

armacevtski vestnik 3



Š T 3 . J U L I J 2 0 1 2 . L E T N I K 6 3

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Farmacevtski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 3 • J U L I J 2 0 1 2 • L E T N I K 6 3

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Petra Slanc Može

Uredniški odbor

Tomaž Bratkovič

Mitja Kos

Janja Marc

Andrijana Tivadar

Matjaž Tuš

Tomaž Vovk

Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mitja Kos

Polonca Fiala

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,
Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01
Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja petkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.400 izvodov

Farmacevtski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 5 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

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

Letnik 2012 sofinancira Javna agencija za knjigo
Republike Slovenije.

UVODNIK

V reviji Mladina, dne 03.01.2012 v rubriki «Država kot plagiat» piše Bernard Nežmah takole:
» Od zdravlila do strupa je samo korak. Ko stopi bolnik v lekarno, se počuti varno. Apotekarju prostodušno razkrije svoje tegobe, saj mu zaupa, da mu bo skrbno in preudarno odmeril lek. Če gre v trgovski center, bo zadržan, ker pač ve, da bi mu trgovec podtaknil polno malho, če bi se mu le prepustil. Lekarnar je eden zadnjih poklicev, ki predpostavlja visoko etično držo.«

Prav v tem zadnjem stavku se kriva vsa veličina in lepota farmacevtskega, predvsem pa lekarniškega poklica! Ljudje, bolniki so nam zaupali. Pa nam še? S spremembo načina poslovanja in vsiljevanja trgovskih prijemov se nekatere lekarne spreminjajo v trgovine, zato ne smemo biti užaljeni, če nas neuki uporabnik naslovi s trgovcem in ne lekarnarjem, ki naj bi predstavljal najvišji nivo povezave med znanostjo o zdravilih in implementacijo tega tako zdravnikom na eni strani, kot tudi bolnikom oziroma uporabnikom zdravil in prehranskih dopolnil na drugi strani. Seveda je popolnoma jasno, da mora sodobna lekarna poleg strokovnega vročevanja zdravil ponujati tudi ostale izdelke, povezane z zdravjem oziroma bolezenskimi tegobami, a kje je meja? Ali ne kaže strogo upoštevati pravila, da se presežek sredstev, pridobljenih na trgu, vlaga v posodobitev lekarniške mreže, izobraževanje in nadgrajevanje znanj lekarnarjev? Pa četudi je to »strokovni« obisk lekarn v sosednji Avstriji, da le ostanejo sredstva v okviru delovanja in krepitev odličnosti lekarniškega poklica. Tako pa postajajo nekatere lekarne vir sredstev za krpanje občinskih proračunov in za netransparentno pretakanje sredstev od bolnika k posameznikom. V času ustanavljanja zbornic smo želeli imeti farmacevtsko zbornico, a prevladalo je mnenje nekaterih, v tistem času zelo aktivnih posameznikov, da je bolj smiselno imeti lekarniško zbornico. En od argumentov je bil tudi, da se bo na ta način bolje umestil poklic farmacevta lekarnarja med visokoizobražene, cenjene poklice. Zbornica, kje si sedaj? Čas za rešitev dobrega imena se počasi izteka. Zavedajmo se, da se spoštovanje in ugled nekega poklica gradi dolga leta, zapravi pa lahko (nepremišljeno) zelo hitro.

V tej številki Farmacevtskega vestnika, ki vas bo spremljal na zasluženih počitnicah, si boste kot osrednjo strokovno temo lahko prebrali več o iritativnemu kontaktnemu dermatitisu, čemur sledi prispevek o oksidacijskem stresu in nosečnosti. Kolegi farmakogenetiki so pripravili prispevek o spremljanju neželenih učinkov zdravil. Skupina prof.dr. Stanislava Gobca je na osnovi lastnih znanstvenih raziskav uredila listo pomembnejših zaviralcev 5-alfa reduktaz, na koncu pa si lahko osvežimo znanje o bioloških in farmakoloških učinkih derivatov cimetne kisline, ki jih najdemo v mnogih zdravilnih rastlinah.

V imenu uredniškega odbora vam želim prijetne počitnice in predvsem veliko mirnih, nestresnih dni.

Prof. dr. Borut Štrukelj

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Mirjam Gosenca, Mirjana Gašperlin, Julijana Kristl

Iritativni kontaktni dermatitis: od mehanizmov do vrednotenja iritantov

Irritative contact dermatitis: from mechanisms of irritation to irritants' assessment

145

Barbara Rejc, Joško Osredkar, Ksenija Geršak

Oksidacijski stres in nosečnost

Oxidative stress and pregnancy

153

Jan Schmidt, Alenka Šmid, Irena Mlinarič-Raščan

Spremljanje neželenih učinkov zdravil

Monitoring of adverse drug reactions

162

Nataša Beranič, Tea Lanišnik Rižner, Stanislav Gobec

Pregled pomembnejših inhibitorjev 5 α -reduktaz tipa 1 in 2

An overview of important 5 α -reductase type 1 and 2 inhibitors

168

Matej Sova

Biološki učinki derivatov cimetne kisline

Biological effects of cinnamic acid derivatives

178

Novi doktorji znanosti v letu 2011

185

Iz društvenega življenja

198

Iritativni kontaktni dermatitis: od mehanizmov do vrednotenja iritantov

Irritative contact dermatitis: from mechanisms of irritation to irritants' assessment

Mirjam Gosenca, Mirjana Gašperlin, Julijana Kristl

Povzetek: Koža je največji in tudi najvidnejši organ človeškega telesa, katere glavna naloga je zaščita organizma pred škodljivimi zunanjimi vplivi. Zaradi pogostih stikov s številnimi snovmi so tudi vnetne reakcije na koži številne. Iritativni kontaktni dermatitis je definiran kot neposredna vnetna reakcija izzvana ob stiku z iritantom. Klinična slika se razlikuje glede na značilnosti dražeče snovi, okolja ter organizma samega. Iritant je lahko katerakoli snov, ki poškoduje celice, če je v stiku s kožo v zadostni koncentraciji in dovolj dolgo. Iritativni kontaktni dermatitis, ki zajema kar 80% vseh kontaktnih dermatitisov, je v članku predstavljen kot biološki proces z značilno patofiziologijo in klinično sliko. Opisana sta dva bistvena mehanizma, vpletena v njegov nastanek, in sicer poškodba zaščitne plasti kože ter neposredni učinki iritantov na celice kože. Ravno poglobljeno razumevanje iritativnega kontaktnega dermatitisa na celični oziroma molekularni ravni omogoča napredek na področju razvoja novih alternativnih metod za vrednotenje draženja kože.

Ključne besede: iritacija, koža, kontaktni dermatitis, mehanizmi, vrednotenje iritantov

Abstract: The skin is the largest as well as prominent organ of human body, most importantly protecting us from harmful environmental hazards. Cutaneous inflammatory reactions are common adverse effect in humans due to frequent contacts with heterogeneous substances. Irritative contact dermatitis is a term used to describe any inflammatory reaction resulting from skin contact with an irritant. It reflects in different clinical entities with respect to irritant properties, environment and the host organism itself. An irritant is any agent, physical or chemical, that is capable of producing cell damage, if applied for sufficient time and in sufficient concentrations. Irritative contact dermatitis that accounts for approximately 80% of clinically recognized contact dermatitis is presented as biological event with a distinct pathophysiology and clinical appearance. Two distinct pathways by which irritants initiate and modulate irritation, i.e. via damage of the barrier function of stratum corneum and by direct effects of irritants on cells of the skin, are introduced. Moreover, only in-depth understanding of irritative contact dermatitis on cellular and molecular level can lead to novel alternative models for skin irritation assessment.

Key words: irritation, skin, contact dermatitis, mechanisms, irritants' assessment

1 Uvod

Koža je glede na površino telesa največji človeški organ, predstavlja pregrado med notranjostjo organizma in zunanjim okoljem ter s tem ščiti pred škodljivimi zunanjimi vplivi. Poleg tega aktivno sodeluje pri obrambi telesa z lokalnim imunskim odgovorom.

Iritacija oziroma draženje kože je biološki odziv na številne zunanje dejavnike, ki lahko povzročajo vnetje kože. Nekdaj so iritacijo kože dojemali kot enostaven proces, danes pa predstavlja zapleten biološki odziv z značilno patofiziologijo in klinično sliko (1), podprt z več kot 3300 znanstvenimi objavami (2). Kontaktni dermatitis je nespecifičen izraz za vsako vnetje kože kot posledica stika z iritantom ali alergenom (3). Iritativni kontaktni dermatitis (IKD) je vnetni odziv kože na dražeče dejavnike iz okolja, kemične ali fizikalne narave. Alergijski kontaktni dermatitis pa je posledica alergijske preobčutljivostne reakcije kože, za katero je potrebna predhodna senzibilizacija celic imunskega sistema (4). Včasih je celo veljalo, da IKD ne vključuje imunološkega odziva,

medtem ko je danes splošno sprejeto, da ima imunski sistem ključno vlogo pri vsakem vnetnem odzivu, le spominski limfociti T ali antigensko specifični imunoglobulini niso udeleženi pri IKD (5,6).

Moderen način življenja terja stike s številnimi snovmi, in v določenih primerih lahko pride do vnetnega odgovora kože bodisi na podlagi alergijske bodisi zgolj neposredne vnetne reakcije kot posledice stika z dražečo snovjo. Med vsemi kontaktnimi dermatitisi gre kar v 80% za IKD. Močno je povezan s poklicno izpostavljenostjo (frizerstvo, čistilstvo, tiskarstvo, pleskarstvo in drugo), kjer so ljudje nenehno izpostavljeni stiku z znanimi, specifičnimi iritanti. Klinični spekter kožnih sprememb je širok, zato razlikujemo več vrst IKD. Ločimo akutni (toksični) IKD, kjer je koža enkrat intenzivno izpostavljena agresivnim škodljivim dejavnikom in kronični (kumulativni) IKD, kjer se bolezen razvije po dolgotrajnem ali ponavljajočem se stiku kože z blažjim iritantom. V primeru akutnega IKD je klinična slika raznolika, koža je lahko le nekoliko bolj izsušena, pordela, lahko pa nastanejo tudi mehurji in oteklina (slika 1a). Začetna reakcija je

največkrat strogo omejena na mesto stika z iritantom, saj koncentracija snovi izven mesta stika izjemno hitro pade pod kritični prag, potreben za sprožitev vnetne reakcije. Take spremembe na koži izzvenijo v nekaj dneh ali tednih. Kljub različnemu nastanku in razvoju bolezni sta klinični sliki alergijskega kontaktnega dermatitisa in akutnega IKD izrazito podobni. Nasprotno pa je za kronični IKD značilna suha, pordela, razpokana, luščeča se in zadebeljena koža. Najpogosteje je prizadeta izpostavljena koža na rokah, še posebej pri ljudeh, ki imajo že sicer bolj suho in občutljivo kožo (slika 1b). Kljub izogibanju stika z iritantom, lahko vnetna reakcija poteka več let. Dodatno razlikujemo še med simptomatskimi (subjektivnimi) iritativnimi reakcijami, kjer zgolj določeni posamezniki zaznajo hudo pekočo bolečino v nekaj sekundah ali minutah po stiku s specifičnimi kemikalijami (kloroform, metanol, klorovodikova in retinojska kislina) ter primarnimi kemičnimi opeklinami z značilnimi hudimi poškodbami kože (bolečine oziroma pekočine, na mestu stika vidimo rdečino, oteklino, mehurje, nekrotično tkivo), ki jih povzročijo močne kisline in baze (5,7).



Slika 1: Klinična slika pri iritativnem kontaktnem dermatitisu:
a) akutna oblika; b) kronična oblika.

Figure 1: Clinical manifestation of irritant contact dermatitis:
a) acute form; b) chronic form.

Na obliko in stopnjo kožne reakcije vplivajo tako zunanji kot notranji dejavniki. Med zunanjimi dejavniki so najpomembnejše strukturne in kemijske lastnosti iritanta, predvsem tiste, ki vplivajo na dermalno absorpcijo (molekulska masa, polarnost, ionizacija, medij oziroma agregatna oblika dražeče snovi), koncentracija in trajanje stika. Mehanski, toplotni in klimatski (temperatura, vlažnost) dejavniki pa lahko tako reakcijo še dodatno spreminjajo. Kožni odgovor na lokalno draženje je seveda zelo raznolik in odvisen tudi od notranjih dejavnikov, in sicer od mesta draženja (določeni predeli telesa so bistveno bolj občutljivi), starosti, spola, rase ter morebitnih kožnih bolezni (7, 8).

2 Iritanti - snovi, odgovorne za nastanek iritativnega kontaktnega dermatitisa

Iritant je katerakoli snov, ki lahko poškoduje celice, če je v stiku s kožo v zadostni koncentraciji in dovolj dolgo (3). Glede na Direktivo o nevarnih

snoveh imajo spojine, ki dokazano povzročajo iritacijo kože, oznako R38, spojine, ki niso iritabilne pa NC (»not classified«) (9). Nabor spojin, ki lahko sprožijo iritacijo, je zelo velik, hkrati pa so strukturno zelo različne, tako da zgolj na podlagi kemijske strukture ne moremo sklepati na njihov iritacijski potencial. Raziskave na tem področju so usmerjene v določitev kvantitativnega razmerja med strukturo in aktivnostjo (QSAR), kar omogoča napovedovanje stopnje iritacije posameznih molekul. QSAR raziskave so aktualne zlasti znotraj določenih skupin spojin, ki pogosteje sprožijo IKD (organske baze in kisline) (10). Dejansko je vsaka snov potencialni iritant, med njimi najpogosteje površinsko aktivne snovi (PAS), industrijska čistila, organska topila, kisline/baze, oksidanti/reducenti, celo zdravilne učinkovine za dermalno uporabo, recimo ditranol, kalijev permanganat, po daljšem času pa tudi voda.

2.1 Površinsko aktivne snovi kot iritanti

Zaradi svojega delovanja so PAS prisotne v večini izdelkov, ki pridejo v stik s človeško kožo (zdravila in kozmetični izdelki, izdelki za nego in čiščenje telesa, čistila), in za razliko od ostalih dražečih snovi izzovejo iritacijo po različnih mehanizmi. Površinsko aktivne snovi lahko v stiku s kožo povzročijo iritacijo kože zaradi vezave in denaturacije proteinov, porušena urejene strukture lipidnih dvojnih plasti in prodiranja v spodnje plasti kože ter interakcije s celicami. Različne PAS izzovejo različne odzive. Razlog je očitno v razlikah v kemijski strukturi, in sicer v povezavi s kritično micelarno koncentracijo, strukturo hidroforne verige in polarne glave (11, 12). V raztopini so proste molekule PAS v dinamičnem ravnotežju s tistimi, ki so asociirane v micela. Dokazano je, da imajo pri iritaciji kože ključno vlogo posamezne molekule PAS, ne glede na mehanizem interakcije s kožo. Zgolj posamezne molekule se adsorbirajo na beljakovine v koži, plato vezave je namreč blizu ali pri kritični micelarni koncentraciji. Če so posamezne molekule manjše, lažje prodirajo v medcelični prostor ter porušijo urejeno zgradbo lipidnega dvosloja. Enako velja tudi za micela z ustrežno majhnim hidrodinamskim premerom (12). Za vrednotenje iritantov se kot zlati standard uporablja natrijev lavrilsulfat (SDS); 20% raztopina SDS ima oznako R38 in služi kot pozitivna kontrola pri epikutnem testiranju (12-15). S tega vidika je torej očitna težnja k uporabi biokompatibilnih PAS. Med farmacevtsko najsprejemljivejšimi emulgatorji so fosfolipidi (lecitin, izolecitin), zanimiv primer pa predstavlja načrtna sinteza lizinskih derivatov lecitina, ki so na celičnih kulturah izkazali manjši iritacijski potencial v primerjavi s SDS (16).

2.2 Voda kot iritant?

Voda je načeloma neškodljiva za kožo, ustreza hidraciji rožene plasti je celo nujna za vzdrževanje homeostaze kože. Daljša izpostavljenost (več ur ali dni) pa lahko privede do nabrekanja in povečanja prožnosti rožene plasti, povezave med korneociti oslabijo zaradi razgradnje dezmosomov. Spremeni se tudi morfologija kože; poveča se debelina vrhnjice ter medceličnega prostora, povečajo se celice imunskega sistema v vrhnjici, kaže se vpliv na aktivnost Langerhansovih celic. V usnjici nastane oteklina, poveča se število makrofagov in Langerhansovih celic. Zaščitna vloga kože se zmanjša predvsem zaradi porušena lipidnega dvosloja rožene plasti. Slednje se odraža v povečani permeabilnosti ter dovzetnosti za iritante, zaradi česar se poveča verjetnost za nastanek IKD (17).

2.3 Kozmetični izdelki kot iritanti

Prav tako ne moremo mimo dermatitisov, povzročenih s kozmetičnimi izdelki, ki jih uporablja že vsak izmed nas. Proizvodnja teh je velikanska,

Preglednica 1: Glavne skupine potencialnih iritantov in/ali alergenov v kozmetičnih izdelkih (19).

Table 1: Common potential cosmetic irritant and/or allergen ingredients (19).

SKUPINE SESTAVIN KOZMETIČNIH IZDELKOV	PREDSTAVNIKI
Konzervansi	formaldehid, parabeni, imidazolidinil sečnina
Antioksidanti	α-tokoferol, propil galat, butilhidroksitoluen, butilhidroksianizol
Dišave	benzilbenzoat, cinamil alkohol, heksil cinamal
Barve za lase	m-aminofenol, toluen-2,5-diamin, pirokatehol, kana
UV filtri	derivati p-aminobenzojske kisline, benzofenoni
Lipidi/emolienti	lanolin in njegovi derivati
Vlažilci	propilenglikol
Specifične sestavine: belila, keratolitiki...	α-hidroksi kisline

oglaševanje agresivno. Zavedati se moramo, da obstaja več tisoč različnih spojin, ki jih uporabljajo v kozmetičnih izdelkih. Hkrati je evropska zakonodaja na tem področju zelo stroga, urejena s kozmetično direktivo (76/768/EEC), ki jo bo prihodnje leto nadomestila Uredba EC 1223/2009. Spojine so glede na dovoljeno uporabo v kozmetičnih izdelkih tako razvrščene v posamezne skupine, ki jih urejajo dodatki h kozmetični direktivi: *dodatek 2* se nanaša na spojine, ki jih kozmetični izdelki ne smejo vsebovati, v *dodatku 3* pa so navedene spojine, katerih uporaba je omejena glede na mesto nanosa. Razvrstitev temelji na podlagi mnenja, ki ga poda Znanstveni odbor za varnost potrošnikov (SCCS) (9). Hkrati ima kozmetična industrija tudi velik ekonomski interes, da proizvaja kakovostne in varne izdelke, vendar kljub obsežnemu testiranju tako posameznih sestavin kot končnih izdelkov še vedno lahko nastopi kontaktni dermatitis. Problematični so predvsem izdelki, ki jih po uporabi ne speremo (npr. kreme za obraz) oziroma jih nanesemo na večjo površino (npr. mleko za telo, varovalni izdelki za sončenje). Glavne skupine iritantov v kozmetičnih izdelkih so navedene v preglednici 1. Iritativni kontaktni dermatitis pri uporabi kozmetičnih izdelkov navadno nastopi po večkratnem nanosu iritanta, je pa zelo težko postaviti ločnico med IKD in alergijskim kontaktnim dermatitisom. Določene spojine delujejo kot iritanti, istočasno pa lahko izzovejo alergijsko reakcijo (npr. cimetna kislina, večina spojin iz preglednice 1). Diagnosticiranje dermatitisa je v domeni dermatologov. Zaradi lažje opredelitve potencialnih alergenov in iritativov pa šteti amandma h kozmetični direktivi zahteva, da so na kozmetičnem izdelku navedene vse sestavine, kar posamezniku omogoča možnost izbire ustreznega kozmetičnega izdelka (18, 19).

2.4 Zdravljenje iritativnega kontaktnega dermatitisa

Zdravljenje IKD je lokalno in odvisno od kroničnosti/akutnosti dermatitisa. Sistemsko zdravljenje praviloma ni potrebno. Akutni IKD velikokrat nastopi zaradi nepazljivega ravnanja z agresivnimi iritanti. Delovanje vzročnega iritanta moramo nemudoma prekiniti ter preprečiti ponovno izpostavljanje. Pri simptomatskem lokalnem zdravljenju se ravnamo po stopnji in vrsti patoloških sprememb. Na prizadetih predelih na začetku zdravljenja večkrat dnevno menjavamo hladne obkladke (npr. s fiziološko raztopino). Močnejše vnete predele do umiritve vnetja (nekaj dni) mažemo s kortikosteroidnimi hidrofilnimi kremami, nato preidemo na negovalne kreme in mazila. Pri kroničnem IKD je prav tako potrebno prekiniti delovanje iritanta in kožo skrbno negovati z negovalnimi mazili. Močnejše vnete predele mažemo s kortikosteroidnimi mazili, dokler se vnetje ne

umiri. Pomembno je, da bolnika poučimo o bolezni, škodljivih dejavnikih in priporočimo, da se jim izogiba ali spremeni okolje, v kolikor je to mogoče (20, 21). Farmacevt lahko bolnika spodbudi k razmisleku, katere snovi oziroma izdelki so odgovorni za nastanek IKD, kar je zlasti pomembno, ko dražeča snov ni očitna (npr. bolnik nima tveganega poklica za nastanek IKD) in mu hkrati s svojim specifičnim znanjem o sestavinah v kozmetičnih izdelkih pri tem lahko pomaga.

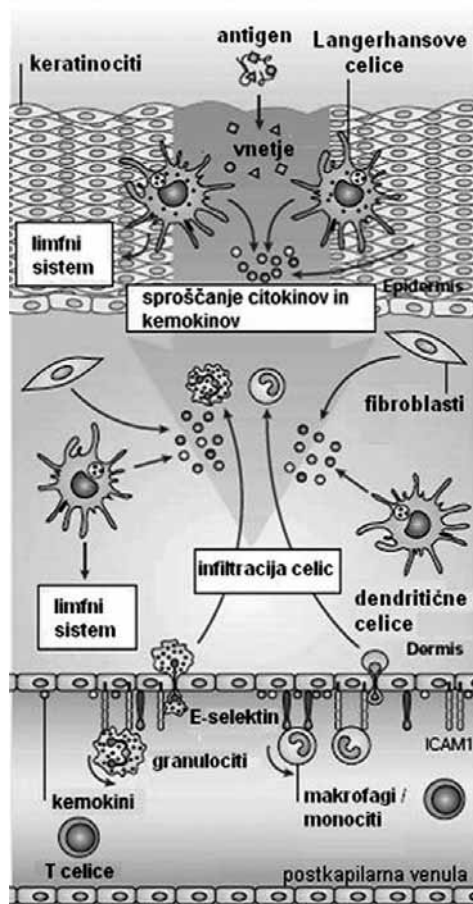
3 Kožni imunski sistem, vpleten v iritativni kontaktni dermatitis

Za razumevanje mehanizma nastanka in razvoja IKD moramo poznati vpletenost celic kože, celic, ki migrirajo na prizadeto območje ter vnetnih in provnetnih mediatorjev. Kožo sestavljajo vrhnjica (epidermis), ki prestavlja zgornjo plast, vmesna usnjica (dermis) in spodaj ležeče podkožje (subcutis). Za imunski odgovor so pomembne predvsem celice vrhnjice, in sicer keratinociti in Langerhansove celice, medtem ko je vloga melanocitov pri tem neznana. V usnjici imajo glavno vlogo limfociti T (brez spominskih limfocitov T), makrofagi in dendritične celice. Celice imunskega sistema v koži, hkrati s potekom imunskega odziva (poglavje 3.1), so predstavljene na sliki 2.

3.1 Celice vrhnjice

Vrhnjico sestavlja večplasten epitelij, v katerem 90% celic predstavljajo keratinociti. Ti so podvrženi procesu diferenciacije, v katerem se proliferativne, nediferencirane celice preobražajo v visoko diferencirane celice, ki niso več sposobne delitve. Glede na stopnjo diferenciacije razdelimo vrhnjico na več plasti, in sicer keratinociti nastajajo v bazalni plasti, dozorevajo v trnasti in zrnatih plasti, v roženi plasti pa poteka zadnja stopnja diferenciacije keratinocitov, to je sprememba v korneocite. Rožena plast s svojo specifično zgradbo predstavlja glavno bariero kože, hkrati pa imajo keratinociti ključno vlogo pri imunskem odgovoru vrhnjice. Sprožijo namreč imunski odziv oziroma imajo ključno vlogo pri začetku ter nadaljnji modulaciji in regulaciji vnetja (11). Vsak vnetni odziv poteka v medsebojnem sodelovanju raznovrstnih in številnih celic, tako je neizogibna povezava keratinocitov z endotelijskimi in imunskimi celicami. Za medsebojno signaliziranje uporabljajo imunske celice stike, ki jih omogočajo receptorske povezave (zlasti preko adhezijskih molekul). Zelo pomembno pa je tudi medcelično signaliziranje preko topnih beljakovinskih signalnih molekul oziroma citokinov. Med slednje uvrščamo interleukine (IL), rastne faktorje in kemokine, ki igrajo pomembno vlogo pri nastanku IKD. Keratinociti so v imunskem odzivu

pomembni predvsem z vidika izdelovanja citokinov IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ter rastnih faktorjev GM-CSF (granulocitno- makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik), TNF- α (dejavnik tumorske nekroze- α) in TGF- β (transformirajoči rastni dejavnik- β). Pri patoloških stanjih keratinociti izražajo molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda II, hkrati je povečano izražanje adhezijskih molekul kot je medcelična adhezijska molekula-1 (ICAM-1). MHC je skupni izraz za veliko skupino genov, ki kodirajo molekule, sodelujoče pri medcelični prepoznavi ter predstavljanju antigenov limfocitom T. Antigen je torej vsaka snov, ki izzove imunski odziv oziroma jih lahko limfociti T prepoznajo pri nespecifičnem imunskem odzivu. Keratinociti sproščajo tudi kemotaktične citokine ter dejavnike, ki vplivajo na sintezo E-selektina in žilnih adhezijskih molekul-1 (VCAM-1) na dermalnih endotelijskih celicah, ki sodelujejo pri migraciji limfocitov T iz žil v kožo (23, 24). Biološki odziv keratinocitov po stiku z iritantom je predstavljen na sliki 3.



Slika 2: Celice imunskega sistema v koži in imunski odziv na poškodbo zaščitne plasti kože (22).

Figure 2: Immune system cells and immune mechanisms in the skin following barrier disruption (22).

Langerhansove celice so dendritične celice, ki izvirajo iz kostnega mozga ter obsegajo 2-5% celic vrhnjice. Pomembne so za imunski sistem v koži, ker imajo vlogo pri predstavljanju antigenov limfocitom T. Na svoji površini izražajo MHC molekule razreda I in II. Značilne so tudi CD1a in CD1b molekule, ki so podobne molekulam MHC razreda I. Sproščajo citokine

IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 ter TNF- α . So edine celice, ki izražajo MHC molekule razreda II v fizioloških razmerah, medtem ko v vneti koži MHC molekule razreda II lahko izražajo tudi keratinociti. Langerhansove celice so torej glavne antigen predstavitvene celice (APC) v koži in posledično odgovorne za začetek imunskega odziva v njej, sodelujejo tudi pri razvoju IKD (7). Načeloma iritanti pri IKD zmanjšajo njihovo število v vrhnjici, čeprav moramo ponovno upoštevati razlike med strukturno različnimi iritanti.



Slika 3: Odziv keratinocitov po stiku z iritantom (7).

Figure 3: Keratinocyte response to skin irritants (7).

3.2 Celice usnjice

V usnjici so glavne APC makrofagi in dendritične celice (na svoji površini izražajo MHC molekule razreda II). Predhodno sproščeni mediatorji vnetja v koži kemotaktično privlačijo in povzročijo infiltracijo limfocitov T, predvsem limfocitov T-celic pomagalk, ki izločajo različne citokine IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , vpletene v vnetni proces.

4 Vloga citokinov pri iritativnem kontaktnem dermatitisu

Kot predhodno omenjeno, je v primerjavi s fiziološkim stanjem kože pri IKD opazna pozitivna regulacija izražanja številnih citokinov, ki imajo različno vlogo za njegov nastanek in razvoj. Med njimi zavzemajo IL-1 α , IL-1 β in TNF- α poglobitno mesto, saj lahko samostojno sprožijo vnetno reakcijo (8). Hkrati so udeleženi tudi ostali citokini: IL-2 je najpomembnejši rastni faktor za limfocite T, IL-6 vpliva na procese zorenja keratinocitov, IL-8 je močan kemokin za limfocite, medtem ko IL-10 zavira sintezo citokinov oziroma imunski odziv.

4.1 Interlevkin-1

IL-1 sintetizirajo številne celice, med njimi tudi keratinociti. Nahaja se v dveh aktivnih oblikah: IL-1 α ter IL-1 β . V fizioloških pogojih keratinociti neprenehoma sintetizirajo IL-1 α , ki se zaradi poškodbe celične membrane ob stiku z iritantom sprosti v medcelični prostor. Nasprotno pa se IL-1 β sprošča kot neaktivni prekurzor (31 kDa), ki ga v aktivno obliko (17,5 kDa) cepijo proteaze, ki niso prisotne v mirujočih keratinocitih. Informacijsko ribonukleinsko kislino (mRNA) za slednje zaznamo šele po aktivaciji keratinocitov z iritanti. Natančen mehanizem indukcije še ni poznan.

IL-1 je vključen tako v aktivacijo limfocitov T in tvorbo IL-2 kakor tudi v pozitivno regulacijo receptorjev za IL-2 na aktiviranih limfocitih T, hkrati deluje kemotaktično na limfocite T. Sproščajo ga Langerhansove celice, kjer je udeležen pri njihovi migraciji in predstavitvi antigena. Inducira

keratinocite k avtokrini ali parakrini sintezi IL-1 ter vpliva na sintezo ostalih citokinov: EGF (epidermalni rastni dejavnik), IL-6, IL-8 ter GM-CSF. Stimulira tudi fosfolipazo A_2 , kar vodi v nastanek prostaglandina E_2 , ki je odgovoren za vazodilatacijo. Sproščanje IL-1 torej omogoča razširitev vnetnega procesa ter z regulacijo adhezijskih molekul na keratinocitih, ICAM-1, vpliva na zadrževanje imunskih celic v koži (7).

4.2 Dejavnik tumorske nekroze- α

TNF- α oziroma njegov prekurzor (26 kDa) sintetizirajo številne celice, limfociti T, monociti, Langerhansove celice, fibroblasti in keratinociti; in sicer pred sproščanjem ga metaloproteaze pretvorijo v aktivno obliko (17 kDa), sestavljeno iz treh podenot. TNF- α izkazuje svoje učinke preko vezave na specifične receptorje TNF-R1 in TNF-R2, ki so izraženi na številnih celicah. TNF-R1 je receptor, preko katerega nastopijo učinki na metabolizem, sintezo citokinov in celično smrt ter se nahaja predvsem na keratinocitih. TNF- α uravnava izražanje ICAM-1 na keratinocitih, poveča izražanje gena za MHC molekule tipa II ter vpliva na sproščanje IL-1 α , IL-6, IL-8, zaradi česar vzdržuje vnetni proces v koži. Vpliva na sintezo kolagenaz in prostaglandina E_2 v fibroblastih, kar še dodatno prispeva k vnetju in poškodbi tkiva. Za večino iritantov (DMSO, SDS, formaldehid, fenol) je sicer dokazano, da povzročijo izražanje TNF- α , ponovno pa ne za vse, tako da se moramo zavedati, da različni iritanti vplivajo na imunski sistem na različnih ravneh (7).

5 Mehanizmi, vpleteni v nastanek iritativnega kontaktnega dermatitisa

Zaradi bistvenih razlik v kemijski strukturi spojin z dražejim potencialom je smiselno pričakovati, da so pri draženju kože udeleženi različni mehanizmi (11). Iritanti načeloma delujejo po dveh poteh: povzročijo zmanjšanje barierne funkcije kože ter izkazujejo neposredne učinke na celice v koži; le-te sprožijo sproščanje molekul, udeleženih v vnetnem procesu in infiltraciji imunskih celic.

Večina raziskav je bila usmerjenih predvsem v proučevanje akutnega IKD in alergijskega kontaktnega dermatitisa. Še vedno pa je težko opredeliti, zakaj nastopi kronični IKD, ki lahko traja več let. Nastanek specifičnih kožnih peptidov, ki jih imunski sistem ne prepozna in vodijo v avtoimunsko bolezen ali avtokrina regulacija sinteze TNF- α , ki vzdržuje lokalno vnetno okolje v koži, sta možni razlagi za nastanek kroničnega IKD (7).

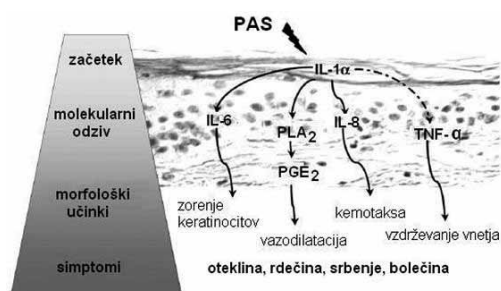
5.1 Poškodba zaščitne plasti kože

V roženi plasti je prostor med korneociti napolnjen z lipidi, večinoma ceramidi, holesterolom in prostimi maščobnimi kislinami, ki so v ravnotežju med trdnim kristaliničnim in gelskim ali tekočim kristalnim stanjem in zagotavljajo barierno funkcijo kože. Korneociti so še dodatno obdani z ovojnico prečno premreženih beljakovin, med katerimi je tudi filagrin, ki ima ključno vlogo pri vzdrževanju nepoškodovane zaščitne plasti. Poškodba rožene plasti nastopi zaradi denaturacije beljakovin, povečane hidracije in porušenega razmerja med lipidi. Poškodba rožene plasti je načeloma primarni učinek iritantov, izrazit zlasti pri PAS, nasprotno pa ga pri določenih iritantih ne zaznamo (ditanol). Porušena zgradba lipidnega dvosloja vpliva predvsem na povečano transepidermalno izgubo vode in lažje prodiranje iritantov in drugih

škodljivih snovi globlje v kožo, kjer lahko povzročijo nadaljnje okvare in nekroze keratinocitov. Zaradi poškodbe rožene plasti pride tudi do velikih sprememb v koncentraciji kalcija, ki je odgovoren za homeostazo rožene plasti. Njegova koncentracija je v fizioloških razmerah večja v zgornjih plasteh vrhnjice. Prav akutna poškodba rožene plasti, natančneje povečana hidracija ter sprememba gradienta kalcija, sprožita tudi procese obnavljanja preko sproščanja lipidov iz lamelarnih telesc in njihove ponovne ureditve v intercelularne lamele (1, 11).

5.2 Neposredni učinki na celice

Neposredni učinki iritantov so najbolj raziskani preko delovanja PAS, predvsem SDS. PAS namreč poškodujejo celične membrane, zaradi česar se iz citoplazme sprosti predhodno sintetiziran citokin IL-1 α , ki ima glavno vlogo pri začetku vnetja; sproži namreč izražanje ostalih citokinov, kot sta IL-6 in IL-8 (slika 4).



Slika 4: Iritacija kože, sprožena s površinsko aktivnimi snovmi (izražanje TNF- α je neodvisno od sproščanja IL-1 α ; črtkana črta) (11).

Figure 4: Skin irritation induced by surfactants (the expression of TNF- α is independent of IL-1 α release; dotted line) (11).

Zaradi delovanja iritantov se v koži poveča količina IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , in GM-CSF. Lahko torej sklepamo, da že poškodba sama sproži imunski odziv, ki vodi v razvoj lokalne vnetne reakcije v koži. Iritanti lahko vplivajo na celično membrano kot tako. Že pri koncentracijah, nižjih od citotoksičnih, povzročijo znatne spremembe v fluidnosti membrane in hkrati zaradi nespecifične afinitete do transmembranskih receptorjev nastopijo spremembe v procesih transdukcije, kar sproži oziroma podpira vnetni odgovor. V nasprotju z opisanim mehanizmom iritanti, ki ne poškodujejo celičnih membran, vnetnega procesa ne sprožijo zgolj s sproščanjem IL-1 α , temveč povzročijo temeljite spremembe procesov in funkcij keratinocitov. Keratinociti sicer že v fizioloških pogojih konstantno tvorijo reaktivne kisikove spojine (ROS), medtem ko določeni iritanti raven ROS še povišajo. Pri tem nastopi oksidacija nukleinskih kislin, beljakovin in membranskih lipidov, kar vodi v spremenjeno izražanje genov in citotoksičnost (11). Prav tako je verjetno, da interakcije iritantov z intracelularnimi ali membranskimi beljakovinami stimulirajo keratinocite ne samo neposredno, ampak tudi posredno preko spremembe okolja, npr. pH vrednosti. Površina vrhnjice je pred okužbami namreč zavarovana z nizkim pH, ki ima prav tako pomembno vlogo pri vzdrževanju zaščitne vloge rožene plasti (25).

6 Vrednotenje iritantov

Za izbiro varnih sestavin izdelkov za kožo sta potrebna ustrezna standardizacija in preizkusi. Tradicionalno so potencialne iritante testirali na živalih (Draize test na kuncih), vedno strožjim etičnim zahtevam za uporabo živali v laboratorijske namene pa je leta 2003 sledil sedmi amandma k Direktivi o kozmetičnih izdelkih, ki je stopil v veljavo leta 2009. Z njim so prepovedali preskušanje sestavin ali kombinacije sestavin na živalih kakor tudi prodajo izdelkov, katerih sestavine so bile testirane na živalih. Raziskovanje na tem področju se je posledično usmerilo v razvoj alternativnih metod za vrednotenje iritacije kože (*in vitro* modeli, *in vivo* testiranja na ljudeh) (10).

6.1 Draize test na kuncih

Pri testiranju iritantov nanese 0,5 ml nerazredčene tekočine oziroma 0,5 g trdne snovi (dodatno navlažimo) na obrit predel na kožo hrbta treh živali, nato jo pokrijemo z obližem za 4 ure. Klinične znake draženja spremljamo po 24-ih, 48-ih in 72-ih urah. Kljub splošnemu sprejetju tega testa se je izkazalo, da so rezultati velikokrat lažno pozitivni, kar je posledica večje odzivnosti zaradi različne strukture kože v primerjavi s človeško kožo. Hkrati pa je Draize-ov test postal podvržen številnim kritikam zaradi uporabe živali v biomedicinskih raziskavah (26, 27).

6.2 Epikutani test

Za oceno iritacijskega potenciala spojin so že pred dvajsetimi leti razvili etično sprejemljiv *in vivo* epikutani test (»patch test«), ki se uporablja tudi za oceno iritacije končnih izdelkov ter za opredelitev glavnih značilnosti iritacije kože. 30-im prostovoljcem s posebnimi obliži naneseemo testne snovi na klinično nespremenjeno kožo nadlakti ter jih pustimo delovati v naraščajočem časovnem intervalu, tj. 15 in 30 min, nato 1, 2, 3 in končno 4 ure. Tako se izognemo potencialno zelo hudi reakciji kože. Kot pozitivno kontrolo uporabljamo 20% raztopino SDS (R38) (10). Rezultate vrednotimo po 24-ih, 48-ih in 72-ih urah po odstranitvi testnega vzorca glede na štiristopenjsko lestvico, kjer oznaka 0 pomeni odsotnost

reakcije, medtem ko z oznakami +, ++ in +++ opredelimo vnetno reakcijo glede na jakost in razširjenost rdečine in otekline. Če je stopnja vnetne reakcije primerljiva ali izrazitejša glede na 20% raztopino SDS, lahko spojino opredelimo kot iritabilno. Zavedati pa se moramo, da je vrednotenje testnih rezultatov najzahtevnejši del epikutanega testiranja in je pravilna ocena odvisna izključno od poznavanja celotne dermatološke problematike (14, 28).

V preglednici 2 je podana opredelitev spojin kot NC ali R38 glede na rezultate epikutanega testiranja (podani kot odstotek prostovoljcev, pri katerih se je pojavila vnetna reakcija) v primerjavi s predhodno opredelitvijo, kjer so bili podatki pridobljeni z uporabo Draize testa. S sivo so označene spojine, pri katerih so bili rezultati epikutanega testiranja drugačni; z ozirom na dejstvo, da so bili podatki pridobljeni *in vivo* na človeški koži se nova opredelitev smatra kot verodostojna (14).

6.3 Rekonstruirani celični kožni modeli

V zadnjih 20-ih letih je sledil intenziven razvoj celičnih modelov, vprašljivo pa je ali lahko uporabimo rekonstruirane celične kožne modele za oceno iritacijskega potenciala posameznih spojin in kozmetičnih izdelkov. Osrednjo vlogo pri razvoju *in vitro* modelov za testiranje draženja imajo keratinociti. Celični kožni modeli so sestavljeni iz keratinocitov na naravni ali umetni podlagi. Izolirani keratinociti, navadno pridobljeni iz vzorcev kože po plastičnih operacijah, se v postopku priprave popolnoma diferencirajo, pri čemer nastane rekonstruiran človeški epidermis (RHE), ki posnema fiziološke lastnosti vrhnjice, bistvene plasti kože, vpletene v iritacijo. Dokazano je, da RHE dobro posnema tridimenzionalno zgradbo človeške kože, precejšnjo podobnost pa izkazuje tudi na področju morfologije, sestave lipidov in biokemičnih označevalcev, tako da je v zadnjem desetletju postal vodilni model za preučevanje draženja. Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM) je do danes priznal že tri *in vitro* modele za vrednotenje draženja kože, ki so enakovredna zamenjava za Draize test iritacije kože, in sicer EpiSkin™, EpiDerm™ ter SkinEthic™. Ocena *in vitro* modelov je temeljila na njihovi

Preglednica 2: Rezultati epikutanega testiranja (14).

Table 2: Human patch test results (14).

SPOJINA	TRENTUTNA OPREDELITEV *	REAKCIJA PO 4IH URAH (%)**	REAKCIJA NA 20% SDS (%)**,#	NOVA OPREDELITEV **
Izopropil miristat	NC	3	58	NC
Tween 80	NC	4	30	NC
Destilirana voda	/	0	56	NC
Mlečna kislina	NC	81	60	R38
Benzalkonijev klorid (7,5%)	R38	15	30	R38
Oktanol	R38	18	77	NC
Natrijev hidroksid (0,5%)	R38	61	70	R38
SDS (100%)	R38	70	45	R38
SDS (20%)	R38	67	/	R38
SDS (10%)	NC	47	45	R38

* glede na rezultate Draize testa (Dodatek I EC Direktive o nevarnih snoveh ali podatki dobavitelja)

** rezultati epikutanega testiranja

pozitivna kontrola pri epikutanem testiranju

sposobnosti, da ločijo iritante z oznako R38 od spojin, ki draženja ne povzročajo, ob sočasni zahtevi po ponovljivih in konsistentnih rezultatih. Prevalidacijske raziskave so obsegale tri faze: *faza I*: optimiranje protokola s testiranjem štirih spojin (dve z oznako R38) v enem laboratoriju; *faza II*: prenosljivost protokola s testiranjem šestih spojin (tri z oznako R38) v dveh laboratorijih in *faza III*: začetna ocena ponovljivosti s testiranjem 20-ih spojin, od teh 10 iritantov, v treh laboratorijih. V validacijskih študijah so v *fazi I* testirali 20 spojin (10 z oznako R38) v vodilnem laboratoriju in v *fazi II* 60 spojin (30 z oznako R38) v treh laboratorijih, izbrane spojine so se razlikovale od spojin iz prevalidacijskih raziskav (29, 30).

Omenjeni modeli izkazujejo v primerjavi s človeško kožo večjo stopnjo penetracije in so posledično bolj občutljivi, hkrati je to prednost pri testiranju spojin s šibko izraženimi iritativnimi lastnostmi. Najbolj izrazita pomanjkljivost celičnih modelov v primerjavi s človeško kožo je nezmožnost vrednotenja kliničnih znakov IKD. Tu je namreč pomembna vloga kožnega krvnega obtoka, imunskih celic, živcev, ki pri *in vitro* modelih manjkajo. Ocena draženja je tako podana na podlagi parametrov kot so stopnja viabilnosti, sproščanje citokinov, morfološke spremembe, spremembe v izražanju genov. Najbolj pogost parameter za oceno draženja je spremljanje viabilnosti celic (ti. MTT test), vendar pa je bistveno bolj občutljiv parameter določanje specifičnih citokinov, predvsem IL-1 kot primarnega citokina pri nastanku IKD, pa tudi IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α in ostalih. Iz napisanega je razvidno, da zgolj poglobljeno razumevanje mehanizmov nastanka in razvoja IKD na celični oziroma molekularni ravni omogoča sočasen napredek na področju razvoja in uporabe alternativnih metod ter novih potencialnih biokemičnih označevalcev za oceno draženja (11, 31).

7 Zaključek

Zmotno je mišljenje, da je IKD preprost biološki odziv kože ob stiku s škodljivimi snovmi. Zgolj razumevanje IKD kot kompleksnega procesa, vključno z imunskim odzivom, lahko omogoči ustrezen pristop tako k preprečevanju IKD kakor tudi vrednotenju iritantov z vzporednim razvojem alternativnih metod. Zavedati se moramo, da IKD predstavlja velik zdravstveni problem z resnimi socialnimi vplivi, saj so simptomi lahko zelo moteči za posameznika, tudi z vidika zunanega izgleda ter želja po popolnem videzu. Če poplavi različnih izdelkov na tržišču in njihovi pogosti uporabi prištejemo še potencialno poklicno izpostavljenost, je očitno, da lahko včasih veliko naredimo že sami s kritičnim pristopom pri izbiri izdelkov, ki pridejo v stik z kožo (npr. uporaba izdelkov, ki vsebujejo manj iritabilne snovi kot so biokompatibilne PAS ali njihove kombinacije).

8 Zahvala

Pregledni članek je nastal v okviru raziskovalnega projekta J1-4236 Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

9 Literatura

- Fluhr JW, Darlenski R, Angelova-Fischer I, Tsankov N, Basketter D. Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment; Skin irritation. Skin Pharmacol Physiol 2008; 21: 124-135.
- Web of science. http://home.izum.si/izum/ft_baze/wos.asp. Dostop: 24-09-2010.
- Chew A-L, Maibach HI. Safety terminology. In: Paye M, Barel AO, Mainbach HI. Handbook of cosmetic science and technology 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, London 2006: 889-894.
- Basketter D, Darlenski R, Fluhr JW. Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment; Skin sensitization. Skin Pharmacol Physiol 2008; 21: 191-202.
- Kopčavar-Guček N. Kontaktni dermatitis in urtikarija v družinski medicini. http://www.drmed.org/strok/ssi/fajdiga_peto_srecanje/fajdiga_12.php. Dostop: 03-08-2010.
- Schliemann S, Breternitz M, Elsner P. Principles and mechanisms of skin irritation. In: Barel AO, Paye M, Mainbach HI. Handbook of cosmetic science and technology 3rd ed., Informa Healthcare USA, Inc. 2009: 443-453.
- Lisby S, Baadsgaard O. Mechanisms of irritant contact dermatitis. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoitteir J-P. Contact Dermatitis 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, 2006: 69-82.
- Corsini E, Galli CL. Cytokines and irritant contact dermatitis. Toxicol Lett 1998; 102-103: 277-282.
- White IR, Basketter D. Legislation. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoitteir J-P. Contact Dermatitis 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, 2006: 869-873.
- Robinson MK, Cohen C, de Brugerolle de Fraissinette A, Ponc M, Whittle E, Fentem JH. Non animal testing strategies for assesment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finidhed products. Food Chem Toxicol 2002; 40: 573-592.
- Weiss T, Basketter DA, Schröder. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicol Vitro 2004; 18: 231-243.
- Paye M. Mechanism of skin irritation by surfactants and anti-irritants for surfactant-based products In: Barel AO, Paye M, Mainbach HI. Handbook of cosmetic science and technology 3rd ed., Informa Healthcare USA, Inc. 2009: 455-469.
- Material safety sata sheet. Sodium lauryl sulfate MSDS. http://129.128.185.122/drugbank2/drugs/DB00815/safety_sheets/1084. Dostop: 06-08-2010.
- Basketter DA, Chamberlain M, Griffiths HA, Rowson M, Whittle E, York M. The classification of skin irritants by human patch test. Food Chem Toxicol 1997; 35: 845-852
- Robinson MK, Kruszewski FH, Al-Atrash J, Blazka ME, Gingell R, Heitfeld FA, Mallon D, Snyder NK, Swanson JE, Casterton PL. Comperative assesment of the acute skin irritation potential of detergent formulations using a novel humen 4-h patch test method. Food Chem Toxicol 2005; 43: 1703-1712.
- Sanchez L, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Determination of interleukin-1 α in human NCTC 2544 keratinocyte cells as a predictor of skin irritation from lysine-based surfactants. Toxicol Lett 2006; 167: 40-46.
- Warner RR, Boissy YL, Lilly NA, Spears MJ, McKillop K, Marshall JL, Stone KJ. Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants. J Invest Dermatol 1999; 113: 960-966.
- Barel AO. General concepts of skin irritancy and anti-irritant products. In: Paye M, Barel AO, Mainbach HI. Handbook of cosmetic science and technology 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, London 2006: 917-932.
- White IR, de Groot AC. Cosmetics and skin care products. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoitteir J-P. Contact Dermatitis 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, 2006: 493-506.
- Levin CY, Maibach HI. Iritant contact dermatitis: is there an imunologic component? Int Immunopharm 2002; 2: 183-189.
- Lunder T. Alergijske in reaktivne kožne bolezni. In: Kansky A. Kožne in spolne bolezni. Ljubljana 2002: 137-150.
- Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nat Rev Immunol 2004; 4: 211-222.
- Vozelj M. Temelji imunologije. DZS Ljubljana 2000: 7-8, 239-259.
- Gordon KB, Chan LS. Inflammation and immunity. In: Freinkel RK, Woodley DT. The biology of the skin, The Parthenon Publishing Group Inc., New York, 2001: 239-254.
- Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. J Invest Dermatol 2003; 121: 345-353.

26. Basketter D, Kimber I. Predictive tests for irritants and allergens and their use in quantitative risk assesment. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoitteir J-P. Contact Dermatitis 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, 2006: 179-187.
27. Bashir SJ, Maibach HI. In vivo irritation. In: Paye M, Barel AO, Mainbach HI. Handbook of cosmetic science and technology 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, London 2006: 905-916.
28. Wahlberg JE, Lindberg M. Patch testing. In: Frosch PJ, Menné T, Lepoitteir J-P. Contact Dermatitis 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, 2006: 365-390.
29. Macfarlane M, Jones P, Goebel C, Dufour E, Rowland J, Araki D, Costabel-Farkas M, Hewitt NJ, Hibatallah J, Kirst A, McNamee P, Schnellauf F, Scheel J. A tiered approach to use alternatives to animal testing for the safety assesment of cosmetics: skin irritation. Regul Toxicol Pharmacol 2009; 54: 188-196.
30. Botham PA. The validation of in vitro methods for skin irritation. Toxicol Lett 2004; 149: 387-390.
31. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, corrosivity, and substance transport. Eur J Pharm and Biopharm 2005; 60(2): 167-178.

Revija Zdravstveno varstvo, ki jo izdaja Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, ima v letu 2011 faktor vpliva 0,452

Igor Švab, Marija Seljak, Saša Zupanič

Revija Zdravstveno varstvo izhaja pod okriljem Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije od leta 1962 in ima torej že 50-letno tradicijo obveščanja strokovne javnosti s področja javnega zdravja.

Konec junija je izšel JCR 2011 (Science Edition in Social Sciences Edition). Težko smo ga pričakovali, saj je revija Zdravstveno varstvo od leta 2009 vključena v SSCI ter posledično podvržena izračunavanju faktorja vpliva (IF).

Faktor vpliva je sinonim za kakovostno uredniško politiko in visoko znanstveno raven revije. S svojim pomenom in uveljavljenostjo tako faktor vpliva zagotavlja reviji ugled, ta pa seveda reden in zadosten dotok kakovostnih člankov in s tem izbor le najboljših člankov v objavo.

Prvi izračun faktorja vpliva IF (2011) za Zdravstveno varstvo je 0,452.

Upoštevani so bili citati znanstvenih in preglednih znanstvenih člankov v letu 2011, ki so se nanašali na članke v letih 2010 in 2009.

Zdravstveno varstvo je v SSCI uvrščeno v kategorijo PUBLIC, ENVIRONMENTAL & OCCUPATIONAL HEALTH. Skupno je v tej kategoriji 131 revij, Zdravstveno varstvo je na 119 mestu, kar

predstavlja 4. kvartil te skupine. Najvišji IF v tej kategoriji v 2010 je bil 8,609.

V Sloveniji je bilo v letu 2010 18 znanstvenih revij s faktorjem vpliva, dve s področja medicine. Letos se je tej skupini priključila še revija Zdravstveno varstvo.

Čestitamo avtorjem, recenzentom in urednikom revije Zdravstveno varstvo in se jim hkrati zahvaljujemo za njihovo uspešno delo.

Ker pa nas izračun faktorja vpliva čaka vsako leto, se bomo trudili, da to lovoriko ohranjamo tudi v bodoče s kakovostnimi članki, strogo recenzijsko politiko in dobrim uredniškim delom. Citiranje člankov iz Zdravstvenega varstva 2010 in 2011 v letu 2012 v revijah, vključenih v SCI in SSCI, pa je seveda pot k uspehu v JCR 2012.

Revija Zdravstveno varstvo (ang. Slovenian Journal of Public Health – SJPH) je brezplačno v polnem besedilu dostopna na spletnih straneh evropske znanstvene založbe Versita <http://www.versita.com/sjph/>, kjer najdete tudi navodila avtorjem in vse osnovne podatke o reviji.

Oksidacijski stres in nosečnost

Oxidative stress and pregnancy

Barbara Rejc, Joško Osredkar, Ksenija Geršak

Povzetek: Nosečnost je fiziološko stanje povišanega oksidativnega stresa. Njegov obseg je odvisen od tvorbe reaktivnih kisikovih spojin ter od učinkovitosti antioksidantnega sistema. Ključno vlogo pri tvorbi reaktivnih kisikovih spojin in uravnavanju intrauterinega oksidativnega ravnotežja v nosečnosti ima posteljica. Motnje oksidativnega ravnotežja v nosečnosti lahko vodijo v nastanek motenj v razvoju zarodka in kasneje ploda, saj prekomerni oksidativni stres povzroči oksidativno okvaro bioloških molekul. Določanje označevalcev oksidativne poškodbe ter določanje učinkovitosti antioksidantov omogoča ovrednotenje prisotnega oksidativnega stresa in ugotavljanje njegove povezanosti z zapleti v nosečnosti. V izbranih raziskavah so bili označevalci oksidacije lipidov in DNK v primeru preeklampsije, zastoja rasti ploda in prezgodnjega poroda značilno povišani glede na zdravo nosečnost. Aktivnost in ekspresija encimskih antioksidantov pa se med različnimi zapleti v nosečnosti razlikujeta. Članek zajema obrazložitev fiziološke in patofiziološke vloge reaktivnih kisikovih spojin v nosečnosti ter pregled nekaterih označevalcev oksidativnega stresa med zdravo nosečnostjo in med nosečnostjo z omenjenimi zapleti.

Ključne besede: reaktivne kisikove spojine, nosečnost, označevalci oksidativnega stresa

Abstract: Pregnancy itself is a state of increased oxidative stress. The extent of oxidative stress depends on reactive oxygen species formation and efficiency of antioxidant system. The placenta has the key role in the formation of reactive oxygen species and regulation of intrauterine oxidative balance. As excessive oxidative stress causes oxidative damage to biological molecules, disorders of oxidative balance in pregnancy can lead to defects in the embryonic and later in fetal development. The detection of markers of oxidative damage and of antioxidant efficiency permits the evaluation of oxidative stress and determination its association with pregnancy complications. In selected studies, markers of lipid and DNA oxidation were significantly elevated in preeclampsia, fetal growth restriction and preterm delivery in comparison to healthy pregnancy. The activity and expression of enzymatic antioxidants varies among high-risk pregnancies. This article includes description of physiological and pathophysiological role of reactive oxygen species in pregnancy and overview of some oxidative stress markers throughout gestation of healthy and complicated pregnancies.

Key words: reactive oxygen species, pregnancy, oxidative stress biomarkers

1 Uvod

Oksidativni stres nastane zaradi neravnotežja med prooksidanti in antioksidanti. Vzrok oksidativnega stresa v organizmu je prekomerna tvorba radikalov in ostalih reaktivnih kisikovih/dušikovih spojin ali nezadosten obrambni antioksidantni sistem. Povzroči lahko neželene poškodbe bioloških molekul. Nosečnost je zaradi povečane metabolične aktivnosti in zmanjšane moči antioksidantov stanje povišanega oksidativnega stresa.

Namen tega preglednega članka je prikazati osnove in trenutna spoznanja o vlogi oksidativnega stresa v nosečnosti in njegovi povezanosti s patološkimi izidi. Informacije so podane sistematično z vidika določanja oksidativnega statusa v nosečnosti z znanimi biološkimi označevalci.

2 Reaktivne kisikove spojine

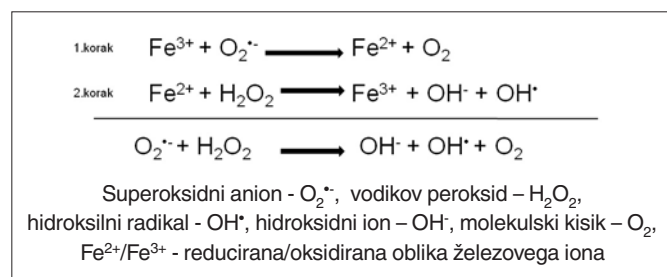
Izraz reaktivne kisikove spojine (ROS) vključuje kisikove radikale in njihove neradikalne intermediate. Nastajajo pri številnih redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektronov. Glavni predstavniki ROS v bioloških sistemih so: superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$),

vodikov peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$). Vzrok nastanka ROS pa predstavljajo tako endogeni viri (mitohondriji, citokrom P450, peroksisomi, endoplazemski retikulum, makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci) kot eksogeni viri (ksenobiotiki, kovinski ioni, ionizirajoče sevanje) (1,2).

Superoksidni anion je za en elektron reducirana molekula kisika (O_2). Kot nabita molekula zato težko prehaja celične membrane in je prekursor večine ROS (3). Glavni vir nastanka $O_2^{\cdot-}$ so mitohondriji. Pri poteku transportne verige elektronov določeno število elektronov uide iz verige, predvsem z mesta kompleksa I in III. Ti elektroni tvorijo s kisikom $O_2^{\cdot-}$ (1). V normalnih pogojih se za tvorbo $O_2^{\cdot-}$ v mitohondrijih porabi 1-2% O_2 (3, 4). Pomemben vir $O_2^{\cdot-}$ so tudi encim ksantin-oksidadza, transportna veriga elektronov v endoplazemskem retikulumu, NADPH-oksidadza, citokrom P450 ter ostale oksido-reduktaze.

Vodikov peroksid je dokaj stabilen in lahko prečka celične membrane. Nastaja iz $O_2^{\cdot-}$ s pomočjo superoksid-dismutaze.

V prisotnosti železa lahko $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 reagirata v Haber-Weissovi reakciji, katere drugi korak je Fentonova reakcija, in tvori $OH^{\cdot}$ (slika 1). Hidroksilni radikal je zelo reaktiven, ima kratko razpolovno dobo in reagira blizu mesta nastanka. Je glavni krivec za oksidativne poškodbe bioloških molekul (2).



Slika 1: Haber-Weissova reakcija. 2. korak – Fentonova reakcija.

Figure 1: Haber-Weiss reaction. 2. step – Fenton reaction

2.1 Fiziološka vloga reaktivnih kisikovih spojin v organizmu

Reaktivne kisikove spojine se v organizmu tvorijo neprenehoma. V nadzorovanih, homeostaznih koncentracijah imajo fiziološko vlogo pri regulaciji delovanja nekaterih encimov, v signalnih poteh pri celičnem razvoju, diferenciaciji in programirani celični smrti ter pri genski ekspresiji občutljivi na redoks potencial (5).

2.2 Vloga reaktivnih kisikovih spojin v nosečnosti

Sodelujejo v signalnih poteh ženskega reproduktivnega cikla. Pomembne so v procesu folikulogeneze, zorenju oocita, pri delovanju rumenega telesca ter miometrija, v procesu embriogeneze, implantacije zarodka in tudi pri fetoplacentnem razvoju. Nosečnost je že sama po sebi stanje povišanega oksidativnega stresa, zaradi velike metabolične aktivnosti v mitohondrijih posteljice (6, 7). Posteljica je pomemben vmesnik med materinim in fetalnim krvnim obtokom, saj prenaša kisik in številne metabolične substrate. Do sedaj zbrani dokazi nakazujejo na to, da ima ključno vlogo pri tvorbi oksidativnega stresa med nosečnostjo in direktno uravnava intrauterino oksidativno ravnotežje (8). V zgodnji nosečnosti, po implantaciji zarodka, sta posteljica in zarodek v pretežno hipoksičnem okolju (4, 8). To zgodnje obdobje predstavlja začetek organogeneze in takrat je zarodek posebno občutljiv na oksidativni stres (3, 9). Že v prvem trimesečju nosečnosti, okrog 10. tedna, se pojavi fiziološki porast ROS, ki je posledica vzpostavitve pretoka krvi v medresnični prostor. Do zvišanja parcialnega tlaka kisika med resicami pride predvsem ob invaziji trofoblastov v maternično sluznico, kar vodi v povečan pretok v uterinih spiralnih arterijah (3, 4). Pri tem je posteljica izpostavljena hipoksiji in reoksigenaciji, kar povzroči porast ROS in oksidativno poškodbo tkiva. To ima za posledico tudi kompenzatorno, večje izražanje antioksidantnih encimov v posteljici (3, 8). Obseg oksidativnega stresa posteljice je torej odvisen od velikosti oksidativne poškodbe ter učinkovitosti antioksidantnega sistema posteljice. Nanju pa vplivajo različni faktorji, vključno s prehranjevalnimi navadami matere, aktivnostjo ter drugimi dejavniki pogojenimi z življenjskim slogom ter genetski dejavniki in dejavniki okolja (10). Za zagotavljanje homeostaze mora biti stalno vzpostavljeno natančno ravnotežje med funkcijo ROS in antioksidanti. Motnje omenjenega oksidativnega ravnotežja lahko vodijo do motenj, ki vplivajo na razvoj zarodnih celic, zarodka in pozneje ploda, in imajo lahko dolgoročne posledice za kasnejše življenje, odvisno od tega v katerem obdobju znotrajmaterničnega razvoja se pojavijo (9).

2.3 Patofiziološka vloga - tarče reaktivnih kisikovih spojin v celici

Oksidativne poškodbe celičnih makromolekul vodijo do porušena ravnotežja v celici in povzročijo poškodbe vseh glavnih bioloških molekul: nukleinskih kislin, lipidov in proteinov. Te poškodbe so lahko reverzibilne in odvisne od antioksidantnega sistema in stresnih proteinov. Če pa so poškodbe ireverzibilne vodijo celico v celično smrt (2).

2.3.1 Oksidacija proteinov

Oksidacija proteinov lahko povzroči spremembe strukture in izgube katalitične funkcije. Poveča se tudi občutljivost takih proteinov na proteolizo in denaturacijo (1).

Kljub nizki reaktivnosti lahko superoksidni radikal povzroči inhibicijo nekaterih antioksidantnih encimov (glutation-peroksidaza, katalaza, mitohondrijska ATP-aza). Vodikov peroksid inaktivira encime z oksidacijo pomembnih tiolnih skupin metioninskih in cisteinskih ostankov. Tvorba disulfidov v proteinih ali med njimi pa je reverzibilna poškodba, saj se lahko ostanki regenerirajo z redukcijo z glutationom ali tioredoksinom. Hidroksilni radikal povzroča hude poškodbe in nastanek karbonilov. Nastanek karbonilov je ireverzibilna okvara proteinov in vodi v njihovo razgradnjo ali združevanje v skupke, kar je tudi vzrok za nekatera obolenja (1, 11).

2.3.2 Oksidacija lipidov

Pri oksidaciji lipidov so tarča ROS najpogostejše polinenasičene maščobne kisline fosfolipidov v membranah celice ali lipoproteini. Proces vodi do nastanka hidroperoksidov, epoksidov, aldehydov in alkanov. Nekateri nastali produkti so zelo reaktivni in še dodatno sodelujejo pri nastajanju radikalov in poškodb makromolekul. Posledici peroksidacije lipidov sta slabša integriteta membrane in povečanje membranske fluidnosti (12).

2.3.3 Oksidacija DNK

Oksidacija DNK povzroči lom DNK verige, spremembe purinov, pirimidinov ali sladkornega dela, izgubo baz ter njihove navzkrižne povezave. Take poškodbe lahko vodijo do spremembe transkripcije, spremembe signalnih poti, kar je tudi vzrok za nastanek rakavih obolenj, različnih degenerativnih bolezni in staranja. Na oksidacijo je še bolj kot jedrna DNK občutljiva mitohondrijska DNK, ki ne vsebuje histonov in popravljalnih mehanizmov (1).

3 Antioksidantni sistem

Aerobni organizmi so neprenehoma izpostavljeni reaktivnim kisikovim zvrstem, ki nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom. V organizmu je homeostazna, neškodljiva koncentracija ROS uravnavana s sistemom encimskih in neencimskih antioksidantov. Ko nastanek ROS preseže antioksidantno kapaciteto, govorimo o oksidativnem stresu.

3.1 Encimski antioksidantni sistem

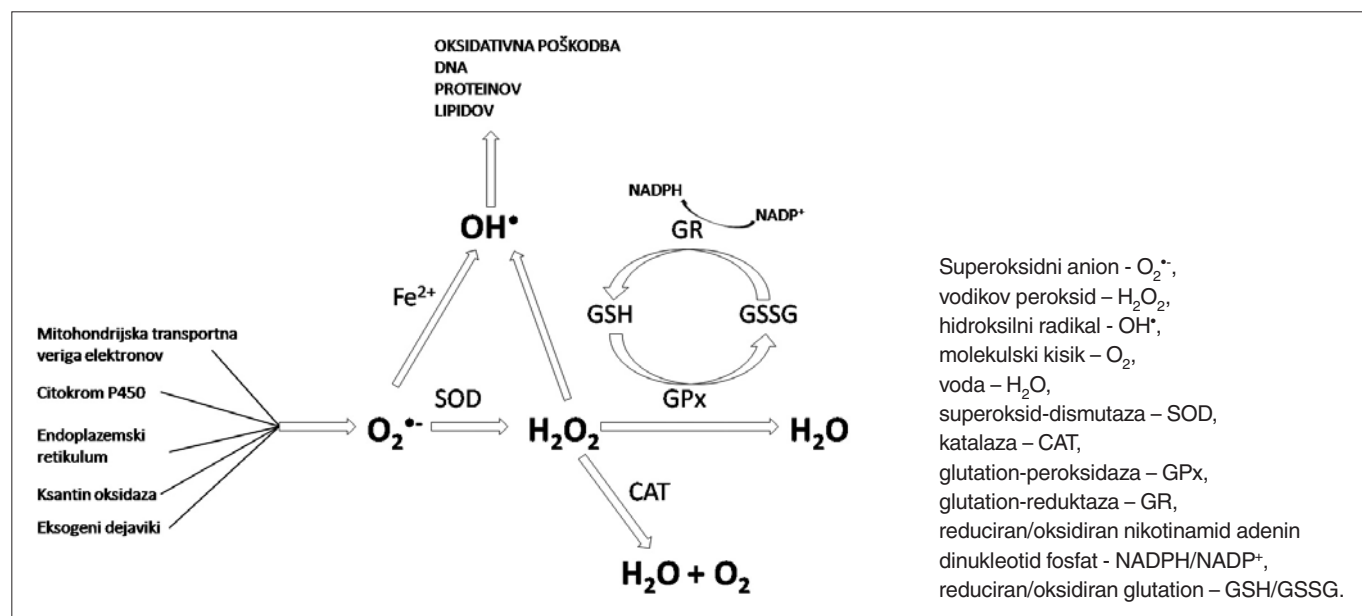
Encimski sistem antioksidantov sodeluje pri razgradnji in odstranjevanju omenjenih reaktivnih zvrsti in vključuje superoksid-dismutazo (SOD), katalazo (CAT), glutationski in tioredoksinški encimski sistem (glutation-peroksidaza - GPx, glutation-reduktaza - GR, tioredoksin-peroksidaza - TrxP, tioredoksin-reduktaza - TrxR) (13).

Preglednica 1: Pregled nekaterih raziskav, ki so preučevale encimske antioksidantne sisteme v zdravi nosečnosti in v nosečnosti z različnimi zapleti.

Table 1: Summary of some studies of enzymatic antioxidant systems in healthy and high-risk pregnancy.

ENCIM	KJE, KDAJ	REFERENCA	POPULACIJA, VELIKOST VZORCA	REZULTATI
SOD	eritrociti, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v rodni dobi	aktivnost SOD ↑ v 3. trimesečju pri nosečnicah glede na nenoseče ženske
SOD	eritrociti, 1., 2., 3. trimester nosečnosti	16	30 nosečnic z DM1, 30 zdravih nosečnic, 30 zdravih nenosečih žensk v rodni dobi	značilno ↑ aktivnost SOD pri zdravih nosečnicah v primerjavi z nenosečimi ženskami; aktivnost SOD ↑ s tedni gestacije
SOD	eritrociti	17	39 žensk z normalno nosečnostjo, nenoseče ženske v rodni dobi	značilno ↑ aktivnost SOD v nosečnosti v primerjavi s skupino nenosečih žensk
SOD	popkovna kri-eritrociti, ob porodu	23	20 zdravih novorojenčkov majhnih za njihovo gestacijsko starost (38-40 tednov), rojenih podhranjenim materam (teža matere po nosečnosti <50kg) ter 20 zdravih novorojenčkov primerne velikosti za gestacijsko starost (38-40 tednov), rojenih zdravim materam	nivo SOD značilno ↓ pri novorojenčkih, ki so bili majhni za gestacijsko starost in rojeni podhranjenim materam
CAT	eritrociti	17	39 žensk z normalno nosečnostjo, nenoseče ženske v rodni dobi	značilno ↑ aktivnost CAT pri nosečnicah
GPx	eritrociti, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	aktivnost GPx ↑ v 3. trimesečju pri nosečnicah glede na nenoseče ženske
GPx	eritrociti, 1., 2., 3. trimester nosečnosti	16	30 nosečnic z DM, 30 zdravih nosečnic, 30 zdravih nenosečih žensk v rodni dobi	aktivnost GPx ↑ z gestacijo; najvišje vrednosti doseže v 3. trimesečju.
GPx	eritrociti, 1., 2., 3. trimester nosečnosti	19	10 nosečnic z DM1, 10 zdravih nosečnic, 10 nenosečih žensk	aktivnost GPx tekom nosečnosti ni značilno odstopala od vrednosti pri nenosečih ženskah
GPx	polna kri, plazma	20	49 zdravih nosečnic, 45 zdravih nenosečih žensk ustreznosti	po 20. tednu nosečnosti začne aktivnost GPx značilno ↓ glede na aktivnost GPx pri nenosečih ženskah
GPx	posteljica, ob porodu	39	12 preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom (28-36 teden nosečnosti), 16 preiskovank s porodom po 37. tednu nosečnosti	aktivnost GPx značilno ↑ v skupini preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom
GR	posteljica, ob porodu	39	12 preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom (28-36 teden nosečnosti), 16 preiskovank s porodom po 37. tednu nosečnosti	aktivnost GR značilno ↑ v skupini preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom
TAC	plazma, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	pred 30. tednom TAC značilno ↓ pri nosečnicah
TAC	serum, 3. trimester nosečnosti	41	14 nosečnic z zastojem rasti ploda, 18 zdravih nosečnic	TAC značilno ↓ v skupini preiskovank z zastojem rasti ploda

↑ - povišan, ↓ - znižan, SOD – superoksid-dismutaza, GPx – glutation-peroksidaza, GR – glutation-reduktaza, CAT – katalaza, GSH – glutation, TAC – celokupni antioksidantni status, DM – diabetes mellitus



Slika 2: Shematski prikaz izvora ROS in glavnih celičnih antioksidantnih poti.

Figure 2: Schematic presentation of sources of ROS and main cellular antioxidant pathways.

Superoksid-dismutaza katalizira dismutacijo $\text{O}_2^{\bullet -}$ v H_2O_2 ter O_2 . Baker (Cu) in cink (Zn) vsebujoča superoksid-dismutaza (Cu,Zn-SOD, SOD1) je dimerni protein, ki se nahaja v citoplazmi, medtem ko je mangan vsebujoča superoksid-dismutaza (Mn-SOD, SOD2) homotetramerni protein, ki je prisoten predvsem v mitohondrijih (slika 2). Zunajcelično pa najdemo SOD3, ki vsebuje Cu in Zn. Med normalno nosečnostjo je aktivnost SOD v plazmi in eritrocitih višja kot pri nenosečih ženskah ter narašča s tedni nosečnosti (preglednica 1) (13-17). Vse tri oblike encima se izražajo v tkivu posteljice, tako da je narasla aktivnost v materinem krvnem obtoku lahko posledica tega povečanega nastajanja SOD (13).

Glutation peroksidaza in katalaza uravnava nastali H_2O_2 . Katalaza je prisotna predvsem v peroksisomih. Encimsko molekulo sestavljajo večinoma štiri podenote, od katerih vsaka vsebuje hemske skupino, vezano na aktivno mesto. Katalaza odstranjuje H_2O_2 s pretvorbo v vodo in kisik. (15). Raziskava pri nosečnicah brez zapletov v primerjavi z zdravimi nenosečimi preiskovankami je pokazala porast aktivnosti CAT v polni krvi med nosečnostjo (preglednica 1) (17).

Glutation-peroksidaza je tetramerni protein, ki za svoje delovanje potrebuje kovinski ion selena (Se). Aktivnost GPx je odvisna od prisotnosti reducirane glutationa (GSH), ki je donor vodika. Glutation-peroksidaza katalizira reakcijo med reduciranim glutationom in vodikovim peroksidom. Pri tem nastajata voda in glutation disulfid (GSSG) (18).

Rezultati raziskav ekspresije in aktivnosti GPx v nosečnosti so si nasprotujoči. Nekatere študije so pokazale visoko raven GPx v posteljici in porast GPx v plazmi zdravih nosečnic v primerjavi z nenosečimi ženskami (13). Pri nosečnicah z normalnim potekom nosečnosti so ugotovili večjo aktivnost GPx v eritrocitih le v tretjem trimesečju v primerjavi s kontrolnimi nenosečimi ženskami v rodni dobi (preglednica 1) (14, 16). Starejši raziskavi pri nosečnicah brez zapletov v nosečnosti v primerjavi z nenosečimi preiskovankami pa sta pokazali

nespremenjeno aktivnost v plazmi ali celo znižano aktivnost v plazmi in eritrocitih proti koncu nosečnosti (preglednica 1) (19, 20).

3.2 Neencimski antioksidanti

Neencimske antioksidante vnašamo v telo kot vitamine s prehrano in s prehranskimi dopolnili. Kot esencialne snovi so pomembni tudi nekateri elementi v sledovih, ki sodelujejo pri tvorbi aktivnega mesta ali so sodejavniki opisanih antioksidantnih encimov.

Glutation je tiolni tripeptid in je glavni celični neencimski antioksidant. Sintetizira se v citosolu iz L-glutamata, L-cisteina ter glicina. Sodeluje pri detoksifikaciji številnih snovi in se s pomočjo GR in v prisotnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) regenerira nazaj do reducirane oblike (18). Meritve GSH v nosečnosti so pokazale znižano koncentracijo v plazmi ter povišano koncentracijo v eritrocitih (13).

Vitamin E je maščobotopen antioksidant iz družine tokoferolov. Najbolj aktivna oblika vitamina E je α -tokoferol, ki zagotavlja predvsem zaščito celičnih membran pred oksidacijo z ROS in lipidnimi radikali (1).

Vitamin C je vodotopen antioksidant, znan kot askorbinska kislina. Poleg neposrednega preprečevanja razširitve verižne reakcije v oksidativnih procesih, sodeluje tudi pri regeneraciji oksidirane vitamina E in GSH, zato ima z omenjenima antioksidantoma sinergistično delovanje (7).

4 Zapleti v nosečnosti in oksidativni stres

Za razvoj ploda je pomembno materino biokemično okolje (4). Mnoge raziskave so potrdile domnevo, da oksidativni stres matere med nosečnostjo vpliva na razvoj ploda in je vpleten v patološke izide nosečnosti (9). Asociacijo so pokazali predvsem med povečanim

oksidativnim stresom v uteroplacentnem okolju in motnjami placentacije. Povečane oksidativne poškodbe so prisotne pri pojavu preeklampsije

4.1 Preeklampsija

Preeklampsija je za nosečnost značilna bolezen, ki se kaže s hipertenzijo, edemi in proteinurijo matere. Izbruh bolezni povzroči okvara endotelija žil. Vzrok za nastanek je nenormalna placentacija oz. napačen materin odziv na nosečnost, čeprav etiologija preeklampsije ni dokončno pojasnjena. Motena je invazivnost trofoblastov, kar povzroči zmanjšanje uteroplacentne perfuzije, ishemijo in hipoksijo posteljice. Posledica teh stanj pa je tudi povečana tvorba ROS, ki še dodatno lahko vodijo do endotelne in vaskularne oksidativne poškodbe (4).

4.2 Zastoj v rasti ploda

Rezultati raziskav nakazujejo, da je oksidativni stres matere med nosečnostjo dejavnik tveganja za zastoj rasti ploda (ang. fetal growth restriction (FGR)) in nizko porodno težo (10, 21). O zastoju plodove rasti govorimo, če plod ne doseže svojega genetsko določenega rastnega potenciala in je njegova ocenjena teža pod 10. percentilo razporeditve porodnih tež za določeno gestacijsko starost. Ugotavljamo ga glede na krivulje rasti ploda za individualno populacijo (22). Zastoj rasti je lahko posledica materine bolezni (hipertenzija, kronična ledvična bolezen, prirojene srčne napake, anemija), neugodnih vplivov na intrauterino okolje (kajenje, alkohol) ali so vzroki plodovi (prirojene razvojne nepravilnosti, kromosomopatije, večplodna nosečnost). V 50% primerov ostaja etiologija neznana (23).

4.3 Ostali zapleti v nosečnosti

Oksidativni stres matere med nosečnostjo naj bi povečal tudi tveganje za prezgodnji porod, spontani splav, hipertenzijo in inzulinsko resistenco pri potomcu (9, 21, 24).

Natančna osnova patološkega oksidativnega stresa v nosečnostih z omenjenimi zapleti za zdaj še ni znana. Pri nagnjenosti k oksidativnemu stresu in zapletom v nosečnosti igrajo pomembno vlogo polimorfizmi v antioksidantnih encimih in nezadostni vnos mikronutrientov, predvsem Se (1). Vpliv na večjo tvorbo ROS ima tudi prisotnost metaboličnih nepravilnosti pri materi, kot na primer diabetes (4, 16).

5 Ocena oksidativnega stresa

Neposredno merjenje oksidativnega stresa pri človeku je zelo težavno, saj so kisikove zvrsti in radikali dokaj kratkoživi. Zato se uporablja predvsem merjenje produktov interakcij ROS z biološkimi makromolekulami. Za določevanje oksidativnega stresa ne zadostuje meritev samo enega biološkega označevalca, saj pri oksidativni poškodbi različnih organov oziroma pri različnih boleznih nastaja različno razmerje oksidativnih produktov (25).

5.1 Določanje poškodovanih proteinov

Ločimo dva načina določanja poškodovanih proteinov. Prvi način zajema meritev karbonilnih produktov, ki pa ne omogoča določitve, kateri aminokislinski ostanek se je oksidiral in kateri protein je bil modificiran. Z neposredno oksidacijo aminokislinskih ostankov, predvsem lizina, arginina, histidina in prolina, nastanejo proteini s karbonilnimi skupinami. Proteini s karbonilno skupino so kemično stabilni označevalci

oksidativnega stresa. V krvi so prisotni dalj časa kot drugi oksidirani produkti. Za določanje proteinov s karbonilnimi skupinami največkrat uporabljamo spektrofotometrično analizo metodo z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNFH). Pri tej metodi z derivatizacijo karbonilne skupine z DNFH tvorimo stabilni 2,4-dinitrofenilhidrazon, ki ga lahko zaznamo na različne načine. Sam dinitrofenilhidrazon absorbira ultravijolično svetlobo in ga lahko določimo spektrofotometrično pri 370 nm. Spektrofotometrično DNFH metodo pa lahko združimo s proteinsko frakcionacijo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), eno- ali dvo-dimenzionalno elektroforezo ter prenosom Western, kar poveča občutljivost in specifičnost metode (11).

Drugi način meritev pa zajema metode, ki zaznavajo specifične spremembe posameznih aminokislin. Ena glavnih tarč oksidacije proteinov je aminokislina tirozin. Določamo lahko njene različne derivate, ki nastajajo odvisno od tipa radikala: nitrotirozin, ditirozin (11). Največkrat uporabljana metoda za analizo slednjih označevalcev oksidativnega stresa v bioloških tekočinah in tkivih je encimsko imunski test (ELISA). Nitrotirozin v biološkem materialu in humani plazmi lahko uspešno določamo tudi s sklopitvijo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS) ali plinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (GC-MS/MS). Bazalne vrednosti dobljene s to metodo služijo kot referenčne vrednosti za nitrotirozin. Ker pa se izmerjene vrednosti nitrotirozina med posameznimi študijami zelo razlikujejo, predvidevajo, da nitrotirozin nastaja tudi ex-vivo med pripravo vzorca in njegovo analizo. Ditirozin ima ugodno lastnost, da se nemetaboliziran izloča v urin, kjer ga lahko določamo kot neinvazivni marker proteinske oksidacije z LC-MS/MS (26).

5.2 Določanje lipidne peroksidacije

Prisotnost lipidne peroksidacije lahko ocenimo z določanjem konjugiranih dienov, produktov preureditve kemijskih vezi po interakciji nenasičenih maščobnih kislin z radikali, z določanjem primarnih produktov peroksidacije (lipidnih hidroperoksidov) ali z določanjem različnih sekundarnih produktov (malondialdehid, 4-hidroksinonenal, heksanoil lizin) (12). Malondialdehid (MDA) je dokazano mutagen in z bazami nukleinskih kislin tvori komplekse (5). Njegovo določanje temelji na nastanku obarvanega kompleksa MDA-tiobarbiturna kislina (TBA). Nastanek kompleksa poteka pri povišani temperaturi v kislem mediju. Količino obarvanega produkta določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 532 nm. Problem je nespecifičnost metode, saj se pri lipidni peroksidaciji tvorijo tudi drugi aldehidi, ki reagirajo s TBA in imajo podobno območje absorbance. Pri interpretaciji rezultatov se zato uporablja izraz »s TBA reagirajoče snovi« (TBARS) (12, 27). Specifičnost določitve MDA se lahko poveča z uporabo različnih separacijskih tehnik, npr. HPLC (28).

Pri določanju produktov lipidne peroksidacije v nosečnosti je večina raziskav pokazala, da je njihova raven v polni krvi in plazmi povečana (preglednica 2) (14, 16). Lipidna peroksidacija poteka predvsem v posteljici. Oksidativni produkti se nato iz posteljice prenesajo v materine placentne vene, kar povečuje koncentracijo teh produktov v materinem krvnem obtoku. Do drugega trimesečja je koncentracija produktov lipidne peroksidacije v krvi matere narasla za 10 do 50% (12). Novejša raziskava, v katero je bilo vključenih 31 zdravih nosečnic v prvem trimesečju in 29 nenosečih zdravih ženskah je pokazala prisotnost MDA in TBARS v obeh skupinah. Raven MDA je bila povišana pri nosečnicah,

TBARS pa v skupini nenosečih žensk, kar ni v skladu s predhodnimi raziskavami (preglednica 2) (29). K povečanju nastanka TBARS v polni krvi prispeva prisotnost diabetesa matere (preglednica 2) (16). Serumske in urinske koncentracije MDA so bile povišane pri nosečnostih z zastojem rasti ploda glede na kontrolno skupino zdravih nosečnic (preglednica 2) (10, 30). Povečano lipidno peroksidacijo v posteljici pa so opazili pri nosečnicah s preeklampsijo (8).

Statusa lipidne peroksidacije ne bi smeli vrednotiti samo na podlagi zgoraj omenjenih označevalcev, saj se lipidni hidroperoksidi in aldehidi lahko absorbirajo v telo tudi iz prehrane, zato bi bilo smiselno, da bi se prehrano ob določanju teh snovi nadzorovalo (25). Boljši označevalci lipidne peroksidacije v organizmu so izoprostani.

Izoprostani nastajajo z neencimsko, z radikali katalizirano peroksidacijo fosolipidov oziroma arahidonske kisline. Nastane serija izomerov, ki

vsebujejo prostanski obroč. Intermediat pri nastanku so prostaglandinu- H_2 podobne spojine, ki se reducirajo do F_2 -izoprostanov. V organizmu pa prihaja tudi do preureditve in tvorbe E_2 , D_2 , A_2 in J_2 -izoprostanov, izotromboksanov in izoketalov. Na začetku so izoprostani esterificirani na fosfolipidih in se kasneje po delovanju fosfolipaz sprostijo kot prosta oblika. Najpogostejše določamo 8-izoPGF_{2α} izomero izoprostanov, ki ima mnogo prednosti pred ostalimi produkti lipidne peroksidacije, saj je kemično zelo stabilna in je v zaznavnih količinah prisotna v vseh tkivih in bioloških tekočinah. 8-izoPGF_{2α} ima tudi biološko aktivnost, saj deluje kot renalni in pulmonalni vazokonstriktor (31). Referenčna analitična metoda za merjenje izoprostanov je plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS), čeprav je dokaj draga in zamudna (8, 30). Večkrat se kot metoda za kvantifikacijo uporabi kvantitativna metoda ELISA (14, 32). V nosečnosti se koncentracija F_2 -izoprostanov v urinu značilno poviša v primerjavi z nenosečimi ženskami predvsem v zadnjem

Preglednica 2: Pregled nekaterih raziskav, ki so preučevale označevalce oksidativne poškodbe lipidov v zdravi nosečnosti in v nosečnosti z različnimi zapleti.

Table 2: Summary of some studies of markers of lipide damage in healthy and high-risk pregnancy.

OZNAČEVALEC	KJE, KDAJ	REFERENCA	POPULACIJA, VELIKOST VZORCA	REZULTATI
TBARS	eritrociti, 1., 2., 3. trimester	16	30 nosečnic z DM, 30 zdravih nosečnic, 30 zdravih nenosečih žensk v rodni dobi	nivo TBARS značilno ↑ pri nosečnicah v 3. trimesečju glede na nenoseče preiskovanke; v skupini nosečnic z DM nivo TBARS celotno nosečnost značilno ↑ glede na normalno nosečnost
MDA, TBARS	urin, 1. trimester	29	31 zdravih nosečnic (18-45 let), zdrave nenoseče ženske (18-45 let)	MDA značilno ↑ v skupini nosečnic, TBARS ↑ v skupini nenosečih preiskovank
MDA	urin, 24.-28. teden nosečnosti	10	prospektivna študija 272 nosečnic, starih 24-28 let	velikost novorojenčka se ni značilno razlikovala med nizkim in visokim MDA nivojem (presečna vrednost nivojev je 75. percentil)
MDA	urin, ob koncu prve faze poroda	30	261 nosečnic, razdeljenih v skupine glede na porodno težo otroka, prezgodnji porod	MDA ↑ v urinu nosečnic s prezgodnjim porodom ter z nizko porodno težo otroka
izoprostani	plazma, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	značilno ↑ pri nosečnicah, glede na nenoseče ženske v 37-41. tednu nosečnosti
izoprostani	urin, 12.-16. teden nosečnosti	21	prospektivna študija pri 508 nosečnicah; razdeljene so bile v skupine glede koncentracijo označevalca ter izid oz. potek nosečnosti: preeklampsija, nizka porodna teža, prezgodnji porod	izoprostani v urinu povezani z večjim tveganjem za nastanek preeklampsije
izoprostani	amnijska tekočina, 15.-18. teden nosečnosti	32	122 nosečnic, ki so prišle na amniocentezo v 15.-18. tednu nosečnosti (18-40 let), razdeljene v skupine glede na porodno težo otroka	↑ koncentracija izoprostanov v amnijski tekočini pri nosečnostih z zastojem rasti ploda

↑ - povišan, ↓ - znižan, MDA – malondialdehid, TBARS – s tiobarbiturno kislino reagirajoče snovi, DM – diabetes mellitus

trimesečju nosečnosti (preglednica 2) (14). Koncentracija je sorazmerna s količino adipoznega tkiva matere (32). Prospektivna raziskava s 508 vključenimi nosečnicami je pokazala, da se koncentracija F_2 -izoprostanov v urinu dodatno poveča v primeru pojava preeklampsije (preglednica 2) (21). Domnevo, da se povišan oksidativni stres v povezavi z zastojem rasti ploda pojavi že v zgodnji nosečnosti, so potrdile povišane koncentracije F_2 -izoprostanov v amnijski tekočini v začetku 2. trimesečja pri 37 nosečnicah z IUGR (preglednica 2) (32).

5.3 Določanje oksidacije DNK

Med purinskimi in pirimidinskimi bazami je gvanin najbolj dovzeten za oksidacijo. Pri oksidativnem napadu OH^* se največkrat na 8. mesto gvaninske molekule doda hidroksilna skupina, ki povzroči nastanek produkta 8-hidroksidegvanozina (8-OHdG), ki omogoča ovrednotenje oksidativne okvare DNK. Oksidirane nukleinske baze so dokaj topne v vodi in se brez predhodnega metabolizma izločijo v urin (33). 8-OHdG pa lahko določamo tudi v serumu in tkivu. Za kvantitativno določitev se največkrat uporablja kompetitivna metoda ELISA ali kombinacija kromatografske tehnike z masno spektrometrijo (6, 8, 10, 28).

Koncentracija 8-OHdG v urinu je značilno povišana pri kadilcih (6). V normalni nosečnosti brez zapletov je količina 8-OHdG v urinu značilno povišana predvsem v 3. trimesečju in v zgodnji fazi poroda (preglednica 3) (14). Povišano koncentracijo v primerjavi z nosečnicami brez zapletov pa so opazili tudi v urinu nosečnic, ki so kasneje imele prezgodnji porod ali so rodile otroka z nizko porodno težo (preglednica 3) (6, 10, 21, 30). V tkivu posteljice so ugotovili povišano raven 8-OHdG, kadar se je preeklampsiji pridružil še intrauterini zastoj plodove rasti (preglednica 3) (34).

5.4 Določanje statusa antioksidantov

Sposobnost obrambe telesa pred ROS lahko merimo z statusom posameznih antioksidantov ali kot celokupno vsoto vseh antioksidantnih snovi.

Izražanje encimov v določenem tkivu (npr. posteljici) lahko spremljamo z analizo ekspresije genov, ki kodirajo za izbrani encim, a največkrat pa določamo aktivnost encima. Aktivnost SOD merimo na podlagi merjenja inhibicije reakcije med 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazol kloridom in superoksidnim radikalom, ki nadzorovano nastaja iz ksantina

Preglednica 3: Pregled nekaterih raziskav, ki so preučevale označevalce poškodbe DNK v zdravi nosečnosti in v nosečnosti z različnimi zapleti.

Table 3: Summary of some studies of markers of DNA damage in healthy and high-risk pregnancy.

OZNAČEVALEC	KJE, KDAJ	REFERENCA	POPULACIJA, VELIKOST VZORCA	REZULTATI
8-OHdG	urin, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	značilno ↑ pri nosečnicah, glede na nenoseče ženske v 26-30. tednu nosečnosti
8-OHdG	urin, 12. ter 28. teden nosečnosti	6	55 nosečnic (18-40 let) z otroki z nizko porodno težo, 55 nosečnic (18-40 let) z otroki s primerno porodno težo	8-OHdG v 12. in 28. tednu nosečnosti značilno ↑ v skupini nosečnic z otroki z nizko porodno težo
8-OHdG	urin - 24-28. tednov nosečnosti, posteljica - ob porodu	10	prospektivna študija 272 nosečnic, starih 24-28 let, analiza placente pri 59 nosečnicah	8-OHdG v urinu ter posteljici značilno povezan z velikostjo otroka ob porodu
8-OHdG	urin, 12.-16. teden nosečnosti	21	prospektivna študija pri 508 nosečnicah, razdeljene so bile v skupine glede koncentracijo označevalca ter izid oz. potek nosečnosti: preeklampsija, nizka porodna teža, prezgodnji porod	8-OHdG v urinu povezan z nižjo porodno težo in nižjo gestacijsko starostjo ob porodu; s preeklampsijo niso našli značilne povezave
8-OHdG	urin, ob koncu prve faze poroda	30	261 nosečnic, razdeljenih v skupine glede na porodno težo otroka, prezgodnji porod	8-OHdG je bil ↑ v urinu nosečnic s prezgodnjim porodom ter z nizko porodno težo
8-OHdG	posteljica, ob porodu	34	18 nosečnic z zdravo nosečnostjo, 17 nosečnic s preeklampsijo brez IUGR, 18 nosečnic s preeklampsijo z IUGR	Značilno ↑ nivo 8-OHdG v posteljici nosečnic z preeklampsijo z IUGR

↑ - povišan, ↓ - znižan, 8-OHdG – 8-hidroksidegvanozin, SOD – superoksid-dismutaza, GPx – glutation-peroksidaza, GR – glutation reduktaza, CAT – katalaza, GSH – glutation, TAC – celokupni antioksidantni status, DM – diabetes mellitus

s ksantin-oksidazno katalizo. Superoksid-dismutaza inhibira nastanek formazanskega barvila, kateremu merimo absorbanco pri 505 nm (35).

Metoda za merjenje GPx temelji na katalizi oksidacije glutationa s kumen peroksidom. V prisotnosti GR in NADPH se oksidirani glutation takoj pretvori v reducirano obliko s sočasno oksidacijo NADPH v NADP⁺, ki povzroči padec absorbance pri 340 nm (36).

Zadnji del postopka služi tudi kot metoda za merjenje aktivnosti glutation-reduktaze (37).

Za merjenje aktivnosti katalaze se uporablja preprosta spektrofotometrična metoda, ki meri padec absorbance, oziroma koncentracije vodikovega peroksida ob prisotnosti katalaze pri 240 nm (38).

Znižanje izražanja SOD mRNA v posteljici ter nižjo aktivnost encima v eritrocitih in posteljici so opazili pri preeklampsiji (8, 13), diabetesu (16) ter spontanih splavih (15). Pri zastoju plodove rasti pa je bila aktivnost encima nižja v eritrocitih popkovne krvi novorojenčkov, ki so bili premajni za gestacijsko starost in rojeni podhranjenim materam (preglednica 1) (23). V posteljici prezgodaj rojenih otrok so ugotovili povišano raven GPx in GR (preglednica 1) (39), pri preeklampsiji pa je bila povišano raven GPx, GSH in CAT (8). V raziskavi oksidativnega stresa v nosečnosti je skupina 30 nosečnic z diabetesom imela značilno povišano aktivnost CAT v eritrocitih v zadnjem trimesečju nosečnosti v primerjavi s skupino 30 zdravih nosečnic. V isti skupini nosečnic z diabetesom pa se je aktivnost GPx v eritrocitih v zadnjem trimesečju zmanjšala v primerjavi z 2. trimesečjem, kar bi bilo lahko povezano s komplementarnim povečanjem aktivnosti CAT (preglednica 1) (16).

Poleg posameznih antioksidantov lahko merimo tudi celokupni antioksidantni status (ang. total antioxidant capacity, TAC). Prednost tega pristopa je, da izmerimo aktivnost vseh prisotnih antioksidantov v biološkem vzorcu. Za določanje TAC je najpogosteje uporabljena metoda FRAP (ang. ferric reducing ability of plasma), ki temelji na merjenju redukcije železa ob prisotnosti antioksidantov. Reducirani ioni železa (Fe²⁺) reagirajo z 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ). Nastane modro obarvan kompleks z absorbanco pri 593 nm (14, 40). Pri nosečnosti brez zapletov je bil TAC v plazmi do 30. tedna nosečnosti nižji kot pri nenosečih ženskah, po 30. tednu značilno povišan (14), v serumu nosečnic z IUGR pa značilno znižan (preglednica 1) (41).

6 Sklep

Pogosti zapleti v nosečnosti nas spodbujajo k iskanju vzrokov in označevalcev za napovedovanje tveganja in lažje prepoznavanje teh zapletov. Meritve posameznih označevalcev so pokazale, da ima oksidativni stres v nosečnosti in pri nekaterih njenih zapletih pomembno vlogo. Novi raziskovalni izzivi temeljijo na iskanju novih informacij v zvezi s fiziološkimi stanjem oksidativnega stresa v nosečnosti, sodelovanjem oksidativnega stresa v patofizioloških procesih različnih zapletov v nosečnosti, preprečevanjem teh z različnimi antioksidanti ter z razvojem novih diagnostičnih metod za čim boljšo oceno oksidativne okvare. Z raziskavami bi bilo smiselno ovrednotiti tudi oksidativni stres v neposrednem plodovem okolju (amnijska tekočina) in ga primerjati s spremembami v krvi in urinu matere. V primeru dobre korelacije označevalcev med materinim in plodovim okoljem, bi ti izsledki lahko pripomogli k razvoju novih neinvazivnih metod na področju spremljanja oksidativnega statusa ploda in njegovega razvoja med nosečnostjo.

7 Literatura

1. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2011; 25: 287-299.
2. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. Semin Fetal Neonatal Med 2010; 15: 186-190.
3. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. J Anat 2009, 215: 27-35.
4. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. Hum Reprod Update 2006; 12: 747-155.
5. Valo M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.
6. Potdar N, Singh R, Mistry V et al. First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for gestational-age fetus. BJOG 2009; 116: 637-642.
7. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive Biol Endocrinol 2005, 3: 28.
8. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in placenta. Histochem Cell Biol 2004, 122: 369-382.
9. Dennery PA. Oxidative stress in development: Nature or nurture? Free Radic Biol Med 2010; 49: 1147-1151.
10. Min J, Park B, Kim YJ et al. Effect of Oxidative Stress on Birth Size: Consideration of Window from Mid Pregnancy to Delivery. Placenta 2009; 30: 418-423.
11. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003; 329: 23-38.
12. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. Reprod Toxicol 1999; 13: 347-352.
13. Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. ANZJOG 2006; 46: 77-83.
14. Hung TH, Lo LM, Chiu TH et al. A Longitudinal Study of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Women With Uncomplicated Pregnancies Throughout Gestation. Reprod Sci 2010; 17: 401-409.
15. Jenkins C, Wilson R, Roberts J et al. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. Antioxid Redox Signal 2000; 2: 623-628.
16. Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A et al. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. J Matern Fetal Neonatal Med 2004; 16: 367-372.
17. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB et al. Oxidative stress and antioxidant defences in pregnant women. Redox Rep 2011; 16: 230-236.
18. Knapen M, Zusterzeel PL, Peters WH. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1999; 82: 171-184.
19. Carone D, Loverro, Gereco P, Capuano F. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1993; 51: 103-109.
20. Zachara BA, Wardak C, Didkowski W et al. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. Gynecol Obstet Invest 1993; 35: 12-17.
21. Stein TP, Scholl TO, Schuller MD et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. Free Radic Res 2008; 42(10): 841-848.
22. Geršak K, Ismaili H, Kavšek G. Uspešnost prenatalnega odkrivanja zastoja plodove rasti. Zdrav Vestn 2010; 79: 690-697.
23. Gupta P, Narang M, Banerjee BD. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. BMC Pediatr 2004; 4: 14.
24. Maulik D. Fetal growth restriction: the etiology. Clin Obstet Gynecol 2006; 49: 228-235.
25. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? BJP 2004; 142: 231-255.
26. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R et al. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. Clin Chem 2006; 52: 601-623.
27. Gupta S, Agarwal A, Banerjee J et al. The Role of Oxidative Stress in Spontaneous Abortion and Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review. Obstet Gynecol Surv 2007; 62: 335-347.

28. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998; 108: 101-106.
29. Jakovljevic B, Novakov-Mikic A, Brkic S et al. Lipid peroxidation in the first trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; posted online on Nov 24: 1-3.
30. Kim YJ, Hong YC, Lee KH et al. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 2005; 19: 487-492.
31. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. II. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18: 1791-1800.
32. Longini M, Perrone S, Kenanidis A et al. Isoprostanes in amniotic fluid: A predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1537-1541.
33. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339 (1-2): 1-9.
34. Wiktor H, Kankofer M, Schmerold I et al. Oxidative DNA damage in placenta from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Virchows Arch* 2004; 445:74-78.
35. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
36. Paglia DE, Valentine WN. Study on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158- 69.
37. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In Bergmeyer HU ed. *Methods Enzymol* Basel Verlag Chemie 1983; 3: 258-265.
38. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
39. Prokopenko VM, Partsalis GK, Pavlova NG et al. Glutathione-Dependent System of Antioxidant Defense in the Placenta in Preterm Delivery. *Bull Exp Biol Med* 2002; 133: 442-443.
40. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of »Antioxidant Power«: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
41. Toy H, Camuzcuoglu H, Arioz DT. Serum prolidase activity and oxidative stress markers in pregnancies with intrauterine growth restricted infants. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 1047-1053.

6. Simpozij Homeopatske sekcije
Sobota, 6. oktober 2012
Fakulteta za farmacijo v Ljubljani

HOMEOPATIJA V SLOVENSKIH LEKARNAH

DOPOLDAN

Tanja Šegula, mag.farm.

HOMEOPATSKA LEKARNA ZA SAMOZDRAVLJENJE

Pregled osnovnih homeopatskih zdravil

Homeopatska potovalna lekarna

Pregled težav in zdravljenja (bolezen/homeopatsko zdravilo)

Zanimivi primeri terapije iz lekarniške prakse

POPOLDAN

Dr. Maruša Hribar, mag.farm.

PSIHIČNE TEŽAVE V HOMEOPATJI

Stres, fobije

»Burn out sindrom«

Nemirni otroci

Primeri iz prakse

Dodatne informacije in prijava:

www.sfd.si

Spremljanje neželenih učinkov zdravil

Monitoring of adverse drug reactions

Jan Schmidt, Alenka Šmid, Irena Mlinarič-Raščan

Povzetek: Zagotavljanje varnih in učinkovitih zdravil zahteva neprestano spremljanje neželenih učinkov in neželenih dogodkov, do katerih prihaja pri zdravljenju z njimi. V ta namen je vzpostavljen sistem farmakovigilance, ki se poslužuje celotnega pristopa za spremljanje, vrednotenje in preprečevanje neželenih učinkov zdravil. Kljub naglemu razvoju *in vitro* toksikoloških metod za odkrivanje toksičnosti učinkovin, testiranj na živalih in ljudeh je nekatere neželene učinke nemogoče napovedati. V vsej svoji razsežnosti se pokažejo namreč šele v postmarketinškem obdobju, ko je zdravilo dostopno večjemu številu bolnikov. Znanih je več različnih klasifikacij neželenih učinkov, ki opredeljujejo resnost in pričakovanost pojava ter mehanizme delovanja. Področje farmakovigilance je zakonsko urejeno in pod nadzorom regulativnih organov. Zakonodaja in smernice sledijo novim spoznanjem in izkušnjam na področju varnosti zdravil.

Ključne besede: farmakovigilanca, klasifikacija neželenih učinkov, zakonodaja

Abstract: Pharmacovigilance is a set of methods intended for the monitoring, evaluation and prevention of adverse drug reactions. Despite rapid development in the field of new *in vitro* toxicological methods used for assessing toxicity of active compounds and testing on animals and humans, it is impossible to predict all such reactions. The whole spectrum of adverse drug reactions is revealed when a medicine is being used by a larger number of people during the post-marketing phase. Adverse drug reactions are classified according to seriousness, expectedness and type of reaction mechanism. It is very important that pharmacovigilance legislation develops in line with new knowledge and data on drug safety.

Keywords: pharmacovigilance, classification of adverse drug reactions, legislation

1 Uvod

Farmakovigilanca je sistem ugotavljanja, vrednotenja in odzivanja na nova spoznanja o neželenih učinkih in drugih varnostnih vidikih zdravila, ko so ta že na trgu.

Tragična izkušnja s teratogenim delovanjem talidomida v petdesetih in začetku šestdesetih let prejšnjega stoletja, ki se je uporabljal kot učinkovit sedativ in zdravilo proti bolečinam, je imela izjemno velik vpliv na razvoj sodobne farmakovigilance. Zaradi antiemetičnih lastnosti ga je za lajšanje simptomov jutranje slabosti jemalo veliko število nosečnic. Teratogenost talidomida je bila dokazana z zamikom več let. Novorojenčki mater, ki so bile izpostavljene zdravilu, so se rojevali z nepravilno razvitimi okončinami. Zdravilo je prišlo na trg leta 1957, najprej v Nemčiji. Do leta 1961, ko je bilo umaknjeno s tržišča, je bilo dostopno v približno 50-ih državah, prizadetih naj bi bilo 10.000 otrok. Dokazana incidenca je bila med 20 in 30 %, tudi po zaužitju enkratnega odmerka zdravila med 4. in 7. tednom nosečnosti. Pojav teratogenih učinkov talidomida je zasejal dvom o varnosti zdravil, kar je spodbudilo ustanavljanje regulativnih organov, ki so pripravili smernice za ustrezno, zadostno in učinkovito testiranje novih zdravil tako v laboratoriju kot v klinični praksi. Pred tem področje spremljanja neželenih učinkov ni bilo nadzorovano. Testiranje in razvoj zdravil sta bila povsem v rokah farmacevtske industrije (1).

2 Opredelitev neželenih učinkov zdravil

Vsako zdravilo ima poleg svojega koristnega in želenega učinka tudi neželene učinke. **Neželen učinek zdravila** (*angl. adverse drug reaction*) je vsak neželen in škodljiv odziv na zdravilo, ki ga je bolnik prejel v pravilnem odmerku za preprečevanje, diagnostiko ali zdravljenje bolezni oziroma spremembo fiziološke funkcije. V to skupino ne spadajo škodljivi učinki, ki so posledica napak pri predpisovanju ali jemanju zdravila. Med neželene učinke zdravil tudi ne uvrščamo namernih in nenamernih zastrupitev. **Resen neželen učinek zdravila** (*angl. serious adverse drug reaction*) je vsak neželen učinek zdravila, katerega posledica je smrt, neposredna življenjska ogroženost, invalidnost, sprejem v bolnišnico, podaljšanje zdravljenja v bolnišnici ali prirojena napaka. **Stranski učinek zdravila** (*angl. side effect*) je neželen učinek zdravila, za katerega pa ni nujno, da je zdravju škodljiv (npr. anksiolitičen učinek zaviralcev adrenergičnih receptorjev beta, ki se uporabljajo za zdravljenje hipertenzije). Pojem **toksični učinek** (*angl. toxic effect*) pomeni zdravju škodljiv učinek, ki je običajno posledica previsokih koncentracij zdravila v krvi (1, 2).

Neželeni učinki zdravil so vse večji zdravstveni problem in so vzrok pomembnega deleža napotitev bolnikov v urgentne internistične

ambulante. V Ljubljani je na interne oddelke mestne in terciarne bolnišnice zaradi neželenih učinkov zdravil sprejetih 5,8 % bolnikov, kar je primerljivo z evropskimi raziskavami. Na pregled v internistično urgentno ambulantno je napotenih 3,7 % bolnikov. Kot zanimivost naj omenimo, da so bili pri bolniških napotitvah v urgentne internistične ambulate najpogostejši neželeni učinki zdravil naslednji: srčno-žilni (40%), prebavni (24%), presnovni (11 %) in živčni zapleti (11 %). Najpogostejši klinični znaki so bili predvsem sinusna bradikardija (19 %), hipotenzija (13 %), sinkopa (11 %) in krvavitev v prebavno cev (8 %) (3).

Nepričakovani neželeni učinki zdravil (*angl. unexpected adverse drug reactions*) so tisti, katerih narava, resnost ali posledice niso v skladu z veljavnim povzetkom glavnih značilnosti zdravila, ki je del dovoljenja za promet z zdravilom. **Neželeni dogodki** (*angl. adverse events*) so neželeni pojavi, ki nastanejo v času uporabe zdravil, vendar nimajo nujno vzročne povezave z zdravilom (1). Informacije o neželenih dogodkih se zbirajo predvsem med kliničnimi študijami, ko med samim dogodkom in uporabo zdravila še ni jasne vzročne povezave (1, 2, 3).

3 Klasifikacija neželenih učinkov

Najosnovnejša in obenem najstarejša klasifikacija po Rawlinsu in Thompsonu razlikuje dve glavni skupini neželenih učinkov zdravil: reakcije, odvisne od odmerka (tip A), ter reakcije, neodvisne od odmerka (tip B) (2).

Reakcije tipa A potekajo po znanih farmakoloških mehanizmih in so odvisne od jakosti odmerka. Ob ukinitvi ali zmanjšanju odmerka so reverzibilne. Reakcije tipa B so nepredvidljive (na osnovi poznanih farmakoloških mehanizmov jih ne moremo napovedati), ne kažejo enostavne odvisnosti odziva od jakosti odmerka in jih na osnovi živalskih modelov ni mogoče napovedati. Reakcije tipa A so najbolj razširjene, saj predstavljajo kar 80 % vseh reakcij. Reakcije tipa B so sicer manj pogoste, vendar je njihov potek pogosto nevarnejši, delež smrtnih izidov pa veliko večji (1, 2).

S pomočjo novejših spoznanj na področju toksikoloških mehanizmov je prišlo do razširitve prvotne klasifikacije z uvedbo dodatnih tipov reakcij: reakcije, odvisne od odmerka in časa (tip C), reakcije, odvisne od časa (tip D), odtegnitvene reakcije (tip E) ter neučinkovita terapija kot šesta

Tabela 1: Klasifikacija neželenih učinkov zdravil (5, 6).

Table 1: Classification of adverse drug reactions (5, 6).

TIP	LASTNOSTI	PRIMERI	UKREPANJE
A	• Pogoste • Povezane s farmakološkim delovanjem zdravil • Dobra napoved • Nizka smrtnost	• Toksični učinki: toksičnost digoksina; serotoninški sindrom • Stranski učinki: antiholinergični učinek tricikličnih antidepresivov	• Zmanjšanje odmerka ali prekinitev • Preučiti učinke vzporedne terapije
B	• Redke • Brez vzročne povezave s farmakološkim delovanjem zdravila • Slaba napoved • Visoka smrtnost	• Idiosinkratske reakcije: preobčutljivost na peniciline, akutna porfirija, maligna hipertermija, pseudoalergija	• Prekinitev
C	• Redke • Povezane s kumulativnim odmerkom	• Supresija hipotalamične-hipofizne-nadledvične osi z jemanjem kortikosteroidov	• Zmanjšanje odmerka ali prekinitev; postopno ukinjanje odmerka
D	• Redke • Se pojavijo ali postanejo klinično opazne šele čez čas po uporabi zdravila	• Teratogeneza (vaginalni adenokarcinom z dietilstilbestrolom) • Karcinogeneza • Tardivna diskinezija	• Pogosto jih ne moremo obvladovati
E	• Redke • Se pojavijo kmalu po prekinitvi uporabe zdravila	• Opiatni odtegnitveni sindrom • Miokardna ishemija (odtegnitev β-blokatorjev)	• Uvesti in odtegniti postopoma
F	• Pogoste • Odvisne od odmerka • Pogosto posledica interakcij med zdravili	• Nežadostno odmerjanje peroralnih kontraceptivov, predvsem kadar se uporabljajo skupaj z induktorji citokromov	• Povečanje odmerka • Preučiti učinke vzporedne terapije

Legenda: tip reakcije; A, odvisne od odmerka; B, neodvisne od odmerka; C, odvisne od odmerka in časovno odvisne; D, časovno odvisne; E, odtegnitvene reakcije; F, neučinkovita terapija.

Legend: type of reaction; A, dose dependent; B, dose independent; C, dose and time dependent; D, time dependent; E, withdrawal reactions; F, therapy failure.

kategorija (tip F). Razširjena klasifikacija je prikazana v tabeli 1, kjer so opisane lastnosti, primeri neželenih reakcij in zdravstveni ukrepi za njihovo preprečitev glede na posamezen tip reakcije (4, 5, 6).

4 Reakcije tipa A

Neželeni učinki tipa A so posledica primarnih in sekundarnih farmakoloških karakteristik zdravila. Primer je zdravljenje z zaviralci adrenergičnih receptorjev beta. Primarni farmakološki učinek je zmanjšanje srčne frekvence in se nanaša na terapevtsko indikacijo zdravila (učinek spojine v tarčnem tkivu – srce). Sekundarna farmakološka lastnost je indukcija bronhospazma (učinek spojine ni v tarčnem tkivu – bronhioli) in predstavlja nenamerno spremljevalno škodo, ki jo povzroči zdravilo. Podoben primer lahko zasledimo pri uporabi širokospektralnih antibiotikov (predvsem cefalosporinov in klindamicina), ki povzročajo spremembo črevesne flore in povečajo tveganje za razvoj toksičnih bakterijskih vrst npr. *Clostridium difficile*, zaradi česar bolniki posledično razvijejo pseudomembranozni kolitis. V predkliničnih testiranjih je zelo pomembno raziskovanje sekundarnih farmakoloških lastnosti učinkovin in njihovo natančno poznavanje, saj se na ta način izognemo poznejšim zapletom v kliničnih fazah testiranja. Napredek v molekularni biologiji je razkril obstoj ogromnega števila podvrst receptorjev, kar odpira možnost razvoja selektivnejših in varnejših učinkovin (2, 7, 8).

Tabela 2: Dejavniki, ki vplivajo na farmakološke neželene učinke (2).

Table 2: Factors with impact on pharmacological adverse effects (2).

FAKTOR	MEHANIZEM	PRIMER	TOKSIČNOST
Farmacevtska oblika	Povečanje biološke uporabnosti zaradi spremembe v farmacevtski obliki	Fenitoin	Toksičnost fenitoina (ataksija, nistagmus)
Genetski polimorfizmi	Zmanjšano izločanje preko jeter zaradi polimorfizma gena za CYP2D6	Metoprolol	Bradikardija
Patološke spremembe v telesu	Zmanjšana eliminacija ob ledvični okvari	Digoksin	Toksičnost digoksina (navzeja, aritmija)
Medsebojne interakcije zdravil	Zavirano izločanje litija iz telesa	Litij in nesteroidni protivnetni analgetiki	Toksičnost litija

Tabela 3: Primeri nekaterih znanih idiosinkratskih reakcij (2, 9, 10).

Table 3: Examples of some known idiosyncratic reactions (2, 9, 10).

PRIMERI NEŽELENIH UČINKOV	ZDRAVILA
Hemoliza pri pacientih s pomanjkanjem encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza	Primakin
Periferne nevropatije pri počasnih acetilatorjih	Izoniazid
Anafilaksije	Penicilini
Jetrna toksičnost	Izoniazid + rifampicin
Jetrna toksičnost	Halotan
Granulocitopenija z anemijo	Trimetoprim + sulfametoksazol
Supresija kostnega mozga	6-merkaptopurin
Jetrna toksičnost	Troglitazon
Kožne reakcije	Nevirapin

Med dejavnike, ki vplivajo na farmakološke neželene učinke prištevamo: velikost odmerka, farmacevtsko obliko, genetske razlike med posamezniki (polimorfizmi v genih za metabolične encime), patofiziološke spremembe v telesu ter interakcije med zdravili. Primere različnih dejavnikov povzema Tabela 2. Do reakcij tipa A torej lahko pride takrat, kadar plazemske koncentracije presežejo terapevtsko okno, prav tako se lahko pojavijo neželeni učinki tipa A v mejah normalne plazemske koncentracije, če se pri posamezniku poveča občutljivost tarčne molekule (receptorji, encimi ...) (2).

5 Reakcije tipa B

Med reakcije tipa B uvrščamo tiste neželene učinke, ki niso povezani s farmakološkim delovanjem zdravila. V literaturi pogosto zasledimo uporabo termina idiosinkratske reakcije (*idiosinkrasia*, gr. posebnost posameznika). Njihovi glavni značilnosti sta nepredvidljivost in neodvisnost od prejetega odmerka zdravila. V predkliničnih in kliničnih fazah razvoja se redko pojavljajo. Njihovo preučevanje še dodatno otežuje dejstvo, da ni možno vzpostaviti ustreznih živalskih modelov. V splošni populaciji se pojavljajo v 0,1 % deležu, med vsemi neželenimi učinki pa se pojavljajo v 10 % deležu. Najpogosteje se pojavljajo v obliki kožnih, krvnih in jetrnih zapletov, ki se pogosto končajo s smrtnim izidom. Za namene zgodnjega odkrivanja je zelo pomembno učinkovito delovanje sistema farmakovigilance in spremljanje neželenih učinkov

zdravil v obdobju po pridobitvi dovoljenja za promet z zdravilom. V tabeli 3 navajamo primere nekaterih znanih idiosinkratskih reakcij (2, 9, 10).

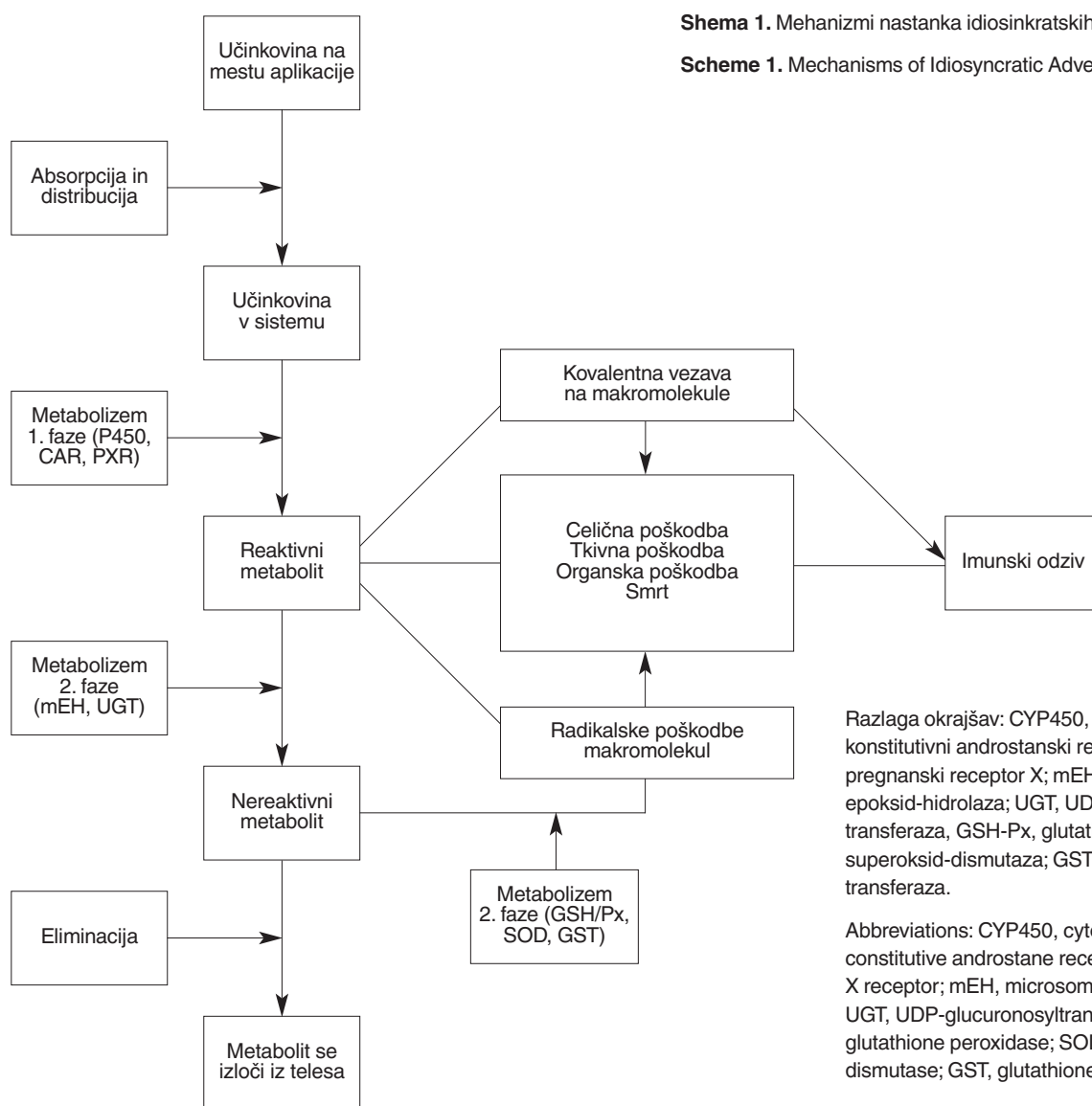
5.1 Hipoteze nastanka idiosinkratskih reakcij

Čeprav natančni mehanizmi z zdravili povzročenih idiosinkratskih reakcij niso znani, številne raziskave kažejo na vse večjo vpletenost reaktivnih metabolitov. Pri aromatskih antiepileptikih (fenitoin, fenobarbital, karbamazepin) so za pojav idiosinkratskih reakcij odgovorni reaktivni metaboliti aren oksidi. Reaktivni metaboliti učinkovin se lahko kovalentno vežejo na makromolekule, lahko povzročijo tvorbo radikalov ali neposredno povzročijo poškodbo celic, tkiv, organov ali smrt (shema 1). Kovalentna vezava reaktivnih metabolitov na makromolekulo povzroči izgubo funkcionalnosti proteina (celične poškodbe, celična smrt) in/ali

ob vezavi na protein nastanek haptena ($M_r > 1000$), kar vodi do imunskega odziva (haptenska hipoteza). Kot primer haptenske hipoteze lahko navedemo s penicilinom sprožene anafilaktične reakcije, ki jih povzroči nastanek haptena ob ireverzibilni reakciji betalaktamskega obroča s prostimi amino in sulfhidrilnimi skupinami na proteinih. Za nastanek haptena so lahko odgovorni tudi reaktivni metaboliti, ki se kovalentno vežejo na proteine (metabolit halotana – trifluoroacetil klorid). Reaktivni metaboliti so prav tako sposobni tvorbe radikalov, ki ob pomanjkanju razstrupljevalnih mehanizmov vodijo do oksidativnega stresa in celičnih poškodb (npr. oksidativne poškodbe eritrocitov ob pomanjkanju encima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze). Vzroki za povečan nastanek večjih količin reaktivnih metabolitov so lahko zmanjšana aktivnost razstrupljevalnih encimov (npr. polimorfizmi v genih za encime 2. faze metabolizma), zmanjšane količine razstrupljevalnih

Shema 1. Mehanizmi nastanka idiosinkratskih neželenih učinkov (12).

Scheme 1. Mechanisms of Idiosyncratic Adverse Reactions (12).



Razlaga okrajšav: CYP450, citokromi P450; CAR, konstitutivni androstanski receptor; PXR, pregnanski receptor X; mEH, mikrosomalna epoksid-hidrolaza; UGT, UDP-glukuronil-transferaza, GSH-Px, glutation-peroksidaza; SOD, superoksid-dismutaza; GST, glutation-S-transferaza.

Abbreviations: CYP450, cytochrome P450; CAR, constitutive androstane receptor; PXR, pregnane X receptor; mEH, microsomal epoxide hydrolase; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; GSH-Px, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase; GST, glutathione S-transferase.

molekul (npr. glutationa) ali povečana aktivnost encimov oksidativne poti, ki povzroči nastanek reaktivnih metabolitov (npr. indukcija CYP450). Indukcijo CYP450 regulirata jedrna receptorja: konstitutivni androstanski receptor (CAR) in pregnanski receptor X (PXR). Najpomembnejši encimi 2. faze metabolizma, ki sodelujejo pri odstranjevanju reaktivnih metabolitov, so mikrosomalne epoksid-hidrolaze (mEH) in UDP-glukuronil-transferaze (UGT). Pri odstranjevanju radikalov imata najpomembnejšo vlogo encima glutation-S-transferaza (GST) in superoksid-dismutaza (SOD) (9,11,12).

6 Reakcije tipa C

Reakcije tipa C so odvisne od odmerka in obdobja jemanja zdravila. Povezane so s kumulativnim odmerkom in jih najlažje ponazorimo na primeru zdravljenja z glukokortikoidi, ki se uporabljajo pri alergijah, vnetnih boleznih in kot imunosupresivi. Pri kratkoročni uporabi glukokortikoidov ne opazimo pojava neželenih učinkov, tudi kadar so odmerki relativno visoki. V primerih kroničnega zdravljenja pa prihaja zaradi inhibicije negativne povratne zanke v hipotalamusu in hipofizi do atrofije dela skorje nadledvične žleze, ki izloča kortizol. Ob nenadni prekinitvi zdravljenja z glukokortikoidi tako v telesu ne nastaja dovolj kortizola, zaradi česar lahko pride do adrenalne krize, ki je lahko smrtno nevarna in zahteva takojšnjo zdravniško pomoč. Simptomi adrenalne krize se lahko kažejo kot nenadne hude bolečine v spodnjem delu hrbta, trebuhu ali v nogah, bruhanje in diareja, hipotenzija, nizek krvni sladkor ter stopnjujoča oslabelost do šokovnega stanja in izgube zavesti. Zdravljenje z glukokortikoidi je zato potrebno prekiniti počasi in s postopnim zniževanjem odmerkov. Pomemben je tudi režim odmerjanja v času terapije z glukokortikoidi, saj je potrebno upoštevati cirkadiani ritem izločanja kortizola. Izločanje kortizola je najvišje zgodaj zjutraj, zato je takrat tudi občutljivost na povratno inhibicijo najnižja. Pozno zvečer je izločanje kortizola najnižje, zato je občutljivost regulatornih centrov na inhibicijo povratne zanke najvišja. Priporočen režim odmerjanja glukokortikoidov je zato enkratni dnevni odmerek, ki se vzame zgodaj zjutraj. Na ta način zmanjšamo supresijo osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (13, 14, 15, 16).

7 Reakcije tipa D

Zdravila s potrjenim teratogenim učinkom se prenašajo na plod preko placente in vplivajo na razvoj zarodka. Določeni škodljivi učinki se pokažejo ob rojstvu otroka (npr. deformacije okončin), medtem ko se nekateri drugi izrazijo šele kasneje. Poseben primer zakasnelih neželenih učinkov (teratogenih in kancerogenih), ki se pokažejo šele pozno v razvoju človeka, je povečana incidenca vaginalnega karcinoma pri mladih ženah, katerih matere so med nosečnostjo zaradi nevarnosti abortusa jemale dietilstilbestrol (latentno obdobje: od 20 do 30 let). Danes je uporaba dietilstilbestrola pri nosečnicah prepovedana (17).

8 Reakcije tipa E

Reakcije tipa E so opredeljene kot odtegnitvene reakcije. Najpogostejše jih srečujemo pri prekinitvi terapije z opiodi, kjer zaradi ponavljajoče aktivacije μ -opiodnih receptorjev pride do adaptacije živčnih celic. Ob vezavi agonistov na μ receptor pride do aktivacije sekundarnih prenašalcev in inhibicije adenilat-ciklaze. Zaradi nenehne aktivacije receptorjev se zmanjša koncentracija cAMP, zato se sproži

kompenzacijski mehanizem, ki poveča sintezo encima adenilat-ciklaze. Ob nenadni prekinitvi jemanja opiodov (4–6 ur pri heroinu) sprožijo povečani nivoji cAMP učinke, ki jih poznamo pod izrazom opiodni odtegnitveni sindrom. Podobne adaptacije se pojavljajo tudi pri uporabi zaviralcev adrenergičnih receptorjev beta, kjer zaradi zaviranja receptorjev pride do kompenzacijske zvečane sinteze receptorjev ter povečane afinitete le-teh za fiziološke agoniste (noradrenalin in adrenalin). Takojšnja prekinitev zdravljenja z zaviralci adrenergičnih receptorjev beta lahko sproži življenjsko nevarne reakcije, med drugim tudi akutni miokardni infarkt (18).

9 Zakonodaja na področju farmakovigilance zdravil za uporabo v humani medicini

Zakonodaja, ki regulira področje farmakovigilance v Sloveniji, obsega Zakon o zdravilih (Uradni list RS, št. 31/06), Pravilnik o farmakovigilanci zdravil za uporabo v humani medicini (Uradni list RS, št. 53/06), ki je v skladu z Direktivo 2001/83/ES Evropskega parlamenta in sveta, Pravilnik o kliničnih preskušanjih zdravil (Uradni list RS, št. 54/06). Natančnejša navodila za nadzor varnosti zdravil v državah članicah EU so podana v smernicah, ki jih je Evropska komisija objavila v pravilih, ki urejajo zdravila v Evropski skupnosti The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 9A – Pharmacovigilance for Medicinal Products for Human Use (različica september 2008) (19, 20, 21, 22, 23).

10 Udeleženci v sistemu farmakovigilance

Udeleženci in drugi viri informacij v sistemu farmakovigilance so:

- organ, ki je pristojen za zdravila (v Sloveniji Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke, v drugih državah članicah ostale nacionalne agencije),
- center za farmakovigilanco (v Sloveniji Center za zastrupitve, Univerzitetni klinični center Ljubljana),
- imetniki dovoljenj za promet, proizvajalci, uvozniki in veletrgovci,
- zdravniki, zobozdravniki, farmacevti in drugi zdravstveni delavci,
- uporabniki zdravil oziroma pacienti,
- ostali viri informacij (agencije za zdravila v drugih državah, WHO, pravne ali fizične osebe, ki so pri svojem stiku z zdravili, podatki iz literature) (20).

11 Poročanje o neželenih učinkih zdravil

Zdravstveni delavci (zdravniki, zobozdravniki, farmacevti in ostali), ki pri svojem delu ugotovijo **kakršnekoli neželene učinke zdravila ali sum nanje**, so dolžni čim prej, najpozneje v 15 dneh od ugotovitve, o tem poročati centru za farmakovigilanco. Še posebej morajo biti pozorni in poročati o:

- resnih neželenih učinkih zdravila (neželeni učinki, ki imajo za posledico smrt, neposredno življenjsko ogroženost, zahtevajo stacionarno bolnišnično obravnavo ali podaljšanje obstoječe bolnišnične obravnave, imajo za posledico dolgotrajno ali izrazito nezmožnost ali nesposobnost ali prirojeno anomalijo ali okvaro ob rojstvu);

- kadar je uporaba zdravila povzročila ali se sumi, da je povzročila škodljivo medsebojno delovanje z drugim zdravilom;
- nepričakovanih neželenih učinkih zdravila (neželeni učinek, katerega narava, resnost ali posledica niso v skladu s povzetkom glavnih značilnosti zdravila);
- kakršnem koli sumu na povečanje pogostosti pojavljanja neželenih učinkov zdravila (20).

12 Obveznosti imetnika dovoljenja za promet z zdravili

Imetnik dovoljenja za promet je po zakonodaji dolžan zaradi varovanja javnega zdravja vzpostaviti sistem farmakovigilance, ga nenehno dopolnjevati in imeti določeno odgovorno osebo za farmakovigilanco, ki je dolžna vzpostaviti in vzdrževati sistem farmakovigilance, pripravljati periodična poročila o varnosti zdravila, predložiti ustrezno dokumentacijo na vse zahteve organa, vključno s predložitvijo podatkov o obsegu prodaje. Imetnik dovoljenja je dolžan zbirati podatke in voditi podrobno dokumentacijo o vseh neželenih učinkih zdravil ali sumu nanje, ki se pojavijo v EU ali tretjih državah. O resnih neželenih učinkih zdravila je dolžan poročati takoj, najpozneje pa v 15 dneh po prejetju informacije, organu, pristojnemu za zdravila. O resnih neželenih učinkih zdravila, ki zahtevajo nujno ukrepanje zaradi neposrednega ogrožanja javnega zdravja, pa takoj. Imetnik dovoljenja za promet poroča o neželenih učinkih v elektronski obliki (format E2B), pri poročanju pa uporablja mednarodno dogovorjeno terminologijo (angl. MedDRA). Dolžnost imetnika dovoljenja za promet je predložitev poročila o vseh neželenih učinkih zdravila organu, pristojnemu za zdravila, v obliki periodičnih poročil o varnosti zdravila. Prav tako je imetnik dolžan takoj obvestiti organ, pristojen za zdravila, če v primeru tveganja za javno zdravje predlaga nujni varnostni ukrep. Imetnik dovoljenja za promet mora na zahtevo organa, pristojnega za zdravila, predložiti načrt upravljanja tveganja v obliki in vsebini, vključno z oceno učinkovitosti sprejetega načrta (20).

Sklep

Ključno vprašanje nadaljnega razvoja zdravil je, kako razviti čim natančnejše metode za napovedovanje toksičnosti zdravilnih učinkovin, še preden pridejo na trg in so na voljo širši populaciji. Napovedati in preprečiti vse škodljive učinke zdravil je nemogoče. Bistveno je, da farmakovigilanci sistem ob pojavu neželenih učinkov s hitrim ukrepanjem omeji škodo in na ta način zmanjša število prizadetih.

Literatura

1. Waller, P: An Introduction to Pharmacovigilance, 1. izdaja, John Wiley & Sons, 2009: 1–5.
2. Mann, RD, Andrews, EB: Pharmacovigilance, 2. izdaja, New York, 2007: 85–103.
3. Brvar, M, Slana, M, Možina, H, Možina, M: Pregledi bolnikov v urgentnih internističnih ambulantah zaradi neželenih učinkov zdravil. *Zdrav. vestn.* 2010; 79: 330–338.
4. Thürmann, PA: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen Diagnostik und Bewertung. *Pathologie.* 2006; 27: 6–12.
5. Edwards, IR, Aronson, JK: Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet.* 2000; 356(9237): 1255–9.
6. Rascher, W, Mentzer, D, Seyberth, HW: Verbesserung der Arzneimittelsicherheit durch Pharmakovigilanz. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2007; 155: 692–699.
7. Ferner, RE, Butt, TF: Adverse drug reactions. *Medicine.* 2008; 36(7): 364–368.
8. Ferner, RE: What's new in... Adverse drug reactions. *Medicine.* 2010; 39(4): 239–241.
9. Utrecht, J: Idiosyncratic Drug Reactions: Past, Present, and Future. *Chem Res. Toxicol.* 2008; 21: 84–92.
10. Roses, AD: Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet.* 2000; 355(9212): 1358–1361.
11. Prakash, C, Sharma, R, Gleave, M, Nedderman, A: In vitro screening techniques for reactive metabolites for minimizing bioactivation potential in drug discovery. *Curr Drug Metab.* 2008; 9(9): 952–64.
12. Glauser, TA: Idiosyncratic reactions: new methods of identifying high-risk patients. *Epilepsia.* 2000; 41 Suppl 8: 16–29.
13. Brunton, L, Laszlo, J, Parker, K: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Therapeutics. 11. izdaja, McGraw Hill, 2005: 1587–1612.
14. Kleiman, A, Tuckermann, JP: Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 275(1–2): 98–108.
15. Margolin, L, Cope, DK, Bakst-Sisser, R, Greenspan J: The steroid withdrawal syndrome: a review of the implications, etiology, and treatments. *J Pain Symptom Manage.* 2007; 33(2): 224–8.
16. Crowley, S: Inhaled glucocorticoids and adrenal function: an update. *Paediatr Respir Rev.* 2003; 4(2):153–61.
17. Vingerhoets, AJ, Assies, J, Goodkin, K, Van Heck, GL, Bekker, MH: Prenatal diethylstilbestrol exposure and self-reported immune-related diseases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 77(2): 205–9.
18. Dong, Z, Mao, R, Han, H, Cao, J, Xu, L: Morphine withdrawal modifies antinociceptive effects of acute morphine in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 346(2): 578–82.
19. Zakon o zdravilih (Uradni list RS, št. 31/06, spremembe Uradni list RS, št. 45/2008)
20. Pravilnik o farmakovigilanci zdravil za uporabo v humani medicini (Uradni list RS, št. 53/2006, spremembe Uradni list RS, št. 16/2011)
21. Direktiva 2001/83/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 6. novembra 2001 o zakoniku Skupnosti o zdravilih za uporabo v humani medicini
22. Pravilnik o kliničnih preskušanjih zdravil (Uradni list RS, št. 54/06)
23. http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-9/index_en.htm, datum: 23.7.2011

Pregled pomembnejših inhibitorjev 5 α -reduktaz tipa 1 in 2

An overview of important 5 α -reductase type 1 and 2 inhibitors

Nataša Beranič, Tea Lanišnik Rižner, Stanislav Gobec

Povzetek: Izoencima 5 α -reduktaza tipa (5AR) 1 in tipa 2 katalizirata redukcijo različnih 4-en-3-oksosteroidov, tudi testosterona, v najmočnejši androgen 5 α -dihidrotestosteron (DHT). Njuno prekomerno aktivnost povezujejo z različnimi boleznimi kot so benigna hiperplazija prostate, androgena alopecija, hirsutizem in akne. Oba izoencima sta tako zanimivi farmakološki tarči za zdravljenje od DHT odvisnih bolezni. Članek zajema pregled glavnih inhibitorjev 5AR. Rezultat 40-letnega iskanja inhibitorjev je nekaj obetavnih in dve klinično uporabni spojini, finasterid in dutasterid. Oba se uporabljata v terapiji benigne hiperplazije prostate, prvi tudi za zdravljenje androgene alopecije. Zaradi stranskih učinkov in potrebe po bolj učinkovitih in selektivnih inhibitorjih, se iskanje novih inhibitorjev nadaljuje. Raziskovalci inhibitorje 5AR iščejo predvsem med spojinami, ki niso steroidne narave, saj takšne molekule v manjši meri interagirajo z receptorji ali ostalimi encimi steroidnega endokrinega sistema.

Ključne besede: 5-alfa reduktaza, inhibitorji, finasterid, dutasterid

Abstract: The 5 α -reductase (5AR) type 1 and 2 enzymes catalyze the reduction of different 4-ene-3-oxosteroids (including testosterone) into the most potent androgen, 5 α -dihydrotestosterone. Increased activities of the 5ARs are related to different diseases, such as benign prostatic hyperplasia, androgen alopecia, hirsutism and acne. The 5ARs are thus emerging drug targets for treatment of 5 α -dihydrotestosterone-dependent diseases. Here, we review the major classes of 5AR inhibitors. Of many 5AR inhibitors reported over the last four decades, the only finasteride and dutasteride are used in the therapy of benign prostatic hyperplasia, and finasteride also in the therapy of androgen alopecia. Due to their serious side effects and the need for more effective and selective inhibitors, the search for inhibitors continues. Over the last few years, the discovery of new non-steroidal inhibitors has gained great importance, as these compounds have fewer interactions with receptors or with other enzymes of the steroid endocrine system.

Key words: 5-alpha reductase, inhibitors, finasteride, dutasteride

1 Uvod

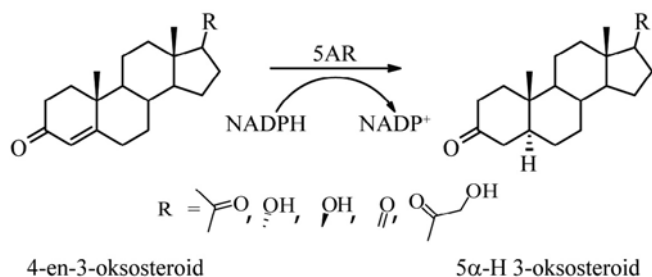
V zadnjih desetletjih predstavljajo zanimive farmacevtske tarče receptorji za steroidne hormone in encimi, vpleteni v biosintezo ali metabolizem posameznih steroidov. Iščejo predvsem spojine s selektivnim delovanjem na določen receptor ali encim. Eden od vedno bolj proučevanih encimov iz te skupine je tudi 5 α -reduktaza (5AR), ki katalizira redukcijo različnih 4-en-3-oksosteroidov (slika 1), prekomerno delovanje izoencimov 5AR pa povezujejo z različnimi patofiziološkimi stanji, zato so inhibitorji 5AR dokazano uporabni pri različnih obolenjih. Zaradi stranskih učinkov trenutno znanih inhibitorjev (impotenca, spremembe libida, ejakulacijske motnje, povečanje dojk, teratogenost) in potrebe po novih, bolj učinkovitih in selektivnih inhibitorjih, je iskanje učinkovnih, ki zavirajo delovanje izoencimov 5AR, zelo aktualno.

2 Opis 5AR

Trenutno so znane tri izooblike izoencima 5 α -reduktaza: tipa 1, tipa 2 in tipa 3 (1). Od teh sta bolje okarakterizirana izoencima 5 α -reduktaza tipa

1 (5AR-1) in 5 α -reduktaza tipa 2 (5AR-2). Oba sta membranska in od NADPH odvisna encima, ki katalizirata ireverzibilno redukcijo 4-en-3-oksosteroidov kot so testosteron, progesteron, deoksikortikosteron, androstendion in epitestosteron v ustrezne 5 α -3-oksosteroide (slika 1). Gena za oba izoencima so klonirali in dobro okarakterizirali. Čeprav je struktura genov podobna, se razlikujeta v lokaciji na kromosomih. Gen za 5AR-1 se namreč nahaja na kromosomu 5 (5p15), gen za 5AR-2 pa na kromosomu 2 (2p23) (2). Izoencima imata le 47 % identičnih aminokislinskih ostankov, kar vpliva tudi na razliko v njuni velikosti in razliko v pH območju, v katerem je njuno delovanje optimalno. 5AR-1 z maso 29 kDa je tako najbolj aktiven v pH območju 6-9, medtem ko je delovanje 5AR-2 z maso 27 kDa optimalno pri pH 5,5. Izoencima se razlikujeta tudi v kinetičnih parametrih, saj imajo substrati (testosteron, androstendion in progesteron) običajno večjo afiniteto do tipa 2 (K_m = 0,05 -1 μ M) kot do tipa 1 (K_m = 1-5 μ M) (2, 3).

Gena za oba izoencima se izražata tkivno specifično. 5AR-1 je prisoten v žlezah lojnicah, v koži (razen v genitalijah) in lasišču, jetrih, mišicah in



Slika 1: Redukcija 4-en-3-oksosteroidov z izoenzimoma 5AR.

Figure 1: The reduction of 4-en-3-oxosteroids catalysed by 5AR isoenzymes.

možganih, v manjši meri ga najdemo tudi v prostati (4, 5), ne izraža pa se v fetusu (6). 5AR-2 se po drugi strani izraža pretežno v prostati, poleg tega pa tudi v semenskih vezikih, koži genitalij, epididimisu, lasnih foliklih in jetrih (4, 5).

3 Vpletenost 5AR v bolezenska stanja

Čeprav lahko 5AR pretvarja različne 4-en-3-oksosteroide, je največ znanega o boleznih, povezanih s spremenjeno pretvorbo testosterona v 5 α -dihidrotestosteron (DHT). Pomemben vir informacij o vlogi 5AR-2 pri človeku predstavlja moški pseudohermaditizem, bolezensko stanje, kjer se gen za 5AR-2 ne izraža. Čeprav so drugi notranji reprodukivni organi normalni, so zunanje genitalije do pubertete podobne ženskim in v času pubertete virilizirajo (se razvijejo v moški fenotip). Zaradi znižanih koncentracij DHT se takšni moški rodijo s hipoplastično prostato, ki ostane nerazvita tudi pri odraslih bolnikih. Obrazna kot tudi telesna poraščenost je podobna ženski, razen na področju senc, kjer je močno znižana. Izločanje loja je normalno, saj leta pod nadzorom 5AR-1 (4, 6). Kaj bi povzročila odsotnost izoenzima 5AR-1, ni znano, saj takšnega bolezenskega stanja pri ljudeh še niso našli. Znano je le, da so miške z izničnim genom za 5AR-1 (*SRD5A1*) sicer fenotipsko normalne (7), a neustrezen metabolizem progesterona vodi v moteno širitev materničnega vratu, zato ob koncu brejosti ne morejo skotiti mladičev (8).

Povišano izražanje 5AR je povezano z različnimi endokrinimi boleznimi v organih, kjer se izoenzima izražata tudi fiziološko, predvsem v prostati in koži (4, 6). Androgeni so v prostati eden najmočnejših mitogenih dejavnikov *in vivo*. Nasplošno delujejo preko vezave na receptor za androgene (AR), kar vodi v prepis genov potrebnih za rast in razvoj prostate. Fiziološki ligand za AR je testosteron, ki nastaja v testistih (90%) in v nadledvični žlezi (10%), a testosteron lahko po krvnem obtoku potuje do tarčnih organov, kjer se pretvori v DHT z lokalno izraženimi izoenzimi 5AR. DHT je najmočnejši androgen, saj ima v primerjavi s testosteronom do AR približno 2 do 10-krat večjo afiniteto. Prekomerno delovanje izoenzimov 5AR v tarčnih tkivih lahko torej vodi v povečane koncentracije močnejšega liganda za AR. Z ustreznimi inhibitorji bi preprečili pretvorbo testosterona v DHT, zato sta 5AR-1 in 5AR-2 zanimivi farmakološki tarči za zdravljenje od DHT odvisnih bolezni (1, 4).

3.1 Bolezni prostate: benigna hiperplazija prostate in rak prostate

V prostati imajo androgeni pomembno vlogo tako v normalnem kot tudi tkivu prostate z benigno hiperplazijo in v rakavem tkivu. Benigna hiperplazija prostate je ena prvih bolezni, ki so jo povezali s prekomernim delovanjem 5AR in kjer posledično višje koncentracije DHT pospešijo rast prostate. Če delovanje izoenzimov 5AR z uporabo ustreznih učinkovin inhibiramo, zmanjšamo tudi proliferacijo tkiva. Ker je v tkivu prostate pretežno izražen 5AR-2, so za terapijo benigne hiperplazije prostate že leta 1992 odobrili prvi obetaven in hkrati 5AR-2 specifičen inhibitor finasterid (2). Dnevna aplikacija 5 mg finasterida (2) zniža serumske koncentracije DHT za približno 70%, velikost prostate pa za 15-25%. Ker je v manjši meri v prostati prisoten tudi 5AR-1, je aplikacija dualnega inhibitorja dutasterida (3), ki inhibira oba izoenzima, približno 60-krat bolj učinkovita. Tudi dutasterid (3) so leta 2002 odobrili za zdravljenje benigne hiperplazije prostate (1). Pri raku prostate se obratno kot pri benigni hiperplaziji prostate v večji meri izraža 5AR-1, zato bi tudi v tem primeru aplikacija dutasterida (3) bila smiselna. Ker vsi rezultati kliničnih študij še niso na voljo, ga trenutno še niso odobrili za terapijo raka prostate. Kljub temu je znano, da preventivna aplikacija finasterida (2) ali dutasterida (3) prepreči oz. upočasni razvoj raka prostate, a po drugi strani večina tumorjev sčasoma razvije rezistenco, kar vodi v razvoj napredovanih oblik tumorjev (1, 9).

3.2 Bolezni povezane s kožo: akne, androgena alopecija in hirsutizem

Patogeneza aken je povezana s hiperplazijo žlez lojnic, nenormalno diferenciacijo foliklov, hiperkolonizacijo foliklov z *Propionibacterium acnes*, vnetjem in neustreznim imunskim odzivom. Pri terapiji zdravljenja aken je zaradi pomanjkanja učinkovitih (problem rezistence na antibiotike) in varnih učinkovin (teratogenost) velika potreba po novih pristopih zdravljenja. Ugotovili so, da je pri aknah izražanje 5AR-1 v žlezah lojnicah, koži obraza in na lasišču povišano, zato se lahko T lokalno pretvarja v močan androgen DHT, izoenzim 5AR-1 pa je postal zanimiva farmakološka tarča tudi v tovrstni terapiji (10, 11).

Rezultati študij kažejo na vpletenost 5AR-1 in 5AR-2 tudi v razvoj plešavosti pri moških. Povišane koncentracije DHT povzročijo hitrejšo izpadanje las, sčasoma pa so lasje tudi tanjši. Po uspešnih rezultatih kliničnih testiranj je od leta 1997 finasterid (2) registriran tudi za zdravljenje androgene alopecije. V nasprotju z zdravljenjem benigne hiperplazije prostate v tem primeru zadostuje že aplikacija 1 mg finasterida (2) na dan (12, 13).

Povečano poraščenost ženskega telesa na delih, ki so odzivni na androgene (prsi ali brada) imenujemo hirsutizem. Povzroči ga lahko povečana občutljivost lasnih foliklov na androgene ali povišane koncentracije androgenov, ki se prekomerno sintetizirajo v jajčnikih. Običajno ga povezujejo tudi s povišano periferno aktivnostjo 5AR-1 v koži, kamor testosteron pripotuje po krvnem obtoku in se nato lokalno pretvori v DHT, oba pa stimulirata rast dlak (14).

3.3 Povezava z drugimi boleznimi

Zadnje čase raziskujejo povezavo med prekomerno aktivnostjo 5AR in vpletenostjo v patofiziologijo drugih bolezni. V literaturi najdemo predloge, da bi inhibitorji lahko delovali antikonvulzivno, antidepresivno,

anksiolitično, bili pa bi uporabni tudi v terapiji shizofrenije (15), depresij, epileptičnih napadov (5). Poleg tega raziskujejo tudi povezavo med 5AR in različnimi ginekološkimi boleznimi (policistični sindrom na jajčnikih, rak endometrija) (16, 17) ter rakom dojke (18). Teh bolezni ne povezujejo s povišanimi koncentracijami DHT, ampak predvsem z drugimi 5 α -reduciranimi steroidi, 5 α -dihidroprogesteronom in nevrosteroidi (19, 20).

4 Kinetičen mehanizem 5AR

Predlagan kinetičen mehanizem redukcije testosterona predvideva, da v prvi stopnji nastane binarni kompleks med encimom in NADPH, sledi tvorba terciarnega kompleksa s substratom testosteronom. Po interakciji med enonom v substratu in elektrofilnim ostankom v aktivnem mestu nastane delokaliziran karbokation. Sledi stereoselektiven hidriden prenos, in sicer z NADPH na α stran karbokationa, kar povzroči stereoselektivno redukcijo na C5. Iz nastalega terciarnega kompleksa E-NADP⁺-DHT najprej oddisociira produkt DHT ter nato še NADP⁺, prosti encim pa lahko nato sodeluje v naslednjem katalitičnem krogu (slika 2A) (21).

5 Inhibitorji 5AR

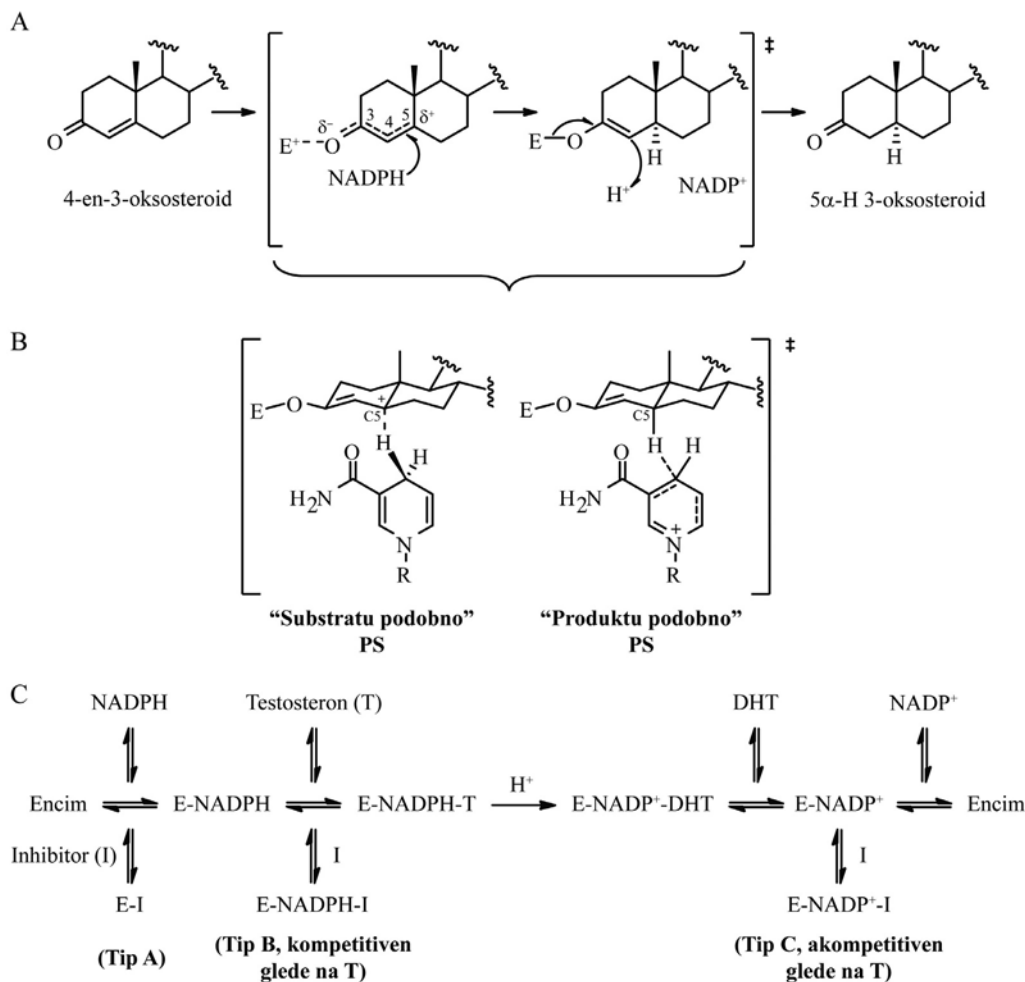
Edini vir informacij o strukturi izoenzimov 5AR je aminokislinsko zaporedje. Ker sta 5AR membranska izoenzima, ju še niso izolirali v

aktivni obliki in zato tudi kristalna struktura še ni znana, kar pa je močno vplivalo na razvoj novih inhibitorjev (3, 4).

Močne inhibitorje najdemo med analogi prehodnega stanja. Poznamo »substratu podobne« analoge prehodnega stanja, kjer je C5 še sp² hibridiziran, C-3, C-4 in C-5 pa so podobni karbokationskemu intermediju in »produktu podobne« analoge prehodnega stanja, kjer je C-5 že sp³ hibridiziran, struktura C-3, C-4 in C-5 pa spominja na strukturo enola v DHT (slika 2B) (22).

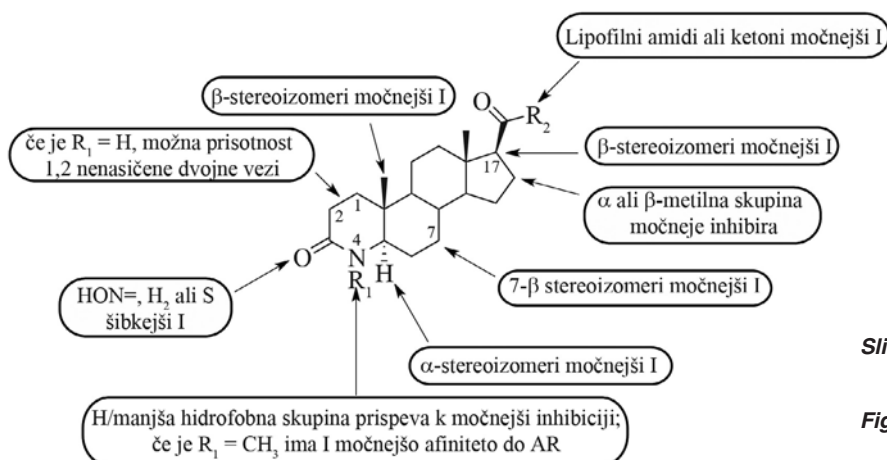
Med znanimi inhibitorji 5AR najdemo: kompetitivne inhibitorje glede na koencim (tip A), ki za vezavo v encim tekmujejo s kofaktorjem (NADPH) in se vežejo na prosti encim; kompetitivne inhibitorje glede na substrat (tip B), ki tekmujejo s substratom in se vežejo na E-NADPH kompleks ter akompetitivne inhibitorje (tip C), ki se vežejo na E-NADP⁺ kompleks (slika 2C). Takšnih inhibitorjev z večjo koncentracijo substrata ne moremo izpodriniti, zato imajo pri *in vivo* aplikacijah zagotovo prednost pred kompetitivnimi inhibitorji.

Na osnovi različnih steroidnih inhibitorjev so ugotovili, da molekulsko prepoznavanje substrata ali inhibitorja pri obeh izoenzimih poteka na enak način, saj so sp² hibridizirani kompetitivni inhibitorji neselektivni ter da je za inhibicijo obeh izoenzimov na C-3 obroču A nujen nukleofilni substituent. Najverjetneje se izoenzima razlikujeta v hidrofobnem žepku,



Slika 2: **A** Predlagan kinetičen mehanizem redukcije 4-en-3-oksosteroidov z izoenzimi 5AR **B** s predlaganimi prehodnimi stanji **C** in potencialna mesta delovanja inhibitorjev.

Figure 2: **A** The kinetic mechanism of 4-en-3-oxosteroid reduction by 5AR isoenzymes **B** with two possible transition states **C** and potential sites of inhibitory action.



Slika 3: SAR za spojine s 4-aza-3-okso-5 α -androstanskim skeletom.

Figure 3: SAR for compounds with 4-aza-3-oxo-5 α -androstane scaffold.

ki ga zasede substituent na C-17, saj so inhibitorji z večjim lipofilnim substituentom na C-17 selektivni inhibitorji 5AR-1. Tudi vpeljava manjše lipofilne skupine na C-7 vodi v selektivno inhibicijo 5AR-1 (slika 3).

5.1 Steroidni inhibitorji

Pri načrtovanju steroidnih inhibitorjev so izhajali iz strukture fizioloških substratov, kjer so običajno en ogljikov atom v steroidnem obroču A ali B nadomestili s heteroatomom, največkrat z dušikom.

5.1.1 4-azasteroidi

4-azasteroidi so najbolj proučeni inhibitorji 5-AR, nekateri od njih so tudi klinično uporabni. Prve raziskave segajo v leto 1973, ko je Voigt s sodelavci sintetiziral serijo spojin s 4-en-3-on strukturnim elementom, 17 β -stransko verigo, končna molekula pa je vsebovala vsaj en kisik. Spojine so kompetitivni inhibitorji in hkrati substrati, zato zaradi hitre pretvorbe v 4,5-dihidro metabolit niso učinkoviti *in vivo* (3). Liang in sodelavci so poročali o sintezi spojin, kjer so -CH₂- skupino na mestu 4 v 3-okso-5 α -steroidih nadomestili z dušikom in ugotovili, da tovrstne spojine niso samo boljše inhibitorji 5AR, ampak izgubijo tudi afiniteto do receptorjev za androgene, poleg tega pa so učinkovite tudi *in vivo*. Zato so 4-aza-3-okso-5 α -androstanski farmakofor zelo dobro proučili. Glavne ugotovitve SAR študij povzema slika 3. 4-azasteroidi se obnašajo kot »produktu podobni« analogi prehodnega stanja, saj imajo C-5 sp³ hibridiziran (slika 2B) (3, 23). Pri proučevanju spojin iz serije 17 β -(*N*-terc-butilkarbamoil)-4-aza-5 α -androst-1-en-3-on so našli dva zelo pomembna inhibitorja 4-MA (1) in finasterid (2) (slika 4). 4-MA (1) je močan dualni inhibitor človeških 5AR izoencimov. Ker je hepatotoksičen, ni prišel v klinično uporabo. V isti seriji spojin so odkrili tudi finasterid (2), močan inhibitor 5AR-2 s šibkim inhibitorskim delovanjem na 5AR-1 (slika 4). Finasterid (2) in njemu podobne učinkovine so samomorilski substrati, saj 5AR-2 prepozna finasterid (2) kot alternativen substrat, ga reducira v dihidrofinasterid, nastali dihidrofinasterid-NADP⁺ kompleks pa je močan bisubstratni analog. Kompleks E-NADP⁺-dihidrofinasterid (3) ima razpolovno dobo disociacije daljšo od enega meseca, zato v literaturi njegovo učinkovitost pogosto primerjajo z učinkovitostjo ireverzibilnih inhibitorjev (24).

Rezultati študije na seriji spojin 4-aza-3-okso-5 α -androst-17 β -*N*-aril-karboksamidov kažejo, da tovrstne spojine delujejo kot dualni inhibitorji,

za kar je odgovoren substituent na mestu C-17. Najboljši inhibitor iz te skupine, dutasterid (3) (slika 4), je od leta 2002 na tržišču za simptomatsko zdravljenje benigne hiperplazije prostate (3) in je celo bolj učinkovit kot finasterid (2) (24). Tudi dutasterid (3) je kompetitivni inhibitor.

Skupino 4-azasteroidov so zelo dobro proučili, zato v literaturi najdemo spojine, ki so podobno učinkovite kot inhibitor finasterid (2) ali celo mnogo boljše. Tako so v seriji (*N*-(2-ciano-2-propil)-3-okso-4-aza-5 α -androst-1-en-17 β -karboksamidov ugotovili, da spojina CGP53153 (4) (slika 4) v primerjavi s finasteridom (2) 10-krat močnejša pri zmanjšanju teže prostate pri podganah. V skupini testiranih 11 α -acetoksi, 11 α -hidroksi, 11 β -hidroksi in 11-okso substituiranih analogov 4-aza-5 α -androstana imajo 11 β -hidroksi (primer spojina 5) in 11-okso derivati (primer spojina 6) inhibitorsko aktivnost, ki je primerljiva s finasteridom (2) (slika 4). Leta 1998 je Salle s sodelavci sintetiziral spojino PNU157706 (7) (slika 4), ki je močan dualen inhibitor tipa 1 in tipa 2 in 16-krat močnejša pri zmanjšanju teže prostate kot finasterid (2). Spojina je v kliničnih testiranjih (3).

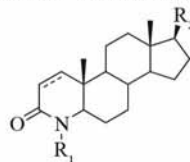
5.1.2 6-azasteroidi

Med 6-azasteroide uvrščamo spojine s 3-keto-4-en-6-aminskim strukturnim elementom (slika 5). Uvrščamo jih v skupino »substratu podobnih« analogov prehodnega stanja (slika 2B), njihov mehanizem inhibicije pa so natančneje proučili in ga primerjali s finasteridom (2). Ugotovili so, da podobno kot finasterid (2), tudi 6-azasteroidi inhibirajo 5AR v vsaj dveh stopnjah. Ker spojini s ketoenaminsko strukturo 5AR ne more reducirati, 6-azasteroidi po vezavi v encim le zelo počasi disociirajo iz aktivnega mesta (25). Rezultate študije SAR prikazuje slika 5. Najboljša spojina je po svoji učinkovitosti primerljiva s finasteridom (2). Spojine, ki so na C-17 substituirane z 2,5 disubstituiranimi anilidi (8) ali arilcikloalkil amidi (9) (slika 6) so izkazale dobro *in vivo* učinkovitost pri psih. Spojine s 6-azaholest-3-on skeletom so močni dualni inhibitorji. Če so na C-7 substituirani z α -metilno skupino, postanejo močni 5AR-1 selektivni inhibitorji (spojini 10 in 11, slika 6). Tudi 16 β -ariloksi-, -alkoksi in -heteroariloksi 6-azasteroidi so močni 5AR-1 inhibitorji z IC₅₀ vrednostmi med 0.1-1000 nM (3).

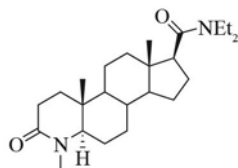
5.1.3 10-azasteroidi

Prvo skupino 10-azasteroidov (slika 7) kot potencialnih inhibitorjev 5AR je Guara s sodelavci načrtoval na osnovi molekularnega modela

Splošna struktura 4-azasteroidov

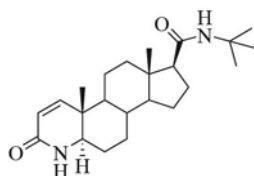


4-MA (1)



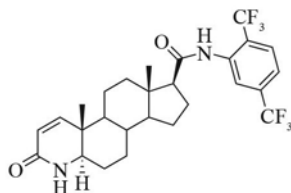
Spojina	IC ₅₀ [nM]	
4-MA	5AR-1 (človeške celice DU-145)	5AR-2 (človeške celice SW-631)
	4,1	7,5

finasterid (2)



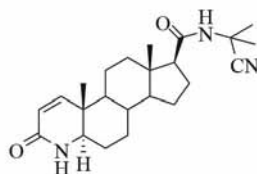
Spojina	IC ₅₀ [nM]	
finasterid (2)	5AR-1 (človeško tkivo)	5AR-2 (človeško tkivo)
	410	9,4

dutasterid (3)



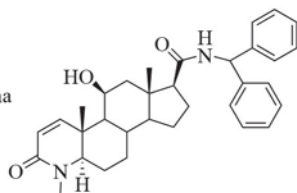
Spojina	IC ₅₀ [nM]	
dutasterid (3)	5AR-1 (človeško tkivo)	5AR-2 (človeško tkivo)
	2,4	0,5
finasterid (2)	52	<0,1

CGP53153 (4)

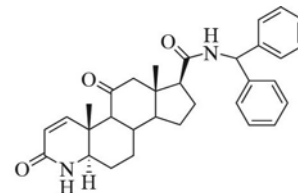


Spojina	IC ₅₀ [nM]	
CGP53153	5AR (podganje prostate)	5AR (človeške prostate)
	36	262
finasterid	11	18

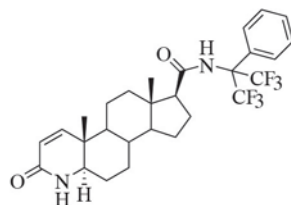
11β-hidroksi analog
4-metil-4-aza-5α-androstana
(5)



11-okso analog
4-aza-5α-androstana
(6)



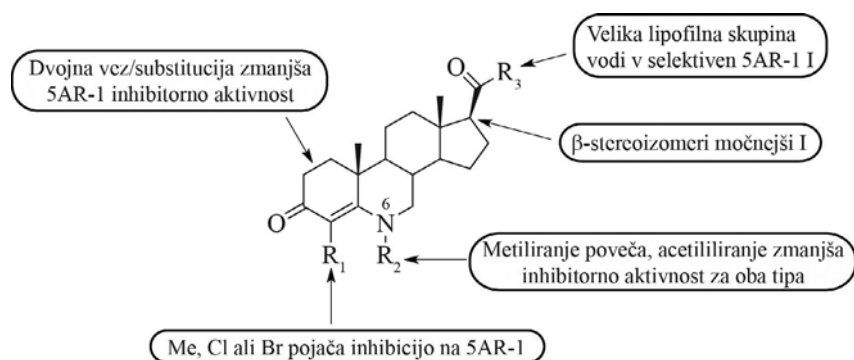
PNU157706 (7)



Spojina	IC ₅₀ [nM]	
PNU157706	Rekombinantni 5AR-1 (iz insektnih celic)	Rekombinantni 5AR-2 (iz insektnih celic)
	3,9	1,8
finasterid	313	11,3

Slika 4: Pregled glavnih inhibitorjev s 4-azasteroidnim skeletom. Insektne celice kot gostitelj za izražanje rekombinantno pripravljenega 5AR-1 in 5AR-2.

Figure 4: An overview of the most important inhibitors with 4-azasteroid scaffold. Insect cells were used as a host in preparation of the recombinant 5AR-1 and 5AR-2.



Slika 5: SAR za 6-azasteroidne inhibitorje.

Figure 5: SAR for 6-azasteroids.

Splošna struktura 6-azasteroidov

Spojina	IC ₅₀ [nM]	
	5AR-1 (človeško tkivo)	5AR-2 (človeško tkivo)
8	1,3	<0,1
finasterid (2)	150	0,18

Spojina	IC ₅₀ [nM]	
	5AR-1 (človeško tkivo)	5AR-2 (človeško tkivo)
9	6,8	<0,1
finasterid (2)	150	0,18

Spojina	K _i [nM]	
	5AR-1 (človeško tkivo)	5AR-2 (človeško tkivo)
α -CH ₃ izomer (10)	0,8	7,9
β -CH ₃ izomer (11)	1	1,2
finasterid (2)	1	2,3

2,5-disubstituiran analog 6-aza-androst-4-en-5-ona (**8**)

(arilcikloalkil) amidni derivat 6-aza-androst-4-en-3-ona (**9**)

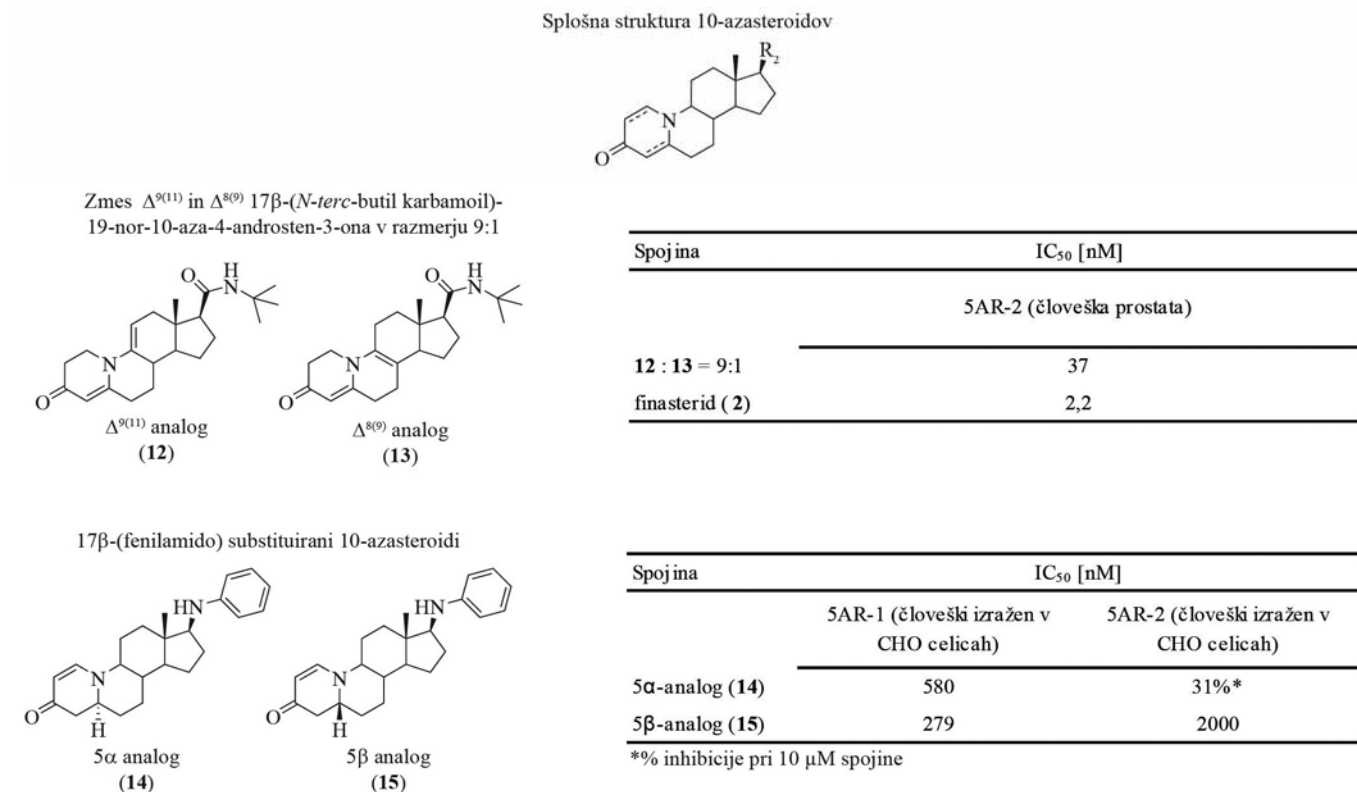
6-azaholest-3-onska analoga (**10**) in (**11**)

Slika 6: Pregled glavnih inhibitorjev s 6-azasteroidnim skeletom

Figure 6: An overview of the most important inhibitors with 6-azasteroid scaffold.

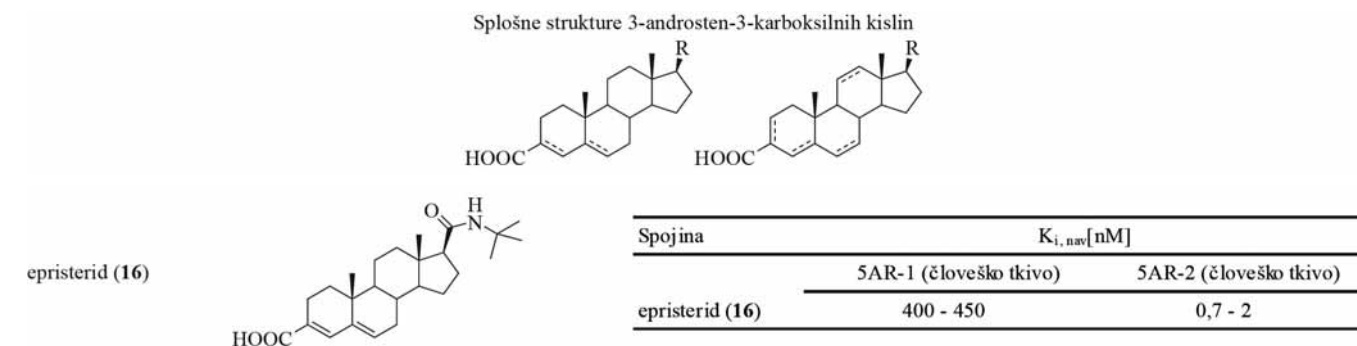
aktivnega mesta za 5AR-2 in predvidevanj, da se spojine z dušikom na mestu 10 in enaminskim strukturnim elementom v obroču A steroidnega skeleta obnašajo kot mimetiki »substratu podobnega« prehodnega stanja. Dušik na mestu 10 poveča nukleofilne lastnosti karbonylne skupine in preko delokalizacije pozitivnega naboja stabilizira karbokation.

Ugotovili so, da z vpeljavo 17 β -(*N*-*tert*-butilkarbamoilne) skupine in ohranitvijo enaminske strukture na obeh izoencimih povečajo *in vitro* inhibicijo. Nasprotno je inhibicija manjša, če je konjugacija med karbonylno skupino in dušikom motena. Najboljše rezultate so dobili za zmes $\Delta^{9(11)}$ - in $\Delta^{8(9)}$ -17 β -(*N*-*tert*-butilkarbamoil)-19-nor-10-aza-4-



Slika 7: Pregled glavnih inhibitorjev z 10-azasteroidnim skeletom. CHO celice, celice iz ovarijske kitajske hrčka.

Figure 7: An overview of the most important inhibitors with 10-azasteroid scaffold. CHO cells, Chinese ovarian hamster.



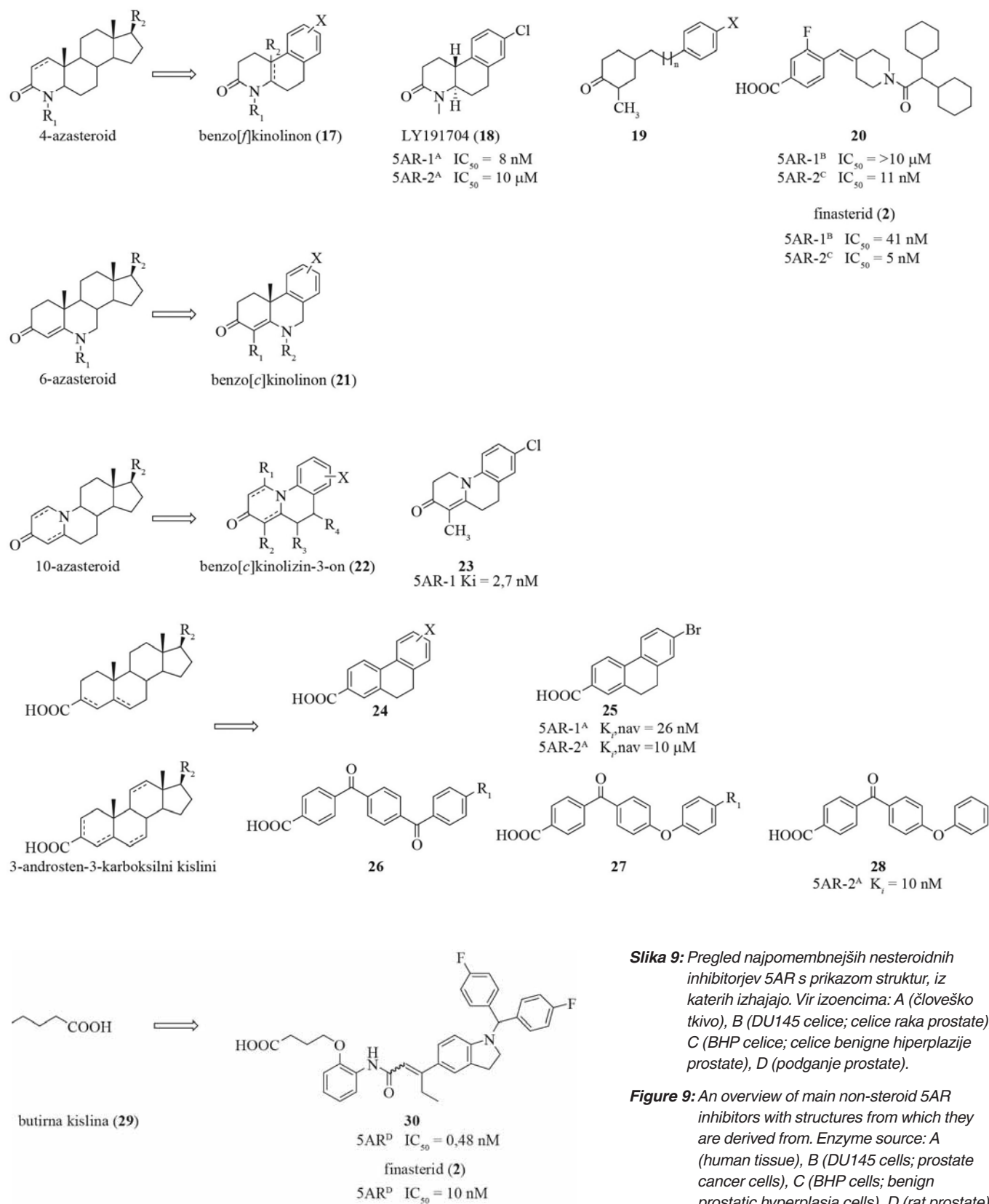
Slika 8: Epristerid, najpomembnejši inhibitor med 3-androsten-3-karboksilnimi kislinami.

Figure 8: Epristerid, the most important inhibitor among 3-androstene-3-carboxylic acids.

androsten-3-ona (12 in 13) v razmerju 9:1 (slika 7) (22). V seriji 17 β -(*N*-(fenil)metil/fenil-amido) substituiranih 10-azasteroidov so nepričakovano ugotovili, da so 5 β -H spojine (primer spojina 15) močnejši inhibitorji kot njihovi 5 α -H ekvivalenti (primer spojina 14, slika 7) ter da lahko s substituenti na mestu 17 vplivajo na selektivnost inhibitorjev. IC₅₀ vrednosti testiranih spojin so bile v nizkem μ M območju (26).

5.1.4 3-androsten-3-karboksilne kisline

Derivati 3-androsten-3-karboksilnih kislin so edini znani akompetitivni inhibitorji 5AR. Predvidevajo, da se spojine tega tipa zaradi ugodnih elektrostatskih interakcij med karboksilatom in pozitivno nabito obliko kofaktorja NADP⁺ vežejo na binarni kompleks E-NADP⁺ in zato delujejo kot akompetitivni inhibitorji (slika 2C) (27). Najboljša spojina v tej seriji, epristerid (K_i = 0,7-2 nM) (16), je močan selektivni inhibitor 5AR-2 (slika



Slika 9: Pregled najpomembnejših nesteroidnih inhibitorjev 5AR s prikazom struktur, iz katerih izhajajo. Vir izoencima: A (človeško tkivo), B (DU145 celice; celice raka prostate), C (BHP celice; celice benigne hiperplazije prostate), D (podganje prostate).

Figure 9: An overview of main non-steroid 5AR inhibitors with structures from which they are derived. Enzyme source: A (human tissue), B (DU145 cells; prostate cancer cells), C (BHP cells; benign prostatic hyperplasia cells), D (rat prostate).

8), ki je trenutno že v kliničnih študijah za zdravljenje benigne hiperplazije prostate (28).

5.2 Nesteroidni inhibitorji

Zadnja leta raziskovalci iščejo predvsem nesteroidne inhibitorje 5AR, saj takšne molekule v manjši meri interagirajo z ostalimi receptorji ali encimi steroidnega endokrinega sistema, poleg tega pa je sinteza nesteroidnih spojin običajno manj kompleksna. Pri načrtovanju nesteroidnih inhibitorjev izhajajo iz struktur znanih steroidnih inhibitorjev. Splošen pristop predstavlja odstranitev vsaj enega obroča iz osnovnega steroidnega skeleta, ki ga v nadaljevanju različno substituirajo ter določijo SAR. Mimetiki azasteroidov se običajno obnašajo kot kompetitivni inhibitorji, mimetiki epristerida (16) pa kot akompetitivni inhibitorji.

5.2.1 Mimetiki 4-azasteroidov

Najpomembnejše mimetike v tej skupini predstavljajo benzo[f]kinolinoni (17), ki jih dobijo, če obroč D v 4-azasteroidnem skeletu odstranijo, obroč C pa nadomestijo z aromatskim (slika 9). V literaturi najdemo podatek o sintezi dveh glavnih razredov benzo[f]kinolinonov (17), in sicer heksahidro in oktahidro derivatov, kjer so oktahidro derivati močnejši inhibitorji. Skoraj vse spojine so selektivni 5AR-1 inhibitorji, a lahko z ustrezno substitucijo na mestu 8 aromatskega obroča dobimo tudi dualne inhibitorje (29). Rezultati SAR študije so pokazali, da so spojine, ki so na C-8 substituirane s halogenom ali večjo lipofilno skupino ter na N-4 z metilno skupino, močnejši 5AR-1 inhibitorji. Najmočnejši inhibitor v tej seriji spojin LY191704 (18, slika 9) z IC_{50} vrednostjo za 5AR-1 8 nM je v kliničnih testiranjih za zdravljenje benigne hiperplazije prostate. Če odstranitev enega obroča pri 4-azasteroidih vodi v močnejše in bolj selektivne 5AR-1 inhibitorje, pa z odstranitvijo dveh ali celo večih obročev, dobimo spojine s slabšo inhibično jakostjo (4). Spojine, ki imajo obroč B in C nadomeščen z acikličnim distančnikom (primer spojina 19, slika 9), inhibirajo podganje 5AR z Ki vrednostjo v μM območju ($> 20 \mu M$). Močni inhibitorji 5AR torej morajo imeti tako obroč A kot obroč B, saj jih drugače encim v aktivnem mestu ne prepozna (3). Hartmann in sodelavci poročajo o *N-acil-4-benziliden-piperidin-4'-karboksilnih kislinah* kot mimetikih 4-azasteroidov. Spojine z ustrezno substituiranim benzenovim obročem, kot je substitucija s fluorjem na C-2 in uvedba karboksilne ali metiloksikarbonilne skupine na C-4 (20, slika 9) so močni inhibitorji 5AR-2, saj je njihova učinkovitost primerljiva s finasteridom (2) (30, 31).

5.2.2 Mimetiki 6-azasteroidov

Mimetike 6-azasteroidov najdemo med benzo[c]kinolinoni (slika 9). Spojine kot npr. 21 so sicer selektivni, a šibki inhibitorji 5AR-1 s Ki vrednostmi v nizkem μM območju (3).

5.2.3 Mimetiki 10-azasteroidov

Zadnji razred nesteroidnih inhibitorjev izpeljanih iz azasteroidov predstavljajo benzo[c]kinolizin-3-oni (22, slika 9). Nekateri so močni in selektivni inhibitorji 5AR-1. Delimo jih lahko v dve skupini, in sicer 4aH z dvojno vezjo med C-1 in C-2 ter 1H z dvojno vezjo med C-4 in C-4a. Podobno kot pri 10-azasteroidih je tudi pri njihovih mimetikih ključnega pomena dvojna vez, ki omogoča konjugacijo med karbonilno skupino in dušikom, zato so 1H spojine boljši inhibitorji. Nadaljnje SAR študije so pokazale, da podobno kot pri benzo[f]kinolinonih (17), prisotnost metilne skupine na C-4 in halogena na C-8 kot v primeru spojine 23 vodi v 5AR-

1 inhibitor, ki je po učinkovitosti primerljiv z znanimi inhibitorji, kot sta finasterid (2) in LY191704 (18). Predvidevajo, da ima vpeljava metilne skupine na C-6 enak vpliv kot metil na C-7 pri azasteroidih, saj se tudi tukaj selektivnost do 5AR-1 poveča. Metilna skupina na C-1 ali C-5 zmanjša inhibično jakost (4, 32).

5.2.4 Mimetiki 3-androsten-3-karboksilnih kislin

Če androsten-3-karboksilnim kislinam odstranimo obroč D dobimo 9,10-dihydrofenantren-2-karboksilne kisline (24) (slika 9), ki se, v nasprotju s spojinami iz katerih izhajajo, obnašajo kot selektivni inhibitorji 5AR-1. V nasprotju z ostalimi tricikličnimi inhibitorji v tem primeru klor pripet na C-7 ne poviša jakosti, poviša pa jo brom (25). Če je v obroču C prisotna dvojna vez, je spojina 5AR-2 selektiven inhibitor. Za razliko od ostalih nesteroidnih inhibitorjev, se spojine te skupine, podobno kot androsten-3-karboksilne kisline, obnašajo kot akompetitivni inhibitorji. Boljše inhibitorje najdemo tudi med spojinami z benzofenonskim skeletom (26 in 27) (slika 9). Ker je prisotnost obroča A in C nujna za inhibično aktivnost, so ju v tem primeru povezali z ustreznim distančnikom in dobili močne 5AR-2 selektivne inhibitorje s Ki vrednostmi v nizkem nM območju (28) (slika 9) (3). Najmočnejši inhibitorji v tej skupini so derivati indolov. V seriji testiranih spojin, je derivat butirne kisline (29), KF20405 (30) približno 20-krat močnejši inhibitor kot finasterid (2) (slika 9) (33).

6 Sklep

Povišano izražanje 5AR in s tem povišane koncentracije DHT že dolgo povezujejo z boleznimi kot so benigna hiperplazija prostate, androgena alopecija, hirsutizem in akne, zadnje čase pa ugotavljajo, da bi 5AR lahko bila vpletena tudi v bolezni kot so rak dojke, endometrijoza in razne neuropsihiatrične bolezni. Zaradi različnih terapevtskih aplikacij sta 5AR zanimivi tarči, z iskanjem njunih inhibitorjev pa se ukvarjajo številne raziskovalne skupine. Rezultat 40-letnega iskanja inhibitorjev je nekaj izredno obetavnih in dve klinično uporabni spojin, finasterid (2) in dutasterid (3). Oba se uporabljata v terapiji benigne hiperplazije prostate, prvi pa tudi za zdravljenje androgene alopecije. Raziskave na področju iskanja inhibitorjev 5AR so tako usmerjene v iskanje primerne nesteroidnega skeleta, ki bi omogočalo močnejšo jakost inhibitorjev ob zmanjšanju afinitete inhibitorja do steroidnih receptorjev in ostalih encimov metabolizma steroidov, ter v iskanje strukturnih elementov, ki bi povečali selektivnost za inhibicijo zgolj ene izooblike.

Literatura

- Schmidt LJ, Tindall DJ. Steroid 5 alpha-reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 125 (1-2): 32-8.
- Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 25-61.
- Aggarwal S, Thareja S, Verma A, Bhardwaj TR, Kumar M. An overview on 5alpha-reductase inhibitors. *Steroids* 2010; 75 (2): 109-53.
- Occhiato EG, Guarna A, Danza G, Serio M. Selective non-steroidal inhibitors of 5 alpha-reductase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 88 (1): 1-16.
- Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gilliland KR, Gorin-Meyer RE, Wiren KM. A new look at the 5alpha-reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Rev* 2006; 12 (1): 53-76.
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 1993; 92 (2): 903-10.
- Steers WD. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 2001; 58 (6 Suppl 1): 17-24.

8. Mahendroo MS, Porter A, Russell DW, Word RA. The parturition defect in steroid 5 α -reductase type 1 knockout mice is due to impaired cervical ripening. *Mol Endocrinol* 1999; 13 (6): 981-92.
9. Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Too CK, Rittmaster RS, Tindall DJ. Type 1 and type 2 5 α -reductase expression in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol* 2008; 53 (2): 244-52.
10. Katsambas A, Dessinioti C. New and emerging treatments in dermatology: acne. *Dermatol Ther* 2008; 21 (2): 86-95.
11. Zouboulis CC, Piquero-Martin J. Update and future of systemic acne treatment. *Dermatology* 2003; 206 (1): 37-53.
12. Bienova M, Kucerova R, Fiuraskova M, Hajduch M, Kolar Z. Androgenetic alopecia and current methods of treatment. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2005; 14 (1): 5-8.
13. Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4 (22): 1-11.
14. Skalba P, Dabkowska-Huc A, Kazimierzczak W, Samojedny A, Samojedny MP, Chelmicki Z. Content of 5- α -reductase (type 1 and type 2) mRNA in dermal papillae from the lower abdominal region in women with hirsutism. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31 (4): 564-70.
15. Paba S, Frau R, Godar SC, Devoto P, Marrosu F, Bortolato M. Steroid 5 α -reductase as a novel therapeutic target for schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. *Curr Pharm Des* 2011; 17 (2): 151-67.
16. Reismann P, Liko I, Igaz P, Patocs A, Racz K. Pharmacological options for treatment of hyperandrogenic disorders. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9 (9): 1113-26.
17. Ito K, Suzuki T, Akahira J, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H. Expression of androgen receptor and 5 α -reductases in the human normal endometrium and its disorders. *Int J Cancer* 2002; 99 (5): 652-7.
18. Wiebe JP, Souter L, Zhang G. Dutasteride affects progesterone metabolizing enzyme activity/expression in human breast cell lines resulting in suppression of cell proliferation and detachment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 100 (4-5): 129-40.
19. Luchetti S, Bossers K, Frajese GV, Swaab DF. Neurosteroid biosynthetic pathway changes in substantia nigra and caudate nucleus in Parkinson's disease. *Brain Pathol* 2011; 20 (5): 945-51.
20. Bortolato M, Frau R, Orru M, Bourrov Y, Marrosu F, Mereu G, Devoto P, Gessa GL. Antipsychotic-like properties of 5- α -reductase inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33 (13): 3146-56.
21. Li X, Chen C, Singh SM, Labrie F, Labrie F. The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 α -oxidoreductase. *Steroids* 1995; 60 (6): 430-41.
22. Guarna A, Belle C, Machetti F, Occhiato EG, Payne AH, Cassiani C, Commerci A, Danza G, De Bellis A, Dini S, Marrucci A, Serio M. 19-nor-10-azasteroids: a novel class of inhibitors for human steroid 5 α -reductases 1 and 2. *J Med Chem* 1997; 40 (7): 1112-29.
23. Liang T, Heiss CE, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmussen GH. 4-Azasteroidal 5 α -reductase inhibitors without affinity for the androgen receptor. *J Biol Chem* 1984; 259 (2): 734-9.
24. Bramson HN, Hermann D, Batchelor KW, Lee FW, James MK, Frye SV. Unique preclinical characteristics of GG745, a potent dual inhibitor of 5AR. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282 (3): 1496-502.
25. Moss ML, Kuzmic P, Stuart JD, Tian G, Peranteau AG, Frye SV, Kaddwell SH, Kost TA, Overton LK, Patel IR. Inhibition of human steroid 5 α -reductases type I and II by 6-aza-steroids: structural determinants of one-step vs two-step mechanism. *Biochemistry* 1996; 35 (11): 3457-64.
26. Scarpi D, Occhiato EG, Danza G, Serio M, Guarna A. Synthesis of 17 β -N-substituted 19-Nor-10-azasteroids as inhibitors of human 5 α -reductases I and II. *Bioorg Med Chem* 2002; 10 (11): 3455-61.
27. Levy MA, Brandt M, Heys JR, Holt DA, Metcalf BW. Inhibition of rat liver steroid 5 α -reductase by 3-androstene-3-carboxylic acids: mechanism of enzyme-inhibitor interaction. *Biochemistry* 1990; 29 (11): 2815-24.
28. Levy MA, Brandt M, Sheedy KM, Dinh JT, Holt DA, Garrison LM, Bergsma DJ, Metcalf BW. Epristeride is a selective and specific uncompetitive inhibitor of human steroid 5 α -reductase isoform 2. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 48 (2-3): 197-206.
29. Smith EC, McQuaid LA, Goode RL, McNulty AM, Neubauer BL, Rocco VP, Audia JE. Synthesis and 5 α -reductase inhibitory activity of 8-substituted benzo[f]quinolinones derived from palladium mediated coupling reactions. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8 (4): 395-8.
30. Picard F, Barassin S, Mokhtarian A, Hartmann RW. Synthesis and evaluation of 2'-substituted 4-(4'-carboxy- or 4'-carboxymethylbenzylidene)-N-acylpiperidines: highly potent and in vivo active steroid 5 α -reductase type 2 inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45 (16): 3406-17.
31. Streiber M, Picard F, Scherer C, Seidel SB, Hartmann RW. Methyl esters of N-(dicyclohexyl)acetyl-piperidine-4-(benzylidene-4-carboxylic acids) as drugs and prodrugs: a new strategy for dual inhibition of 5 α -reductase type 1 and type 2. *J Pharm Sci* 2005; 94 (3): 473-80.
32. Guarna A, Machetti F, Occhiato EG, Scarpi D, Commerci A, Danza G, Mancina R, Serio M, Hardy K. Benzo[c]quinolizin-3-ones: a novel class of potent and selective nonsteroidal inhibitors of human steroid 5 α -reductase 1. *J Med Chem* 2000; 43 (20): 3718-35.
33. Takami H, Koshimura H, Kishibayashi N, Ishii A, Nonaka H, Aoyama S, Kase H, Kumazawa T. Indole derivatives as a new class of steroid 5 α -reductase inhibitors. *J Med Chem* 1996; 39 (26): 5047-52.

OBJAVA POPRAVKA:

V prvi številki Farmacevtskega vestnika, letnik 2012 je bil objavljen članek z naslovom »Sheme zdravljenja pri kronični bolečini in glavni mehanizmi interakcij z analgetiki«, ki vključuje dve preglednici: Opioidni analgetiki, na strani 24 in Neopioidni analgetiki, na strani 25.

Preglednici sta povzeti po Obrazcu Službe za lajšanje akutne bolečine v Splošni bolnišnici Murska Sobota, ki jo vodi Oddelek za perioperativno medicino Splošne bolnišnice Murska Sobota.

Preglednico je oblikoval in pripravil Oddelek za perioperativno medicino s sodelovanjem Bolnišnične lekarne in je večinoma povzeta po SmPC-jih zdravil iz BPZ (www.zdravila.net). Za nenamerno napako pri viru se avtorica opravičuje Oddelku za perioperativno medicino Splošne bolnišnice Murska Sobota.

Uredništvo Farmacevtskega vestnika

Biološki učinki derivatov cimetne kisline

Biological effects of cinnamic acid derivatives

Matej Sova

Povzetek: Cimetna kislina in njeni derivati so naravno prisotne spojine, ki jih najdemo v sadju, zelenjavi, začimbah, čaju in vinu. Izkazujejo številne biološke učinke, med katerimi izstopajo antioksidativno, protivnetno, protimikrobno, protitumorno, antidiabetično in hepatoprotektivno delovanje. V članku predstavljamo glavne derivate cimetne kisline, njihove biološke učinke in potencialno uporabo pri preprečevanju in zdravljenju različnih bolezni.

Ključne besede: cimetna kislina, biološki učinki, antioksidanti, protimikrobno delovanje, protitumorno delovanje

Abstract: Cinnamic acid and its derivatives are naturally occurring substances found in fruits, vegetables, spices, tea and wine. They exhibit a broad spectrum of biological activities, most notably antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antitumor, antidiabetic and hepatoprotective activity. This article presents the main cinnamic acid derivatives, their biological effects and potential applicability in the prevention and treatment of various diseases.

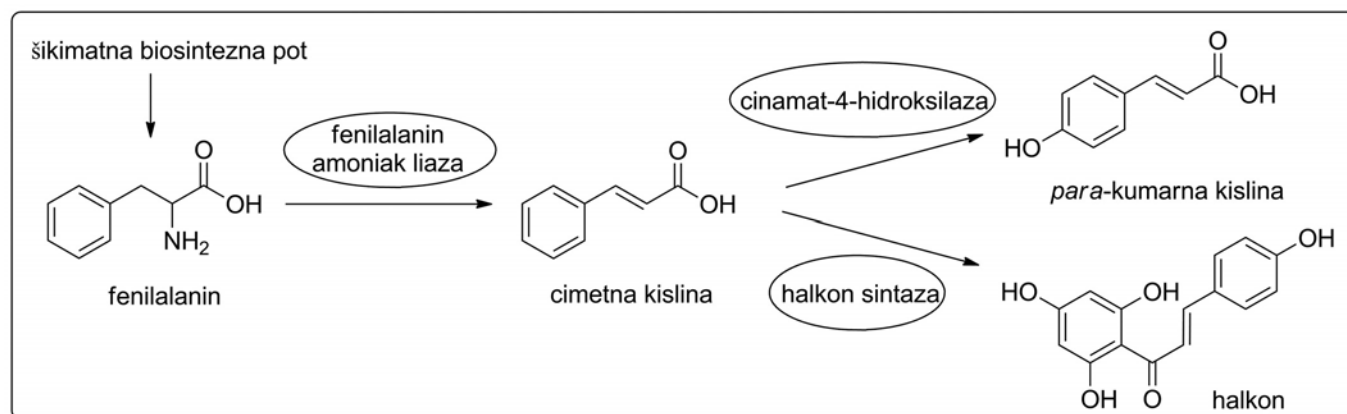
Keywords: cinnamic acid, biological effects, antioxidants, antimicrobial activity, antitumor activity

1 Uvod

Fenolne kisline, ki so zelo razširjene v rastlinskem svetu, lahko razdelimo na dva velika razreda: derivati benzojske kisline in derivati cimetne kisline (1). *Trans*-cimetna kislina oziroma *trans*-3-fenil-2-propenojska kislina in njeni derivati so v različnih koncentracijah v večini sadja in zelenjave, kjer so v glavnem prisotni kot estri z drugimi hidroksikislinami (na primer s kina kislino ali vinsko kislino) ali različnimi derivati sladkorjev (1–3). V prosti obliki so le v majhnih količinah predvsem zaradi svoje nizke polarnosti in slabe vodotopnosti. Med glavne derivate cimetne kisline prištevamo *para*-kumarno, kavno, ferulno in sinapinsko kislino, med estri

pa velja omeniti predvsem estre hidroksicimetnih kislin s kina kislino, ki sodijo med tako imenovane klorogenske kisline. Klorogenske kisline so množično zastopane v rastlinskem materialu, saj so v večjih količinah prisotne v kavi, zelenem in črnem čaju, sadju (jabolko, borovnice, češnje, grozdje) in zelenjavi (špinača, brokoli, brstični ohrovt, zelje, solata, krompir) (1–3).

Derivate cimetne kisline vsebujejo celične stene večine rastlin. Cimetna kislina se biosintetizira iz aminokisline fenilalanin in predstavlja ključni intermediat v šikimatni in fenilpropanoidni biosintezni poti (slika 1), hkrati pa je pomemben prekurzor pri biosintezi flavonoidov in lignina (4, 5).



Slika 1: Biosinteza cimetne kisline in njenih najpomembnejših derivatov.

Figure 1: Biosynthesis of cinnamic acid and its most common derivatives.

Med naravnimi in tudi sintezni derivati cimetnih kislin najdemo predvsem estre, amide in hidrazide, za katere so ugotovili številne biološke učinke (6–9). Zaradi nizke toksičnosti in zdravju koristnih učinkov so derivati cimetne kisline postali predmet številnih raziskav tako v kozmetični industriji kot pri iskanju novih potencialnih učinkovin. Namen prispevka je predstaviti spekter farmakoloških učinkov pomembnejših derivatov cimetne kisline in njihovo potencialno uporabo pri preprečevanju in zdravljenju različnih bolezenskih stanj.

2 Nomenklatura

Glede na substitucijo na fenilnem obroču ločimo naslednje pomembne derivate cimetne kisline (preglednica 1): cimetna, *para*-kumarna, kavna, ferulna, izoferulna in sinapinska kislina (1–4).

Večina derivatov cimetne kisline je v obliki estrov – cinamatov, od katerih so v naravi najpomembnejše klorogenske kisline ter kaftarna in rožmarinska kislina (slika 2) (1).

3 Biološki učinki

Že za samo cimetno kislino so v različnih študijah ugotovili številne biološke učinke, med katerimi izstopajo predvsem antioksidativno, protibakterijsko, protivirusno in antimikotično (protiglivično) delovanje (6–8, 10–13). Derivati hidroksicimetnih kislin so znani po zelo močnem antioksidativnem in protivnetnem delovanju (8), pogosto pa imajo tudi protitumorno delovanje (9). Klorogenska in rožmarinska kislina sta prav tako spojini s številnimi biološkimi učinki (3, 8, 9, 14, 15). Na splošno pa

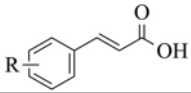
za različne derivate cimetnih kislin navajajo pozitivne učinke pri številnih obolenjih, ki so omenjena in podrobneje opisana pri posamezni skupini bioloških učinkov.

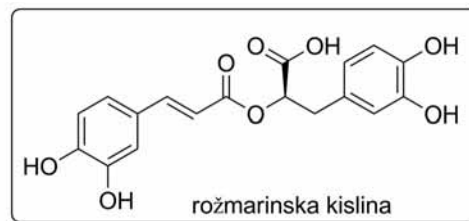
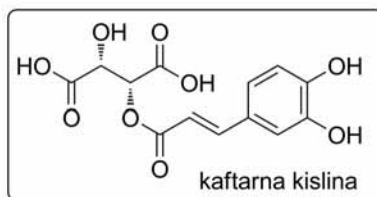
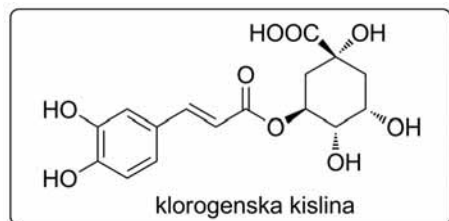
3.1 Antioksidativno delovanje

Najbolj pogosto se kot zelo dobri antioksidanti omenjajo predvsem hidroksicimetne kisline, ki so celo učinkovitejše kot njihovi hidroksibenzojski analogi (primerjava hidroksicimetna kislina – hidroksibenzojska kislina) (8, 16). Razloga za to sta dva: hidroksilna skupina, ki reagira z oksidanti (radikali) in tvori resonančno stabilizirani fenoksilni radikal, in prisotnost propenojske stranske verige, ki zaradi konjugirane dvojne vezi stabilizira nastali fenoksilni radikal (16). Kavna, ferulna in sinapinska kislina so zelo močni antioksidanti in so se v različnih študijah izkazale kot učinkoviti lovci reaktivnih kisikovih vrst, kot so hidroksilni, superoksidni in peroksidni radikal ter singletni kisik. Spojine z antioksidativnimi lastnostmi imajo zato pomembno vlogo pri omejevanju oksidativnega stresa, ki se danes obravnava kot glavni dejavnik pri razvoju kroničnih degenerativnih stanj, kot so različna rakava obolenja, srčno-žilne bolezni, hipertenzija, artritis in nevrodegenerativna stanja (8, 15). Vlogo raznih žitaric, sadja, zelenjave in pijač (npr. kave, čaja, rdečega vina) pri zmanjševanju tveganja za številne bolezni in ohranjanju zdravja pogosto pripisujejo ravno hidroksicinamatom, ki so v večjem deležu prisotni v omenjeni hrani in pijači. Dolgoverižni alkinilni derivati hidroksicinamatov pa zaradi antioksidativnih lastnosti, lipofilnosti in sposobnosti absorpcije UVB-svetlobe kažejo potencial za uporabo v kozmetiki, sončnih kremah in topikalnih formulacijah za zdravljenje eritema in ostalih kožnih bolezni (17).

Preglednica 1: Glavni derivati cimetne kisline.

Table 1: Main cinnamic acid derivatives.

Ime spojine	Kemijsko ime (IUPAC)	Strukturna formula (R)
		
cimetna kislina	<i>trans</i> -3-fenil-2-propenojska kislina = <i>trans</i> -fenilakrilna kislina	H
<i>p</i> -kumarna kislina	(<i>E</i>)-3-(4-hidroksifenil)-2-propenojska kislina	4-OH
kavna kislina	(<i>E</i>)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propenojska kislina	3,4-diOH
ferulna kislina	(<i>E</i>)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)prop-2-enojska kislina	3-OCH ₃ -4-OH
izoferulna kislina	(<i>E</i>)-3-(3-hidroksi-4-metoksifenil)prop-2-enojska kislina	3-OH-4-OCH ₃
sinapinska kislina	(<i>E</i>)-3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)prop-2-enojska kislina	4-OH-3,5-diOCH ₃



Slika 2: Pomembnejši derivati cimetne kisline (klorogenska, kaftarna in rožmarinska kislina).

Figure 2: Most common derivatives of cinnamic acid (chlorogenic, caffeic and rosmarinic acid).

Klorogenske kisline so prav tako dobro poznani antioksidanti, za katere predvidevajo številne pozitivne učinke pri zmanjševanju srčno-žilnih bolezni, sladkorni bolezni tipa 2 in Alzheimerjevi bolezni, kar pripisujejo njihovemu antioksidativnemu in protivnetnemu delovanju (15). Podobno delovanje pa se pripisuje tudi rožmarinski kislini (14).

3.2 Protivnetno delovanje

Številni derivati cimetne kisline so v različnih študijah kazali protivnetno delovanje. Že prej smo omenili klorogenske kisline, ki so znane po svojem antioksidativnem in protivnetnem delovanju (15). Naravni fenilpropani, med katere sodijo tudi bornilni estri kumarne, kavne in ferulne kisline, so se prav tako izkazali kot zelo učinkovite protivnetne spojine. Podobne lastnosti so ugotovili tudi za monoterpenoidne estre cimetne kisline (18).

Že nekaj časa je znano, da ima fenilni ester kavne kisline (angleška oznaka CAPE), ki je strukturni analog flavonoidov in aktivna sestavina propolisa, protivirusne, protivnetne in imunomodulatorne lastnosti. To je vodilo do sinteze številnih substituiranih derivatov tega estra, ki so v različnih študijah kazali obetajoče protivnetno delovanje (19).

S serijo alfa-substituiranih *para*-metilsulfonilcimetnih kislin, načrtovanih na osnovi strukture rofekoksiba (selektivni inhibitor ciklooksigenaze tipa 2-COX-2), so kitajski raziskovalci pripravili spojine s cimetnim fragmentom, ki so imele podobno močno protivnetno delovanje kot rofekoksib, a malo bolj izražene gastrointestinalne stranske učinke, ki pa so bili manj izraženi v primerjavi z antirevmatikom diklofenakom (20). Kitajski patent razkriva derivate cimetne kisline kot selektivne inhibitorje COX-2 (slika 3), ki so uporabni pri zdravljenju bolečine, vnetja ali revmatoidnega artritisa (21).

Ena tipičnih značilnosti vnetja so povišane vrednosti nevtrofilne elastaze v krvi. V *in vitro* študijah so kavna kislina, fukinolinska kislina in camicifugne kisline (slika 3) zavirale delovanje nevtrofilne elastaze. Še posebej izrazito zaviranje elastaze je pokazala fukinolinska kislina, ki se je izkazala kot močno protivnetno sredstvo (22). Protivnetno delovanje pa ima tudi rožmarinska kislina na osnovi zaviranja lipo- in ciklooksigenaz (14).

3.3 Protibakterijsko delovanje

Že nekaj časa je znano, da ima cimetna kislina protibakterijsko delovanje proti nekaterim patogenim bakterijam, vendar slaba vodotopnost

omejuje njeno uporabo (10, 11). Posledica tega je bila sinteza številnih derivatov cimetne kisline, predvsem v obliki estrov in amidov, ki imajo boljše fizikalno-kemijske lastnosti in še vedno obdržijo protibakterijsko delovanje (10). Med temi derivati je bil proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* najučinkovitejši izobutilcinamat, ki predstavlja pomembno spojino pri nadaljnjem razvoju protimikrobnih učinkovin. Predpostavljajo, da izobutilcinamat zaradi svoje lipofilnosti interagira s tiolnimi skupinami proteinov (6, 10).

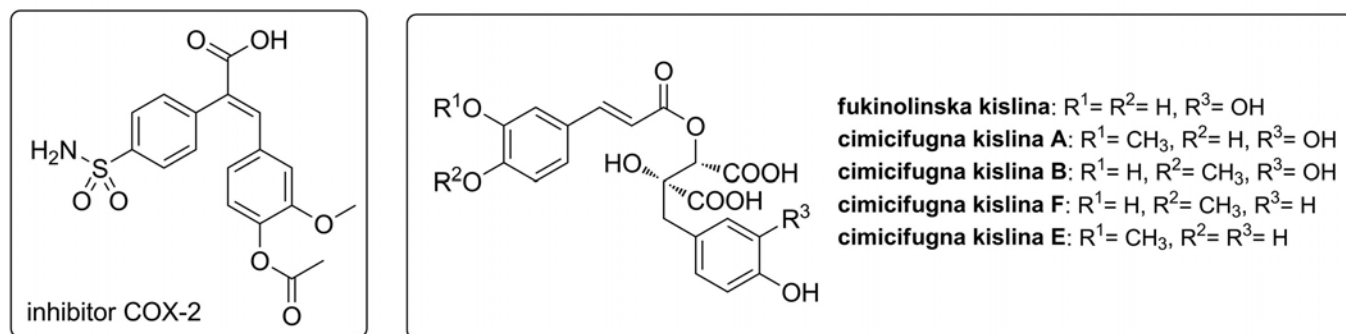
Z molekularno hibridizacijo med cimetno kislino in izoniazidom so dobili *N*-(3-fenilakrilil)hidrazide (slika 4), ki so bili učinkoviti proti mikobakterijam, zato predstavljajo začetno stopnjo pri razvoju novih zdravil proti tuberkulozi (23). Prav tako so tudi gvanilhidrazonski derivati (spojina na sliki 4) izkazovali protimikobakterijsko delovanje z minimalnimi inhibitorskimi koncentracijami (MIC) v mikromolarnem območju (6). Kljub obetavnim rezultatom pa se derivati cimetne kisline za zdaj še ne uporabljajo kot zdravila proti tuberkulozi; ena izmed glavnih omejitev, da bi te spojine prišle v klinično rabo, namreč predstavlja njihova toksičnost (6).

Protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam so opazili tudi pri kumarni, ferulni, sinapični in rožmarinski kislini (14, 24); kavna kislina pa je bila celo učinkovita proti sporam bakterije *Clostridium botulinum* (25) in je imela tudi močno baktericidno delovanje proti povzročitelju listerioze *Listeria monocytogenes* (26).

3.4 Protivirusno delovanje

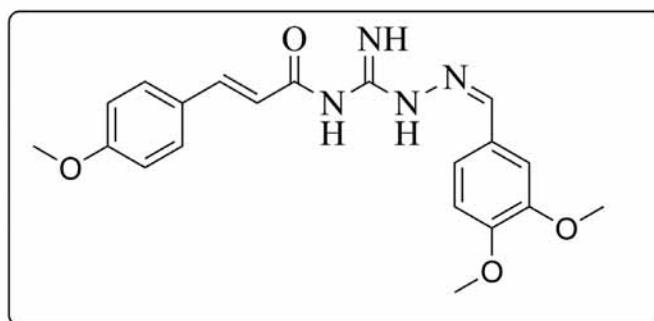
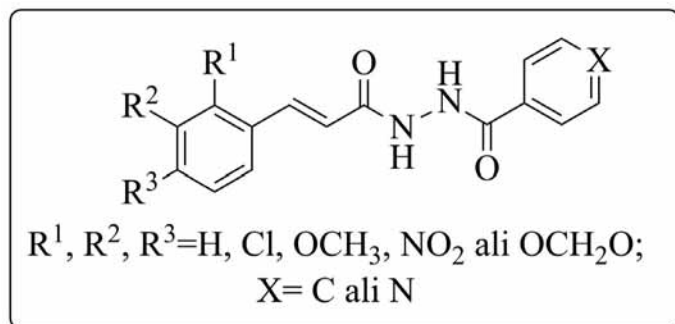
Cimetna kislina zavira replikacijo konjskega herpes virusa 1 (EHV-1), vendar pa nima virucidne aktivnosti (12). Za učinkovitejšo se je izkazala rožmarinska kislina, ki bi jo lahko uporabljali pri terapiji infekcij z virusom *Herpes simplex* v obliki ekstraktov iz melise, ki je eden glavnih naravnih virov te kisline (14).

Fenetilni estri cimetne kisline so se izkazali kot močni inhibitorji HIV-1 integraze (27), ki je ključni encim pri replikaciji virusa HIV. Kot inhibitorje HIV-1 integraze pa je treba omeniti tudi derivate kavne kisline: L-cikorno kislino (slika 5), 3,5-dikafeoilkino kislino in 1-metoksioksalil-3,5-dikafeoilkino kislino, ki so zavirale replikacijo HIV v tkivni kulturi pri koncentracijah 1–4 µg/mL (28). Ker je njihova toksična koncentracija vsaj 100-krat večja od koncentracije za protivirusno aktivnost, so ti derivati pomembni za razvoj novih zdravil pri zdravljenju aidsa.



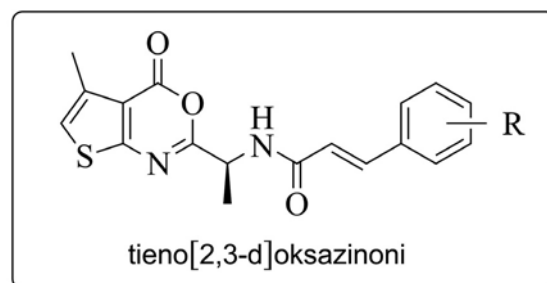
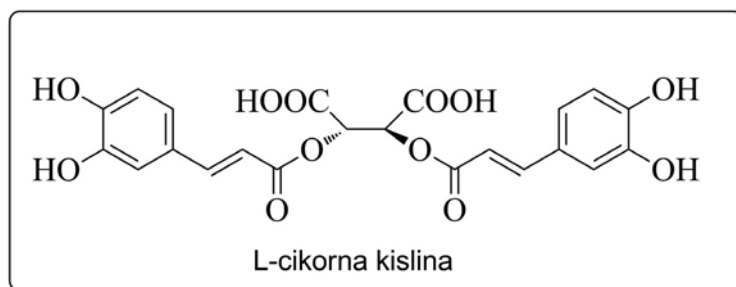
Slika 3: Selektivni inhibitor COX-2 in inhibitorji nevtrofilne elastaze kot potencialne protivnetne učinkovine.

Figure 3: Selective inhibitor of COX-2 and inhibitors of neutrophil elastase as potential anti-inflammatory agents.



Slika 4: Derivati cimetne kisline z antimikobakterijskim delovanjem.

Figure 4. Cinnamic acid derivatives with antimycobacterial activity.



Slika 5: Cikorna kislina in derivati tieno[2,3-d]oksazinonov kot spojine s protivirusnim delovanjem.

Figure 5: Chicoric acid and thieno[2,3-d]oxazinone derivatives as antiviral agents.

Med derivati cimetne kisline s protivirusnim delovanjem velja omeniti še derivate tieno[2,3-d]oksazinonov (slika 5), ki so v nanomolarnih koncentracijah izkazovali protivirusno delovanje proti virusu *Herpes simplex* tipa 2, virusu *Varicella zoster* (povzročitelj noric) in citomegalovirusu (29).

3.5 Protiglivično delovanje

Cimetna kislina je toksična tudi za nekatere glivice. Opisujejo njeno protiglivično delovanje proti *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus* in *Malassezia ovalis*, kar omogoča njeno potencialno uporabo v kozmetičnih pripravkih (losjoni, šamponi) pri zdravljenju infekcij lasišča z *M. ovalis* (13, 30). Še močnejše protiglivično delovanje ima metilni ester cimetne kisline, ki je učinkovit tudi proti glivici *Candida albicans* (31). Tudi klorogenska kislina in *p*-kumarna kislina sta bili učinkoviti proti številnim patogenim glivicam, ki jih pogosto najdemo pri shranjevanju sadja in zelenjave (32).

Izmed številnih strukturnih analogov cimetne kisline je zelo obetavne rezultate dosegla (*E*)-3-(4-metoksi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil)akrilna kislina, ki je zavirala rast glivic iz družine *Aspergillus* (patogene glivice, ki povzročajo bolezni pljuč ali infekcije ušesa) s podobno jakostjo kot antimikotik mikonazol, izkazovala pa je tudi nizko toksičnost pri ribah in dvoživkah, kar kaže na možnost razvoja netoksičnih protiglivičnih sredstev (6).

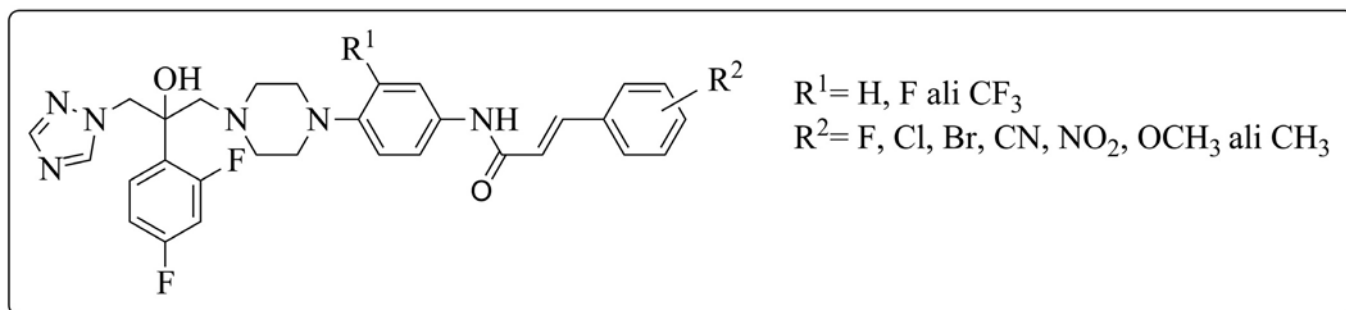
Derivati cimetne kisline s triazolnim obročem (slika 6) so bili aktivni proti osmim človeškim patogenim glivicam (33), zato predstavljajo pomembne spojine pri razvoju novih antimikotikov.

3.5 Protitumorno delovanje

Protitumorno delovanje cimetne kisline je poznano že kar nekaj časa, zlasti v tradicionalni kitajski medicini, saj cimetna kislina predstavlja eno izmed aktivnih sestavin ginsenga. Na rakavih celičnih linijah Caco-2 (celice humanega adenokarcinoma debelega črevesa) so ugotovili, da ima cimetna kislina antiproliferativno delovanje in zavira sintezo DNA v rastočih celicah (9). Pri cimetni kislini v koncentracijah 1–4,5 mM (9) so prav tako opazili *in vitro* zaviranje proliferacije celic pri glioblastomu, melanomu, raku prostate in pljuč.

Protitumorno delovanje je značilno tudi za kavno kislino in njene estre, predvsem fenetilni ester, ki je v študijah poleg antiproliferativnega delovanja značilno preprečeval metastaziranje preko delovanja na matrične proteaze, ki so ključni encimi pri metastazi tumorjev. Fenetilcinamat je induciral tudi apoptozo celic pri levkemiji in vplival na zmanjševanje rasti tumorjev (9).

Poleg naravnih virov so sintetizirali številne estre, amide in hidrazide cimetnih kislin, ki so prav tako izkazovali obetavno protitumorno delovanje, saj so imeli citotoksično, citostatično, antiproliferativno,



Slika 6: Derivati cimetne kisline s triazolnim obročem s širokospektralnim protiglivičnim delovanjem.

Figure 6: Cinnamic acid derivatives with triazole ring having broad-spectrum antifungal activity.

antiangiogenetsko in antilevkemično delovanje, zavirali so številne encime (transglutaminazo, aminopeptidazo N, histon deacetilazo) in povzročali poškodbe DNA (9). Na podlagi teh dejstev lahko rečemo, da derivati cimetne kisline predstavljajo pomembne izhodiščne spojine pri razvoju novih učinkovin za zdravljenje rakavih obolenj.

3.6 Hepatoprotektivno delovanje

Hepatoprotektivni učinek spojin pogosto ugotavljajo na živalskih modelih, kjer spremljajo zmanjšanje akutne poškodbe poškodbe jetrnih celic, ki se pojavijo po aplikaciji tetraklorometana (CCl_4). Cimetna kislina je le zmerno preprečila poškodbe jeter podgan po intoksikaciji s CCl_4 . Boljše rezultate so dobili pri kavni kislini in *p*-kumarni kislini, pri kateri je prišlo do izboljšanja skoraj vseh označevalcev, ki kažejo na poškodbo jeter. Predvidevajo, da so hepatoprotektivne lastnosti kavne kisline in njenih derivatov posledica zaviranja aktivnosti 5-lipoksigenaze, antioksidativnega delovanja in sposobnosti lovljenja in odstranjevanja radikalov, ki povzročajo poškodbe celic (34). Pri *p*-metoksicimetni kislini in izoferulni kislini pa so opazili značilen hepatoprotektivni učinek, in sicer se je ob prisotnosti teh spojin kljub aplikaciji CCl_4 ohranila aktivnost glutatondisulfid reduktaze in glutation *S*-transferaze, prav tako pa ni prišlo do znižanja koncentracije glutationa in povečane tvorbe malonildialdehidov (produktov lipidne peroksidacije), ki je značilna za poškodbe jeter s CCl_4 (35).

Vsekakor pa so pred raziskovanjem hepatoprotektivnih učinkov derivatov cimetnih kislin na človeku potrebni dodatni eksperimenti, ki bodo ovrednotili farmakološke učinke na različnih modelih po inducirani poškodbi jeter (34).

3.7 Hipolipemično in hipoholesterolemično delovanje

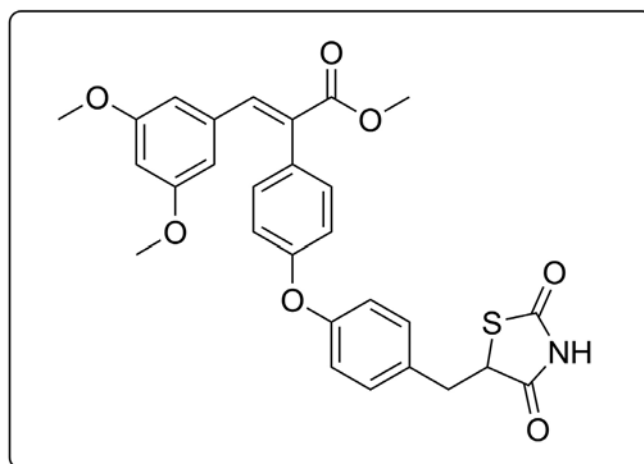
Povišani koncentraciji holesterola (hiperholesterolemija) in maščob oziroma trigliceridov (hiperlipidemija) v krvi sta dva izmed glavnih dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja (36, 37). Sposobnost zniževanja koncentracije holesterola in trigliceridov v krvi so opazili tudi pri nekaterih derivatih cimetne kisline. Za cimetno kislino so ugotovili, da zniža aktivnost jetrne HMG-CoA reduktaze (inhibitorji tega encima se že uporabljajo za zniževanje koncentracije holesterola (38)) pri podganah, hranjenih s hrano, ki je vsebovala visoke koncentracije holesterola (36). Podobne rezultate so dobili tudi pri 3,4-dihidroksicinamatu, ki je značilno znižal plazemske koncentracije holesterola v primerjavi s kontrolno

skupino in skupino, ki je jemala lovastatin (37). 4-alkilamino- in 4-cikloalkilaminocimetne kisline so izkazovale hipolipemični in antiaterosklerotični učinek (7), hipoholesterolemično delovanje pa so našli tudi pri 4-(karboksimetoksi)cimetni kislini (39).

3.8 Antidiabetično delovanje

Izmed različno substituiranih cimetnih kislin sta *m*-hidroksi in *p*-metoksi (ferulna kislina) derivata značilno povečala sproščanje inzulina tako *in vitro* kot *in vivo*, prav tako pa sta obdržala aktivnost ob hkratni aplikaciji glibenklamida, ki se uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 (6). Ferulna kislina je hkrati tudi nekompetitivni inhibitor α -glukozidaze (etilni ester pa kompetitivni), kar vodi do upočasnjene razgradnje ogljikovih hidratov v črevesju in posledično znižanja koncentracije glukoze v krvi (40).

Tiazolidindioni kot učinkovine izboljšajo občutljivost perifernih tkiv na inzulin preko agonističnega delovanja na peroksisom proliferator aktivirajoči receptor tipa γ (PPAR γ) (41). Podobno delovanje so ugotovili tudi za 2,4-tiazolidindionske derivate alfa-fenil substituiranih cimetnih kislin (slika 7). Spojina na sliki je imela zmerno agonistično delovanje na PPAR γ in močan učinek zniževanja koncentracije glukoze v živalskih



Slika 7: 2,4-Tiazolidindionski derivat cimetne kisline z izrazitim antidiabetičnim delovanjem.

Figure 7: 2,4-Thiazolidinedione derivative of cinnamic acid with strong antidiabetic activity.

modelih s sladkorno boleznijo tipa 2. Na podlagi farmakokinetičnih študij so ugotovili, da je ta spojina predzdravilo in da ima tudi njen metabolit podobno delovanje. Ta spojina je vsekakor zelo zanimiva za razvoj novih antidiabetičnih učinkovin.

Antidiabetično delovanje so na testnih podganah opazili tudi pri kavni kislini, ki je zniževala plazemsko koncentracijo glukoze predvsem zaradi povečanja privzema glukoze v tkiva (42), in pri klorogenski kislini, ki je zavirala delovanje jetrne glukoza-6-fosfataze in stimulirala izločanje inzulina (43). Povečano izločanje inzulina in večji privzem glukoze v mišične celice so zaznali tudi pri cikorni kislini (spojina na sliki 5) (44).

3.9 Ostali biološki učinki in uporaba v kozmetologiji

Derivati cimetne kisline so znani po zelo širokem spektru bioloških učinkov (6–9). Poleg zgoraj omenjenih učinkov imajo še antimalarijsko (6), antikoagulatívno (7), antialergijsko (45), cerebroprotektivno (45), antihipertenzívno (39), antifibrotično (46) in anksiolitično delovanje (6).

Za zdaj pa se derivati cimetne kisline množično uporabljajo v kozmetični industriji, saj so sestavina številnih šamponov, dišav, dekorativne kozmetike, toaletnih mil, najdemo pa jih tudi v raznih hišnih čistilih in detergentih (6, 7, 47). V kozmetologiji se uporabljajo predvsem različni estri cimetne kisline, od katerih so najpogostejši metil-, etil- in benzilcinnamat (47, 48).

4 Sklep

Cimetna kislina in njeni derivati so naravno prisotne spojine, pri katerih so odkrili različne biološke učinke. To je vodilo do izolacije in/ali sinteze številnih derivatov, ki so izkazovali antioksidativno, protivnetno, protimikrobno, protitumorno, antidiabetično, hepatoprotektivno in hipolipemično delovanje. Zaradi omenjenih učinkov imajo te spojine velik potencial za uporabo pri preprečevanju določenih bolezni in razvoju novih učinkovin.

5 Literatura

- Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev* 2008; 7: 301–311.
- Clifford NM. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999; 79(3): 362–372.
- Clifford NM. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* 2000; 80(7): 1033–1043.
- Lavrenčič A, Stibilj V. Derivati cimetne kisline in lignin: vsebnost, struktura in lastnosti. *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika* 1999; 74(1): 19–35.
- Edreva A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agric Ecosyst Environ* 2005; 106: 135–146.
- Sharma P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *J Chem Pharm Res* 2011; 3(2): 403–423.
- Simonyan AV. Activity of cinnamic acid derivatives and new methods of their synthesis (a review). *Khim Farm Zh* 1993; 27(2): 21–22.
- Shahidi F, Chandrasekara A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem Rev* 2010; 9: 147–170.
- De P, Baltas M, Bedos-Beval F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-A review. *Curr Med Chem* 2011; 18: 1672–1703.
- Narasimhan B, Belsare D, Pharande D, Mourya V, Dhake A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *Eur J Med Chem* 2004; 39(10): 827–834.
- Truong VT, Boyer RR, McKinney JM, O'Keefe SF, Williams RC. Effects of alpha-cyclodextrin-cinnamic acid inclusion complexes on population of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteric* in fruit juices. *J Food Prot* 2010; 73(1): 92–96.
- Gravina HD, Tafuri NF, Silva Júnior A, Fietto JLR, Oliveira TT, Diaz MAN, Almeida MR. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Res Vet Sci* 2011; 91(3): 158–162.
- Kim JH, Campbell BC, Mahoney NE, Chan KL, Molyneux RJ. Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay. *J Agric Food Chem* 2004; 52(26): 7814–7821.
- Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003; 62: 121–125.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are high bioavailable in humans. *J Nutr* 2008; 138: 2309–2315.
- Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem* 1999; 47(4): 1453–1459.
- Menezes JCJMS, Kamat SP, Cavaleiro JAS, Gaspar A, Garrido J, Borges F. Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. *Eur J Med Chem* 2011; 46(2): 773–777.
- Godoy ME, Rotelli A, Pelzer L, Tonn CE. Antiinflammatory activity of cinnamic acid esters. *Molecules* 2000; 5: 547–548.
- Bose JS, Gangan V. Cinnamic acid, vanillic acid, and benzofuran compounds as chemotherapeutic agents against inflammation and cancer. 2008; WO 200806246.
- Ao G, Zhang Y, Ji H, Deng G, Wu Y, Peng S. Synthesis and anti-inflammatory activity of alpha-substituted p-methylsulfonylcinnamic acids. *J China Pharm Univ (Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao)* 2002; 33: 460–465.
- Mao J, Wang W, Ran X, Tian J, Zhang P. Preparation of cinnamic acid derivatives as COX-2 selective inhibitors. *CN* 2008-10238549.
- Löser B, Kruse SO, Melzig MF, Nahrstedt A. Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med* 2000; 66: 751–753.
- Carvalho SA, da Silva EF, de Souza MVN, Lourenco MCS, Vicente FR. Synthesis and antimycobacterial evaluation of new trans-cinnamic acid hydrazide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18(2): 538–541.
- Barber MS, McConnell VS, DeCaux BS. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochemistry* 2000; 54: 53–56.
- Bowles BL, Miller AJ. Caffeic acid activity against *Clostridium botulinum* spores. *J Food Sci* 1994; 59(4): 905–908.
- Acero-Ortega C, Dorantes-Alvarez L, Hernandez-Sanchez H, Gutierrez-Lopez G, Aparicio G, Jaramillo-Flores ME. Evaluation of phenylpropanoids in ten *Capsicum annum* L. varieties and their inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* Murray, Webb and Swann Scott A. *Food Sci Tech Int* 2005; 11(1): 5–10.
- Burke TR Jr, Fesen MR, Mazumder A, Wang J, Carothers AM, Grunberger D, Driscoll J, Kohn K, Pommier Y. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem* 1995; 38: 4171–4178.
- Robinson WE Jr, Reinecke MG, Abdel-Malek S, Jia Q, Chow SA. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93(13): 6326–6331.
- Jarvest RL, Pinto IL, Ashman SM, Dabrowski CE, Fernandez AV, Jennings LJ, Lavery P, Tew DG. Inhibition of herpes proteases and antiviral activity of 2-substituted thieno[2,3-d]oxazinones. *Bioorg Med Chem Lett* 1999; 9(3): 443–448.
- Baroni A, De Rosa R, De Rosa A, Donnarumma G, Catalanotti P. New Strategies in dandruff treatment: growth control of *Malassezia ovalis*. *Dermatology* 2000; 201: 332–336.
- Ali NAM, Rahmani M, Shaari K., Ali AM, Cheng Lian GE. Antimicrobial activity of *Cinnamomum impressicostatum* and *C. pubescens* and bioassay-guided isolation of bioactive (E)-methyl cinnamate. *J Biol Sci* 2010; 10(2): 101–106.
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Imperato, F. *Phytochemistry: Advances in research*. Research Signpost: Kerala, India, 2006: 23–67.

33. Chai X, Zhang J, Cao Y, Zou Y, Wu Q, Zhang D, Jiang Y, Sun Q. New azoles with antifungal activity: Design, synthesis, and molecular docking. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(2): 686–689.
34. Perez-Alvarez V, Bobadilla RA, Muriel P. Structure-hepatoprotective activity relationship of 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) derivatives. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 527–531.
35. Lee EJ, Kim SR, Kim J, Kim YC. Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl_4 -induced toxicity: Action mechanism and structure-activity relationship. *Planta Med* 2002; 68: 407–411.
36. Lee M-K et al. Hypocholesterolemic and antioxidant properties of 3-(4-hydroxyl)propanoic acid derivatives in high-cholesterol fed rats. *Chem Biol Interact* 2007; 170: 9–19.
37. Lee J-S et al. Lipid-lowering and antioxidative activities of 3,4-di(OH)-cinnamate and 3,4-di(OH)-hydrocinnamate in cholesterol-fed rats. *Clin Chim Acta* 2001; 314: 221–229.
38. Farmer JA. Aggressive lipid therapy in the statin era. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 41(2): 71–94.
39. Guzhva NN, Kazakov AL, Simonyan AV, Kompantsev VA, Luk'yanchikov MS, Drogovoz SM, Ivashev MN. 4-(carboxymethoxy)cinnamic acid possessing hypotension activity. 1991; SU 1446712.
40. Adisakwattana S, Sookkongwaree K, Roengsumran S, Petsom A, Ngamrojnavanich N, Chavasiri W, Deesamer S, Yibchok-anun S. Structure-activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on alpha-glucosidase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 2893–2896.
41. Neogi et al. Synthesis and structure-activity relationship studies of cinnamic acid-based novel thiazolidinedione antihyperglycemic agents. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 4059–4067.
42. Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med* 2000; 66: 228–230.
43. Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burger HJ, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1997; 339(2): 315–322.
44. Tusch D, Lajoix AD, Hosy E, Azay-Milhau J, Ferrare K, Jahannault C, Cros G, Petit P. Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(1): 131–135.
45. Simonyan AV, Oganessian ET, Gushin IS, Gaevyi MD, Saraf AS, Kupko EN, Voitenko VG. Aminobenzoic acid derivatives of cinnamic acid displaying antiallergic and cerebroprotective activity. 1991; SU 1566684.
46. Zammit SC, Cox AJ, Gow RM, Zhang Y, Gilbert RE, Krum H, Kelly DJ, Williams SJ. Evaluation and optimization of antifibrotic activity of cinnamoyl anthranilates. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(24): 7003–7006.
47. Bhatia SP, Wellington GA, Cocchiara J, Lalko J, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on benzyl cinnamate. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: S40–S48.
48. RIFM Expert Panel, Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Tagami H. A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: S1–S23.

Novi doktorji znanosti v letu 2011

Uredila: asist. dr. Janja Zupan, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

dr. MAJA FLORJANIČ, mag. farm.

RAZISKAVE ZAGOTAVLJANJA KAKOVOSTI PREČIŠČENE VODE Z OZONIRANJEM SHRANJEVALNO- DISTRIBUCIJSKEGA SISTEMA

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Dr. Maja Florjanič je raziskovalno delo opravljala predvsem v laboratorijih tovarne zdravil KRKA d.d. Novo mesto, kjer je tudi zaposlena, njena disertacija pa sodi na področje farmacevtskih znanosti in osvetljuje nekatere ključne principe za vzdrževanje ustrezne mikrobiološke kakovosti prečiščene vode v vsakodnevni proizvodnji.

Vsaka plavajoča bakterijska celica se lahko prilepi na površino shranjevalno/distribucijskega sistema, kjer začne izločati v okolico polisaharide, ki jo povežejo s površino in z drugimi bakterijskimi celicami v zapleten ekosistem mikroorganizmov različnih rodov in vrst ter tvorijo biofilm. Biofilm jim nudi zaščito pred stresnimi pogoji okolja, pospeši privzem hranljivih snovi in predstavlja zaradi občasnega odtrganja posameznih celic ali skupkov stalen vir okužb.

Maja Florjanič je v doktorski disertaciji preučila ustreznost razkužilnega učinka ozona in hidrodinamskih pogojev za vzdrževanje predpisane mikrobiološke kakovosti prečiščene vode. V vsakem vodnem sistemu nastane biofilm kljub izredno nizkemu številu planktonskih bakterij in nizkih vrednosti celokupnega organskega ogljika (TOC), iz filma odpušeni mikroorganizmi (MO) pa zato nepredvideno poslabšajo mikrobiološko kakovost vode. V ta namen se je doktorandka več kot 5 let spremljala število planktonskih MO ter TOC v rezervoarju in iztopni vodi, razvila metode za ugotavljanje in napoved prisotnosti biofilma, ter korelirala med številom MO v biofilmu in številom planktonskih MO v iztopni vodi v laboratorijskem modelu. Nekateri pristopi izmed vključenih v te namene doslej še niso bili uporabljeni in tudi ne raziskovani za sisteme prečiščene vode.

Maja Florjanič je raziskala teoretične osnove za nastanek biofilma in njegov obstoj, možnosti za obvladovanje biofilmov v farmacevtskih vodnih sistemih ter metode za ugotavljanje njihove prisotnosti v obliki 4 sklopov (uvodni, zagotavljanje mikrobiološke kakovosti vode z ozonom, vpliv ozona na razvoj planktonskih ali biofilmskih MO v prečiščeni vodi (nizko MO, TOC) ter vpliv hidrodinamskih pogojev na nastanek biofilma v krožnem sistemu).

Razkrila je, da kritično vplivajo na MO kakovost vode odvzemna mesta in cevi za dovajanje vode do opreme, kar je spodbudilo ustrezno ukrepanje. Ozon učinkovito odstrani planktonske MO, za biofilmske pa je

manj učinkovit. Dobre mikrobiološke rezultate gre pripisati kroženju vode skozi rezervoar s 70 ppb ozona, ki jih učinkovito uniči. Dokazala je, da sta stalen pretok vode in nizko število planktonski MO odločilna za razvoj biofilma pri nizki vsebnosti TOC.

Maja Florjanič je med študijem razvila kompetence, ki ji omogočajo uspešno redno načrtovanje in izvajanje proizvodnje prečiščene vode in servisiranje številnih tujih inšpekcij.

dr. JASNA OMERSEL, mag. farm.

POSTTRANSLACIJSKE SPREMEMBE IMUNOGLOBULINOV KOT VZROK AVTOIMUNOSTI

**Mentor: prof. dr. Borut Božič, mag. farm.,
spec. med. biokem.**

Avtoimunost je odziv imunskega sistema proti lastnemu organizmu. Če je obseg avtoimunskih reakcij velik, vodi v okvaro tkiv in nastanek avtoimunskih bolezni. Med vzroke, ki vodijo do nastanka preko 100 tovrstnih bolezni, uvrščamo genetske in imunološke faktorje, hormonsko stanje in vplive iz okolja. Večinoma so študije usmerjene v iskanje sprememb v regulaciji imunskega sistema ali v spremenjenih lastnih antigenih; šele v zadnjih letih so se odprla vprašanja o spremembah naravnih in antimikrobnih protiteles, ki vodijo v avtoimunost.

Dr. Jasna Omersel je v svojem delu dokazala, da lahko delna oksidacija protiteles, oziroma njihovih vezišč, vodi do spremenjenih vezavnih sposobnosti, kar se kaže kot sprememba v specifičnosti protiteles do molekul lastnega organizma. Na molekulskem nivoju je to posledica kemijske spremembe, kar je dokazala s povečano vsebnostjo karbonilnih skupin v protitelesih, ki je korelirala z dvigom imunoreaktivnosti. Spremembe imunoreaktivnosti oz. specifičnosti so odvisne od razreda protiteles, časa oksidacije in sredstva oksidacije. S specifičnimi encimsko-imunskimi metodami je dokazala, da pridobijo protitelesa zdravih ljudi po delni oksidaciji lastnosti diagnostično pomembnih avtoprotiteles. V biološkem sistemu je dokazala, da oksidirana protitelesa povzročijo izražanje provnetnega interlevkina IL-6, kar potrjuje predpostavljeno patogeno vlogo redoks-reaktivnih protiteles.

Omersel Jasna je s svojim delom vplivala na razumevanje možnih mehanizmov avtoimunosti, kar je pomembno tudi z vidika potencialnih modelov zdravljenja ali preventive.

dr. SAMO TURK, mag. farm.

ODKRIVANJE NOVIH INHIBITORJEV BIOSINTEZE BAKTERIJSKEGA PEPTIDOGLIKANA Z RAČUNALNIŠKIMI METODAMI

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Biosinteza peptidoglikana vključuje okrog 20 reakcij, ki potekajo tako v citoplazmi, kot na zunanji strani celične stene. Te reakcije katalizirajo tako encimi, ki so že znane tarče, kot tudi encimi, katerih inhibitorji še niso v klinični rabi. Ker je peptidoglikan ključnega pomena za preživetje bakterij, lahko inhibicija katerega koli od teh encimov pomeni smrt bakterije ali zmanjšanje virulence.

Dr. Samo Turk je opravil iskanje novih inhibitorjev encimov, udeleženih v sintezi peptidoglikana, z modernimi metodami računalniško podprtega načrtovanja in rešanja spojin. Pri tem je uporabili različne metode filtriranja in načrtovanja virtualnih knjižnic spojin, rešanje na osnovi liganda in sidranje. Pri svojem delu je bil uspešen in je v sodelovanju s sodelavci na fakulteti, kot tudi z različnimi partnerji iz tujine v okviru mednarodnega projekta v 6. OP »EUR-INTAFAR«, odkril vrsto inhibitorjev encimov, udeleženih v biosintezi peptidoglikana. Tako je sodeloval pri odkritju novih inhibitorjev ligaz MurD in MurF, novih hidroksietilenskih inhibitorjev ligaze VanA, in tudi novih inhibitorjev glikoziltransferaz z zanimivim mehanizmom delovanja. Za enega od inhibitorjev glikoziltransferaz so namreč dokazali, da deluje preko vezave na substrat lipid II. Sodeloval je pri odkritju novih nekovalentnih inhibitorjev različnih transeptidaz iz rezistentnih bakterijskih sevov, ki imajo tudi dobro protibakterijsko aktivnost. Njegovo virtualno rešanje visoke zmogljivosti je bilo osnova za odkritje prvih znanih inhibitorjev encima PgdA, ki bi lahko potencialno zmanjšali bakterijsko virulenco. Ker gre v vseh naštetih primerih za nove tarče ali pa nov mehanizem delovanja na že znane tarče, predstavljajo vsi odkriti inhibitorji dobro izhodišče za optimizacijo in nadaljnji razvoj protimikrobnih učinkovin.

Samo Turk je v svoji dosednji karieri v soavtorstvu objavil 13 člankov v revijah z dejavnikom vpliva, dva članka sta v tisku, vloženi pa sta tudi dve mednarodni patentni prijavi.

dr. BOJANA MIRKOVIČ, mag. farm.

REGULACIJA ENDOPEPTIDAZNE IN EKSOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI KATEPSINA B

Mentor: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Dr. Bojana Mirković je raziskovala proteolitično delovanje cisteinske proteaze katepsina B in njegovih eksogenih inhibitorjev. Tako je za nevtralizacijsko protitelo 2A2 dokazala, da se epitop nahaja v bližini zaporne zanke, to je strukture, ki določa endo ali ekso peptidazno

aktivnost katepsina B. Protitelo inhibira endopeptidazno aktivnost katepsina B, hkrati pa aktivira njegovo eksopeptidazno aktivnost. Glede specifičnosti bi bilo nevtralizacijsko protitelo primerno za inaktivacijo katepsina B v patoloških procesih, problem pa je lahko njegova biološka uporabnost. Zato se je v nadaljevanju usmerila v pripravo majhnih sinteznih inhibitorjev katepsina B, ki bi imeli podobne inhibitorne lastnosti kot monoklonsko protitelo 2A2. S pomočjo virtualnega rešanja se je kot tak kandidat izkazal nitroksolin, ki je že uveljavljen antibiotik za zdravljenje urinarnih infekcij. Nitroksolin je značilno zavrl invazijo tumorskih celic *in vitro* ter *in vivo*. S pomočjo določene kristalne strukture kompleksa katepsin B/nitroksolin, pridobljene z rentgensko spektroskopijo, je bil razložen tudi mehanizem vezave inhibitorja z encimom. V okviru doktorskega dela je kot inhibitorje katepsina B okarakterizirala tudi 4,6-bis(benziltio)-1,3,5-triazin-2(1H)-one in dokazala, da spojine, ki vsebujejo 4-aminofenol, delujejo kot lažni pozitivni inhibitorji katepsina B. Bojana Mirković je rezultate doktorskega dela objavila v šestih člankih v revijah z dejavnikom vpliva in je tudi avtorica mednarodne patentne prijave.

dr. SAŠA HABERL, univ. dipl. mikrobiol.

ANALIZA VPLIVA RAZLIČNIH PARAMETROV NA UČINKOVITOST GENŠKE ELEKTROTRANSFEKCIJE V CELIČNIH KULTURAH IN V IN VITRO MODELU TKIVA

Mentorica: doc. dr. Mojca Pavlin, univ.dipl.fiz.

Somentorica: prof. dr. Irena Mlinarič Raščan, mag. farm.

Dr. Saša Haberl se je osredotočila na področje analize in optimizacije elektrotransfekcije. Le-ta omogoča preprost in varen način vnosa genetskega materiala v celice *in vitro* in *in vivo* in ima številne prednosti pred ostalimi metodami. Vendar pa mehanizmi genske elektrotransfekcije še niso popolnoma pojasnjeni, raziskave *in vitro* pa ne omogočajo analize v razmerah podobnih v tkivih, kjer je mobilnost DNA omejena z zunajceličnim matriksom. Glavni cilji doktorske naloge so bili boljše razumevanje mehanizmov elektrotransfekcije ter razvoj preprostega *in vitro* modela tkiva, ki bi omogočal analizo mobilnosti DNA v razmerah podobnim v tkivu.

Saša Haberl je analizirala vpliv koncentracija Mg^{2+} ionov v elektroporacijskem mediju na različne korake elektrotransfekcije, od elektropermeabilizacije membrane, vezave DNA na membrani do učinkovitosti vnosa. Potrdila je hipotezo, da je sam proces sestavljen iz več korakov ter pokazala da večja vezava DNA na membrane ne vodi nujno do bolj uspešne transfekcije ter, da ionska sestava vpliva tudi na prehod DNA preko membrane in prenos do celičnega jedra.

Nadalje je razvila postopek, ki omogoča gojenje celic v 3-D kolagenskem modelu tkiva ter uspešen vnos DNA z električnimi pulzi, primerljiv z rezultati dobljenimi *in vivo*. Model omogoča preučevanje in napovedovanje mehanizmov genske elektrotransfekcije v bolj realnem

in vivo okolju, izvedla pa je tudi analizo vpliva mobilnosti DNA v tovrstnem 3-D gelu na učinkovitost transfekcije.

Doktorska disertacija Saše Haberl predstavlja izvirne prispevke k znanosti, saj omogoča zasnovo novih študij optimizacije vnosa v 3-D gelih, njeni rezultati pa lahko v prihodnosti pripomorejo k izboljšanju učinkovitosti genske elektrotransfekcije v biomedicinskih aplikacijah kot sta genska terapija ter genska vakcinacija.

dr. NACE ZIDAR, mag. farm.

NAČRTOVANJE IN SINTEZA HETEROCIKLIČNIH INHIBITORJEV LIGAZ MurC-E

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Encimi udeleženi v zapletenem in za bakterijo značilnem procesu sinteze peptidoglikanske stene so odlična tarča za razvoj protibakterijskih učinkovin. V citoplazemskih stopnjah njegove biosinteze sodeluje skupina ligaz Mur (MurC–MurF), ki katalizirajo zaporedje štirih reakcij, pri katerih pride do pretvorbe UDP-*N*-acetilmuraminske kisline do UDP-*N*-acetilmuramoil-pentapeptida. Kljub številnim raziskavam trenutno na tržišču še ni terapevtsko uporabnega inhibitorja ligaz Mur. V okviru doktorskega dela se je doktorand ukvarjal z načrtovanjem, sintezo in biološkim vrednotenjem novih nizkomolekularnih inhibitorjev encimov MurC–E. Kot osnova pri načrtovanju so mu služile strukture naravnih substratov in produktov ter tridimenzionalne zgradbe aktivnih mest encimov. Izhajajoč iz spojine kinazolinskega tipa dobljene z virtualnim reševanjem je pripravil več strukturnih analogov, v katerih je kinazolinski obroč nadomestili z (Z)-5-benzilidenrodaninskim ali (Z)-5-benzilidentiazolidin-2,4-dionskim fragmentom in na ta način prišel do inhibitorja z IC₅₀ vrednostjo 174 μM na encim MurD iz *E. coli*. S sistematičnim uvajanjem strukturnih sprememb je pripravil izboljšane serije inhibitorjev z IC₅₀ vrednostmi do 28 μM. Poleg tega je za tri spojine iz serije pridobil kristalne strukture kompleksov z encimom MurD iz *E. coli*. Kristalne strukture so razkrile položaj vezave inhibitorjev v aktivnem mestu in predstavljajo dobro osnovo za nadaljnjo optimizacijo. Eni spojin iz serije so izmerili šibko protibakterijsko delovanje na seva *S. aureus* ATCC 29213 in *E. faecalis* ATCC 29212 z MIK vrednostma 128 μg/mL. V okviru svojega dela je razvil tudi več originalnih sinteznih metod za pripravo omenjenih spojin. Rezultati dobljeni v okviru doktorske disertacije Naceta Zidarja so bili objavljeni v 9 znanstvenih člankih v mednarodnih revijah.

dr. STANE PAJK, mag. farm.

VPLIVI NEKATERIH PRODUKTOV OKSIDACIJE HOLESTEROLA NA STRUKTURIRANOST MODELNIH MEMBRAN

Mentor: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Somentor: izr. prof. dr. Janez Štrancar, dipl. ing. fiz.

Spoznavanje vplivov produktov radikalnih oksidacij fiziološko pomembnih snovi postaja vse aktualnejše. To so snovi, ki nastajajo mimo ustaljenih encimsko kataliziranih reakcij, v njih pa je udeležen kisik oziroma reaktivne kisikove zvrsti. Čeprav so omenjeni produkti količinsko prisotni v komaj še zaznavnih koncentracijah pa lahko skozi daljši čas povzročijo spremembe, ki pomenijo začetek degenerativnega obolenja. V procesih lipidne peroksidacije in širše, oksidativnega stresa, se v membranah prisoten holesterol v radikalno sproženih reakcijah oksidira. Nastajajo različni oksisteroli.

Dr. Stane Pajk je raziskoval vplive nekaterih oksisterolov na strukturiranost modelnih membran. Transmembransko signaliziranje kot ustaljen tok informacij med celicami je odvisno od dinamičnih lastnosti biološke membrane, te pa so odvisne od membranskih sestavin. S spreminjanjem posameznih sestavin (prisotnost oksisterolov) se spreminja tudi membranska strukturiranost in s tem povezano signaliziranje. Kot metodo za proučevanje vpliva oksisterolov na membransko strukturiranost je izbral metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR), kot objekt proučevanja pa membrane liposomov.

Ugotovil je, da je vpliv oksisterola odvisen tako od koncentracije le-tega kot od vrste oksisterola. Oksisteroli z več polarnimi skupinami v drugem obroču steroidnega skeleta, imajo večji vpliv na strukturiranost modelne membrane, še več, rezultati kažejo, da večja polarnost drugega obroča v primerjavi s holesterolom, povzroči drugačno interakcijo oksisterola z liposomsko membrano in posledično tudi drugačno strukturiranost. Omenjene ugotovitve so temeljnega pomena za nadaljnje raziskave na realnih bioloških membranah. Stane Pajk je tudi v tej smeri storil prve korake z razvojem novih molekularnih orodij za proučevanje strukturiranost bioloških membran in vplivov na to strukturiranost. Sintetiziral je nove dvojne probe, ki se vgrajujejo v biološko membrano, imajo fluoroformo in hkrati paramagnetno nitroksidno skupino. Omenjene probe omogočajo, da hkrati pridobimo informacijo, kje v biološkem vzorcu je proba (fluorescentna mikroskopija) in kakšna je dinamika v njeni neposredni okolici (EPR spektroskopija). S tem je kot prvi odprl pot tovrstnim raziskavam membranskih domen. S svojim znanjem (razvoj fluorescentne probe s selektivnim porazdeljevanjem v izbrano fazo) pa je sodeloval tudi v skupini na IJS, ki je svoje rezultate objavila v *Nature photonics*.

**dr. LJUBA KRNJAK, prof. kem.
in biol. spec. med. biok.**

PROGNOSTIČNI POMEN PROTEINA S100B IN NJEGOVE PODENOTE S100BB KOT KAZALCA ZA OCENO OKVARE MOŽGANOV PRI POŠKODBAH GLAVE

**Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med.
biokem.**

Somentor: doc. dr. Marjan Koršič, dr. med., spec. kirurg.

Poškodba glave je eden od največjih zdravstveno socialnih problemov v razvitih državah in predstavlja glavni vzrok dela nezmožnosti prebivalstva. Ob sprejemu v bolnišnico je 10% vseh poškodb glave opredeljenih kot huda nezgodna poškodba glave, nadaljnjih 10% je opredeljenih kot srednje huda, 80% pa kot blaga poškodba glave. Mortaliteta po hudi nezgodni poškodbi glave je ocenjena na 20 do 30%, invalidnost preživelih pa na 50%. Zato je iskanje zanesljivega biokemičnega označevalca možganske poškodbe smiselno in predstavlja znanstveni izziv že 30 let. Rutinsko določanje koncentracij S100B v serumu poškodovancev bi predstavljalo velik pozitiven premik pri obravnavi poškodovancev s sumom na poškodbo možganov.

Dr. Ljuba Krnjak je dokazala, da sta LS100B in S100BB povišana pri vseh nezgodnih poškodbah glave. Obseg in teža poškodbe vplivata na koncentracijo proteina S100B in njegove podenote S100BB. Protein S100B ima visoko negativno napovedno vrednost poškodbe možganov in je zato uporaben pri odločanju za nadaljnje spremljanje poškodovanca s CT. Mejna vrednost je za S100B 0,15 µg/L.

Bolniki z nižjimi koncentracijami proteina S100B so imeli krajšo ležalno dobo kot bolniki z višjimi koncentracijami. Visoke serumske koncentracije 24 ur po poškodbi pomenijo slabo prognozo. Dinamika naraščanja koncentracij v prvih 24 urah je večja pri tistih, ki niso preživeli. Rezultati te doktorske naloge kažejo, da je poleg kliničnega in radiološkega pregleda smiselno redno spremljanje koncentracije proteina S100B za napoved diagnoze in prognoze poškodovancev po nezgodnih poškodbah glave.

dr. TIHOMIR TOMAŠIČ, mag. farm.

RAČUNALNIŠKO PODPRTO NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH HETEROCIKLIČNIH ZAVIRALCEV LIGAZ Mur

Mentorica: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Pojav multirezistentnih bakterij predstavlja vedno večji problem pri zdravljenju infekcijskih okužb, saj nam v boju proti nekaterim rezistentnim

sevom že primanjkuje učinkovitih zdravilnih učinkovin. Zaradi tega je dr. Tihomir Tomašič v luči nujnega razvoja in odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin v svojem doktorskem delu iskal nove protibakterijske učinkovine z novimi mehanizmi delovanja. Z uporabo molekulskega modeliranja je na osnovi znanih tridimenzionalnih struktur encimov (»structure based drug design«) sintetiziral nove zaviralce ligaz MurC, MurD in MurE, ki so udeleženi v znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana, gradnika bakterijske celične stene, pomembne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Velik izziv mu je predstavljalo načrtovanje zaviralcev ligaz Mur z multiplim mehanizmom delovanja, saj bi na ta način lažje dosegli protibakterijsko delovanje in se borili proti bakterijski rezistenci. Da bi se izpopolnil v novih metodah molekulskega modeliranja je v letu 2008 štiri mesece gostoval v laboratoriju prof. dr. Gerharda Klebeja v Marburgu v Nemčiji, na Institut für Pharmaceutische Chemie, Philipps Universität Marburg. Tihomir Tomašič je svoje znanstvene dosežke objavil v 10 člankih v mednarodnih revijah s faktorjem vpliva ter predstavil na številnih mednarodnih konferencah. V zaključku doktorskega usposabljanja je prejel enoletno štipendijo Svetovne federacije znanstvenikov pri Slovenski znanstveni fundaciji. Poleg tega mu bo za znanstvene dosežke podeljena Krkina nagrada za leto 2011.

dr. ILIJA ILIČ, mag. farm.

ŠTUDIJ KOMPRESIBILNOSTI IN KOMPAKTIBILNOSTI IZBRANIH FARMACEVTSKIH EKSCIPIENTOV

Mentor: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Dr. Ilija Ilič je nalogo izdelal na Fakulteti za farmacijo na Univerzi v Ljubljani, delno pa tudi na Univerzi v Szegedu na Madžarskem. Tematika disertacije je deformacija farmacevtskih snovi med procesom stiskanja tablet, kjer se glavni deformacijski procesi – elastična in plastična deformacija ter fragmentacija – praviloma prekrivajo. Uporabil je različne modele, npr. Heckelov in Walkerjev in različne metodologije določanja tehnološko relevantnih mehanskih lastnosti nekaterih farmacevtskih ekscipientov: t.j. pri laktozah, mikrokristalni celulozi, koruznem škrobu, kalcijevem hidrofosforatu in izomaltu. V nadaljevanju je podrobno študiral vpliv granulacije teh ekscipientov na mehanske lastnosti izdelanih granul. Originalni prispevek naloge pa predstavlja uvedba proučevanja mehanskih lastnosti na nivoju enega delca z uporabo nanoindentacije in te rezultate primerja s tistimi na makro skali. Ti podatki in povezave so izjemnega pomena in aktualna raziskovalna novost na farmacevtsko tehnološkem področju.

Znanja in podatke o deformacijskih lastnosti farmacevtskih snovi je Ilija Ilič tudi aplikativno uporabil za razvoj večtenotne farmacevtske oblike – t.j. tablete sestavljene iz filmsko obloženih pelet. Tudi to je področje izjemnega zanimanja v farmacevtski industriji, tako originatorski kot generični.

dr. NIKOLA MINOVSKI, mag. farm.

UPORABA KEMOMETRIČNIH PRISTOPOV ZA QSAR ŠTUDIJE FLUOROKINOLONOV KOT PROTITUBERKULOZNIH UČINKOVIN

Mentor: prof. dr. Tomaž Šolmajer, dipl. ing. fiz.

Somentor: doc. dr. Marjan Vračko Grobelšek, dipl. ing. fiz.

Dr. Nikola Minovski je v svoji doktorski disertaciji uvodoma predstavil protituberkulozne učinkovine, 6-fluorokinolone, ki delujejo kot zaviralci encima DNA giraze A. To je bakterijski encim, ki kontrolira proces topoloških sprememb bakterijske DNA (cepitev in ponovno povezavo verige). Fluorokinoloni zavirajo girazno aktivnost s stabilizacijo kompleksa med girazo A in cepjeno DNA. Klinične raziskave so pokazale, da imajo znane kinolonske učinkovine tudi nezaželene stranske učinke, zato so novejšie raziskave usmerjene v iskanje kinolonskih analogov z izboljšano biološko učinkovitostjo in zmanjšano toksičnostjo.

Za načrtovanje novih 6-fluorokinolonov kot potencialnih novih zaviralcev DNA giraz, je izdelal kompleksen pristop na treh nivojih: na prvi ravni je na osnovi znanih 6-fluorokinolonov, za katere so bile vrednosti biološke aktivnosti eksperimentalno določene, na treh nizih molekul ugotovil kvantitativno razmerje med strukturo in aktivnostjo (QSAR modele). Ti modeli, ki so bili razviti z uporabo multiple linearne regresije (MLR), nato pa validirani še z uporabo nelinearnih pristopov - Kohonenove umetne nevronske mreže (KANN) in protitočne umetne nevronske mreže (CP ANN), omogočajo napoved biološke aktivnosti za nove analoge s 6-fluorokinolonsko strukturo. Na drugi ravni je na osnovi sintezne poti za klasične zaviralce DNA giraze ciprofloksacina, moksifloksacina in ofloksacina generaliral virtualno kombinatorično knjižnico (skupaj 53.871 spojin) vseh možnih R1, R7 in R1,R7 substituiranih analogov s 6-fluorokinolonskim skeletom. Iz te knjižnice je z uporabo filtrov, s katerimi izberemo spojine z zdravilni učinkovini podobno strukturo, izbral niz 427 spojin, ki jim je s poprej razvitimi QSAR modeli določil virtualno biološko aktivnost. Na tretjem nivoju je nato te spojine sidral v (i) eksperimentalno določeno strukturo kompleksa DNA giraza-DNA-levofloksacin in (ii) pripravil več farmakofornih modelov na osnovi strukture ligandov in na osnovi eksperimentalno določene strukture aktivnega mesta encima tarče. Položaj v aktivnem mestu giraze A vseh spojin, ki so bile izbrane na osnovi teh modelov, je analiziral in njihove interakcije z okolico v aktivnem mestu ovrednotil s primerjavo z znanimi, klinično uporabljanimi 6-fluorokinoloni. Na ta način je z uporabo razpoložljivih kemometričnih pristopov in sodobnih metod molekulskega modeliranja izbral serijo šestih novih 6-fluorokinolonskih analogov z visoko predvideno biološko aktivnostjo ($0.0021 < \text{MIC} [\mu\text{g}/\text{mL}] < 0.1$).

Dr. Minovski je z uporabo široke palete sodobnih metod kemometrije in molekulskega modeliranja zgradil modele kvantitativnega razmerja med strukturo in aktivnostjo (QSAR) in na osnovi dostopnih eksperimentalnih podatkov iz kristalnih struktur kompleksov encim-zaviralec povečal razumevanje zaviranja encima na atomskem nivoju. Ti rezultati omogočajo tako optimizacijo do sedaj znanih spojin vodnic kot identifikacijo novih razredov potencialnih inhibitorjev z uporabo

virtualnega rešetanja knjižnic dosegljivih spojin. Disertacija predstavlja pomembno izhodišče za načrtovanje novih antimikrobnih učinkovin 6-fluorokinolonskega tipa in je tudi prispevek k razumevanju mehanizma inhibicije DNA giraz A.

dr. ŠTEFAN STARČEVIĆ, mag. farm.

NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH NESTEROIDNIH INHIBITORJEV 17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE TIPA 1

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Somentorica: izr. prof. dr. Tea Lanšnik Rižner, univ. dipl. kem.

V svoji doktorski disertaciji je dr. Štefan Starčević načrtoval, sintetiziral in biokemijsko vrednotil nove inhibitorje 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1 (17 β -HSD1) kot potencialne protitumorne učinkovine. 17 β -HSD1 katalizira redukcijo estrona do najmočnejšega estrogena estradiola in tako predstavlja pomembno tarčo za razvoj novih učinkovin za zdravljenje hormonsko odvisnih oblik raka. Kljub intenzivnemu načrtovanju in iskanju inhibitorjev 17 β -HSD1, ki potekata že vse od odkritja encima konec petdesetih let dvajsetega stoletja, ter kljub razrešeni kristalni strukturi encima, klinično uporabnega zdravila še ni. Nekateri inhibitorji 17 β -HSD1 so pomembno vplivali na zmanjšanje tumorske mase pri živalskih modelih, vendar niso uspeli preiti v klinične faze razvoja novih zdravil. V zadnjem času pospešeno iščemo predvsem nesteroidne inhibitorje 17 β -HSD1, ki bi imeli boljše farmakološke in farmakokinetične lastnosti od steroidnih učinkovin.

Ker sta oblika in struktura aktivnega mesta encima visoko komplementarni s ploščato strukturo estrogenskega substrata, je Štefan Starčević uporabili steroidomimetični pristop načrtovanja novih nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1. Poleg planarne hidrofobne steroidne strukture je pri načrtovanju spojin upošteval še razporeditev in medsebojno oddaljenost polarnih skupin na steroidnem substratu. S sintezo je pripravil knjižnico različnih derivatov kumarina in indola, ki oponašajo steroidni skelet, ter z njimi razložil povezavo med strukturo in delovanjem (SAR) za inhibicijo 17 β -HSD1.

Štefan Starčević je pokazal, da 7-fenilni derivati kumarinov, ki imajo na mestu 3 kumarinskega skeleta še acetilno skupino, dobro in selektivno (v primerjavi s 17 β -HSD2) inhibirajo 17 β -HSD1. Potrdil je tudi, da je njihova afiniteta do receptorjev za estrogene zanemarljiva, kar nakazuje na njihovo neestrogeno delovanje. Najmočnejši kumarinski inhibitor 17 β -HSD1 kompetitivno in reverzibilno inhibira tarčni encim z vrednostjo K_i 53 nM. Poleg tega je za to spojino uspel dokazati tudi njeno znotrajcelično delovanje na tarčo, kar je privedlo do zmanjšanja od estrona odvisne proliferacije celic T-47D. Te človeške rakave celice endogeno izražajo 17 β -HSD1 in jih uporabljamo kot enega od celičnih modelov za proučevanje od estrogenov odvisnega raka dojke. V nasprotju s kumarinskimi derivati se derivati indola niso izkazali kot dobri inhibitorji 17 β -HSD1.

V naslednji fazi svojega dela je z uporabo strukturno podprtega virtualnega reševanja visoke zmogljivosti odkril nove derivate auronov, ki izjemno učinkovito inhibirajo 17 β -HSD1. S pomočjo računalniških metod je razložil tudi povezavo med strukturo in delovanjem za inhibitorno delovanje auronov na 17 β -HSD1. Najmočnejši auronski inhibitor je inhibiral tarčni encim z IC₅₀ vrednostjo 45 nM.

Z doktorskim delom je Štefan Starčević uspel razkriti strukturne elemente, ki so pomembni za učinkovito načrtovanje selektivnih nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1 (v primerjavi s 17 β -HSD2 in vezavo na receptorje za estrogene). Uspelo mu je tudi potrditi uspešnost strukturno podprtega virtualnega reševanja visoke zmogljivosti pri iskanju in načrtovanju novih inhibitorjev 17 β -HSD1. Dognanja njegovega doktorskega dela pa bodo pomembno pripomogla k uspešnemu preboju nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1 v klinične faze razvoja.

dr. DANIJELA FURLAN, uni. dipl. kem. spec. med. biokem.

NEKONJUGIRANA HIPERBILIRUBINEMIJA NOVOROJENČKOV IN SPREMEMBE V GENU ZA UDP-GLUKURONIL TRANSFERAZO 1A1 (UGT1A1)

Mentorica: zasl. prof. dr. Jana Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

Dr. Danijela Furlan je preučevala povezanost polimorfizmov A(TA)₅₋₈TAA v območju TATA ponavljajočega zaporedja v promotorski regiji gena UGT1A s pojavom hiperbilirubinemije novorojencev. Bilirubin je do neke meje zaščita pred singletnim kisikom in drugimi radikali, vendar pa je pri vrednostih, ki presežejo fiziološke meje, nevrotoksičen in zahteva niz ukrepov in kot skrajni, zamenjava krvi z izmenjalno transfuzijo. Omenjene polimorfizme poznamo pod klinično oznako Gilbertov sindrom (GS), ki se v kavkaški populaciji pojavlja v okoli 15% in se deduje avtosomno recesivno. Ugotovljeno je tudi, da imajo osebe z GS lahko moteno tudi glukuronizacijo zdravil, ki zaradi tega lahko delujejo toksično.

V raziskavo je vključila skupno 335 novorojenčkov (dve skupini) in 236 odraslih prostovoljcev. V prvi preiskovani skupini 147 novorojenčkov je ugotavljala razlike med donošenimi in nedonošenimi novorojenčki z nepojasnjeno patološko hiperbilirubinemijo, v drugo preiskovano skupino je vključila 188 zdravih zaporedno rojenih donošenih novorojenčkov, ki jim je bila odvzeta popkovnična kri in 3. dan ter kasneje venska kri. Za izvedbo raziskave je uporabila sodobne tehnike in metode molekularne genetike in laboratorijske medicine, za vrednotenje rezultatov pa ustrezne statistične analize. Dokazala je, da je patološka nekonjugirana hiperbilirubinemija novorojenčkov povezana s polimorfizmom A(TA)₇TAA v promotorski regiji gena UGT1A1, da se tako akutna kot prolongirana hiperbilirubinemija pogostejše pojavlja pri dečkih kot pri deklicah, da sta genotip (TA)_{7/7}, značilen za Gilbertov sindrom in alel (TA)₇, pogostejša pri dečkih z akutno in prolongirano nekonjugirano hiperbilirubinemijo ter da je z merjenjem koncentracije bilirubina v popkovnični krvi možno

napovedati patološko nekonjugirano hiperbilirubinemijo. Podala je tudi predlog, da se pri vseh novorojenčkih uvede merjenje koncentracije bilirubina v neinvazivno odvzeti popkovnični krvi in se tistim s preseženo mejno koncentracijo izvede tudi genotipizacija, kar omogoča v kasnejšem obdobju farmakogenetsko svetovanje za ustrezen izbor zdravil pri zdravljenju kasnejših bolezni vsem posameznikom z odkritim polimorfizmom (TA)_{7/7}.

dr. ZORAN BUBNIČ, uni. dipl. ing. kem.

RAZVOJ IN VALIDACIJA METOD ATOMSKE ABSORPCIJSKE SPEKTROMETRIJE IN NJIHOVA UPORABA V KONTROLNIH LABORATORIJIH V PROIZVODNJI ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Mentor: prof. dr. Marjan Veber, uni. dipl. kem.
Somentor: prof. dr. Uroš Urleb, mag. farm.

Kovine so v zdravilnih učinkovinah lahko prisotne tudi kot nečistote zaradi uporabe kovinskih katalizatorjev, zaradi surovin, ki vsebujejo kovinske ione ali zaradi izločanja kovin s površin opreme. Zaradi možnih toksičnih učinkov kovin postaja njihovo določanje in spremljanje njihovih koncentracij v vseh stopnjah sinteze vse pomembnejše.

Dr. Bubnič je razvil metodo za določanje niklja v učinkovinah z ETAAS. Kot testni substanci je izbral tamsulozinijev klorid in lizinopril, pri sintezi katerih se uporablja nikelj kot katalizator. Izdelana metoda je visoko specifična in ima zelo nizko mejo določljivosti. Za pripravo vzorcev je uporabil mikrovalovni razkroj pri povišanem tlaku in uporabo mešanice HNO₃ in H₂O₂. Posebno pozornost je posvetil izbiri in optimizaciji temperaturnega programa za ETAAS. Pravilnost metode je potrdil s tehniko standardnega dodatka in primerjavo rezultatov dobljenih z elementno masno spektrometrijo (ICP-MS). V nadaljevanju je potrdil, da je mogoče AAS uporabiti tudi za določanje sledov učinkovin v izpiralnih medijih. V te namene je razvil postopka za določanje magnezija z elektrotermično atomizacijo v vodnem in etanolnem mediju in litija v vodnem mediju. Prednost razvitih postopkov glede na do sedaj uporabljene je nizka meja določljivosti in boljša specifičnost, ostanke učinkovin pa je možno določati tudi v organskih topilih, ki se poleg vode najpogosteje uporabljajo za čiščenje opreme.

dr. KARMEN TESKAČ PLAJSŠEK, mag. farm.

POVEZAVA MED POVRŠINSKIMI LASTNOSTMI NANODELCEV, CELIČNIM PRIVZEMOM IN BIOLOŠKIM ODGOVOROM

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Disertacija Dr. Karmen Teskač Planjšek sodi na področje nanotehnologije. V celoti je uspela raziskati in potrditi tri hipoteze, ki jih je navedla v predlogu teme: samo nanodelci z ustrezno sestavo nimajo toksičnih posledic na celicah, biološka uporabnost dostavljene učinkovine je odvisna od načina in hitrosti prehajanja in porazdeljevanja po citosolu ter od pozicije nanodelcev v celicah, in trdni lipidni nanodelci s primerno sestavo so uporabni kot dostavni sistemi za resveratrol, ki naj bi v mitohondrijih uravnaval številne procese, povezane z nastankom radikalov in sprožanjem encimskih procesov. Upošteva prvo hipotezo - citotoksičnost - je opredelila *in vitro* varnostni profil nanodelcev (ND) ZnO in TiO₂ in biološko najbolj sprejemljivo sestavo trdnih lipidnih nanodelcev (SLN). Drugo hipotezo - porazdeljevanje ND v celičnem okolju - je potrdila s proučevanjem načina in hitrosti prehoda ND v celice, citosolnem porazdeljevanju ter njihovi končni poziciji v celicah, katera je zaželeno enaka tarčnemu mestu za delovanje učinkovine. Sledenje SLN na njihovi poti v znotrajcelično področje je dosegla z učinkovitim fluorescenčnim označevanjem SLN z novo sintetizirano spojino na FFA (S. Pajk, S. Pečar), ter celičnih struktur in napredno tehniko mikroskopiranja. S tretjo hipotezo je dokazala, da so ND sprejemljivi nosilci učinkovin. Proučevala je resveratrol (RSV), kot obetajoča naravna spojina za bolezenska stanja z visoko radikalsko gostoto, ki je velikokrat iniciator rakavih obolenj. Intrinzične lastnosti RSV, ki slabijo njegovo biološko razpoložljivost, je možno obiti z vgrajevanjem v lipofilne ND (npr. SLN, liposome). Proučevala je celični odziv v prisotnosti samega RSV in dostavljenega s pomočjo ND. Članek z resveratrolom je bil pol leta na 8. mestu med najbolj iskanimi člankov v International Journal of Pharmaceutics (vir Sciencedirect Top 25).

dr. IRMA ŠTERN, mag. farm.

PROUČEVANJE DIAGNOSTIČNE UPORABNOSTI ANALIZE ZUNAJCELIČNE mRNA GENOV ODGOVORNIH ZA RAZVOJ NESTABILNE LEHE V PLAZMI BOLNIKOV S KORONARNO ATEROSKLEROZO

Mentor: izr. prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

V raziskovalnem delu je dr. Irma Štern proučevala zunajcelične mRNA (mRNA, ki se nahajajo zunaj celic) v plazmi bolnikov s koronarno

aterosklerozo. Najprej je razvila zanesljive postopke merjenja nivoja mRNA v plazmi in sicer tistih genov, ki z zvečanim izražanjem v žilni steni spremljajo ali aktivno sodelujejo v razvoju in destabilizaciji koronarne aterosklerotične lehe. S tem je potrdila domnevo o obstoju omenjenih mRNA v plazmi in o možnosti njihove zanesljive kvantifikacije. V drugem delu eksperimentalnega dela je potrdila domnevo, da imajo bolniki s koronarno aterosklerozo zvišan plazemski nivo mRNA genov, ki z zvečanim izražanjem v žilni steni spremljajo ali aktivno sodelujejo v razvoju in destabilizaciji koronarne aterosklerotične lehe. Odnosi med plazemskimi nivoji mRNA različnih genov so skladni trenutnemu poznavanju aterogeneze, nekatere nepričakovane povezave pa nakazujejo na povsem nove patobiokemične mehanizme, med katerimi velja izpostaviti predvsem vpetost katepsina S v vnetno in imunsko komponento aterogeneze. Razvite analitske metode trenutno predstavljajo predvsem novo raziskovalno orodje in zanimiv strokovni izziv. Omogočajo neinvazivno *in vivo* analizo izražanja genov v žilni steni ter zaznavo in oceno intenzivnosti aterosklerotičnega procesa. Omogočajo neinvazivno *in vivo* preučevanje patofizioloških procesov in preučevanje novih načinov zdravljenja bolezni. So alternativa ali dopolnilo analitiki proteinov.

dr. UROŠ MAVER, mag. farm.

FUNKCIONALIZACIJA POVRŠIN ZA RAZVOJ DOSTAVNIH SISTEMOV UČINKOVIN ZA CILJANO ZDRAVLJENJE

Mentor: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Somentor: prof. dr. Janko Jamnik, dipl. ing. fiz.

Dr. Uroš Maver je proučeval uporabnost mikroskopije na atomsko silo na področju biomedicinskih znanosti in razvijal modelne terapevtske sisteme z nanometrskimi velikostmi. V ta namen je razvil večstopenjsko metodologijo, ki temelji na zelo natančni pripravi vseh stopenj razvoja terapevtskega sistema. Kot prvo je razvil postopek ponovljive in zanesljive priprave atomske ravne površine zlata in dokazal, da ta zagotavlja pridobivanje slik in nedvoumno merjenje z molekulske ločljivostjo ob uporabi mikroskopa na atomsko silo. Za potrebe določanja interakcij med posameznimi deli terapevtskih sistemov, je predstavil metodologijo za pripravo funkcionaliziranih konic, ki jih uporabljamo pri meritvah z mikroskopom na atomsko silo. Dokazal je, da je izbran postopek primeren za vrednotenje reverzibilnih interakcij s poenostavljenimi deli terapevtskega sistema. Za preverjanje delovanja pripravljenih modelnih terapevtskih sistemov je izvedel meritve z mikroskopom na atomsko silo pri simuliranih fizioloških pogojih in razvil postopek za vrednotenje sprememb po nastopu izbranih fizioloških dejavnikov. Z razvojem nove metodologije, ki zajema statistično obdelavo velikega števila meritev sil, izmerjenih z mikroskopom na atomsko silo, je pokazal, da lahko tudi za relativno kompleksne polimerne molekule dokažemo vrsto vezi z modelno površino. Izdelal je tudi nanokompozit z vgrajenimi superparamagnetnimi nanodelci in fluorescenčnim barvilom rodaminom. Dokazal je, da so takšni delci primerni za sledenje

modelnega terapevtskega sistema v *in vitro* raziskavah ter da izkazujejo lastnosti, ki bi lahko omogočile dostavo izbrane zdravilne učinkovine na terapevtsko zanimivo mesto v telesu.

Za potrditev hipoteze, da je reverzibilna vezava zdravilne učinkovine na nanodelce pomembna za njeno delovanje na ciljanem mestu je opisal pripravo nanodelcev cinkovega fosfata s koordinativno pripetimi proteinskimi zdravilnimi učinkovinami. Njihovo učinkovitost je dokazal s testi sproščanja in z *in vitro* raziskavami biološke aktivnosti pred in po vezavi na mišjih fibroblastnih celičnih linijah. Predstavil je tudi nov dostavni sistem sestavljen iz superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida, obloženih s tanko plastjo silicijevega dioksida. V to oblogo je vgradil zdravilno učinkovino in pokazal, da se iz nje sprošča z difuzijo. Karakterizacija novo razvitega dostavnega sistema kaže potencialno uporabo v terapevtske namene.

dr. TINA UKMAR, mag. farm.

PROUČEVANJE MEHANIZMOV VGRAJEVANJA IN SPROŠČANJA MODELNE UČINKOVINE IZ UREJENIH MEZOPOROZNIH SILIKATOV

Mentor: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.
Somentor: doc. dr. Gregor Mali, dipl. ing. fiz.

Dr. Tina Ukmar je proučevala mehanizem vgrajevanja in sproščanja modelne učinkovine indometacina iz urejenih mezoporoznih silikatov ter identifikacijo kritičnih parametrov, ki vplivajo na oba procesa. Za doseg omenjenega cilja je najprej podrobno načrtovala in pripravila urejene mezoporozne silikate, postavila in razvila metodologijo za njihovo vrednotenje ter za vgradnjo modelne učinkovine, podrobno analizirala strukturo učinkovine v porah modelnih ogrodij ter proučevala dinamiko sproščanja učinkovine. Eksperimentalne ugotovitve je teoretično podkrepila z matematičnim modeliranjem faznih sprememb ter transporta učinkovine iz ogrodij.

Z rezultati raziskav je potrdila hipotezo, in sicer da imajo prostorske omejitve ogrodja, lastnosti topila in koncentracija raztopine modelne učinkovine pri polnjenju ogrodja izredno pomembno vlogo pri vgradnji učinkovine in poleg tega vplivajo na to, katera faza učinkovine pri vgradnji nastane. Vplivajo torej tako na strukturo vgrajene učinkovine, kot tudi na fizikalno-kemijske lastnosti in celo stabilnost vgrajene snovi. Teoretični rezultati molekularnega transporta so razkrili obrat odvisnosti kinetike transporta topljenca od velikosti por ogrodja ob postopnem povečanju privlaka s stenami. Skupaj z eksperimentalnimi študijami sproščanja pa je podprla hipotezo, da jakost interakcij učinkovine s steno ogrodja odločilno vpliva na kinetiko sproščanja in ne nazadnje, da interakcije določijo tudi celokupni delež sproščene učinkovine. Prav vključitev interakcij s stenami v opis transporta pa je podala razlago izmerjene odvisnosti kinetike sproščanja od velikosti por. Odkritje, da je sproščanje iz mezoporoznih silikatov interakcijsko nadzorovano vsekakor predstavlja preboj v bazični znanosti. Razlaga mehanizma vgrajevanja ter strukturnih

lastnosti učinkovine skupaj s poglobljenim vpogledom v procese sproščanja omogoča ciljano uravnavanje kinetike sproščanja. Doktorsko delo predstavlja celostni prispevek k znanstvenemu napredku na področju razvoja sodobnih dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin.

dr. URŠKA ŽAGER, mag. farm.

ZNAČILNOSTI VEZAVE PROTITELES PROTI β 2-GLIKOPROTEINU I NA ANTIGEN

Mentor: prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.
Somentorica: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

Avtoimunitet je odziv imunskega sistema proti lastnemu organizmu. Če je obseg avtoimunskih reakcij velik, vodi v okvaro tkiv in nastanek avtoimunskih bolezni. Ena od njih je antifosfolipidni sindrom, ki se klinično kaže skozi venske in arterijske tromboze, zastoje rasti plodu in splave, laboratorijsko pa s prisotnostjo specifičnih avtoimunskih protiteles.

Dr. Urška Žager je s pomočjo površinske plazmonske resonance, rešetanja bakteriofagnih peptidnih knjižnic, različnih encimskoimunskih tehnik in seveda s svojimi lastnimi kognitivnimi sposobnostmi odkrila nekatere pomembne lastnosti medmolekulskih interakcij, ki so osnova bolezni. Dokazala je, da so za vezavo teh protiteles na epitope tarčnega antigena ključne aminokislinske stranske skupine, ki omogočajo nastanek vodikovih ali ionskih vezi, oziroma tiste aminokislinske, ki to možnost pridobijo s tautomerijo. Ugotovila je aminokislinski zaporedji, ki posnemata vezišča na tarčnem antigenu, na katera se veže več kot 60% patogenih protiteles bolnikov z antifosfolipidnim sindromom. Hkrati je dokazala, da izkazujejo oksidativno spremenjena naravna ali protimikrobna protitelesa v *in vitro* sistemu podobne vezavne značilnosti kot patogena avtoprotelesa. To nakazuje, da lahko oksidacija že prisotnih naravnih protiteles spremeni njihovo specifičnost vezave in jih pretvori v avtoimunska protitelesa.

Urška Žager je s svojim delom pridobila znanja, ki so pomembna za razumevanje mehanizmov nastanka bolezni, za učinkovito diferencialno diagnostiko, pa tudi za razvoj morebitne tarčne terapije imunske pogojene tromboze in antifosfolipidnega sindroma.

dr. MIHAEL SIMČIČ, uni. dipl. mikrobiol.

DOLOČITEV NAČINA VEZAVE NOVIH INHIBITORJEV MurD LIGAZE

Mentor: prof. dr. Uroš Urleb, mag. farm.

Somentorica: doc. dr. Simona Golič Grdadolnik, dipl.ing. fiz.

Dr. Mihael Simčič je določil način vezave več vrst novih inhibitorjev encima, ligaza MurD, ki sodeluje pri znotrajceličnih citoplazemskih fazah biosinteze peptidoglikana in je pomembna tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Razvoj novih antibiotikov z novimi mehanizmi delovanja je ena od ključnih strategij v boju proti naraščajoči bakterijski rezistenci. V Evropski uniji se v bolnišnicah vsako leto okuži dva milijona ljudi z bakterijskimi infekcijami, od tega jih več kot stosedemdestisoč umre. Mihael Simčič je z uporabo modernih metod NMR spektroskopije in molekularnega modeliranja določil interakcije ligand-encim na atomskem nivoju in ugotovil več vrst dinamičnih procesov v kompleksih ligand-encim, kot so rotacije posameznih segmentov vezanih ligandov in nihanja domen ligaze MurD, ki vplivajo na vezavne afinitete in inhibitorne aktivnosti novih ligandov. Podal je smernice za načrtovanje aktivnejših analogov in prispeval k novim aspektom racionalnega načrtovanja učinkovin. Dosedanje neuspehe pri razvoju učinkovitih inhibitorjev muramilnih ligaz je mogoče pripisati tudi nepoznavanju dinamičnih procesov pri interakciji biološko aktivnih molekul s proteinskimi tarčami.

dr. PETRA KOLENC PEITL, mag. farm.

RADIOOZNAČENI ANALOGI GASTRINA KOT LIGANDI ZA HOLECISTOKININ-2, (CCK-2/gastrinski) RECEPTOR

Mentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Somentor: prof. dr. Helmut Maecke

Analogi minigastrina, označeni s pozitronskimi ali gama sevalci se uporabljajo za prikazovanje tumorjev, ki imajo na svoji površini visoko izražene receptorje za CCK-B/gastrinski receptor. Kot poglobilni razlogi, da se radiooznačeni analogi gastrina ne uporabljajo v terapiji tumorjev z izraženimi CCK-B/gastrinskimi receptorji, so relativna nizka serumska stabilnost obstoječih analogov in neugodno razmerje njihovega kopičenja tumor-proti-ledvicam.

Dr. Petra Kolenc Peitl je sintetizirala vrsto analogov minigastrina, kjer je obdržala C-terminalni del minigastrina, ki je odgovoren za vezavo na receptor in spreminjala distančnik do bifunkcionalnega kelatorja DOTA, ki ga je konjugirala na N-terminalni del minigastrijskega analoga in je kot tak služil za kompleksiranje kovinskih ionov. Z uvedbo neionskih

distančnikov, kot so dPEG_n, ki so se izkazali kot dobri stabilizatorji v primeru analogov bombezina in D-izomerov različnih aminokislin, za katere je prav tako znano, da v izbranih primerih zvišajo metabolično stabilnost, je sintetizirala spojine, ki so primerne za označevanje z različnimi radioizotopi (¹¹¹In kot primerom gama sevalca, ⁹⁰Y in ¹⁷⁷Lu kot beta sevalcema in ⁶⁸Ga kot primerom pozitronskega sevalca) in jih evaluirala na različnih *in-vitro* in *in-vivo* modelih. Kot nadaljevanje osnovne strategije uvajanja neionskih distančnikov je sintetizirala in biološko ovrednotila še spojini z ionskima distančnikoma in razliko v stereoisomeriji (L-Glu vs. D-Glu).

Dva sintetizirana analoga minigastrina (z D-Gln₆ in D-Glu₆ distančnikom) izkazujeta visoko metabolično stabilnost v humanem serumu in ugodno razmerje njihovega kopičenja tumor-proti-ledvicam. V primerjalni »Minigastrin« študiji, ki je potekala v okviru COST BM0607 Action, kjer so se primerjali najboljši izbrani analogi iz posameznih evropskih laboratorijev, je bil minigastrijski analog z D-Glu₆ distančnikom ocenjen kot najbolj obetajoč in se z njim načrtuje multicentrična klinična študija, ki bo pokazala, če je ta spojina dejansko primerna tudi za peptidno-receptorsko radionuklidno terapijo.

dr. MIHA VIVODA, mag. farm.

KVANTIFIKACIJA AMORFNOSTI SUBSTANC ZA FARMACEVTSKO RABO NA PRIMERU NIFEDIPINA

Mentor: doc. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Somentor: prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Doktorska disertacija dr. Mihe Vivoda sodi na področje obstojnosti zdravil t.j. na področje farmacevtskih raziskav, ki preverjajo in zagotavljajo, da bolnik znotraj predvidenih časovnih okvirov prejme zdravilo deklarirane učinkovitosti, varnosti in kakovosti. Zaradi velika pomena amorfnosti v farmaciji, je tako z vidika njihove potencialne terapevtske uporabe, kot tudi z vidika obvladovanja proizvodnje trdnih farmacevtskih izdelkov izrednega pomena sposobnost vrednotenja že manjšega deleža amorfnih oblik učinkovin v vseh fazah razvoja zdravila. Zaradi kompleksne in heterogene strukture amorfnih oblik se za celovito obravnavo amorfnosti danes še vedno uporablja več komplementarnih analizičnih metod hkrati.

Ravno zato je Miha Vivoda v prvi fazi raziskav preveril uporabnost nekaterih že uveljavljenih analizičnih metod na tem področju kot so diferenčna dinamična kalorimetrija, rentgenska difrakcija, infrardeča spektroskopija. Dokazal je, da lahko z optimizacijo pogojev testiranja in z ustreznim pristopom vrednotenja podatkov izboljša uporabnost posameznih metod v smislu kvantitativnega vrednotenja amorfnosti nifedipina. Da bi omogočil še širši vpogled v obravnavano tematiko, je vpeljal v prakso še dve relativno novi in neveljavljeni analizični metodi na tem področju: jedrsko kvadropolno resonanco in mikrokolorimetrijo. Še zlasti pri slednji je s sistematičnim pristopom optimizacije pogojev testiranja značilno skrajšal (več kot desetkrat) čas testiranja amorfnosti,

kar bo v prihodnje nedvomno prispevalo k večji uporabnosti te termoanalizne metode.

V drugi fazi raziskav je proučeval različne načine pridobivanja amorfnih oblik nifedipina, s čimer je ocenil tako vpliv različnih tehnoloških procesov (npr. mletja) na nastanek amorfne kot tudi ustrezen način za pridobivanje terapevtsko uporabne oblike amorfnih učinkovin. Z namenom opredelitve morebitne terapevtske uporabnosti, je bil zadnji del raziskav namenjen preizkušanju stabilnosti amorfnega nifedipina. Kljub temu, da kandidat ni potrdil uporabnosti amorfnega nifedipina v terapevtske namene, je stabilnostna študija jasno pokazala, da je potrebno vsebnost amorfnega nifedipina skrbno spremljati v vseh fazah proizvodnje, saj lahko le tako zagotovimo ponovljivo in ustrezno kakovost končnih farmacevtskih izdelkov. Inovativnost in aktualnost obravnavane tematike potrjuje tudi dejstvo, da je kandidat s področja omenjenih raziskav objavil oz. je v fazi objavljania več člankov v revijah s faktorjem vpliva.

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

dr. MOHAMMAD MEHDI SAGHAFI, mag. farm.

DONEPEZIL IN GALANTAMIN KOT PREVENTIVNA ZAŠČITA PRED ZASTRUPITVIJO Z DIIZOPROPILFLUOROFOSFATNIM ZAVIRALCEM ENCIMA AChE

Mentor: izr. prof. dr. Fajko Bajrovič, dr. med.
Somentor: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Doktorska naloga doktoranda Mehdijsa Mohammada Saghafija, mag. farm., z naslovom donepezil in galantamin kot preventivna zaščita pred zastrupitvijo z diizopropilfluorofosfatnim zaviralcem encima AChE zadeva področje patofiziologije in farmacije holinergičnega sistema v živčevju.

Glavni namen dela je bil ugotoviti, ali lahko reverzibilna inhibitorja AChE – galantamin in donepezil – poskusne živali zaščitita pred holinergičnim toksičnim sindromom, povzročenim z ireverzibilnimi inhibitorji AChE - DFP. Poleg tega je dr. Mohammada Mehdi Sagafa zanimala uporabna vrednost sinaptotagmina 4, kot nevrokemičnega kazalca učinkovitosti predlagane profilaktične terapije učinkov organofosfatnih inhibitorjev AChE v možganih podgan.

Poskusi so bili narejeni na podganah soja Wistar. Znake holinergičnega toksičnega sindroma je ugotavljal s spremljanjem telesne temperature, mišičnih fascikulacij, orofacialnih diskinezij, lokomotorne aktivnosti in epileptičnih napadov. Vpliv apliciranih učinkovin na aktivnost AChE je ugotavljal s histokemično metodo barvanja možganskih rezin po

Koelleju, izražanje mRNA za AChE, Fos, Jun in Syn 4 pa z metodo hibridizacije in situ.

V svojem delu skladno z zastavljenimi hipotezami ugotavlja, da pretretiranje podgan z reverzibilnima inhibitorjema AChE povzroči povečanje izražanja mRNA za AChE in povečanje aktivnosti AChE ter posledično zmanjšanje znakov holinergičnega toksičnega sindroma povzročenega z ireverzibilnim inhibitorjem AChE - DFP.

Originalni prispevek doktorske disertacije k znanosti je ugotovitev, da donepezil lahko zaščiti možgane pred učinki DFP in da povečanje izražanja mRNA za Syt 4 lahko štejemo za nov marker epileptičnih napadov, povzročenih z organofosfatnimi inhibitorji AChE.

dr. MILOŠ ILIĆ, mag. farm.

STRUKTURNA OPTIMIZACIJA NOVIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN Z DVOJNIM DELOVANJEM IN NJIHOV VPLIV NA ANGIOGENEZO

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.
Somentor: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

Srčnožilne bolezni so vodilni vzrok obolenja in smrti v razvitih družbah. Kombinacija antikoagulantnega in antiagregatornega delovanja v eni sami molekuli predstavlja nov pristop k razvoju antitrombotičnih učinkovin, s katerim bi lahko izboljšali pomanjkljivosti obstoječega zdravljenja, ki vključuje kombinacijo antikoagulantnih in antiagregatornih učinkovin.

Z namenom povečanja učinkovitosti predhodno razvitih spojin s potencialnim dvojnimi antitrombotičnim delovanjem in pridobitve boljšega vpogleda v odnos med strukturo in delovanjem, je dr. Miloš Ilić z uvajanjem fluora v molekulo izvedel strukturno optimizacijo že znanih 1,4-benzoksazinov z dvojnimi delovanjem, ki hkrati zavirajo trombin in delujejo antagonistično na fibrinogeni receptor. Tako pripravljena najbolj učinkovita spojina z uravnoteženim dualnim antitrombotičnim delovanjem je imela 330 nM konstanto inhibicije trombina in in 1,1 μ M IC_{50} za zaviranje vezave fibrinogena na fibrinogeni receptor. Z namenom izboljšanja dvojnega antitrombotičnega delovanja je pripravil serijo enantiomerno čistih analogov z 1,4-benzodioksinskim ogrodjem namesto 1,4-benzoksazinskega skeleta, ki so prav tako izkazovali submikromolarno konstanto inhibicije trombina in vezave fibrinogena na fibrinogeni receptor.

Vaskularni oksidativni stres, endotelijske poškodbe in tromboza so prepletajoči se procesi, ki sodelujejo pri številnih boleznih srca in ožilja, zato je doktorand v okviru sodelovanja z raziskovalno skupino univerze v Solunu (Grčija) raziskoval tudi antioksidativni in protivnetni potencial pripravljenih fluoriranih 1,4-benzoksazinskih derivatov. Štiri spojine so se izkazale kot lovci radikalov, tri spojine so pokazale zaviralno delovanje na peroksidacijo linolne kisline, za dve spojini pa so ugotovili, da zavirajo sojino lipooksigenazo. Zaradi opažene kombinacije inhibicije trombina z

inhibicijo peroksidacije lipidov in/ali z zaviralnim delovanjem na lipoksigenazo so pripravljene spojine zanimive za nadaljnje preiskave v smeri mutiplih antitrombotičnih učinkovin.

Trombin igra pomembno vlogo pri spodbujanju tumorske angiogeneze, rasti rakavih celic in metastaziranju. Integrin GPIIa/IIIb potreben za adhezijo tumorskih celic na trombocite, kar je eden od ključnih procesov pri metastaziranju. Zato je doktorand želel tudi raziskati, ali imajo pripravljene potencialne dualne antitrombotične spojine z zaviralnim delovanjem na trombin in antagonističnim delovanjem na fibrinogeni receptor, zaviralno delovanje na angiogenezo. Spojine benzoksazinske in benzodioksinske serije je testiral na inhibicijo proliferacije in migracije normalnih endotelijskih in rakastih celic. Izvedel je tudi test vpliva pripravljenih spojin na zaviranje tvorbe tubulov iz endotelijskih celic v matrigelu in *in vivo* test zaviranja angiogeneze na piščančji embrionalni horioalantoidni membrani. Na osnovi izvedenih standardnih *in vitro* in *in vivo* testov za ugotavljanje antiangiogenega delovanja je ugotovil, da so pripravljene estri benzoksazinske in benzodioksinske serije močni inhibitorji angiogeneze. Zaviralnega delovanja na tumorsko rast in zaviranja metastaziranja ni uspel dokazati, verjetno zaradi neugodnih farmakokinetičnih lastnosti spojin. Ta del raziskav je opravil na Rega inštitutu univerze v Leuvnu v Belgiji.

dr. BILJANA GOVEDARICA, mag. farm.

VREDNOTENJE POVRŠINSKIH IN MEHANSKIH LASTNOSTI FARMACEVTSKIH SUROVIN IN IZDELKOV NA NIVOJU DELCEV Z UPORABO MIKROSKOPIJE NA ATOMSKO SILO

Mentor: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Somentor: doc. dr. Miha Škarabot, dipl. ing. fiz.

Dr. Biljana Govedarica je eksperimentalno delo opravila na Inštitutu Jožef Stefan, na Fakulteti za farmacijo ter v švicarskem podjetju CSM, Laboratoriju za mehansko testiranje materialov. V svojem delu se je osredotočila na področje proučevanja elastičnosti in plastičnosti farmacevtskih materialov na nivoju osnovnih delcev. Kot glavni orodji je uporabljala mikroskop na atomsko silo in nanoindenter, ki je standard za testiranje mehanskih lastnosti, predvsem trših in ne-farmacevtskih materialov. Originalni znanstveni prispevek disertacije predstavlja ugotovitev, da mehanske lastnosti posameznih delcev snovi izjemno in odločilno kontrolirajo obnašanje snovi v farmacevtsko tehnoloških procesih, med drugim tudi v procesu stiskanja teh materialov pri izdelavi tablet. To je potrdila z rezultati korelacijskih študij, pri katerih je ugotovila visoko korelacijo med parametroma elastičnosti na osnovni in na razsežnosti (bulk) ravni. Uporabljeni raziskovalni pristop odpira možnost napovedovanja poteka stiskanja ustreznih farmacevtskih materialov, kakor tudi razumevanje in odpravljanje številnih težav, ki se ob tem pojavljajo.

Nadaljnji prispevek njene doktorske disertacije je potrditev, da je gelska plast ksantanskih polimerov v ogrodnih tabletah tista, ki kontrolira hitrost sproščanja zdravilne učinkovine, lastnosti teh plasti pa so vezane in odvisne od fleksibilnosti posameznih ksantanskih verig ter načina urejanja v prostoru. Rezultate svojega raziskovalnega dela je objavila v štirih vrhunskih evropskih revijah z visokimi faktorji citiranosti. Za svoje delo je na Fakulteti za farmacijo prejela posebno dekanovo nagrado, ki se podeljuje v okviru raziskovalnega dneva Fakultete za izjemne dosežke.

dr. ALENKA KUŽNIK KRAJNIK, mag. farm.

MEHANIZEM AKTIVACIJE IN INHIBICIJE ENDOSOMALNIH TOLLU-PODOBNIH RECEPTORJEV

Mentor: prof. dr. Roman Jerala, univ. dipl. kem.

Somentor: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Imunski sistem nam omogoča preživetje v okolju s patogenimi organizmi ter obnovitev tkiva po poškodbah. Pomembna sestavina naravnega imunskega odziva so receptorji, ki prepoznavajo sestavine patogenov, kot so Tollu podobni receptorji. Dr. Alenka Kužnik Krajnik je raziskala delovanje in inhibicijo TLR, ki prepoznavajo nukleinske kisline, še posebej TLR9, ki prepozna nemetilirano enoverižno DNK. Oligodeoksinukleotidi, ki vsebujejo zaporedje CpG so agonisti TLR9 in so vključeni v klinične raziskave za zdravljenje infekcij, rakastih obolenj, astme in alergije. Aktivacija endosomalnih TLR je povezana z avtoimunimi boleznimi kot sta sistemski eritematozni lupus in revmatoidni artritis, kjer že dlje časa v terapiji uporabljajo klorokin in druge antimalarike. Dokazala je, da antimalarike, kot so klorokin delujejo preko vezave na nukleinske kisline, s čimer preprečijo aktivacijo receptorjev. Gre za nov mehanizem inhibicije, ki se razlikuje od splošno sprejetega modela. Pokazala je, da druge spojine, ki se vežejo na nukleinske kisline inhibirajo aktivacijo TLR9 ter da rezikvimod, ki je agonist TLR7 prav tako inhibira aktivacijo TLR9 preko vezave na DNK. Rezultate je potrdila tudi na vzorcih pacientov s sistemskim eritematoznim lupusom.

V drugem delu doktorata je raziskala mehanizem aktivacije TLR9 z DNK. Ugotovila je, da delecija amino-končnega segmenta receptorja bistveno zmanjša učinkovitost aktivacije, identificirala aminokislinske -ostanke ki so pomembni za aktivacijo ter s serijo ODN različnih zaporedij pokazala vpliv stabilnega dupleksa ter bistveno izboljšala aktivnost ODN v primerjavi s standardnimi zaporedji.

Rezultati njenega doktorata pomembno prispevajo k razumevanju aktivacije ter inhibicije aktivacije receptorja TLR9 ter omogočajo načrtovanje bolj učinkovitih imunomodulatorjev. Rezultate dela je objavila v treh člankih, med drugim v članku v ugledni reviji Journal of immunology, kjer je bil v letu dni od objave citiran že 13x.

dr. Matevž Prijatelj, mag. farm.

PROSTAGLANDINSKI RECEPTOR EP4 REGULIRA DELOVANJE LIMFOCITOV B

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Dr. Matevž Prijatelj je doprinesel k razumevanju molekularnih mehanizmov kancerogeneze in avtoimunosti, in sicer z ovrednotenjem vloge prostaglandinskega receptorja EP4 v limfocitih B.

V svojem delu je zagovarjal hipotezo, da ima receptor EP4 pomembno vlogo pri apoptozi nezrelih limfocitov B oz. proliferaciji zrelih limfocitov B in da je dobra tarča za razvoj novih terapevtskih pristopov.

Dokazal je, da posreduje prostaglandin E2 inhibitorne učinke na proliferacijo nezrelih limfocitov B preko receptorja EP4 ter da vodi sočasna aktivacija receptorjev EP4 in BCR v povečan obseg apoptoze nezrelih limfocitov B. V nadaljevanju je naslovil vlogo *receptorja EP4 pri uravnavanju odzivov limfocitov B na z lipopolisaharidom posredovani odzivi*, kar nakazuje pomembno vlogo receptorja EP4 pri uravnavanju imunskega odziva sproženega po bakterijskih infekcijah, kot je lahko primer sepse. Nenazadnje pa je na modelu Burkittovega limfoma dokazal, da aktivacija receptorja EP4 poveča občutljivost celic na toksične učinke bortezomiba in doksorubicina. S tem je razkril do sedaj še neprepoznavno potencialno uporabo agonistov receptorja EP4, kot novih učinkovin pri izboljšanju terapije B celičnih levkemij in limfomov.

Izvirnost doktorskega dela Matevža Prijatelja je v odkrivanju in vrednotenju novih tarčnih molekul, ki služijo za ciljan razvoj učinkovin – modulatorjev apoptoze in s tem novih pristopov pri zdravljenju malignih in avtoimunih obolenj.

dr. BORUT KOVAČIČ, mag. farm.

IZBOLJŠANJE FARMACEVTSKO-TEHNOLOŠKIH LASTNOSTI KARVEDILOLA Z IZDELAVO TRDNIH DISPERZIJ IN KOKRISTALOV

Mentor: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Somentor: izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.

Dr. Borut Kovačič je ovrednotil nekatere industrijsko uporabne možnosti za izboljšanje lastnosti modelne učinkovine, ki so povezane predvsem z njenim sproščanjem iz farmacevtske oblike v gastrointestinalnih tekočinah. Kot modelno učinkovino je uporabil karvedilol, za katerega je značilna slaba topnost in nizka hitrost raztapljanja ter dobra permeabilnost skozi biološke membrane. V prvem delu naloge je izdeloval trdne disperzije karvedilola s poroznim silicijevim dioksidom. Uporabljal je različne metode izdelovanja trdnih disperzij, s pomočjo katerih je proučevali mehanizme nalaganja karvedilola na površino in v pore poroznega nosilca ter vpliv na kristalno obliko učinkovine. Ugotovil je, da način nalaganja karvedilola v porozni nosilec pri izdelavi trdnih

disperzij vpliva na pojavno obliko, močljivost in hitrost raztapljanja te zdravilne učinkovine v vodnem mediju. Ugotovil je, da je amorfna oblika karvedilola izkazuje v primeru trdnih disperzij le-tega na poroznem nosilcu zadovoljivo fizikalno stabilnost.

V nadaljevanju je razvijal dostavni sistema z dvopulznim sproščanjem zdravilne učinkovine iz katerega se prvi del učinkovine sprosti v želodcu, drugi del pa v distalnem delu prebavnega trakta. Za osnovo takšnega dostavnega sistema je izbral trdno disperzijo karvedilola s poroznim silicijevim dioksidom. Z granuliranjem trdne disperzije z disperzijo gastrozistentnega polimera je dosegel hitro sproščanje dela odmerka v kislem mediju in hitro sproščanje preostalega dela odmerka v alkalnem mediju. Ukvarjal se je tudi z možnostjo izdelave kokristalov karvedilola in različnih pomožnih snovi. Gre za novejšo metodo za izboljšanje topnosti ali hitrosti raztapljanja s spremembo pojavne oblike zdravilne učinkovine. Izdelal je kokristal karvedilola in salicilne kisline v razmerju 1:1. S kokristalizacijo je izvedel z mletjem obeh komponent z dodatkom majhne količine organskega topila, s katerim je pospešil mehanokemijsko reakcijo. Pokazal je, da se karvedilol iz kokristalne strukture hitreje raztaplja kot mleti karvedilol ali fizikalna zmes s salicilno kislino.

dr. MIRJAM GOSENCA, mag. farm.

NAČRTOVANJE IN VREDNOTENJE MIKROEMULZIJ IN TEKOČIH KRISTALOV Z LECITINOM KOT NOSILNIH SISTEMOV ZA DERMALNO APLIKACIJO ASKORBILPALMITATA

Mentorica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Dr. Mirjam Gosenca je raziskovala biokompatibilne nosilne sisteme za dermalno dostavo antioksidantov za preprečevanje posledic oksidativnega stresa na koži. Glavno oviro za optimalno terapijo predstavljajo neustrezne fizikalno-kemijske in biofarmacevtske lastnosti teh spojin ter velik barierni upor kože. Mirjam Gosenca je predlagala inovativen pristop za povečanje stabilnosti askorbilpalmitata, derivata vitamina C, v mikroemulzijskem sistemu z vključitvijo dodatnega antioksidanta iz skupine lipofilnih oksimov, načrtno sintetiziranega na podlagi strukturne podobnosti z askorbilpalmitatom. Potrdila je njegovo antioksidativno delovanje, ki temelji na sposobnosti lovljenja radikalov in necitotoksičnost. Razvila je biokompatibilen nosilnega sistema s strukturo lamelarnih tekočih kristalov na osnovi lecitina. Izdelala je psevdotrikomponentni fazni diagram z emulgatorsko zmesjo lecitin/Tween 80 = 1/1, izopropilmiristatom in vodo in določila široko področje nastanka lamelarnih tekočih kristalov, ki jih je primarno identificirala s polarizacijsko mikroskopijo. Vpliv kvantitativne sestave na notranjo strukturo sistemov je natančneje proučila z ozkokošnim rentgenskim sipanjem in diferenčno dinamično kalorimetrijo. Temeljnemu fizikalno-kemijskem sklopu vrednotenja je sledil osrednji del raziskav, usmerjen v proučevanje citotoksičnosti tekočih kristalov na celični liniji

keratinocitov, s katerim je potrdila signifikantno večjo celično proliferacijo v primerjavi s pozitivno kontrolo (natrijev lavrilsulfat). Biološki test je nadgradila z vrednotenjem vpliva tekočih kristalov na morfologijo celic, kjer je kot inovativno tehniko uporabila mikroskop na atomsko silo. Z metodo nanoindentacije je ugotovila izrazit vpliv tekočih kristalov na zmanjšano rigidnost celične membrane zaradi fluidizacije le-te. Učinek tekočih kristalov na povečanje elastičnosti keratinocitov potrjuje njihovo primernost v terapiji zmanjšane elastičnosti kože kot posledice (foto)-staranja.

dr. DARKO URŠIČ, mag. farm.

VPLIV LUMINALNIH IN HUMORALNIH DEJAVNIKOV NA INTESTINALNO SEKRECIJO UČINKOVIN

Mentor: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Somentor: izr. prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.

Osnovna naloga sekretornih prenašalcev je zaščita organizma pred škodljivimi vplivi telesu tujih snovi. Najbolj znana skupina sekretornih prenašalcev so ABC (ATP Binding Cassete) prenašalci, kamor poleg MDR (multi drug resistance protein) P-glikoproteina sodijo še MRP (multi drug resistance associated protein) in BCRP (breast cancer resistance protein) prenašalci. Črevo je med absorpcijo hrane izpostavljeno različnim toksinom in potencialno škodljivim dejavnikom. Zato obstajajo v intestinalnem epiteliju regulatorni mehanizmi, ki zaznajo in se hitro odzovejo na spremenjene pogoje.

Dr. Darko Uršič je raziskal, kako vplivajo luminalni in humoralni dejavniki na aktivnost sekretornih prenašalcev v intestinalnem epiteliju. Preučeval je vpliv prisotnosti parakrinih hormonov ter hranil kot so sladkorji, beljakovine, aminokisline in kratko ter dolgotrajne maščobe v GIT, kakor tudi vpliv ostalih dejavnikov, kot sta npr. sprememba osmolarnosti oz. kislosti vsebine GIT.

Pojasnil je fiziološki pomen regulacije prenašalcev v GIT kot tudi interakcij teh prenašalcev med seboj in z drugimi dejavniki. Na ta način lahko obrazložimo tudi marsikatero razliko in nedoslednosti pri interpretaciji farmakokinetičnih študij po aplikaciji zdravil na tešče oziroma po obroku.

dr. MATEVŽ LUŠTRIK, mag. farm.

RAZVOJ METOD IN VREDNOTENJE LOKALNIH KARAKTERISTIK TOKA TRDNIH DELCEV V VRTINČNOSLOJNIH NAPRAVAH ZA OBLAGANJE TER NJIHOV VPLIV NA ENAKOMERNOST OBLOGE DELCEV

Mentor: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Dr. Matevž Luštrik je raziskave opravil v laboratorijih Fakultete za farmacijo in deloma v podjetju za izdelavo procesne opreme Brinox d.o.o., iz Medvoda. Ovrednotil je nekatere možnosti za izboljšanje postopka oblaganja delcev s stališča konstrukcijskih modifikacij že obstoječe in v farmacevtski industriji uporabljane procesne opreme. Strukturne elemente, s katerimi je mogoče spreminjati tok zraka in delcev, je ovrednotil s stališča enakomernosti nanosa polimerne obloge po površini delcev (pelet), izkoristka oblaganja in deleža aglomeratov, ki v procesu oblaganja nastanejo. Z vgradnjo novo razvitega in izdelanega generatorja vrtinčastega toka je v novi napravi za oblaganje v primerjavi z nemodificirano napravo dosegel mnogo bolj enakomeren nanos polimernega filma, izboljšanje izkoristka procesa in zmanjšal stopnjo tvorbe aglomeratov. Dodatno zmanjšanje variabilnosti nanosa obloge med delci je dosegel tudi z drugo modifikacijo, t.j. vgradnjo posebnega nastavka z režami za dodatno vpihovanje zraka.

Da bi detaljno preučil tok trdnih delcev znotraj oblagalnega valja že obstoječe komore in nove komore z generatorjem vrtinčastega toka, je razvil in izdelal sondo, katere princip delovanja temelji na piezoelektričnem efektu. S tako izdelano sondo je določil območja značilnih frekvenc trkov pelet v sondo in ovrednotil porazdelitev gostote delcev v obliki profilov časovno povprečnega števila trkov. Potrdil je, da do odstopanj v porazdelitvi količine obloge med isto količino enako velikih delcev pride zaradi lokalnih razlik v gibanju delcev znotraj območja razprševanja.

Rezultate svojega dela je Matevž Luštrik s soavtorji zaščitil v SI patentu, dodatno pa ima vložene še prijave na Evropskem patentnem uradu ter v ZDA in v Indiji.

Društvena priznanja v letu 2012

prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm., predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj

Izvršni odbor SFD
je na 37. skupščini podelil društvena priznanja,
ki so jih prejeli:

Minařikovo odliĉje:

Metka Štefanĉiĉ, mag. farm., spec.

Minařikova priznanja:

Polonca Fiala, mag. farm.

dr. Maruša Hribar, mag. farm.

Simona Mitroviĉ, mag. farm., spec.

mag. Alenka Rutar Pariš, mag. farm.

MatjaŹ Tuš, mag. farm.

Podelitev druřtenih priznanj za leto 2012 je tradicionalno potekala v Tartinijevem gledaliřĉu, v ĉetrtek, 10. maja. Slavnostno podelitev druřtenih priznanj je popestril kulturni program v izvedbi Vite Mavriĉ. Za prijetni zakljuĉek sreĉanja in nadaljevanje druženja pa je poskrbela Kemofarmacija.

Podelitev je bila povezana s simpozijem, ki ga Slovensko farmacevtsko druřstvo organizira ob letnih skupřĉinah. Organizacija letošnjega simpozija je ponovno potekala pod vodstvom prof. dr. Boruta Štruklja. O vsebini simpozija priĉa majska številka Farmacevtskega vestnika, v kateri so bili objavljeni ĉlanki s podroĉij:

Nanotehnologija 10 let kasneje – prednosti in pasti

Zdravila in bolezni ORL

Vloga farmacevtov pri usklajevanju zdravljenja z zdravili.



Prejemniki druřtenih priznanj za leto 2012 s predsednikom Odbora za podeljevanje druřtenih priznanj (prvi z leve) in predsednikom Druřtva (tretji z leve).

Utemeljitelj

Magistra **Polonca Fiala** se je po diplomi na Fakulteti za farmacijo zaposlila v Pomurskih lekarnah. Poleg rednega dela je intenzivno vključena v pripravo prispevkov v strokovnih revijah in javnih občilih ter za svetovanja preko radia in televizije. Na ta način laično javnost seznaja z aktualnimi vsebinami o zdravljenju z zdravili in s priporočili za varovanje zdravja. Pripravlja tudi strokovne vsebine za sodelavce v Pomurskih lekarnah, ter za šole in društva v Prekmurju. Sodeluje tudi s SFD in LZS pri pripravah in izvedbi Dneva slovenskih lekarn. Med drugim je bila tudi urednica knjižice Zdravila in starostniki. S svojim delom ter pisnimi prispevki in predavanji magistra Fiala nedvomno prispeva k prepoznavnosti lekarniške farmacije v ožjem okolju Pomurja in širše v Sloveniji.

Doktorica znanosti **Maruša Hribar** je po diplomi na Fakulteti za farmacijo svoje raziskovalno delo pričela na Kemijskem inštitutu na področju biotehnologije in nadaljevala na farmakološkem oddelku Medicinske fakultete v Ženevi. Po zagovoru doktorske disertacije leta 1999 je v Ženevi nadaljevala raziskovalno delo na področju nevronske celice in apoptoze. O kvaliteti njenega raziskovalnega dela pričajo številni članki, objavljeni v revijah z visokim faktorjem vpliva in patenti. V Švici je tudi uspešno zaključila triletno izobraževanje iz homeopatije, kateri se intenzivno posveča zadnjih 10 let. V teh letih je veliko prispevala k popularizaciji homeopatije v strokovni in laični javnosti. Aktivno sodeluje kot predavateljica francoske šole homeopatije v Ljubljani in Zagrebu, od

leta 2011 pa je tudi članica Evropskega komiteja za homeopatijo v Bruslju. Sodelovala je s SAZU-jem pri pripravi farmacevtskega terminološkega slovarja. Odmevni so njeni medijski nastopi, v katerih laično in strokovno javnost na primeren način seznaja s homeopatijo. Z življenjskim optimizmom in nekonfliktnim pristopom se dr. Hribarjeva zavzema za sobivanje ter sinergistično povezovanje med alopatsko in homeopatsko medicino, s čimer je tudi bistveno prispevala k umestitvi homeopatije v zdravstveni sistem.

Magistra **Simona Mitrovič** se je po diplomi na Fakulteti za farmacijo zelo zavzeto posvetila bolnišnični farmaciji, opravila specializacijo iz oblikovanja zdravil in prevzela vodenje galenskega laboratorija Lekarne UKC v Ljubljani. Razvila je centralizirano pripravo kapljic in mazil za oko, razvija recepture peroralnih suspenzij za otroke in s tem pomembno skrbi za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja. Je aktivna članica številnih komisij in delovnih skupin v okviru LZS, UKC Ljubljana in dolgoletna aktivna tajnica Sekcije bolnišničnih farmacevtov pri SFD. Sodeluje tudi v dodiplomskem študiju farmacije kot vabljen predavateljica pri predmetu Farmacevtska tehnologija in mentorica za področje bolnišnične farmacije. Svoje bogato znanje in praktične izkušnje nesebično posreduje tudi farmacevtom javnih lekarn, ki se v vsakodnevem delu srečujejo s problematiko magistralne priprave zdravil. Med mladimi kolegi in v svojem delovnem okolju magistra Mitrovič zavzeto promovira pomen SFD in Sekcije bolnišničnih farmacevtov in si vseskozi prizadeva za boljše poznavanje in priznavanje vloge in odgovornosti bolnišničnega farmacevta pri serijski in magistralni pripravi zdravil.



Prejemnice Mlinařikovega priznanja (z leve) Polonca Fiala, Maruša Hribar, Simona Mitrovič in Alenka Rutar Pariš.



Predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj je prebral utemeljitev, odličje pa je podelil predsednik društva.



Magistrica znanosti **Alenka Rutar Pariš** se je po diplomi zaposlila kot mlada raziskovalka na Fakulteti za farmacijo. Kasneje se je zaposlila v Leku in kot aktivna članica odbora Ljubljanske podružnice sodelovala v Izdajateljskem svetu Farmacevtskega vestnika ter v odborih Sekcije farmacevtov javnih lekarn. Njena sedanja zaposlitev je v Kemofarmaciji, kjer kot vodja marketinga uvaja številne nove storitve, ki jih s pridom uporabljajo mnogi lekarniški farmacevti kot tudi farmacevtske hiše za predstavitev svojih izdelkov. Njena ideja in izvedba je sodoben spletni portal za e-naročanje in komunikacijo dodatnih vsebin Elona, izdajanje mesečnega glasila Farmainfo s strokovno prilogo za zdravila na recept - Receptum in tudi e-novice. Sodeluje tudi pri vsakoletni organizaciji Dneva lekarn in pri organizaciji Skupščine SFD. Z aktualnimi temami mag. Rutar Pariš skrbi za prenos informacij o zdravilih do vseh lekarniških farmacevtov in tako pomaga pri pridobivanju in vzdrževanju visokega nivoja znanja v lekarniški farmaciji.

Magister **Matjaž Tuš** se je po diplomi na Fakulteti za farmacijo zaposlil v Mariborskih lekarnah. Odlikuje ga uspešno organizacijsko, strokovno in pedagoško delo ter aktivno delovanje v organih SFD. Organiziral je več kot 40 strokovnih srečanj, kot predsednik podružnice pa je organiziral dva odmevna družabna dogodka: novoletni zdravniško-farmacevtski ples, kjer se je izrazila želja po močnejši medsebojni povezanosti v domačem okolju, in 10. farmacevtski ples s poudarkom na boljši povezanost med farmacevti. Dopolnilno je poučeval farmacevtske tehnike in tehnike zdravstvene nege, lani pa tudi študente medicine na mariborski univerzi pri vajah iz farmakologije in toksikologije. S naštetimi aktivnostmi pomembno prispeva k ugledu in krepitvi vloge lekarniškega farmacevta. Magister Tuš izstopa z jasnim izražanjem strokovnih stališč, zato je kot član več komisij in odborov zaželen sogovornik. Stroka ga ceni tudi kot prepoznavnega zagovornika etičnih in deontoloških načel lekarniških farmacevtov.

Dobitnica Mlinařikovega odličja

Magistra **Metka Štefančič** je ena najbolj vidnih in prepoznavnih osebnosti v slovenski bolnišnični in klinični farmaciji. Kjeroli je delovala, je s svojo neizmerno voljo, podprto z visoko strokovnostjo in vztrajnostjo, pustila za seboj neizbrisen pečat.

Njene najodmevnejše aktivnosti lahko strnemo v nekaj naslednjih ugotovitev. Svojo profesionalno kariero je pričela kot bolnišnična farmacevtka v Lekarni Splošne bolnišnice dr. Franca Derganca v Šempetru pri Gorici. Tej pomembni zdravstveni instituciji na meji s sosednjo Italijo je ostala zvesta do današnjih dni in v vlogi dolgoletne vodje Lekarne tudi bistveno prispevala k njenemu razvoju. Že v 80-ih letih je kot direktorica tedanjega TOZD Medicinske storitve s svojimi strokovnimi in organizacijskimi aktivnostmi omogočila hitro rast Centralnega laboratorija, Radiološkega oddelka, Transfuziološke službe in seveda lekarniške dejavnosti. Lekarna šempeterske bolnišnice je bila v začetku 80-ih let prva s strani tedanjega Ministrstva za zdravje verificirana bolnišnična lekarna v Sloveniji. Leta 1988 je kot ena od prvih specializantk zaključila specialistični študij iz klinične farmacije, vzporedno pa tudi podiplomski študij iz bolnišničnih okužb na Medicinski fakulteti v Ljubljani. S pridobljenim znanjem je znatno pripomogla k



Predsednik SFD izroča priznanje Matjažu Tušu.

racionalizaciji porabe protimikrobnih zdravil; med prvimi v Sloveniji je v šempeterski bolnišnici uvedla Listo zdravil in Priporočila za racionalno uporabo protimikrobnih zdravil ter organizirala izobraževanje zdravnikov in sester. Rezultate teh aktivnosti ji je priznala tudi domača in mednarodna strokovna in politična javnost s podelitvijo ustreznih certifikatov. Svoje znanje in izkušnje je aktivno in kontinuirano prenašala tudi v druga bolnišnična okolja preko dela v organih SFD in LZS. Po osamosvojitvi Slovenije je s svojimi domačimi in mednarodnimi povezavami bistveno doprinesla k vključevanju slovenskih strokovnih združenj bolnišnične in klinične farmacije v evropska združenja,



Predsednik Lekarniške zbornice Slovenije je čestital prejemnici odličja.



Prejemniki priznanj so z zanimanjem spremljali kulturni program.

predvsem v EAHP in ESCP. Znatno je tudi njen prispevek k umestitvi bolnišnične in klinične farmacije v slovenski zdravstveni sistem, od predlogov v projektih Lekarniške zbornice Slovenije, preko določanja standardov v nacionalnih planih zdravstvenega varstva do doprinosov pri oblikovanju nacionalne strategije nadaljnjega razvoja bolnišnične in klinične farmacije.

Opus magistre Štefančič na področju predavateljskega dela je impresiven. Več kot 40-krat je nastopila na skupnih ali ločenih srečanjih s člani zdravstvenega tima (zdravniki, sestrami in farmacevti) s prepričljivimi argumenti o potrebi po timski obravnavi bolnikov, ker je edino na ta način možno zagotoviti učinkovito, varno in stroškovno učinkovito zdravljenje z zdravili.

Magistro Štefančič odlikuje odprtost, širina in komunikativnost. Nalog, ki so ji naložene oz. si jih nalaga sama, se loteva zavzeto in vedno z željo, da čim hitreje doseže cilj. Ker je dolga leta v okolju šempeterske bolnišnice delovala kot edina farmacevtka, je razvila tudi relativno visoko stopnjo individualizma pri svojem delu. Zato v času hitrih sprememb morda ni izkoristila vseh priložnosti, s katerimi bi uspela zbrati in organizirati močnejšo ekipo bolnišničnih oz. kliničnih farmacevtov, ki bi bila v tako veliki bolnišnici kot je šempeterska, nujno potrebna.

Odbor SFD za podeljevanje društvenih priznanj je skrbno pretehtal osebni in strokovni profil magistre Štefančič in ugotovil, da pozitivni rezultati njenega dela presegajo zgoraj navedeno pomanjkljivost, zato je soglasno potrdil predlog Sekcije kliničnih farmacevtov ter sklenil, da ga predloži Izvršnemu odboru SFD v sprejem. Tudi Izvršni odbor SFD je predlog Odbora natančno proučil in ga soglasno podprl. S tem je bil sprejet sklep, da se magistri Metki Štefančič podeli najvišje društveno priznanje, t.j. Minarikovo odličje.



Podjetje Farmadent je ob praznovanju svojega jubileja prejemnikom društvenih priznanj podelilo kipce Franca Minařika.

Sponzor Sekcije kliničnih farmacevtov



Apta Medica Int d.o.o.
Likožarjeva ul. 6
1000 Ljubljana, Slovenija
info@apta-medica.com
www.apta-medica.com





Pot do zdravja

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

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si

