genskega materiala v ostale, komenzalne bakterije. To je zlasti pomembno pri uporabi plazmidov, pri čemer je potrebno uporabljati replikacijske elemente, ki so omejeni na gostitelja. Popolnoma se je potrebno izogniti antibiotičnim označevalcem. Potrebno je tudi izključiti vključevanje DNA v genom gostitelja in morebitno onkogeno delovanje.

Mlečnokislinske bakterije imajo velik potencial kot vektorji za dostavo biološko aktivnih makromolekul. Pred uporabo bo potrebno razrešiti odnos do gensko spremenjenih organizmov, katerim javno mnenje ni naklonjeno in zaradi katerega je tudi odnos industrije zadržan. Res pa je, da je uporaba gensko spremenjenih organizmov v terapevtske namene sprejemljivejša od npr. uporabe v prehrani. Tveganje, ki smo ga namreč pripravljeni sprejeti, je povezano s koristjo, ki jo dobimo. Ta pa je večja v primeru resne ali težko ozdravljive bolezni.

4 Literatura

1. de Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 289-295.
2. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol 1997; 36: 1-29.
3. van Hylckama Vlieg JE, Rademaker JL, Bachmann H et al. Natural diversity and adaptive responses of Lactococcus lactis. Curr Opin Biotechnol 2006; 17: 183-190.
4. Bolotin A, Wincker P, Mauger S et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403. Genome Res 2001; 11: 731-753.
5. Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363. J Bacteriol 2007; 189: 3256-3270.
6. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 705-717.
7. Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M et al. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. International Journal of Food Microbiology 1998; 41: 155-167.
8. Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A et al. Heterologous protein production and delivery systems for Lactococcus lactis. Genet Mol Res 2003; 2: 102-111.
9. Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I et al. Oral immunization with recombinant Streptococcus lactis carrying the Streptococcus mutans surface protein antigen gene. Infect Immun 1990; 58: 2929-2934.
10. Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM et al. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant Lactococcus lactis. Nat Biotechnol 1997; 15: 653-657.
11. Grangette C, Muller-Alouf H, Geoffroy M et al. Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. Vaccine 2002; 20: 3304-3309.
12. Oliveira ML, Areas AP, Campos IB et al. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in Streptococcus pneumoniae colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. Microbes Infect 2006; 8: 1016-1024.
13. Lee MH, Roussel Y, Wilks M et al. Expression of Helicobacter pylori urease subunit B gene in Lactococcus lactis MG1363 and its use as a vaccine delivery system against H. pylori infection in mice. Vaccine 2001; 19: 3927-3935.
14. Pontes DS, Dorella FA, Ribeiro LA et al. Induction of partial protection in mice after oral administration of Lactococcus lactis producing Brucella abortus L7/L12 antigen. J Drug Target 2003; 11: 489-493.
15. Mannam P, Jones KF, Geller BL. Mucosal vaccine made from live, recombinant Lactococcus lactis protects mice against pharyngeal infection with Streptococcus pyogenes. Infect Immun 2004; 72: 3444-3450.
16. Scavone P, Miyoshi A, Rial A et al. Intranasal immunisation with recombinant Lactococcus lactis displaying either anchored or secreted forms of Proteus mirabilis MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonisation in mice. Microbes Infect 2007; 9: 821-828.
17. Wu CM, Chung TC. Mice protected by oral immunization with Lactobacillus reuteri secreting fusion protein of Escherichia coli enterotoxin subunit protein. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50: 354-365.
18. Buccato S, Maione D, Rinaudo CD et al. Use of Lactococcus lactis expressing pili from group B Streptococcus as a broad-coverage vaccine against streptococcal disease. J Infect Dis 2006; 194: 331-340.
19. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F et al. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. J Immunol 2005; 175: 7297-7302.
20. Poo H, Pyo HM, Lee TY et al. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on Lactobacillus casei induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. Int J Cancer 2006; 119: 1702-1709.
21. Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y et al. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant Lactococcus lactis expressing surface-bound HIV Env. Blood 2003; 102: 223-228.
22. Lee JS, Poo H, Han DP et al. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on Lactobacillus casei induces neutralizing antibodies in mice. J Virol 2006; 80: 4079-4087.

23. Perez CA, Eichwald C, Burrone O et al. Rotavirus vp7 antigen produced by Lactococcus lactis induces neutralizing antibodies in mice. J Appl Microbiol 2005; 99: 1158-1164.
24. Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intragastric administration of Lactobacillus casei expressing transmissible gastroentritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. Vaccine 2005; 23: 1335-1342.
25. Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A et al. Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by Lactococcus lactis in oral immunisations. Vaccine 2006; 24: 3900-3908.
26. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L et al. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of Lactococcus lactis coexpressing antigen and cytokine. Infect Immun 1998; 66: 3183-3189.
27. Steidler L, Hans W, Schotte L et al. Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. Science 2000; 289: 1352-1355.
28. Braat H, Rottiers P, Hommes DW et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2006; 4: 754-759.
29. Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J et al. Active delivery of trefoil factors by genetically modified Lactococcus lactis prevents and heals acute colitis in mice. Gastroenterology 2004; 127: 502-513.
30. Foligne B, Dessein R, Marceau M et al. Prevention and treatment of colitis with Lactococcus lactis secreting the immunomodulatory Yersinia LcrV protein. Gastroenterology 2007; 133: 862-874.
31. Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Barcena JM et al. Anti-inflammatory properties of Lactobacillus gasseri expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 293: G729-738.
32. Liu X, Lagenaur LA, Simpson DA et al. Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3250-3259.
33. Daniel C, Repa A, Wild C et al. Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. Allergy 2006; 61: 812-819.
34. Scheppler L, Vogel M, Marti P et al. Intranasal immunisation using recombinant Lactobacillus johnsonii as a new strategy to prevent allergic disease. Vaccine 2005; 23: 1126-1134.
35. Kruger C, Hultberg A, van Dollenweerd C et al. Passive immunization by lactobacilli expressing single-chain antibodies against Streptococcus mutans. Mol Biotechnol 2005; 31: 221-231.
36. Drouault S, Juste C, Marteau P et al. Oral treatment with Lactococcus lactis expressing Staphylococcus hyicus lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 3166-3168.
37. Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N et al. Biological containment of genetically modified Lactococcus lactis for intestinal delivery of human interleukin 10. Nat Biotechnol 2003; 21: 785-789.
38. Guimaraes VD, Gabriel JE, Lefevre F et al. Internalin-expressing Lactococcus lactis is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. Microbes Infect 2005; 7: 836-844.
39. Guimaraes VD, Innocentin S, Lefevre F et al. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 7091-7097.
40. Li YG, Tian FL, Gao FS et al. Immune responses generated by Lactobacillus as a carrier in DNA immunization against foot-and-mouth disease virus. Vaccine 2007; 25: 902-911.
41. Detmer A, Glenting J. Live bacterial vaccines--a review and identification of potential hazards. Microb Cell Fact 2006; 5: 23.
42. Renault P. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. Biochimie 2002; 84: 1073-1087.

Interpolimerni kompleksi

Interpolymer complexes

Matej Pavli, Franc Vrečer, Saša Baumgartner

Povzetek: Razvoj novih pomožnih snovi poteka sočasno z razvojem novih učinkovin. Namen razvoja novih pomožnih snovi je doseganje želenih lastnosti farmacevtskih oblik, kot so: nadzorovano sproščanje, izboljšanje biološke uporabnosti, povečana stabilnost idr. Primer novih pomožnih snovi so interpolimerni kompleksi (IPC), ki lahko izkazujejo povsem drugačne lastnosti od posameznih izhodiščnih polimerov. Na nastanek in lastnosti IPC imajo ključen vpliv parametri izdelave. V članku poleg ključnih parametrov izdelave obravnavamo tudi nekaj konkretnih primerov uporabe IPC v farmacevtski tehnologiji. Nakazane so tudi možnosti uporabe računalniških modelov za načrtovanje optimalnih pogojev za nastanek IPC. Zaključimo lahko, da so raziskave vpliva in uporabnosti IPC pri oblikovanju farmacevtskih oblik danes v farmacevtski tehnologiji zelo aktualne.

Ključne besede: *nadzorovano sproščanje, pomožne snovi, polimeri, kompleksi*

Abstract: The developement of new pharmaceutical excipients is proceeding simultaneously with developement of new active pharmaceutical ingredients. The purpose of the developement of new pharmaceutical excipients is to achieve desirable properties in dosage forms like controlled release, improved bioavailabilty, enhanced stability etc. An example of new excipients are interpolymer complexes (IPC), which can obtain completely different properties compared to separate original polymers. The developement and properties of IPC are essentially influenced by manufacturing parameters. In this article we also present some experimental cases of the usage of IPC in pharmaceutical technology beside important manufacturing parameters. The feasibilities of the usage of computer models for developement of optimal conditions for IPC assembly are also pointed out. We can conclude that the research of influence and applications of IPC on formulation of dosage forms are nowadays the topic of great interest in pharmaceutical techology.

Key words: *controlled release, excipients, polymers, complexes*

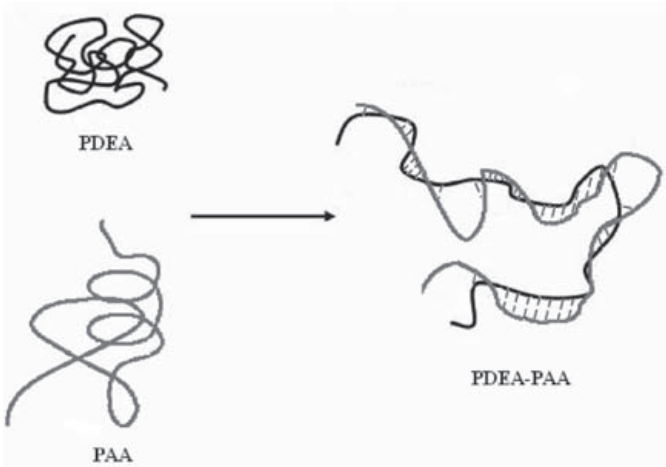
1 Uvod

Izraz interpolimerna kompleksacija opisuje nekovalentno povezovanje med posameznimi skupinami na različnih polimernih verigah (slika 1) (1). Rezultat tovrstnega povezovanja so interpolimerni kompleksi (IPC).

Interpolimerni kompleksi nastajajo pod pogoji, v katerih so polimeri med seboj termodinamsko kompatibilni. Polimerni kompleksi se tvorijo zaradi van der Waalsovih interkacij, ionskih vezi ali vodikovih vezi (1).

Interakcije, kot so vodikove vezi, dipol-dipol interakcije, prenos naboja in kislinsko-bazična kompleksacija so nujne, da pride do mešanja polimerov v raztopinah (2). Kadar so polimer-polimer interakcije močnejše kot interakcije polimer-topilo, tvorita polimera pri mešanju raztopin teh dveh polimerov v skupnem topilu interpolimerne komplekse (precipitate) (3). Parametrov, ki lahko vplivajo na tvorbo interpolimernega kompleksa, je več: struktura, molekulska masa polimerov, temperatura, pH, vrsta topila ipd. Tvorba kompleksa je reverzibilna (4).

Polimerna kompleksacija je termodinamsko ugodna. Pospešena je z negativno prosto energijo združevanja med ponavljajočimi enotami.



Slika 1. Primer interpolimerne kompleksacije med poliakrilno kislino (PAA) in poli N,N – dietilakrilamidom (PDEA) (2).

Figure 1. Example of interpolymer complexation of poly(acrylic acid) (PAA) with poly(N,N – diethylacrylamide) (PDEA) (2).

Matej Pavli, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana; Krka, d.d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 7000 Novo mesto
izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm., Krka, d.d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 7000 Novo mesto
doc. dr. Saša Baumgartner, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

To združevanje pospešuje tudi eksotermna reakcija med funkcionalnimi skupinami ter velika pozitivna entropijska sprememba zaradi tvorbe kompleksa. Interpolimerni kompleksi so stabilizirani s kooperativno naravo njihovih vezi, kar pomeni, da je z nastankom prvih vezi v IPC tvorba naslednjih zaradi prostorskega približevanja sosednjih aktivnih mest (funkcionalnih skupin) še pospešena. Zaradi kooperativne narave vezi obstaja kritična dolžina polimerne verige za kompleksacijo, kar je v večini primerov povezano z molekulsko maso polimera (1). Ko je molekulska masa majhna, je kljub prisotnosti lokalnih interakcijskih mest težko povzročiti konformacijske spremembe polimerov, saj je kooperativni učinek majhen, zato je tudi kompleksacija majhna. Kooperativni učinek se torej povečuje s povečanjem molekulske mase (povečevanjem polimerne verige), na ta način se poveča stopnja tvorbe kompleksa (5). Poleg kooperativnega efekta igrajo zelo pomembno vlogo tudi hidrofobne interakcije.

Interpolimerna kompleksacija lahko bistveno vpliva na strukturo polimerne mreže. Rezultat tega so lahko povsem spremenjene fizikalne lastnosti polimerov, kot so nabrekanje, mehanske lastnosti in mehanizem transporta topljenca skozi IPC. Zaradi takega obnašanja imajo interpolimerni kompleksi možnost uporabe na različnih področjih. Uporabimo jih lahko kot pomožne snovi za izdelavo farmacevtskih oblik z nadzorovanim sproščanjem, kot mehanske senzorje, biosenzorje, peptidne stabilizatorje ipd. (1). Na tržišču že obstaja dostavni sistem na osnovi ksantana in semenske sluzi rožičevca imenovan TIMERx, ki je namenjen nadzorovanemu sproščanju (6).

3 Delitev interpolimernih kompleksov (IPC-jev)

3.1 IPC-ji na osnovi vodikovih interakcij

Interpolimerni kompleksi, ki so stabilizirani z vodikovimi vezmi, se tvorijo med polimeri, ki imajo funkcionalne skupine s pomanjkanjem elektronov (polikisline) v neioniziranem stanju, ter polimeri s funkcionalnimi skupinami, ki vsebujejo področja z visoko elektronsko gostoto (etri, alkoholi, pirolidoni) (slika 2) (1).

Ti kompleksi se ponavadi tvorijo v vodnem mediju v ozkem območju sestave topila, pH-ja in ionske moči (4). Dodatno je kompleksacija stabilizirana s kooperativno naravo vezi kot tudi s hidrofobnimi interakcijami.

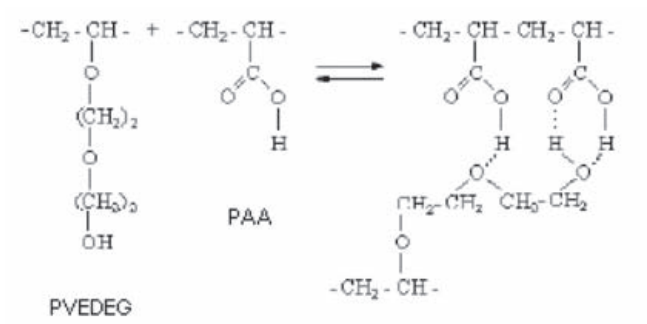
Nekateri primeri polimernih sistemov, kjer pride do kompleksacije zaradi vodikovih vezi: poliakrilna kislina in poliakrilamid, poliakrilna kislina in polivinilalkohol, poliakrilna kislina in polietilenglikol, polimetakrilna kislina in polietilenglikol, polimetakrilna kislina in polivinilpirolidon. Kompleksi med polimetakrilno kislino in polivinilpirolidonom so najstabilnejši med kompleksi z vodikovimi vezmi. Njihovo stabilnost pripisujejo močnemu intermolekularnemu privlaku med polimernimi verigami ter hidrofobne stabilizacije vodikovih vezi z α-metilno skupino (1).

3.2 IPC-ji na osnovi elektrostatskih interakcij

Do tvorbe IPC v tem primeru pride preko ionskih interakcij med kationskimi in anionskimi polimeri (enostaven primer: kompleks kislina-baza) (slika 3).

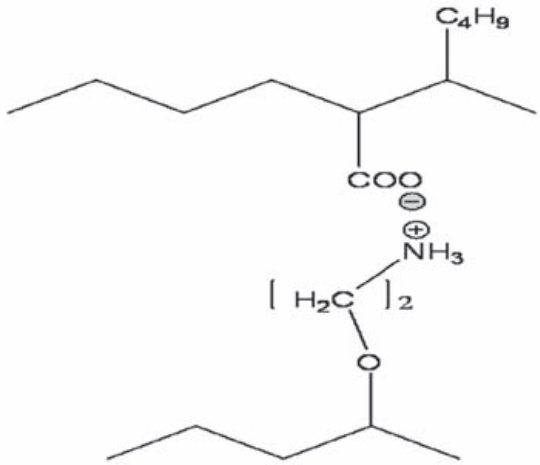
IPC-ji na osnovi elektrostatskih interakcij nastanejo lahko tudi med ionskim in ionizabilnim polimerom.

Hitosan se kot ionski polimer pogostokrat uporablja za pripravo IPC z ionizirajočimi akrilnimi polimeri, kot so akrilna kislina, metakrilna kislina in akrilamid. Najzanimivejša lastnost teh sistemov je zmožnost akrilnih polimerov, da tvorijo ionske komplekse preko interakcije karboksilne funkcionalne skupine z bazično aminsko skupino deacetiliranih piranskih obročev hitosanskih verig (8).



Slika 2. Primer interpolimernega kompleksa na osnovi vodikovih interakcij med poliviniletrom dietilenglikola (PVEDEG) in poliakrilno kislino (PAA) v neioniziranem stanju (7).

Figure 2. Example of interpolymer complex based on hydrogen interactions between poly (vinyl ether) of diethylene glycol (PVEDEG) with poly(acrylic acid) (PAA) in unionized state (7).



Slika 3. Shematski prikaz ionske interakcije.

Figure 3. Schematic presentation of ionic interaction.

4 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek IPC

4.1 Vpliv dolžine verige, molekulske mase ter koncentracije polimera

V splošnem velja, da je za tvorbo stabilnega kompleksa potrebna kritična dolžina polimerne verige. Kritična dolžina verige je odvisna od afinitete med dvema komplementarnima skupinama in sicer se zmanjša, če se so interakcije večje (2). Dolžina verige polimera je ponavadi v sorazmerju z molekulsko maso polimera.

V primeru interakcije razvejanega kopolimera polimetakrilne kisline (MAA) s polietilenglikolom (PEG) so avtorji (1) ugotovili, da večja kot je bila molekulska masa uporabljenega PEG (daljše, razvejane verige), večja je bila stopnja kompleksacije. Stopnja kompleksacije pa je bila močno odvisna od pH medija, saj je kompleksacija naraščala z daljšanjem verige le v kislem. Nad pH 4,2 pa je prišlo do večje interpolimerne kompleksacije v primeru najkrajših razvejanih PEG (najmanjša molekulska masa). Lowman in soavtorji (1) vzrok pripisujejo močnejši ionizaciji kislinskih skupin MAA pri višjem pH-ju, kar naj bi v primeru večjih PEG enot vodilo do večjega nabrekanja in posledično možne manjše kompleksacije.

V drugi študiji (9) so preučevali vpliv koncentracije in molekulske mase polimera na kritično pH-vrednost, pri kateri se tvorijo kompleksi. Preučevali so kompleksacijo med poliakrilno kislino (PAA) in polivinileter etilenglikolom (PVEEG). Nastanek kompleksov so spremljali z merjenjem motnosti – turbidimetrijo. Ugotovili so, da je kritična pH-vrednost, ko pride do nastanka kompleksa takrat, ko pride do močnega povečanja motnosti. Pod to vrednostjo so zmesi kompleksov polimerov motne in pride do oboritve kompleksov iz disperzije. Povečanje polimerne koncentracije pa premakne kritične pH k višjim pH-vrednostim. Ta pojav pojasnjujejo (9) z zmanjšanjem ionizacije PAA s povečanjem njene koncentracije v raztopini.

Molekulska masa PAA ni vplivala na kritično pH-vrednost tvorbe kompleksa PVEEG-PAA. Slednje avtorji (9) razlagajo z dejstvom, da so bile vse različne preiskovane PAA verige že dovolj velike, da je bila možna popolna tvorba kompleksa.

4.2 Vpliv pH in temperature

V sistemu, ki vsebuje šibko polibazo (npr. polietilenimin (PEI)), polikislino (npr. poliakrilno kislino (PAA)) in proton akceptorski, neionski polimer (npr. polietilenoksid (PEO)), je selektivnost tvorbe makromolekularnega kompleksa z različnimi pari polimerov odvisna od pH-sistema. V tem trokomponentnem sistemu je v kislih medijih (PEI povsem protoniran, PAA skoraj nič) prvenstveno favorizirana tvorba kompleksa preko vodikovih vezi med PAA in PEO, v nevtralnem pH (PAA in PEI oba delno ionizirana) je favoriziran nastanek polielektrolitnega kompleksa med PAA in PEI. V bazičnem pH-okolju (PAA popolnoma disocirana, PEI skoraj nič) pa ne pride do tvorbe ne polielektrolitnega kompleksa, in ne kompleksa, ki bi bil posledica vodikovih vezi. V tem primeru je torej pH-sistema bistven za selektivnost tvorbe kompleksa med različnimi pari polimerov, saj vpliva na interakcijske lastnosti med komponentami (10).

Na tvorbo IPC vpliva tudi temperatura medija preko vpliva na jakost vezi, ki vežejo polimere med seboj. Pri povišanih temperaturah pride le do rahlih sprememb v moči kolumbovih (elektrostatskih) vezi, medtem ko se vodikove vezi prekinejo pri dovolj visoki temperaturi. Potrebno je upoštevati še hidrofobni efekt, saj le-ta igra pomembno vlogo pri stabilizaciji IPC. Znano je, da se hidrofobne interakcije povečajo z naraščujočo temperaturo v vodnem mediju.

Verjetno pa je efekt hidrofobnih interakcij na stabilizacijo vodikovih vezi v kompleksu močnejši kot v primeru stabilizacije kolumbovih sil v polielektrolitnem kompleksu (10).

4.3 Vpliv dodanih ionov in ionske moči

Vpliv anorganskih soli na kompleksacijo z vodikovimi vezmi je odvisen od dveh nasprotujočih si dejavnikov. Po eni strani povečanje ionske moči raztopine vodi v delno disociacijo poli (karboksilnih kislin), kar je lahko neugodno za kompleksacijo. Po drugi strani dodatek anorganskih soli poslabša termodinamsko kakovost topila z ozirom na polimere, saj njihova prisotnost vodi do ojačanja hidrofobnih interakcij, ki so ugodne za kompleksacijo. Ravnotežje med tema dvema nasprotujočima si vplivoma bo določalo, kako se bo polimerni sistem v raztopini odzval na prisotnost ionov z majhno molekulsko maso.

Budtova s sodelavci (4) je poročal, da povečanje ionske moči medija zaustavi kompleksacijo poliakrilne kisline (PAA) s polivinilalkoholom (PVA) in hidroksietilcelulozo (HEC) (4). Chen in Morawetz (4) sta demonstrirala, da dodatek NaCl zmanjša intenziteto interakcij med PAA in polivinilpirolidonom (PVP) in polietilenoksidom (PEO). Sivadasan in sodelavci (4) so odkrili, da povečanje ionske moči vodi do znižanja pH-ja, pri katerem pride do interpolimernih interakcij med PAA in poliakrilamidom z modificiranimi pireni. Staikos in sodelavci (4) pa so pokazali, da prisotnost NaBr v raztopini pospešuje tvorbo polikompleksa med PAA in PEO.

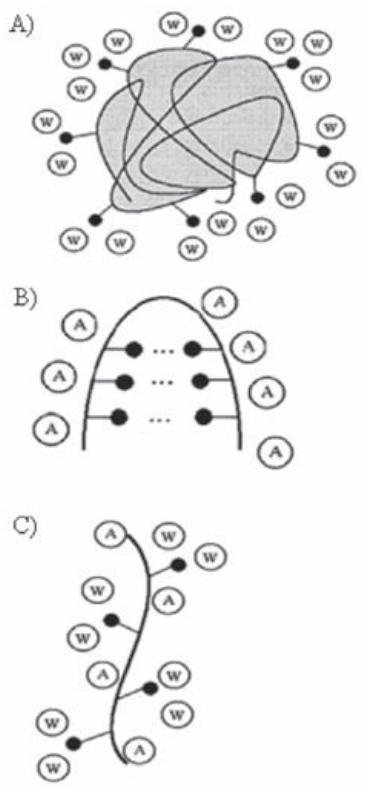
Če povzamemo, v literaturi lahko najdemo precej nasprotujoča si mnenja o vplivu ionske moči oziroma ionov na interpolimerno kompleksacijo (4).

4.4 Vpliv medija

Tekmovanje polimer-polimer interakcij z interakcijami polimer-topilo je odločilni dejavnik, ki vpliva na kompleksacijo v raztopinah.

V študiji avtorjev (9) so preučevali vpliv medija za kompleksacijo PVEEG-PAA (polivinileter etilenglikola – poliakrilna kislina). Preskušali so vodo, etanol in njuni mešanici. Ugotovili so, da je v vodnih raztopinah konformacija molekul IPC stabilizirana z hidrofobnimi interakcijami nepolarnih skupin (slika 4(A)).

Nasprotno pa so v alkoholnih raztopinah hidrofilni IPC fragmenti povezani z intermolekularnimi vodikovimi vezmi in alkoholne molekule solvatirajo hidrofobne dele polimerov (slika 4(B)). Zato lahko kompleksi nastanejo tako v vodi kot v etanolu, imajo pa seveda različne površinske lastnosti. V zmeseh vode in alkohola pa naj bi sočasna solvatacija hidrofilnih skupin z vodo in hidrofobnih skupin z alkoholom vodila do razvitja IPC (slika 4(C)). V določenih razmerjih vode in etanola se kompleksi ne tvorijo, ker so interakcije polimer-topilo močnejše od polimer-polimer interakcij (9).



Slika 4. Možne IPC strukture PVEEG-PAA IPC v vodi (A), alkoholu (B) in njihovih mešanicah (C). Molekule vode in alkohola so označene z W oziroma A. Črni krogci predstavljajo hidrofilne skupine. Obarvano območje označuje hidrofobne interakcije (A) (9).

Figure 4. Possible IPC structures of PVEEG-PAA IPCs in water (A), alcohol (B) and their mixture (C). Molecules of water and alcohol are indicated as W and A respectively. Black circles indicate the hydrophillic groups. The field area indicates the hydrophobic interactions (A) (9).

5 Parametri karakterizacije IPC-jev

Kot smo že omenili se lahko IPC-ji bistveno razlikujejo v svojih lastnostih od izhodnih (osnovnih) polimerov. Parametri s katerimi lahko vrednotimo oziroma dokazujemo nastanek interpolimernega kompleksa so lahko naslednji:

- Viskoznost in motnost (2);
- Temperatura steklastega prehoda (11);
- Sila nabrekanja (12)
- Natezna trdnost (1);
- Slike elektronskega mikroskopa (13);
- ATR-FTIR spekter (14);
- NMR (13)
- Površinska energija (15);
- Sproščanje zdravilnih učinkovine iz ogrodja interpolimernga kompleksa (16)
- Stabilnost (10)

6 Primeri IPC v farmacevtskih oblikah

6.1 Trdne disperzije z vgrajenim fenacetinom

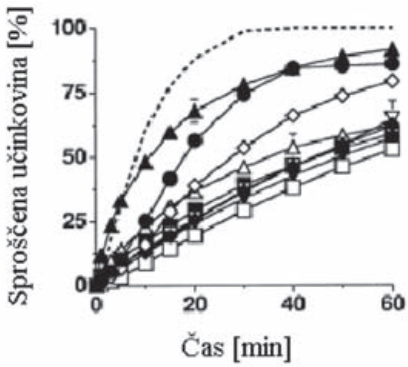
Proučevali so vpliv vgradnje fenacetina (FEN) v IPC na sproščanje iz zrnc, narejenih iz trdnih disperzij. Za izdelavo trdnih disperzij so uporabili čist PEO (polietilenoksid) različnih molekulskih mas ter CP (karboksivinil polimer). Med njima lahko v ustreznih pogojih pride do nastanka IPC zaradi tvorbe vodikovih vezi med etersko skupino PEO in karboksilno skupino CP.

Profil sproščanja čistega fenacetina in fenacetina iz zrnc trdnih disperzij (IPC) z različnimi molekulskimi masami PEO je prikazan na sliki 5.

Iz slike je razvidno, da je sproščanje iz trdnih disperzij in kompleksov počasnejše kot sproščanje samega čistega fenacetina. Razvidno je tudi, da je sproščanje iz trdnih disperzij odvisno od molekulske mase uporabljenega PEO v IPC, s čimer lahko uravnavamo kinetiko sproščanja. Vpliv molekulske mase PEO na sproščanje fenacetina iz IPC lahko vidimo na sliki 6.

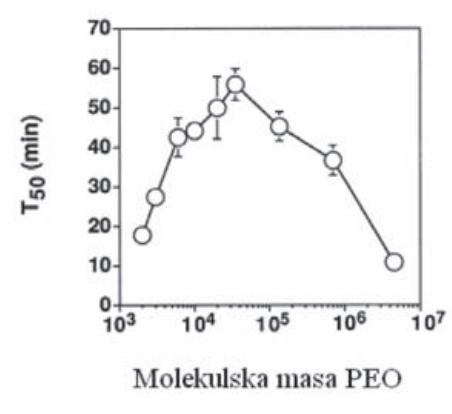
T_{50} fenacetina iz trdnih disperzij se je poviševal s povečevanjem molekulske mase PEO do MM 35000. Z nadaljnim večanjem molekulske mase se je T_{50} zniževal.

Možen vzrok, da se z nadaljnim povečevanjem mase PEO sproščanje ni dodatno upočasnjevalo je v manjši stopnji kompleksacije. S povečevanjem molekulske mase PEO nad 35000 se je namreč efektivna specifična površina PEO, ki je zmožna tvorbe vodikovih vezi s CP, zmanjšala zaradi sočasnega navijanja in zapletanja verig PEO (5).



Slika 5. Vpliv molekulske mase PEO na profile sproščanja fenacetina (FEN) iz PEO-CP trdnih disperzij (IPC). Črtkana črta označuje profil raztapljanja čistega FEN. Trdne disperzije (molekulska masa PEO: ●, 2000; ◊, 3000; ♦, 8200; ▽, 10 750; ▼, 20 000; □, 35 000; ■, 135 000; △, 700 000; ▲, 4 500 000) (n = 3) (3).

Figure 5. Effect of molecular weight of PEO on release profiles of phenacetine (FEN) from PEO-CP solid dispersions (IPC). The dotted line: dissolution profile of pure FEN. Solid dispersions (the molecular weight of PEO: ●, 2000; ◊, 3000; ♦, 8200; ▽, 10 750; ▼, 20 000; □, 35 000; ■, 135 000; △, 700 000; ▲, 4 500 000) (n = 3) (3).



Slika 6. Vpliv molekulske mase PEO na T_{50} fenacetina (FEN) iz IPC med PEO in CP (n = 3) (5).

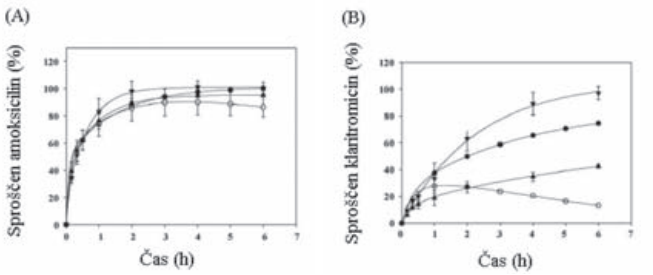
Figure 6. Effect of molecular weight of PEO on T_{50} phenacetine (FEN) from IPC of PEO and CP (n = 3) (5).

6.2 Mukoadhezivne mikrosfere z vgrajenim klaritromicinom ali amoksicilinom

Ugotovljeno je bilo, da ima poliakrilna kislina (PAA) dobre mukoadhezivne lastnosti. Le-te ohrani tudi v IPC, ki ga tvori s polivinilpirolidonom (PVP) preko vodikovih vezi. Topnost PAA-PVP kompleksa se v raztopinah zmanjša in pride do oboritve.

Preko tvorbe IPC je možna tudi izdelava mikrosfer. Vanje so vgrajevali klaritromicin in amoksicilin, da bi dosegli podaljšano sproščanje. Učinkovitost vgradnje klaritromicina v IPC mikrosfere je bila višja kot v primeru amoksicilina (17).

Hitrost sproščanja amoksicilina, vgrajenega v kompleksne mikrosfere, je bila večja od hitrosti sproščanja vgrajenega klaritromicina pri vseh preučevanih pH-jih (slika 7). Sproščanje amoksicilina je bilo skoraj povsem pH neodvisno, medtem ko je bila hitrost sproščanja klaritromicina od pH odvisna (pri pH 4,0 je bilo sproščanje počasnejše v primerjavi s pH 2,0, pri pH 6.8 pa hitrejše, kar avtorji (17) razlagajo z večjim vplivom ogrodja). V vseh primerih je bilo sproščanje učinkovin iz kompleksnih mikrosfer PAA-PVP počasnejše glede na sproščanje iz mikrosfer, narejenih le iz PVP, kar pa na grafih (slika 7) ni prikazano (17).



Slika 7. Sproščanje amoksicilina (A) in klaritromicina (B) iz PAA/PVP IPC mikrosfer pri pH: ○, 2,0; ●, 2.0 (podatki popravljeni zaradi degradacije učinkovine); ▲, 4,0; ▼, 6,8 pri 37 °C (n=3) (17).

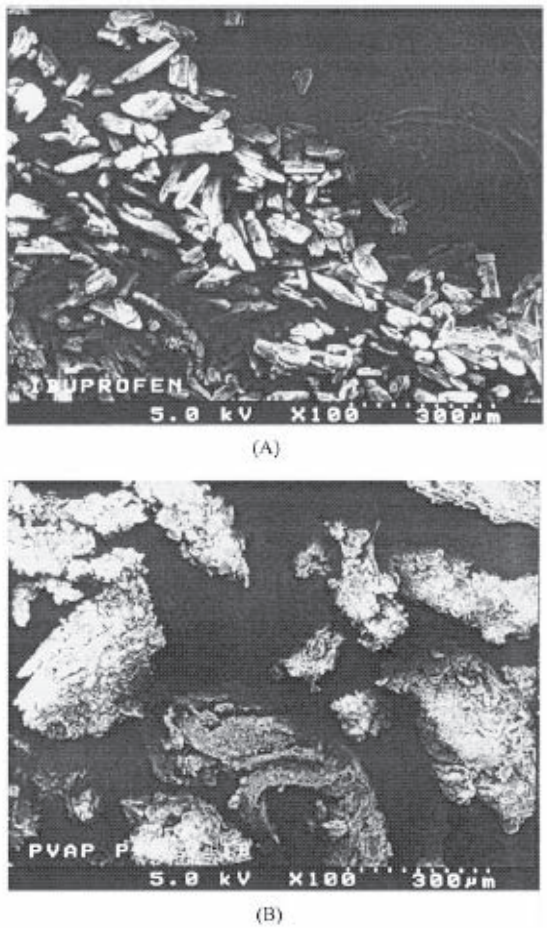
Figure 7. Release of amoxicillin (A) and clarithromycin (B) from the PAA/PVP complex at pH: ○, 2,0; ●, 2.0 (data corrected for degradation of active substance); ▲, 4,0; ▼, 6,8 at 37°C (n=3) (17).

6.3 Žvečljive tablete z vgrajenim ibuprofenom

Za žvečljive tablete je zelo pomembno, da so dobrega okusa. S tem namenom so pripravili žvečljive tablete iz IPC med PVAP in PVP. Vanj so s koprecepiatcijo vključili ibuprofen kot modelno učinkovino ter tako dobili zrnca.

Slike posnete z elektronskim mikroskopom (slika 8) kažejo, da se čist ibuprofen nahaja v obliki podolgovatih kristalov, zrnca polimernega kompleksa z ibuprofenom pa so v obliki agregatov.

Zrnca ibuprofena v IPC so nato stisnili v tablete. Izkazalo se je, da je trdnost teh tablet nekoliko nižja kot trdnost tablet z ibuprofenom,



Slika 8. SEM slike čistega ibuprofena (A) ter ibuprofena v zrncih polimernega kompleksa (B) (18).

Figure 8. SEM pictures of pure ibuprofene (A) and ibuprofene in granules of polymer complex (B) (18).

Tabela 1. Sestava žvečljivih tablet z ibuprofenom (18).
Table 1. Compositions of chewable ibuprofen tablets (18).

	Sestava tablet				
Sestavina	I*	II	III	IV	V
Ibuprofen	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	–
PVP-PVAP kompleks	–	–	–	–	512 mg**
PVP	–	312 mg	–	–	–
PVAP	–	–	312 mg	–	–
PVAP:PVP***(2:1)	–	–	–	312 mg	–
Aroma višnje	156 mg	156 mg	156 mg	156 mg	156 mg
Laktoza	162 mg	–	–	–	–
Koruzni škrob	150 mg	–	–	–	–
Masa tablete	668 mg	668 mg	668 mg	668 mg	668 mg
Trdnost (kp)	5,7	>20	18	>20	7,1

** Pripravljeno z metodo vlažne granulacije, ** Vsebnost ibuprofena bila 200 mg, **** Fizikalna zmes*

vgrajenim v druge pomožne snovi (tabela 1), vendar še venomer ustrezna.

Izdelane tablete so imele poleg ostalih ustreznih tehnoloških parametrov tudi dober okus v ustih, kar je bil namen študije. Pri preučevanju sproščanja ibuprofena iz tako dobljenih tablet so ugotovili, da je pri pH 1,2 sproščanje minimalno (2 % v 3 urah), pri pH 7,4 pa je bilo sproščanje nekoliko počasnejše kot pri ostalih preskušanih tabletah. To pomeni, da je uporaba IPC med PVAP in PVP potencialno ustrezna za pripravo zrnc z dobrim okusom za izdelavo žvečljivih tablet (18).

7 Prihodnost IPC-jev?

Interpolimerni kompleksi predstavljajo alternativne pomožne snovi za farmacevtske oblike z nadzorovanim sproščanjem. Njihov pomen bo v prihodnosti zagotovo naraščal. Za zdaj je pri njihovem uveljavljanju omejujoče ugotavljanje vseh dejavnikov, ki na interpolimerno kompleksacijo vplivajo ter iskanje najugodnejših kombinacij polimerov in njihovih razmerij.

Prav tako je relativno slabo raziskano njihovo obnašanje v fizioloških (in vivo) pogojih, kjer imamo sočasen vpliv večih dejavnikov (temperatura, ioni, površinsko aktivne snovi, …). Ker stabilnost kompleksov vpliva na sproščanje, bi potencialno lahko prišlo tudi do t.i. dose dumpinga v primeru prehitrega sproščanja.

Danes obstajajo tudi že računalniški modeli napovedovanja optimalnih interakcij med polimeri z namenom ugotavljanja želene kombinacije zmesi polimerov za tvorbo ustreznega interpolimernega kompleksa.

Eksperimentalni modeli in molekulski (računalniški) modeli se zaenkrat razlikujejo v enem bistvenem aspektu: v molekulskem modelu se polimerne verige nahajajo v »suhem« okolju, medtem ko eksperimentalni model vključuje tudi vpliv topila. Zavedati se moramo, da bi vključitev molekul topila v simulacijo precej povečala stroške in čas izračunavanja. Pomembna razlika med simulacijo in eksperimentalnim modelom je tudi v dolžini verig polimerov. V računalniški simulaciji ne uporabljajo zelo dolgih polimernih verig, saj želijo obdržati čas računanja na sprejemljivem nivoju, hkrati pa želijo zagotoviti ustrezno mobilnost verig znotraj določenega časovnega okvirja. Seveda bi lahko uporabili tudi daljše polimerne verige posameznega polimera vendar bi bilo teh verig zato ustrezno manj, s tem pa bi postal sistem manj realen (19).

Za razmahnitev uporabe IPC bo torej nujna uporaba računalniških modelov. Za zdaj pa se bolj ali manj zanašamo na eksperimentiranje.

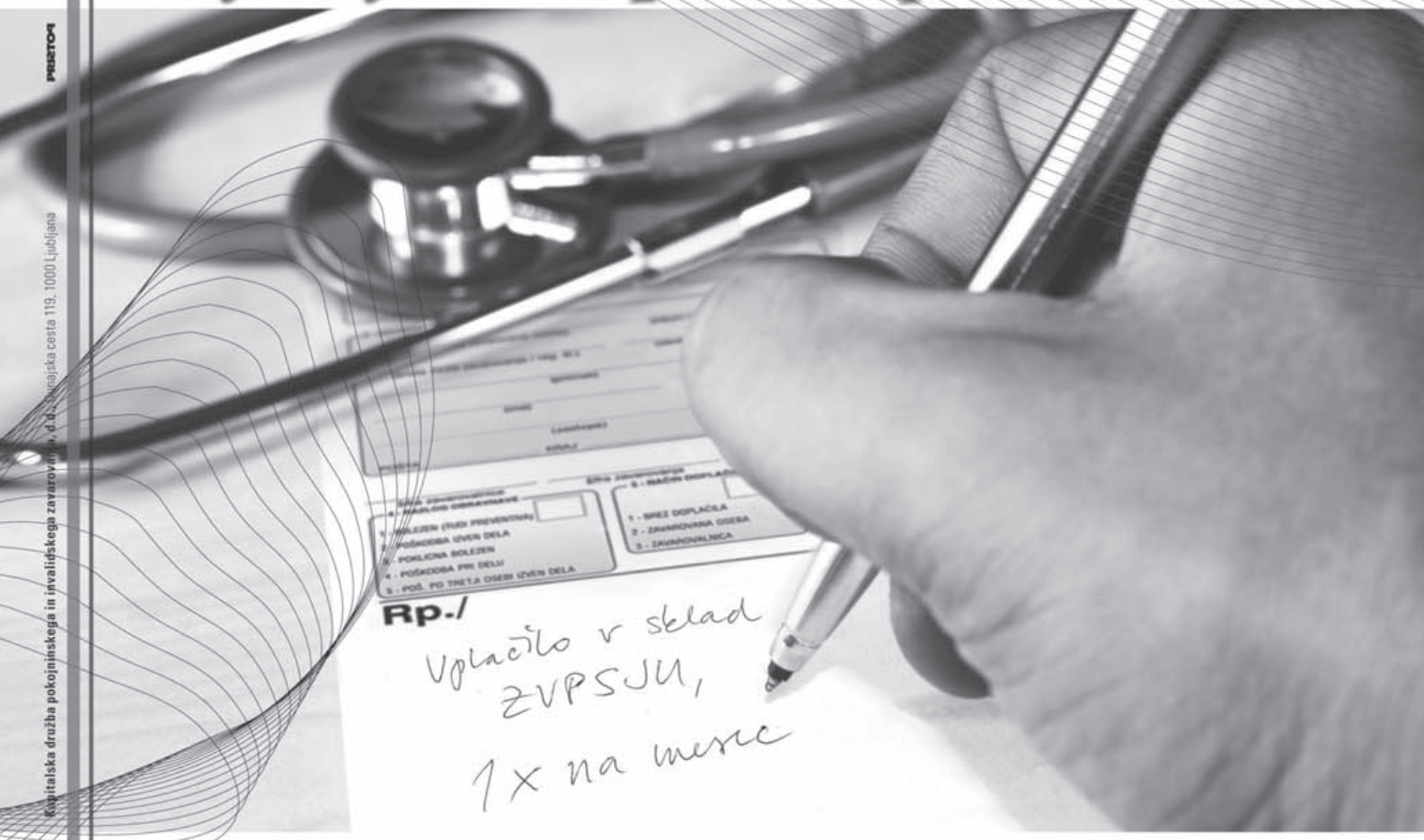
8 Literatura

1. Lowman AM, Peppas NA: Molecular analysis of interpolymer complexation in graft copolymer networks. Polymer 2000; 41: 73-80.
2. Bian F, Liu M: Complexation between poly(N,N-diethylacrylamide) and poly(acrylic acid) in aqueous solution. Eur Polym J 2003; 39: 1867-1874.
3. Luo X, Goh SH, Lee SY, Tan KL: Interpolymer complexation between poly(N-methyl-4-piperidinyl methacrylate) and acidic polymers. Macromolecules 1998; 31: 3251-3254.
4. Khutoryanskiy VV, Mun GA, Nurkeeva ZS, Dubolazov AV: pH and salt effects on interpolymer complexation via hydrogen bonding in aqueous solutions. Polym Int 2004; 53: 1382-1387.
5. Ozeki T, Yuasa H, Kanaya Y: Control of medicine release from solid dispersion composed of the poly(ethylene oxide)-carboxyvinylpolymer interpolymer complex by varying molecular weight of poly(ethylene oxide). J Controlled Release 1999; 58: 87-95.
6. McCall TW, Baichwal AR, Staniforth JN: TIMERx Oral Controlled-Release Drug Delivery System, v: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MC (Eds.), Modified-Release Drug Delivery Technology. Marcel Dekker, NY, Basel, 2003, 11-19.
7. Nurkeeva ZS, Mun GA, Khutoryanskiy VV, Sergaziyev AD: Complex formation of polyvinyl of diethylene glycol with polyacrylic acid II. Effect of molecular weight of polyacrylic acid and solvent nature. Eur Polymer J 2002; 38: 313-316.

8. Peniche C, Argüelles-Monal W, Davidenko N, Sastre R, Gallardo A, Roman JS: Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. Biomaterials 1999; 20: 1869-1878.
9. Nurkeeva ZS, Mun GA, Khutoryanskiy VV, Zotov AA, Mangazbaeva RA: Interpolymer complexes of poly(vinyl ether) of ethylene glycol with poly(carboxylic acids) in aqueous, alcohol and mixed solutions. Polymer 2000; 41: 7647-7651.
10. Vasheghani BF, Rajabi FH, Ahmadi MH, Nouhi S: Stability and thermodynamic parameters of some selective intermacromolecular complexation. Polym Bull 2006; 56: 395-404.
11. Zhou X, Goh SH, Lee SY, Tan KL: Interpolymer complexation between poly(vinylphosphonic acid) and poly(vinylpyridine)s. Polymer 1997; 38: 5333-5338.
12. Bell CL, Peppas NA: Measurement of the swelling force ionic polymer networks. III. Swelling force of interpolymer complexes. J Controlled Release 1995; 37: 277-280.
13. Kumar V, Yang T, Yang Y: Interpolymer complexation. I. Preparation and characterization of a polyvinyl acetate phthalate-polyvinylpyrolidone (PVAP-PVP) complex. Int J Pharm 1999; 188: 221-232.
14. Dumitriu S, Magny P, Montane D, Vidal PF, Chornet E: Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: their properties as supports for enzyme immobilization. J Bioactive and Comp Polym 1994; 9: 184-209.
15. Liu S, Jiang M, Chan CM, Weng LT: Elimination of surface enrichment in polymer blends via interpolymer complexation. Macromolecules 2001; 34: 3802-3804.
16. Fukuda M, Peppas NA, McGinity JW: Properties of sustained release hot-melt extruded tablets containing chitosan and xanthan gum. Int J Pharm 2006; 310: 90-100.
17. Chun MK, Sah H, Ckoi HK: Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of H. pylori. Int J Pharm 2005; 297: 172-179.
18. Kumar V, Yang T, Yang Y: Interpolymer complexation. II. Entrapment of ibuprofen by in-situ complexation between polyvinyl acetate phthalate (PVAP) and polyvinylpyrrolidone (PVP) and development of a chewable tablet formulation. Pharm Dev Tech 2001; 6: 71-81.
19. Moolman FS, Meunier M, Labuschagne PW, Truter PA: Compatibility of polyvinyl alcohol and poly(methyl ether-co-maleic acid) blends estimated by molecular dynamics. Polymer 2005; 46: 6192-6200.

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

PRIZMA

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

Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi

Bacteriophage therapy

Tomaž Bratkovič, Andrej Preželj

Povzetek: Ideja o uporabi bakteriofagov za zdravljenje okužb, povzročenih z bakterijskimi patogeni, je stara že skoraj stoletje. Nerazumevanje biologije bakteriofagov in pomanjkanje nadzorovanih kliničnih raziskav, predvsem pa odkritje antibiotikov, so bakteriofagno terapijo po začetnem zagonu v zahodnih državah pahnile v pozabo. Vse bolj pereč problem odpornosti bakterijskih patogenov proti klinično pomembnim antibiotikom je v zadnjem desetletju obudil zanimanje za bakteriofagna zdravila. Znanje, ki je rezultat sodobnih raziskav, ponuja realno možnost novih terapevtskih pristopov in odpira tudi nekatera povsem nova področja uporabe bakteriofagov.

Ključne besede: *bakterijske okužbe, bakteriofagi, antibiotiki, encibiotiki*

Abstract: The use of bacteriophage for combating bacterial infections was proposed almost a century ago. However, after the initial enthusiasm the idea quickly faded in the West with the discovery of antibiotics, accompanied by lack of phage biology understanding and insufficient proof of therapeutic efficacy of bacteriophage medicines due to inappropriately designed clinical trials. Today, as we are faced with accelerating emergence of bacterial resistance to antibiotics, the idea of bacteriophage-based drugs was brought back to life. Knowledge gathered over all these years offers a solid foundation on which to build new therapeutic approaches and develop alternative areas of bacteriophage application.

Keywords: *bacterial infections, bacteriophages, antibiotics, enzybiotics*

1 Bakterijski virusi

Bakteriofagi (krajše: *fagi*) so preprosti virusi, ki se razmnožujejo izključno v bakterijskih celicah. Odkril jih je francosko-kanadski mikrobiolog Félix d'Herelle. Pri svojih raziskavah je opazil, da so v nekaterih bakterijskih kolonijah na agarnem gojišču prisotna drobna področja, kjer bakterije ne uspevajo. Pri prenosu takih kolonij v bakterijsko kulturo v tekočem gojišču je že v nekaj urah opazil, da je prišlo do odmrtja vseh bakterij in posledično do zbistritve gojišča. Sklepal je, da je vzrok mikroorganizem, ki se kot zajedalec »hrani« z bakterijami – od tod izhaja tudi ime *bakteriofag* (grško »tisti, ki jé bakterije«). Enak pojav (naknadno poimenovan Twort-d'Herelle-ov fenomen) je pred d'Herelle-om opisal angleški bakteriolog Frederick Twort, a je delovanje zmotno pripisal za bakterije toksičnemu proteinskem dejavniku (1, 2).

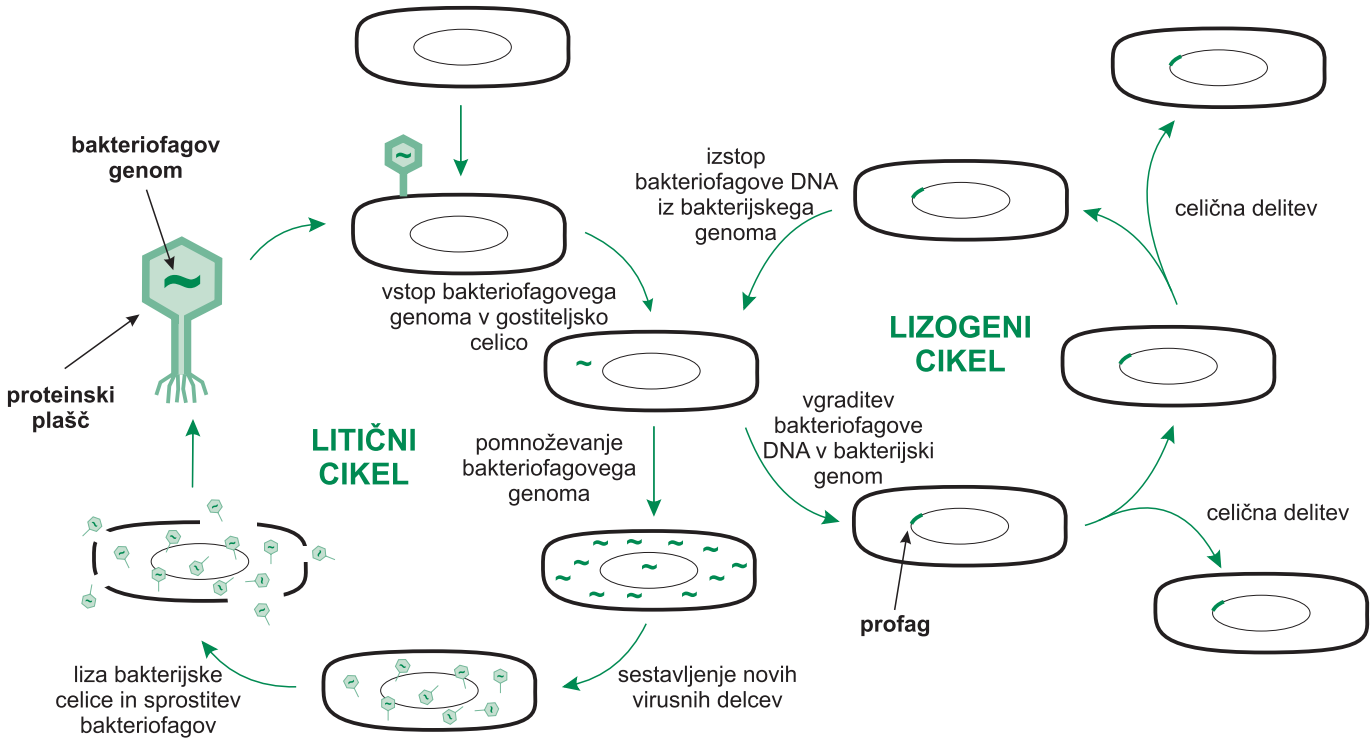
Fagi so v naravi prisotni skoraj povsod. Najdemo jih v slanih in sladkih vodah, v prsti, v hrani in tudi v pitni vodi. V prebavnem traktu živali in človeka predstavljajo pomemben del normalne gastrointestinalne flore. Ocenjujejo, da je njihovo celokupno število reda velikosti 10^{31}, kar je približno desetkrat več, kot je velikost celokupne svetovne bakterijske populacije (3, 4).

Genetsko so bakteriofagi izjemno heterogena skupina. Pri najmanjših tvorijo genom vsega štirje geni, dedni material največjih pa gradi tudi do štiristo genov. Genska informacija je prisotna bodisi v obliki enoverižne ali dvoverižne RNA oziroma DNA, v linearni ali cikličnimi obliki. Ne glede na morfološko pestrost oblik je vsak virusni delec (virion) zgrajen iz osrednje nukleinske kisline, ki jo obdaja proteinski plašč (3). Praviloma so bakteriofagi glede na gostitelja ne le vrstno, temveč pogosto celo sevno visoko specifični. Primarni dejavnik, ki določa gostiteljsko specifičnost, so površinske strukture na bakterijskih celicah, po svoji naravi proteini ali ogljikovi hidrati. Le-te bakteriofag izkorišča kot receptorje za pritrditev na bakterijo (3, 5). Skladno s heterogenostjo bakteriofagov imajo ti tudi nadvse različne življenjske cikle. V splošnem ločimo *litične* (*virulentne*) in *lizogene* (*temperatne*) bakteriofage (slika 1).

2 Zgodovina zdravljenja bakterijskih okužb z bakteriofagi

d'Herelle je svoje poskuse iz laboratorija kmalu prenesel na živali. Glede na njegova navajanja mu je uspelo močno omejiti epidemijo bakterijskega gastroenteritisa med kokošmi, tako da jim je v hrano dodajal bakteriofage, specifične za bakterijo *Salmonella gallinarum*. Uspešen naj bi bil tudi pri zajezitvi epidemije hemoragične septikemije pri vodnih bivolih, katerim je bakteriofage, specifične za bakterijo *Pasteurella multocida*, injiciral intravensko (7). Poskuse je nato nadaljeval še na sebi, članih družine in sodelavcih. Opogumljen z rezultati je d'Herelle poskusil tudi z zdravljenjem okužb pri bolnikih. Številna poročila pričajo, da je bilo mogoče v dobi pred odkritjem antibiotikov z d'Herelle-ovo metodo odpraviti prej neozdravljive bolezni bakterijskega vzroka, kakršne so bubonska kuga, krvave griže

dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm., Fakulteta za farmacijo, UL, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija
dr. Andrej Preželj, mag. farm., Lek farmacevtska družba d.d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana, Slovenija



Slika 1. Primerjava *litičnega* (levo) in *lizogenega* cikla (desno) (prirejeno po 6). Nekateri bakteriofagi so stabilno *litični* in svoje DNA *ne* vgrajujejo v genom gostiteljske bakterije. Bakteriofag po okužbi bakterije izkorišča celične mehanizme za pomnoževanje lastnega genoma in sintezo strukturnih proteinov ovojnice. Nazadnje bakteriofag izzove smrt celice in pomnoženi virusni delci se sprostijo iz lizirane bakterije. *Lizogeni* bakteriofagi svoj dedni material vgradijo v genom gostiteljske celice (tak latentni bakteriofag imenujemo *profag*), ki se tako prenaša na vse hčerinske bakterije, nastale z vegetativno delitvijo okužene celice. Ob indukciji profag izstopi iz bakterijskega genoma (občasno »odnese« s seboj tudi del bakterijskega genoma in ga naknadno vgradi v genom nove gostiteljske celice; proces imenujemo *transdukcija*). Bakteriofag nato vstopi v t. i. litični cikel, pri tem nastajajo novi bakteriofagi.

Figure 1. Comparison of *lytic* (left) and *lysogenic* cycle (right) (6). Some phages are stably *lytic* and do *not* integrate their DNA into hosts' genomes. Upon infecting the bacterium phage uses the cell's mechanisms to replicate the viral genome and produce capsid proteins. Multiplied virions are released from bacterium through cell lysis. *Lysogenic* phages, on the other hand, integrate their genetic material into host cells' genomes (such dormant phages are called *prophages*) and are thus transferred to all daughter cells (bacterial clones). Following induction, prophage enters the lytic cycle, forming new virions. Sometimes a lysogenic phage transfers parts of old host genome to newly infected bacteria in a process known as *transduction*.

in kolera (1, 7). Tako imenovana *bakteriofagna terapija* je postala v dvajsetih letih prejšnjega stoletja zelo popularna, sam d'Herelle pa naj bi si prislužil celo nominacijo za Nobelovo nagrado za medicino (8).

Do štiridesetih let prejšnjega stoletja je več farmacevtskih podjetij v Franciji in Združenih državah Amerike tržilo zdravila, ki so vsebovala bakteriofage, vendar pa je splet okoliščin (odkritje betalaktamskih antibiotikov), kot tudi nepoznavanje rokovanja s pripravki botrovalo negativnim odzivom Sveta za farmacijo in kemijo (Council on Pharmacy and Chemistry) uglednega Ameriškega zdravniškega združenja (American Medical Association). Očitki novi tehnologiji so leteli predvsem na pomanjkanje ustrezno izvedenih kliničnih raziskav, ki bi nedvoumno potrjevale učinkovitost bakteriofagnih zdravil (2, 7).

V nasprotju z Zahodom se je uporaba bakteriofagov v Vzhodni Evropi ohranila vse do devetdesetih let prejšnjega stoletja. Največja centra bakteriofagne terapije sta aktivna še danes. V Wrocławu deluje Hirszfeldov inštitut za imunologijo in eksperimentalno terapijo, v Tbilisiju pa Eliavin inštitut za bakteriofage, mikrobiologijo in virologijo (slednjega je soustanovil sam d'Herelle). Sovjetski in poljski zdravniki so poročali o 80-90 % uspešnosti v boju s trdovratnimi bakterijskimi patogeni, pogosto odpornimi proti različnim skupinam antibiotikov. Zahodni svet je obdržal znanstveno sporno, politično motivirano odklonilno stališče do bakteriofagne terapije, verjetno tudi zaradi nedostopnosti novejše znanstvene literature in načelnem zavračanju vsega sovjetskega (1, 5, 7). Kot zanimivost naj omeniva, da so še v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja pod pokroviteljstvom Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) v Pakistanu potekale klinične raziskave, v okviru katerih so potrdili primerljivo učinkovitost zdravljenja kolere s tetraciklinskimi antibiotiki in visokimi odmerki bakteriofagov, danim *per os* (7).

3 Sodoben pogled na bakteriofagno terapijo

Bakteriofagna terapija, v svojih začetkih skrajno revolucionarna tehnologija, je bila za tedanji svet pred svojim časom. Takratno znanje s področja mikrobiologije in medicine je ni dohajalo, zato je bila njena terapevtska vloga in tržna uveljavitev vnaprej obsojena na neuspeh. Poleg tega je ob uvedbi antibiotikov v klinično prakso sprva kazalo na dokončno zmago človeštva nad patogenimi bakterijami in o alternativnih metodah zdravljenja bakterijskih okužb niso razmišljali.

Danes je potreba po alternativnih zdravljenjih okužb velika. Ena od možnih rešitev je identifikacija novih tarč in razvoj protimikrobnih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja, torej kemoterapevtikov, proti katerim bakterije še niso odporne. Še vedno veliko vlagajo tudi v razvoj zaviralcev bakterijskih proteinov, ki so nosilci odpornosti. Nekatere takšne učinkovine so že učinkovita podpora uveljavljenim antibiotikom. Na drugi strani sta napredek v poznavanju biologije bakteriofagov ter razvoj biomedicinskih tehnologij v zadnjem desetletju omogočila ponovno znanstveno ovrednotenje bakteriofagne terapije. Primerjavo lastnosti antibiotikov in bakteriofagov kot protibakterijskih zdravil podaja preglednica 1.

Trenutno je v svetu le nekaj deset manjših in srednje velikih biotehnoloških podjetij, ki predstavljajo prvi val razvoja tehnologij za uporabo bakteriofagov v humani in veterinarski medicini, poljedelstvu in prehrambeni industriji (9). V nadaljevanju predstavljava pogled na bakteriofagno terapijo skozi oči sodobne znanosti vključno z nekaterimi novimi koncepti in biotehnološkimi pristopi v načrtovanju protimikrobnih (bakteriofagnih) zdravil prihodnosti.

3.1 Klasična bakteriofagna terapija

Etični standardi biomedicinskih raziskav v današnjem času so neprimerljivi s tistimi z začetka 20. stoletja, ko je d'Herelle pričel z uvajanjem bakteriofagne terapije. Takó zavedanje o podrobnem dogajanju med bakteriofagovim življenjskim ciklom in potencialnim imunskim odzivom, ki bi utegnil spremljati vnos bakteriofagov v organizem, vzbuja številne tehtne pomisleke o varnosti bakteriofagnih zdravil. A z današnjim znanjem zagovorniki bakteriofagne terapije lahko kritikom in skeptikom ponudijo sprejemljive rešitve.

Osnovna zahteva za zagotovitev varnosti bakteriofaga kot zdravila je, da izberemo vrsto, ki je stabilno litična in ne prenaša genetskega materiala s transdukcijo med bakterijami (glej tudi sliko 1). Lizogeni bakteriofagi niso zgolj manj učinkoviti, temveč ob njihovi uporabi obstaja tudi nevarnost horizontalnega prenosa antibiotične odpornosti, bakterijskih toksinov in virulentnih dejavnikov. Pri tem se lahko prej nenevarni bakterijski sevi pretvorijo v patogene. Transdukcija je sicer možna tudi pri litičnih bakteriofagih, a je precej manj verjetna (3, 10). Z določitvijo nukleotidnega zaporedja fagnega genoma in naknadno bioinformatično analizo je pred načrtovano uporabo določenega bakteriofaga smiselno preveriti, ali so v genomu prisotni geni, ki kodirajo znane alergene, toksine in virulentne dejavnike (3). Endotoksine, ki izvirajo iz liziranih gostiteljskih celic, v katerih pomnožujejo bakteriofage v bioreaktorjih, je z modernimi separacijskimi tehnikami, kot sta ultracentrifugiranje in ionsko-izmenjevalna kromatografija, mogoče učinkovito odstraniti (3). Pri sterilizaciji bakteriofagnega zdravila je potrebno izbrati metode, ki zagotavljajo ohranitev infektivnosti bakteriofagov, in validirati pogoje shranjevanja (6). Vsekakor pa je najpomembneje preveriti učinkovitost bakteriofaga kot bakteriolitika na živalskem modelu bakterijske okužbe, saj se posamezne bakteriofagne vrste v pogojih *in vivo* obnašajo različno (6). Skurnik in sod. (6, 11, 12) so ugotovili, da bakteriofaga PY100 in ϕ YeO3-12, dana mišim *per os* (v neodvisnih raziskavah), ne zaščitita živali pred naknadno izzvano okužbo z bakterijo *Yersinia enterocolitica*, čeprav so v kulturah *in vitro* opazili popolno lizo bakterij. Drugi raziskovalci poročajo o visoki učinkovitosti svojih bakteriofagov, ki so statistično značilno zmanjšali umrljivost pri miših po intraperitonealnem injiciranju v času do 5 ur po okužbi z virulentnima bakterijama *Enterococcus faecium* (13) in *Staphylococcus aureus* (14).

Farmakokinetične lastnosti bakteriofagov niso primerljive s klasičnimi učinkovinami. Praviloma se zadržujejo in pomnožujejo na samem mestu okužbe le v prisotnosti gostiteljske bakterije, kar je s terapevtskega in toksikološkega vidika ugodno, znižuje pa tudi potrebo po večkratnem odmerjanju (1, 7). Po intravenskem dajanju se bakteriofagi razporedijo v večino organov, kar omogoča njihovo uporabo za različne tipe infekcij. Zanimivo je, da se (vsaj nekatere vrste) kljub precejšnji velikosti učinkovito absorbirajo iz prebavnega trakta in prehajajo celo v urin (4). Iz organizma se pospešeno odstranjujejo, za kar je pretežno odgovoren retikuloendotelijski sistem. Nekateri bakteriofagi so dokazano imunogeni in izzovejo tvorbo nevtralizacijskih protiteles (4). Slednja za uspešnost bakteriofagne terapije naj ne bi bila omejujoč dejavnik, saj je kinetika bakterijske lize veliko hitrejša kot humoralni imunski odziv (1), vendar so poskusi zdravljenja ponovne okužbe z isto vrsto bakteriofaga manj uspešni. O zanimivem odkritju poročajo Merrill in sod. (15). Razvili so metodo za izolacijo različic bakteriofagov, ki jih imunski sistem ne prepozna. Mišim so intraperitonealno injicirali enterofag λ, ga po določenem času izolirali iz odvzetih vzorcev krvi, pomnožili *in vitro* v kulturah mutatorske bakterije *Escherichia coli* in očiščene ponovno injicirali poskusnim živalim. Po desetih krogih takšne selekcije *in vivo* (čas pred odvzemom vzorcev krvi so postopoma podaljševali) in pomnoževanja *in vitro* so uspeli izolirati bakteriofagni klon, na katerega se mišji imunski sistem ni odzival in je bil zato uspešnejši pri odpravljanju ponovno povzročenih okužb. Rezultat pojasnjujejo z mutacijo antigenskih determinant na bakteriofagni ovojnici.

Težave pri praktični uporabi bakteriofagnih zdravil bi zaradi gostiteljske specifičnosti utegnila povzročati potreba po hitri in točni etiološki diagnostiki – identifikaciji vrste in seva patogena. To nekdaj zamudno in pogosto nemogočo nalogo je mogoče premagati s sodobnimi tehnologijami, kakšni sta DNA-mikromreže ali verižna reakcija s polimerazo (PCR) (3). V preteklosti so poskušali doseči širši spekter delovanja bakteriofagnih zdravil s pripravo kombinacije različnih bakteriofagov, ki so lizirali večino sevov nekega patogena, t. i. *fagnih koktejlov*. Po drugi strani so smiselne tudi kombinacije različnih bakteriofagov, ki imajo skupnega gostitelja, saj je verjetnost, da bi patogen razvil odpornost proti vsem, zanemarljiva. Pri razvoju potencialnih bakteriofagnih zdravil se bo potrebno omejiti le na tiste patogene, ki predstavljajo največje težave in izzive za sodobno zdravljenje (multirezistentne bakterije kot so MRSA (*Staphylococcus aureus* odporen proti meticilinu), VRE (enterokoki odporni proti vankomicinu) in *Pseudomonas aeruginosa*). Z vidika regulatornih

Preglednica 1. Primerjava protibakterijskih lastnosti bakteriofagov in antibiotikov (zgornji del tabele) ter nekaterih razvojnih značilnosti obeh vrst zdravil (spodnji del tabele) (prirejeno po 1, 3).

Table 1. Comparison of antibacterial properties of phages and antibiotics (upper part) and some specific development issues concerning both types of drugs (lower part of table) (1, 3).

Bakteriofagi	Antibiotiki	Opomba
So glede na gostitelja vrstno/sevno specifični, zato je verjetnost sekundarnih okužb manjša.	Vplivajo tudi na normalno bakterijsko floro, kar lahko vodi v sekundarne (npr. glivične) okužbe.	Hitra mikrobiološka diagnostika je predpogoj za uspešno izbiro protimikrobnega zdravila, kar v primeru visoko specifičnih bakteriofagov lahko obravnavamo tudi kot pomanjkljivost.
Se pomnožujejo na mestu okužbe in se sicer hitro odstranijo iz organizma.	Telo jih presnavlja in izloča. Ne zadržujejo se samo na mestu okužbe.	Teoretično zadostuje en sam odmerek bakteriofagnega zdravila. Po preboleni bolezni fagi hitro zapustijo organizem.
Novejše raziskave opravljene na poskusnih živalih in zdravih prostovoljcih niso odkrile resnejših stranskih učinkov pri dajanju bakteriofagnih zdravil.	Številni antibiotiki imajo stranske učinke, npr. so alergogeni, ototoksični, nefrotoksični, izzovejo sekundarne okužbe ipd.	Litični bakteriofagi bi lahko izzvali septični šok zaradi obsežne lize bakterijskih celic, pri čemer se sprostijo endotoksini. Bakteriofagi sicer so imunogeni, vendar se praviloma še pred pojavom nevtralizacijskih protiteles odstranijo iz organizma. Ob ponovni okužbi je bakteriofagna terapija z isto vrsto bakteriofaga manj učinkovita.
Razvoj odpornosti patogene bakterije proti eni vrsti bakteriofaga ne predstavlja nevarnosti, saj ostane bakterija občutljiva na druge bakteriofage.	Razvoj odpornosti proti antibiotiku ni omejen na patogene bakterije in se lahko prenaša med različnimi bakterijskimi vrstami.	Antibiotiki vršijo selekcijski pritisk na širok spekter bakterijskih vrst, tako patogene kot tiste, ki so del normalne flore.
Odkrivanje oz. izolacija novih baktreiofagov je relativno hiter (nekaj tedenski) in cenovno ugoden proces.	Razvoj novega antibiotika je zamuden in predvsem finančno izjemno zahteven proces (10-12 let).	Bakteriofagi so se več kot tri in pol milijarde let razvijali skupaj z gostiteljskimi bakterijami, zato je zelo verjetno, da je mogoče odkriti oz. izolirati »nove« bakteriofage, ki napadajo bakterijske celice, odporne proti določenim vrstam bakteriofagov ali antibiotikov.
Pričakovane so težave pri poskusu registracije bakteriofagnih zdravil, posebej pri zmeseh več bakteriofagov z različno specifičnostjo, ki bi učinkovali proti širšemu spektru bakterij (bakteriofagni koktejli), in potrebnih zamenjavah aktivnih bakteriofagov pri nastopu bakterijske odpornosti.	Smernice/pogoji za registracijo novih antibiotičnih zdravil so dobro definirani.	Regulatorni organi (še) ne ponujajo smernic za registracijo bakteriofagnih zdravil.
Bakteriofagna zdravila so problematična z vidika intelektualne lastnine in patentne zaščite.	Zaščita intelektualne lastnine v primeru antibiotikov in antibiotičnih zdravil načeloma ni sporna.	V Vzhodni Evropi je bakteriofagna terapija neprekinjeno v uporabi več kot 80 let, kar onemogoča patentiranje zaradi pomanjkanja novosti (prior art). Patentna zaščita gensko spremenjenih bakteriofagov in terapevtskih pripravkov z bakteriofagi ni sporna.
Pripravki z bakteriofagi zahtevajo posebne pogoje shranjevanja za ohranitev infektivnosti bakteriofagov.	Antibiotiki so fizikalno-kemijsko stabilni, zdravila imajo zato relativno dolg rok uporabe.	Nekatere vrste bakteriofagov so občutljive na nizko, druge na visoko temperaturo. Nekatere vrste izkazujejo dobro stabilnost kot liofilizati (> 1 leto pri sobni temperaturi).

organov je uporaba variabilnih bakteriofagnih mešanic nesprejemljiva, saj za vsako kombinirano zdravilo zahtevajo ločeno izvedbo kliničnih študij za posamezne učinkovine (10). S tem povezani astronomski stroški razvoja bakteriofagnih zdravil in problematična zaščita intelektualne lastnine vsaj zaenkrat odvračata večja farmacevtska podjetja od vlaganj v razvoj te skupine zdravil.

3.2 Gensko spremenjeni bakteriofagi

Baktriofagi imajo kot bakteriolitične učinkovine številne pomanjkljivosti. Razvoj omnipotentnega oz. širokospektralnega bakteriofaga s tehnologijo rekombinantne DNA je le malo verjeten (3). Kljub temu ostaja nakaj upanja za razvoj bakteriofaga, ki bi uspešno prepoznal večino sevov nekega patogena. Določeni bakteriofagi namreč svoj genom v gostiteljsko bakterijo vnesejo tako, da s posebnimi encimi vanjo »zvrtajo« luknjo (6). Bakteriofag, ki bi v genomu vseboval zapise za več hidrolaz, ki bi bile sposobne razgraditi različne površinske strukture na bakteriji, bi tako izkazoval širši antibakterijski spekter delovanja.

Številni kritiki bakteriofagne terapije se bojijo septičnega šoka, ki bi utegnil nastopiti ob sprostitvi endotoksinov pri obsežni bakterijski lizi (pojav je dokumentiran tudi pri uporabi antibiotikov). Poleg tega bi visoka lokalna koncentracija novonastalih bakteriofagov sama lahko sprožila imunsko reakcijo (10). Matsuda in sod. (16) so zato razvili bakteriofag z okvarjenim litičnim sistemom. Bakteriofag je v mišjem modelu sepse okužil bakterije *E. coli*, se v njih pomnoževal in povzročil bakterijsko smrt, a ni izzval lize. Učinkovitost bakteriofagne terapije je bila celo višja kot pri uporabi betalaktamskega antibiotika. Hagens in Bläsi (17) sta pripravila dve različici gensko spremenjenega nitastega bakteriofaga M13 (vrste, ki sicer ni baktericidna). V genom matičnega bakteriofaga sta vgradila gen za endonukleazo (encim, ki prepozna določena nukleotidna zaporedja in cepi dvoverižno DNA) ali holin (protein, ki z umestitvijo v membrano bakterij v njej tvori pore). Ugotovila sta, da bakteriofaga *in vitro* delujeta baktericidno, a je sproščanje endotoksinov v gojišče v primerjavi s kulturami, okuženimi z litičnimi bakteriofagi, zanemarljivo majhno. Na podoben način so Westwater in sod. (18) kot *dostavni sistem* za vnos genov, kodirajočih specifične antibakterijske toksine, uporabili fagmidni sistem M13, a so uspeli učinkovitost protibakterijskega delovanja dokazati tudi *in vivo* v mišjem modelu bakteriemije.

Nenazadnje so gensko spremenjeni bakteriofagi zanimivi tudi z vidika patentne zaščite, kar bi k razvoju bakteriofagnih zdravil utegnilo privabiti podjetja, sposobna v raziskave vložiti več finančnih sredstev.

3.3 Encibiotiki

Z izrazom *encibiotik* (skovanko iz besed »encim« in »antibiotik«) označujemo rekombinantne proteinske produkte bakteriofagnih genov (t. i. *lizine*), ki sprožijo lizo bakterijske celice. Lizini so hidrolitični encimi (glikozidaze ali amidaze), ki po translokaciji v periplazemski prostor razgrajujejo peptidoglikansko celično steno. Ugotovili so, da encibiotiki delujejo baktericidno tudi z zunaje strani celice (vsaj pri po Gramu pozitivnih bakterijah). Žal je litični spekter lizinov ozek, saj je pogojen s prisotnostjo specifičnih ligandov (običajno ogljikovih hidratov; ki predstavljajo vezavne epitope), vezanih na peptidoglikansko mrežo. Lizini so dvodomenski proteini, aktivnost obeh domen – encimske (hidrolitične) in vezavne – pa je neodvisna. Tako je mogoče s kombiniranjem različnih domen pripraviti encibiotike z novo specifičnostjo delovanja (19).

Encibiotiki so izjemno zanimivi kot protimikrobne učinkovine, saj (vsaj zaenkrat) v laboratorijskih poskusih zaporednih pasaž še niso zaznali razvoja bakterijske odpornosti, niti niso opazili, da bi se nanje imunski sistem poskusnih živali odzval s tvorbo nevtralizacijskih protiteles (19). Fischetti in sod. so dokazali visoko učinkovitost različnih encibiotikov proti različnim vrstam streptokokov in bakteriji *Bacillus antracis* v pogojih *in vitro* in *in vivo* (20-23). Poseben izziv predstavljajo bakterijski biofilmi in metabolno manj aktivne bakterijske celice (24), ki pomembno prispevajo h kroničnemu poteku infekcij in so naravno odporni proti zdravljenju z antibiotiki in bakteriofagnimi terapevtiki.

3.4 Bakteriofagi kot orodje za identifikacijo novih protimikrobnih tarč

Bakteriofagi so obligativni znotrajcelični patogeni evbakterij in so kot taki razvili sposobnost izkoriščati gostiteljeve mehanizme za lastno pomnoževanje. To vključuje tudi oviranje številnih bakterijskih presnovnih poti, s čimer se večina energije usmeri v izražanje bakteriofagovih genov in replikacijo bakteriofagovega genoma. Bakteriofagne proteine, ki na različnih nivojih delujejo kot inhibitorji delitve bakterijske celice, je mogoče uporabiti pri identifikaciji in validaciji novih protimikrobnih tarč ali celo pri razvoju presejalnih testov za identifikacijo nizkomolekularnih protimikrobnih spojin s povsem novimi mehanizmi delovanja (25, 26).

3.5 Že uveljavljeni bakteriofagni profilaktiki

Redki izdelki, ki kot aktivno komponento vsebujejo bakteriofage, so se na nekaterih manj strogo nadzorovanih področjih uveljavili že tudi na Zahodu. V Združenih državah Amerike je od leta 2005 poljedelcem na voljo pesticid za preprečevanje in zatiranje bakterijskih bolezni paradižnika in paprike, povzročenih z bakterijama *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (27). Isti proizvajalec ponuja živinorejcem tudi pršilo, ki vsebuje bakteriofage, specifične za salmonelo (28). Namenjeno je omejevanju prisotnosti te bakterije na koži goveda, kar zniža verjetnost kontaminacije mesa pri klanju. FDA je v lanskem letu odobrila celo uporabo fagnega koktejla v obliki pršila za zaščito pripravljenih mesnih jedi pred kontaminacijo z nevarno bakterijo *Listeria monocytogenes* (29). Edini avtorjema poznani primer uradno registriranega bakteriofagnega zdravila je obliž iz biorazgradljivih polimerov, impregniran z različnimi bakteriofagi, ki je bil nedavno v Gruziji odobren za zdravljenje trdovratnih kožnih okužb in okužb odprtih ran (2).

4 Zaključek

Napredki na področju biotehnologije, mikrobiologije in infektologije omogočajo ponovno znanstveno ovrednotenje sicer skoraj stoletje stare ideje o uporabi bakteriofagov za preprečevanje in zdravljenje bakterijskih okužb. Bakteriofagna terapija – četudi se nekoč uveljavi

kot del moderne medicine – ne bo nikoli zamenjala uporabe antibiotikov. Slednji ostajajo preveč pomembni, uspešni in potrebni, da bi popolnoma opustili njihovo uporabo. Bakteriofagi ponujajo kvečjemu potencialno dopolnitev antibiotičnega arzenala, namenjeno zlasti uničevanju multirezistentnih bakterijskih patogenov, ki predstavljajo naraščajočo grožnjo človekovemu zdravju (5, 19).

5 Literatura

1. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Moriss Jr. JG. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(3): 649-659.
2. Stone R. Stalin' forgotten cure. Science 2002; 298: 728-731.
3. Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. Biotechnol Lett 2007; 29: 995-1003.
4. Dabrowska K, Swita³a-Jelen K, Opolski A et al. Bacteriophage penetration in vertebrates. J Appl Microbiol 2005; 98: 7-13.
5. Pirisi A. Phage therapy – advantage over antibiotics? Lancet 2000; 356: 1418.
6. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. Int J Med Micobiol 2006; 296: 5-14.
7. Summers WC. Bacteriophage therapy. Annu Rev Microbiol 2001; 55: 437-451.
8. Häusler T. Viruses vs. superbugs. A solution to the antibiotic crisis? Macmillan, 2006.
9. Projan SJ. New (and not so new) antibacterial targets – from where and when will the novel drugs come? Curr Opin Pharmacol 2002; 2: 513-522.
10. Thiel K. Old dogma, new tricks – 21st Century phage therapy. Nat Biotechnol 2004; 22(1): 31-36.
11. Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M. Bacteriophage YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. J Bacteriol 2000; 182: 5114-5120.
12. Pajunen M, Kiljunen SJ, Soderholm ME et al. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage YeO3-12 of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. J Bacteriol 2001; 183: 1928-1937.
13. Biswas B, Adhya S, Washart P et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. Infect Immun 2002; 70: 2004-210.
14. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage MR11. J Infect Dis 2003; 187: 613-624.
15. Merril Cr, Biswas B, Carlton R et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 3188-3192.
16. Matsuda T, Freeman TA, Hilbert DW et al. Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. Surgery 2005; 137(6): 639-646.
17. Hagens S, Blasi U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. Lett Appl Microbiol 2003; 37(4): 318-323.
18. Westwater C, kasman LM, Schofield DA et al. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(4): 1301-1307.
19. Fischetti VA, Nelson D, Schuch R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? Nat Biotechnol 2006; 24(12): 1508-1511.
20. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. Science 2001; 294: 2170-2172.
21. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 4107-4112.
22. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. Nature 2002; 418: 884-889.
23. Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(1): 375-377.
24. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol 2007; 5(1): 48-56.
25. Liu J, Dehbi M, Moeck G et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. Nat Biotechnol 2004; 22(2): 185-191.
26. Projan S. Phage-inspired antibiotics? Nat Biotechnol 2004; 22(2): 167-168.
27. OmniLytics obtains landmark EPA registration for bacteriophage usage; revolutionary AgriPhage products approved for use on tomato and pepper crops. Business Wire, February 15, 2006.
28. OmniLytics announces USDA/FSIS allowance of bacteriophage treatment of salmonella on livestock. Business Wire, March 29, 2007.
29. Bren L. Bacteria-eating virus approved as food additive. FDA Consumer 2007; January-February Issue.

Svetloba, radikali in fotodinamična terapija

Razširjen povzetek predavanja na simpoziju: Fotobiologija in bolezni ven

Slavko Pečar

1 Svetloba in nastajanje reaktivnih snovi v koži

Svetloba je elektromagnetno valovanje, katerega energijo opišemo bodisi z valovno dolžino (λ) ali s frekvenco (ν). Energija (E) fotona svetlobe je opredeljena z enačbo: $E = h\nu$ ali $E= hc/\lambda$, kje je h Planckova konstanta (6,62 x 10^{-34}Js) in c hitrost svetlobe v vakuumu (c=2,997 x 10^8 m/s). Fotoni svetlobe ali krajše svetloba se na površini kože lahko odbije, lahko se v koži absorbira ali pa potuje skozi kožo. Kateri dogodek je prevladujoč je odvisno od valovne dolžine (λ) svetlobe in od lastnosti kože. Elektromagnetna valovanje s kratkimi valovnimi dolžinami (fotoni z visoko energijo) prodirajo v in skozi kožo, valovanja z dolgimi valovnimi dolžinami pa se odbijajo in le deloma absorbirajo.

V tem prispevku se bomo omejili le na ozek del spektra elektromagnetnega valovanja: na svetlobo z valovnimi dolžinami med 200 nm in 700 nm. To področje razdelimo na področje ultravijolične (UV) svetlobe (od 200 do 400 nm) in na področje vidne svetlobe (od 400 (vijolična) do 700 (rdeča) nm). Samo UV področje še naprej delimo na UVA (400 – 320 nm), UVB (320 – 280 nm) in UVC področje (280 – 200 nm). Fotoni UVA svetlobe imajo energijo: 71 – 89 kcal/mol, UVB: 89 – 101 kcal/mol in UVC: 101 – 141 kcal/mol. Navedene energije UV svetlobe postanejo pomembne ob dejstvu, da so energetske vrednosti enojnih kovalentnih vezi večine organskih spojin v območju: 70 - 105 kcal/mol. To pomeni, da imajo UV fotoni, še zlasti UVB in UVC, dovolj energije, da prekinjajo kovalentne vezi v molekulah vode, proteinov, lipidov, nukleinskih kislin ali v drugih sestavinah kože. UV svetloba v koži povzroča biokemične poškodbe zaradi nastajanja radikalov in posledično najrazličnejših sekundarnih, vendar še vedno kemično reaktivnih spojin. Poleg takojšnje vnetne reakcije so nadaljnje posledice delovanja UV svetlobe na kožo lahko zelo različne: od pospešenega staranja do mutacij in nastajanja rakavih celic v koži (1).

Fotoni vidne svetlobe imajo manj energije: od 71 kcal/mol (vijolična svetloba) do 40 kcal/mol (rdeča svetloba). Vidna svetloba pri večini organskih spojin ne more neposredno prekiniti enojne vezi, lahko pa po absorpciji povzroča prehod posameznih komponent v koži v različna vzbujena stanja. Lep dokaz za vpliv svetlobe na živo snov je fotosinteza v zelenih rastlinah in proces gledanja pri živalih. V večini primerov absorpcija vidne svetlobe nima škodljivih posledic, ker se večina absorbirane svetlobe pretvori v toplotno energijo. Samo v posebnih pogojih se lahko lahko zgodi, da tudi vidna svetloba lahko povzroča lokalne okvare, kar z uspehom izkoriščajo pri fotodinamični terapiji.

2 Radikali in singletni kisik (2,5)

Homolitska cepitev /1/ kovalentne vezi (skupen elektronski par), ki jo povzroči foton UV svetlobe z ustrezno energijo, vodi v nastanek radikalskega para, od katerih ima vsak fragment po en (nesparjen) elektron.

$$A - B + \text{UV-svetloba} \rightarrow A^{\bullet} + {}^{\bullet}B \qquad /1/$$

Atomi, ioni, molekule in kompleksi, ki imajo vsaj en nesparjen elektron se imenujejo radikali (angleško: free radical). Stanje snovi z nesparjenim elektronom je neobičajno, kemično reaktivno in zaradi tega kratkoživo. Radikal poskuša manjkajoči elektron pridobiti iz svoje okolice. Omenjena težnja se uresničuje v treh tipih kemičnih reakcij, značilnih za radikale:

1. odvzem vodikovega atoma /2/ neradikalski spojini, ki jo sreča radikal. Pri tem nastane nov radikal. Tovrstne reakcije postopoma pripeljejo do vse stabilnejših radikalov:

   $$R^{\bullet} + R_1\text{-}H \rightarrow R\text{-}H + R_1^{\bullet} \qquad /2/$$

2. adicija radikala /3/ na dvojno vez. Tudi pri tej reakciji nastane nov radikal:

   $$R^{\bullet} + CH_2{=}CH\text{-}R_1 \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CH^{\bullet}\text{-}R_1 \qquad /3/$$

3. Srečanje in reagiranje dveh radikalov – obratna reakcija nastajanju radikalskega para - povzroči nastanek neradikalske spojine /4/, ki v večini primerov ni več kemično reaktivna:

   $$A^{\bullet} + {}^{\bullet}B \rightarrow A\text{-}B \qquad /4/$$

Na tem mestu moramo v radikalske reakcije vpeljati še kisik (O_2), ki je sicer normalna sestavina atmosfere in ki se v različnih koncentracijah pojavlja tudi v tkivih. Koža je v primerjavi z drugimi tkivi v nekoliko posebni situaciji, ker je na svoji površini izpostavljena kar atmosferski koncentraciji kisika (21%), ki difundira tudi v globje plasti kože, v spodnjih plasteh pa je oksigenacija odvisna tudi od prekrvavitve.

V molekuli kisika je energetsko ugodnejša takšna razporeditev elektronov, da sta v molekuli dva nesparjena elektrona (biradikal) s spinom usmerjenim v isto smer. Stanje, kjer sta elektrona v paru pa je energetsko bogatejše. Molekuli kisika z dvema nesparjenima elektronoma pravimo tudi tripletni kisik ($^3O_2$) za razliko od kisika, ki ima vse elektrone v parih in ga imenujemo singletni ($^1O_2$) kisik. Singletnega kisika običajno ni, nastaja le v posebnih pogojih in po različnih poteh. Zaradi različne razporeditve in orientacije spinov se $^3O_2$ in $^1O_2$ močno

prof. dr. Slavko Pečar, UL, Fakuteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana, pecars@ffa.uni-lj.si

razlikujeta tako v kemični reaktivnosti kot v samih reakcijah v katere sta vpletena.

Pri reakcijah oksidacije se kisik spaja z najrazličnejšimi snovmi. Nastajajo nove kovalentne vezi, ki so pravzaprav novi pari elektronov z nasprotnim spinom. V primeru $^3O_2$ je nastanek kovalentne vezi povezan z obratom spina elektrona. Ker je ta proces malo verjeten, obrat spina preprečuje (spinska restrikcija), da bi se $^3O_2$ brez težav spajal z različnimi organskimi spojinami. To je tudi glavni razlog, da kljub relativno visoki koncentraciji kisika v atmosferei, v tej atmosferi živijo bitja sestavljena iz organskih snovi, ki se samo pod določenimi pogoji lahko oksidirajo. V primeru $^1O_2$ ni spinske restrikcije, ki bi preprečevala $^1O_2$ spajanje z drugimi snovmi in $^1O_2$ lahko brez težav reagira z organskimi spojinami.

Tripletni kisik brez ustrezne aktivacije težko reagira z organskimi pojinami v singletnem stanju. Čisto drugače je, če se $^3O_2$ sreča z radikalom. V tem primeru ni spinske restrikcije in reakcija radikala s $^3O_2$ /5/ je zelo hitra. Ker se $^3O_2$ obnaša kot biradikal, nastane v smislu reakcije /4/ peroksilni radikal /5/, ki vstopa v nadaljne pretvorbe /6/ in /7/:

$$A^\bullet + {}^3O_2 \rightarrow A\text{-}O\text{-}O^\bullet \qquad /5/$$

$$A\text{-}O\text{-}O^\bullet + R\text{-}H \rightarrow A\text{-}O\text{-}O\text{-}H + R^\bullet \qquad /6/$$

$$R^\bullet + {}^3O_2 \rightarrow R\text{-}O\text{-}O^\bullet \text{ itd.} \qquad /7/$$

Vidimo, da je teoretično dovolj že en sam radikal, da se sproži radikalska reakcija oksidacije. UV fotoni (reakcija /1/) zagotove radikale za sprožitev oksidacije, ki se nadaljuje in širi zaradi biradikalske narave $^3O_2$. Obseg in vrsta poškodb je odvisna od sposobnosti posameznih plasti kože, kako učinkovito in kako hitro lahko nastale radikale odstrani.

Če omenjeni proces oksidacije poteka v celični membrani, govorimo o lipidni peroksidaciji. Končni produkti lipidne peroksidacije so različni aldehidi in dialdehidi (malon dialdehid), ketoni, alkoholi, alkani, alkeni, epoksidi, itd in posledična sprememba ali porušitev membranske strukture. Za nekatere od teh produktov so ugotovili (nenasičeni aldehidi, malon dialdehid itd.), da so mutageni in tudi kancerogeni.

Pri izpostavljanju kože UV sevanju nastajajo primarni radikali naključno in povsod tam, kjer UV foton homolitsko prekine kovalentno vez. Reakcije oksidacije s $^3O_2$ lahko potekajo ne samo v membrani, kjer je koncetracija kisika največja, ampak tudi v jedru (poškodbe DNK molekule, mutacije, kancerogenost) ali kjerkoli drugje v celicah kože. Z UV svetlobo povzročeno nastajanje radikalov je v koži uvod v oksidacijo sestavin celic z najrazličnejšimi končnimi razpleti. Premik ravnotežja redoks reakcij v smeri oksidativnih procesov imenujemo oksidativni stres. Oksidativni stres sproži na eni strani bodisi nenadna pojava radikalov (UV obsevanje) ali povečanje koncentracije reaktivnih kisikovih (ROS) oziroma dušikovih (RNS) zvrsti. Med ROS in RNS uvrščajo tako radikale kot spojine, ki so bodisi nastale iz radikalov in so kemično še reaktivne, oziroma pod določenimi pogoji lahko iz njih nastanejo novi radikali. Tipični predstavniki ROS so:

- radikali: superoksid ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($HO^\bullet$), peroksil ($ROO^\bullet$), hidroperoksil ($HOO^\bullet$), alkoksil ($RO^\bullet$);
- neradikalske spojine: vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorid (ClO^-), $^1O_2$, peroksinitrit ($ONOO^-$), ozon (O_3), itd.

in RNS:

- radikali: dušikov oksid ($^\bullet NO$), dušikov dioksid ($^\bullet NO_2$)
- neradikalske spojine: peroksinitrit ($ONOO^-$), didušikov trioksid (N_2O_3), didušikov tetraoksid (N_2O_4), nitrozil kation (ON^+), nitrozil anion (ON^-), itd.

Do oksidativnega stresa pride tudi, če se zmanjša celična zaščita, ki sloni na antioksidantih (2,6). Ti po različnih mehanizmih in na različnih ravneh preprečujejo oksidativni stres oziroma skrbijo, da ostaja koncentracija posameznih predstavnikov ROS in RNS na obvladljivi ravni. V primeru obsevanja kože z UV svetlobo nastali radikali sprožijo oksidativni stres, ki je intenzivnejši ter obsežnejši tudi zaradi neposrednih in škodljivih vplivov UV svetlobe na encime, ki so nosilci antioksidativnega delovanja v celici.

Ko je proces lipidne peroksidacije v razmahu (verižna radikalska reakcija) začne kemično nastajati še $^1O_2$ predvsem v reakciji med dvema peroksilnima radikaloma:

$$R_1\text{-}O\text{-}O^\bullet + {}^\bullet O\text{-}O\text{-}R_2 \rightarrow R_1\text{-}O\text{-}O\text{-}R_2 + {}^1O_2 \qquad /8/$$

Neugodna situacija (radikalsko sprožene oksidacije) se s pojavom $^1O_2$ še poslabša. Nastali $^1O_2$ ne potrebuje več »radikalske« aktivacije ampak oksidira celične sestavine v svoji neposredni okolici po neradikalskih poteh. Primarno nastajajo hidroperoksidi in ciklični endoperoksidi (Slika 1). Oboji se lahko ob prisotnosti ionov železa ali bakra (Fe^{2+}, Cu^+) pretvorijo v hidroksilne in alkoksilne radikale, ki sprožijo nov val oksidacij s $^3O_2$.

Slika 1. Oksidacija s 1O2 do cikličnega endoperoksida (A) in hidroperoksida (B)

Vsako nenadzorovano nastajanje radikalov v koži, ki preseže celično antioksidativno kapaciteto, pahne celico v oksidativni stres, kjer potekajo najprej radikalske reakcije s $^3O_2$, v kasnejši fazi pa se v oksidacije vmeša tudi $^1O_2$. Od množine absorbirane UV svetlobe je odvisno, kakšen obseg biokemičnih poškodb bo UV svetloba povzročila. Koža je v evolucijskem razvoju razvila mnoge obrambne sisteme (pigmentacija, antioksidanti) pred UV sevanjem in čeprav človeštvo proizvaja zaščitne pripravke, ki UV svetlobi preprečijo prodor v živa področja kože, se ljudje še premalo zavedamo vseh nevarnosti pri izpostavljanju kože UV sevanjem.

3 Fotodinamična terapija (7, 8)

Singletni kisik nastaja v celici po različnih poteh. Poleg nastajanja iz peroksilnih radikalov /8/ je pomembno še fotokemično nastajanje, kjer se v proces vključi posrednik: fotosenzibilizator. Vidna svetloba (400 do 700 nm) lahko po absorpciji v snovi povzroča prehod molekul v različna vzbujena stanja. Ponavadi se iz vzbujenega stanja molekula vrne v osnovno stanje z izsevanjem fotona svetlobe (fluorescenca) ali pa se energija vzbujenega stanja pretvori v toploto. V nekaterih posebnih primerih se energije vzbujenega stanja lahko uporabi za obrat enega izmed spinov eletronov. Slednje se v različnem obsegu dogaja pri spojinah, ki jih imenujemo fotosenzibilizatorji. Iz osnovnega

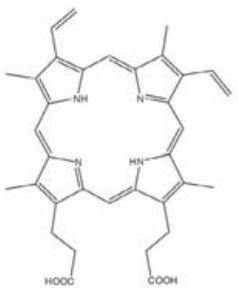
singletnega stanja molekula fotosenzibilizatorja po absorpciji vidne svetlobe preide v vzbujeno stanje, to stanje pa lahko preide v osnovno tripletno stanje, ki je stabilneše in se počasneje vrača (fosforescenca) nazaj. Obstaja pa še možnost, da fotosenzibilizator v tripletnem stanju izmenja usmeritve spinov z okolišnim $^3O_2$ pri čemer nastane $^1O_2$ in molekula fotosenzibilizatorja v osnovnem singletnem stanju (Shema 1). Fotokemično nastajanje $^1O_2$ si predstavljamo kot proces, ki poteka v treh stopnjah:

1. fotoekscitacija B $\quad B(\uparrow\downarrow) + h\nu \leftrightarrow B^*(\uparrow\downarrow)$
2. prehod B v tripletno stanje $\quad B^*(\uparrow\downarrow) \rightarrow B^*(\uparrow\uparrow)$
3. rakcija s $^3O_2$ $\quad B^*(\uparrow\uparrow) + {}^3O_2(\downarrow\downarrow) \rightarrow B(\uparrow\downarrow) + {}^1O_2(\downarrow\uparrow)$

Shema 1. Fotokemično nastajanje singletnega kisika ($^1O_2$), kjer je B fotosenzibilizator, B vzbujeno stanje fotosenzibilizatorja, ↑↓ je singletno stanje, in ↑↑ tripletno stanje.*

Vidna svetloba lahko ob posredovanju molekule fotosenzibilizatorja preskrbi dovolj energije (22,5 kcal/mol), ki je potrebna za obrat spina elektrona tripletnega kisika in prehod v singletno stanje, ki je pri kisiku (izjema) energetsko višje kot tripletno stanje. Če v topilu raztopimo fotosenzibilizator in tako raztopino obsevamo z vidno svetlobo, potem bo v raztopini fotokemično nastajal $^1O_2$. Ugotovili so, da v tkivu molekula $^1O_2$ zaradi velike reaktivnosti zreagira z okolišnimi organskmi snovmi v kroglici s polmerom 0,1 mm od mesta svojega nastanka. Fotokemično nastajanja $^1O_2$ in njegova velika kemična reaktivnost sta osnova za fotodinamično terapijo, ki izkorišča možnost lokaliziranega nastajanja $^1O_2$ za doseganje terapevtskega učinka. Nastali $^1O_2$ namreč poškoduje samo molekule v neposredni bližini svojega nastanka, kar pomeni, da lahko z usmerjenim obsevanjem pričakujemo zelo lokalizirane učinke.

Znani so številni fotosenzibilizatorji za lokalno ali sistemsko aplikacijo. Po aplikaciji fotosenzibilizatorja z lokaliziranim obsevanjem z ozkimi snopi koherentne (laserske) ali nekoherentne svetlobe dosežemo nastajanje $^1O_2$ samo v tanki plasti področja obsevanja in s tem zelo lokalizirane učinke. Današnja fotodinamična terapija je primerna za posege na koži in sluznicah povsod tam, kjer je možna osvetlitev z žarki svetlobe iz vidnega področja spektra. Pogoj za uspešnost fotodinamične terapije je zadostna prisotnost $^3O_2$ v tkivu. Uspeh je nadalje odvisen od uporabljenega fotosenzibilizatorja in od svetlobnega vira. Fotosenzibilizator mora biti farmakološko inertna spojina z ustezno farmakokinetiko, porazdeljevanjem po tarčnih tkivih in s primerno visokim izkoristkom tvorbe $^1O_2$. Zelo pomembna lastnost fotosenzibilizatorja je, da absorbira svetlobo v področju valovnih dolžin, ki jih tkivo ne absorbira. Temu morajo biti prilagojeni tudi viri svetlobe



Slika 2. Struktura fotosenzibilizatorja protoporfirina IX

tako po valovni dolžini, kot po možnosti obsevanja samo določenih predelov kože ali sluznice. Največ se uporabljajo laserski viri koherentne svetlobe z valovno dolžino iz vidnega območja (valovne dolžine nad 600 nm) in z močjo od 1 do 4 W. Taka svetloba prodira v tkivo nekaj mm globoko in pozroča nastajanje $^1O_2$.

V uporabni je več fotosenzibilizatorjev, razvijajo pa številne nove z boljšimi lastnostmi. Najpogostejši so derivati porfirina. Uporabljajo pa tudi 5-aminolevulinsko kislino, ki sama sicer ni fotosenzibilizator, vendar celica lahko iz nje sintetizira protoporfirin IX (Slika 2), ki po osvetlitvi pretvarja $^3O_2$ v $^1O_2$. Trenutno se s fotodinamično terapijo zdravijo vsa tista lokalizirana rakava in druga obolenja kože ter sluznic, ki jih lahko dosežemo z sistemi za obsevanje z vidno svetlobo. Izkorišča se tudi protibakterijski učinek $^1O_2$, še zlasti v dentalni medicini.

4 Zaključek

UV in vidna svetloba povzročata v koži različne učinke. UV svetloba je energetsko dovolj bogata, da povzroči nastanek radikalov na posameznih sestavinah celic kože. Primarni radikali sprožijo oksidativne procese in s tem pojav oksidativnega stresa, ki v koži v procesih lipidne peroksidacije, poškodbe proteinov in nukleinskih kislin vodi bodisi v pospešeno staranje, v degenerativne spremembe, v nastanek raka ali neposredno v celično smrt. Od količine absorbirane UV svetlobe ter od zaščitne kapacitete kože (antioksidanti) je odvisno, kakšen bo razplet dogodkov po obsevanju.

Vidna svetloba neposredno ne more povzročiti nastajanje radikalov, lahko pa preko vzbujenih stanj fotosenzibilizatorjev povzroča nastajanje singletnega kisika v obsevanem tkivu. Singletni kisik kot zelo reaktiven oksidant prav tako povzroča prostorsko omejene oksidativne poškodbe in smrt celice. Z uporabo primernih fotosenzibilizatorjev in sistema za lokalilzirano obsevanje dosežemo, da singletni kisik nastaja samo v področju, kjer želimo doseči terapevtski učinek. V tem primeru omenjeno lokalizirano nastajanje izrabljamo za fotodinamično terapijo, ki je uporabna pri obravnavi površinskih patoloških sprememb na dostopni površini kože ali sluznic.

5 Literatura

1. Fossel M. B.: *Cells, Aging, and Human Disease*, Oxford University Press, 2004, 140-160 (The Skin);
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Ed. Oxford, 2007.
3. Pečar S.: *Radikali v našem okolju*, Kemija v šoli: (2006), 18(2), 1-5;
4. Pečar S.: *Radikali v našem življenju,* Kemija v šoli: (2006), 18(3), 13-19;
5. Byrne-Habič B., Mravljak J., Pečar S.: *Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost*
6. Jurkovič P., Šentjurc M., Gašperlin M., Kristl J., Pečar S.: *Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions*, Eur. J. Pharm & Biopharm: (2003), 56, 59-66; *in nastajanje NO v organizmu,*. Farm Vest. (2004), 55, 469-478;
7. Bonnett R.: *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Brech Science Publishers, Amsterdam 2000;
8. Japelj B., Pečar S.: *Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja.* Farm Vest (2006), 57, 131-139.

Uporaba in vrednotenje varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem

Matejka Kumperščak Duh

Povzetek: Področje varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem se zelo hitro razvija. Uporaba izdelkov, ki vsebujejo UV filtre, se je v zadnjih desetih letih zelo povečala. Vzrok je predvsem osveščanje ljudi o porastu števila primerov kožnega raka, opeklin, alergij in tanjšanju ozonske plasti. Povpraševanju seveda sledijo tudi proizvajalci kozmetičnih izdelkov, ki dajejo na tržišče vedno nove tehnološke oblike varovalnih pripravkov za zaščito pred soncem z vedno višjimi vrednostmi zaščitnih faktorjev.

V prispevku je podan pregled UV filtrov, ki so dovoljeni za uporabo v kozmetičnih izdelkih v Evropski skupnosti. Opisane so metode, ki jih je za določanje sončnega zaščitnega faktorja in UV A zaščitnega faktorja sprejela COLIPA (Evropsko kozmetično združenje). Podane so smernice za vrednotenje učinkovitosti, označevanje in uporabo varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem.

1 Ultravijolična svetloba in njeni učinki

Elektromagnetno valovanje zajema rentgenske valove (valovna dolžina λ<200nm), ultravijolične žarke (λ=200-400nm), vidno svetlobo (λ=400-800nm) in infrardeče, radijske valove (λ>800nm). Ultravijolični žarki so žarki valovne dolžine 200-400nm. Razdelimo jih na UV C žarke, ki zajemajo valovno dolžino 200-290nm, UV B žarke, ki zajemajo valovno dolžino 290-320nm in UV A žarke z valovno dolžino 320-400nm. UV A žarki se delijo še na UVA I (340-400nm) in UVA II (320-340nm)[1,2].

Tabela 1: Spekter UV žarkov

Ultravijolični žarki (UV)	Valovna dolžina (λ)
UV C	200-290nm
UV B	290-320nm
UV A II	320-340nm
UV A I	340-400nm

UV C žarki so žarki z najkrajšo valovno dolžino in zato največjo energijo.

So zelo nevarni, saj so smrtni za rastline in mikroorganizme, za ljudi pa karcinogeni, vendar jih ozonska plast absorbira in tako ne dosežejo površine zemlje.

UV B žarki zajemajo 18% sončnega UV spektra, vendar jih velik del filtrira ozonska plast. UV B žarki so tisti, ki so v največji meri odgovorni za sončne opekline in nastanek kožnega raka. Prehajajo skozi roženo plast kože in povrhnjico.

UV A žarki zajemajo 75% sončnega UV spektra, prehajajo pa praktično v celoti skozi ozonsko plast. Imajo najnižjo energijo, vendar prehajajo globlje v kožo. V večjih količinah prav tako povzročijo rdečino. UV A žarki so pomemben dejavnik pri nastanku kožnega raka, ob daljšem izpostavljanju pa povzročajo staranje kože (photo-aging).

UV **A** žarki – **A**GEING

UA **B** žarki - SUN**B**URN

V zadnjih letih se veliko poudarja pomen UV A žarkov pri nastanku kožnega raka, predvsem UVA I, ne le UV B žarkov. Sodobni varovalni pripravki za sončenje zato vsebujejo UV filtre, ki absorbirajo oz. odbijajo ne le UV B in UVA II, ampak tudi UVA I žarke [3].

2 UV filtri

Da bi lahko čas bivanja na soncu podaljšali, po drugi strani pa zmanjšali škodljive učinke sončnih žarkov, uporabljamo pri sončenju varovalne kozmetične izdelke za zaščito pred soncem, ki vsebujejo UV filtre. **Naloga UV filtra je, da absorbira oz. odbije UV žarke, preden** dosežejo kožo. Lahko so organskega ali anorganskega izvora [16].

Uporaba in s tem tudi izdelava izdelkov, ki vsebujejo UV filtre, se je v zadnjih desetletjih izredno povečala. Vzrokov za to je več: tanjšanje ozonske plasti, spremenjen življenjski slog in s tem večja izpostavljenost UV žarkom, vsesplošno osveščanje ljudi o porastu kožnega raka in alergij, nove tehnološke oblike varovalnih pripravkov za zaščito pred soncem. UV filtrov ne vsebujejo le varovalni pripravki, ampak vedno pogosteje tudi drugi kozmetični izdelki, na primer dnevne negovalne kreme.

Matejka Kumperščak Duh, mag. farm., spec., Mariborske lekarne Maribor

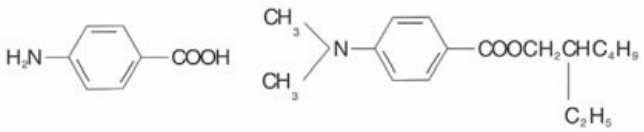
2.1 Organski UV filtri

Organski UV filtri so organske sintezne spojine, ki se večinoma uporabljajo sami ali v kombinaciji z anorganskimi. Kemijske vezi nekaterih molekul lahko absorbirajo UV žarke in jih oddajo ali reabsorbirajo v neškodljivi obliki. Take so aromatske spojine s karbonilno skupino oz. spojine z elektrondonorsko skupino, npr. amino skupino, metoksi skupino na orto ali para mestu glede na aromatski obroč. Ko taka spojina absorbira UV žarke, pride do fotokemijske ekscitacije, molekula preide v višji energijski nivo. Pri vrnitvi v prvotno stanje se odvečna absorbirana energija odda. Večina UV filtrov odda energijo v obliki IR svetlobe [4].

Po kemizmu organske UV filtre delimo na [4,5,16]:

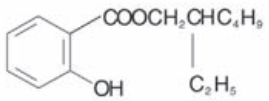
1. derivate p-aminobenzojske kisline (PABA, oktildimetil PABA)
2. salicilate (oktilsalicilat, homosalat)
3. cinamate (oktilmetoksicinamat)
4. benzofenone (oksibenzon, sulisobenzon)
5. derivate kafre
6. derivate dibenzoilmetana.

1**. PABA** in njeni derivati se uporabljajo kot UV filtri že od leta 1950 in so na seznamu dovoljenih filtrov v ZDA in Evropski skupnosti. Absorbirajo v območju UV B žarkov.



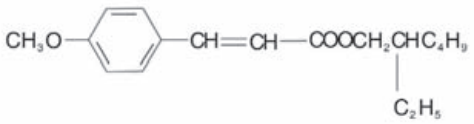
Slika 1: PABA in oktildimetil p-aminobenzoat (Padimat O)

2. **Salicilati** so prve spojine, ki so se uporabljale kot UV filtri in so popularni še danes. Absorbirajo v območju UV B žarkov. Če jih primerjamo z ostalimi UV filtri so slabši absorberji, vendar pa je njihova uporaba bolj varna (manj stranskih reakcij).



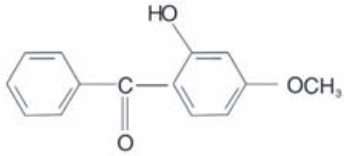
Slika 2: Oktilsalicilat

3. **Cinamati**, predvsem oktilmetoksicinamat, so najbolj uporabljani UV filtri. Oktilmetoksicinamat absorbira v območju UV B žarkov, je relativno varen, kar pomeni, da ne povzroča fotoalergičnih in fototoksičnih reakcij, ker je v tekočem stanju, ga lažje vgradimo v varovalne emulzije, dobro je topen v oljnih komponentah, netopen pa je v vodi, kar omogoča pripravo vodoodpornih pripravkov.



Slika 3: 2-etilheksil p-metoksicinamat

4. **Benzofenoni** so prav tako na seznamu dovoljenih UV filtrov v ZDA in EU. Absorbirajo predvsem v območju UV A žarkov. Ker so v praškasti obliki, je oblikovanje varovalnih pripravkov težje. Značilna predstavnika sta benzofenon-3 (oksibenzon) in benzofenon-5. Če pripravek vsebuje oksibenzon, mora biti po evropski zakonodaji označeno na etiketi opozorilo zaradi večje možnosti alergij.



Slika 4: Oksibenzon

5.,6**. Derivati kafre in dibenzoilmetana** so na seznamu dovoljenih UV filtrov v EU. Absorbirajo predvsem v območju UV A žarkov So precej dragi, netopni v nekaterih topilih, slabše stabilni pod vplivom UV žarkov, posledica razpada pod vplivom svetlobe je ponavadi slabša učinkovitost pripravka, fotokemijski produkti pa lahko povzročijo fotoalergične ali fototoksične reakcije.

2.2 Anorganski UV filtri

Varovalni pripravki za zaščito pred soncem vedno pogosteje vsebujejo anorganske UV filtre (pogosto jim rečemo tudi fizikalni UV filtri – physical sunscreens). Ločimo dve vrsti anorganskih UV filtrov: tiste, ki sevanje le odbijajo in tiste, ki poleg odboja žarkov žarke določenih valovnih dolžin tudi absorbirajo. V prvo skupino spadata barijev sulfat $BaSO_4$ in smukec, v drugo pa titanov dioksid TiO_2 in cinkov oksid ZnO, ki se v mikronizirani obliki uporabljata v varovalnih pripravkih za zaščito pred soncem. Velika prednost anorganskih UV filtrov pred organskimi je, da v kožo ne prodirajo, zato ne povzročajo alergičnih reakcij, delujejo pa v celotnem delu UV spektra [6,7,16].

2.3 Stranski učinki UV filtrov in varovalnih pripravkov za zaščito pred soncem

Zaradi povečane uporabe UV filtrov se je povečalo tudi število stranskih reakcij. Vzrok za to ni le vedno večje število varovalnih pripravkov z vedno višjimi zaščitnimi faktorji, ampak tudi vgrajevanje UV filtrov v kozmetične izdelke za preprečevanje nastanka gub in staranja in za podaljšanje roka uporabe, saj povečajo fotostabilnost izdelka [8,9,16].

Stranske reakcije na UV filtre se kažejo kot preobčutljivostne reakcije na svetlobo, zato UV filtre uvrščamo med topikalne fotoalergene. To pomeni, da pri lokalnem nanosu na kožo, ki je izpostavljena svetlobi, izzovejo alergično reakcijo. Prav vsi UV filtri so možni fotoalergeni. Med najpogostejšimi povzročitelji fotoalergij so derivati p-aminobenzojske kisline (PABA), benzofenoni (oksibenzon) in derivati dibenzoilmetana (avobenzon). Derivati dibenzoilmetana so med novejšimi UV filtri, ki absorbirajo v območju UV A žarkov.

Vzrok za fotoalergično reakcijo na varovalni kozmetični izdelek ni vedno le UV filter, ampak mnogokrat tudi druge uporabljene sestavine v pripravku. Kontaktni alergeni, ki po obsevanju v UV žarki povzročijo alergično reakcijo, so tudi konzervansi, dišave, antioksidanti, emulgatorji.

Zakonodaja v Evropski skupnosti

V Evropski skupnosti ureja področje varovalnih pripravkov za zaščito pred soncem Kozmetična direktiva Evropske skupnosti (Cosmetics Directive), ki jo je pripravila in izdala Komisija Evropske skupnosti v sodelovanju z Evropskim kozmetičnim združenjem (COLIPA). Dovoljeni UV filtri so na listi, znani kot Aneks VII (Annex VII). Slovenska zakonodaja je popolnoma usklajena z evropsko, zato Pravilnik o sestavi kozmetičnih proizvodov v 3. členu navaja, da lahko kozmetični proizvodi vsebujejo le ultravijolične filtre iz Priloge VII Direktive 76/768/ EGS [10].

V Evropski skupnosti dovoljene UV filtre prikazuje tabela 2 [10,11].

3 Vrednotenje učinkovitosti varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem

Za vrednotenje učinkovitosti varovalnih pripravkov za zaščito pred soncem uporabljamo **sončni zaščitni faktor SPF** (Sun Protection Factor). Definiran je kot razmerje med minimalnim odmerkom UV žarkov za nastanek eritema na koži (Minimum Erythemal Dose – minimalni eritemski odmerek - MED), ki jo ščiti izdelek za zaščito pred soncem, in minimalnim odmerkom UV žarkov za nastanek eritema na isti nezaščiteni koži (enačba 1) [12].

$$SPF = \frac{MED_{zavarovana}}{MED_{nezavarovana}}$$

Enačba 1: Definicija sončnega zaščitnega faktorja (SPF)

MED je izražen kot energija UV sevanja (izraženo v J/m^2), ki je potrebna za prvo opazno rdečino na koži z jasno izraženimi mejami. Če ima pripravek SPF 8 pomeni, da smo po njegovi uporabi lahko izpostavljeni sončnim žarkom osem krat dlje, da se pojavi prva opazna rdečina, če ne bi bili zavarovani.

Princip določanja zaščitnega faktorja je **opazovanje rdečine na koži, kar pomeni, da metoda zajame predvsem vpliv UV B žarkov na kožo, ne pa tudi UV A žarkov.** Žarki UV B so namreč dosti močnejši povzročitelji rdečine. Pripravek z visokim zaščitnim faktorjem torej dobro varuje kožo pred UV B žarki, ne pa tudi pred UV A žarki, ki

Tabela 2: UV filtri dovoljeni v Evropski skupnosti

Spojina (ime)	Najvišja dovoljena konc. (%)
1. p-aminobenzojska kislina	5
2. benzalkonijev metasulfat kafra	6
3. homosalat	10
4. benzofenon-3 (oksibenzon)	10
5. fenilbenzimidazol sulfonska kislina in njene soli	8 (prerač. na kislino)
6. tereftaliden dikafra sulfonska kislina in njene soli	10 (prerač. na kislino)
7. butilmetoksi dibenzoilmetan (avobenzon)	5
8. benziliden kafra sulfonska kislina in njene soli	6 (prerač. na kislino)
9. oktokrilen	10 (prerač. na kislino)
10. poliakrilamidometil benziliden kafra	6
11. etilheksil metoksicinamat	10
12. PEG-25 PABA (etoksiliran etil-4-aminobenzoat)	10
13. izoamil p-metoksicinamat	10
14. etilheksil triazon	5
15. drometrizol trisiloksan	15
16. dietilheksil butamidotriazon	10
17. 4-metilbenziliden kafra	4
18. 3-benziliden kafra	2
19. etilheksil salicilat	5
20. benzofenon-5 in njegove soli	5 (prerač. na kislino)
21. etilheksildimetil p-aminobenzojska kisl. (Padimat O)	8
22. bisoktitriazol	10
23. bisimidazilat	10
24. anisotriazin	10
25. dimetikodietil benzalmalonat	10
26. titanov dioksid	25
27. dietilamino hidroksibenzoil heksilbenzoat	10

Opomba: uradno veljavnega INCI poimenovanja v slovenskem jeziku ni na razpolago.

povzročajo prehitro staranje kože, vplivajo na imunski sistem in nastanek kožnega raka. V varovalne pripravke za zaščito pred soncem zato poleg UV B filtrov vgrajujemo tudi UV A filtre, učinkovitost pa določimo z **UV A zaščitnim faktorjem** [13].

UV A zaščitni faktor (UV A PF) je razmerje med minimalnim odmerkom UV A, potrebnim za obstojno pigmentacijo na koži, ki jo ščiti izdelek za zaščito pred soncem, in minimalnim odmerkom UV A, potrebnim za minimalni učinek pigmentacije na isti nezaščiteni koži [14].

Zaščitnih faktorjev za varovalni pripravek ni mogoče kar enostavno določiti oz. izračunati glede na uporabljane UV filtre in njihove koncentracije, ampak ga moramo po predpisanem postopku (in vivo, in vitro) določiti za vsak pripravek posebej. Zaščitni faktor namreč ni odvisen le od vrste, koncentracije in kombinacije uporabljenih UV filtrov, ampak tudi od vehikla (podlage, emulgatorjev) in debeline plasti varovalnega pripravka [15,16].

3.1 Določanje zaščitnega faktorja SPF z mednarodno preskusno metodo za zaščitni faktor (2006) (International Sun Protection Factor test Method) (2006))

Metodo so leta 2006 posodobile in prevzele evropska, japonska, južnoafriška industrija in industrija ZDA. Gre za in vivo določitev zaščitnega faktorja za testni pripravek za zaščito pred soncem [12].

Z določanjem sončnega zaščitnega faktorja SPF označimo nivo zaščite varovalnega pripravka pred sončnimi žarki. Vendar vrednosti SPF ne smemo jemati kot natančno število, ampak kot informacijo, v katero kategorijo varovalne sposobnosti spada izdelek (**nizka, srednja, visoka ali zelo visoka zaščita**). Izdelek z zaščitnim faktorjem 15 absorbira 93% sevanja UV B, izdelek z zaščitnim faktorjem 30 pa 97% sevanja UV B. Zveza med vrednostmi SPF in zmanjšanjem sevanja torej ni linearna, zato pripravki z zaščitnimi faktorji nad 50 praktično ne povečajo več zaščite pred UV sevanjem in zato tudi niso smiselni [16].

Ker je in vivo metoda za določanje zaščitnega faktorja časovno in materialno zahtevna, pa tudi etično vprašljiva, predvsem proizvajalci varovalnih pripravkov za sončenje preizkušajo številne metode in vitro. V Sloveniji izvaja in vitro merjenje SPF v izdelkih za sončenje Inštitut za varovanje zdravja v Ljubljani. Metoda je interna, v bodoče pa razmišljajo o podizvajalcih, ki bi določali SPF in UV A PF.

3.2 Metode za določanje učinkovitosti zaščite pred UV A žarki

Danes se od varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem pričakuje, da nas ne bodo zaščitili le pred nastankom opeklin, ampak nas bodo varovali tudi pred poznimi učinki UV žarkov (pred kožnim rakom, prehitrim staranjem kože, povečano pigmentacijo). To pomeni, da postajajo UV A filtri vedno bolj pomembni, sodobni pripravki za zaščito pred soncem zato poudarjajo UV A zaščito.

Še pred nekaj leti v Evropski skupnosti ni bilo enotne standardizirane metode za določanje učinkovitosti zaščite pred UV A žarki. Proizvajalci so uporabljali različne metode (najbolj znan Avstralski standard, sistem označevanja zaščite z zvezdicami) [16].

V letu 2006 in 2007 je COLIPA metode za določanje UV A zaščitnega faktorja standardizirala in tako imamo na voljo 3 metode za merjenje UV A zaščite [13,14].:

1. in vivo metoda merjenja obstojne pigmentacije (PPD Method – Persistent Pigment Darkening)
2. in vitro določanje UV A PF, kot ga je predpisala COLIPA
3. preskus kritične valovne dolžine, ko mora biti enaka ali večja od 370 nm.

Zaradi etičnih pomislekov je potrebno dajati prednost metodam in vitro!

COLIPA določa tudi razmerje med UV A zaščitnim faktorjem in sončnim zaščitnim faktorjem (SPF). Da ima lahko izdelek za zaščito pred soncem oznako, da nas varuje pred UV A žarki, **mora biti vrednost UV A zaščitnega faktorja, izmerjenega z metodo obstojne pigmentacije ali in vitro metodo vsaj 1/3 sončnega zaščitnega faktorja (SPF).** Kritična valovna dolžina mora biti vsaj 370 nm.

4 Označevanje in uporaba varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem

V Uradnem listu Evropske unije so septembra 2006 izdali "Priporočila o učinkovitosti izdelkov za zaščito pred soncem in s tem povezanimi trditvami proizvajalca", ki so prevedena tudi v slovenščino. Poleg osnovnih pojmov o UV žarkih, učinkih UV žarkov, metodah za vrednotenje učinkovitosti izdelkov za zaščito pred soncem, so v priporočilih tudi zahteve proizvajalcem, kako morajo biti varovalni izdelki za sončenje označeni, da ne zavajajo potrošnikov [14].

Izdelki za zaščito pred soncem morajo vsebovati vidna opozorila o tem da ne zagotavljajo 100 % zaščite, npr.:

- "**Tudi ko uporabljate izdelek za zaščito pred soncem, ne ostajajte na soncu predolgo**";
- "**Dojenčki in majhni otroci ne smejo biti izpostavljeni neposrednim sončnim žarkom**";
- "**Prevelika izpostavljenost soncu resno ogroža vaše zdravje".**
- Izdelki za zaščito pred soncem morajo vsebovati navodila za uporabo, ki bodo zagotovila njihovo učinkovitost, npr.:
- **"Izdelek za zaščito pred soncem nanesite pred izpostavljanjem soncu"**
- **"Zlasti po potenju, kopanju ali brisanju z brisačo izdelek ponovno nanesite na kožo"**
- Za doseganje ravni zaščite, ki jo zagotavlja navedeni zaščitni faktor, se morajo izdelki za sončenje nanesti na kožo v dovolj veliki količini. Ta količina je pribl. **6 polnih kavnih žličk za telo odrasle osebe (35 g). "Uporaba manjše količine od navedene bo bistveno znižala raven zaščite."**
- Izdelki za zaščito pred soncem morajo zagotoviti minimalno stopnjo zaščite pred UV A in UV B žarki. Minimalna stopnja zaščite mora biti naslednja:
- **Vrednost SPF zaščitnega faktorja najmanj 6 (izmerjena s standardizirano metodo in vivo ali in vitro) in vrednost UV A**

zaščitnega faktorja najmanj 1/3 SPF, izmerjenega z in vivo metodo obstojne pigmentacije ali z in vitro COLIPA metodo. Kritična valovna dolžina, dosežena pri uporabi preskusne metode kritične valovna dolžine, mora biti vsaj 370 nm.

- Omejiti je treba število različnih vrednosti zaščitnega faktorja na embalažah, da se tako olajša primerjava med različnimi izdelki. Priporoča se naslednji razpon zaščitnih faktorjev (tabela):

Označena kategorija:	Označeni SPF na ovojnini:	Min UV A PF:	Kritična valovna dolžina:
NIZKA ZAŠČITA (do 10)	SPF 6 SPF 10	**1/3 SPF**	**370 nm**
SREDNJA ZAŠČITA (do 25)	SPF 15 SPF 20 SPF 25		
VISOKA ZAŠČITA (do 50)	SPF 30 SPF 50		
ZELO VISOKA ZAŠČITA (več kot 50**???**)	SPF 50+		

Na embalaži je zelo priporočljiva uporaba posebnih **piktogramov,** ki uporabniku nazorno pokažejo pravilno uporabo izdelka za zaščito pred soncem in ga hkrati opozarjajo na nevarnosti, ki jih prinaša prekomerno izpostavljanje sončnim žarkom [17].

5 Zaključek

Varovalni kozmetični izdelki za zaščito pred soncem nikakor niso prva in edina zaščita pred škodljivimi vplivi sončnih žarkov. Najbolj varno in učinkovito je, da omejimo izpostavljanje sončnim žarkom v času, ko so najmočnejši in zato najbolj nevarni in nosimo zaščitna oblačila, pokrivala in očala. Posebej pozorni moramo biti pri otrocih, saj sončne opekline v otroštvu podvojijo možnost za kasnejši nastanek kožnega raka.

6 Literatura

1. Technical Series: Solar Radiation, *C&T*, 3/1997.
2. Technical Series: UV Radiation and Skin Cancer, *C&T*, 2/1998.
3. S. Forestier, R. Mascotto: Sun&UV A, *SOFW Journal*, **125**, 8/1999, 2-6.
4. K. Klein: Encyclopedia of UV Absorbers for Sunscreen Products, *C&T*, Vol. **107,** 10/1992, 45-64.
5. D. Steinberg: Sunscreen Encyclopedia Regulatory Update, *C&T,* Vol. **111,** 12/1996, 77-86.
6. Technical Series: Microfine Zinc Oxide: Photostable UVB & UVA Protection, *C&T,* 9/1999.
7. R. Sayre: Physical Sunscreens, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **41,** 4/1990, 103-109.
8. Scheman: Dermatologic Aspect of Cosmetics: Adverse Reactions to Cosmetic Ingredients, *Dermatologic Clinics*, **18,** 10/2000.
9. H. DeBuys, S. Levy, J. Murray, D. Madey, S. Pinnel: Dermatologic Aspect of Cosmetics: Modern approaches to Photoprotection, *Dermatologic Clinics*, **18,** 10/2000.
10. COUNCIL DIRECTIVE (76/768/EGS), ANNEX VII (List of UV filters which cosmetic products may contain)
11. Pravilnik o sestavi kozmetičnih proizvodov, Uradni list RS št. 35/2005, 5. 4. 2005.
12. http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/sunscreen/ (International Protection Factor Test Method)
13. http://www.colipa.com/ (Method for the in vitro Determination of UV A Protection provided by Sunscreen Products)
14. Uradni list Evropske unije L 265/39, 26. 9. 2006, Priporočilo komisije o učinkovitosti izdelkov za zaščito pred soncem in s tem povezanimi trditvami proizvajalca
15. D.T.Floyd, et al: Formulation of Sun Protection Emulsions with Enhanced SPF Response, *C&T,* Vol. **112,** 6/1997, 55-62.
16. Matejka Kumperščak Duh:Optimiranje sestave in oblikovanja ter zagotavljanje stabilnosti varovalne emulzije za sončenje, Specialistična naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2001.
17. http://ec.europa.eu/health-eu/

Primerjava alelnih frekvenc mutacij ključnih encimov presnove homocisteina med vzorci Slovencev in drugih narodov

Allele frequency of mutations of homocysteine metabolism key enzymes in Slovene population in comparison to that in other populations

Nadja Plazar, Barbara Ostanek

Povzetek: V vzorcu 149 navidezno zdravih prostovoljcem smo proučevali pogostost mutacij genov: 677C>T 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze - MTHFR, 1947G>A katehol-O-metil transferaze – COMT in 1420C>T citosolne serin hidroksimetiltransferaze - cSHMT), ki določajo tri ključne encime presnove homocisteina in jih primerjali z že objavljenimi rezultati. Ugotovili smo, da pri alelni frekvenci mutacije 677C>T MTHFR med Slovenci in ostalimi evropskimi narodi (z izjemo Italijanov in Nemcev) ni statistično značilne razlike. Prav tako ni statistično značilne razlike pri mutaciji 1947G>A COMT (z izjemo Italijanov in Špancev). Alelne frekvence za 1420C>T cSHMT se med evropskimi narodi statistično značilno ne razlikujejo, so pa v pogostosti pojavljanja gena primerljive z Japonci. Primerjali smo pričakovane in za evropsko populacijo določene frekvence genotipov in ugotovili, da se statistično pomembno ne razlikujejo za vse tri preiskovane mutacije, iz česar sklepamo, da v evoluciji Evropejcev ni bilo očitne prednosti ali slabosti zaradi mutacij izbranih genov, kljub temu, da imajo mutirani homozigoti le 50 % ali manj aktivnosti nemutiranega encima.

Ključne besede: *hiperhomocisteinemija, aktivnost encima, mutirani gen, alelni gen.*

Abstract: In 149 apparently healthy volunteers we studied the frequency of gene mutations 677C>T 5.10-methylenetetrahydrofolate reductase - (MTHFR), 1947G>A catechol-O-methyltransferase - COMT and 1420C>T cytosol serine hydroxymethylransferase –cSHMT) which define the three key enzymes essential for normal homocysteine metabolism, and compared them to already reported results. We concluded that there is no significant difference in the allele frequency of 677C>T MTHFR mutation in Slovene population comparable to that in European population (except Italian and Spanish). There is no significant difference in the frequency of the 1420C>T cSHMT allele in European population, whereas in comparison to that in the Japanese there is. We compared the expected and for the European population determined genotype frequency and came to the conclusion that there is no significant difference for any of the mutations examined. We thus conclude that the mutation of selected genes, even though the activity of the non-mutated enzyme in mutated homozygotes is only of 50% or less, was of no obviously positive or negative significance for the evolution of European populations.

Key words: *hyperhomocysteinemia, enzyme activity, mutated gene, allele gene*

1 Uvod

1.1 Hiperhomocisteinemija - dejavnik tveganja

Zmerna hiperhomocisteinemija je približno enako pomemben dejavnik tveganja za nastanek aterotromboze kot kajenje in hiperlipidemija (1). Pri porastu koncentracije homocisteina za 5 mol/L se relativno tveganje poveča od 1,3 do 2,7 (2). Povišan homocistein naj bi bil odgovoren za najmanj 10 % tveganja za razvoj aterotrombotične žilne bolezni (3). Dodatni dejavniki tveganja, kot so kajenje, povišan krvni tlak, sladkorna bolezen in hiperlipidemija lahko sinergistično delujejo s povišanim homocisteinom in ga še povečujejo (2).

Mehanizmi, s katerimi homocistein vpliva na nastanek aterotrombotične spremembe žilne stene, še niso povsem razjasnjeni, osnovani pa so na predpostavki, da homocistein pospešuje nalaganje

Dr. Nadja Plazar, Univerza na Primorskem, Visoka šola za zdravstvo Izola, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija
Dr. Barbara Ostanek, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Oddelek za klinično biokemijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

fibrina (nastanek tromba) na žilno steno ter da spremeni endotelijske celice in celice gladkega mišičja tako, da povzroči nastanek žilne bolezni ali pospeši njen razvoj. Verjetno homocistein deluje na žilno steno po več poteh: neposredno poškoduje celice žilnega endotelija, pospešuje proliferacijo celic gladkega mišičja in nalaganje kolagena ter oksidacijo lipoproteinov nizke gostote.

Možna sta dva mehanizma, po katerih naj bi homocistein spreminjal žilno funkcijo, ki vključujeta oksidativni stres in spremembe celične metilacije:

Po mehanizmu oksidativnega stresa oksidacija homocisteina v plazmi v homocistin, mešane disulfide in homocistein-tiolakton, vodi do nastanka reaktivnih oksidativnih vrst, kot so vodikov peroksid, superoksidni anion in hidroksilni radikal. Rezultati raziskav *in vitro* kažejo, da nastanejo poškodbe endotelijskih celic pri zmerni hiperhomocisteinemiji predvsem zaradi delovanja vodikovega peroksida (4).

Drugi možni mehanizem, ki vodi do motene žilne funkcije pri hiperhomocisteinemiji, je prepletenost presnove homocisteina z reakcijami **metilnega prenosa**. Presnova homocisteina je povezana s celičnim nivojem S-adenozil-metionina (SAM), ki se vpleta tako v transsulfuracijsko kot remetilacijsko pot presnove. SAM je obenem dajalec metilnih skupin pri metilaciji DNA, beljakovin, fosfolipidov in biogenih aminov. Aktivnost metiltransferaz je torej odvisna od celične koncentracije SAM-a, pa tudi S-adenozil-homocisteina (SAH). Obenem pa visoke vrednosti homocisteina, ki zastajajo v celicah, inhibirajo reakcije metiliranja. Metilacija je bistvenega pomena za vzdrževanje strukture DNA; brez reparacije pride do mutacij in rušenja same strukture (5, 6). Tesna povezava med homocisteinom, SAM in SAH kažejo, da je spremenjena celična metilacija odgovorna za nekatere učinke homocisteina pri žilni disfunkciji (7).

1.2 Presnova homocisteina

Homocistein nastaja pri presnovi metionina v skoraj vseh celicah. V kri ga prehaja le del, največ iz hepatocitov, in sicer 5 do 10 % dnevno sintetiziranega homocisteina, kar je 1,2 mmol/dan. Tveganje za srčnožilne bolezni narašča sorazmerno z naraščanjem koncentracije homocisteina in zato jasne razmejitve med normalnimi in povišanimi vrednostmi ni. Kljub temu so hiperhomocisteinemije razdelili po koncentraciji celokupnega homocisteina v plazmi, odvzeti na tešče v **zmerno** (koncentracija homocisteina 12-30 µmol/L), **srednjo** (koncentracija homocisteina 31-100 µmol/L) in **hudo hiperhomocisteinemijo (**nad 100 µmol/L) (4).

Homocistein nastaja iz esencialne aminokisline metionina. V telo prihaja s hrano ali nastaja z razgradnjo endogenih beljakovin. Metilna skupina metionina se aktivira s prehodom v S-adenosil-metionin. Reakcijo katalizira ATP: L-metionin-S-adenoziltransferaza. Metionin se v reakciji poveže z adenozilskim delom molekule ATP preko žveplovega mostička (-S-) tako, da nastane vez med 5'-ogljikovim atomom riboze in žveplovim atomom metionina. S-adenozil-metionin je zaradi žveplovega mostička »visoko energetska« molekula in je glavni biološki dajalec metilne skupine, ki jo ob prisotnosti metilaz **(katehol-O-metiltransferaza, COMT; EC 2.1.1.6**) prenaša na kateholamine, nukleinske kisline, proteine, fosfolipide, mielin, polisaharide in številne druge molekule (slika 1). Po prenosu metilne skupine prehaja S-adenozil-metionin v tioester S-adenozil-homocistein. S-adenozil-homocistein ima podobno strukturo kot S-adenozin-metionin, zato se lahko veže na ista vezalna mesta (vendar z drugačno afiniteto) in s tem zmanjšuje njegovo aktivnost. Razmerje med njima je kazalec metilacijskih procesov v telesu. Z merjenjem koncentracije so ugotovili, da je S-adenozil-homocisteina v jetrih normalnih odraslih podgan 13 nmol/g, S adenozin-metionina pa 60 do 90 nmol/g, kar pomeni, da je njuno razmerje približno 1:4. Njuno razmerje je zaradi zaviralnega delovanja S-adenozil-homocisteina pomembno; če se poruši, se zmanjša aktivnost metiltransferaz, odvisnih od S-adenozil-metionina, za 10 do 60 %.

S-adenozil-homocistein nato hidrolizira v homocistein in adenozin z reverzibilno reakcijo, ki jo katalizira S-adenozil-homocistein hidrolaza.

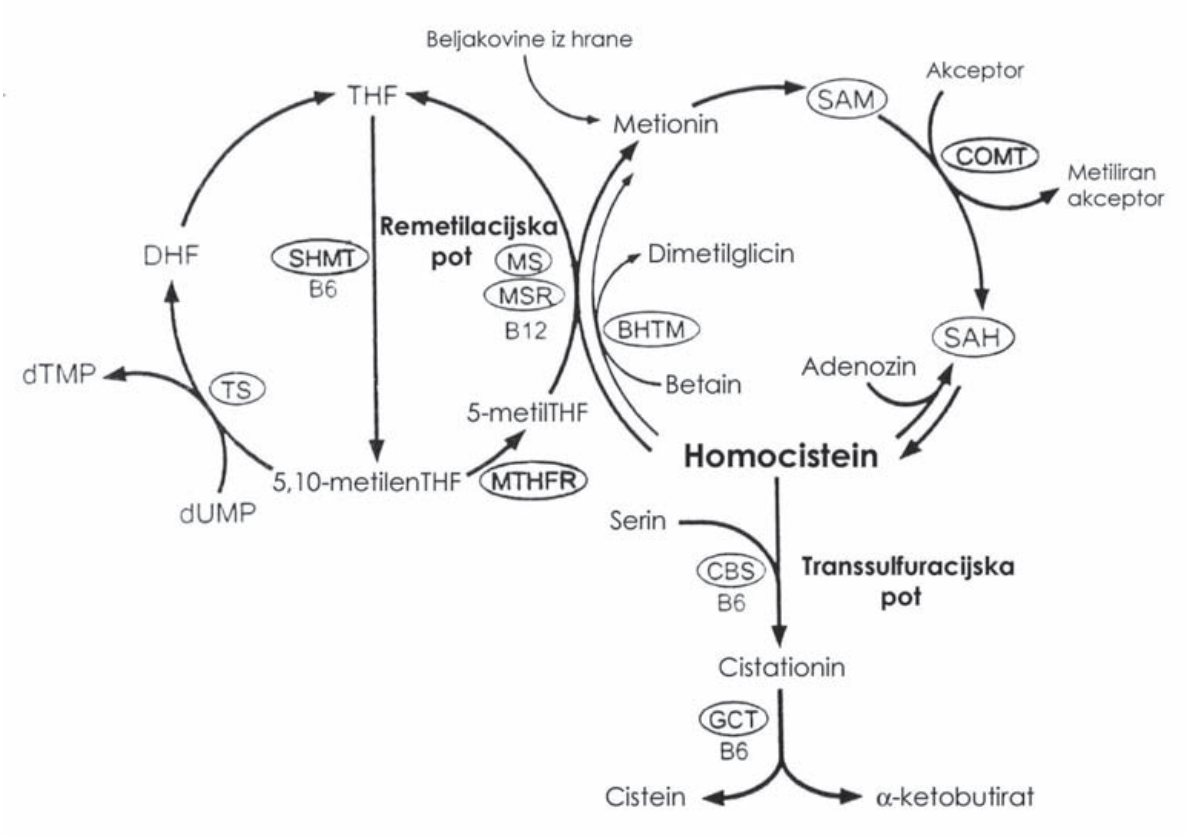
Homocistein se lahko presnavlja naprej po dveh poteh: remetilacijski ali transsulfuracijski poti.

V večini tkiv se homocistein lahko **remetilira** v metionin. Pri remetilizaciji homocisteina v metionin je v večini tkiv dajalec metilne skupine 5-metiltetrahidro-folat. Reakcijo katalizira 5-metiltetrahidrofolat-homocistein-metiltransferaza (metonin-sintaza, MS) s kofaktorjem vitaminom B12, kar je prikazano na sliki 1. Nastali tetrahidrofolat prehaja v 5,10-metiltetrahidrofolat z encimom **5,10-metiltetrahidrofolat-reduktazo, (MTHFR, EC 1.1.9.9**) in nato v 5-metiltetrahidro-folat. V nekaterih tkivih, predvsem v jetrih, ledvicah pa tudi v očesnih lečah, poteka remetilacija homocisteina po poti, neodvisni od folatov in vitamina B12; dajalec metilne skupine je betain (trimetilglicin), ki prehaja v dimetilglicin. Reakcijo katalizira encim betain-homocistein-metiltransferaza. Dimetilglicin se lahko naprej demetilira z dimetilglicin dehidrogenazo do sarkozina in pri tem nastaja 5,10-metilentetrahidrofolat. Sarkozin se razgradi s sarkozin dehidrogenazo do glicina, ki se lahko porabi za tvorbo 5,10-metilentetrahidrofolata (4, 8).

Druga presnovna pot homocisteina je **transsulfuracijska**, pri kateri homocistein s serinom prehaja v cistationin z encimom cistationin-sintazo (CBS) in s kofaktorjem vitaminom B6, nato v cistein z encimom-cistationazo (GCT).

Katerikoli proces v presnovi homocisteina (remetilacija, transulfuracija, metilacija) je lahko moten zaradi neustreznih aktivnosti sodelujočih encimov, do katerih lahko privedejo spremembe v genih za te encime ali neustrezne količine potrebnih kofaktorjev (vitamin B6, B12, folati, piridoksal-5 fosfat). Najbolj so raziskovane spremembe v genih za tiste encime, ki privedejo do hude hiperhomocisteinemije, na primer v genu za CBS ali v genu za GCT na transsulfuracijski poti. V zadnjem času je vedno več objav o vzrokih, ki privedejo do srednje in zmerne hiperhomocisteinemije. Ti so lahko mutacije v genih za encime, ki sodelujejo v remetilacijski poti in z njo povezano presnovno potjo folata (predvsem MTHFR, cSHMT) in v metilacijskih procesih (predvsem COMT).

Domnevamo, da so za višjo koncentracijo homocisteina in s tem višjim tveganjem za razvoj srčnožilnih bolezni odgovorni tudi ali predvsem genetski dejavniki, zato smo ugotavljali pogostost mutacij pri treh izbranih genih encimov, ki sodelujejo na ključnih mestih v presnovi homocisteina in jih primerjali z že objavljenimi rezultati. Ti so 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), katehol-O-metil transferaza (COMT) in citosolna serin hidroksimetiltransferaza (cSHMT).



Slika 1: Presnova homocisteina

Figure 1: Homocysteine metabolic patways

Okrajšave: 5-metilTHF – 5-metiltetrahidrofolat; 5,10-metilenTHF – 5,10-metilentetrahidrofolat; B_6 – vitamin B6; B12 – vitamin B12; BHMT – betain-homocistein metiltransferaza; CBS – cistationin β-sintaza; COMT – katehol-o-metiltransferaza; DHF – dihidrofolat; dUMP – deoksiuridin monofosfat; dTMP – deoksitimidin monofosfat; GCT – γ-cistationaza; MS – metionin sintaza; MSR – reduktaza metionin sintaze; MTHFR – 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza; SAH – s-adenozil homocistein; SAM – s-adenozil metionin; SHMT – serin hidroksimetiltransferaza; THF – tetrahidrofolat, TS-timidilat sintaza.

1.3 Gen za 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazo (MTHFR)

Gen za MTHFR se nahaja na kromosomu 1, na koncu krajše ročice p, na položaju 1p36.32. Kodirajoča regija je dolga 1980 bp in kodira za protein molekulske mase 77 kDa. Gen je sestavljen iz 11 eksonov, dolžine od 102 bp do 432 bp, in intronov, dolžine od 250 bp do 1,5 kb, razen enega introna, ki ima 4,2 kb. (9, 10). Določa encim 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazo (MTHFR), flavoprotein iz družine metilentetrahidrofolat reduktaz (EC:1.5.1.20). Človeški encim je homodimer, ki ga sestavljata dve podenoti, velikosti 77 kDa. Dolžina aminokislinskega zaporedja je 656. MTHFR je citoplazemski encim, ki katalizira redukcijo 5,10-metilentetrahidrofolata v 5-metiltetrahidrofolat. Encim veže koencim flavin adenin dinukleotid (FAD) in potrebuje NADPH kot elektronski dajalec. V fizioloških pogojih je reakcija ireverzibilna, encimsko aktivnost pa alosterično regulira glede na koncentracijo metionina v celici S-adenozil-metionin (SAM), ki je inhibitor encima (11, 12).

V genu za MTHFR so odkrili 34 redkih, a škodljivih mutacij in 9 pogostih polimorfizmov. Ena izmed prvih odkritih je bila mutacija 677C>T. Mutacija 677C>T se nahaja v eksonu 4, na mestu, ki kodira vezalno mesto za folat. Posledica je zamenjava 220 aminokisline alanina (A) z valinom (V) na mestu 222. Pri homozigotni osebi z mutacijo je aktivnost encima znižana na 35 % normalne, kar je posledica povečane termolabilnosti. Ugotovili so tudi, da mutacija povzroči razpad dimernega encima v monomerni, slabšo vezavo FAD koencima in s tem manjšo aktivnost (12, 13).

1.4 Gen za katehol-O-metil transferazo (COMT)

Poznamo dve izoobliki encima, topno (S-COMT) in membransko vezano (MB-COMT), ki se v različnih tkivih različno izražata (14, 15). Kodira ju skupni gen na daljši ročici 22. kromosoma, na mestu 22q11.21-q11.23. Gen je sestavljen iz 6 eksonov, od katerih eksona 1 in 2 nista kodirajoča. Prepis COMT gena uravnavata dva ločena promotorja P1 in P2. (16) Encim COMT katalizira prenos metilne

skupine iz SAM na –OH skupino kateholnega akceptorja (noradrenalin, adrenalin in drugi), pri čemer se SAM pretvori v SAH. Na ta način COMT sodeluje pri inaktivaciji kateholaminskih nevrotransmiterjev, kot so adrenalin, noradrenalin in dopamin ter razgradnji kateholnih estrogenov.

Proučevana mutacija 1947G>A na genu v COMT je točkasta mutacija, pri kateri se na 4. eksonu v 158. kodonu za MB-COMT, oziroma 108. kodonu za S-COMT, gvanin zamenja z adeninom. Posledica te mutacije je zamenjava amino kisline valina (GTG) z metioninom (ATG) v polipeptidu, kar zmanjša za 3 do 4-krat aktivnost nastalega encima. Aktivnost encima COMT s homozigotno mutacijo je od 25 do 35 % v primerjavi s homozigom z nemutiranima aleloma. (17,18)

1.5 Gen za citosolno serin hidroksimetiltransferazo (cSHMT)

Encim SHMT katalizira reverzibilno reakcijo, v kateri serin prehaja v glicin, medtem ko hidroksimetilna skupina prehaja na tetrahidrofolat in tako nastane 5,10-metilentetrahidrofolat. Na ta način ima SHMT ključno vlogo v metabolizmu folatov, ki so povezani z biosintezo purinov in pirimidinov in s tem nukleinskih kislin (19). Aktivnost encima SHMT je pogojena z vezavo koencima piridoksal-5'-fosfat (PLP) in spada v razred piridoksal-5'-fosfat encimov, čeprav ima manjšo sekvenčno podobnost z ostalimi encimi skupine, na primer z aspartat aminotransferazo (20).

Dva različna gena kodirata zapis za izoencima SHMT: gen SHMT1 (za encim cSHMT) in SHMT2 (za encim mSHMT). Nahajata se na dveh kromosomih: 17p11.2 in 12q13. Gen SHMT1 je dolg 23 kb in vsebuje 12 intronov ter 13 eksonov. Izrezovanje intronov poteka po pravilu gt/ag. Kodirajoči del gena je prekinjen z 10 introni, od katerih sta le 2 pozicijsko ohranjena v genu za mSHMT. Visoka stopnja identičnosti med obema genoma in prisotnost genov za keratin na obeh kromosomskih regijah kaže na možnost, da sta regiji kromosoma 12 in 17 nastali z duplikacijo, najverjetneje v filogenetskem razvoju po ločitvi razvojne poti prokariontov in evkariontov. (20, 21)

Mutacija 1420C>T v genu za cSHMT se nahaja v zadnjem, 13. eksonu, ki kodira C-terminalno domeno, pri čemer je mesto mutacije šteto od začetnega mesta translacije (AUG kodona). Posledica tranzicije citozina v timin je zamenjava aminokisline levcina (Leu) s fenilalaninom (Phe) na mestu 474 proteina (L474F) (22). Pri tem se zmanjša aktivnost encima in posledice so podobne kot pri pomanjkanju folatov. Zaradi znižanja aktivnosti mutirane cSHMT pride do motene remetilacije homocisteina in sinteze DNA (23). Lahko pa polimorfizem 1420C>T povzroči usmerjanje folatov v sintezo timidina zaradi interakcije (protein-protein) s timidilat sintazo ali zaradi povečane sinteze 5-formiltetrahidrofolata (24).

Izbrani geni kodirajo encime, ki sodelujejo v presnovi homocisteina. Mutacije različno znižujejo aktivnost encimov, običajno pri homozigotih pod 50 %. Namen naše študije je bil določiti, kakšna je alelna frekvenca določenih mutacij v slovenski populaciji, in jih primerjati z objavljenimi podatki o alelnih frekvencah drugih narodov. Ugotavljali smo prisotnosti naslednjih mutacij: 677C>T v genu za 5,10-metilretrahidrofolat reduktazo (MTHFR), 1947G>A v genu za katehol-O-metiltransferazo (COMT) in 1420C>T v genu za serin hidroksimetiltransferazo (SHMT).

Te mutacije vplivajo na aktivnost ključnih encimov v presnovi homocisteina (MTHFR), obenem pa povezujejo presnovo homocisteina s presnovo folatov in s sintezo nukleinskih kislin (SHMT) ter z glavno potjo presnove kateholaminskih nevrotransmitorjev (COMT).

2 Materiali in metode

Vzorec: 149 navidezno zdravim prostovoljcem, starih od 20 do 78 let, s povprečjem 43,9 (+,-13,7) let je bilo odvzete 4 ml venozne krvi z antikoagulantom K_3EDTA . Med vključenimi prostovoljci je bilo 112 žensk (81,9 %) in 37 moških (18,1 %).

Študijo je odobrila Komisija za etična vprašanja Republike Slovenije (57/05/04). Privolitev so podpisali vsi prostovoljci vključeni v študijo.

Analiza DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz levkocitov venske krvi, odvzete z antikoagulantom K_3EDTA, pri čemer smo uporabili komplet FlexiGene DNA (Qiagen, Hilden, Germany). Za identifikacijo mutacij *MTHFR* 677C > T, *COMT* 1947G > A in *cSHMT* 1420C > T smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR), ki ji je sledila analiza dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) ali analiza konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA (SSCP).

Genotipizacija MTHFR 677 C > T. PCR so izvedli tako, da smo v reakcijsko zmes s skupnim volumnom 20 µL smo dodali DNA vzorca (100 ng), 1 × PCR Gold pufer, 0.2 mM vsakega od štirih deoksiribonukleotidov, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 enote AmpliTaq Gold™ polimeraze (Applied Biosystems, Foster City, CA) in 0.2 mM vsakega oligonukleotidnega začetnika (F: (5'-TGA-AGG-AGA-AGG-TGT-CTG-CGG-GA-3', R: 5'-AGG-ACG-GTG-CGG-TGA-GAG-TG-3'). Uporabljene oligonucleotide začetnike je opisal Frosst et al. . Optimizirani pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja so bili: začetek 10 minut na 95 °C, ki mu je sledilo 37 ponovitev po 30 sekund na 94 °C (denaturacija), 30 sekund na 62 °C (prileganje začetnikov) in 30 sekund na 72 °C (podaljševanje DNA) ter na koncu 7 minut na 72 °C (končno podaljševanje DNA).

Pet mL tako dobljenega PCR produkta (198 bp) smo čez noč inkubirali z 1 enoto *Hin*fI restrikcijske endonukleaze (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). Uspešnost restrikcije smo preverili z elektroforezo (Mini-protean, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) na 4 % agaroznem gelu pri napetosti 85 V, času poteka 90 minut in z uporabo 1.0 × TAE pufra (4 mM Tris-HCl, 20 mM ocetne kislina, 0,96 mM EDTA) ter barvanjem z etidijevim bromidom.

Fragment velikosti 198 bp je predstavljal CC genotip, 175- in 23-bp TT genotip in 198, 175- in 23-bp CT genotip.

Genotipizacija COMT 1947 G > A. Pri PCR smo v reakcijsko zmes s skupnim volumnom 20 µL smo dodali DNA vzorca (100 ng), 1 × PCR Gold pufra, 0.2 mM vsakega od štirih deoksiribonukleotidov, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.4 enote AmpliTaq Gold™ polimeraze in 0.2 mM vsakega oligonukleotidnega začetnika (F: 5'-CTC-ATC-ACC-ATC-GAG-ATC-AA-3' in R: 5'-CCA-GGT-CTG-ACA-ACG-GGT-CA-3'). Uporabljene oligonucleotide začetnike je opisal Malhotra et al. (26). Optimizirani pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja so bili: začetek 10 minut na 95 °C, ki mu je sledilo 37 ponovitev po 30 sekund na 94 °C, 30 sekund

na 55 °C in 30 sedund na 72°C ter na končnih 7 minut na 72°C. Pet mL PCR tako dobljenega PCR produkta (109 bp) smo čez noč inkubirali z 1 enoto *Nla*III restrikcijske endonukleaze (New England Biolabs, Inc.).

Uspešnost restrikcije smo preverili z elektroforezo na 12 % poliacrilamidnem gelu pri napetosti 200 V, času poteka 40 minut in 0.5 x TAE pufru (50 mM Tris-borata, pH 8.3 in 0.5 mM EDTA) ter barvanjem z etidijevim bromidom. Fragment velikosti 87- in 22-bp je predstavljal GG genotip, 69-, 18- in 22-bp AA ter 87-, 69-, 18- in 22-pa GA genotip.

Genotipizacija cSHMT1420 C > T . Pri PCR smo v reakcijsko zmes s skupnim volumnom 20 µL smo dodali DNA vzorca (100 ng), 1 × PCR pufera II, 0.2 mM vsakega od štirih deoksiribonukleotidov, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.4 enote AmpliTaq Gold™ polimeraze in 0.25 mM vsakega oligonukleotidnega začetnika (F: 5'-AGA-GTT-CAA-GGA-GAG-ACT-GGC-AG-3' in R: 5'-GTC-AAC-AGT-TCC-CCT-TTG-GAG-3'). ki smo ju izbrali glede na sekvenco cSHMT, objavljeno v GenBank (NM-004169) s pomočjo računalniškega programa NetPrimer 3.

Optimizirani pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja so bili: začetek 10 min na 95 °C, ki mu je sledilo 37 ponovitev po 30 sekund na 94 °C, 30 sekund na 60 °C in 30 sekund na 72°C ter končnih 7 min na 72°C.

Za SSPS analizo smo 2 mL tako pridobljenega PCR produkta (220 bp) pomešali s 17 mnanašalnega LIS pufra (10 % saharoza, 0.01 % bromfenol-modro in 0.01 % ksilenciano) denaturirali v vodni kopeli pri 95 do 97°C 3 minute in nato takoj prenesli na led za 5 minut.

15 mL tako pripravljenega vzorca smo nanesli na on 8 % (37:1) poliakrilamidni gel. Elektroforeza je potekala na Protean II elektroforezni enoti (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), pri čemer smo uporabljali 0.5 × TBE pufer (50 mM Tris-borate, pH 8.3 in 0.5 mM EDTA) in konstanten električni tok 20 W pri temperaturi 22 °C in trajanju 2.5 ure. Sledilo je barvanje s srebrovim nitratom.

Statistika

Genotipsko in alelno frekvenco smo izračunali po prikazanih formulah:

$$f_A = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N} \quad \text{in} \quad f_a = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$$

f_A … frekvenca alela A v populaciji

f_a … frekvenca alela a v populaciji

n_{AA}, n_{Aa}, n_{aa} … števila posameznikov z genotipi AA, Aa in aa

N … število vseh posameznikov

Alelno frekvenco mutacije genov smo preverili s pravili Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Številčnost genotipov smo primerjali s pomočjo testa $\chi 2$ in Fischer Exact testa(SPSS za Windows 4.0).

3 Rezultati in razprava

Pogostost mutacije 677C>T v genu za MTHFR pri preiskovani skupini je bila: CC 52,5 %, CT 39,0 % in TT genotipa 8,5 %. Alelna frekvenca C alela je pa 67,8 %, alelna frekvenca T alela pa 32,2 %. S Fisherjevim exact testom smo primerjali alelne frekvence C in T alela med Slovenci in objavljanimi rezultati za ostale narode v Evropi (preglednica 1).

Tabela 1: Alelna frekvenca T alela mutacije 677C>T v genu za MTHFR pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.

Table 1: Allele frequency of the 677C>T mutation in MTHFR gene T allele in diverse European populations in comparison with that in Slovenian population

Populacija	Število preiskovancev	Alelna frekvenca T alela (%)	Fisher Exact test (p)
Slovenci	149	32,2	/
Britanci	1046	35,4	0,299
Nizozemci	503	32,2	1,000
Francozi	133	36,1	0,374
Nemci	257	24,5	**0,022**
Irci	1309	32,5	0,948
Italijani	2053	43,8	**0,000**
Norvežani	391	28,0	0,178
Švedi	126	30,2	0,645
Hrvati	298	30,5	0,646

Alelne frekvence med Slovenci in ostalimi evropskimi narodi (z izjemo Italijanov in Nemcev) se statistično značilno ne razlikujejo. Italijani imajo najvišjo pojavnost T alela v Evropi (43,8 %), Nemci pa najnižjo (24,5 %). Razlika med Slovenci in Italijani ter Nemci je statistično značilna.

Pogostost mutacije 1947G>A v genu za COMT določena pri isti skupini je bila GG 24,2 %, GA 45,60 % in AA genotipa 30,2 %. Alelna frekvenca G alela je 47,0 % in A 53,0 %. S Fisher Exact testom smo primerjali alelne frekvence G alela med Slovenci in ostalimi narodi v Evropi in ugotovili statistično značilne razlike s Švedi, Italijani in Španci, ki imajo najvišjo pojavnost G alela v Evropi (preglednica 2).

Primerjali smo tudi pojavnost G alela med narodi različnih celin. Ker se podatki v virih nanašajo na G alel, smo temu prilagodili tudi naše podajanje, ne glede na to, da je A mutirani alel. Večje razlike v alelni frekvenci mutacije 1947G>A v genu za COMT opazimo v primerjavi s povprečnimi alelnimi frekvencami populacij drugih kontinentov, izračunanih iz podatkov v ALFRED bazi. Podatki so podani v preglednici 3.

Pogostost mutacije **mutacije 1420C>T v genu za cSHMT** preiskovane skupine je bila: CC 40,3 %, CT 50,3 % in TT genotipa 9,4 %. V slovenski populaciji je pojavnost T alela 34,6 %, kar je blizu alelni frekvenci drugih kavkaških narodov. S Fisher exact testom smo primerjali alelne frekvence T alela slovenske populacije z ostalimi objavljenimi raziskavami, katerih alelne frekvence so na voljo (Preglednica 4).

Med alelno frekvenco slovenske in alelnimi frekvencami drugimi kavkaških narodov ni statistično pomembnih razlik, obstaja pa z

Tabela 2: Alelna frekvenca G alela mutacije 1947G>A v genu za COMT pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.
Table 2: Allele frequency of the 1947G>A in COMT gene G allele in diverse European populations in comparison with that in Slovenian population

Populacija	Število preiskovancev	Alelna frekvenca G alela (%)	Primerjava s Slovenci Fisher Exact test (p)
Slovenci	149	47	/
Švedi	458	**56**	**0,007**
Nemci	328	49	0,530
Italijani	127	**61**	**0,001**
Rusi	96	49	0,711
Angleži	161	51	0,297
Danci	102	39	0,099
Španci	226	**57**	**0,007**
Irci	230	50	0,457
Američani (EP)	55	55	0,182

Oznake: EP – evropsko poreklo.
Denotation: EO – European origin

Tabela 3: Povprečne frekvence G alela mutacije 1947G>A v genu za COMT za populacije različnih kontinentov.
Table 3: Average frequency of the 1947G>A in COMT gene G allele in diverse continents populations

Celina	G alel
Evropa	52 ± 9 %
Afrika	75 ± 10 %
Azija	63 ± 7 %
Vzhodna Azija	75 ± 6 %
Severna Amerika	66 ± 14 %
Južna Amerika	82 ± 13 %
Oceanija	77 ± 8 %

Japonci (p=0,0001), ki imajo alelno frekvenco T statistično pomembno nižjo (8,9 %).

Napravili smo povzetek številčnosti posameznih genotipov vseh treh genov za preiskovano skupino 149 prostovoljcev (Preglednica 5).

Po Hardy-Weinbergovih pravilih ($p^2 + 2pq + q^2=1$, pri čemer sta p in q alelni frekvenci nevtralnih genov) smo iz povprečnih alelnih frekvenc treh proučevanih genov, izračunanih iz razpoložljivih virov (Preglednica 1, 2 in 4) izračunali teoretično pričakovane genske frekvence. Pričakovane in za evropsko populacijo določene frekvence genotipov smo primerjali s pomočjo χ^2 testa in ugotovili, da se statistično pomembno ne razlikujejo za vse tri preiskovane mutacije. Ker Hardy-Weinbergovo ravnovesje velja le za velike izolirane populacije, pri katerih je bilo parjenje naključno ter so imeli vsi genotipi enake možnosti preživetja in razmnoževanja, lahko

Tabela 4: Alelna frekvenca T alela mutacije 1420C>T v genu za cSHMT pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.

Table 4: Allele frequency of the 1420C>T in cSHMT gene T allele in European populations in comparison with that in Slovenian population

Populacija	Število preiskovancev	Alelna frekvenca T alela (%)	Primerjava s Slovenci Fisher Exact test (p)
Slovenci	149	34,6	/
Britanci	114	38,1	0,411
Nizozemci	411	32	0,428
Američani (Kavkazijci)	458	30,4	0,173
Američani (beli (ne)hispanci)	729	30,6	0,192
Japonci	411	**8,9**	**0,0001**

Tabela 5: Številčnost posameznih genotipov in kombinacije mutacij 677C>T gena za MTHFR, 1947G>A gena za COMT in 1420C>T gena za cSHMT pri skupini 149 prostovoljcev.

Table 5: Frequency of individual genotypes and mutation combinations of the 677C>T in MTHFR gene, 1947G>A in COMT gene, and 1420C>T in cSHMT gene in 149 volunteers.

	COMT				**cSHMT**			
MTHFR	AA	GA	GG	Skupaj	CC	CT	TT	Skupaj
CC	22	31	18	71	34	27	10	71
CT	18	29	13	60	21	36	3	60
TT	5	8	5	18	5	12	1	18
Skupaj	45	68	36	149	60	75	14	149

sklepamo, da v evoluciji Evropejcev ni bilo očitne prednosti ali slabosti zaradi mutacij izbranih genov. Iz tega lahko sklepamo, da mutacije proučevanih genov niso vplivale na preživetje in možnost razmnoževanja kljub temu, da imajo homozigoti mutiranih genov le od polovico do tretjine aktivnosti encimov nemutiranih genotipov. Sklepamo, da so imeli osebki z mutiranimi genotipi neke druge prednosti. V naši raziskavi smo proučevali gene za ključne encime presnove homocisteina, ki povezujejo presnovo homocisteina s sintezo DNA (MTHFR-cSHMT). Znižana aktivnost encima MTHFR genotipa TT na približno 35 % in polna aktivnost encim cSHMT genotipa CC omogočata preusmeritev folatov iz presnove homocisteina v sintezo timidilata in s tem DNA (slika 1). Izmerjena pogostost T alela v genu za MTHFR v slovenski populaciji je 32 % (v Evropi od 24,5 do 43,8), kar je zelo visoka pogostost glede na to, da

ima encim TT genotipa le tretjino aktivnosti encima nemutiranega homozigota. V evoluciji je, po vsej verjetnosti, mutirani alel imel v določenih pogojih prednost in je omogočal boljšo prilagoditev na pomanjkanje hrane živalskega izvora, ki vsebuje aminokislino metionin. Omogočal je preusmeritev folatov v sintezo timidilata (cSHMT) in s tem DNA. S tem je dajal evolucijsko prednost nosilcem T alela. (27)

4 Zaključek

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se ugotovljene frekvence genotipov v slovenski populaciji ne razlikujejo od pričakovanih. Zaključimo lahko, da v evoluciji Evropejcev ni bilo očitne prednosti ali slabosti zaradi mutacij v izbranih genih, ki vplivajo na presnovo homocisteina in s tem na razvoj srčnožilnih bolezni.

5 Literatura

1. Chen P, Poddar R,Tipa EV et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. Adv Enzyme Regul 1999; 39:93-109.
2. Biasioli S, Schiavon R. Homocysteine as a cardiovascular risk factor. Blood Purif. 2000; 18:177-82. Review.
3. Clarke R, Levington S, Donald A et al. Understiation of the importance of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in epidemiological studies. J Cardiovasc Risc 2001 ;8:396-9.
4. Castro R et al. *Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview.* J Inherit Metab Dis, 2006. **29**(1): p. 3-20.
5. Stegnar M. Hiperhomocisteinemija in žilna bolezen. Farm. Vestn 2002; 343-346.
6. Weisberg IS, Park E, Ballman KV et al. Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease. Atherosclerosis 2003; 167(2): 205-214.
7. Marc J. Laboratorijska medicina pri obravnavi bolnika s končno ledvično boleznijo. Farm vestn 2004; 283-285.
8. Van der Put NMJ, Van Straaten HWM, Trijbels FJM et al: Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. Exp Biol Med 2001; 226: 243-270.
9. Geisel J, Hübner U, Bodis M et al. The Role of Genetic Factors in the Development of Hyperhomocysteinemia. Clin Chem Lab Med 2003; 41(11):1427-1434.
10. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overwiev of mutations/polymorphisms. In: NCBI Books. Dostopno marca 2005 na internetu: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eurekah.chapter.30251.
11. Uni-prot podatkovna baza na internetu. Dostopno marca 2007 na internetu: http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.do?proteinId=MTHR_HUMAN&pager.offset=0.
12. Yamada K, Chen Z, Rozen R et al. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. PNAS 2001; 98 (26): 14853-14858. Dostopno februarja 2007 na internetu: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.261469998.
13. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. JNephrol 2000; 13:20-33.
14. Voutilainen, S et al. Functional COMT Val158Met Polymorphism, Risk of Acute Coronary Events and Serum Homocysteine: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. PLoS ONE, 2007. **2**: p. e181.
15. Munafo MR et al. Lack of association of the COMT (Val158/108 Met) gene and schizophrenia: a meta-analysis of case-control studies. Mol Psychiatry, 2005. **10**(8): p. 765-70.
16. Vidgren J, Svensson LA, Liljas A. Catechol: O-Methyltransferase; Deposition 5-Jan-96; Taxonomy: Rattus norvegicus. Dostopno maja 2007 na internetu: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=4499.
17. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) - COMT. Dostopno maja 2007 na internetu: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=116790.
18. ALFRED baza za COMT 1947G>A mutacijo. Dostopno maja 2007 na internetu: .
19. Costi MP, Ferrari S. Update on antifolate drugs targets. Current Drugs Tarets 2001; 2:135-166.
20. Renwick SB, Snell K, Baumann U. The crystal structure of human cytosolic serine hydroksymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy. Structure 1998; 6:1105-1116.
21. Chaturvedi S, Bhakuni V. Unusual structural, functional, and stability properties of serine hydroxymethyltransferase from Mycobacterium tuberculosis. Biol Chem 2003;78:40793-805.
22. Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM et al. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferase and chromosomal localization. The journal of biological chemistry 1993; 268:11910-6.
23. Slkibola CF, Smith MT, Hubbard M et al. Polymorphisms in the Thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytyc leukemia. Blood 2002; 99:3786-3791.
24. Hishida A, Matsuo K, Hamajima N et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase and susceptibility to malignant lymphoma. Haematologica 2003; 88:159-166.
25. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet. 1995 May;10(1):111-3.
26. Malhotra AK, Kestler LJ, Mazzanti C et al. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. Am J Psychiatry. 2002 Apr;159(4):652-4.
27. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge, UK.1983.

Tulip®
atorvastatin

Darilo življenju

www.lek.si/vademekum
vedno svež vir informacij

Tulip® atorvastatin, filmsko obložene tablete po 10 mg, 20 mg in 40 mg

Skrajšano navodilo za predpisovanje

TERAPEVTSKE INDIKACIJE: Primarna hiperholesterolemija (tip IIa), kombinirana hiperlipidemija (tip IIb), heterozigotna in homozigotna družinska hiperholesterolemija. Uporaba zdravila je indicirana kot dodatek k dietnemu zdravljenju za zniževanje ravni celotnega holesterola, holesterola LDL, apolipoproteina B in trigliceridov. **ODMERJANJE IN NAČIN UPORABE:** Začetni odmerek 10 mg na dan, največji odmerek 80 mg na dan. Bolnikom z ledvično okvaro odmerka zdravila ni treba prilagajati. **KONTRAINDIKACIJE:** Preobčutljivost za atorvastatin ali katerokoli pomožno snov, aktivna jetrna bolezen ali nepojasnjeno stalno zvečanje serumskih vrednosti transaminaz, bolezni skeletnih mišic, nosečnost in dojenje, ženske v rodni dobi, ki ne uporabljajo zanesljive kontracepcijske zaščite. **POSEBNA OPOZORILA IN PREVIDNOSTNI UKREPI:** Jetrna okvara: Po uporabi zaviralcev reduktaze HMG CoA se lahko tako kot po uporabi nekaterih drugih hipolipemikov pojavijo biokemične nepravilnosti v delovanju jeter. Jetrne funkcijske teste je priporočeno opraviti pred začetkom zdravljenja in 12 tednov po začetku zdravljenja ali po zvečanju odmerka, nato pa periodično, npr. na pol leta. Če je zvečanje vrednosti ALT ali AST večje od trikratne zgornje mejne vrednosti, je priporočeno odmerek atorvastatina zmanjšati ali pa zdravljenje z njim ustaviti. Atorvastatin je treba dajati zelo previdno bolnikom, ki popijejo precej alkoholnih pijač, in/ali tistim z jetrno boleznijo v anamnezi. Skeletne mišice: Možnost miopatije (po definiciji mišične bolečine ali mišična oslabelost z vrednostmi kreatinfosfokinaze (CPK), ki so več kot desetkrat večje od zgornje mejne vrednosti) je treba upoštevati pri vsakem bolniku z difuznimi mialgijami, mišično občutljivostjo ali oslabelostjo in/ali bistvenim zvečanjem vrednosti CPK. Zdravnik mora pri odločanju za kombinirano zdravljenje z atorvastatinom in derivati fibrične kisline, eritromicinom, imunosupresivnimi zdravili, azolnimi antimikotiki ali hipolipemičnimi odmerki niacina skrbno pretehtati, ali je možna korist večja od tveganja, vse bolnike, pri katerih se pojavijo znaki ali simptomi bolečin v mišicah,njihove občutljivosti ali oslabelosti, še posebej v prvih mesecih zdravljenja in ob vsakem zvečanju odmerkov zdravil pri njihovem titriranju, pa skrbno opazovati. Zdravljenje z atorvastatinom je treba začasno ali za stalno ustaviti pri bolnikih v hudem akutnem stanju, ki bi utegnilo biti posledica miopatije, in pri tistih, pri katerih obstaja zaradi dejavnikov tveganja nevarnost pojava sekundarne ledvične insuficience po rabdomiolizi. Laktoza: Zdravilo Tulip vsebuje laktozo. Bolniki z redko dedno intoleranco za galaktozo, laponsko obliko zmanjšane aktivnosti laktaze ali malabsorpcijo glukoze/galaktoze ne smejo jemati tega zdravila. **MEDSEBOJNO DELOVANJE Z DRUGIMI ZDRAVILI IN DRUGE OBLIKE INTERAKCIJ:** Ob sočasni uporabi ciklosporina, fibratov, makrolidnih antibiotikov (tudi eritromicina), azolskih antimikotikov ali niacina se zveča tveganje za miopatijo; v redkih primerih je prišlo do rabdomiolize z motenim delovanjem ledvic zaradi mioglobinurije. Zato je treba natančno pretehtati koristi in tveganja sočasnega zdravljenja. Atorvastatin se presnavlja s citokromom P450 3A4, zato je potrebna previdnost, če atorvastatin uporabljamo sočasno z zaviralci citokroma P450 3A4 (npr. ciklosporinom, makrolidnimi antibiotiki, vključno z eritromicinom in klaritromicinom, nefazodonom, azolnimi antimikotiki (tudi itrakonazolom) in zaviralci HIV proteaze). Med jemanjem atorvastatina ni priporočljivo, da bolnik pije veliko grenivkinega soka, ki vsebuje več sestavin, ki zavirajo CYP 3A4. Interakcije je treba upoštevati tudi pri drugih zdravilih z nizkim terapevtskim indeksom, npr. pri antiaritmikih iz skupine III (tudi amiodaronu). Do interakcij pride tudi ob sočasni uporabi atorvastatina s fibrati, digoksinom, peroralnimi kontraceptivi, holestipolom, antacidi, varfarinom. **NEŽELENI UČINKI:** Bolniki atorvastatin na splošno dobro prenašajo. Neželeni učinki so ponavadi blagi in prehodni. Neželeni učinki so razvrščeni po pogostnosti. Pogosti (≥ 1/100 do < 1/10): zaprtje, flatulenca, dispepsija, navzeja, driska, alergijske reakcije, nespečnost, glavobol, omotica, parestezije, hipestezija, kožni izpuščaj, pruritus, mialgija, artralgija, astenija, bolečine v prsih, bolečine v hrbtu, periferni edemi, zvišanje vrednosti serumske kreatin fosfokinaze (CPK)(>3x ZMN). Občasni (≥ 1/1000 do < 1/100): anoreksija, bruhanje, trombocitopenija, alopecija, hiperglikemija, hipoglikemija, pankreatitis, amnezija, periferna nevropatija, urtikarija, tinitus, miopatija, zvišanje vrednosti transaminaz (>3x ZMN), zvišanje vrednosti serumske kreatin fosfokinaze (CPK)(>10x ZMN). **VRSTA OVOJNINE IN VSEBINA:** Škatlice s 30 tabletami po 10 mg, 20 mg in 40 mg atorvastatina in škatlice z 90 tabletami po 10 mg, 20 mg in 40 mg atorvastatina.
IZDAJANJE ZDRAVILA: Samo na zdravniški recept. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET:** Lek farmacevtska družba d.d., Verovškova 57, Ljubljana, Slovenija.

Informacija pripravljena: marec 2008. Podrobnejše informacije o zdravilu so na voljo pri proizvajalcu.

lek
član skupine Sandoz

Lek farmacevtska družba d. d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana • www.lek.si

Obravnava astme v Sloveniji – prospektivna opazovalna raziskava

Managing of asthma in Slovenia – prospective observational study

Stanislav Šuškovič

Povzetek: Veliko bolnikov ima kljub zdravilom slabo urejeno astmo. V opazovalni prospektivni raziskavi smo preučevali v kolikšni meri se da urejenost astme še dodatno izboljšati. V raziskavo je bilo vključenih 425 bolnikov z neurejeno astmo, katerim so zdravniki po lastni presoji spremenili terapijo. Izkazalo se je, da so zdravniki veliki večini bolnikom, ki so imeli do vključitve v raziskavo predpisan olajševalec, inhalacijski glukokortikoid brez ali z dolgodelujočim simpatikomimetikom dodatno predpisali montelukast 10 mg/dan. Bolnikom se je statistično signifikantno (vse p< 0.001) po 6 tednih dodanega montelukasta ne glede na izhodiščno terapijo izboljšala pljučna funkcija (merjena s PEF in/ali FEV1), zmanjšala pogostnost dnevnih in nočnih simptomov ter popravila telesna zmogljivost. Bolniki so ocenili, da se jim je kakovost življenja pomembno izboljšala. Menimo, da je potrebno redno razkrivanje stopnje urejenosti astme ter da montelukast pomembno izboljša parametre urejenosti astme ne glede na predhodno terapijo, celo pri bolnikih, ki imajo neurejeno astmo ob prejemanju fiksne kombinacije inhalacijskega glukokortikoida z dolgodelujočim simpatikomimetikom beta2.

Ključne besede: *Urejenost astme, montelukast, inhalacijski glukokortikoid, dolgodelujoči simpatikomimetik beta2*

Abstract: Many patients have in spite of regular treatment still poorly controlled asthma. In prospective observational study we questioned the possibility of further improving the level of asthma control. 425 patients with uncontrolled asthma were included. At first visit the treatment plan was changed according to physician's preference. As patients were before the entry in to the study treated with short acting bronchodilators, inhaled glucocorticoids alone or in fixed combination with long acting beta2 sympathicomimetics most of the included patients were additionally treated for next 6 weeks with montelukast 10 mg/day. In that period control of asthma statistically significantly improved with less day or night symptoms, improved exercise tolerance and heightened quality of life (all p< 0.001). Lung function also statistically significantly improved (PEF or/and FEV1, p< 0.001). It was concluded, that addition of montelukast is useful in patients with uncontrolled asthma even in patients, treated with fixed combination of inhaled glucocorticoid and long acting sympaticomimetic beta2.

Key words: *Control of asthma, montelukast, inhaled glucocorticoid, long acting sympaticomimetic beta2.*

1 Uvod

Astma je bolezen za katero je značilno persistentno vnetje bronhijev, ki se kaže s simptomi težkega dihanja, piskanja, kašljanja in tiščanja v prsih. Vnetje prispeva k zapori dihalnih poti, bronhialni preodzivnosti in zvečani cirkadialni variabilnosti. Osnovni vzrok vnetja je neznan, vnetje pa najpogosteje poslabšajo virusi ter redkeje vdihani alergeni. Sprožilci pri astmi izzovejo aktivacijo limfocitov T, eozinofilcev, mastocitov in makrofagov iz katerih se sproščajo vnetni mediatorji, kot so citokini in levkotrieni. Tako citokini kot levkotrieni so pomembni mediatorji vnetja. Citokini stimulirajo proliferacijo in diferenciacijo vnetnih celic (limfociti B in T, makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci) in vplivajo na njihovo delovanje. Levkotrieni pomembno zmanjšajo ciliarno aktivnost, zvečajo izločanje sluzi, povečajo prepustnost žil, kar vodi v nastanek edema, ter v vnetišče privabljajo vedno nove vnetne celice. Levkotrieni so močni bronhokonstriktorji, saj je njihov učinek 1000-krat močnejši od učinka histamina. Ob zmanjšanju vnetja se astma klinično in funkcijsko izboljša (1-3).

Temeljna protivnetna zdravila so glukokortikoidi in antilevkotrieni. Oboji so primerni za začetno zdravljenje astme. V kolikor astma samo z enim preprečevalcem ni zadovoljivo urejena lahko bolnik prejema kombinacijo inhalacijskega glukokortikoida in antilevkotriena, saj je s tem zagotovljen boljši nadzor nad vnetjem v pljučih (4-6).

V Sloveniji nimamo natančnega podatka o prevalenci astme pri odrasli populaciji. Nekatere raziskave kažejo na slabšo urejenost astme od pričakovane (prepogosti dnevni in nočni simptomi, poslabšanja zaradi katerih bolniki izostajajo od dela/šole, motene vsakodnevne telesne aktivnosti, slabšanje/upadanje pljučne

Prof. dr. Stanislav Šuškovič, dr.med., Bolnišnica Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, 4204 Golnik

funkcije...) in to kljub prejemanju inhalacijskih glukokortikoidov oz. tudi že fiksnih kombinacij inhalacijskega glukokortikoida z dolgodelujočimi simpatikomimetiki (7).

Odločili smo se, da bomo z neintervencijsko opazovalno raziskavo poskušali odkriti bolnike s slabo nadzorovano astmo in jim izboljšati kvaliteto življenja. Pri obravnavi bolnikov so zdravniki ocenjevali simptome astme, parametre pljučne funkcije, urejenost astme in kakovost življenja.

2 Metode

V neintervencijski opazovalni raziskavi, ki je bila izvedena med oktobrom 2005 in marcem 2006 je sodelovalo 67 naključno izbranih zdravnikov (pulmologov in splošnih/družinskih zdravnikov) iz vse Slovenije. Za raziskavo so bili primerni vsi bolniki z astmo, za katere so zdravniki ob pregledu ugotovili kazalce neurejenosti astme. V raziskavi sodelujoči zdravniki so za vsakega bolnika ob vključitvi v raziskavo (»1. obisk«) zabeležili njegovo trenutno terapijo zoper astmo, kazalce urejenosti astme (dnevne in nočne simptome, uporabo olajševalca, telesno zmogljivost bolnika), bolnikovo oceno o kakovosti življenja, pljučno funkcijo (FEV1 in/ali PEF) in svetovano nadaljevalno terapijo zoper astmo. PEF (največji ekspiratorni pretok – peak expiratory flow) smo merili s prenosnim Mini-Wrightovim merilcem. FEV1 (forsirani ekspiratorni volumen v prvi sekundi) smo merili s spirometri, ki so bili na voljo v posameznih raziskovalnih centrih. Parne vrednosti FEV1 so bile izmerjene vselej z istim aparatom ter z enako merilno tehniko.

Kriteriji za urejenost astme so bili: brez dnevnih ali nočnih simptomov, brez uporabe olajševalca ter z normalno telesno zmogljivostjo. Odstopanje od kateregakoli kriterija je pomenilo, da ima bolnik astmo neurejeno ter da se ga lahko vključi v raziskavo.

Vsi bolniki so bili po načelih dobre prakse obveščeni, da se njihovi podatki zbirajo v anonimizirani bazi podatkov. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije.

Zdravnik je ob vključitvi bolnika v raziskavo lahko po svoji presoji zdravljenje spremenil. Po 4 do 6 tednih je sledil kontrolni obisk (»2. obisk«) in zdravnik je zabeležil iste parametre, kot ob vključitvi bolnika v raziskavo.

Izpolnjene protokole smo analizirali z studentovim t testom ali hi-kvadrat testom. Pri analizi smo uporabljali Excel 2003.

3 Rezultati

V raziskavo je bilo vključenih 425 bolnikov. Povprečna starost bolnikov vključenih v raziskavo je bila 47,3 let.

3.1 Terapija – zdravila, ki so jih jemali bolniki

Pri prvem obisku je 52 bolnikov uporabljalo le kratkodelujoči simpatikomimetik (SABA), 168 bolnikov le inhalacijski glukokortikoid (IGK), 175 kombinacijo IGK s dolgodelujočim simpatikomimetikom (IGK/LABA) ter 30 druga zdravila (antihistaminik, peroralni glukokortikoid itd). Nihče ni imel predpisanega antilevkotriena

Pri vseh bolnikih z ugotovljeno neurejeno astmo so se zdravniki ob prvem pregledu odločili za dodatek antagonista levkotrienskih receptorjev montelukast, opažene pa so bile tudi nekatere druge manjše terapevtske spremembe (tabela 1).

3.2 Vpliv na pljučno funkcijo

PEF in/ali FEV1 so merili pri 266 od 425 vključenih bolnikov. PEF se je od prvega do drugega obiska v povprečju povišal za 55 L/min oziroma za 13,5 % ($p<0,001$). FEV1 se je od prvega do drugega obiska v povprečju povišal za 306 ml oziroma za 12,4 % ($p<0,001$).

3.3 Primerjava kazalcev urejenosti astme ob prvem in drugem obisku

3.3.1 Dnevni simptomi

Zdravniki so pogostnost dnevnih simptomov ocenjevali s pomočjo petih kategorij. Ob prvem obisku je imela večina bolnikov (67%) simptome večkrat dnevno oz. večkrat tedensko, le četrtina (26 %) nekajkrat mesečno oz. nikoli. Ob drugem obisku je bilo ravno nasprotno: kar 71% bolnikov je imelo dnevne simptome le nekajkrat mesečno oz. nikoli, 28% pa je bilo še vedno takih, ki so imeli dnevne simptome večkrat dnevno oz. večkrat tedensko. Razlika je bila statistično visoko pomembna ($p<0.001$) (slika 1).

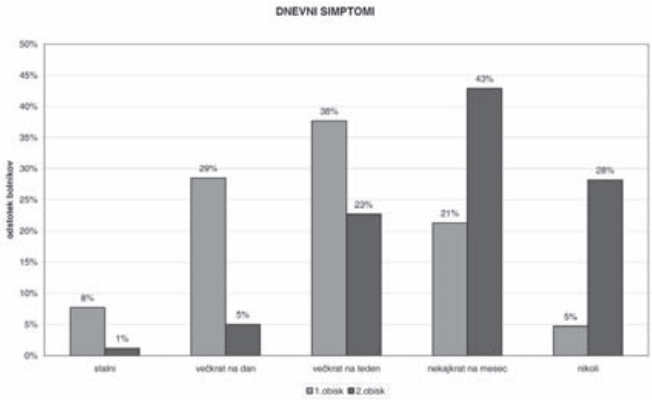
3.5.2 Nočni simptomi

Podoben trend izboljšanja se je pokazal pri nočnih simptomih. Podobno kot v primeru dnevnih simptomov so imeli zdravniki na voljo pet kategorij. Pri prvem obisku je skoraj polovica bolnikov poročala o nočni astmi vsako noč oz. večkrat na teden (49%), pri drugem obisku

Tabela 1. Sprememba terapije ob vključitvi v raziskavo. Legenda: kratkodelujoči bronhodilatator (SABA), inhalacijski glukokortikoid (IGK), dolgodelujoči bronhodilatator (LABA), montelukast (MTL).

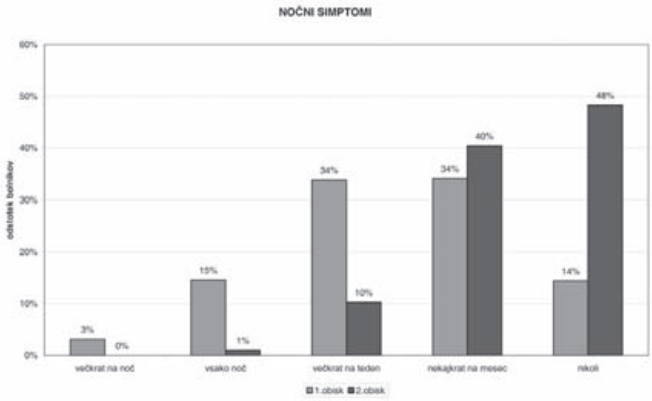
Table 1: Change of therapy at enrolment into the study. Legend: short acting bronchodilator (SABA), inhaled corticosteroid (IGK), long acting bronchodilator (LABA), montelukast (MTL).

	SABA	IGK	IGK/LABA	MTL	OSTALO	IGK + MTL	IGK/LABA + MTL
1.obisk	52	168	175	0	30	0	0
2.obisk	0	0	0	107	0	164	154



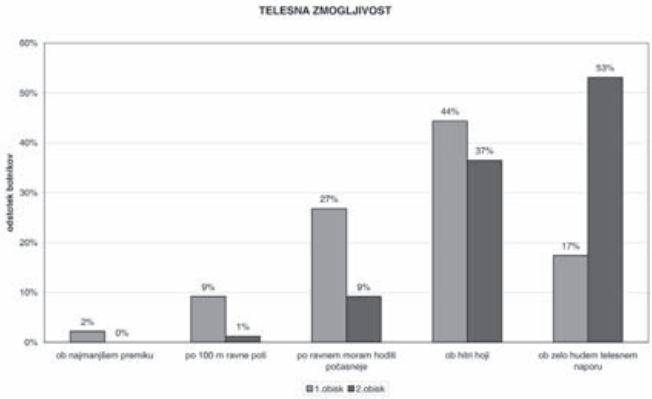
Slika 1: Pogostnost dnevnih simptomov je po uvedbi montelukasta statistično pomembno upadla (p<0.001).

Picture 1: Frequency of daily symptoms has statistically significant decreased after initiation of montelukast (p<0.001).



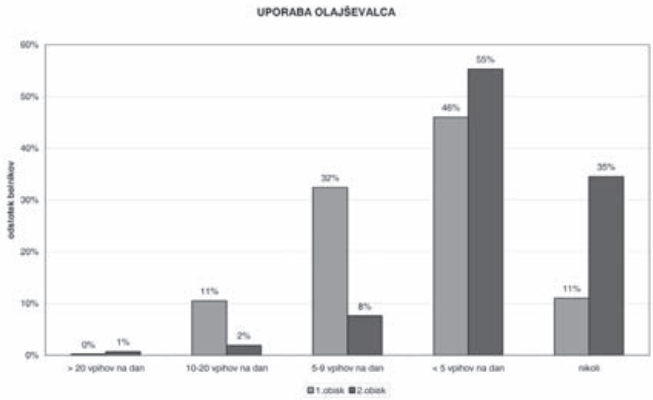
Slika 2: Pogostnost nočnih simptomov se je po uvedbi montelukasta statistično pomembno zmanjšala (p<0.001).

Picture 2: Frequency of night symptoms has statistically significant decreased after initiation of montelukast (p<0.001).



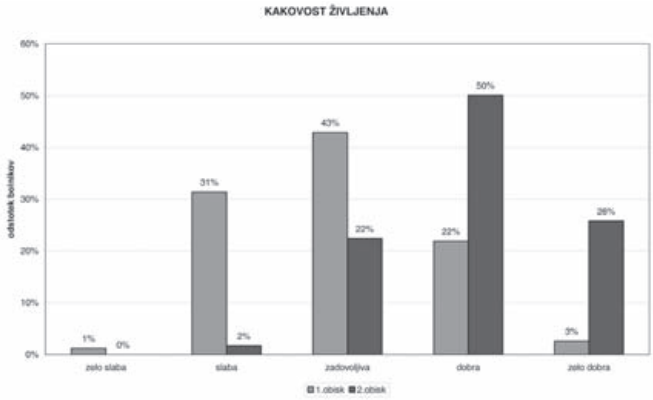
Slika 3: Po uvedbi montelukasta se je bolnikom statistično pomembno povečala telesna zmogljivost (p<0.001).

Picture 3: The exercise tolerance has statistically significant increased after initiation of montelukast (p<0.001).



Slika 4: Uporaba olajševalca je po uvedbi montelukasta statistično pomembno upadla (p<0.001).

Picture 4: Frequency of reliever consumption has statistically significant decreased after initiation of montelukast (p<0.001).



Slika 5: Po uvedbi montelukasta so bolniki kakovost življenja statistično pomembno bolje ocenili (p<0.001).

Picture 5: The quality of life has statistically significant improved after initiation of montelukast (p<0.001).

se je delež teh bolnikov zmanjšal na 11%. Druga polovica bolnikov (48%) je pri prvem obisku poročala o simptomih nočne astme nekajkrat na mesec oz. nikoli, pri drugem obisku se je delež povečal na 88 % Razlika je bila statistično visoko pomembna (p<0.001) (slika 2).

3.5.3 Telesna zmogljivost

Pri drugem obisku se je močno povečal delež bolnikov, ki so imeli težko sapo le ob zelo hudem telesnem naporu (iz 17% na 53%). Po uvedbi montelukasta so se znižali deleži bolnikov, ki so doživljali napor pri manj intenzivnih oblikah telesne aktivnosti, kot sta hoja po ravnem (iz 36 % na 10 %) in hitra hoja (iz 44 % na 37 %) Razlika je bila statistično visoko pomembna (p<0.001) (slika 3).

3.5.4 Uporaba olajševalca

Pri prvem obisku je bilo le 11% bolnikov, ki niso nikoli uporabljali olajševalca. Ob drugem obisku pa kar dobra tretjina (35%) bolnikov ni

več uporabljala olajševalca. Pri drugem obisku se je nekoliko znižal delež bolnikov, ki so olajševalec uporabljali vsakodnevno, a manj kot 10 vpihov na dan (iz 78 % na 63 %) in tistih, ki so olajševalec uporabljali vsakodnevno, a več kot 10 vpihov na dan (iz 11 % na 3 %) Razlika je bila statistično visoko pomembna (p<0.001) (slika 4).

3.5.5 Kakovost življenja

Po terapiji se je izboljšala tudi percepcija bolnikov o njihovi kakovosti življenja. Pred dodatno terapijo je večina bolnikov ocenila svojo kakovost življenja kot zadovoljivo oz. slabo (74%). Po uvedbi montelukasta je bilo takih še 24%, večina pa je ocenila svojo kakovost življenja kot dobro oz. zelo dobro (76%) Razlika je bila statistično visoko pomembna (p<0.001) (slika 5).

3.6 Varnost

Zdravilo montelukast se je izkazalo za varno. V času trajanja raziskave (okt 05 – mar 06) so zdravniki poročali o 4 (štirih) neželenih učinkih pri zdravljenju z montelukastom (glavobol, utrujenost in zgaga, bolečine in otekanje sklepov, žeja ter otekanje obraza), med njimi ni bilo resnih neželenih učinkov.

4 Razprava

V prospektivni opazovalni raziskavi smo ugotovili, da dodatek montelukasta k ustaljeni terapiji bolnikov z neurejeno astmo pripomore k zboljšani urejenosti astme, izboljšani kakovosti astme ter k izboljšanju pljučne funkcije.

Podatki, ki so pridobljeni z neintervencijskimi raziskavami so koristni, ker odražajo posnetek realnega dogajanja v populaciji bolnikov z astmo in s tem tudi učinkovitost terapije v realnem življenju (8-10). Podatki pridobljeni v opazovalnih raziskavah zato odlično dopolnjujejo rezultate nadzorovanih kliničnih raziskav.

Slabost opazovalne študije je v tem, da ni oblikovana dvojno slepo ter s placebo skupino. Vendar pa so bili po drugi strani v randomizirane farmakološke raziskave vključevani le močno selekcionirani bolniki z astmo. Zaradi številnih izključitvenih kriterijev (starost, predhodna terapija, nekadilci, brez komorbidnosti) je bilo v takšne raziskave vključenih le del bolnikov z astmo. S čimer pa veljajo izidi sicer metodološko brezhibno oblikovanih randomiziranih raziskav seveda le za majhen delež »realnih« bolnikov. Za večji del bolnikov, ki jih srečujemo ob našem vsakodnevnem delu, rezultatov randomiziranih »izključitvenih« raziskav ne moremo brez zadržkov sprejeti. To se je na primer jasno pokazalo ob spoznanju, da inhalacijski glukokortikoidi pri astmatikih, ki kadijo ne učinkujejo dobro, ali pa sploh ne učinkujejo. Ker so bili kadilci astmatiki dolgo časa izključeni iz randomiziranih raziskav, smo do tega spoznanja prišli relativno pozno. Za vključitev v našo opazovalno raziskavo ni bilo niti ene omejitve. Razen seveda ugotovitve, da je astma že urejena s trenutno predpisanimi zdravili.

Rezultati opazovalne raziskave so pokazali, da je v Sloveniji še vedno veliko bolnikov z astmo, ki imajo nenadzorovano astmo, a se jo da primerno urediti. Vsem bolnikom, ki so bili vključeni v raziskavo (ugotovljena neurejenost astme) so zdravniki ob prvem obisku predpisali antilevkotrien (montelukast). Rezultati potrjujejo pomembno vlogo levkotrienov kot mediatorjev vnetja pri astmi, katero so ugotovili v podobnih, nedavnih opazovalnih raziskavah drugi avtorji (8-10). Uvedba oz. dodatek antilevkotriena je izboljšala vse opazovane parametre. Pomembno in statistično značilno se je povečal PEF in FEV1, zmanjšalo se je število bolnikov z dnevnimi in nočnimi simptomi, močno se je povečal delež bolnikov, ki so bili brez pomembnih težav ob telesnem naporu. Če pogledamo kazalce urejenosti astme lahko vidimo, da so se po uvedbi montelukasta vsi preučevani kazalci statistično pomemno izboljšali. Večina bolnikov je ob vključitvi v raziskavo že uporabljala inhalacijski glukokortikoid ali fiksno kombinacijo; z dodatkom antlevkotriena so dodatno pridobili na urejenosti. Samo montelukast je zadostoval 25% bolnikov, ki pred tem niso uporabljali nobenega protivnetnega zdravila za zdravljenje astme. V subanalizi podatkov se je tudi izkazalo, da je dodatek montelukasta koristil tako bolnikom, ki so prejemali inhalacijski glukokortikoid (N=168) kakor celo tudi bolnikom, ki so ob vključitvi v raziskavo prejemali fiksno kombinacijo inhalacijskega glukokortikoida z dolgodelujočim simpatikomimetikom (N=175). Takšne ugotovitve imajo tudi drugi (10).

5 Literatura

1. Moore WC, Peters SP. Update in asthma 2006. Am J Respir Crit Care Med 2007;7:649-54.
2. W. Glezen. Asthma, influenza, and vaccination. J Allerg Clin Immunol 2006;118: 1199-1206.
3. Ogawa Y, Calhoun WJ. The role of leukotrienes in airway inflammation. 2006;118(4):789-98.
4. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2006, www.ginasthma.org.GINA,
5. Šuškovič S.Košnik M, Fležar M et al. Stališče Bolnišnice Golnik - KOPA, Združenja pnevmologov Slovenije in Katedre za družinsko medicino do obravnave odraslega bolnika z astmo Zdrav Vestn 2007; (6): 369-79.
6. Scow DT, Luttermoser GK, Dickerson KS. Leukotriene inhibitors in the treatment of allergy and asthma. Am Fam Physician. 2007 Jan 1;75(1):65-70.
7. Šuškovič S. Raziskava o odraslih in otroških bolnikih z astmo v Sloveniji. Zdrav Vestn 2003; 72(6):367-72.
8. Borderias L, Mincewicz G, Sazonov Kocevar V et al. Asthma control in patients with asthma and allergic rhinitis receiving add-on montelukast therapy for 12 months: a retrospective observational study. Curr Med R Opinion 2007;23:721-30.
9. Zhang Q, Thomas M, Price D. Treatment and outcomes in patients with asthma and allergic rhinitis in the United Kingdom. Int Arch Allergy Immunol 2007;142:318-28.
10. Dupont L, Potvin E, Korn D. Singulair as Complementary Therapy to Fixed Association in Real life Study Group. Improving asthma control in patients suboptimally controlled on inhaled steroids and long-acting beta2-agonists: addition of montelukast in an open-label pilot study. Curr Med Res Opin 2005;21(6):863-9.

Novice iz sveta farmacije

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

FDA potrdila učinkovitost fenilefrina

Borut Štrukelj

Posvetovalni komite ameriške Agencije za hrano in zdravila (FDA) je potrdil učinkovitost in varnost uporabe peroralnih pripravkov, ki vsebujejo 10 mg fenilefrinijevega hidroklorida. FDA se je odzvala s tem mnenjem na podlagi peticije, ki je bila naslovljena nanjo v februarju 2007. Predlagatelji peticije zatrjujejo, da za učinkovitost in varnost delovanja fenilefrinijevega hidroklorida in bitartrata v danih odmerkih, v obstoječih monografijah ni zadostnih dokazov. V skladu s peticijo bi bilo potrebno odmerek za odrasle dvigniti z 10 mg na 25 mg vsake štiri ure, vendar pa dnevni odmerek ne bi smel preseči 100 mg fenilefrinijevega hidroklorida na dan. Za bitartratno sol pa iz 15,6 mg na 40 mg vsake štiri ure z maksimalnim dnevnim odmerkom 160 mg. Predlagatelji peticije se prav tako zavzemajo, da bi bilo potrebno izvesti dodatne študije, ki bi potrdile učinkovitost višjih odmerkov pri predlaganem dozirnem intervalu. Poleg tega se peticija zavzema tudi za ukinitev uporabe pri otrocih mlajših od 12 let.

Fenilefrinijev hidroklorid se uporablja kot nazalni dekongestiv, kot paralela pseudoefedrinu. Primerjava učinkovitosti je protislovna, saj zanesljivih podatkov, ki bi beležili učinkovitost fenilefrina po peroralnem dajanju ni. Glede na literaturne podatke je učinkovitost fenilefrina po peroralnem dajanju osnovana na študijah farmacevtskih podjetij. V letu 2007 je bila sicer objavljena meta-analiza sedmih navzkrižnih študij, ki je potrdila učinkovitost 10 mg fenilefrina v primerjavi s placebom (*Kollar et al. 2007*), vendar pa sta bila le tri mesece pred tem objavljena meta-analiza in pregled študij, ki pa za potrditev učinkovitosti fenilefrina nista zbrala zadosti podatkov (*Hatton et al. 2007*). Učinkovitost pseudoefedrina je bistveno bolj dokumentirana. Kljub temu pa ne gre zanemariti dveh dejstev, da je fenilefrin registriran v številnih pripravkih na evropskih trgih ter po drugi strani, da je pseudoefedrin sintezni prekurzor metamfetamina. Varnost obeh učinkovin je primerljiva.

Priporočila posvetovalnega komiteja za FDA niso zavezujoča, vendar pa jim FDA navadno sledi. Zanimivo pa je, da poročilo prihaja ravno v času, ko je problematika uporabe pseudoefedrina na vrhuncu.

Viri:

1. www.otcbulletin.com
2. Kollar C, Schneider H, Waksman J, Krusinska E. Meta-analysis of the efficacy of a single dose of phenylephrine 10 mg compared with placebo in adults with acute nasal congestion due to the common cold. *Clin Ther. 2007 Jun; 29 (6): 1057-70.*
3. Hatton RC, Winterstein AG, McKelvey RP, Shuster J, Hendeles L. Efficacy and safety of oral phenylephrine: systematic review and meta-analysis. *Ann Pharmacother. 2007 Mar; 41 (3): 381-90.*

Zdravljenje infekcij urinarnega trakta - nova odkritja

Marjetka Smolej

Infekcije urinarnega trakta (IUT) so za respiratornimi najpogostejše infekcije pri otrocih. Glede na mesto nastanka jih delimo na okužbe zgornjih sečil (pielonefritis) in okužbe spodnjih sečil (cistitis).

Normalen urin ne vsebuje bakterij. Bakterije lahko pridejo v urinarni trakt in urin iz kože okrog rektuma in genitalij tako, da potujejo po sečevodu v mehur. Ko se to zgodi, bakterije lahko povzročijo vnetje mehurja, ki se kaže kot zatekanje in bolečina v spodnjem delu trebuha. To vnetje mehurja se imenuje cistitis. Če pa bakterije potujejo navzgor po sečnici v ledvica, se lahko razvije bakterijsko vnetje ledvic, ki se imenuje pielonefritis. Do sedaj je bilo zdravljenje IUT povezano z uporabo antibiotikov. Po zadnji študiji, objavljeni v reviji *The Journal of the American Medical Association,* pa pri zdravljenju ponavljajočih se IUT dolgotrajna uporaba antibiotika ni več smiselna. Če ima otrok ponavljajoče infekcije urinarnega trakta, zdravnik otroka pogosto pošlje na preiskavo za vesikoureteralni refluks. Vesikoureteralni refluks je stanje, ki povzroči vračanje urina v ledvice. Pri tretjini otrok je refluks vzrok za IUT. Če je bil pri otroku dokazan vesikoureteralni refluks, so zdravniki do sedaj rutinsko priporočali dolgotrajno (večletno) terapijo z nizkimi odmerki antibiotika, da bi s tem preprečili nadaljnje infekcije urinarnega trakta. Strokovnjaki so sedaj ugotovili, da je tako zdravljenje neučinkovito in lahko celo poveča možnost za nastanek na antibiotik odpornih infekcij. Otroci s ponavljajočimi IUT, ki nastanejo zaradi vesikoureteralnega refluksa ali drugih dejavnikov (zaprtje, genetskih faktorjev ali preprosto zaradi zadrževanja urina), po najnovejših ugotovitvah ne potrebujejo dolgotrajne terapije z antibiotiki. Druga možnost pri teh otrocih je opazovanje simptomov, testiranje urina in šele, če testi kažejo na bakterijsko okužbo, je potrebno zdraviti IUT s kratkotrajno (sedem do deset dni) terapijo z antibiotikom. Včasih je potrebna tudi operacija, pogosto pa težave izzvenijo, ko otrok zraste. Najboljše zdravljenje pa je preventiva. IUT je ena pogostejših infekcij pri otrocih do šestih let, ki se jo da v določenih primerih preprečiti. Deklice in neobrezani fantki so bolj ogrožena skupina, pri kateri je potrebna še večja pazljivost pri negi. Vedno jih je potrebno umivati od spredaj nazaj in jih tudi naučiti, da se bodo sami pravilno brisali. Zmanjšati je potrebno tudi uporabo sladkih tekočin in tekočin z dodatki kofeina ter otroku ponujati veliko navadne vode.

Viri:

1. http://www.parenting.com/Common/printArticle.jsp?articleID=1000053544
2. http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/utichildren/

Zahteva FDA po umiku internetnega prehranskega dopolnila Xiadafil VIP: Razkrita še ena »naravna viagra«

Borut Štrukelj

Relativno majhna farmacevtska družba SEI Pharmaceuticals iz Miamija, ZDA, je povečala svoje prihodke za 700 % v zadnjih dveh letih z internetno prodajo prehranskega dopolnila Xiadafil VIP, ki ga je tržila v obliki pretisnega omota z dvema tabletama oziroma v mini plastenkah po osem tablet. Izjemno agresivno trženje po internetu je opisovalo Xiadafil kot popolnoma naravno prehransko dopolnilo za povečevanje spolne moči s takojšnjim delovanjem, brez neželenih stranskih učinkov in popolnoma varno. Vsebovalo naj bi izvlečke nekaterih zdravilnih rastlin, med njimi: ginsenga, rožnega korena, ginka in kitajske pokončne dresni. Glavni učinkovini, ki jih Xiadalafil vsebuje, naj ne bi bili v takem odstotku vsebovani v nobenem drugem pripravku. Ena od učinkovin, ki je naravni derivat pirazolopirimidona, pa naj bi stimulirala nastanek dušikovega oksida, povečevala koncentracijo cGMP in inhibirala fosfodiesterazo PDE-5, torej naj bi imela enake učinke kot sildenafil, ki je učinkovina znanega zdravila Viagra. Seveda uvrščamo Viagro v skupino zdravil na recept, Xiadafil pa se je tržil kot prehransko dopolnilo. FDA je ugotovila, da vsebuje prehransko dopolnilo Xiadafil nevarno sintezno spojino, strukturno podobno sildenafilu, ki lahko povzroči nenaden padec krvnega tlaka, kar lahko privede tudi do smrti. To velja predvsem za paciente, ki jemljejo nitroglicerin in podobne učinkovine. Janet Woodcock, direktorica Centra za evalvacijo zdravil pri FDA poudarja, da obstaja nevarnost predvsem zaradi napačnega označevanja, ki je zavajajoče, saj uporabnik verjame, da je prehransko dopolnilo stoodstotno naravno in ne povezuje možnosti medsebojnega delovanja z ostalimi zdravili. FDA poudarja, da Xiadafil VIP tablete niso bile odobrene kot zdravilo in je poleg kvalitativne in kvantitativne sestave vprašljiva tudi kakovost in varnost pripravka.

Vir:

1. FDA Immediate Release, junij 2008

Več informacij:
www.fda.gov/consumer/updates/erectiledysfunction010408.html.

Z novimi testi do varnejših zdravil

Petra Slanc Može

V juniju 2008 sta tako Evropska agencija za zdravila (EMEA) kot Ameriška agencija za zdravila in hrano (FDA) izdala prvi skupni predpis, ki vključuje nove teste za ugotavljanje nefrotoksičnosti učinkovin. Doslej so farmacevtske družbe, ki so hotele registrirati novo zdravilno učinkovino, dokazovale odsotnost nefrotoksičnosti z merjenjem kreatinina in uree v plazmi. Ker je bila metoda relativno pomanjkljiva, so uvedli merjenje koncentracije sedmih proteinov, imenovanih »ledvični biomarkerji«. To so KIM-1, albumin, beta2-mikroglobulin, cistatin C, klusterin, celokupni proteini in trefoilni dejavnik-3. Z uvedbo omenjenih novih testov bodo uporabniki testiranih zdravilnih učinkovin bolje zaščiteni, saj so bile doslej poškodbe ledvic zaradi jemanja nekaterih zdravil relativno pogoste. Pri uporabi starih, trenutno še veljavnih testov na osnovi uree in kreatinina, je mogoče zaznati poškodbe ledvic en teden po tem, ko je poškodba že nastala. Novi test pa je bolj občutljiv in lahko zazna poškodbo na celičnem nivoju že nekaj ur po poškodbi, prav tako pa je iz razmerja sedmih biomarkerjev mogoče ugotoviti, na katerem delu ledvičnega tkiva je poškodba nastala. Zanimivo je, da je test razvila skupina raziskovalcev 16 inovativnih farmacevtskih družb in ne EMEA ali FDA. Vodilno vlogo pri razvoju so imeli znanstveniki iz družb Novartis in Merck&Co.

Vir:

1. FDA Immediate Release, junij 2008

33. skupščina SFD

Jelka Dolinar

Tematika letošnjega simpozija Slovenskega farmacevtskega društva je pritegnila skoraj 400 udeležencev, pretežno farmacevtov iz cele Slovenije. O kakovosti vsebin priča majska številka Farmacevtskega vestnika, v katerem so objavljeni referati s simpozija. Srečanje se je zaključilo z redno letno skupščino v soboto, 17. maja.

Raznolike aktivnosti Slovenskega farmacevtskega društva, o katerih je poročal predsednik Društva, se iz leta v leto povečujejo. Narašča predvsem delovanje sekcij, ki povezujejo člane s podobni profesionalni interesi. Skupščina je soglasno potrdila vsa poročila, prav tako tudi plane za leto 2008.

Živahna razprava, ki je sledila poročilom kaže, da člani od Društva pričakujejo več podpore pri uveljavljanju stroke v sistemu zdravstvenega varstva in v javnosti. Posebej je bil izpostavljen problem nepoznavanja poslovanja lekarniške službe, izraženih je bilo veliko predlogov glede nadaljnega razvoja FIC-a, farmacevtskega informacijskega centra, ki je ob ustanovitvi med člani vzbudil velika pričakovanja, ki pa so se le delno izpolnila. Dejstvo je, da v teh treh letih projekt ni bil ustrezno voden, glede na cilje pa je bila postavljena prešibka kadrovsko-organizacijska struktura. Predstavljenih je bilo več idej glede nadaljnjega razvoja FIC-a, med drugim tudi predlog, da FIC pridobi status organizacije za dajanje informacij javnega pomena, potem ko bi ga prej morali umestiti v zdravstveni sistem oz. ko bi pridobil status uradnosti. Tudi predlog o preimenovanje FIC-a v center za zdravila je vzbudil veliko zanimanja.

Po predvidevanjih predsednika SFD bo razvoj FIC-a posledično vplival tudi na razvoj založništva pri SFD, predvsem nacionalnega biltena o zdravilih, ki zadnja leta zaradi nestabilnih razmer pri urednikovanju neredno izhaja. Pri obeh projektih je vsebinska usmeritev k lekarništvu tista, ki bo najbolj povezala člane in večala ugled stroke. Skladno s tem stališči je skupščina sprejela sklep, da mora postati dejavnost FIC-a prioritetna naloga SFD v naslednjih letih.

Društvena priznanja v letu 2008

Izvršni odbor SFD je na 33. skupščini podelil društvena priznanja. *Minařikovo odličje* je prejel prof. dr. **Slavko Pečar**, mag. farm.

Minařikovo priznanje so prejeli
Marija Zupan Bizjak, mag. farm. spec.
Marija Čehovin, mag. farm.
mag. Andreja Čufar, mag. farm. spec.
Nataša Faganelli, mag. farm. spec.
Dušan Hus, mag. farm.
Duša Kramer, mag. farm.
Jože Kukman, mag. farm
Matejka Kumperščak Duh, mag. farm. spec.
Saša Maurič, mag. farm. spec.
Davorin Poherc, mag. farm.
Mojca Prah Klemenčič, mag. farm.

Prof. dr. Slavko Pečar

Prejemniki društvenih priznanj za leto 2008, skupaj z dr. Marcem in s prof. dr. Mrharjem

Utemeljitve

Pri magistri **Mariji Zupan Bizjak** izstopa njen osebni prispevek pri izdelavi monografij galenskih izdelkov, nadalje značilno prispeva k dvigu kakovosti v lekarništvu z izvajanjem strokovnega nadzora s svetovanjem in s številnimi predavanji, z veliko predanostjo opravlja mentorsko delo za specializante, farmacevte in tehnike, je pa tudi zanesljiv in trezen mislec v kriznih situacijah, zato se kolegi vedno lahko zanesejo na njo.

Predsednik SFD dr. Gašper Marc, predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj prof. dr. Aleš Mrhar in Marija Zupan Bizjak, mag. farm. spec.

Magistro **Marijo Čehovin** odlikujejo strokovne in človeške kvalitete. Svoje delo je usmerjala k cilju, da se dostojno predstavita in ovrednotita poklic in vloga lekarniškega farmacevta, kar je dosegla s povezovalnim delovanjem in odpiranjem možnosti strokovnega dokazovanja svojim sodelavcem. Svoje delo je vseskozi povezovala z delom Primorske podružnice, v kateri je uspela preseči različne regijske interese pri doseganju strokovnih ciljev.

Marija Čehovin, mag. farm.

Težko je na kratko z nekaj besedami predstaviti osebnost magistre **Andreje Čufar**, ki tako zelo preveva slovensko strokovno in javno sfero**.** V laični javnosti je sinonim za slovensko lekarništvo, prav tako pa pušča svoj pečat na vseh področjih farmacevtske stroke. S svojo neizčrpno energijo in življenjskim optimizmom se loteva vsakodnevnih izzivov kot predsednica Lekarniške zbornice. Neizbrisna je njena vloga v popularizaciji lekarništva ter pri dvigovanju kvalitete dela in organiziranosti slovenskega lekarništva. Kot asistentka na Katedri za socialno farmacijo prenaša bogato znanje in pripadnost stroki na bodoče farmacevte.

mag. Andreja Čufar, mag. farm. spec.

Magistra **Nataša Faganelli** s svojim delom, znanjem in izkušnjami od samega začetka svoje kariere odločilno prispeva k razvoju klinične farmacije v Ortopedski bolnišnici Valdoltra, kjer je uspela uveljaviti kliničnega farmacevta kot enakopravnega člana zdravstvenega tima. Kot predsednica Sekcije kliničnih farmacevtov SFD si je zadala zelo ambiciozen cilj – organizacijsko, pravno in strokovno umestiti kliničnega farmacevta na klinični oddelek kot prepoznavnega strokovnjaka za načrtovanje in vodenje zdravljenja z zdravili.

Nataša Faganelli, mag. farm. spec.

Magister **Dušan Hus** je diplomiral na Farmacevtsko biokemijski fakulteti v Zagrebu. Poklicno pot je pričel v javnem zavodu Celjske lekarne in jo nadaljuje od leta 1993 kot koncesionar zasebne lekarne v Celju. Svojo aktivnost v SFD je pričel kot predsednik Celjske podružnice in jo nadaljuje kot član Odbora sekcije javnih lekarn in organizacijskega odbora za pripravo športnih iger, na katerih sodelujejo tudi naši kolegi iz Hrvaške. V okviru Lekarniške zbornice Slovenije je več mandatov član UO, predsednik komisije za informatiko, član pogajalske skupine LZS in član skupine za odnose z drugimi evropskimi lekarniškimi zbornicami. Ves čas si aktivno prizadeva za promocijo in ustrezno družbeno priznavanje farmacevtskega poklica, zato je cenjen v domačem in mednarodnem okolju.

Dušan Hus, mag. farm.

V začetku 60-tih let, ko lekarništvo pri nas še ni bilo razvito, je magistra **Duša Kramer** uspela nagovoriti vodstvo občine za novo lekarno Bežigrad. Aktivna je bila pri novoustanovljenem poslovnem združenju - Skupnosti lekarn, kasneje Združenju lekarn. Kot predsednica komisije za tehnologijo je sodelovala pri projektu Storitveni sistem v zdravstvu, kar je tudi omogočilo zbližati lekarniško dejavnost z zavarovalnico in političnimi institucijami. Tako je zaslužna za oblikovanje in uveljavitev storitvenega sistema in vključitev farmacevtov med zdravstvene poklice. Magistri Kramer je bilo priznanje izročeno posthumno.

Aktivni prostovoljci iz seniorskih vrst so pomembni vzorniki vsem mlajšim članom društva. S svojim delom nas spodbujajo in nam posredujejo iskrico optimizma za življenje v tretjem življenjskem obdobju.

Nadaljevanje zapuščine predhodnikov je pomemben prispevek k ohranjanju naravne dediščine v farmacevtski stroki. In prav v tem je magister **Jože Kukman** dal svoj izjemni prispevek z nadaljevanjem in nadgrajevanjem zapuščine Domače lekarne patra Ašiča.

Jože Kukman, mag. farm

Magistra **Matejka Kumperščak Duh** se je uveljavila z razumljivimi strokovnimi nastopi, s predavanji na farmacevtskih srečanjih in predstavitvah galenskega dela bodočim študentom FFA. Poučuje na srednji zdravstveni šoli, objavila pa je tudi več člankov v strokovnih revijah. Pomemben je njen prispevek pri nastajanju Kodeksa galenskih izdelkov. Kot predsednica mariborske podružnice SFD je dvignila raven rednih strokovnih srečanj in tudi dobro obiskanega farmski.

Matejka Kumperščak Duh, mag. farm., spec.

Magistra **Saša Maurič** je prepoznavna po aktivnem delu v komisiji za strokovni nadzor in svetovanje pri Lekarniški zbornici Slovenije in po dolgoletnem delu v komisiji za verifikacijo lekarn pri Ministrstvu za zdravje. V obeh komisijah se je zavzemala za dosledno izvajanje strokovnih načel v lekarniški praksi. Nastopala je tudi javno in si prizadevala približati lekarniško dejavnost laični javnosti.

Prof. Mrhar bere utemeljitev za podelitev priznanja Saši Maurič, mag. farm., spec.

Magister **Davorin Poherc** je bistveno pripomogel k uveljavitvi sekcije farmacevtskih tehnikov in sekcije farmacevtov javnih lekarn ter k realizaciji njunih programov dela. Njegove organizacijske sposobnosti so splošno znane že dolga leta skozi organizacijo različnih dogodkov SFD, od študentskih simpozijev, organizacije praks študentov v tujini do simpozijev SFD, farmacevtskega plesa ter športnih prireditev. Gre za osebnost, ki je spiritus agens, povezovalec in animator strokovnega in družabnega življenja farmacevtov.

Davorin Poherc, mag. farm.

Magistra **Mojca Prah Klemenčič** je prepoznavna po osebnem prispevku pri promociji društva in stroke v širši družbeni skupnosti, še posebej pa pri strokovnem povezovanju med zdravniki in farmacevti v okviru organizacije vsakoletnih skupnih strokovnih srečanj. Je tudi pobudnica projekta približevanja stroke uporabnikom z izdajo publikacije "Krka v skrbi za vaše zdravje", ki je na voljo vsem obiskovalcem lekarn.

Predsednik Društva čestita Mojci Prah Klemenčič, mag. farm.

Profesor **Slavko Pečar** je v svoji karieri odločilno prispeval k uveljavitvi farmacije kot znanstvene discipline v slovenskem in svetovnem prostoru. V sedemdesetih letih je oral ledino pri postavitvi temeljev za bodočo Fakulteto za farmacijo kot vrhunsko raziskovalno in izobraževalno ustanovo ter pri povezovanju takratnega Oddelka za Farmacijo z domačimi in tujimi raziskovalnimi inštituti. Pri postopni preobrazbi prvotnega Odseka za farmacijo na Oddelku za kemijo in kemijsko tehnologijo Fakultete za naravoslovje in tehnologijo v današnjo Fakulteto za farmacijo je odločilno pripomogel v dveh fazah: prvič pri preobrazbi Odseka za farmacijo v VTOZD Farmacija (Visokošolska temeljna organizacija združenega dela farmacija), ko je v začetku sedemdesetih letih s predlogi za pravočasno pripravo ustreznega programa omogočil osamosvojitev univerzitetnega študija farmacije in na tem temelju v začetku devetdesetih let nastanek samostojnega Oddelka za Farmacijo v okviru FNT ter drugič, pri preoblikovanju FNT v štiri fakultete v sredini devetdesetih let je s svojo znanstveno bibliografijo, še zlasti s članki v mednarodnih revijah in s citiranostjo teh del odločilno pripomogel k doseganju kriterijev za prehod iz Oddelka za farmacijo v samostojno Fakulteto za farmacijo.

Nadalje, več kot tridesetletno kvalitetno pedagoško in prodorno znanstveno delovanje profesorja Pečarja na področju farmacevtske kemije in biofizike je dalo pečat vsem generacijam slovenskih farmacevtom in naredilo farmacevtsko stroko in znanost prepoznavno v slovenski farmacevtski industriji in lekarništvu.

In najpomembnejše, profesor Pečar ima izjemne zasluge pri razvoju in uveljavitvi Fakultete za farmacijo kot vrhunske izobraževalne in znanstvene ustanove v slovenskem in mednarodnem visokošolskem in raziskovalnem prostoru. V obdobju 1995 - 1999 je kot dekan Fakultete za farmacijo z vizionarskim pogumom in vztrajnostjo izpeljal gradnjo novega južnega krila fakultete, tako da sta standard in opremljenost prenovljene fakultete presegla povprečni evropski nivo. Ta korak je dal nov zagon kadrovski rasti na FFA, pedagoškemu in znanstvenoraziskovalnemu delu ter začetku novega razvojnega cikla FFA. Za svoje zasluge pri razvoju in vodenju Fakultete za farmacijo je leta 2001 prejel zlato plaketo Univerze v Ljubljani.

Profesor Pečar je bil letih 1999 – 2007 podpredsednik programskega sveta univerzitetnega podiplomskega študija Biomedicina, leta 2007 pa je postal predsednik programskega sveta prenovljenega doktorskega študija Biomedicina. Sodelovanje pri nastajanju prve podiplomske šole na Univerzi v Ljubljani , ki je sedaj prerasla v doktorsko šolo, je pomembno prispevalo k prepoznavnosti FFA na UL, saj je FFA soustanoviteljica prve uspešne, že 9 let delujoče podiplomske šole na UL. V tej vlogi je odločilno vplival na kakovosten razvoj podiplomskega izobraževanja farmacevtov, ki je predpogoj za nadaljnji razvoj slovenske farmacije. Ker se je profesor Pečar v 35 - ih letih svojega poklicnega delovanja kot visokošolski učitelj in znanstvenik vedno zavzemal za kvalitetno in na znanstvenih osnovah temelječe izobraževanje in z njim povezano raziskovanje, in pri tem dosegel merljive rezultate, je Izvršilni odbor SFD sklenil, da mu podeli najvišje društveno priznanje.

Prejemnik Minařikovega odličja prof. dr. Slavko Pečar, se je zahvalil v imenu vseh nagrajencev

Razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2009

Podružnice in sekcije prijavijo kandidate za podelitev društvenih priznanj skladno z določili Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj tajništvu Slovenskega farmacevtskega društva. Predlogi morajo biti pripravljeni na obrazcih, ki so sestavni del Pravilnika in objavljeni na spletni strani www.sfd.si. Predlagatelji pošljejo predloge najkasneje do 31. januarja 2009, tajništvu SFD.

10. jubilejni FarmaSki 2008

Ljubica Lovišček

V organizacijskem odboru za prireditev smučarskega tekmovanja FarmaSki smo člani Mariborske podružnice Slovenskega farmacevtskega društva ponovno zavihali rokave in pripravili vse potrebno za jubilejno deseto tekmovanje. V letu 2007 nam tekme ni uspelo izpeljati, saj so nas visoke temperature opeharile za tisto malo snega, kot ga je dala zima. Tudi letos ni kazalo najboljše, toda prvi februarski vikend nas je vendarle obdaril z nekaj centimetri debelo snežno odejo na nekaj umetne podlage in Smučarskemu klubu Branik Maribor je uspelo pripraviti na Arehu zimsko idilo in odlične tekmovalne pogoje.

9. februarja 2008 se nas je zbralo v hotelu Arena ob vznožju Pohorja 48 tekmovalk in 51 tekmovalcev za veleslalom, ki ga je že desetič za FarmaSki postavil Milan Šmon. Tekmovalci smo prišli iz šestih podružnic in ene sekcije Slovenskega farmacevtskega društva: Ljubljanske, Celjske, Dolenjske, Gorenjske, Mariborske, Posavske in Študentske sekcije. Na 1090 m nadmorske višine smo se pogumno pognali s starta in skozi 18 vratic prismučali na cilj 115 metrov nižje. Najhitreje je prispel v cilj Tadej Dolenc s časom 0:36.18, pod 40 sekundami pa je uspelo prismučati v cilj tudi naši kolegici iz organizacijskega odbora Neni Šajber in je tako dosegla najboljši čas med damami. Tekmovalce je spremljalo tudi nekaj navijačev, po napornih spustih se nam je vsem prilegla topla malica. Ko se je dan že spuščal k večeru, smo se ponovno sestali v dolini. Že med večerjo nas je vse pozdravil tudi predsednik organizacijskega odbora Silvo Koder s Prešernovimi verzi za vse tiste, ki se prejšnji večer niso udeležili praznovanja v čast dnevu kulture. Po pozdravu predsednika Mariborske podružnice Matjaža Tuša je zbrane navdušila skupina Turbo Angels s poskočnimi takti ob spremljavi harmonike. Pokale in nagrade je ob jubilejnem srečanju podaril kar sam Pohorski car. Tradicija Pohorskih carjev je stara že 49 let. Pohorskega carja izberejo vsako leto na pustovanju smučarski zanesenjaki, car pa je dolžan zagotavljati sneg, spodbujati mora smučanje v Smučarskem klubu Branik, aktivno pomagati pri tekmovanju svetovnega pokala Zlate lisice, spodbujati razvoj turizma na Pohorju in poskrbeti tudi za kakšen sodček rujnega. Letos je Pohorski car postal dolgoletni direktor hotela Arena Miran Ferk, ki je v vseh letih poskrbel tudi za kulinariko na FarmaSkijih in je na podelitev prišel oblečen v tradicionalno oblačilo carja, ki ga sestavlja do tal segajoč ovčji kožuh s carsko kučmo, prekrito s ploščicami, na katerih so imena bivših carjev. Po podelitvi nagrad smo za vse tekmovalce in goste pripravili film, ki je v sliki in besedi spominjal na dogodke izpred dvanajstih let, ko smo v Mariboru prvič organizirali FarmaSki, pa vse do leta 2006. Še enkrat smo pogledali pohorske strmine, proge na Cojzarici, Habakuku in v ciljni areni, prijateljska druženja in kramljanja, hitre spuste po progi in počitek ob prijaznih pohorskih kočah, stalne tekmovalce in posebne goste,

In komu smo podelili pokale?

DAME 1. SKUPINA:

1. LJUBICA LOVIŠČEK	MPSFD	0:51,02
2. SILVA SMOLEJ	GPSFD	0:54,91

DAME 2. SKUPINA:

1. NENA ŠAJBER	MPSFD	0:39,44
2. TATJA KOSTNAPFEL	LPSFD	0:43,94
3. BRIGITA PUCELJ	DPSFD	0:45,50

DAME 3. SKUPINA:

1. MAJA VOVK	LPSFD	0:39,67
2. BARBARA ZADRAVEC	GPSFD	0:39,74
3. M. GORIČANEC BERNOT	LPSFD	0:42,32

DAME 4. SKUPINA:

1. VANJA PRAPOTNIK	MPSFD	0:41,10
2. VESNA KRALJ	DPSFD	0:41,23
3. POLONA BUKOVEC	DPSFD	0:42,82

MOŠKI 1. SKUPINA:

1. DUŠAN HUS	CPSFD	0:41,74
2. SILVO KODER	MPSFD	0:42,33
3. MAKS GORENJAK	MPSFD	0:44,35

MOŠKI 2.SKUPINA:

1. BRUNO NUSSDORFER	LPSFD	0:37,74
2. TOMI POPOVSKI	LPSFD	0:38,34
3. ROBERT OBERČ	DPSFD	0:39,03

MOŠKI 3.SKUPINA:

1. ALJAŽ SOČAN	LPSFD	0:38,15
2. IGOR PETROVIČ	DPSFD	0:38,45
3. MATEJ BERNOT	LPSFD	0:39,08

MOŠKI 4. SKUPINA:

1. TADEJ DOLENC	ŠSSFD	0:36,18
2. TIMOTEJ VIVOD	MPSFD	0:38,25
3. MILOŠ REPŠE	ŠSSFD	0:39,21

nastopajoče skupine z nepozabnimi Sestrami, ki so jih ustvarili farmacevti Mariborske podružnice s Silvom na čelu. Skupaj smo preživeli veliko prijetnih uric in veliko zabave in vsem, ki so FarmaSki zamudili, žal ne moremo pomagati. Tudi zdravila sponzorjev, ki so nam ves čas stali ob strani in smo se jim tudi še za poslednjič zahvalili, v tem primeru niso učinkovita.

Na jubilejnem FarmaSkiju smo se zahvalili tudi Silvu Kodru, ki se je na predsedniškem mestu organizacijskega odbora obdržal dolgih deset in nekaj let, predsednik pa tudi vsem članom odbora, ki so s svojimi idejami FarmaSkije vedno pripravljali vrhunsko, duhovito in neponovljivo.

Poleg tekmovalnega duha je FarmaSki bil vedno priložnost za sprostitev in druženje in le želimo lahko, da bo tako tudi v bodoče, ko bo smučarska srečanja pripravljala Celjska podružnica, ki je v Mariboru od Mariborske podružnice prejela simbolično smučko, objeto z bahavo farmacevtsko kačo.

Na svidenje! Morda na Rogli?

In memoriam Vladu Vebletu, mag. farm.

Na naših običajnih srečanjih bomo odslej zaman čakali, da bi k omizju farmacevtov upokojencev prisedel tudi naš dragi kolega, Vlado Veble. Smrt je konec aprila 2008 pretrgala nit življenja človeku, ki je dolga leta hodil svojo strokovno pot skupaj z nami.

Rojen je bil 28. 07. 1923 v Mariboru , osnovno šolo je končal v Celju, štiri leta gimnazije v Sremskih Karlovcih, naslednja štiri leta je nadaljeval v Murski Soboti, kjer je tudi maturiral. Potem je bil poslan v kazensko delovno brigado, od koder se je vrnil domov v Mursko Soboto. Novembra meseca 1945. leta se je vpisal na ljubljansko farmacevtsko fakulteto, ki je takrat prvič začela s predavanji. Po dveh letih je nadaljeval svoj študij v Beogradu. Tam je 2. marca 1950 tudi diplomiral.

Že pred diplomo je delal v več mestnih lekarnah v Mariboru in tako je nadaljeval tudi po diplomi vse do časa, ko je oktobra 1950 dobil poziv za služenje rednega vojaškega roka. Tega je najprej služil v Ljubljani, nato opravil tečaj rezervnih oficirjev v Vojni medicinski akademiji JLA v Beogradu. Od tu je bil poslan v Zagreb, kjer je končal staž in bil oktobra 1951 demobiliziran. Od takrat je delal kot magister farmacije v Okrajni lekarni v Slovenj Gradcu.

1. avgusta 1952 je bil službeno premeščen v Rogaško Slatino kot upravnik Okrajne lekarne. Prav tu je naslikal eno svojih prvih oljnih slik, Alkimista. Po štirih letih dela v Rogaški Slatini je bil premeščen v Kranj. Od tu naprej je svoje strokovno delo nadaljeval kot predstavnik pri zastopstvu FABEG za firmo Boehringer/Sehn. Nato je prestopil v Galeniko, pa v Krko in nazadnje je bil zastopnik pri firmi Agroprogres za firmo CILAG Chemie vse do svoje upokojitve t.j. trideset let.

Po pestri in dolgi strokovni poti pa z upokojitvijo njegov ustvarjalni um ni obmiroval. Kolega Vlado je bil človek mnogih registrov. V svojem mini ateljeju je dajal duška vsem svojim notranjim potrebam po izražanju samega sebe in to v vseh mogočih tehnikah. Svoja občutja je prenašal v oljne slike, v slikanje na steklu v posebni tehniki, v plastiki, v lesorezu. Motive je jemal predvsem iz stroke in njene zgodovine, blizu mu je bila narava in tudi etnologija. Vsega skupaj je ustvaril okrog tristo del. Ob priliki farmacevtske letne skupščine v Portorožu je pred leti imel svojo samostojno razstavo, kjer je bilo razstavljenih približno 20 njegovih slik. Razstavljal pa je tudi v Društvu upokojencev Ljubljana – Poljane.

Kolega Vlado Veble je bil član sekcije seniorjev od njene ustanovitve leta 1987 in več let tudi član izvršnega odbora te sekcije. Kot pobudnik mesečnih srečevanj članov sekcije upokojenih farmacevtov se je teh srečanj tudi redno udeleževal. Prizadeval si je, da bi se le-teh udeleževalo kar največ članov sekcije, zlasti iz Ljubljane in bližnje okolice. V svoji sredini ga bomo zelo pogrešali.

Poleg njegovih toplih človeških lastnosti nas v lekarni Ormož nanj spominja njegov Alkimist, v kleteh vinskih goric Peter-kletar Ptujski, v lekarni Radgona Radgonski grad, v Mariborskih lekarnah njegovo poslikano lekarniško posodje … v naših srcih pa neizbrisen spomin na plemenitega, delavnega in ustvarjalnega človeka, vrednega vsega spoštovanja.

Naj mu njegove Breze šepetajo nežno uspavanko miru in zahvalo za vse, kar smo ob njem lepega doživeli.

Omizje farmacevtov upokojencev

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.