

Farmaceutski vestnik 3

Š T 3 . J U L I J . 2 0 0 9 . L E T N I K 6 0

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE . PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA



Pot do zdravja

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

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si



Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 3 • J U L I J 2 0 0 9 • L E T N I K 6 0

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Andrijana Tivadar

Uredniški odbor

Tajda Gala Miharija

Stanko Gobec

Katja Gombač Aver

Iztok Grabnar

Janja Marc

Franc Vrečer

Izdajateljski svet

Stane Srčič

Simona Cencelj

Boštjan Debelak

Mirjana Gašperlin

Lili Grosek

Mirjam Hočevar Korošec

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

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

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in:

BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS,

PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC

PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

UVODNIK

Tokratno številko Farmaceutskega vestnika sestavlja pisana paleta sestavkov in člankov iz najširšega področja farmacije in medicine, ki bo popestrila strokovno branje in izobraževanje v poletnih, dopustniških mesecih. Prvi članek avtorjev U. Švajgerja in M. Jerasa predstavlja novo področje, ki ga uspešno razvijajo v laboratoriju doc.dr. Jerasa in predstavlja del sodobnega celičnega zdravljenja, ki bo poleg tkivnega in genskega zdravljenja eden od pomembnih delov bodoče medicine in farmacije. V sestavku o koencimu Q10 je predstavljeno delovanje, vloga in tržišče tega prehranskega dopolnila iz skupine antioksidantov. Temu sledita dva članka iz področja biokemije in fiziologije. Avtorji M. Brunskole, T. Lanišnik Rižner in J. Stojan predstavljajo encimsko skupino dehidrogenaz in reduktaz, ki so vpletene v številne fiziološke in patofiziološke mehanizme, obenem pa so osnovni encimi za metabolizem nekaterih zdravih učinkovin in bi lahko služile kot tarča za izdelavo novih učinkovin v bodoče. V sestavku dr. Ferjanove izvemo o regulatorni vlogi Ca^{2+} ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov, prav tako farmakološki pa je tudi članek S. Obermajer o zdravilih in dezinficentih, ki se uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje paradontalnih bolezni. Iz Katedre za farmacevtsko tehnologijo pa prihaja sestavek o sodobnih pristopih k izdelavi trdnih dispenzij, ki omogočajo izboljšano biološko uporabnost učinkovin.

Zopet torej mnogo strokovnih novosti. Preberimo jih in poskušajmo razširiti naša strokovna znanja. Tega nam tudi čas recesije ne more vzeti. Z željo po čim lepših dopustniških dnevih vas lepo pozdravljam,

Prof.dr. Borut Štrukelj

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Urban Švajger, Matjaž Jeras

Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila
Cell therapy using regulatory T cells – cells playing the role of drugs

143

Janko Žmitek, Katja Žmitek

Koencim Q₁₀ kot prehransko dopolnilo in zdravilo
Coenzyme Q₁₀ as a Dietary Supplement and Drug

150

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

Encimi iz naddružine kratkoveržnih dehidrogenaz/reduktaz kot nove farmakološke tarče
Enzymes of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily s new pharmacological targets

159

Ilonka Ferjan

Regulatorna vloga Ca²⁺ ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov
The regulatory role of Ca²⁺ ions in the secretion of inflammatory mediators from mast cells

165

Odon Planinšek

Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo učinkovin
Contemporary approaches to solid dispersions production with improved drug bioavailability

169

Saša Obermajer

Farmakoterapija paradontalnih bolezni
Pharmacotherapy of periodontal diseases

177

Iz društvenega življenja

34. skupščina SFD

185

Poročilo o udeležbi na 2. PharmSci Fair v Nici 2009

191

Osebnosti

192

Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila

Cell therapy using regulatory T cells - cells playing the role of drugs

Urban Švajger, Matjaž Jeras

Povzetek: V zadnjih letih je prišlo do velikega napredka v razumevanju biologije regulatornih celic T in načina njihovega delovanja v fizioloških in patofizioloških pogojih. Regulatorne celice T danes uvrščamo med ključne akterje v vzdrževanju imunske homeostaze pri čemer je njihova vloga pri oblikovanju imunskega odziva neizpodbitna. Številna odkritja glede različnih vrst, mehanizmov delovanj, kot tudi razvoj na področju pridobivanja ter manipulacije regulatornih celic T v laboratorijskih pogojih, so sprožila zanimanje za morebitno uporabo regulatornih celic T v terapevtske namene. Imunoterapija z regulatornimi celicami T bi v primerjavi s klasičnimi načini imunosupresije lahko nudila številne prednosti. Kljub obetom, ki jih prikazujejo živalski modeli, pa čakajo prenos tega znanja na ljudi in posledično klinično uporabnost številne prepreke. V tem preglednem članku podajamo najnovejša dognanja na področju regulatornih celic T v smislu njihove uporabnosti za celične terapije.

Ključne besede: Regulatorne celice T, Tr1, Treg, celična terapija

Abstract: In recent years there has been a major progress in understanding the biology of regulatory T cells and the way they function in physiological and pathophysiological conditions. Today, regulatory T cells are considered crucial players in the maintenance of immune homeostasis and carry an indisputable role in shaping the immune response. Numerous findings revealing various types, mechanisms of action, as well as improved methods of obtaining and manipulating regulatory T cells in laboratory environments, have raised interest in the possibility of using regulatory T cells for therapeutic purposes. Immunotherapy using regulatory T cells could hold many advantages over conventional immunosuppression treatments. Despite promising results obtained using animal models, there are still many obstacles in the way of transferring this knowledge to human studies and consequently to clinical use. In this review we summarize the latest findings on regulatory T cells in context of their use for cellular therapies.

Keywords: Regulatory T cells, Tr1, Treg, cell therapy

1 Uvod

V imunologiji poznamo regulatorne limfocite T že dobri dve desetletji. V zadnjih desetih letih pa se je razumevanje biologije teh celic poglobilo do te mere, da jih danes obravnavamo kot enega od temeljnih dejavnikov, ki so ključni za vzdrževanje imunske homeostaze, in sicer tako v fizioloških kot patofizioloških pogojih. S številnimi raziskavami so nedvoumno dokazali, da sta neustrezno delovanje ali celo odsotnost regulatornih celic T v človeškem organizmu jasno povezana s pojavom avtoimunskih obolenj, medtem ko njihova neokrnjena prisotnost zagotavlja vzpostavitev in vzdrževanje imunske tolerance na telesu lastne in tuje antigene (1-3). Poznamo številne podvrste regulatornih celic T, ki sodijo tako v populacijo CD4⁺ kakor tudi CD8⁺ limfocitov T (4). V tem preglednem članku se bomo zaradi obsežnosti področja osredotočili predvsem na dve poglavitni in hkrati najbolj raziskani vrsti regulatornih celic T, ki sta še posebej zanimivi zaradi njune potencialne uporabe za imunske celične terapije. To so CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorni limfociti T (Treg), ki se med odraščanjem razvijajo v priželjcu kot samostojna celična vrsta in so v posamezniku prisotne že od njegovega rojstva. Prepoznavnost celic

Treg je vezana predvsem na njihovo konstitutivno izražanje transkripcijskega dejavnika FoxP3. Druga vrsta regulatornih celic T se oblikuje v periferiji iz naivnih (neaktiviranih, nespominskih) limfocitov CD4⁺, in sicer pod točno določenimi pogoji. Te tako imenovane regulatorne celice Tr1 so sposobne proizvajati velike količine imunosupresivnega interlevkina-10 (IL-10), ki igra poglavitno vlogo v zaviranju imunskih odzivov. Obe vrsti celic, Treg in Tr1, lahko pridobimo in namnožimo v pogojih *in vitro* oziroma *ex vivo*, seveda v specifičnih okoljih, ki jih lahko vzpostavimo v celičnih kulturah. To pa pomeni, da bi tako pripravljene celice ob upoštevanju zahtev dobre proizvodne prakse (GMP), lahko uporabili za terapevtske namene. Prednosti tovrstnih celičnih terapij bi lahko bile, v primerjavi z običajno imunosupresijo, kot jo poznamo danes, številne. Antigensko specifične regulatorne celice bi namreč lahko zavrle prekomerne imunske odzive (kronična vnetna stanja), natanko tam, kjer se dogajajo, torej na točno določenem mestu v telesu, s čimer bi se izognili nespecifični sistemski imunosupresiji, ki povzroča številne neželene učinke. S takšno terapijo različnih avtoimunskih obolenj ter uporabo regulatornih celic T pred in po alogenskih presaditvah tkiv in organov, bi lahko vzpostavili dolgotrajno imunsko regulacijo/toleranco *in vivo*. Ker bi bile regulatorne

celice T pripravljene iz bolnikov oziroma transplantirančevih lastnih celic, bi s tem odpadla nevarnost aloreaktivnosti in alosenzibilizacije in tako kot smo že omenili, ne bi bilo potrebno uporabljati klasičnih imunosupresivov. Uporabnost imunosupresivnih celičnih terapij je zaradi številnih spodbudnih rezultatov preiskav v živalskih modelih več kot očitna, vendar zaenkrat še vedno obstajajo številne nejasnosti, kdaj in v kolikšni meri bi lahko izsledke tovrstnih predkliničnih študij uporabili pri človeku. Najpomembnejša vprašanja, ki se ob tem porajajo so namreč naslednja: katera vrsta regulatornih limfocitov T bi bila najprimernejša za uporabo v humani celični terapiji, kateri postopek priprave takšnih celic *in vitro* oz. *ex vivo* bi bil najvarnejši in najučinkovitejši ter katere človeške bolezni bi bile najprimernejše in najdovzjetnejše za takšno obliko zdravljenja.

2 Regulatorne celice T in mehanizmi njihovega delovanja

Limfocite T delimo v dve osnovni skupini, in sicer celice CD4⁺ in CD8⁺, znane tudi kot celice pomagalke (CD4⁺) in celice ubijalke (CD8⁺). Obe skupini vsebujeta številne celične podvrste. Med njimi razlikujemo naivne, ki še niso prišle v stik z antigenom, spominske, aktivirane oziroma efektorske in supresorske oz. regulatorne celice T. Prav zadnje so zaradi sposobnosti nadzorovanja imunskih odzivov v fizioloških in bolezenskih stanjih že nekaj let v središču pozornosti številnih raziskovalcev. Poznamo več vrst regulatornih celic, ki sodijo v obe osnovni skupini limfocitov T, CD4⁺ in CD8⁺ (tabela 1). V nadaljevanju bomo podrobneje opisali dve najbolj raziskani vrsti omenjenih celic, in sicer naravno prisotne limfocite Treg, ki jih opredeljuje prisotnost površinsko izraženih molekul CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ter celice Tr1, ki lahko nastanejo na periferiji iz naivnih CD4⁺ limfocitov T in katerih pglavitna značilnost je obsežno proizvajanje IL-10. Celice Treg nastanejo pri ljudeh po rojstvu v priželjcu in pri odraslem človeku predstavljajo le 5-10 % vseh CD4⁺ limfocitov T (5). Ob izplavitvi v periferijo je repertoar njihovih T-celičnih receptorjev (TCR) usmerjen v prepoznavanje organizmu lastnih antigenov. Njihovo proliferacijo v telesu omogoča specifično prepoznavanje lastnih antigenov ob hkratni stimulaciji kostimulatorne molekule CD28 in prisotnosti interlevkina 2 (6,7). Za Treg celice je značilno izražanje naslednjih površinskih molekul: CD62L (L-selektin), CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen) ter GITR (Glucocorticoid-Induced Tumour-Necrosis factor Receptor-related protein). Specifični transkripcijski dejavnik FoxP3⁺ je ključnega pomena za imunosupresorsko delovanje celic Treg. V miših, ki so jim odstranili gen za FoxP3, je prišlo do drastičnega upada celic Treg in posledično do hitrega razvoja hude oblike limfoproliferativnega avtoimunskega sindroma. Podobno bolezensko stanje razvijajo posamezniki, ki trpijo za redko recesivno genetsko motnjo imenovano IPEX (Immunedysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-linked syndrome). Bolezenski znaki pri takšnih bolnikih se kažejo v zelo agresivnem razvoju avtoimunskih obolenj, ki vodijo v zgodnjo smrt. Vse to pa je posledica različnih mutacij v genu za FoxP3 (8). Mehanizem delovanja limfocitov Treg naj bi bil v veliki meri odvisen od tesnih medceličnih stikov, poleg tega pa tudi od sposobnosti Treg, da proizvajajo in izločajo topne imunosupresivne molekule. Danes vemo, da igrata pglavitni vlogi pri zaviranju imunskih odzivov, s strani Treg,

CTLA-4 in površinsko vezani transformirajoči rastni dejavnik b (TGF- β) (9,10).

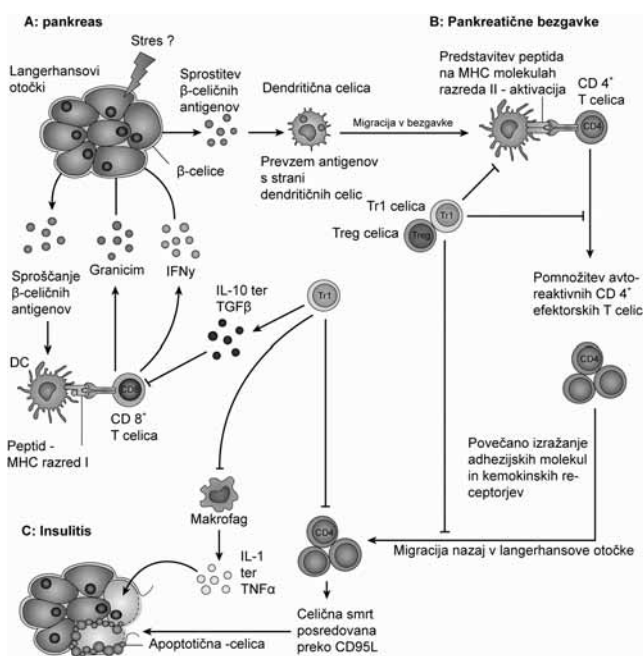
Tabela 1: Različni podtipi CD4⁺ in CD8⁺ regulatornih celic T

Table 1: Various subtypes of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells

Celični tip	Mesto izvora	Predlagan mehanizem supresije
CD4⁺ celice T		
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (Treg) celice	Priželjc	<i>In vitro</i> : celični kontakt <i>In vivo</i> : različni mehanizmi delovanja
CD4 ⁺ IL-10 ⁺ FoxP3 ⁻ (Tr1) celice	Periferija	IL-10, TGF- β (ne nastane v vseh primerih)
CD4 ⁺ TGF β ⁺ (Th3) celice	Periferija	TGF- β
CD8⁺ celice T		
CD8 ⁺ CD25 ⁺ celice T	Priželjc	TGF- β in CTLA-4
CD8 ⁺ CD28 ⁻ celice T	Periferija	ILT3, ILT4
CD8 ⁺ CD62 ⁺ CD122 ⁺ celice T	Ni definirano	Ni definirano
CD8 ⁺ IL-10 ⁺ celice T	Periferija	IL-10

Celice Tr1, za razliko od Treg nastanejo v periferiji iz naivnih CD4⁺ limfocitov T, za kar pa so potrebni točno določeni pogoji. Eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na razvoj celic Tr1 je citokinsko mikrokolje. Osrednjo vlogo pri tem igra IL-10. Sprva so ga uvrščali med citokine, ki so jih sposobne proizvajati le celice pomagalke vrste Th2 in ob tem ugotovili, da zavira odzive celic pomagalke vrste Th1 (11). Danes vemo, da igra IL-10 osrednjo vlogo pri nadzoru poteka vnetnih procesov, saj zavira imunske odzive limfocitov T in ohranja vzpostavljeno imunsko toleranco (12). Celic Tr1 zaenkrat ne moremo opredeliti s pomočjo značilnih površinskih molekulskih označevalcev, saj jih do sedaj še niso odkrili, zato pa imajo zelo specifičen profil proizvodnje citokinov. Tako je za celice vrste Th1 značilno izločanje IL-2 in drugih pro-vnetnih citokinov, med katere sodi interferon- γ (IFN- γ), ki je med drugim močan aktivator makrofagov. Nasprotno pa celice vrste Th2 proizvajajo citokine, ki ključno vplivajo na razvoj protitelesne (humoralne) imunosti: IL-4, IL-5, IL-13 in IL-10. Limfociti Tr1 tvorijo zelo malo oziroma nič IL-4 in IL-2, imajo pa veliko sposobnost proizvajanja IL-10 in v določenih okoliščinah tudi TGF- β (tabela 1) (13). IL-10 predstavlja osrednji mehanizem imunosupresivnega delovanja celic Tr1. Svoj delež k temu prispeva tudi TGF- β , za katerega pa še ni povsem jasno ali ga celice Tr1 lahko proizvajajo v vseh primerih.

Imunosupresorski mehanizmi delovanja celic Treg in Tr1 se med seboj sicer razlikujejo, nikakor pa se ne izključujejo. Vezani so na površinsko izražene molekule in biološko aktivne dejavnike, ki jih omenjene celice izločajo v okolje, kot na primer avtokrino in parakrino delujoči citokini, ki delujejo na vrsto imunskih in tkivnih celic v različnih stopnjah njihove aktivacije, kot je v primeru avtoimunega diabetesa prikazano na sliki 1.



Slika 1: Imunska regulacija patologije diabetesa tipa 1 z regulatornimi celicami T. β -celične antigene privzamejo dendritične celice in jih posledično predstavijo celicam T v bezgavkah. $CD4^+$ in $CD8^+$ celice T, specifične za omenjen antigen se aktivirajo ter migrirajo nazaj v Langerhansove otočke kjer poškodujejo pankreatične celice. Tako Tr1 kot Treg celice lahko kontrolirajo patološko aktivnost efektorskih celic T in dendritičnih celic na mnogih stopnjah razvoja bolezni.

Figure 1: The pathogenesis of type 1 diabetes and its control by regulatory T cells. β -cell antigens are taken up by dendritic cells which subsequently present these antigens to T cells in the lymph nodes. $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells specific for these antigens are activated and afterwards migrate to Langerhans islets where they cause pathology. Tr1 as well as Treg cells are able to control the pathological activity of effector T cells and dendritic cells through multiple stages of disease development.

3 Celične imunske terapije

Celične terapije lahko definiramo kot uporabo živih človeških ali živalskih celic za popravilo oziroma nadomestilo okvarjenega tkiva. O celični terapiji je pred 500 leti, v svoji knjigi *Die Grosse Wundartznei*, govoril že Paracelsus. V prakso jo je leta 1931 vpeljal dr. Paul Niehans, ko je namesto transplantacije paratiroidne žleze junca v bolnico zaradi pomanjkanja časa presadek razkosal na drobne delce ter ga dispergirane v sterilni slanici neposredno injiciral v umirajočo bolnico. Zdravje se ji je hitro izboljšalo in živela je še nadaljnih 30 let. Imunski odzivi so rezultat kompleksnega delovanja različnih vrst celic, makrofagov, dendritičnih celic, $CD4^+$ in $CD8^+$ limfocitov T, limfocitov B, itd. Te medsebojno komunicirajo preko številnih citokinov, kemokinov, hormonov in ostalih sporočilnih oziroma signalizacijskih

biomolekul ter tako bodisi pospešujejo ali zavirajo imunski odziv. Imunski odzivi lahko organizmu varujejo pred nevarnimi dejavniki kot so bakterije, virusi in rakave celice, lahko pa organizmu tudi škodijo, v kolikor se usmerijo proti telesu lastnim antigenom (avtoimunost, kronična vnetja). Tudi v primeru alogenske transplantacije pretirana aloimunska odzivnost organizma na presadek ali presadka na prejemnika nikakor ni zaželena, saj lahko resno ogrozi bolnikovo življenje. Pri zdravih ljudeh obstajajo številni mehanizmi takoimenovane osrednje imunske tolerance, ki poskrbijo, da se potencialno nevarni limfociti, tisti katerih T-celični receptor (TCR) prekomerno prepozna telesu lastne antigene, odstranijo že med samim nastajanjem repertoarja omenjene celične vrste v priželjcu. Navkljub temu pa se v periferijo vedno izplavi nekaj takšnih celic, ki kažejo določeno zvišano mero avtoaktivnosti. Njihovo aktivacijo imunski sistem preprečuje predvsem z vzpostavljanjem periferne tolerance, s kompleksnim procesom, v katerem igrajo osrednjo vlogo regulatorne celice T.

V okviru imunskega sistema torej delujejo različne vrste celic in drugih dejavnikov, ki omogočajo njegovo aktivacijo ali supresijo. Celična terapija z bolnikovimi regulatornimi limfociti T, predhodno pripravljenimi v dovolj velikih količinah *in vitro* ter nato prenesenimi nazaj v njegov organizem, ne bi predstavljala le nadomestila njihovega premajhnega števila, pač pa tudi dodatno imunsko celično komponento, ki bi lahko uravnotežila prekomerne lokalne ali sistemske imunske odzive. Celice kot terapevtsko sredstvo, bi torej lahko učinkovito in brez neželenih vplivov nadomestile določene farmakološke učinkovine oziroma bi lahko služile kot dopolnilo klasičnim oblikam zdravljenja (adjuvantna terapija).

4 Načini pridobivanja regulatornih celic Tr1 in $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ limfocitov Treg

Za osamitev limfocitov T iz vzorcev periferne krvi ter nato pripravo zelenih celic *in vitro* za njihovo kasnejšo uporabo *in vivo*, moramo nujno zagotoviti pogoje dobre proizvodne prakse. Vse korake proizvodnje celičnih pripravkov pa morajo spremljati tudi najvišji standardi kontrole kakovosti, vključno s popolno sledljivostjo (slika 2).

4.1 Pomnoževanje celic Treg *in vitro*

Poglavitna ovira pri pridobivanju limfocitov Treg je njihovo zelo majhno število v periferni krvi vsakega posameznika. Celice Treg predstavljajo namreč le 5-10 % celokupnega števila celic $CD4^+$. Najbolj razširjen postopek za izolacijo specifičnih vrst imunskih celic iz periferne krvi je izolacija s pomočjo feromagnetnih kroglic, na katere so vezana specifična protitelesa, ki prepoznajo značilne površinske molekule na tarčnih celicah. Po dodatku omenjenega reagenta v celično suspenzijo le-to spustimo skozi kolono, ki jo postavimo v močno magnetno polje. To nato zadrži le ciljno populacijo imunskih celic. Odvisno od namena lahko nato uporabimo bodisi zadržane, na feromagnetne kroglice vezane celice, ali pa tiste, ki so neovirano zapustile kolono. Pri osamitvi limfocitov Treg je bistvenega pomena njihova čistost, ki mora biti nad 99%. V nasprotnem primeru namreč obstaja tveganje, da so v pridobljeni celični suspenziji prisotni tudi pred kratkim aktivirani naivni in spominski limfociti T, ki prav tako izražajo

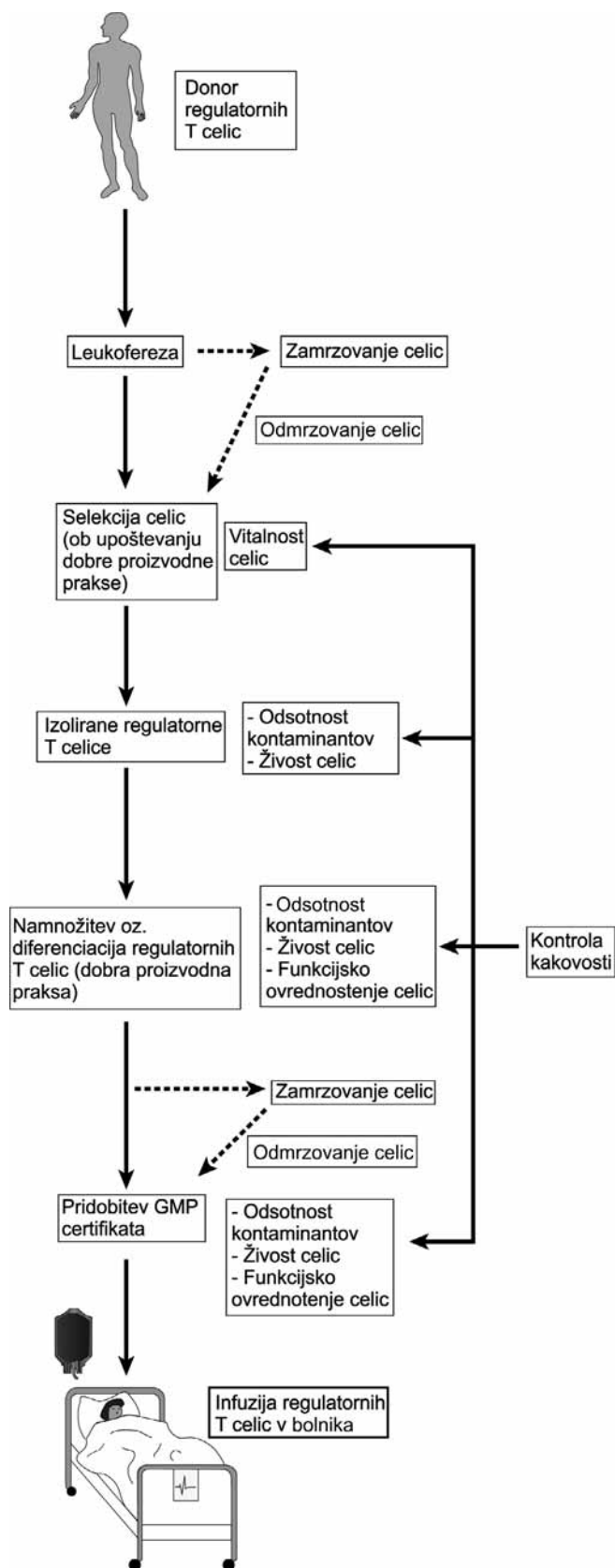
CD25. Kadar torej uspemo osamiti ustrezno čisto populacijo celic Treg, jih lahko ustrezno namnožimo *in vitro*. Značilnost omenjenih celic je, da se v pogojih *in vitro* precej nerade množijo. Ta problem lahko rešimo tako, da njihove T-celične receptorje (TCR) poliklonsko stimuliramo s protitelesi proti molekulam CD3 in CD28, ki predstavljajo najpomembnejše elemente v kompleksu aktivacijskih molekul T celičnega receptorja, ob tem pa uporabimo zelo visoke koncentracije IL-2. Tako namnoženi limfociti Treg obdržijo svoje imunosupresivne lastnosti ter izražajo pomembne površinske molekule kot sta L-selektin in kemokinski receptor CCR7, ki omogočajo potovanje celic v bezgavke, potem ko jih vrnemo bolniku. Z opisanim postopkom pa žal lahko poleg celic Treg učinkovito namnožimo tudi morebiti prisotne aktivirane in spominske limfocite T, s čimer seveda zmanjšujemo imunosupresivno učinkovitost takšnega pripravka. V prizadevanjih, da bi to preprečili, so do danes uspeli razviti en sam postopek, s katerim so uspeli doseči selektivno proliferacijo celic Treg, in sicer v prisotnosti rapamicina. Rapamicin je imunosupresivna učinkovina, za katero so ugotovili, da v ustreznih koncentracijah omogoča selektivno namnoževanje limfocitov Treg, medtem ko zavira proliferacijo efektorskih in spominskih celic CD4⁺CD25⁺T (14).

4.2 In vitro priprava celic Tr1, ki proizvajajo interlevkin-10

Za pripravo celic Tr1 *in vitro* potrebujemo naivne CD4⁺CD45RA⁺ limfocite T, osamljene iz periferne krvi darovalca oziroma bolnika. To je populacija celic T brez aktiviranih efektorskih CD4⁺CD25⁺ in spominskih CD4⁺CD45RO⁺ limfocitov T. Poglavitna prednost priprave celic Tr1 pred pripravo limfocitov Treg je v tem, da je v periferni krvi prisotno veliko večje število izhodnih naivnih celic T (do 30% vseh mononuklearnih krvnih celic) kot pa Treg (le okoli 5% vseh CD4⁺ T limfocitov). Večina CD4⁺ limfocitov T v periferiji je naivnih, kar pomeni da še niso prišli v stik z antigenom, ki bi ga lahko prepoznali s svojimi specifičnimi TCR. Če želimo iz naivnih limfocitov celic T pripraviti bodisi efektorske ali regulatorne (imunosupresivne) celice Tr1, moramo zagotoviti ustrezne specifične pogoje *in vitro*, s pomočjo katerih lahko usmerjamo njihovo preobrazbo. Pri tem je odločilen izbor citokinov, ki jih med aktivacijo izhodne populacije celic T dodamo v kulturo. Medtem ko razvoj efektorskih celic T pomagalk vzpodbujajo pro-vnetni citokini kot je na primer IL-12, nastanku limfocitov Tr1 celic botruje zlasti

Slika 2: Celosten prikaz razvoja in vrednotenja pridobivanja regulatornih celic T za uporabo v terapiji. Prikazani so potrebni koraki za pridobitev regulatornih celic T v obliki medicinskega pripravka. Izolacija, diferenciacija, njihova pomnožitev ter končna infuzija v pacienta morajo biti opravljene ob upoštevanju pravil dobre proizvodne prakse.

Figure 2: General display of development and assesement of preparation of regulatory T cells for use in cell therapy. The necessary steps for generation of regulatory T cells in terms of a medicinal product are shown. Cell isolation, differentiation, expansion along with the final infusion into the patient should be preformed in accordance with good manufacturing practice (GMP).



prisotnost IL-10. V splošnem obstajajo trije različni načini priprave regulatornih celic Tr1 *in vitro*:

1. S poliklonskim draženjem TCR s protitelesi proti ko-aktivacijskim molekulam CD3 in CD28, ob prisotnosti interleukina-10 in interferona alfa (IFN- α) (15). V tem primeru se izognemo predhodni pripravi antigen-predstavljaljočih celic (APC), konkretno najučinkovitejših med njimi, dendritičnih celic.
2. Z nezrelimi dendritičnimi celicami (DC). Dendritične celice so najpomembnejše APC in lahko v neaktiviranem oziroma nezrelem stanju vzpodbudijo nastanek regulatornih limfocitov T *in vitro*. Za ta proces potrebujemo 3 do 4 tedne, znotraj katerih v definiranih pogojih gojimo naivne limfocite CD4⁺ T v prisotnosti nezrelih DC. Tako pripravljene celice Tr1 proizvajajo velike količine IL-10 (16). V nasprotju s prej omenjenim postopkom takšen način indukcije limfocitov Tr1 ni poliklonski. Kadar izberemo dražilne nezrele DC in odzivne naivne celice T različnih oseb, takšne DC aktivirajo le aloantigensko specifične limfocite T, ki proliferirajo in ustrezno diferencirajo, medtem ko ostale celice propadejo. V primeru, da so dražilne in odzivne celice avtologne, kar pomeni, da pripadajo istemu darovalcu, moramo nezrelim DC dodati specifičen peptid, ki ga nato predstavijo naivnim limfocitom T in pri tem aktivirajo le tiste odzivne klonke, ki so sposobni prepoznati takšen antigen, vezan na lastne molekule pglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II (HLA- II). Na takšen način so že uspešno pripravili regulatorne limfocite Tr1, ki so specifično zavrlj imunske odzive na točno določene avtoantigene, kot sta naprimer GAD65 (diabetes) ali mielinski bazični protein (multipla skleroza) (17,18).
3. S tolerogenimi DC. Na dendritične celice lahko med njihovo diferenciacijo vplivamo z dodatkom različnih imunosupresivnih citokinov, predvsem IL-10, TGF- β ali pa učinkovin kot so kortikosteroidi, vitamin D₃ in njegovi derivati (19) ter drugimi protivnetno delujočimi učinkovinami (20) in s tem pridobimo takšne APC, ki imajo izrazite imunosupresivne lastnosti. Z njimi lahko učinkovito izzovemo nastanek potentnih in antigensko-specifičnih regulatornih limfocitov T. Takšen način priprave celic Tr1 je vedno bolj aktualen, saj omogoča njihovo pridobitev v mnogo krajšem času kot ob uporabi nezrelih DC.

5 Bolezni, ki bi jih lahko zdravili z regulatornimi limfociti T

Predklinične študije na živalih nazorno kažejo, da si v prihodnosti lahko od uporabe regulatornih limfocitov T veliko obetamo, saj so sposobni uravnavati pretiran obseg imunskih odzivov. Dandanes se v kliniki pogosto srečujejo z neželenimi imunskimi odzivi, še posebej pri avtoimunskih obolenjih in alogenskih presaditvah tkiv in organov. Večino predkliničnih študij so do sedaj opravili na miših, in sicer v okviru različnih modelov avtoimunskih obolenj in transplantacij organov ali kostnega mozga (tabela 2). V okviru tovrstnih raziskav so uspešno preprečili nastanek diabetesa tipa 1, multiplo sklerozo oziroma EAE - eksperimentalno izzvani encefalomyelitis, revmatoidni artritis, vnetne črevesne bolezni, sistemski lupus eritematosus in številna druga obolenja (17,18,21-28). Enako uspešen je bil prenos regulatornih limfocitov Tr1 oz. Treg v miši, ki so jim presadili alogenski kostni mozeg ali organe (29-32). Na osnovi uspešnih poskusov na živalih si danes

prizadevamo za razvoj takšnih protokolov, ki bi omogočali zdravljenje enakih bolezni tudi pri ljudeh. Ovire, s katerimi se srečujemo na poti k temu cilju pa so predvsem tehnične narave in so vezane na razvoj optimiziranih postopkov, ki bi nam omogočali pridobivanje dovolj velikih količin regulatornih limfocitov T v okviru pogojev, ki jih narekuje dobra proizvodna praksa.

Alogenska transplantacija kostnega mozga oziroma krvotvornih matičnih celic (KMC) je primer, v okviru katerega številni imunologi predvidevajo uspešno uporabo regulatornih celic T za ublažitev intenzivnih aloimunskih reakcij, ki lahko nastanejo ob takšnem posegu. Gre za tako imenovano reakcijo GvHD (Graft versus Host Disease), ko efektorske aloimunske celice, ki se nahajajo v presajenem darovalčevem kostnem mozgu prepoznajo prejemnikov organizem kot tuj in ga zato napadejo. Za zdravljenje takšnega stanja v tekočih eksperimentalnih kliničnih študijah preučujejo delovanje in učinkovitost poliklonskih regulatornih celic Treg. Tovrstne limfocite T lahko uporabimo tudi za zdravljenje avtoimunskih bolezni, pri čemer pa so tiste, ki so antigensko specifične, dejansko najučinkovitejše, saj lahko z njimi ne le izboljšamo, ampak celo ozdravimo tovrstna patološka stanja. Antigensko-specifične regulatorne celice Tr1, pripravljene v pogojih *in vitro*, učinkovito zavirajo avtoimunske reakcije zoper naslednje avtoantigene: inzulin in GAD65, ki sta ključna tarčna antigena pri diabetesu tipa I, mielinski bazični protein pri multipli sklerozi ter kolagen vrste II pri revmatoidnem artritisu (33). Zlasti pri diabetesu bi bila takšna zgodnja imunoregulatorna intervencija, ko je delovanje pankreatičnih β -celic še prisotna, ključnega pomena za ohranitev njihove aktivnosti.

Uporaba regulatornih limfocitov T bi bila zaradi njihove netoksičnosti oziroma varnosti zelo primerna tudi v primeru alogenskih presaditev organov. Na takšen način bi namreč lahko vzpostavili dolgotrajno imunsko toleranco na presajene aloantigene in s tem zagotovili popoln sprejem transplantov. Večina danes uporabljenih imunosupresivnih učinkovin zaradi svojih nespecifičnih sistemskih učinkov izzove številne nežele reakcije. S pripravo aloantigensko-specifičnih regulatornih limfocitov T *in vitro* (predvsem Tr1) pa bi lahko doživljenjsko zavirali škodljive aloimunske odzive na različne presadke. Tako naprimer v znanstvenem inštitutu San Raffaele v Italiji preiskujejo možnost imunosupresivnih intervencij z antigensko-specifičnimi limfociti Tr1, in sicer v kombinaciji z imunosupresivi, ki ne vplivajo na aktivnost omenjenih celic (34).

Genetske bolezni, ki pogojujejo zmanjšano sposobnost zaviranja imunskih odzivov so prav tako željeni cilj zdravljenja z imunoregulatornimi limfociti T. V primeru recesivne motnje IPEX, kjer gre za mutacije v genu FoxP3, je vzdrževanje imunske homeostaze v telesu močno okrnjeno. V miših s podobnim sindromom so s prenosom avtolognih limfocitov Treg, pripravljenih *in vitro*, uspešno omilili nastanek številnih avtoimunskih obolenj. Pri ljudeh pa je omenjena situacija veliko bolj zapletena, saj FoxP3 ne izražajo le regulatorne celice T, temveč tudi aktivirani efektorski limfociti T. Podrobnejše poznavanje takšnih in podobnih mehanizmov imunogenetskih motenj je vsekakor bistveno za uspešne terapije na tem področju (35).

Tabela 2: Celična terapija imunsko posredovanih bolezni z regulatornimi celicami T je uspešna v številnih živalskih modelih.

Table 2: Cell therapy of immune-mediated diseases using regulatory T cells has met with success in many animal models.

Bolezen	Vrsta regulatornih celic T	Živalski model	Učinek na bolezen	Viri
Avtoimune bolezni				
Diabetes tipa 1	CD4+CD25+FoxP3+ celice specifične za BDC2.5 antigen Tr1 celice specifične za GAD65 antigen	NOD.Rag ^{-/-} miši s prenesenimi diabetogenimi celicami T	Preprečitev bolezni	21
		NOD.SCID miši s prenesenimi diabetogenimi celicami T	Preprečitev bolezni	17
Multipla skleroza	OVA-specifične Tr1 celice	Miši, imunizirane s homogenatom hrbtnjače	Preprečitev inducirane bolezni	18
Revmatoidni artritis	CD4+CD25+FoxP3+ celice	Miši – artritis inducirani s kolagenom	Preprečitev napredovanja bolezni v zgodnji fazi	25
Vnetne črevesne bolezni	CD4+CD25+FoxP3+ celice OVA-specifične Tr1 celice	Imunokompromirane miši s prenesenimi patološkimi celicami T	Ozdravitev že vzpostavljene bolezni	27
		Imunsko oslABLJENE miši s prenesenimi patološkimi celicami T	Preprečitev nastanka bolezni	26
Sistemska lupus eritematozus	Iz priželjca izolirane CD4+CD25+FoxP3+ celice	Mišji model	Vzpostavljen nadzor nad patološkim procesom	28
Transplantacije				
Graft-versus-host-disease (GVHD)	CD4+CD25+FoxP3+ celice	Presaditev alogenskega kostnega mozga pri miših	Preprečitev smrti zaradi GVHD	29
	Aloantigensko-specifične Tr1 celice	Presaditev alogenskega kostnega mozga pri miših	Preprečitev smrti zaradi GVHD	30
Zavrnitev presajenega organa	CD4+CD25+FoxP3+ celice pomnožene <i>ex vivo</i>	Presaditev alogenih pankreasnih otočkov pri miših	Preprečena zavrnitev presadka	32
	Tr1 celice inducirane <i>in vivo</i>	Presaditev alogenih pankreasnih otočkov pri miših	Preprečena zavrnitev presadka	31

6 Zaključek

Regulatorni limfociti T so bili na področju imunologije še nedolgo tega deležni le malo zanimanja, v zadnjih letih pa so se uveljavili kot pglavilni regulatorji imunskih odzivov in danes predstavljajo obetajoče dejavnike, namenjene zdravljenju imunsko pogojenih bolezni. Celične terapije avtoimunskih in kroničnih vnetnih bolezni, kakor tudi imunomodulacije poteka alogenskih transplantacij predstavljajo nove terapevtske pristope, ki bi lahko v mnogočem preseglj ustaljene načine zaviranja neželenih oziroma prekomernih učinkov delovanja imunskega sistema. Pglavilna slabost uporabe klasičnih imunosupresivov, kot so kortikosteroidi, ciklosporin, rapamicin in ostalih je namreč v tem, da poleg številnih ostalih stranskih učinkov, nespecifično in na splošno zavirajo imunsko reaktivnost, kar lahko vodi v večjo dovzetnost za infekcije in večje tveganje za nastanek malignih obolenj. Z uporabo antigensko specifičnih, avtolognih, torej posameznemu bolniku ali prejemniku presadka lastnih regulatornih celic T, pripravljenih *in vitro*, pa bi se v celoti izognili vsem omenjenim neželenim učinkom. Kljub

tako obetajočim napovedim oziroma pričakovanjem pa še vedno obstajajo številna vprašnja, na katera bomo morali odgovoriti, preden bomo začeli regulatorne limfocite T uporabljati v humani medicini. Eno od najpomembnejših je vsekakor tehnična izvedba priprave tovrstnega celičnega terapevtskega sredstva. Tako bo naprimer osamitev zadostne izhodne količine CD4+CD25+FoxP3+ limfocitov Treg, zaradi njihovega zelo omejenega števila v perifernih krvi vedno težavna, še zlasti pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, pri katerih naj bi bilo njihovo število še manjše. Regulatorne celice Tr1 lahko, kot smo že omenili, pridobimo iz naivnih CD4+ limfocitov T, ki jih je v perifernem krvnem obtoku dovolj, vendar pa zaenkrat še nimamo na razpolago dovolj učinkovitih protokolov, s katerimi bi lahko v razmeroma kratkem časovnem obdobju pripravili obsežne populacije tovrstnih antigensko-specifičnih celic *in vitro*. Ne glede na vrsto in začetno število izhodnih populacij limfocitov T, jih bo v vsakem primeru potrebno zelo učinkovito gojiti, funkcijsko usmerjati in pomnoževati ter pri tem ves čas izpolnjevati zahteve in pogoje, ki jih narekuje dobra proizvodna praksa. Poleg tega je, v nasprotju s transgenimi mišmi, pri ljudeh prisotna

izrazita inter-individualna biološka variabilnost. Pri tem moramo omeniti zlasti razlike v izjemno polimorfni genih in molekulah HLA (Human Leukocyte Antigens), ki sodijo v poglavni kompleks tkivne skladnosti in ki pogojujejo učinkovitost predstavljanja, tako telesu lastnih kot tujih antigenov, limfocitom T. To dejstvo seveda še dodatno povečuje zahtevnost priprave učinkovitih antigensko-specifičnih regulatornih celic T. In nenazadnje, laboratorijska oprema, visoko izobraženo in specializirano osebje in vsi potrebni reagenti, ki jih potrebujemo za izdelavo celičnih terapevtikov, predstavljajo velik finančni zalogaj. Kljub številnim zahtevnim izzivom pa ostaja področje raziskav optimalne priprave, delovanja in potencialne klinične uporabe regulatornih limfocitov T še naprej zelo aktualna tema. O tem priča izjemno veliko število znanstvenih publikacij, ki so bile na tem področju objavljene v zadnjih nekaj letih. K temu pa je in bo tudi v prihodnje, po svojih najboljših močeh, prispevala tudi naša raziskovalna skupina.

Avtorji se želijo zahvaliti Tomažu Dolinarju za grafično oblikovanje prispevka.

7 Literatura

1. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-440
2. Malek TR, Bayer A. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature Rev. Immunol.* 2004; 4: 665-674
3. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 2001; 27: 68-73
4. Schevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201
5. Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H et al. Naturally arising FoxP3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006; 305: 51-66
6. Lerman MA, Larkin J, Cozzo C et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell repertoire formation in response to varying expression of a neo-self-antigen. *J. Immunol.* 2004; 173: 236-244
7. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK et al. CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2003; 171: 3348-3352
8. Walker MR, Kasprowitz DJ, Gersuk VH et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1437-1443
9. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 253-257
10. Tanq Q, Boden EK, Henriksen KJ et al. Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2996-3005
11. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; 248: 1230-1234
12. Moore KW, de Waal-Malefyt R, Dang MN et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683-765
13. Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R et al. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Semin. Immunol.* 2006; 18: 120-127
14. Battaglia M, Stabili A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105: 4743-4748
15. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* 2000; 166: 5530-5539
16. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1213-1222
17. Chen C, Lee WH, Yun P et al. Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 2003; 171: 733-744
18. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A et al. *In Vitro* generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 603-616
19. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 610-621
20. Svajger U, Vidmar A, Jeras M. NFA renders dendritic cells tolerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4. *International Immunopharmacology* 2008; 8: 997-1005
21. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M et al. *In Vitro*-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 1455-1465
22. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K et al. CD25⁺CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 1467-1477
23. Masteller EL, Warner MR, Tang Q et al. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2005; 175: 3053-3059
24. Ding Q, Lu L, Wang B et al. B7H1-Ig fusion protein activates the CD4⁺IFN- γ receptor⁺ type 1 T regulatory subset through IFN- γ -secreting Th1 cells. *J. Immunol.* 2006; 177: 3606-3614
25. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25⁺ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2212-2221
26. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
27. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2003; 170: 3939-3943
28. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA et al. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of *ex vivo* expanded regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006; 177: 1451-1459
29. Taylor PA, Lees CJ, Blaazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493-3499
30. Zeller JC, Panoskaltis-Mortari A, Murphy WJ et al. Induction of CD4⁺ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- β . *J. Immunol.* 1999; 163: 3684-3691
31. Battaglia M, Stabili A, Draghici E et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 2006; 55: 40-49
32. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S et al. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol.* 2001; 167: 1945-1953
33. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 585-598
34. Spletna stran: <http://www.sanraffaele.org/static/upl/Sc/SciRep2007.pdf>
35. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1713-1722.

Koencim Q_{10} kot prehransko dopolnilo in zdravilo

Coenzyme Q_{10} as a Dietary Supplement and Drug

Janko Žmitek, Katja Žmitek

Povzetek: Koencim Q_{10} (CoQ_{10}) ima nenadomestljivo vlogo prenašalca elektronov med kompleksi mitohondrijske dihalne verige ter aktivnega nosilca protonov prek notranje mitohondrijske membrane, s čimer sodeluje v procesu nastajanja gradienta protonov in sinteze ATP. CoQ_{10} je hkrati tudi edini endogeni maščobotopni antioksidant v telesu. Del ga zaužijemo tudi s hrano. Njegova biološka vloga temelji na redoks ravnotežju med (oksidirano) ubikinonsko in (reducirano) ubikinolno obliko, med katerima neprestano prehaja. Redoks stanje zaužitega CoQ_{10} (ubikinon / ubikinol) ne vpliva na njegovo funkcijo v telesu. Študije kažejo, da se koncentracije celokupnega CoQ_{10} v najaktivnejših telesnih organih s staranjem zmanjšujejo, raziskovalci pa so pokazali tudi pozitiven prispevek dodajanja CoQ_{10} pri različnih zdravstvenih stanjih. Ker se zaradi svojih fizikalnih lastnosti tako ubikinon kot ubikinol zelo slabo absorbirata iz prebavnega trakta, je potrebno posebno pozornost posvečati biodostopnosti proizvodov. Prvi večji korak za povečevanje biodostopnosti CoQ_{10} predstavlja razvoj oljnih suspenzij (mehkih kapsul) z ubikinonom in kasneje ubikinolom, nadaljnega pa razvoj vodotopnih oblik CoQ_{10} . Predstavljen je tudi pregled izdelkov s CoQ_{10} na slovenskem tržišču.

Ključne besede: CoQ_{10} , ubikinon, ubikinol, biorazpoložljivost, biodostopnost, varnost, koencim Q_{10}

Abstract: Coenzyme Q_{10} is a lipophilic compound playing an important role in the mitochondrial respiratory chain, where it acts as an electron carrier and as a carrier of proton transfer across membranes. It is also well known for its antioxidant properties. In the body CoQ_{10} mostly has an endogenous origin and is only partly derived by food. The biological role of CoQ_{10} is built on its redox equilibrium and continuous transformation between (oxidised) ubiquinone and (reduced) ubiquinol forms. Its function in the body is not affected by the form in which it is consumed. A decline in CoQ_{10} levels can be observed with increasing age, especially in the most active organs, while the beneficial effect of supplementation has been observed in many medical conditions. Due to its physical properties CoQ_{10} is very poorly absorbed from the gastrointestinal tract. Oil suspensions (soft-gel capsules) of ubiquinone and later ubiquinol represent the first important steps in increasing the bioavailability, while a further breakthrough was achieved with the development of water-soluble forms. An overview of CoQ_{10} products available on the Slovenian market is presented.

Key words: CoQ_{10} , ubiquinone, ubiquinol, bioavailability, safety, coenzyme Q_{10}

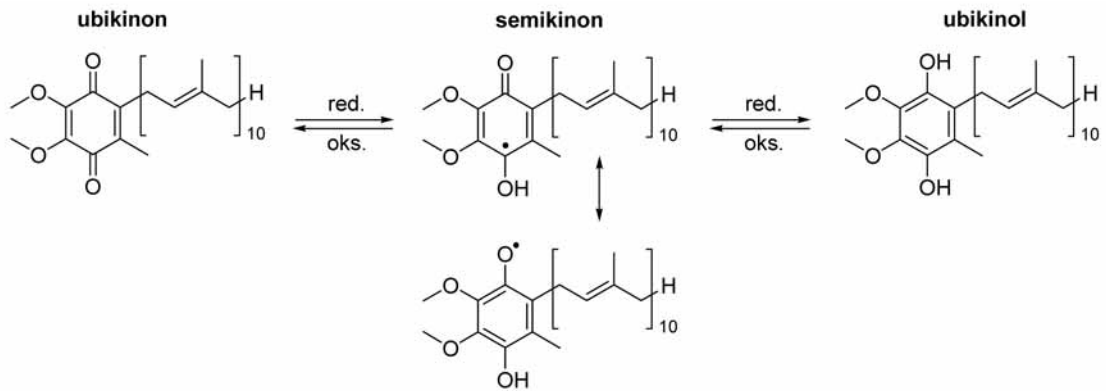
1 Uvod

Koencimi Q so lipofilne molekule, ki so naravno prisotne v vsaki živi celici, zaradi njihove velike razširjenosti v naravi (ubikvitete) pa jih imenujemo tudi *ubikinoni* (1). Kemijsko gre za 2,3-dimetoksi-5-metil-6-polliizoprenil-1,4-benzokinone, ki jih poimenujemo glede na dolžino polliizoprenske verige: stranska veriga koencima Q_{10} , sicer najpogostejše oblike v človeku in večini sesalcev, je tako sestavljena iz 10 izoprenskih enot. Prvič so ga izolirali leta 1957 v okviru raziskav mitohondrijskega transportnega sistema, v naslednjih letih pa so potrdili tudi njegovo ključno vlogo v procesih oksidativne fosforilacije (1). Pomembne raziskave za razumevanje vloge koencima Q_{10} v celičnih energetskih procesih je vodil Peter D. Mitchell, ki je leta 1978 za svoje delo prejel Nobelovo nagrado.

Koencim Q_{10} je amfifilna molekula, ki ima zaradi dolge nepolarne stranske verige močno prevladujoč lipofilni značaj. Zato se v telesu pojavlja le v treh oblikah: v micelnih agregatih, v lipidnih membranah, ali vezan na proteine (2). Večinoma se nahaja v membranah mitohondrijev, medtem ko je v citosolu le okrog 10% skupnega koencima Q_{10} (2). Vse biološke funkcije CoQ_{10} temeljijo na njegovem redoks ravnotežju, saj relativno enostavno prehaja med (polno oksidirano) ubikinonsko, semikinonsko in (polno reducirano) ubikinolno obliko (**Slika 1**), pri čemer redoks potencial ubikinon/ubikinol [$E_{m(7,0)}$] znaša okrog 0,1 V (1). Za enostavnejšo obravnavo v tem prispevku je termin *koencim Q_{10}* (CoQ_{10}) uporabljen za ravnotežno zmes, medtem ko sta termina *ubikinon* in *ubikinol* uporabljena, ko govorimo neposredno o oksidirani oz. reducirani obliki.

Slika I: Redoks stanja koencima Q_{10}

Figure I: Redox forms of coenzyme Q_{10}



Medtem ko je CoQ_{10} koencim različnim membranskim encimom, je najboljše raziskana njegova ključna vloga v kompleksih mitohondrijske dihalne verige: *NADH-CoQ₁₀ reduktazi* (kompleksu I), *sukcinat-CoQ₁₀ reduktazi* (kompleksu II) in *ubikinol-citokrom c reduktazi* (kompleks III) (2). Ima zelo pomembno vlogo prenašalca elektronov med navedenimi kompleksi in tako sodeluje pri nastajanju membranskega gradienta protonov, potrebnega za delovanje *ATP sintaze*. Ker sta za redukcijo ubikinona v ubikinol poleg dveh elektronov potrebna tudi dva protona, bi bil CoQ_{10} lahko v proces nastajanja gradienta protonov vključen tudi neposredno, če bi redukcija in oksidacija CoQ_{10} potekali na nasprotni strani membrane (3). Slednje je bilo z veliko verjetnostjo potrjeno pri kompleksu III, medtem ko mehanizem uporabe redoks energije za prenos protonov preko notranje mitohondrijske membrane v kompleksih I in II še ni povsem jasen (2). Za natančnejši opis vloge CoQ_{10} v mitohondrijskih procesih priporočamo ogled preglednega članka na to temo, ki so ga pred kratkim pripravili *Lenaz in sodelavci* (2).

Znano je, da procesi oksidativne fosforilacije (še posebej v kompleksih I in III) predstavljajo največji izvor reaktivnih kisikovih vrst (ROS, *reactive oxygen species*), npr. peroksidov in radikalov (2). Ireverzibilna škoda, ki jo le-te povzročajo na različnih biološko pomembnih molekulah v celicah, je tesno povezana s procesi staranja. Zelo

pomembno lastnost CoQ_{10} zato predstavljajo njegove antioksidativne lastnosti. CoQ_{10} je ključna komponenta telesnega obrambnega mehanizma zoper ROS, saj je edini endogeni maščobotopni antioksidant (4). Pri tem ne gre zanemariti, da ga je največ prav v mitohondrijih, glavnem izvoru ROS (4). Dokazano je bilo tudi njegovo sinergistično delovanje z drugimi antioksidanti, npr. α -tokoferolom (5).

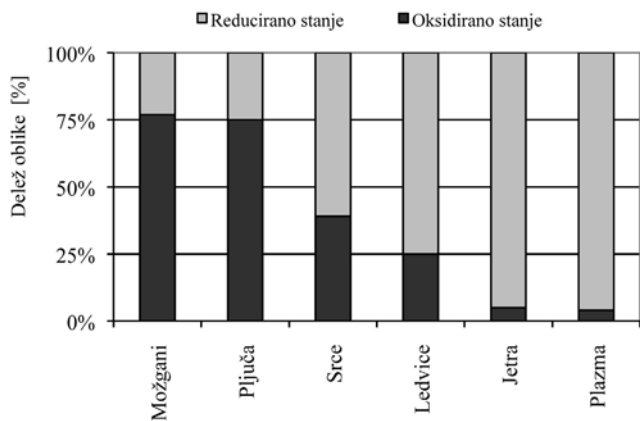
Koncentracije CoQ_{10} so v različnih delih telesa zelo različne; največ ga je v najbolj aktivnih organih, t.j. v srcu, ledvicah in jetrih (6). Tudi položaj redoks ravnotežja CoQ_{10} je v različnih delih telesa različen. Tako je npr. v plazmi in ledvicah ravnotežje pomaknjeno v smeri reducirane oblike, medtem ko se v možganih in pljučih CoQ_{10} nahaja pretežno v obliki ubikinona (Slika II).

2 Pomanjkanje in klinična raba

V človeškem telesu je skupaj okrog 2 grama CoQ_{10} ; njegov povprečni razpolovni čas je 4 dni in telo ga dnevno nadomesti okrog 0,5 g predvsem z endogeno sintezo, deloma pa tudi s hrano (6,8).

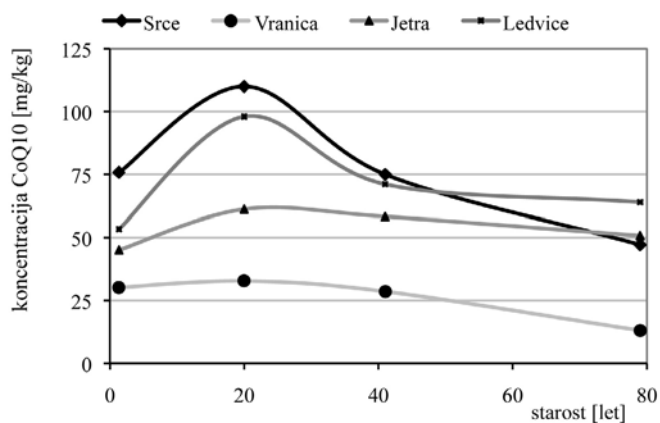
V splošnem je pomanjkanje CoQ_{10} v telesu lahko posledica motnje v biosintezi, pomanjkljivega vnosa s hrano, ali pa prevelike porabe v organizmu (9). Njegova biosinteza se začne iz tirozina preko kaskade osmih aromatskih prekurzorjev, v proces pa je vključenih tudi več vitaminov: C, B2, B6, B12, folna kislina, niacin in pantotenska kislina (10). Učinkovitost sinteze s staranjem telesa pada, še posebej velik padec koncentracije CoQ_{10} pa so opazili v najaktivnejših organih (Slika III) (6). Tako se npr. koncentracija v srcu začne nižati že po 20. letu (110 mg/kg) in se do 80 leta zniža za skoraj 60% (47 mg/kg) (6). Tudi v vranici se v enakem obdobju koncentracija zmanjša za 60%, medtem ko je zmanjšanje v ledvicah in jetrih nekaj manjše (35 oz. 17%). Endogena sinteza CoQ_{10} je lahko zmanjšana tudi pri rednih uživalcih inhibitorjev *HMG-CoA reduktaze*, zdravil za zniževanje holesterola (statinov) (11). Statini namreč kompetitivno inhibirajo tvorbo mevalonata, ki je prekurzor tako pri biosintezi holesterola kot koencima Q_{10} , kar je verjetno povezano z nastankom statinskih miopatij (11). Pomanjkanje CoQ_{10} so opazili tudi v različnih bolezenskih stanjih (12), pri ljudeh z neuravnoteženo prehrano in kadilcih (13).

Pomembno vlogo koencima Q_{10} v klinični rabi sta pred nedavnim v slovenski strokovni literaturi že predstavila *Pavlin* (14) in *Rus* (9), zato je v tem prispevku ne bomo podrobneje obravnavali. Dobro poznana je sicer uporaba Q_{10} pri srčnem popuščanju, kasneje pa so ga kliniki



Slika II: Položaj redoks ravnotežja CoQ_{10} v različnih organih in plazmi (7)

Figure II: CoQ_{10} redox equilibrium in different organs and plasma (7)



Slika III: Starostno povezane spremembe koncentracije CoQ10 v nekaterih človeških organih (6)

Figure III: Age-related changes in concentrations of CoQ10 in selected human organs (6)

kot pomožno zdravilo začeli uporabljati tudi pri mnogih drugih stanjih, npr. pri Parkinsonovi bolezni, akutnem infarktu, migreni, esencialni hipertenziji, Alzheimerjevi bolezni, Friedreichovi ataksiji, statinski miopatiji, makularni degeneraciji, neplodnosti moških, diabetesu, periodontitisu in v kombinaciji s kemoterapijami (14). Indikacijsko območje za klinično rabo se je v zadnjih letih močno razširilo, tudi na področja, kjer nimamo uspešnih zdravil. Objavili so prispevek CoQ₁₀ k zmanjšanju oksidativnega stresa v koži (15), pred kratkim pa tudi prva poročila o njegovih potencialnih vplivih na zaviranje nastanka katarakte (16) ter zmanjšanje možnosti za preeklampsijo med nosečnostjo (17). Za zanesljivo potrditev vpliva CoQ₁₀ na preprečevanje ali zdravljenje različnih bolezni bo potrebno opraviti še več dobro načrtovanih kliničnih raziskav.

3 Eksogeni koencim Q₁₀ in hrana

Z upadanjem učinkovitosti endogene sinteze postaja pomembnejši eksogeni vnos. Najbolj logičen zunanji vir je hrana, vendar raziskave kažejo, da je takšen vnos zaradi nizke naravne vsebnosti CoQ₁₀ v živilih majhen. V razvitem svetu dnevno človek, ki uživa uravnoteženo in raznovrstno hrano, zaužije povprečno le 3-6 mg koencima Q₁₀ (18). Doslej znane študije vsebnosti koencima Q₁₀ v hrani je pred kratkim celovito pregledal *Pravst s sodelavci* (18); ugotovili so, da na vsebnost CoQ₁₀ v živilih precej vpliva tudi geografsko poreklo. Vsebnost CoQ₁₀ v izbranih živilih je prikazana v Preglednici I. S koencimom Q₁₀ so najbogatejši rdeče meso (govedina do 40 mg/kg) in migrirajoče ribe (sardine do 64 mg/kg); opazili so pomembne razlike med posameznimi deli živali. Bogati so tudi oreščki (arašidi 27 mg/kg) in rastlinska olja (olivno do 160 mg/kg). Mnogo manj CoQ₁₀ lahko najdemo v mleku in mlečnih izdelkih, zlasti v tistih z manj maščobami (do 2 mg/kg), v sadju in zelenjavi ga je večinoma pod 5 mg/kg. Med slednjimi so najbogatejši peteršilj (do 26 mg/kg), cvetača (do 9 mg/kg) in avokado (10 mg/kg). V splošnem je opaziti večjo vsebnost CoQ₁₀ v živilih z več maščobami, opazne pa so tudi razlike glede na pridelavo in tehnološko obdelavo. Podatki kažejo, da se s predelavo živil, zlasti z odstranjevanjem maščob, v katerih se koencim Q₁₀ raztaplja, njegova vsebnost

Preglednica I: Vsebnost CoQ₁₀ v nekaterih živilih (18)

Table I: CoQ₁₀ content in various foods (18)

Hrana	Konc. CoQ ₁₀ [mg/kg]
Meso	
- govedina	16-40
- svinjina	13-45
- perutnina	8-25
Ribe	
- sardine	5-64
- skuše (rdeče meso)	43-67
- skuše (belo meso)	11-16
Olja	
- koruzno (Italija)	106-139
- olivno (Italija)	109-160
- sončnično (Italija)	10-15
Oreščki	
- arašidi	27
- orehi	19
- mandlji	5-14
Zelenjava	
- peteršilj	8-26
- brokoli	6-9
- cvetača	2-7
Sadje	
- avokado	10
- črni ribez	3
- jagode	1

zmanjšuje. Razlike v objavljenih vsebnostih CoQ₁₀ v enakih živilih so precejšnje, razlog za to pa bi lahko bil tudi v različnih uporabljenih analitskih metodah. Podatke je zato potrebno obravnavati previdno, tiste, ki se ne nanašajo na točno določen izdelek oz. vzorec, pa jemati zgolj kot orientacijske.

Z običajnim načinom prehranjevanja ni mogoče zadostiti povečanim potrebam po CoQ₁₀, še zlasti ne z nizkomaščobno hrano. Zato so se na tržišču pojavila funkcionalna živila, obogatena s tem koencimom, s katerimi je mogoče za nekajkrat povečati njegov povprečni naravni dnevni vnos v telo.

4 Dodajanje koencima Q₁₀

V zadnjih letih so pravi razmah doživeli formulirani izdelki s CoQ₁₀ v različnih farmacevtskih oblikah, s katerimi lahko v telo vnašamo precej večje količine tega koencima, kot to lahko dosežemo s hrano.

4.1 Absorpcija in prenos CoQ₁₀

Koencim Q₁₀ je rumena kristalinična snov s tališčem okrog 50°C in relativno veliko molekulsko maso (Mr = 863) (1). Zaradi svoje kemijske zgradbe je netopen v vodi, hkrati pa je omejena tudi njegova topnost v lipidih. Posledično se zelo slabo absorbira iz prebavnega trakta. Učinkovitost absorpcije je odvisna od več dejavnikov, tudi od načina zaužitja in odmerka CoQ₁₀. Absorpcijo lahko povečamo s hkratnim uživanjem hrane (19) in z delitvijo enega večjega na več manjših odmerkov CoQ₁₀ tekom dneva (20). Študije na glodalcih so pokazale

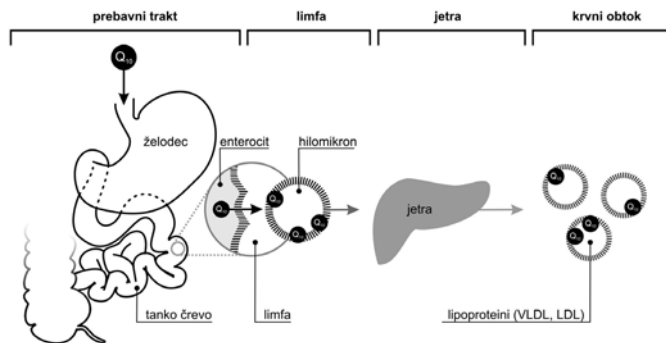
Preglednica II: Delež odmerka CoQ_{10} v plazmi po zaužitju v času najvišje koncentracije

Table II: The amount of CoQ_{10} in plasma following a single oral dose at the time of the peak plasma level

Zaužita oblika CoQ_{10}	Delež odmerka v plazmi v času t_{max}	Referenca
obrok, pripravljen iz svinjskega srca (hrana)	3,9%	(23)
kristalinični CoQ_{10}	0,2-1,6%	(24,25)
oljne suspenzije ubikinona	1,6-3,6%	(25,26)
oljne suspenzije ubikinola	1,8-2,6%	(24,27)
CoQ_{10} v obliki vodotopnega Q10CD kompleksa (slika IV)	4,5-4,8%	(26)

Opomba: Predpostavljen volumen plazme 2,5L.

le 2-3% absolutno absorpcijo CoQ_{10} (21), pri ljudeh pa je nekoliko višja – predvidoma nekje do 10% (22). Učinkovitost absorpcije CoQ_{10} je zelo odvisna tudi od oblike, v kateri učinkovino zaužijemo. Rezultati farmakokinetičnih študij na ljudeh so pokazali, da je v krvi v času maksimalne krvne koncentracije CoQ_{10} (t_{max}) navadno do 5% zaužitega odmerka CoQ_{10} (nekaj primerov je navedenih v **Preglednici II**) – najmanj v primeru kristalinične učinkovine (0,2-1,6%), in največ po zaužitju vodotopnih oblik CoQ_{10} (4,5-4,8% za vodotopni Q10CD kompleks). Poudariti je potrebno, da izračunane vrednosti predstavljajo le stanje v izbranem času (t_{max}) in jih zato ne smemo obravnavati kot približke absolutne absorpcije, temveč le kot njen minimum.



Slika IV: Shematski prikaz absorpcije in transporta CoQ_{10}

Figure IV: Scheme absorption and transport of CoQ_{10}

Mehanizem absorpcije in prenosa CoQ_{10} (**Slika IV**) je zelo podoben kot pri α -tokoferolu (vitamin E), podobni lipofilni molekuli. Sama absorpcija temelji predvsem na emulzifikaciji s pomočjo žolčnih kislin v tankem črevesu; ni znano, da bi kateri del črevesa pri tem imel specifično vlogo. Med absorpcijo pride v enterocitih do naravne redukcije koencima, ki se v krvi pojavi predvsem v reducirani obliki (28). Metabolizem CoQ_{10} pri človeku ni dobro raziskan; večina raziskav je bila narejena na živalih. Kot kaže se CoQ_{10} metabolizira v vseh tkivih, izloča pa se predvsem z blatom (28). Maksimalno koncentracijo v krvni plazmi dosežemo v 2-6 urah po zaužitju (29), po prenehanju dodajanja pa se krvna koncentracija v nekaj dneh povrne na izhodiščno raven ne glede na obliko zaužite substance.

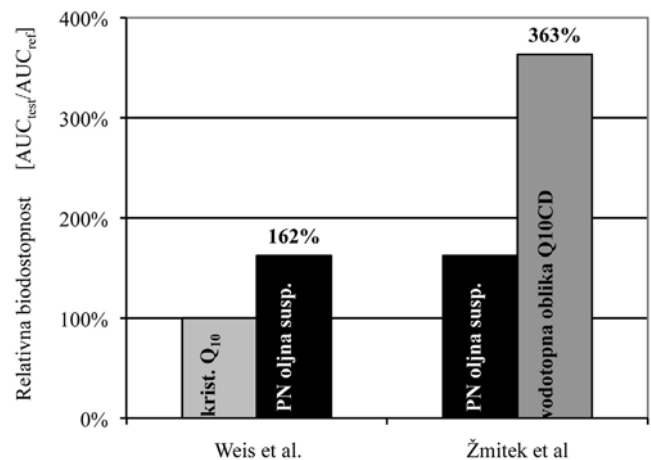
4.2 Povečevanje biodostopnosti

Poglavitni vzrok za nizko biodostopnost ubikinona in ubikinola je nezadosten čas za absorpcijo v prebavnem traktu, kar je značilno tudi

za nekatere druge v vodi netopne snovi. Kot smo že omenili ima na absorpcijo CoQ_{10} največji vpliv uporabljena oblika učinkovine oz. formulacija proizvoda.

Oljne suspenzije ubikinona

Za povečevanje absorpcije in s tem biodostopnosti so raziskovalci uporabili različne strategije v smeri optimizacije formulacij in razvoja novih oblik CoQ_{10} (29). Pogost princip v takšnih primerih je zmanjševanje delcev do mikro in nano velikosti, vendar v tem primeru tak pristop ni bil učinkovit. Prvi uspešni pristop je bila tvorba suspenzij v različnih oljih (mehke kapsule), pri čemer na povečevanje absorpcije CoQ_{10} iz teh izdelkov pomembno vplivajo mnogi dodatki, npr. emulgatorji, kot je pokazal npr. *Weis s sodelavci* z raziskavami vpliva formulacije in dodatkov na biodostopnost CoQ_{10} . Mehke želatinske kapsule s CoQ_{10} v sojinem olju z dodatki polisorbata 80 samega ali v



Slika V: Primerjava dveh študij relativne biodostopnosti CoQ_{10} ; v prvi so mehke kapsule s suspenzijo CoQ_{10} v sojinem olju (Pharma Nord) [PN oljna susp.] primerjane s kristaliničnim CoQ_{10} [Weis in sodelavci (25)], v drugi pa z vodotopno obliko CoQ_{10} (kompleks z β -ciklodekstrinom; Q10CD) [Žmitek in sodelavci (26)]

Figure V: Comparison of two relative bioavailability studies for CoQ_{10} ; soft-gel capsules with CoQ_{10} in a soybean oil suspension (Pharma Nord) [PN oljna susp.] were compared to crystalline CoQ_{10} in the first study [Weis et al. (25)], and with a water-soluble form of CoQ_{10} (complex with β -cyclodextrin; Q10CD) in the second one [Žmitek et al. (26)]

kombinaciji z lecitinom je primerjal s trdimi kapsulami, v katerih je bil kristalinični CoQ₁₀ (25). Rezultati so pokazali velik vpliv sestavin na biodostopnost CoQ₁₀, ki je bila pri najučinkovitejši formulaciji na ravni 162% biodostopnosti osnovnega kristaliničnega CoQ₁₀ (Slika V) (25).

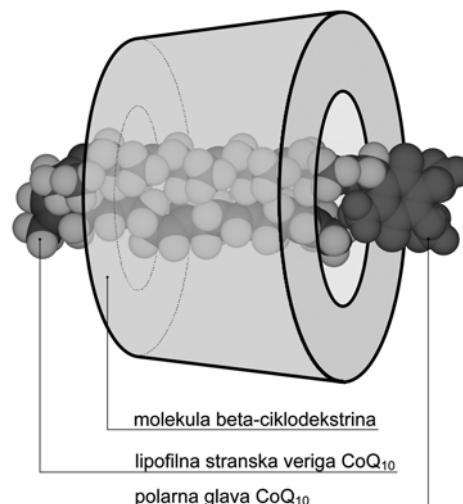
Oljne suspenzije ubikinola

Okrog leta 2000 so se na tržišču pojavile mehke kapsule s suspenzijo reducirane oblike CoQ₁₀. O razmeroma dobri biodostopnosti posebnih t.i. *aktivnih kapsul*, v katerih je bila ta substanca emulgirana z digliceril monooleatom in lecitinom v repičinem olju, je poročal Hosoe s sodelavci (27). Študija žal ni bila izvedena primerjalno proti drugim proizvodom in je zato neposredna primerjava z ostalimi oblikami CoQ₁₀ dokaj problematična, testirana formulacija *aktivnih kapsul* pa na slovenskem tržišču ni dostopna. Ne glede na to lahko z upoštevanjem doslej znanih podatkov sklepamo, da je biodostopnost oljnih suspenzij ubikinola boljše od kristalinične učinkovine, morda pa tudi od oljnih suspenzij ubikinona. Za potrditev tega bodo potrebne dodatne raziskave, saj po naših informacijah primerjalna študija biodostopnosti oljne suspenzije ubikinola glede na oljno suspenzijo ubikinona še ni bila izvedena. Tudi deleži odmerka CoQ₁₀, ki so bili določeni v krvi v času maksimalne koncentracije (po zaužitju CoQ₁₀ v obliki oljnih suspenzij ubikinola) niso zelo prepričljivi (Preglednica II).

Solubilizirane (vodotopne) oblike CoQ₁₀

Solubilizacija lipofilnih snovi je pogosta strategija za povečevanje njihove absorpcije v telesu (30). Pristopi za doseg tega cilja so v praksi zelo različni, npr. izdelava različnih inkluzijskih kompleksov, tvorba micel, idr. Slednja strategija je bila za povečevanje biodostopnosti koencima Q₁₀ prvič uporabljena leta 1997, ko je Chopra s sodelavci na zdravih prostovoljcih pokazal, da je biodostopnost testirane solubilizirane oblike CoQ₁₀ za 90% večja od biodostopnosti kristaliničnega CoQ₁₀ (31). Uspešnost tega pristopa se je pokazala še pri nekaterih drugih solubiliziranih oblikah CoQ₁₀ (32), tudi pri vodotopnem kompleksu koencima Q₁₀ in β-ciklodekstrina (Q10CD, Slika VI) (26,33). Vodotopnost je v tem primeru posledica specifične strukture β-ciklodekstrina, ki ima hidrofobno notranjost, v katero se ujame molekula CoQ₁₀, in precej bolj hidrofilno zunanost. Po razpadu kompleksa pod vplivom želodčnega soka, s čimer se sprostijo posamezne molekule CoQ₁₀ za absorpcijo, pa se β-ciklodekstrin izloči iz organizma v nespremenjeni obliki. Ta derivat škroba se tudi sicer pogosto uporablja v farmaciji za solubilizacijo lipofilnih substanc ter stabilizacijo. Povečano biodostopnost vodotopnega Q10CD napram mehkim kapsulam z oljno suspenzijo je najprej pokazala študija na psih (33), kasneje pa je bilo to potrjeno tudi na zdravih prostovoljcih (26). Rezultati slednje študije so pokazali, da je biodostopnost testirane vodotopne oblike Q10CD v povprečju na ravni 220% biodostopnosti referenčnih oljnih kapsul (Slika V) (26).

Žal zaradi izkazane dobre biodostopnosti nekaterih *vodotopnih oblik* CoQ₁₀ vse pogosteje prihaja do zlorab tega termina. Nekateri proizvajalci tako svoje proizvode zavajajoče označujejo kot vodotopne in jim pripisujejo povečano absorpcijo CoQ₁₀, čeprav takšnih lastnosti dejansko ne izkazujejo. Primeri takšnih oblik, ki v vodi večinoma tvorijo bolj ali manj stabilne suspenzije, so različne zmesi, v katerih je npr. učinkovina adsorbirana na trden matriks (npr. na SiO₂ ali celulozo).



Slika VI: Shematski model vodotopnega Q10CD – inkluzijskega kompleksa CoQ₁₀ in β-ciklodekstrina (18)

Figure VI: Schematic model of water-soluble QCD– inclusion complex of CoQ₁₀ and β-cyclodextrin (18)

4.3 Ubikinon proti ubikinolu

Vloga koencima Q₁₀ v telesu določa redoks ravnotežje med ubikinonsko in ubikinolno obliko (Slika I), zato nobena od obeh oblik v nobenem primeru ne more biti obravnavana kot prednostna. Zaužita oblika ne vpliva na funkcijo CoQ₁₀ v telesu, saj takoj po absorpciji ubikinona pride do spontane redukcije, zaradi česar se CoQ₁₀ v krvni plazmi pojavi pretežno v reducirani obliki (28). V znanstveni literaturi nismo našli nobenih opažanj, da bi na učinkovitost pretvorbe ubikinona v ubikinol kakorkoli vplivala starost ljudi, niti ne, da bi s starostjo pešala tvorba endogenega ubikinola bolj kot ubikinona.

5 Varnost in odmerjanje v zdravju in bolezni

Koencim Q₁₀ je naravno prisoten tako v telesu kot hrani, zato ni presenetljivo, da klinična testiranja na tisočih bolnikih z zelo različnimi odmerki (tudi do 3000 mg) niso pokazala pomembnih stranskih učinkov (34). Redko se pojavijo poročila o posameznih blagih gastrointestinalnih težavah, ki pa niso bile povezane z uživanjem CoQ₁₀ (ni povezave med zaužitim odmerkom in odzivom). Ocena tveganja po metodi *opaženih varnih vrednosti* (OSL, *observed safe level*) je pokazala veliko varnost dnevnih odmerkov do 1200 mg (34). Rezultati farmakokinetičnih študij kažejo, da zunanji vnos ne vpliva na endogeno sintezo CoQ₁₀, ter da se CoQ₁₀ po končanem dodajanju ne akumulira v plazmi ali tkivih (35). Koencim Q₁₀ je v obliki različnih farmacevtskih oblik po vsem svetu dostopen že preko 20 let, večinoma kot prehransko dopolnilo (35).

Priporočen dnevni odmerek (RDA) za CoQ₁₀ ni določen, saj je v telesu le-ta pretežno endogenega izvora in se potrebe med posamezniki lahko bistveno razlikujejo. Trenutno se sme v Sloveniji priporočati dopolnjevanje prehrane do dnevnega odmerka 50 mg CoQ₁₀. Ta odmerek je relativno nizek, tudi v primerjavi z dovoljenimi odmerki v

Preglednica III: Okvirni dnevni odmerki CoQ_{10} v različnih stanjih

Table III: Frame guidelines for the supplementation of CoQ_{10} in different conditions

Stanje	Odmerek	Opomba
Zdravi otroci	/	(po posvetu z zdravnikom)
Zdravi ljudje do 40. leta	do 50 mg	
Zdravi ljudje nad 40. letom	50 – 100 mg	
Zdrave nosečnice in doječe matere	/	(po posvetu z zdravnikom)
Ljudje z dejavniki tveganja (tudi uporabniki statinov)	okrog 100 mg	(po posvetu z zdravnikom)
Bolniki z različnimi bolezenskimi stanji	navadno nad 300 mg	(po posvetu z zdravnikom)

Opombe: V Sloveniji se trenutno sme priporočati dopolnjevanje prehrane do dnevnega odmerka 50 mg CoQ_{10}

nekaterih drugih evropskih državah (npr. 200 mg v Belgiji). Razpon priporočenih odmerkov CoQ_{10} v literaturi je razmeroma velik in povezan predvsem z namenom uporabe (preventiva, dejavniki tveganja, različna bolezenska stanja) (**Preglednica III**). Glede na razvoj novih formulacij s povečano biodostopnostjo je v prihodnosti mogoče pričakovati, da bodo priporočila za odmerjanje vezana na uporabljeno obliko.

Absolutne kontraindikacije uporabe CoQ_{10} niso znane (36). Uporaba pri zdravih otrocih, nosečnicah in doječih materah se iz previdnostnih razlogov svetuje po nasvetu zdravnika. V nekaj študijah na posameznih pacientih so opazili potencialno interakcijo z antitrombotikom varfarinom, kar pa so ovrgli s placebo kontrolirano študijo na 24 stabilnih pacientih, ki so 4 tedne poleg varfarina uživali še 100 mg CoQ_{10} (36).

6 Izdelki s koencimom Q_{10} na tržišču

Na slovenskem tržišču je dostopnih precej izdelkov z različnimi oblikami CoQ_{10} , ki imajo status zdravila, ki se izdaja brez recepta v lekarnah in specializiranih prodajalnah, ali pa prehranskega dopolnila. Izdelke različnih distributerjev, ki jih je mogoče kupiti v lekarnah, smo zbrali v **Preglednici IV**. Na pobudo uredništva smo v preglednico vključili tudi maloprodajne cene izdelkov, ki smo jih za enostavnejšo primerjavo preračunali na ceno v EUR za 30 mg CoQ_{10} , običajno priporočenim dnevnim odmerkom. Na podlagi podatkov o sestavi izdelkov smo izdelke glede na dostopne podatke o njihovi potencialni biodostopnosti razdelili v pet razredov:

- **A:** izdelki s kristaliničnim CoQ_{10} , za katerega je značilna slaba absorpcija;
- **B:** izdelki z oljno suspenzijo ubikinona, katere biodostopnost ni bila preverjena, vendar je verjetno boljša od kristaliničnega CoQ_{10} ;
- **C:** izdelki z oljno suspenzijo ubikinona, katerih biodostopnost je z objavljenimi študijami dokazano boljša od kristaliničnega CoQ_{10} ;
- **D:** izdelki z oljno suspenzijo ubikinola, katere biodostopnost je boljša od kristaliničnega CoQ_{10} ;
- **E:** izdelki z vodotopno obliko CoQ_{10} , katere biodostopnost je z objavljenimi študijami dokazano boljša od oljne suspenzije ubikinona (C).

V slovenskih spletnih trgovinah po pričakovanju lahko najdemo kar nekaj proizvodov s kristaliničnim CoQ_{10} , ki se iz prebavnega trakta zelo slabo absorbira, natančen pregled stanja na tržišču pa je presenetljivo

pokazal, da so takšni izdelki tudi na policah naših lekarn (**Preglednica IV**). Primer takšnih proizvodov so npr. trde kapsule s 30 mg CoQ_{10} v zmesi z belim rižem v prahu (*NOW Koencim Q_{10}*). Na tržišču so tudi proizvodi s kristaliničnim CoQ_{10} , za katere proizvajalci navajajo trditve o vodotopnosti, vendar iz deklaracij proizvodov ni razvidno, da je dejansko uporabljena vodotopna oblika učinkovine. Primeri takšnih proizvodov so npr. pelete s 50 mg CoQ_{10} v stiku (*GOGO Q_{10} Energy*) in trde kapsule s 50 mg CoQ_{10} (*Sensilab Koencim Q_{10}*). Za pojasnilo v zvezi s tem in informacijo o uporabljeni obliki učinkovine smo se obrnili na oba distributerja omenjenih proizvodov, ki nista zanikala uporabe kristaliničnega CoQ_{10} , niti nista pojasnila podlage za uporabo trditve o vodotopnosti. Najpogostejša farmacevtska formulacija koencima Q_{10} so mehke kapsule s CoQ_{10} v oljni suspenziji; na tržišču so proizvodi z 20 mg (*Pharma Effect Koencim Q_{10}*) ali 30 mg CoQ_{10} (*Fidi Koencim 10*, *Natural Wealth Koencim Q_{10}* in *BioQinon Q_{10}*). Za slednji proizvod je bila dokazana povečana biodostopnost v primerjavi s kristaliničnim CoQ_{10} (**Slika V**). Na slovenskem tržišču so dostopne tudi kapsule z oljno suspenzijo ubikinola (*Ubiquinol CoQH-CF*), za katere se predvideva povečana biodostopnost v primerjavi s kristaliničnim CoQ_{10} , njihove biodostopnosti v primerjavi z oljnimi suspenzijami ubikinona pa niso študirali. V zadnjih letih so se na tržišču pojavili tudi prvi proizvodi z vodotopno obliko $Q_{10}CD$, za katero so dokazali izboljšano biodostopnost tudi v primerjavi z oljnimi suspenzijami ubikinona (**Slika V**). Takšno obliko učinkovine vsebujejo šumeče tablete z 10 mg (*Sensilab Q_{10} Koencim mladosti*) in tablete s 30 mg CoQ_{10} (*Quvital tablete*) ter sirup s 15 mg CoQ_{10}/mL (*Quvital forte sirup*).

Pri primerjavi cen proizvodov na tržišču moramo upoštevati, da se le-te dokaj hitro spreminjajo. Analiza ni pokazala jasne zveze med ceno, farmacevtsko obliko proizvoda in uporabljeno obliko učinkovine. Presenetljiva je relativno visoka cena proizvodov s kristalinično učinkovino (0,39 - 0,61 EUR). V času priprave tega prispevka so bili tako najcenejši kot najdražji tisti proizvodi, ki vsebujejo CoQ_{10} v obliki vodotopnega kompleksa $Q_{10}CD$: najcenejše so bile tablete in sirup (*Quvital tablete* in *Quvital forte sirup*; 0,33 EUR), dražje pa šumeče tablete (*Sensilab Q_{10} Koencim mladosti*; 1,17 EUR), pri katerih pa je potrebno upoštevati, da poleg CoQ_{10} vsebujejo še vitamine (B1, B2, B6, B12, C, E, biotin, niacin, pantotenska in folna kislina). Mehke kapsule z ubikinonom so dostopne v relativno ozkem cenovnem intervalu med 0,40 in 0,47 EUR (*Natural Wealth* in *Pharma Effect Koencim Q_{10}* , *Fidi Koencim 10* ter *BioQinon Q_{10}*), tiste z ubikinolno obliko CoQ_{10} pa so skoraj enkrat dražje (*Ubiquinol CoQH-CF*; 0,79 EUR).

Preglednica IV: Nekateri izdelki s CoQ₁₀ dosegljivi v Sloveniji kot zdravila brez recepta ali prehranska dopolnila za peroralno uporabo

Table IV: Selected products with CoQ₁₀ available in Slovenia in the form of drugs available without prescription or food supplements for peroral use

Razred	Oblika	Izdelek	Vsebnost CoQ ₁₀	Cena za 30 mg CoQ ₁₀ (maj 2009)	Opomba	Študija biodostopnosti
A	trde kapsule	NOW Koencim Q ₁₀ (Bimedia)	30 mg / kap.	0,41 €	Q10	/
A	trde kapsule	Sensilab Koencim Q ₁₀ (Farmicom)	50 mg / kap.	0,39 €	Q10*	/
A	pelete v stiku	GOGO Q10 Energy (Fidimed)	50 mg / stik	0,61 €	Q10*	/
B	mehke kapsule	Fidi Koencim 10 [®] (Fidimed, BRp)	30 mg / kap.	0,44 €	SU	/
B	mehke kapsule	Natural Wealth Koencim Q ₁₀ (Difar)	30 mg / kap.	0,48 €	SU	/
B	mehke kapsule	Koencim Q ₁₀ (Pharma Effect)	20 mg / kap.	0,40 €	SU	/
C	mehke kapsule	Pharma Nord Bio-Qinone [®] Q ₁₀ (Mic Mengeš)	30 mg / kap.	0,47 €	SU	(25)
D	mehke kapsule	NOW Ubiquinol CoQH-CF [®] (Bimedia)	50 mg / kap.	0,79 €	SUR	/
E	tablete	Quvital tablete [®] (Novval)	30 mg / tab.	0,33 €	Q10CD	(26,33)
E	sirup	Quvital [®] forte sirup (Novval)	15 mg / mL	0,33 €	Q10CD	(26,33)
E	šumeče tablete	Sensilab Q ₁₀ koencim mladosti (Farmicom)	10 mg / tab.	1,17 €	Q10CD	(26,33)

Opombe: V tabelo so vključeni proizvodi, ki so bili pomladi 2009 v prodaji v naključni lekarni (Mariborske lekarne). Imena izdelkov in blagovne znamke so iz registra zdravil in seznama notificiranih prehranskih dopolnil (poleg imena proizvoda je naveden zastopnik). Večina proizvodov sodi med prehranska dopolnila, eden (označen z oznako *BRp*) pa je zdravilo, ki je na voljo brez recepta. Pri vsebnosti CoQ₁₀ je navedena vsebnost celokupnega CoQ₁₀, morebitne druge aktivne komponente (npr. vitamini) niso vključene. Maloprodajne cene izdelkov so za enostavnejšo primerjavo enotno preračunane na 30 mg CoQ₁₀. Pri proizvodih, ki so na tržišču dostopni v različnih pakiranjih, smo v tabelo vključili proizvod z najnižjo ceno na 30 mg CoQ₁₀. Okrajšave: Q10 = uporabljen kristaliničen CoQ₁₀; Q10* = proizvajalec navaja vodotopnost, vendar nam ni posredoval dokazov, s katerimi bi to trditev podkrepil; SU = uporabljena oljna suspenzija ubikinona; SUR = uporabljena oljna suspenzija ubikinola; Q10CD = uporabljen vodotopni kompleks CoQ₁₀ in β-ciklodekstrina (Q10CD).

Tako kot na večini svetovnih tržišč ima tudi pri nas glavnina izdelkov s koencimom Q₁₀ status prehranskih dopolnil. Proizvodnja le-teh je v primerjavi s proizvodnjo zdravil manj kontrolirana, so pa proizvajalci skladno z veljavno zakonodajo dolžni zagotoviti ustrezno vsebnost učinkovine in stabilnost proizvoda v predpisanem roku uporabe. Ustreznost prehranskih dopolnil v Sloveniji nadzira Zdravstveni inšpektorat. O njihovi kakovosti se še posebej v povezavi z določenimi proizvajalci med strokovno javnostjo občasno pojavljajo dvomi, katerih upravičenost bi lahko ovrednotili le z rednimi neodvisnimi kontrolnimi pregledi. Da so standardi zagotavljanja kakovosti proizvodov med proizvajalci zelo različni, lahko sklepamo tudi iz izkušenj, ki smo jih dobili ob pripravi tega pregleda. Tako so nam nekateri proizvajalci oz. distributerji sami posredovali dokaj natančno dokumentacijo o prodajanih izdelkih (npr. specifikacije, analitske izvide, analitska poročila o stabilnosti v roku uporabe), nekateri pa so se npr. na naša vprašanja odzvali z informacijo, da gre za poslovne skrivnosti.

7 Sklep

Koencim Q₁₀ je naravno prisoten v vsaki telesni celici. Ima nenadomestljivo vlogo prenašalca elektronov med kompleksi mitohondrijske dihalne verige in je aktivno vključen v prenos protonov prek notranje mitohondrijske membrane in posledičen nastanek gradienta protonov, kar je gonilo tvorbe ATP. CoQ₁₀ je hkrati tudi edini endogeni maščobotopni antioksidant. V telesu je večinoma

endogenega izvora, deloma pa ga zaužijemo tudi s hrano. Vlogo koencima Q₁₀ v telesu določa redoks ravnotežje med ubikinonsko in ubikinolno obliko; njegova funkcija v telesu ni odvisna od tega, ali ga zaužijemo v obliki ubikinona ali ubikinola. Živila sicer vsebujejo relativno malo CoQ₁₀, še največ ga je v rdečem mesu, migrirajočih ribah, nekaterih rastlinskih oljih in oreščkih. Študije kažejo, da se koncentracije CoQ₁₀ v najaktivnejših telesnih organih s staranjem zmanjšujejo. Zato, zaradi dokazane varnosti uživanja in dobrih izkušenj v klinični rabi postaja dodajanje CoQ₁₀ vse popularnejše. Najbolj smotno je pri stanjih, za katera je bil ugotovljen primanjkljaj CoQ₁₀ v telesu, ali pa pozitiven učinek te učinkovine na potek bolezni ter preventivno zaradi antioksidativnega učinka. Njegov učinek v telesu lahko pripišemo tako vzpostavljanju normalnega toka elektronov v dihalni verigi, kot antioksidativnim lastnostim. V literaturi ni podatkov, da bi zunanji vnos inhibiral endogeno sintezo CoQ₁₀; po prenehanju dodajanja se krvna koncentracija v nekaj dneh povrne na izhodiščno raven. V prihodnosti bo sicer potrebno opraviti še več dobro načrtovanih kliničnih raziskav, da bi lahko zanesljivo potrdili vpliv CoQ₁₀ na preprečevanje ali zdravljenje bolezni.

Zaradi svojih fizikalnih lastnosti se tako ubikinon kot ubikinol zelo slabo absorbirata iz prebavnega trakta. Ta vidik mora še posebej upoštevati strokovna javnost, saj širši javnosti ni enostavno razumljiv. Posebno pozornost je potrebno zato posvečati biodostopnosti proizvodov, še posebej, ker je na tržišču kar nekaj proizvodov, za katere se utemeljeno

pričakuje slaba absorpcija CoQ₁₀. Žal v želji po čimbolj prepričljivih številkah distributerji pogosto operirajo z zavajajočimi podatki in se sklicujejo na študije, v katerih so bili njihovi ali njihovim podobni proizvodi testirani le v primerjavi z oblikami z dokazano najslabšo biodostopnostjo, npr. s kristalinično učinkovino, ki jih neutemeljeno razglašajo za standardno obliko na tržišču. Najpogostejšo obliko na tržišču sicer predstavljajo mehke kapsule z oljnimi suspenzijami ubikinona, na katerih je bila prvič pokazana boljša absorpcija CoQ₁₀. Izboljšana absorpcija CoQ₁₀ je značilna tudi za oljne suspenzije ubikinola, nadaljnji razvojni korak pa je bil narejen z razvojem vodotopnih oblik CoQ₁₀. Žal so nekateri proizvajalci začeli izkoriščati osveščenost javnosti o dobri biodostopnosti nekaterih takšnih vodotopnih oblik. Na tržišču se namreč pojavljajo proizvodi s kristaliničnim CoQ₁₀, za katere proizvajalci neupravičeno trdijo, da vsebujejo vodotopne oblike koencima Q₁₀. Slabe prakse agresivne promocije izdelkov, ki jih žal vse pogosteje uporabljajo tudi dobro uveljavljeni distributerji, je mogoče pokazati tudi na več drugih primerih. Tako nekateri proizvajalci na svojih izdelkih pretirano izpostavljajo koencim Q₁₀, čeprav ga izdelki dejansko vsebujejo zelo malo (le kakšen miligram), ali pa izdelke oglašujejo z neresničnimi trditvami. Tako npr. uporabo ubikinolne oblike CoQ₁₀ distributer promovira z neresnično trditvijo, da s staranjem pri ljudeh slabi sposobnost pretvorbe ubikinona do ubikinola, ter da naj bi bilo zato uživanje ubikinola bolj primerno. Z uporabo omenjenih promocijskih tehnik, ki jih včasih težko prepozna tudi strokovna javnost, prodajalci z namenom pospeševanja prodaje povzročajo zmedo na tržišču in zavajajo potrošnike.

8 Literatura

- Coenzyme Q: Biochemistry, bioenergetics, and clinical applications of ubiquinone. Chichester: John Wiley & Sons, 1985.
- Lenaz G, Fato R, Formigini G, Genova ML. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 2007; 7: S8-S33.
- Crane FL. Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* 2007; 7: S2-S7.
- Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 2007; 7: S41-S50.
- Kaikkonen J, Nyyssonen K, Tomasi A, Iannone A, Tuomainen TP, Porkkala-Sarataho E, Salonen JT. Antioxidative efficacy of parallel and combined supplementation with coenzyme Q10 and d-alpha-tocopherol in mildly hypercholesterolemic subjects: a randomized placebo-controlled clinical study. *Free Radic Res* 2000; 33: 329-340.
- Kalén A, Appelkvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 1989; 24: 579-584.
- Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295: 230-234.
- Bliznakov EG, Wilkins DJ. Biochemical and clinical consequences of inhibiting coenzyme Q10 biosynthesis by lipid-lowering HMG-CoA reductase inhibitors (statins): A critical overview. *Adv Ther* 1998; 15: 218-228.
- Rus P, Rus RR. Koencim Q10. *Zdrav Var* 2008; 47: 89-98.
- Folkers K. Relevance of the biosynthesis of coenzyme Q10 and of the four bases of DNA as a rationale for the molecular causes of cancer and a therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 358-361.
- Littarru GP, Langsjoen P. Coenzyme Q10 and statins: Biochemical and clinical implications. *Mitochondrion* 2007; 7: S168-S174.
- Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M. Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res* 2007; 32: 723-727.
- Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutr Res* 2001; 21: 551-567.
- Pavlin R. Koencim Q10 - Klinična raba. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 159-162.
- Blatt T, Mundt C, Mummert C, Maksiuk T, Wolber R, Keyhani R, Schreiner V, Hoppe U, Schachtschabel DO, Stab F. Modulation of oxidative stress in human skin of old donors. *Z Gerontol Geriatr* 1999; 32: 83-88.
- Zhang J, Wang S. Topical use of Coenzyme Q10-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. *Int. J. Pharm.* 2009; doi:10.1016/j.ijpharm.2009.01.001 (In Press).
- Teran E, Hernandez I, Nieto B, Tavera R, Ocampo JE, Calle A. Coenzyme Q10 supplementation during pregnancy reduces the risk of pre-eclampsia. *Int. J. Gyn. Obst.* 2009; doi:10.1016/j.ijgo.2008.11.033 (In Press)
- Pravst I, Žmitek K, Žmitek J. Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; doi: 10.1080/10408390902773037 (In Press).
- Ochiai A, Itagaki S, Kurokawa T, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. Improvement in intestinal coenzyme Q10 absorption by food intake. *Yakugaku Zasshi* 2007; 127: 1251-1254.
- Singh RB, Niaz MA, Kumar A, Sindberg CD, Moesgaard S, Littarru GP. Effect on absorption and oxidative stress of different oral coenzyme Q10 dosages and intake strategy in healthy men. *Biofactors* 2005; 25: 219-224.
- Zhang Y, Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Uptake of dietary Coenzyme Q supplement is limited in rats. *J Nutr* 1995; 125: 446-453.
- Weber C. Dietary intake and absorption of Coenzyme Q. In: Kagan VE, Quinn PJ, eds. *Coenzyme Q: Molecular mechanisms in health and disease*. Boca Raton: CRC Press, 2001: 209-215.
- Weber C, Bysted A, Holmer G. Intestinal absorption of coenzyme Q10 administered in a meal or as capsules to healthy subjects. *Nutr Res* 1997; 17: 941-945.
- Miles MV, Horn P, Miles L, Tang P, Steele P, DeGrauw T. Bioequivalence of coenzyme Q10 from over-the-counter supplements. *Nutr Res* 2002; 22: 919-929.
- Weis M, Mortensen SA, Rassing MR, Mollersonnergaard J, Poulsen G, Rasmussen SN. Bioavailability of 4 oral Coenzyme Q10 formulations in healthy volunteers. *Mol Aspects Med* 1994; 15: 273-280.
- Žmitek J, Šmidovnik A, Fir M, Prošek M, Žmitek K, Walczak J, Pravst I. Relative bioavailability of two forms of a novel water soluble coenzyme Q10. *Ann Nutr Metab* 2008; 52: 281-287.
- Hosoe K, Kitano M, Kishida H, Kubo H, Fujii K, Kitahara M. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH™) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007; 47: 19-28.
- Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res* 2006; 40: 445-453.
- Žmitek J, Žmitek K, Pravst I. Improving the bioavailability of coenzyme Q10: From theory to practice. *Agro Food Ind Hi Tec* 2008; 19 (4): 8-10.
- Water-insoluble drug formulation, Second edition. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2008.
- Chopra RK, Goldman R, Sinatra ST, Bhagavan HN. Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulations in human subjects. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68: 109-113.
- Bhagavan HN, Chopra RK. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion* 2007; 7: S78-S88.
- Prošek M, Butinar J, Lukanc B, Fir M, Miliivojevič M, Miliivojevič L, Križman M, Šmidovnik A. Bioavailability of water soluble CoQ10 in beagle dogs. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47: 918-922.
- Hathcock JN, Shao A. Risk assessment for coenzyme Q10 (Ubiquinone). *Regul Toxicol Pharmacol* 2006; 45: 282-288.
- Hidaka T, Fujii K, Funahashi I, Fukutomi N, Hosoe K. Safety assessment of coenzyme Q10 (CoQ10). *Biofactors* 2008; 32: 199-208.
- Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q10. *Am Fam Phys* 2005; 72: 1065-1070.

4S SALUS

odzivno, kakovostno, učinkovito

oskrbujemo lekarne,
bolnišnice,
zdravstvene domove,
veledrogerije
ter druge, ki opravljajo
zdravstveno
in veterinarsko
dejavnost
širom Slovenije



že 40 let

Salus, Ljubljana, d. d.
Mašera Spasičeva ulica 10
SI - 1000 Ljubljana

telefon
+386 (0)1 589 91 00
telefaks
+386 (0)1 568 10 22

e-pošta
info@salus.si
splet
www.salus.si



Encimi iz naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz kot nove farmakološke tarče

Enzymes of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily as new pharmacological targets

Mojca Brunskole, Tea Lanišnik Rižner, Jure Stojan

Povzetek: Encimi iz naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR) predstavljajo zelo veliko proteinsko družino. Čeprav jih povezujejo številne strukturne podobnosti, je njihova substratna specifičnost različna. Udeleženi so v metabolizmu steroidnih hormonov, maščobnih kislin, alkoholov, retinoidov, prostaglandinov in ksenobiotikov. V človeškem genomu je identificiranih okrog 70 SDR. Vpleteni so v številne (patofiziološke) procese, zato so zanimivi s stališča zdravljenja genetskih, hormonsko odvisnih in metaboličnih bolezni, kot so: galaktozemija, fenilketonurija, rak dojke, endometrija, prostate in debelega črevesa, dislipidemija, debelost in arterijska hipertenzija.

Ključne besede: kratkoverižne dehidrogenaze/reduktaze (SDR), človeške SDR, metabolične bolezni, hormonsko odvisne bolezni, SDR kot farmakološke tarče

Abstract: Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) constitute a large protein family. Although they have several structural features in common, they act on a highly diverse set of substrates. They are involved in metabolism of steroid hormones, fatty acids, alcohols, retinoids, prostaglandins and xenobiotics. Around 70 SDR members are identified within the human genome. In human body they participate in numerous distinct (patho)physiological processes, thus they are very interesting therapeutic targets for the treatment of genetic, hormone dependent and metabolic diseases like galactosemia, phenylketonuria, breast cancer, endometrium, prostate and colon cancer, dyslipidemia, obesity and arterial hypertension.

Key words: short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), human SDR, metabolic diseases, hormone dependent diseases, SDR as pharmacological targets

1 Uvod

Encimi iz naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR) so postali predmet intenzivnih raziskav predvsem v zadnjem desetletju. Z leti je bilo odkritih vedno več predstavnikov te naddružine – trenutno je poznanih preko 3000 encimov SDR, od tega je okrog 70 človeških (1). Kljub številnim skupnim strukturnim značilnostim imajo ti encimi v živih organizmih zelo raznoliko vlogo. Zaradi njihove vpletenosti v različne patofiziološke procese so zanimivi s terapevtskega stališča kot tarče za nove zdravilne učinkovine pri zdravljenju različnih bolezni. V članku predstavljamo strukturo in delovanje encimov SDR, podrobnejši opis človeških encimov SDR in njihovo vpletenost v bolezenske procese.

2 Predstavitev encimov SDR

Encimi SDR tvorijo veliko, po delovanju zelo raznoliko skupino proteinov, s trenutno znanimi preko 3000 primarnimi strukturami (1, 2).

Najdemo jih pri bakterijah, glivah, rastlinah, žuželkah in vretenčarjih (3). Naddružino SDR so vpeljali po odkritju razlik med alkohol-dehidrogenazami žuželk in vretenčarjev (4). Alkohol-dehidrogenaza vinske mušice se je razlikovala od tedaj znanih jetrni in glivnih alkohol-dehidrogenaz po vezavnem mestu za koencim NAD⁺, ki se je nahajalo na N-terminalnem delu. Novo odkritim alkohol-dehidrogenazam so določili drugačen mehanizem delovanja ter visoko ohranjeno YxxxK zaporedje, ki je vključevalo aminokislino aktivnega mesta. Čeprav je prvotno prevladovalo mnenje, da je SDR naddružina sestavljena le iz prokariontskih dehidrogenaz in alkohol-dehidrogenaz žuželk, se je zanimanje zanjo povečalo z odkritjem sesalske 15-hidroksiprostaglandin-dehidrogenaze in 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze, ki sta tipična predstavnika naddružine SDR (5).

Osnovna struktura večine encimov SDR je sestavljena iz 250 do 350 aminokislinskih preostankov, pogosto imajo tudi N- oz. C-terminalne transmembranske domene, pripete signalne peptide ali pa so del

multiencimskih kompleksov (2). Čeprav imajo encimi SDR le 15–30 % identičnih aminokislinskih preostankov, imajo vsi podobno tridimenzionalno zgradbo – enodomenski vzorec zvitja, kjer se izmenjuje 7 ali 8 α -vijačnic s 7 ali 8 β -ploskvami (α/β -vzorec zvitja, znan kot Rossmannovo zvitje) (5, 6). Večina encimov SDR je v dimerni ali tetramerni obliki (5). Znani so le trije encimi SDR, ki so aktivni v monomerni obliki: prašičja testikularna karbonil-reduktaza ter človeški karbonil-reduktazi 1 in 3 (7, 8).

Za encime SDR je značilno, da imajo številne visoko ohranjene segmente (preglednica 1). Primerjave aminokislinskih zaporedij, kemijske modifikacije, točkovno usmerjene mutacije in kristalografske analize so pokazale, da večina teh segmentov sodeluje pri vezavi koencimov ali pa so del katalitičnega mesta encimov SDR (9). Visoko ohranjeno zaporedje TGxxxGxG na N-terminalnem delu in NNAG motiv vzdržujeta strukturo središčne β -ploskve in predstavljata del vezavnega mesta za koencim. Olajšata pravilno postavitve in vezavo koencima, čeprav se z njim ne povežeta direktno. S koencimom pa se lahko povežejo nekateri drugi aminokislinski preostanki – Asp, Ala, Thr ter Pro ali Gly iz PG motiva (preglednica 1). V aktivnem mestu se nahajajo katalitični aminokislinski preostanki Ser, Tyr in Lys, pri čemer je v celotni naddružini SDR najbolj ohranjen Tyr (2). Novejši podatki kažejo, da je za katalitično aktivnost pomemben tudi visoko ohranjen Asn, ki tako s Ser, Tyr in Lys pri večini SDR tvori katalitično tetrado (2, 10). Raziskave so pokazale, da Ser stabilizira lego substrata, hidroksilna skupina Tyr pa deluje kot katalitična baza. Pri znižanju pKa hidroksilne skupine Tyr sodeluje Lys, ki se poveže z nikotinamidno ribozo kofaktorja. Vsi trije tako tvorijo sistem za prenos naboja pri kislino-bazični katalizi (2). Asn s povezavo z Lys preko vmesne molekule vode stabilizira lego Lys, dodatno pa omogoča tudi prenos protona med koencimom, substratom, Tyr, 2'-OH riboze, Lys, vodo in Asn v aktivnem mestu (10).

Podobno zvitje encimov SDR in ohranjeno YxxxK zaporedje kažeta na to, da imajo ti encimi tudi podoben reakcijski mehanizem. Encimske reakcije sledijo zaporednemu bi-bi mehanizmu, kjer se v aktivno mesto najprej veže koencim, nato substrat. Sledi encimska reakcija, aktivno mesto potem najprej zapusti produkt in šele nato spremenjen koencim.

Preglednica 1: Motivi zaporedij pri encimih SDR (oštevilčenje položajev se nanaša na oštevilčenje aminokislinskih preostankov pri 3 β /17 β -HSD (PDB koda 1HXH)) (2)

Table 1: Sequence motifs found in SDR enzymes (positions refer to residue numbering as in 3 β /17 β -HSD (PDB code 1HXH)) (2)

MOTIV	POLOŽAJ	VLOGA
TGxxxGxG	12 – 19	območje vezave koencima; vzdrževanje središčne β -ploskve
D	60	stabilizacija žepa, kamor se veže adeninski obroč; šibka vezava s koencimom
NNAG	86 – 89	stabilizacija središčne β -ploskve
N	111	aktivno mesto
S-Y-K	138, 151, 155	aktivno mesto
N	179	povezava med zanko, ki pokrije aktivno mesto in aktivnim mestom
PG	183 – 184	povezava s koencimom
T	188	vodikova vez s karboksamidnim delom nikotinamidnega obroča

Sproščanje koencima iz aktivnega mesta pri tem predstavlja hitrost omejujočo stopnjo celotne encimsko katalizirane reakcije (9).

Koencimsko specifičnost encimov SDR določajo aminokislinski ostanki v $\beta\alpha\beta$ motivu na začetku Rossmannovega zvitja (11). Pomemben je elektrostatski naboj aminokislinskega ostanka v neposredni bližini 2'-hidroksi (oz. fosfatne) skupine adenoinske riboze koencimov. Kristalografsko določene tridimenzionalne strukture klasičnih encimov SDR so pokazale, da je pri od NAD(H)-odvisnih encimih SDR na koncu druge β -ploskve kislinski ostanek, pri od NADP(H)-odvisnih pa bazični (11, 12). Od NAD(H)-odvisne encime glede na položaj kislinkega preostanka za drugo β -ploskvijo razdelimo na poddružine cD1d, cD1e, cD2 in cD3. Glede na položaj bazičnega preostanka pa od NADP(H)-odvisne encime razdelimo v cP1, cP2 ali cP3 poddružino (11).

Encime SDR naddružine lahko razvrstimo v več EC (Enzyme Commission) razredov: oksidoreduktaze (EC 1), liaze (EC 4) in izomeraze (EC 5), pri čemer je med njimi večina oksidoreduktaz (2). Vpleteni so v metabolizem steroidov, prostaglandinov, alifatskih alkoholov in ksenobiotikov. Izničenje genov in genetske variacije so pokazale, da imajo SDR pomembno vlogo tudi pri razvoju in homeostazi pri ljudeh, žuželkah in rastlinah (2, 13).

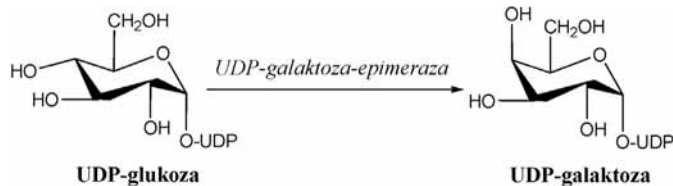
3 Encimi SDR pri ljudeh

Čeprav se v človeškem genomu nahaja okrog 70 genov, ki kodirajo za encime iz SDR naddružine, sta med njimi delno opisani le dve tretjini. Za nekatere je poznano izražanje v različnih tkivih in substratna specifičnost, vendar pa je večina človeških SDR slabo opisana – strukturne informacije na primer so na voljo za samo okrog 20 encimov (1). Glede na delovanje lahko človeške SDR razdelimo v tri glavne skupine:

- encimi intermediarnega metabolizma (kemijske reakcije pri presnavljanju molekul iz hrane v molekule celičnih in zunajceličnih struktur);
- encimi metabolizma hormonov, mediatorjev in ksenobiotikov;
- encimi z neznano vlogo, ki so bili identificirani kot odprti bralni okvirji (ORF) (14).

3.1 Encimi intermediarnega metabolizma

Encimi intermediarnega metabolizma sodelujejo pri kemijskih reakcijah pretvorbe sladkorjev, sinteze aminokislilin, β -oksidacije maščobnih kislin, ketogeneze, idr. Med encime SDR iz te skupine uvrščamo: UDP-galaktoza-epimerazo, ki katalizira epimerizacijo UDP-glukoze (slika 1) in UDP-N-acetilglukozamina v UDP-galaktozo in UDP-N-acetilgalaktozamin; sepiapterin-reduktazo in dihidroksipteridin-



Slika 1: Epimerizacija UDP-glukoze v UDP-galaktozo z UDP-galaktoza-epimerazo

Figure 1: Epimerization of UDP-glucose to UDP-galactose by UDP-galactose epimerase

reduktazo, ki imata pomembno vlogo pri sintezi tetrahidrobiopterina; ter *R*-3-OH-butirat-dehidrogenazo, dienol-CoA-reduktazo ter *trans*-enoil-CoA-reduktazo, ki so vključene v β -oksidacijo maščobnih kislin in ketogenezo (14).

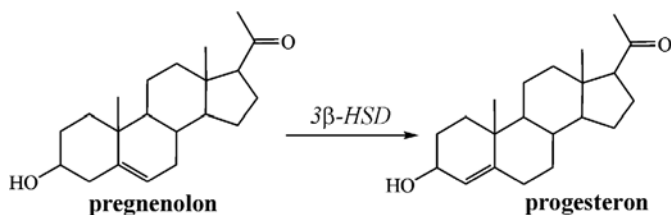
3.2 Encimi metabolizma hormonov, mediatorjev in ksenobiotikov

Encimi metabolizma hormonov, mediatorjev in ksenobiotikov predstavljajo največjo skupino človeških encimov SDR. Mednje so uvrščeni encimi s hidroksteroid-dehidrogenazo (HSD) in prostaglandin-dehidrogenazo aktivnostjo ter encimi, ki metabolizirajo retinoide:

- 3β -hidroksteroid-dehidrogenaze/ Δ^5 - Δ^4 -izomeraze;
- 11β -hidroksteroid-dehidrogenaze;
- 17β -hidroksteroid-dehidrogenaze;
- retinol/retinal-dehidrogenaze;
- karbonil-reduktaze/PGDH (14).

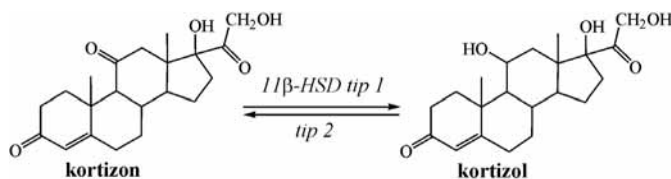
3β -hidroksteroid-dehidrogenazi/ Δ^5 - Δ^4 -izomerazi (3β -HSD) izoencimi so odgovorni za oksidacijo in izomerizacijo Δ^5 - 3β -hidroksteroidnih prekurzorjev v Δ^4 -ketosteroide (slika 2) – katalizirajo torej nujno potreben korak sinteze vseh vrst steroidnih hormonov (glukokortikoidov, mineralokortikoidov, progesterona, estrogenov in androgenov). Pri človeku sta znani dve izoobliki 3β -HSD: tip I, ki se nahaja v placenti in perifernih tkivih ter tip II, ki se v glavnem izraža v nadledvični žlezi, jajčnikih in testisih. V obeh primerih gre za bifunkcionalna encima, torej encima s 3β -HSD in Δ^5 - Δ^4 izomerazno aktivnostjo, pri čemer sta obe stopnji reakcije povezani s koencimom – NAD⁺ se s 3β -HSD aktivnostjo reducira v NADH, le-ta pa potem aktivira izomerazno aktivnost istega encima (15).

11β -hidroksteroid-dehidrogenazi (11β -HSD) tipa 1 in 2 uravnava delovanje glukokortikoidnega hormona kortizola (slika 3) – uravnava pretvorbo med ligandom, ki se veže na receptor, kortizolom in njegovim



Slika 2: Pretvorba pregnenolona v progesteron s 3β -HSD

Figure 2: Conversion of progesterone to progesterone by 3β -HSD



Slika 3: Pretvorba med kortizonom in kortizolom z 11β -HSD tipoma 1 in 2

Figure 3: Interconversion between cortisone and cortisol by 11β -HSD type 1 and 2

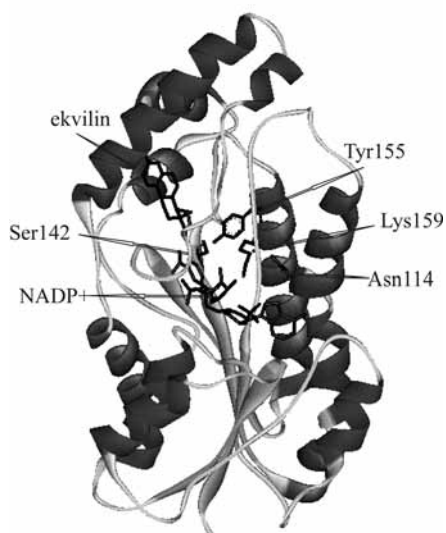
prekurzorjem kortizonom, ki se na receptor veže z manjšo afiniteto. 11β -HSD1 reducira neaktivne glukokortikoide v aktivne in s tem omogoča njihovo vezavo na receptorje, 11β -HSD2 pa deluje kot dehidrogenaza in tako zaščiti intrinzično neselektivne periferne mineralokortikoidne receptorje v ledvicah pred aktivacijo s kortizolom, namesto z aldosteronom (1).

17β -hidroksteroid-dehidrogenaze (17β -HSD) so encimi, vključeni v zadnjo stopnjo biosinteze androgenov in estrogenov in katalizirajo oksidoredukcijske reakcije hidroksi oz. keto skupine na mestu 17 steroida (16). Pretvarjajo visoko aktivne 17-hidroksisteroide v nizko oz. neaktivne 17-ketosteroide in obratno. Danes je poznanih že 14 tipov 17β -HSD, vendar je med njimi le 11 takšnih, ki jih uvrščamo v naddružino SDR in jih najdemo tudi pri človeku: tip 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14. Med seboj se razlikujejo po koencimski in substratni specifičnosti, znotrajcelični lokalizaciji in tkivno specifičnem izražanju (1).

17β -HSD tip 1, 2 in 3 so ključni encimi pri homeostazi steroidnih hormonov (16). 17β -HSD tip 1 (slika 4) je dimerni encim, ki katalizira redukcijo estrona v estradiol (1). V glavnem je izražen v jajčnikih, dojkah in placenti (1). Tudi 17β -HSD tip 2 je vključen v metabolizem estrogenov, vendar je njegovo delovanje ravno obratno delovanju tipa 1 – katalizira oksidacijo estradiola v estron (testosterona v androstendion, ...) in s tem zmanjša izpostavljenost tkiv pred delovanjem estrogenov. Izražen je v številnih tkivih: dojkah, maternici, prostati, jetrih, ledvicah in različnih epitelijskih celicah (17). 17β -HSD tip 3 je ključni encim sinteze testosterona – izražen je predvsem v testisih in katalizira redukcijo androstendiona v testosteron (slika 5) (16).

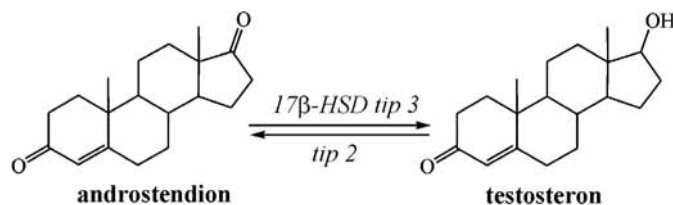
Ostali tipi 17β -HSD imajo širšo substratno specifičnost. 17β -HSD tip 4 je vpleten v metabolizem steroidov in β -oksidacijo maščobnih kislin: oksidira estradiol v estron, dolgoveržne in razvejane maščobne kisline, sodeluje pri sintezi žolčnih kislin. Encim je prisoten v številnih tkivih, vendar pa je v največji meri izražen v jetrih (16). 17β -HSD tip 7 katalizira pretvorbo estrona v estradiol v rumenem telescu (močno je izražen v drugi polovici nosečnosti), ima pa tudi 3-keto reduktazno aktivnost, ki inaktivira dihidrotestosteron – katalizira torej aktivacijo estrogenov in inaktivacijo androgenov. Našli so ga v placenti, jajčnikih, dojkah, testisih, prostati in jetrih (18). Vloga 17β -HSD tip 8 v človeškem telesu še ni popolnoma jasna. Nahaja se v jetrih, ledvicah, jajčnikih in testisih ter nekaterih drugih tkivih (16). Katalizira inaktivacijo estradiola, testosterona in dihidrotestosterona, domnevajo, da je vpleten tudi v metabolizem maščobnih kislin (18). 17β -HSD tip 10 je homotetramerni mitohondrijski encim s široko substratno specifičnostjo: katalizira pretvorbo estradiola in dihidrotestosterona, ima 3α -HSD aktivnost, oksidira lahko 20β - in 21 -hidroksilni skupini, katalizira metabolizem izolevcina ter oksidacijo razvejanih in nerazvejanih maščobnih kislin, sodeluje pa tudi pri metabolizmu žolčnih kislin (16, 19). V možganih naj bi bil odgovoren za metabolizem nevrosteroidov – katalizira oksidacijo alopregnanolona in alotetrahydrodeoksikortikosterona, ki sta pozitivna alosterična modulatorja GABA_A receptorja. Izražen je v prostati, jetrih, možganih in srcu (19).

17β -HSD tipi od 11 do 14 so bili odkriti v zadnjih nekaj letih. 17β -HSD tip 11 oksidira estrogene in androgene – najboljši substrat je 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol (16). Našli so ga v steroidogenih tkivih, trebušni slinavki, ledvicah, jetrih, pljučih, nadledvični žlezi in srcu (20). 17β -HSD tip 12 selektivno katalizira pretvorbo estrona v estradiol in je visoko



Slika 4: Tridimenzionalna struktura 17β-HSD tip 1 s koencimom in ekvilinom (učinkovina, ki se uporablja pri estrogenski nadomestitveni terapiji) v aktivnem mestu (pdb koda 1EQU). Prikazane so tudi aminokisljine katalitične tetrade: Asn114, Ser142, Tyr155 in Lys159.

Figure 4: Three-dimensional structure of 17β-HSD type 1 complexed with coenzyme and equilin (used in estrogen replacement therapy) (pdb code 1EQU). Amino acids of the catalytic tetrad are also shown: Asn114, Ser142, Tyr155 and Lys159.

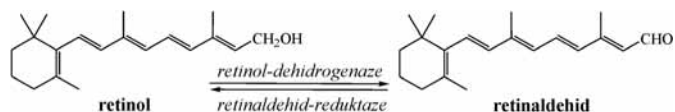


Slika 5: Pretvorba med androstendionom in testosteronom s 17β-HSD tipoma 3 in 2

Figure 5: Interconversion between androstenedione and testosterone by 17β-HSD type 3 and 2

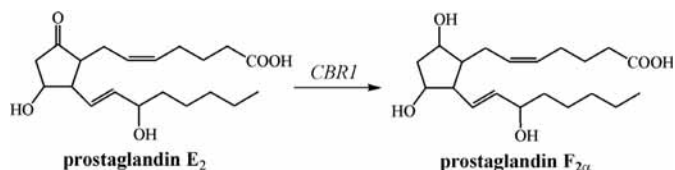
izražen v jajčnikih in dojkah. 17β-HSD tip 12 je s svojo ketoacil-koencim A (CoA) reduktazno aktivnostjo vključen tudi v podaljševanje maščobnih kislin (21). 17β-HSD tip 13 je specifično izražen v jetrih in je z lipidnimi kapljicami povezan protein. Njegovo N-terminalno zaporedje služi kot signal za usmerjanje v endoplazmatski retikulum in lipidne kapljice (22). 17β-HSD tip 14 oksidira in s tem inaktivira steroide (estradiol) v jetrih, možganih in placenti (23).

Številni encimi SDR so vključeni tudi v metabolizem retinoidov. Glede na koencimsko in substratno specifičnost jih razdelimo v dve poddružini: retinol-dehidrogenazam podobni SDR (RoDH-podobni SDR) in retinaldehid-reduktazi 1 podobni SDR (RalR1-podobni SDR). So od NAD⁺ in NADP⁺-odvisne retinoid-oksidoreduktaze, pri čemer od NAD⁺-odvisni encimi katalizirajo oksidacijo retinola do retinaldehida, od NADP⁺-odvisni encimi pa katalizirajo redukcijo retinaldehida nazaj



Slika 6: Pretvorba med retinolom in retinaldehidom z retinol-dehidrogenazami in retinaldehid-reduktazami

Figure 6: Interconversion between retinol and retinaldehyde by retinol dehydrogenases and retinaldehyde reductases



Slika 7: Redukcija prostaglandina E2 s CBR1

Figure 7: Reduction of prostaglandin E2 by CBR1

v retinol (slika 6). Med človeške RoDH-podobne SDR uvrščamo 11-*cis*-retinol-dehidrogenazo, RoDH-4 in RoDH-podobno 3α-HSD – vsi imajo 3α-hidroksisteroid-dehidrogenazno in retinol-dehidrogenazno aktivnost. Retinaldehid-reduktazo 1 (RalR1) ali retinol-dehidrogenazo 11 (RDH11) ter RDH12, RDH13 in RDH14 pa uvrščamo med RalR1-podobne SDR. Obe poddružini encimov sta izraženi v jetrih, prostati, možganih, testisih, srcu in številnih drugih tkivih (24).

Karbonil-reduktaze (CBR), ki jih uvrščamo med SDR, so monomerni citosolni encimi z oksidoreduktazno aktivnostjo. Mednje uvrščamo človeške CBR1, CBR3, CBR4 in 15-hidroksi-prostaglandin-dehidrogenazo. CBR1 je zastopana v številnih tkivih (jetra, epidermis, možgani, tanko črevo, centralni živčni sistem ...) in reducira (slika 7) številne biološko in farmakološko aktivne karbonilne spojine – kinone, ketoaldehide, aromatske aldehide in biogene aldehide, ima pa tudi od NADP⁺-odvisno 9-keto-prostaglandin-reduktazno in 15-hidroksi-prostaglandin-dehidrogenazno aktivnost (25). O fiziološki vlogi človeških CBR3 in CBR4 ni podatkov. CBR3 je izražen v jajčnikih, trebušni slinavki in črevesju, CBR4 pa v želodcu, hipofizi in maternici (25, 26). Od NAD⁺-odvisna 15-hidroksi-prostaglandin-dehidrogenaza inaktivira prostaglandine in je izražena v številnih organih pri sesalcih (25).

3.3 SDR identificirani kot odprti bralni okvirji (ORF)

Vloga nekaterih SDR, ki so bili identificirani kot odprti bralni okvirji, ni pojasnjena, medtem ko naj bi bili drugi povezani z malignimi obolenji – hepatokarcinogenezo, folikularnim limfomom, rakom dojke, idr. (14). V teku so različne molekularne in biokemijske raziskave, ki poskušajo opredeliti vlogo SDR iz te skupine pri boleznih pri človeku.

4 SDR kot farmakološke tarče

Ker imajo SDR zelo pomembno fiziološko vlogo v človeškem organizmu, so zanimivi tudi kot farmakološke tarče. Za nekatere med njimi je bilo dokazano, da so povezani z genetskimi in metaboličnimi motnjami. Raziskave in razvoj inhibitorjev številnih hidroksisteroid-

Preglednica 2: Človeške SDR in bolezni s katerimi so lahko povezane (HSD – hidroksteroid-dehidrogenaza; RDH – retinol-dehidrogenaza; CBR – karbonil-reduktaza)

Table 2: Human SDR forms and associated diseases (HSD – hydroxysteroid-dehydrogenase; RDH – retinol dehydrogenase; CBR – carbonyl reductase)

ENCIM	BOLEZEN
ENCIMI INTERMEDIARNEGA METABOLIZMA	
UDP-galaktoza-epimeraza	galaktozemija tip III
dihidropteridin-reduktaza	fenilketonurija tip II
ENCIMI METABOLIZMA HORMONOV, MEDIATORJEV IN KSENOBIOTIKOV	
3 β -HSD tip 1	kongenitalna adrenalna hiperplazija
11 β -HSD tip 1	odpornost na inzulin, dislipidemija, debelost, arterijska hipertenzija
17 β -HSD tip 1	rak dojk, jajčnikov in endometrija, endometrioza
17 β -HSD tip 2	rak dojk, endometrija, črevesja in prostate, endometrioza
17 β -HSD tip 3	psevdohermafroditizem
17 β -HSD tip 4	rak endometrija, endometrioza, Zellwegerjev sindrom
17 β -HSD tip 7	rak endometrija, endometrioza
17 β -HSD tip 8	policistične ledvice
17 β -HSD tip 10	duševna zaostalost, nevrodegeneracija, Alzheimerjeva bolezen
11- <i>cis</i> -RDH	zakasnjena adaptacija na svetlobo, <i>fundus albipunctatus</i>
RDH12	avtosomalna recesivna retinalna distrofija
CBR1	metastaziranje rakavih celic, rast tumorjev, angiogeneza

dehidrogenaz in drugih encimov iz SDR naddružine so v teku in predstavljajo zelo obetavno področje za nove farmakološke pristope.

Variante alelov gena za UDP-galaktoza-epimerazo so vzrok za pomanjkanje UDP-galaktoze in s tem za galaktozemijo tipa III (preglednica 2), variante alelov dihidropteridin-reduktaznega gena pa lahko povzročijo fenilketonurijo tipa II – znano je, da je biopterin pomemben kofaktor pri hidrosilaciji tirozina (14). Pomanjkanje 3 β -HSD tip 1 je vzrok za nastanek redke oblike kongenitalne adrenalne hiperplazije, ki vodi do različnih stopenj izgubljanja soli pri ljudeh obeh spolov ter nepopolnega razvoja genitalij pri novorojenčkih (15). 11 β -HSD tip 1 je povezana z nastankom metaboličnega sindroma (odpornost na inzulin, dislipidemija, debelost in arterijska hipertenzija), zato je razvoj inhibitorjev tkivno specifične aktivacije glukokortikoidov zanimiv s stališča zdravljenja metaboličnih in kardiovaskularnih bolezni (27). 11 β -HSD tip 1 je induciran ob vnetju, zato lahko pride pri motnjah v njegovem delovanju do nepopolnega protivnetnega odziva (28).

Tudi 17 β -HSD so zanimive tarče za razvoj novih zdravilnih učinkovin, saj so udeležene v številnih fizioloških in patofizioloških procesih. Primarna vloga 17 β -HSD tip 1 in 2 je uravnavanje delovanja estrogenov v človeškem tkivu. Čeprav sta v tkivu dojk izraženi obe izoobliki, v zdravem tkivu prevladuje oksidativna aktivnost (torej tip 2), medtem ko v malignem tkivu prevladuje tip 1 – inhibitorji 17 β -HSD tipa 1 so zato zanimivi s stališča zdravljenja od estrogenov odvisnih vrst raka dojke (17). Za reduktivne 17 β -HSD (tip 1, 3, 7), ki aktivirajo steroidne hormone, je značilno, da so lahko vpletene v razvoj hormonsko odvisnih oblik raka (npr. rak dojke, jajčnikov in prostate) (1, 17). Zmanjšano izražanje 17 β -HSD tip 2 pa lahko vodi do raka na črevesju, prostati in dojkah (29). Številni 17 β -HSD izoencimi so povezani tudi z rakom endometrija in endometrioza – predvsem gre za zmanjšano izražanje tipov 2 in 4 ter povečano izražanje tipov 1 in 7 (30, 31). Mutacije gena za 17 β -HSD tip 3 preprečijo pretvorbo androstendiona v testosteron, kar lahko povzroči psevdohermafroditizem pri moških

(18). Neaktivnost 17 β -HSD tip 4 vodi do nastanka Zellwegerjevega sindroma – oboleli običajno umrejo v prvem letu življenja (16). Nizko izražanje gena za 17 β -HSD tip 8 naj bi bilo povezano z nastankom policističnih ledvic (14). Mutacije gena za 17 β -HSD tip 10 povezujejo s številnimi kliničnimi stanji – od blage duševne zaostalosti do progresivne nevrodegeneracije pri otrocih. Encim je zanimiv s stališča zdravljenja Alzheimerjeve bolezni, saj ima veliko afiniteto do β -amiloidnih peptidov in bi bil lahko povezan z mitohondrijsko disfunkcijo pri Alzheimerjevi bolezni. Ugotovili so, da številne maligne epitelne celice prostate vsebujejo visoke koncentracije tega izoencima, zato bi lahko imeli njegovi inhibitorji tudi protirakavo delovanje. Zaradi vloge 17 β -HSD tip 10 pri oksidaciji pozitivnih alosteričnih modulatorjev GABA_A receptorja je pospešena vazava GABA na receptor, kar ima za posledico antikonvulzivni in anksiolitični učinek (19).

Da imajo SDR pomembno fiziološko vlogo v metabolizmu retinoidov dokazujejo mutacije človeškega gena, ki kodira za 11-*cis*-RoDH, saj so le-te povezane z zakasnjeno adaptacijo na temo in *fundus albipunctatusom*. Mutacije gena, ki kodira za RDH12, naj bi bile povezane z resno avtosomalno recesivno retinalno distrofijo (24). Človeška CBR1 ima zaradi zniževanja koncentracije PGE₂ pomembno vlogo tudi pri preprečevanju metastaziranja rakavih celic, rasti tumorjev in njihovi angiogenezi (32, 33).

5 Sklep

Čeprav številni encimi SDR še niso popolnoma opisani, o njihovem pomenu v človeškem telesu priča njihova številčna zastopanost ter raznolika fiziološka vloga. Zaradi vpletenosti v različne patofiziološke procese so predvsem v zadnjem desetletju predmet številnih raziskav. Zanimivi so s stališča novih terapevtskih pristopov k zdravljenju različnih genetskih, hormonsko odvisnih, metaboličnih ter drugih bolezni. Zaradi velike strukturne sorodnosti encimov SDR in njihove

zastopanosti v različnih tkivih predstavlja raziskovalcem še poseben izziv odkritje učinkovin s selektivnim in tkivno specifičnim delovanjem.

6 Literatura

1. Wu X, Lukacik P, Kavanagh KV, Oppermann U. SDR-type human hydroxysteroid dehydrogenases involved in steroid hormone activation. *Mol Cell Endocrinol* 2007, 265-266: 71-76.
2. Opperman U, Filling C, Hult M et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* 2003, 143-144: 247-253.
3. Keller B, Volkman A, Wilckens T et al. Bioinformatic identification and characterisation of new members of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 2006, 248: 56-60.
4. Jörnvall H, Persson M, Jeffery J. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78 (7): 4226-4230.
5. Jörnvall H, Persson B, Krook M et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Am Chem Soc* 1995, 34 (18): 6003-6013.
6. Rossmann MG, Liljas A, Bränden C-I, Banaszak LJ. In: Boyer PD. *The Enzymes*, 3rd Edition, Academic Press, New York, 1975, 11: 61-102.
7. Ghosh D, Sawicki M, Pletnev V et al. Porcine carbonyl reductase. *J Biol Chem* 2001, 276: 18457-18463.
8. Miura T, Nishinaka T, Terada T. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Mol Cell Biochem* 2008, 315(1-2): 113-121.
9. Oppermann U, Persson B, Filling C, Jörnvall H. Structure-function relationship of SDR hydroxysteroid dehydrogenases. In: Weiner et al. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6*, Plenum Press, New York, 1996: 403-415.
10. Filling C, Berndt KD, Benach J et al. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* 2002, 277 (28): 25677-25684.
11. Persson B, Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* 2003, 143-144: 271-278.
12. Tanaka N, Nonaka N, Nakanishi M. Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure* 1996, 4 (1): 33-45.
13. Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H, Persson B. Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: A large family with eight clusters common to human, animal and plant genomes. *Prot Sci* 2002, 11: 636-641.
14. Oppermann U, Filling C, Jörnvall H. Form and functions of human SDR enzymes. *Chem Biol Interact* 2001, 130-132: 699-705.
15. Simard J, Ricketts ML, Gingras S et al. Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ ^{Δ^5} / _{Δ^4} isomerase gene family. *Endocrin Rev* 2005, 26 (4): 525-582.
16. Moeller G, Adamski J. Multifunctionality of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 2006, 248: 47-55.
17. Viiko P, Isomaa V, Ghosh D. Structure and function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 171: 71-76.
18. Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001, 76: 143-151.
19. Yang SY, He XY, Schulz H. Multiple functions of type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Trends Endocrinol Metab* 2005, 16 (4): 167-175.
20. Chai Z, Brereton P, Suzuki T et al. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology* 2003, 144 (5): 2084-2091.
21. Luu-The V, Tremblay P, Labrie F. Characterisation of type 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol Endocrinol* 2006, 20 (2): 437-443.
22. Horiguchi Y, Araki M, Motojima K. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 370 (2): 235-238.
23. Lukacik P, Keller B, Bunkoczi G et al. Structural and biochemical characterisation of human orphan DHRS10 reveals a novel cytosolic enzyme with steroid dehydrogenase activity. *Biochem J* 2007, 402: 419-427.
24. Kedishvili, NY. Retinoid-active short-chain dehydrogenases/reductases. In: Weiner H, Maser E, Lindahl R, Plapp B. *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism – 13; Carbonyl reductases*. Purdue University Press, 2007: 217-223.
25. Maser E, Hoffmann F. Multifunctional carbonyl reductases of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily in mammalian species. In: Weiner H, Maser E, Lindahl R, Plapp B. *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism – 13; Carbonyl reductases*. Purdue University Press, 2007: 169-183.
26. Meier M, Haller F, Spielhauer C, Adamski J. Characterisation of human carbonyl reductase CBR4. In: Workshop on pre-receptor steroid metabolism as target for pharmacological treatment. Abstract book, Eibsee Hotel, Germany, May 26-28, 2008.
27. Opperman U. Type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as universal drug target in metabolic disease? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006, 6 (3): 259-269.
28. Chapman KE, Secki JR. 11 β -HSD1, inflammation, metabolic disease and age-related cognitive (dys)function. *Neurochem Res* 2008, 33 (4): 624-636.
29. Viiko P, Härkönen P, Soronen P et al. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases – their role in pathophysiology. *Mol Cell Endocrinol* 2004, 215: 83-88.
30. Dassen H, Punyadeera C, Kamps R et al. Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. *Hum Reprod* 2007, 22 (12): 3148-3158.
31. Šmuc T, Pucelj MR, Šinkovec J et al. Expression analysis of the genes involved in estradiol and progesterone action in human ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2007, 23 (2): 105-111.
32. Ismail E, Al-Mulla F, Tsuchida S et al. Carbonyl reductase: a novel metastasis-modulating function. *Cancer Res*. 2000, 60 (5): 1173-1176.
33. Takenaka K, Ogawa E, Oyanagi H et al. Carbonyl reductase expression and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14 (8): 1972-1975.

Regulatorna vloga Ca^{2+} ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov

The regulatory role of Ca^{2+} ions in the secretion of inflammatory mediators from mast cells

Ilonka Ferjan

Povzetek: Mastociti so celice vezivnega tkiva, ki imajo ključno vlogo pri vnetju in alergijskih reakcijah. Po imunološki ali neimunološki stimulaciji sproščajo številne posrednike (mediatorje) vnetja. Sproščanje mediatorjev je v veliki meri odvisno od koncentracije prostih Ca^{2+} ionov v celici. Po aktivaciji mastocita se prosta koncentracija Ca^{2+} v celici močno zveča, kar vpliva na sproščanje vnetnih mediatorjev iz mastocitov. Spremembe proste koncentracije Ca^{2+} v celici so odvisne od aktivnosti nekaterih ionskih izmenjevalnih sistemov v mastocitu; Na^+/Ca^{2+} -izmenjevalca, Na^+/K^+ - ATPaze ter Ca^{2+} -ATPaze. Aktivnost teh izmenjevalcev je odvisna od koncentracije zunajceličnih in znotrajceličnih Ca^{2+} ionov. Številne zdravilne učinkovine in endogene spojine vplivajo na koncentracijo zunajceličnih in znotrajceličnih Ca^{2+} ionov ter na aktivnost ionskih izmenjevalnih mehanizmov mastocita. Kombinirano delovanje izmenjevalnih mehanizmov mastocita lahko pripomore pri spremenjenem sproščanju mediatorjev med vnetno ali alergijsko reakcijo.

Ključne besede: mastociti, Ca^{2+} ioni, ionski izmenjevalni mehanizmi mastocitov, sproščanje mediatorjev vnetja

Abstract: Mast cells play a central role in inflammatory and allergic reactions. In response to immunologic or non-immunologic stimuli they release a variety of inflammatory mediators. The secretion of the mediators is strongly dependent on the concentration of the cytosolic calcium. Immunologic or nonimmunologic stimulation of mast cells increases intracellular concentration of free Ca^{2+} and thus influences on the mediators release from mast cells. The changes of intracellular free Ca^{2+} depend on the activity of Na^+/Ca^{2+} - exchanger, Na^+/K^+ - ATPase and Ca^{2+} -ATPase of mast cell. Several drugs and endogenous compounds can modify the concentration of intracellular free Ca^{2+} ions by influencing the activity of the exchange mechanisms of mast cell. Combined actions of these exchange mechanisms serve to change mediators release from mast cells in inflammatory or allergic reactions.

Key words: mast cells, Ca^{2+} ions, ionic exchangers of mast cells, secretion of inflammatory mediators

1 Uvod

Mastociti (tkivni bazofilci) so celice vezivnega tkiva, ki imajo ključno vlogo pri procesu vnetja in pri alergičnih reakcijah (1,2). Plazmina membrana mastocitov vsebuje specifične membranske receptorje, ki imajo visoko afiniteto za vezavo imunoglobulina IgE (3,4). Povezava dveh molekul IgE z antigenom povzroči imunološko aktivacijo celice. Na membrani mastocita so pa poleg receptorjev za vezavo IgE protiteles prisotni tudi številni drugi receptorji za vezavo endogenih in eksogenih spojin, ki lahko povzročijo neimunološko sproščanje mediatorjev vnetja (5,6,7). Med neimunološke sproščevalce sodijo bazični sproščevalci; mono-, di- in poliamini (spojina 48/80) ter peptidi, kalcijeve ionofore, lektini (concanavalin A) in citokini (interlevkini) ter rastni dejavniki (živčni rastni dejavnik – NGF).

Po aktivaciji mastocitov z različnimi imunološkimi (kompleks antigena in dveh IgE protiteles) ali neimunološkimi (številne endogene ali eksogene spojine) stimulusi sproščajo mastociti številne kemijske posrednike (mediatorje) vnetja. Mediatorje vnetja delimo v dve skupini. V prvo skupino štejemo tiste spojine, ki so ves čas shranjene v zrnih celic (histamin, serotonin, eozinofilni kemotaktični faktor, nevtrofilni kemotaktični faktor, lizosomski encimi) in se iz njih sprostijo po aktivaciji celice z ustreznim stimulusom. Drugo skupino mediatorjev vnetja pa sestavljajo spojine, ki nastajajo v mastocitu med procesom vnetja in se nato tudi sproščajo iz mastocita. Mednje sodijo: arahidonska kislina, prostaglandini, prostaciklini, citokini (interlevkini), rastni dejavniki (živčni rastni dejavnik).

Pri procesu sproščanja mediatorjev vnetja imajo pomembno vlogo kalcijevi ioni. Sproščevalce mediatorjev vnetja lahko razdelimo na tiste, ki potrebujejo za svoje delovanje zunajcelične kalcijeve ione (Ca^{2+}) in tiste, ki niso povsem odvisni od zunajceličnih kalcijevih ionov, njihovo delovanje pa zavisi od znotrajcelične koncentracije prostih kalcijevih ionov (Ca^{2+}). V prvo skupino sproščevalcev prištevamo imunološke sproščevalce, lektine, ionofore, citokine (interlevkine) in rastne dejavnike (živčni rastni dejavnik). V drugo skupino sproščevalcev pa sodijo neimunološki polibazični sproščevalci – poliamini (spojina 48/80) in peptidi.

2 Mehanizem sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocita

Vezava sproščevalca na membrano mastocita preko aktivacije proteina G aktivira encime (fosfolipazo C, proteinsko kinazo C) v membrani mastocita, ki imajo pomembno vlogo pri mehanizmu sekrecije vnetnih mediatorjev iz mastocita (4,10).

Aktivacija fosfolipaze C povzroči razgradnjo fosfatidilinizitola (8,11). Pri tem nastanejo naslednji metabolični produkti: diacilglicerol (DAG), fosfatidilna kislina in inozitol trifosfat (IP_3). IP_3 sproži odprtje kalcijevih kanalov v plazemski membrani in s tem vdor Ca^{2+} v citoplazmo mastocita in dvig koncentracije prostih Ca^{2+} v citoplazmi. IP_3 povzroči tudi sprostitvev Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikuluma (ER) v citoplazmo in tudi na ta način zveča koncentracijo prostih Ca^{2+} v mastocitu. DG aktivira proteinsko kinazo C, ki omogoča fosforilacijo proteinov. To ima pomembno vlogo pri delovanju mikrotubulov in mikrofilamentov in tako tudi pri premikanju granul z mediatorji vnetja k plazmini membrani, kar omogoča kasnejše zlitje membrane granul z plazmino membrano mastocita in proces eksocitoze.

Osnovni stimulus za sproščanje mediatorjev vnetja iz aktiviranih mastocitov je povečana koncentracija znotrajceličnih prostih Ca^{2+} (12). Kratkotrajnemu zvečanju znotrajceličnih prostih Ca^{2+} sledi odstranitev Ca^{2+} iz citoplazme v celične zaloge (membranske zaloge za Ca^{2+} , endoplazmatski retikulum) ali v izvencelično tekočino (13,14). Pri uravnavanju proste koncentracije Ca^{2+} v celici imajo pomembno vlogo specifični na membrano vezani proteini (Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalni sistem, Ca^{2+} - ATPaza ter Na^+/K^+ - ATPaza), ki skrbijo za transport Na^+ , K^+ in Ca^{2+} v citoplazmo celice in iz nje (15). Omenjeni transportni proteini uravnavajo znotrajcelično koncentracijo prostih Ca^{2+} pri številnih evkariotskih celicah.

3 Transportni proteini, ki skrbijo za uravnavanje koncentracije Ca^{2+} v celicah.

Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalni sistem.

Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalec je reverzibilni transportni protein, ki omogoča izmenjavo treh Na^+ skozi celično membrano za en Ca^{2+} (16,17). V fizioloških razmerah Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalec transportira Na^+ iz zunajceličnega prostora, kjer je njihova koncentracija večja v citoplazmo, kjer je koncentracija Na^+ manjša. Transport Na^+ v smeri nižjih koncentracij daje izmenjevalcu gonilno moč za transport Ca^{2+} v

smeri proti koncentracijskemu gradientu, torej ven iz celice. Če se spremeni smer koncentracijskega gradienta za Na^+ , izmenjevalec deluje v obratni smeri in transportira Na^+ iz celice in Ca^{2+} v celico. Smer delovanja izmenjevalnega sistema je torej odvisna od koncentracije Na^+ in Ca^{2+} v celici in v mediju, kjer se celica nahaja.

Na^+/K^+ - ATPaza.

Na^+/K^+ - ATPaza je transmembranski encim, ki je odgovoren za aktivni transport Na^+ iz celice in K^+ v celico (18). Na ta način se vzdržuje membranski potencial celice. Transport Na^+ in K^+ pri tem poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta. Zato je za ta proces črpanja ionov potrebna energija, ki se tvori pri hidrolizi ATP molekul.

Če se aktivnost Na^+/K^+ - ATPaze zmanjša, se koncentracija Na^+ v celici zveča. Zvečana koncentracija znotrajceličnih Na^+ aktivira Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalec in povzroči zamenjavo znotrajceličnih Na^+ za zunajcelične Ca^{2+} . Kot posledica tega se zveča znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , kar ima lahko za posledico aktivacijo številnih celičnih encimov in različnih celičnih procesov.

Ca^{2+} - ATPaza.

Ca^{2+} -ATPaza je encim, ki se nahaja na plazmini membrani celice, kot tudi v celici na membrani endoplazmatskega retikuluma. Ca^{2+} -ATPaza skrbi za aktivni transport Ca^{2+} iz citoplazme v celične zaloge (celična membrana, endoplazmatski retikulum, mitohondriji), kot tudi iz celice v zunajcelično tekočino. Pri tem potujejo Ca^{2+} proti koncentracijskemu gradientu za Ca^{2+} . Ker Ca^{2+} -ATPaza omogoča prehod Ca^{2+} v smeri od nižje koncentracije k višji koncentraciji, je zato potrebna energija, ki se sprošča pri hidrolizi ATP molekul (19). Gre torej za energetsko odvisen aktivni proces.

4 Pomen Ca^{2+} pri procesu sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocita

V mastocitu je v stanju mirovanja koncentracija prostih Ca^{2+} zelo nizka (100 nmol/L) (21). Po aktivaciji mastocitov z imunološkim ali z neimunološkim sproščevalcem pride v mastocitu do kratkotrajnega zvečanja koncentracije prostih Ca^{2+} v celici (12,20), kar povzroči sproščanje številnih mediatorjev vnetja. Večja koncentracija znotrajceličnih Ca^{2+} vpliva na številne celične funkcije, kot so fosforilacija specifičnih proteinov, aktivacija celičnih encimov in aktivacija mikrofilamentov, ki potiskajo zrnca z mediatorji vnetja k celični membrani. Sledi proces zlitja membrane zrnca s plazmino membrano in sprostitvev mediatorjev vnetja iz zrnca v zunajcelični prostor.

Večina kalcija v mastocitih (>99%) je vezanega na proteine v citoplazmi celice ali shranjenega v celičnih zalogah (13,14,22). Največja zaloga Ca^{2+} v mastocitih je endoplazmatski retikulum (ER). Na membrani ER se nahajajo receptorji za IP_3 , ki nastane po aktivaciji celice s sproščevalcem vnetja. Vezava IP_3 na receptorje na plazmino membrano celice ali na ER v celici sproži odprtje kalcijevih kanalov v membrani ER ter plazemski membrani in s tem dvig koncentracije prostih Ca^{2+} v citoplazmi, kar vodi v sproščanje vnetnih mediatorjev.

5 Vzdrževanje nizke koncentracije prostih Ca^{2+} pri neaktiviranih mastocitih

Po vsaki aktivaciji mastocita s sproščevalcem, kateri sledi zvečanje intracelularne proste koncentracije Ca^{2+} , se mora koncentracija prostih Ca^{2+} v celici hitro znižati. Pri tem je pomemben transport Ca^{2+} iz citoplazme celice v endoplazmatski retikulum oziroma v zunajcelično tekočino. Tako se vzpostavi ponovno nizka koncentracija prostih Ca^{2+} v celici. Pri tem imajo podobno, kot pri številnih drugih celicah tudi pri mastocitu pomembno vlogo specifični na membrano vezani proteini (Ca^{2+} -ATPaza, Na^+/K^+ - ATPaza in Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalni sistem), s pomočjo katerih se Ca^{2+} odstrani iz citoplazme (15).

Ca^{2+} - ATPaza.

Ca^{2+} -ATPaza omogoča aktivni transport Ca^{2+} iz citoplazme mastocita in tako znižuje koncentracijo prostih Ca^{2+} v celici (20). V mastocitih sta dve vrsti Ca^{2+} -ATPaze. Prva vrsta se nahaja na citoplazmatski membrani mastocita, druga vrsta pa na membrani endoplazmatskega retikuluma (12). Tako prehaja Ca^{2+} iz citoplazme v celične zaloge (celična membrana, endoplazmatski retikulum, mitohondriji), kot tudi iz celice v zunajcelično tekočino (19).

Na^+/K^+ - ATPaza in Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalni sistem

V stanju mirovanja mastocita ima pomembno vlogo koncentracija Na^+ v mastocitu (15 mM) in v zunajcelični tekočini (134 mM) v kateri se mastocit nahaja. Na^+/K^+ - ATPaza omogoča aktivni transport Na^+ iz celice in K^+ v celico in tako vzdržuje visoko koncentracijo Na^+ v izvencelici tekočini. Ca^{2+} iz citoplazme mastocita se zato lahko zamenjajo z Na^+ iz medija s pomočjo Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalnim sistemom, ki se nahaja na plazmini membrani mastocita (18, 19). Na ta način se lahko koncentracija Ca^{2+} v citoplazmi močno zniža.

6 Mehanizmi, ki so vpleteni pri spremembi intracelularne koncentracije prostih kalcijevih ionov v mastocitu po delovanju različnih spojin.

Številne endogene spojine in zdravilne učinkovine lahko vplivajo na spremembo znotrajcelične proste koncentracije Ca^{2+} .

Intracelularna koncentracija prostih Ca^{2+} se lahko zveča kot posledica:

- 1) vstopa Ca^{2+} iz zunajcelične tekočine v celico (23,24).
Tako delujejo številni imunološki in neimunološki sproščevalci vnetnih mediatorjev (17,25).
- 2) sprostitve Ca^{2+} iz znotrajceličnih vezavnih mest (9).
Številne bazične spojine (peptidi in spojina 48/80) lahko preko zanje specifičnih vezavnih mest aktivirajo encim fosfolipazo C. IP_3 , ki pri tem nastaja povzroči zvečanje znotrajcelične proste koncentracije Ca^{2+} , kar sproži proces sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocitov.
- 3) inhibicije privzema Ca^{2+} v intracelularne zaloge (22).
Privzem Ca^{2+} v zaloge poteka s pomočjo transportnih proteinov

Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalnega sistema in Ca^{2+} -ATPaze. Lipofilne zdravilne učinkovine (antipsihotiki in antidepresivi) v večjih koncentracijah lahko inhibitorno vplivajo na omenjene transportne sisteme in na ta način zavro privzem Ca^{2+} v njihove zaloge. Tako se zveča koncentracija prostih Ca^{2+} v celici, posledica česar je lahko sproščanje vnetnih mediatorjev iz mastocitov (26,27). V eksperimentalne namene se za inhibicijo Ca^{2+} -ATPaze uporablja tapsigargin (22).

- 4) inhibicije encima Na^+/K^+ - ATPaze.

Če se aktivnost Na^+/K^+ - ATPaze zmanjša, to povzroči kopičenje Na^+ v mastocitu (18,19). S pomočjo Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalnega sistema se nato Na^+ iz citoplazme izmenjuje s Ca^{2+} iz zunajcelične tekočine ali iz celičnih zalog, kar zveča znotrajcelično koncentracijo prostih Ca^{2+} in to je stimulus za sproščanje vnetnih mediatorjev.

Med zdravili, ki se uporabljajo kot inhibitorji Na^+/K^+ - ATPaze so poznani kardiotionični glikozidi. Kardiotionični glikozidi preko inhibitornega učinka na Na^+/K^+ - ATPazo lahko potencirajo proces sproščanja mediatorjev vnetja, ki ga povzroči tako imunološka, kot neimunološka aktivacija mastocitov (19).

Po drugi strani pa nekatere zdravilne učinkovine (antipsihotiki ali antidepresivi) lahko zaradi svoje velike lipofilnosti inhibirajo sproščanje Ca^{2+} iz znotrajceličnih vezavnih mest. Zato se koncentracija prostih Ca^{2+} v citoplazmi mastocita po imunološki ali neimunološki stimulaciji ne more ustrezno zvečati, da bi prišlo do sprostitve mediatorjev vnetja iz mastocita. Na ta način lahko zgoraj omenjene spojine zavrejo proces sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocitov (26,27).

7 Sklep

Sprememba proste koncentracije Ca^{2+} v mastocitu ima pomembno vlogo pri sproščanju mediatorjev vnetja. Številne endogene spojine kot tudi zdravilne učinkovine lahko na različne načine preko spremembe proste koncentracije Ca^{2+} v celici vplivajo na proces sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocita in na ta način potencirajo ali inhibirajo vnetni odgovor organizma.

8 Literatura

1. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 2000;96(13):4028-38.
2. Kimata M, Inagaki N, Kato T, Miura T, Serizawa I, Nagai H. Roles of mitogen-activated protein kinase pathways for mediator release from human cultured mast cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60(4):589-94.
3. Tedeschi A, Lorini M, Gibelli S, Mladonna A. Effects of protein kinase C and phospholipase C inhibitors on IgE-dependent basophil histamine release. *Inflammation Research* 2000;49:480-5.
4. Windmiller DA, Backer JM. Distinct Phosphoinositide 3-kinases mediated mast cell degranulation in response to G-protein-coupled versus FcepsilonRI receptors. *J Biol Chem* 2003;278(14):11874-8.
5. Hanson DA, Ziegler SF. Regulation of ionomycin-mediated granule release from rat basophil leukemia cells. *Mol Immunol* 2002;38(16-18):1329-35.
6. Sheffer I, Taube Z, Medalia O, Sagi-Eisenberg R. Basic secretagogues activate protein tyrosine phosphorylation and release of arachidonic acid in mast cells via a novel protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1998;28:3468-78.
7. Seebeck J, Westerberger K, Elgeti T, Ziegler A, Schitze S. The exocytotic signaling induced by nerve growth factor in the presence of lyso-

- phosphatidylserine in rat peritoneal mast cells involves a type D phospholipase. *Regulatory peptides* 2001;102:93-99.
8. Ferjan I, Čarman-Kržan M, Erjavec F. Comparison of histamine and serotonin release from rat peritoneal mast cells induced
 9. Shefler I, Sagi-Eisenberg R. Gi-mediated activation of the syk kinase by the receptor mimetic basic secretagogues of mast cells: role in mediating arachidonic acid/metabolites release. *J Immunol* 2001;167(1):475-81.
 10. Ferjan I, Čarman-Kržan M. Differential effect of interleukin-3, stem cell factor and nerve growth factor on histamine and serotonin release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2000;49:S15-S16.
 11. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 2004;22:563-98.
 12. Dorval V, Dufour M, Leclerc P. Role of protein tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca^{2+} store depletion during human sperm acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 2003;9:125-31.
 13. Alfonso A, Botana MA, Vieytes MR, Louzao MC, Botana LM. Effect of signal transduction pathways on the action of thapsigargin on rat mast cells. *Biochemical Pharmacology* 1994;47:1813-20.
 14. Inesi G, Wade R, Rogers T. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump: Inhibition by thapsigargin and enhancement by adenovirus-mediated gene transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;853:195-206.
 15. Rumpel E, Pilatus U, Mayer A, Pecht I. Na^+ and Ca^{2+} gradients across the membrane modulate the secretory response of mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:351-3.
 16. Alfonso A, Lago J, Botana MA, Vietes MR, Botana LM. Characterization of Na^+Ca^{2+} exchanger on rat mast cells. *Cellular Physiol Biochem* 1999;9:53-71.
 17. Praetorius HA, Friis UG, Praetorius J, Johansen T. Evidence for a Na^+Ca^{2+} exchange mechanism in rat peritoneal mast cells. *Pflugers Arch* 1998;437:86-93.
 18. Lago J, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. Ouabain induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by protein phosphorylation and intracellular pH. *Cellular Signaling* 2001;13:515-24.
 19. Knudsen T. The Na^+K^+ -pump in rat peritoneal mast cells: some aspects of regulation of activity and cellular function. *Danish Medical Bulletin* 1995;42:441-53.
 20. Alfonso A, Cabado AG, Vietes MR, Botana LM. Calcium-pH crosstalks in rat mast cells: cytosolic alkalization, but not intracellular calcium release, is a sufficient signal for degranulation. *Br J Pharmacol* 2000;130:1809-16.
 21. Inesi G, Wade R, Rogers T. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump: Inhibition by thapsigargin and enhancement by adenovirus-mediated gene transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;853:195-206.
 22. Huber M, Huges MR, Krystal G. Thapsigargin-induced degranulation of mast cells is dependent on transient activation of phosphatidylinositol-3 kinase. *J Immunol* 2000;165:124-33.
 23. Micera A, Puxeddu I, Aloe I, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:369-74.
 24. Štempelj M, Čarman-Kržan M, Ferjan I. Regulatory role of extracellular Na^+ and Ca^{2+} ions in nerve growth factor induced histamine secretion from rat mast cells. *Inflamm Res* 2003;52:74-8.
 25. Štempelj M and Ferjan I. Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2005;54:344-349
 26. Ferjan I and Erjavec F. Effect of Ca^{2+} ions on the inhibition of histamine and serotonin secretion caused by phenothiazines. *Fundamental and clinical pharmacology* 1999;13 (Suppl 1):145.
 27. Ferjan I, Erjavec F. Changes in histamine and serotonin secretion from rat mast cells caused by antidepressants. *Inflamm Res* 1996;45:141-4.

Sodobni pristopi k izdelavi trdnih disperzij z izboljšano biološko uporabnostjo učinkovin

Contemporary approaches to solid dispersions production with improved drug bioavailability

Odon Planinšek

Povzetek: Velik delež novih zdravilnih učinkovin je težko vodotopnih, kar omejuje njihovo absorpcijo. Povečevanje biološke uporabnosti teh spojin je eden izmed največjih izzivov razvoja sodobnih farmacevtskih oblik. Z razvojem trdnih disperzij lahko pogosto presežemo omejitve drugih metod povečevanja hitrosti raztapljanja, kot so: tvorba soli, solubilizacija z uporabo sotopil ali zmanjševanje velikosti delcev in dosežemo želeno sproščanje učinkovine. Po stiku trdne disperzije z vodnim medijem pride do hitre raztopitve pomožne snovi, težko topna učinkovina pa se sprosti v obliki koloidnih delcev z veliko specifično površino, s čimer se povečata njena hitrost raztapljanja in biološka uporabnost. Prispevek obravnava omejitve, ki so v preteklosti preprečevale industrijsko proizvodnjo trdnih disperzij, kamor spadajo predvsem zapleteni postopki izdelave, slaba ponovljivost fizikalno-kemijskih lastnosti, omejitve povezane z razvojem ustrezne farmacevtske oblike in fizikalna nestabilnost. Prav tako so opisane tudi tehnologije, ki danes omogočajo industrijsko proizvodnjo trdnih disperzij, kot so: oblaganje sladkornih jeder v zvrtničenih plasteh, iztiskanje talin, neposredno polnjenje želatinskih kapsul s talinami, uporaba površinsko aktivnih snovi in tehnologija s superkritičnimi fluidi.

Gljučne besede: trdne disperzije, biološka uporabnost, hitrost raztapljanja

Abstract: Large percentage of new drug compounds are poorly water soluble. Bioavailability increase of these compounds represents one of the major challenge in the development of drug formulations. To achieve desired drug release, the development of solid dispersions can overcome the limitations of approaches such as salt formation, solubilization by cosolvent or particle size reduction. After the solid dispersion is exposed to aqueous media, the carrier dissolves and the drug is released as fine colloidal particles with large surface area that increases dissolution rate and bioavailability. Article discusses limitations that disabled industrial production of solid dispersions in the past which include laborious methods of preparation, low reproducibility of physicochemical characteristics, difficult dosage form development and low physical stability. Technologies which today enable industrial production of solid dispersion such as spraying on sugar beads using fluidized bed coating system, hot-melt extrusion, direct capsule filling, use of surface active carriers and supercritical fluid technology are also described.

Key words: solid dispersions, bioavailability, dissolution rate

1 Uvod

Raztapljanje učinkovine v bioloških medijih je poleg njene permeabilnosti najpomembnejši parameter, ki vpliva na biološko uporabnost. Povečamo jo lahko z izdelavo soli, ki pa ni mogoča pri uporabi nevtrálnih učinkovin. Tudi pri uporabi šibkih kislin ali baz je lahko ta metoda nepraktična, kadar izboljšanje raztapljanja prepreči pretvorba soli v prvotno obliko kisline oziroma baze. Solubilizacija učinkovin v organskih topilih ali v vodnem mediju z uporabo površinsko aktivnih snovi v kombinaciji s sotopili vodi v izdelavo tekočih formulacij, ki so s stališča komercializacije izdelka manj zaželene od trdnih farmacevtskih oblik (1).

Analiza modificirane Noyes-Whitneyeve enačbe omogoča pregled nekaterih možnosti za izboljšanje hitrosti raztapljanja (dC/dt) v vodi težko topnih učinkovin (Enačba 1) (2).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{h} \quad (1)$$

A je površina, ki je na razpolago za raztapljanje, D difuzijski koeficient spojine, C_s topnost spojine v mediju za raztapljanje, C koncentracija spojine ob času t in h debelina difuzijske plasti v stiku s površino delca, ki se raztaplja.

Prva možnost za povečanje hitrosti raztapljanja je povečanje površine, ki je na voljo za raztapljanje. To lahko dosežemo z zmanjševanjem velikosti delcev ali z izboljšanjem močenja snovi, ki se raztaplja. Uporaba različnih mlinov ali nadzorovane kristalizacije ima omejitve glede minimalne velikosti delcev, ki jih lahko izdelamo. Poleg tega je rokovanje s finimi delci v proizvodnji zelo zahtevno. Teoretično lahko stanjšamo tudi debelino difuzijske plasti, česar pa praktično, glede na definirane hidrodinamične pogoje v telesu, ne moremo doseči. Bolj smiselno je zagotavljanje „sink“ pogojev, ki pa so odvisni predvsem od permeabilnosti mukoze, sestave in volumna tekočin v prebavni cevi. Permeabilnost mukoze lahko povečamo z dodatkom ustreznih pomožnih snovi, ki pa v preteklosti niso dale najboljših rezultatov. Aplikacija učinkovine takoj po zaužitju hrane omogoča izboljšanje raztapljanja in podaljšanje časa, ki je na voljo za raztapljanje. Vpliv hrane na raztapljanje lahko napovedujemo s testiranjem raztapljanja v biorelevantnih medijih (3). Uporaba različnih formulacijskih pristopov predstavlja verjetno najbolj zanimivo skupino možnosti za izboljšanje hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin. Poleg obarjanja različnih kristalnih oblik, tvorbe amorfov ali psevdopolimorfov, lahko za ta namen izdelujemo tudi trdne disperzije.

2 Definicija trdne disperzije

Trdna disperzija je disperzija ene ali več aktivnih komponent v inertnem nosilcu, oziroma ogrodju, ki je v trdnem agregatnem stanju. Pripravimo jo lahko s taljenjem, raztapljanjem ali kombinacijo obeh metod. Pri tem lahko pride do že omenjene pospešitve ali do upočasnitve sproščanja. Med pomožno snovjo (nosilcem) in učinkovino lahko pride do različnih interakcij. Nastanejo lahko različne strukture, kot so: enostavna evtektična zmes, trdna raztopina, amorfnna raztopina in amorfnna suspenzija, amorfnni precipitat v/na kristalnem nosilcu, kompleksna spojina ali kombinacije naštetih struktur (4). Trdne disperzije sta prva predstavila Sekiguchi in Obi (5). Evtektična zmes v vodi težko topne zdravilne učinkovine sulfatiazola in fiziološko inertnega, vodotopnega nosilca sečnine, se po peroralni aplikaciji hitreje absorbira in izloči iz telesa, kot sam sulfatiazol. Strukture in mehanizmi, ki vplivajo na raztapljanje so bili v Farmaceutskem vestniku predstavljeni v sklopu metod za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja učinkovin opisane leta 2002 (6).

3 Prednosti izdelave trdnih disperzij

Zaradi povečanja hitrosti raztapljanja pride do povečanja hitrosti in obsega absorpcije zdravilne učinkovine. Odmerek zdravilne učinkovine lahko zato tudi zmanjšamo. Posledica povečane absorpcije je lahko tudi zmanjšanje predsistemskega metabolizma. Tako je povečana hitrost raztapljanja 17-estradiola v črevesju vzrok za nasičenje encimskih sistemov, ki so odgovorni za predsistemski metabolizem (4).

4 Omejitve izdelave trdnih disperzij

Uporaba različnih preslabo definiranih metod izdelave, slaba ponovljivost izdelave, težave pri izdelavi ustrezne farmacevtske

oblike, omejitve glede povečevanja proizvodne serije ter fizikalna in kemijska nestabilnost so v preteklosti preprečevale komercializacijo trdnih disperzij.

4.1 Omejitve povezane z metodo izdelave

Temperature, ki so jih mnogi raziskovalci uporabljali pri izdelavi trdnih disperzij s taljenjem, so bile v začetku razvoja zelo visoke (nad 100°C pri uporabi kombinacije acetaminofen-urea, ali nad 200°C v primeru uporabe sladkorjev) (7, 8). Nižjo temperaturo so uporabili za taljenje nifedipina in PEG 6000 (85°C) (9). Ohlajanje talin so izvajali z uporabo ledene kopeli, pri čemer so nekateri uporabili mešanje, drugi ohlajen zrak ali pa so talino nadzorovano počasi ohlajali. Disperzije je bilo treba do več dni shranjevati pri nizki temperaturi, da je prišlo do strjevanja, ki je omogočilo naknadno drobljenje.

Glavna omejitev uporabe metode raztapljanja za izdelavo trdne disperzije je neustrezna topnost učinkovine in pomožne snovi v istem topilu. Zaradi nizke topnosti ene od komponent je za izdelavo trdne disperzije potrebno uporabiti velik volumen topila. Tako sta npr. Chiou in Riegelman (10) 0,5g grizeofulvina in 4,5g PEG 6000 raztapljala v 500 ml etanola. Nekateri avtorji so težavo reševali tako, da so uporabili sotopila, drugi pa tako, da so le učinkovino raztopili v organskem topilu in jo v obliki raztopine dodali staljeni pomožni snovi (11).

4.2 Omejitve zaradi neponovljivosti fizikalno-kemijskih lastnosti

Poleg različnih možnosti, ki so na voljo npr. za ohlajanje taline ali metod sušenja raztopine pri izdelavi trdnih disperzij, tudi mnogi drugi parametri vplivajo na lastnosti produkta. Sem prištevamo hitrost segrevanja, maksimalno temperaturo segrevanja, čas vzdrževanja maksimalne temperature, metodo in hitrost ohlajanja, metodo mletja in končno velikost delcev. Kristaliničnost komponente v trdni disperziji je pogosto odvisna od segrevanja do tiste temperature kjer nastane bistra raztopina učinkovine in pomožne snovi (11). Nepopolno raztapljanje komponent v talini, podobno kot njuno razmerje ali velikost delcev zdobljene disperzije, vodi v spremembe v raztapljanju (11, 12).

Tudi pri izdelavi trdne disperzije z metodo raztapljanja mnogokrat nastane amorfnna oblika učinkovine. Delež kristaliničnosti oziroma amorfnosti je odvisen od razmerja učinkovina-pomožna snov ter od mnogih drugih parametrov kot so: narava topila, razmerje učinkovina-topilo ali pomožna snov-topilo, način ter hitrost sušenja.

4.3 Omejitve povezane z razvojem farmacevtske oblike

Za ustrezno klinično uporabo in komercializacijo zdravila je potrebno trdno disperzijo vgraditi v kapsulo ali tableto. Pri tem se lahko pojavijo težave glede možnosti drobljenja delcev, ki so premehki. Druge težave so lepljivost, slabe pretočne lastnosti, nestisljivost, nekompatibilnost učinkovine s pomožnimi snovmi in nestabilnost trdnih disperzij. V literaturi najdemo nekaj opisov relativno neuspešnih razvojov farmacevtskih oblik, ki vsebujejo trdne disperzije. Ford in Rubinstein sta staljeno disperzijo indometacina in PEG (tališče disperzije je 100 °C) dodajala zmesi natrijevega škrobnege glikolata in kalcijevega hidrogehekarbonata v mešalniku pri 70°C ter tako izdelala granule (13). Te sta nato strjevala en dan pri 25°C, dodala Mg

stearat in izdelala tablete. Končne tablete z maso 600 mg so vsebovale le 25 mg indometacina. Kljub temu, da je bil delež pomožnih snovi zelo visok, izdelane tablete niso razpadle. Težave povezane s slabo razpadnostjo tablet so posledica lastnosti pomožnih snovi, kot je npr. PEG, ki pri tabletiranju delujejo kot dobra veziva. Tako se med stiskanjem lahko zmeščajo ali stalijo, napolnijo pore med delci ter s tem med raztapljanjem preprečijo razpad tablete. Poleg tega mehanizma lahko med stiskanjem pomožna snov prekrije delce razgrajevala.

Povečevanje serije pri metodi izdelave trdne disperzije z raztapljanjem bi zahtevalo velike količine uporabe in odparevanja organskih topil. Za znižanje stroškov proizvodnje bi bilo na ta način izdelano trdno disperzijo smiselno označiti kot aktivno farmacevtsko substanco in proizvodnjo delcev prenesti v tovarno, kjer poteka sinteza in izolacija učinkovin (1). Seveda, bi bilo pri tem treba ugotoviti, ali predpisi omogočajo takšno proizvodnjo zdravil.

4.4 Fizikalno-kemijska nestabilnost trdnih disperzij

V literaturi je najpogosteje obravnavana fizikalna nestabilnost trdnih disperzij kristalizacija učinkovine in/ali pomožnih snovi. Trdne disperzije, izdelane z metodo taljenja, večinoma vsebujejo del učinkovine, ki je molekularno dispergirano, kar je odvisno od topnosti. Drugi del se nahaja v amorfni ali kristalni stanju, kar je odvisno od pogojev izdelave te disperzije. Če je učinkovina v obliki molekularne disperzije prenasočena, ali se nahaja v amorfni obliki, lahko s staranjem kristalizira. Podobno se lahko dogaja s pomožnimi snovmi. Chiou je ugotovil, da grizeofulvin kristalizira v disperziji s PEG 6000, kadar je njegova koncentracija nad 5 % medtem, ko pri nižji koncentraciji ostane raztopljen in se s časom ne spreminja (14). Istemu pojavu sta Ford in Rubinstein pripisala znižanje hitrosti raztapljanja indometacina iz disperzije s PEG 6000 (15). Poleg tega sta ugotovila večje znižanje hitrosti raztapljanja pri višje koncentriranih disperzijah. Splošno lahko rečemo, da lahko na stabilnost disperzije, ki vsebujejo amorfne spojine, vplivajo pogoji shranjevanja (predvsem temperatura in vlaga) in razmerje komponent v trdni disperziji. Tako predvsem povišana relativna vlaga (npr. med 60 in 75 %) povzroči popolno kristalizacijo učinkovine v trdni disperziji v relativno kratkem času (npr. nekaj tednov) (16).

Pretvorba amorfne v kristalno obliko je najpomembnejše vprašanje stabilnosti tudi pri disperzijah, izdelanih z metodo raztapljanja. Tudi tu vlaga bistveno vpliva na kristalizacijo učinkovine v trdni disperziji. Ugotovljeno je, da lahko pri nižji relativni vlagi PVP zadrži kristalizacijo učinkovin. Stabilizacija amorfne učinkovine v disperziji s PVP naj bi bila posledica tvorbe vodikovih vezi (17). Poleg izbire ustrezne pomožne snovi je za stabilizacijo trdne disperzije bistveno tudi njeno razmerje glede na učinkovino.

5 Izboljšave, ki omogočajo industrijsko proizvodnjo trdnih disperzij

5.1 Polnjenje kapsul s talinami

Trdne disperzije lahko izdelamo tako, da talino polnimo neposredno v trdne želatinske kapsule in jo ohladimo na sobno temperaturo. V ta

namen lahko uporabimo obstoječo opremo za kapsuliranje. V kapsuli nastane čep, iz katerega se po stiku s topilom v prebavni cevi sproščajo sestavine disperzije. Temperatura polnjenja ne sme preseči 70°C, ker višja temperatura vpliva na lastnosti kapsule. Tehnologija se najprej ni izkazala, saj so ugotovili, da se učinkovina iz disperzije, kljub zagotovitvi „sink“ pogojev, ne raztaplja bistveno hitreje, kot v čisti obliki. Razlog za takšno obnašanje učinkovine je hitro raztapljanje pomožne snovi, ki povzroči nastanek plasti učinkovine na površini ogrođa trdne disperzije in prepreči njeno nadaljnje sproščanje. Te težave so uspešno reševali tako, da so k PEG dodajali površinsko aktivne snovi kot so polisorbit 80, ali fosfatidilholin (18,19). Kljub temu, da sproščena učinkovina ostane neraztopljena v mediju za raztapljanje, ko njena koncentracija preseže topnost, drobne kapljice nastale emulzije ali disperzije delcev, omogočajo izboljšanje absorpcije.

5.2 Sodobne površinsko aktivne snovi za izdelavo trdnih disperzij

Dve pomembni površinsko aktivni snovi, ki ju uporabljamo za izdelavo trdnih disperzij sta Gelucire 44/14 in vitamin E R-alfa-tokoferil polietilen glikol 1000 sukcinat (TPGS). Gelucire 44/14 je zmes gliceril in PEG 1500 estrov z dolgimi maščobnimi kislinami in je oficalna spojina v evropski farmakopeji. Vrednost 44 označuje temperaturo tališča, vrednost 14 pa hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB). Vitamin E TPGS ima HLB vrednost 13 ter tališče 38°C. Za uporabo v trdnih disperzijah ga mešamo s pomožnimi snovmi, ki zvišajo njegovo temperaturo tališča (1).

Raziskave biološke uporabnosti trdnih disperzij s tovrstnimi spojinami so dale mnoge vzpodbudne rezultate. Aungst in sodelavci so poročali, da se biološka uporabnost inhibitorja HIV proteaze z oznako DMP323 ob zvišanju odmerka s 85 mg na 350 mg zniža za 49,6% na 5,2%, kadar so uporabili PEG kot pomožno snov v trdnih disperzijah. Pri uporabi disperzij, ki so vsebovale Gelucire 44/14, je bil padec biološke uporabnosti pri istem povečanju odmerka mnogo manjši (z 68,9% na 49,5%) (19). Biološka uporabnost v vodi težko topne učinkovine z oznako RP69698 pri psih je bila 4,5 krat večja (27,6% v primerjavi s 6%), ko so uporabili trdno disperzijo PEG 3350-Labrosol-polisorbit 80 kot takrat, ko so uporabili vodno suspenzijo, ki je vsebovala 0,5% metilceluloze (19).

Uporaba površinsko aktivnih snovi v trdnih disperzijah je omejena, kadar je učinkovina v pomožni snovi preslabo topna, saj je volumen taline disperzije prevelik, da bi ga lahko napolnili v kapsulo. V takšnem primeru lahko delce učinkovine dispergiramo v talini pomožne snovi, vendar je vprašanje ali se bo na ta način biološka uporabnost dovolj povečala (21). Pri temperaturi shranjevanja trdne disperzije učinkovina v pomožni snovi ne sme kristalizirati. Kadar je topnost učinkovine v staljeni pomožni snovi mnogo višja od koncentracije, ki jo nameravamo uporabiti v disperziji, lahko pričakujemo, da do obarjanja pri nižji temperaturi ne bo prišlo. Kristalizacija učinkovine iz disperzije z Gelucire 50/13, polisorbitom 80 in polioksil 35 ricinovim oljem je bila razlog za umik zdravila Norvir® s tržišča leta 1998 (22).

5.3 Oblaganje jeder v zvrtnjenih plasteh

Raztopino učinkovine in pomožne snovi lahko razpršujemo na površino nevtralnih granul, oziroma sladkorna jedra, ki jih nato

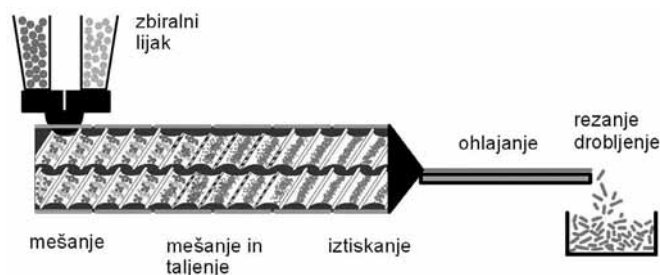
tabletiramo ali pa obložimo pelete, ki jih polnimo v kapsule. Zdravilo z itrakonazolom industrijsko proizvajajo tako, da raztopino učinkovine in hidroksipropilmetilceluloze (HPMC) v diklorometanu in etanolu razpršujejo na sladkorna jedra (23). V Wursterjevi komori nastanejo s trdno raztopino obložena jedra, ki v fizioloških pogojih omogočajo nastanek prenasočene raztopine učinkovine in njeno hitro absorpcijo iz prebavne cevi. HPMC pri tem deluje predvsem kot inhibitor kristalizacije učinkovine. Namesto razprševanja z organskimi raztopinami lahko za oblaganje uporabljamo talino disperzije učinkovine in pomožne snovi (24).

5.4 Iztiskanje taline

Najpomembnejša aplikacija iztiskanja v farmaciji je izdelava granul ali pelet enakih velikosti, oblik in gostote. Proces je sestavljen iz mešanja zmesi praškov (učinkovine in pomožnih snovi), ki ji dodamo tekočino, nadaljnega mešanja in potiskanja skozi matrico oziroma perforirano ploščo, da nastane cilindrični ekstrudat. Druga možnost je iztiskanje talin, ki je bila v farmaciji prvič uporabljena že leta 1971 (25). Prednost uporabe taline za izdelavo trdne disperzije je predvsem v tehnologiji, ki ne zahteva uporabe topil zaradi česar ni onesnaževanja okolja, ni potrebno dokazovati rezidualnih topil v proizvodnji in uporabljati eksplozivno varne opreme. Naprava za iztiskanje (angl. screw extruder - vijalni ekstrudator) vsebuje vijalni mešalnik, z enim ali dvema vijakoma, s tako oblikovano površino, ki omogoča mešanje in transport snovi vzdolž cevi-ohišja imenovanim polž (Slika 1).

V področju zbiralnega lijaka izvajamo polnjenje ekstrudatorja, ki mu sledi mešanje, taljenje in iztiskanje homogene zmesi skozi matrico ter obdelava ekstrudata. Na lastnosti ekstrudata vplivajo predvsem tok praškov, strižne sile, čas zadrževanja zmesi v aparatu, tlak in hitrost ohlajanja. Večina toplote za taljenje zmesi nastane med trenjem zmesi, ostalo pa dodamo z električnim ali tekočinskim segrevanjem plašča cevi. Značilnost vijalnega ekstrudatorja je tudi kratek čas potovanja zmesi od polnjenja do iztiskanja, ki znaša do dve minuti. Temperatura lahko natančno nadziramo med 30 in 250 °C. Zaprt sistem, ki preprečuje dostop vlage in kisika omejuje razgradnjo učinkovine. Sistem, ki poleg učinkovine in pomožnih snovi vsebuje še tekočino, ima pomanjkljivosti glede homogenosti, medtem ko lahko talina učinkovine in pomožne snovi obstaja kot enofazen sistem v širokem temperaturnem območju (26).

Na stabilnost trdnih disperzij vplivajo predvsem medmolekulske interakcije med učinkovino in nosilcem ter viskoznost pomožne snovi (27). Medtem ko je trdna raztopina stabilna, na stabilnost prenasočene



Slika 1: Shema dvovijačnega ekstrudatorja.

Figure 1: Scheme of a twin screw extruder.

disperzije vpliva temperatura steklastega prehoda. V amorfni disperziji se molekule do neke mere gibljejo, kar vodi v kristalizacijo učinkovine oziroma pomožne snovi (27). Zato so medmolekulske interakcije med učinkovino in pomožno snovjo zelo pomemben mehanizem fizikalnokemijske stabilizacije disperzije.

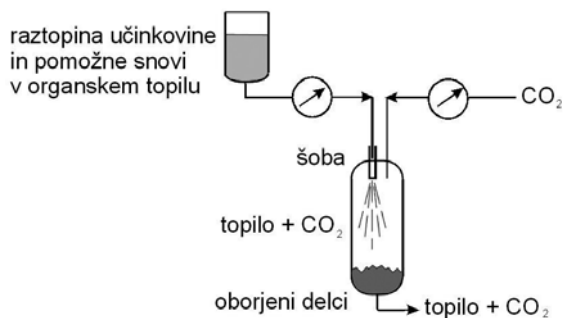
Rosemberg in sodelavci so z ekstruzijo taline razvili sistem učinkovine s pomožnimi snovmi, ki med raztapljanjem tvori delce velikosti 1-3 μm , s čimer se bistveno poveča hitrost raztapljanja (28). Kot pomožne snovi so uporabili PVP, vinilpirolidonvinilacetat v kombinaciji z različnimi površinsko aktivnimi snovmi. Tridesetkratno povečanje hitrosti raztapljanja 17-estradiola so dosegli Hülsmann in sodelavci z uporabo PVP in Gelucire 44/14 v disperzijah (29). Izboljšanje raztapljanja se je ohranilo tudi po izdelavi tablet. Pozitivni učinki izdelave trdnih disperzij so se pokazali tudi pri raziskavah na ljudeh. Testiranja na prostovoljcih so pokazala 2,3 kratno povečanje biološke uporabnosti itrakonazola iz trdne disperzije izdelane z ekstruzijo taline v primerjavi z registriranim zdravilom v obliki kapsul (30). Z isto tehnologijo so uspeli izdelati bioekvivaletno zdravilo z ibuprofenom glede na registrirane tablete, ki vsebujejo ibuprofenom lizinat (31).

5.5 Tehnologija s superkritičnimi fluidi

Superkritični fluid se nad kritično temperaturo in tlakom nahaja v obliki ene faze. Njegove lastnosti so primerne za izdelavo različnih produktov saj ima gostoto podobno tekočinam, stisljivost podobno plinom in večjo difuzivnost od tekočin. Poleg tega se lastnosti kot so viskoznost, difuzivnost, dielektrična konstanta in polarnost odvisno od tlaka in temperature spreminjajo, kar omogoča izbiro ustreznih pogojev za posamezno aplikacijo. Tehnologijo uporabljamo za frakcioniranje polimerov, čiščenje površinsko aktivnih spojin in drugih farmacevtskih surovin, za izvajanje polimerizacij in drugih kemijskih reakcij ter kristalizacije in obarjanja (32). Najpogosteje v teh procesih uporabljamo ogljikov dioksid, ki ima relativno nizek kritični tlak in temperaturo (31,1°C, 73,8 bar). Poleg tega, da je netoksičen, negorljiv in poceni, ga lahko uporabljamo za obdelavo termolabilnih učinkovin. Tehnologija s superkritičnimi fluidi omogoča izdelavo majhnih delcev z veliko specifično površino, ki imajo dobre pretočne lastnosti in majhno vsebnost rezidualnih topil (33).

Prva izmed možnosti za izdelavo trdnih disperzij je metoda hitre ekspanzije iz superkritične raztopine (RESS -angl. *rapid expansion of supercritical solution*). Učinkovino in pomožno snov raztopimo v CO_2 ter skozi šobo razpršimo v ekspanzijsko posodo z nižjim tlakom, da nastanejo delci disperzije. Omejitev te metode za izdelavo trdnih disperzij za farmacevtsko uporabo je predvsem nizka topnost učinkovin in polimerov v superkritičnem CO_2 (<0,01 %), zaradi česar bi bila industrijska proizvodnja večjih količin produkta nepraktična (1).

Pri večini ostalih metod, ki jih uporabljamo pri izdelavi trdnih disperzij s superkritičnimi fluidi pride do obarjanja delcev. To pomeni, da v postopku njihove izdelave uporabljamo organska topila. Superkritični fluid pri tehniki GAS uporabimo kot netopilo (angl. *gas antisolvent* - plin kot netopilo). Učinkovino, pomožno snov ali obe komponenti hkrati raztopimo v organskem topilu. Raztopini v avtoklavu naknadno dodajamo superkritični fluid, ki povzroči obarjanje (Slika 2) (34). Prednost te metode je predvsem v možnosti uporabe različnih topil. Pri izdelavi disperzij karbamazepina v kombinaciji s PEG, Gelucire 44/14 oziroma vitamin E TPGS s to metodo, so bili rezultati raztapljanja



Slika 2: Shematski prikaz metode uporabe plina kot netopila.

Figure 2: Scheme of gas anti-solvent method.

predvsem zaradi polimorfne transformacije učinkovine boljši, kot pri izdelavi trdnih disperzij z metodo odparevanja topila (35).

Pri metodi PGSS (angl. *precipitation from gas saturated solutions* - obarjanje iz raztopin, nasičenih s plinom) učinkovino in pomožno snov stalimo ter talino nasitimo s superkritičnim CO₂. Po ekspanziji se topnost zniža in izginjajoči plin povzroči, da se staljena zmes razgradi v drobne kapljice. Adiabatna ekspanzija povzroči tudi ohlajanje (Joule-Thomsonov pojav) in oborijo se delci trdne disperzije. Delci, ki nastanejo so majhni z enakomerno porazdelitvijo velikosti tako, da naknadno mletje ni potrebno. Prednost tehnike je tudi odsotnost organskih topil. PGSS proces so uspešno uporabili pri izdelavi disperzij nifedipina, felodipina in fenofibrata v kombinaciji s PEG 8000. Raztapljanje učinkovine iz disperzij je bilo v vseh primerih boljše kot v primeru raztapljanja mikronizirane učinkovine (36,37).

Tehnika SEDS (angl. *solution enhanced dispersion by supercritical fluids* - sprememba raztopine v disperzijo s superkritičnimi fluidi) je podobna GAS tehniki. Omogoča obarjanje delcev z uporabo koaksialne šobe, skozi katero hkrati razpršujemo raztopino učinkovine in pomožnih snovi ter superkritični fluid. Slednji začne pronicati v kapljice raztopine, raztapljati organsko topilo, v katerem se prenasita učinkovina in pomožna snov kar povzroči kristalizacijo in nastanek delcev. Z uporabo te tehnike je med modelno učinkovino in Eudragit-om E100 nastala trdna raztopina (38). Prav tako so trdne raztopine nastale pri uporabi več modelnih učinkovin ter hidroksiopropilceluloze, etilceluloze in polivinilpirolidona (39).

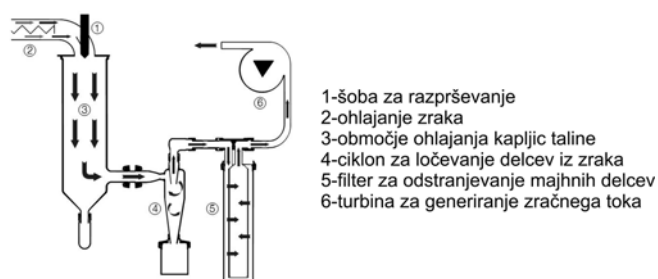
Še ena metoda za izdelavo trdnih disperzij obsega impregnacijo polimernega ogrodja z učinkovino, raztopljeno v superkritičnem fluidu. Učinkovina mora biti dobro topna v superkritičnem fluidu. S to raztopino nato impregniramo polimer, ki nabrekne in absorbira učinkovino (40). Nastane lahko trdna raztopina ali amorfna trdna disperzija. Z opisano metodo so izdelali amorfno trdno disperzijo ibuprofena in PVP (41).

5.6 Ostale novejšje tehnike

Granuliranje s talinami je ena izmed enostavnejših metod za reševanje težav povezanih z veliko kohezivnostjo mikroniziranih delcev učinkovine, ki onemogočajo njihovo enakomerno dispergiranje v zmesi za direktno tabletiranje. Mikronizirane delce učinkovine lahko dispergiramo v talini veziva in jo po kapljicah dodajamo ostalim pomožnim snovem v hitrovrtnečem mešalniku, v katerem vzdržujemo

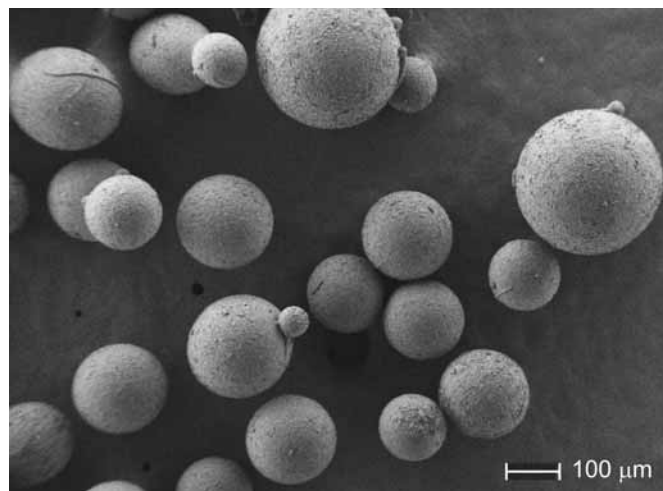
povišano temperaturo, dokler ne nastanejo granule. Po ohladitvi izdelane granule omogočajo izboljšano raztapljanje učinkovine zaradi povečane specifične površine. Podobne rezultate lahko dosežemo s taljenjem veziva v zmesi z ostalimi komponentami (z učinkovino in polnilom), ki tvorijo granule v hitrovrtnečem mešalniku. Seo in sodelavci so na opisane načine izboljšali raztapljanje diazepama iz granul, ki so kot veziva vsebovale PEG 3000 ali Gelucire 50/13 (42). Vzpodbudne rezultate raztapljanja so dobili tudi Perissutti in sodelavci z izdelavo granul ibuprofena z vezivom poloksamer 188 (43) ter Passerini s sodelavci z izdelavo granul prazikvantela s PEG 4000 oziroma s poloksamerom 188 (44).

Pomemben korak izdelave delcev trdne disperzije s taljenjem je hitra ohladitev taline, ki jo lahko dosežemo z uporabo tehnike razprševanja s strjevanjem. V aparatu, ki ga najpogosteje uporabljamo za sušenje z razprševanjem vodnih in organskih disperzij, razpršujemo talino učinkovine in pomožnih snovi skozi šobo, kjer nastanejo kapljice. Te



Slika 3: Shema aparata izdelavo delcev z razprševanjem s strjevanjem.

Figure 3: Scheme of an apparatus for particles formation with spray congealing.



Slika 4: Mikrodenci trdne disperzije učinkovine in Gelucire 44/14 izdelane z metodo razprševanja s strjevanjem na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Figure 4: Solid dispersion microparticles prepared with a drug and Gelucire 44/14 using spray congealing at the Faculty of pharmacy in Ljubljana.

se med letom srečajo z ohlajenim zrakom in strdijo, padejo na dno posode, ali pa s tokom zraka potujejo v ciklon, kjer se ločijo od zraka in zberejo v posodi (Slika 3). Nastanejo sferični delci trdne disperzije učinkovine in pomožnih snovi (Slika 4). Passerini in sodelavci so z uporabo te metode izdelali trdne disperzije prazikvantela oziroma karbamazepina in Gelucire 51/13 (44, 45) z izboljšanim raztapljanjem učinkovine glede na fizikalne zmesi istih komponent. Ili in sodelavci so ugotovili, da je raztapljanje glimepirida hitrejše ob uporabi Gelucire 50/13, kot ob uporabi PEG 6000 in poloxamera 188. V vseh primerih je bilo raztapljanje učinkovine iz takšnih sistemov bistveno hitrejše kot raztapljanje same učinkovine (46).

Evaporacijsko obarjanje v vodno raztopino (EPAS-angl. *Evaporative Precipitation into Aqueous Solution*) je nova metoda izdelave trdnih disperzij. Pri postopku pride do hitre fazne separacije, pri čemer nastanejo nanodelci in mikrodenci v vodi težko topne učinkovine. Učinkovino najprej raztopimo v organskem topilu z nizkim vreliščem, jo nato vodimo skozi šobo pri temperaturi višji od vrelišča topila in razpršujemo v segreto vodno raztopino. Hitro odparevanje drobnih kapljic povzroči prenasičenje in hitro nukleacijo, zaradi česar je velika verjetnost, da bodo namesto kristalnih nastali amorfni delci. V organsko topilo, vodo ali obe dodamo površinsko aktivno snov, ki omogoča optimiranje tvorbe delcev in njihovo stabilizacijo. Pri izdelavi delcev je šoba potopljena v vodno raztopino kar zagotavlja hiter stik delcev učinkovine s hidrofilno površinsko aktivno snovjo, ki prepreči kristalizacijo in rast delcev ter vpliva na izboljšanje raztapljanja posušenih delcev. Stabilno vodno suspenzijo delcev lahko posušimo z razprševanjem pri povišani temperaturi ali z liofilizacijo. Na ta način so izdelali nano in mikrodelce ciklosporina, ki so ga raztopili v kloroformu in obarjali v vodni raztopini različnih površinsko aktivnih snovi (fosfatidilholin, Tween, Mryj in Brij) oziroma polimerov (PEG, PVP) (47). Pri opisani metodi pride do oblaganja delcev učinkovine s stabilizatorjem, ki se porazdeljuje na medfazi učinkovina-voda tako, da se hidrofilni del molekule orientira proti vodi. Po osušitvi je površina delcev hidrofilna, kar bistveno pripomore k izboljšanju raztapljanja. Delež pomožnih snovi je v tem primeru mnogo manjši kot pri večini ostalih metod za izdelavo trdnih disperzij, zaradi česar so primerni tudi za parenteralno aplikacijo.

Pri elektrostatski metodi z vrtenjem (angl. *Electrostatic Spinning Method*) kombiniramo metode za izdelavo trdne raztopine/disperzije in nanotehnologijo. Raztopino učinkovine in polimera črpamo skozi cev, v kateri jo izpostavimo električni napetosti med 5 in 30 kV. Ko električne sile presežejo medfazno napetost med raztopino učinkovine, pomožne snovi in zrakom, nastanejo vlakna s premerom v nanometrskem ali mikrometrskem območju. Njihov premer je odvisen od medfazne napetosti, dielektrične konstante, hitrosti pretoka raztopine in velikosti električne napetosti (48). Po odparitvi topila vlakna zberemo na situ. Proces je omejen z nizkim številom uporabnih pomožnih snovi, ki so sposobne tvoriti nitke. Na farmacevtskem področju so ga preverili s pretvorbo itraconazola in HPMC v nanovlakna, ki so vsebovala amorfno nanodisperzijo učinkovine v polimernem ogrodju (49). Učinkovina se je iz vlaken hitro popolnoma sprostila, medtem ko je bilo sproščanje učinkovine iz fizikalnih zmesi z isto sestavo minimalno (1–3 %).

Elegantna metoda izdelave trdnih disperzij je segrevanje fizikalne zmesi učinkovine in pomožne snovi z uporabo mikrovalov, ki jih snovi

absorbirajo in pretvorijo v toplotno energijo. Z izdelavo trdnih disperzij karvedilola in b-ciklodekstrina so na ta način izdelali kompleks s stehiometrijskim razmerjem 1:2 in izboljšano navidezno vodotopnostjo glede na čisto učinkovino (50). Moneghini in sodelavci so izdelali trdne disperzije ibuprofena z β -ciklodekstrinom oziroma PVP/VA (kopolimer polivinilpirolidona in vinilacetata) (51). V obeh primerih je prišlo do znižanja kristaliničnosti učinkovine oziroma do njene skoraj popolne amorfizacije, hitrost raztapljanja pa se je glede na raztapljanje učinkovine iz fizikalnih zmesi bistveno izboljšala.

Trdne disperzije lahko z metodo odparevanja topila izdelamo tudi tako, da ostane pomožna snov neraztopljena, učinkovina pa se obori v porah oziroma adsorbira na površini delcev. Takeuchi in sodelavci so izdelali disperzije z raztapljanjem tolbutamida in suspedniranjem SiO_2 v etanolu (52). Vzorce so sušili z razprševanjem ali z odparevanjem topila pri znižanem tlaku. Učinkovina se je v disperzijah oborila v pretežno amorfni obliki. Raztapljanje tolbutamida je bilo pri uporabi hidrofilnega SiO_2 (neporozni Aerosil 200 in porozna Sylisia 350) glede na čisto učinkovino bistveno izboljšano. Izboljšanje raztapljanja so pripisali boljšemu močenju, večji disperzibilnosti delcev v mediju za raztapljanje, zmanjšanju velikosti delcev in znižanju kristaliničnosti učinkovine. Tako izdelane disperzije imajo dobre pretočne lastnosti in stisljivost, tako da je izdelava tablet mnogo enostavnejša kot pri trdnih disperzijah, ki so izdelane s taljenjem. Uporabimo lahko relativno majhen delež polnila in razgrajevala in izdelamo tablete, iz katerih se učinkovina zelo hitro popolnoma sprosti (53).

6 Zaključek

Trdne disperzije lahko oblikujemo v farmacevtsko obliko s hitrim ali upočasnjenim sproščanjem že v zgodnji fazi razvoja zdravila z uporabo relativno majhnih količin učinkovine, kar je velika prednost pred ostalimi metodami, s katerimi želimo zagotoviti čim višjo biološko uporabnost. Kljub intenzivnim raziskavam, ki trajajo že desetletja, je razvoj pomožnih snovi in tehnologij za izdelavo trdnih disperzij šele v zadnjem obdobju omogočil prihod tovrstnih zdravil na tržišče. Nekatera med njimi kot sta Norvir® in Rezulin® je bilo treba zaradi nestabilnosti in pojava neželenih stranskih učinkov umakniti s tržišča, druga pa se danes zaradi nove dodane vrednosti, uspešno prodajajo. Uspešno razvita zdravila izdelana z ekstruzijo talin za peroralno aplikacijo, ki jih danes najdemo na trgu, vsebujejo disperzijo grizeofulvina in polietilenglikola, nabilona in PVP, troglitazona in PVP. Obstajajo tudi registrirane oblike, izdelane z ekstruzijo taline za subkutano aplikacijo in nadzorovano sproščanje, ki vsebujejo goserelin ali buserelin v kombinaciji z PLGA (poli(laktid-ko-glikolid)). Dve kontracepcijski zdravili vsebujeta polietilen vinilacetat kopolimer za nadzorovano sproščanje progestina in estrogena iz rezervoarja (ogrodja), ki ga apliciramo subkutano oziroma vaginalno.

Z izdelavo trdnih disperzij želimo najpogosteje povečati hitrost raztapljanja in doseči prenasičeno koncentracijo raztopljenega učinkovine na mestu absorpcije. Njihov razvoj je intenziven, ker lahko izdelamo farmacevtske oblike za različne aplikacije, vključujoč najbolj zaželene, tablete. Pričakujemo lahko, da se bo število registriranih zdravil, ki vsebujejo trdne disperzije, v prihodnosti hitro povečevalo.

7 Literatura

1. Serajuddin ATM. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: Early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J Pharm Sci* 1999; 88: 1058-1066.
2. Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc* 1897; 19: 930-934.
3. Galia E, Nicholaides E, Hörter D, et al. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 1998; 15: 698-705.
4. Ford JL. The current status of solid dispersions. *Pharm Acta Helv* 1986; 3: 69-88.
5. Sekiguchi K, Obi N. Studies on absorption of eutectic mixture I. A comparison of the behaviour of eutectic mixture of sulfatiazole and that of ordinary sulfatiazole in man. *J Chem Pharm Bull* 1961; 9: 866-872.
6. Planinšek O. Nekatero metode za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin-2. del. *Farm Vestn* 2002;53: 117-127.
7. Goldberg AH, Gibaldi M, Kanig JL. Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures II. Experimental evaluation of eutectic mixture: urea-acetaminofen system. *J Pharm Sci* 1966; 55: 482-487.
8. Allen LV, Yanchick VA, Maness DD. Dissolution rates of corticosteroids utilizing sugar dispersions. *J Pharm Sci* 1977; 66 494-497.
9. Lin CW, Cham TM. Effect of particle size on the available surface area of nifedipine from nifedipine-poly(ethylene glycol) 6000 solid dispersions. *Int J Pharm* 1996; 127: 261-272.
10. Reed-Hill RE. *Physical Metallurgy Principles*, Van-Nostrand, Princetown, NJ, 1964. Chiu WL, Riegelman S. Preparation and dissolution characteristics of several fast release solid dispersions of griseofulvin. *J Pharm Sci* 1969; 58: 1505-1509.
11. Vera N, Veiga MD, Cadorniga R. Solid dispersions of oxodipine-PEG 6000 characterization and dissolution study. *STP Pharma Sci* 1991; 1: 125-129.
12. Ginés JM, Arias MJ, Moyano JR, et al. Thermal investigation of crystallization of poly(ethylene glycol)s in solid dispersions containing oxazepam. *Int J Pharm* 1996; 143: 247-253.
13. Ford JL, Rubinstein MH. Formulation and aging of tablets prepared from indomethacin-poly(ethylene glycol) 6000 solid dispersions. *Pharm Acta Helv* 1980; 55: 1-7.
14. Chiou WL. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems: X-ray diffraction and aqueous solubility studies on griseofulvin-poly(ethylene glycol) 6000 systems. *J Pharm Sci* 1977; 66: 989-991
15. Ford JL, Rubinstein MH. Aging of indomethacin-poly(ethylene glycol) 6000 solid dispersion. *Pharm Acta Helv* 1979; 54: 353-358.
16. Suzuki H, Sunada H. Some factors influencing the dissolution of solid dispersions with nicotinamide and hydroxypropylmethylcellulose as combined carriers. *Chem Pharm Bull* 1988; 46: 1015-1020.
17. Taylor LS, Zografis G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. *Pharm Res* 1997; 14: 1691-1698.
18. Serajuddin ATM, Sheen PC, Mufson D et al. Effect of vehicle amphiphilicity on the dissolution and bioavailability of a poorly water-soluble drug from solid dispersion. *J Pharm. Sci.* 1988; 77: 325-329.
19. Aungst BJ, Ngguyen NH, Rogers N et al. Amphiphilic vehicles improve the oral bioavailability of a poorly soluble HIV protease inhibitor at high doses. *Int J Pharm* 1997; 156: 79-88.
20. Serajuddin ATM, Sheen PC, Augustine MA. Improved dissolution of a poorly water-soluble drug from solid dispersions in poly(ethylene glycol): polysorbate 80 mixtures. *J Pharm Sci* 1990; 79: 463-464.
21. Dordunoo SK, Ford JL, Rubinstein MH. Preformulation studies on solid dispersions containing triamterene of temazepam in polyethylene glycols or Gelucire 44/14 for liquid filling of hard gelatine capsules. *Drug Dev Ind. Pharm* 1991; 17: 1685-1713
22. Rosoff M, Serajuddin ATM. Solubilization of diazepam in bile salts and in sodium cholate-lecithin-water phases. *Int J Pharm* 1980; 6: 137-148.
23. Gillis PA, De Conde V, Vandecruys R. Janssen Pharmaceutica NV. Beads having a core coated with an antifungal and a polymer. US patent 5 633 015. 1997.
24. Kennedy JP, Niebergall PJ. Development and optimization of a solid dispersion hot melt fluid bed coating metod *Pharm Dev Technol* 1996; 1: 51-62.
25. el-Egakey MA, Soliva M, Speise P. Hot extruded dosage forms. *Pharm Acta Helv.* 1971; 46 : 31-52.
26. Karanth H, Subbraya Shenoy V, Ramachandra Murthy R. Industrially feasible alternative approaches in the manufacture of solid dispersions: A technical report. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7(4): E1-E7.
27. Breitenbach J, Two concepts, one technology: controlled release and solid dispersion with Meltrex, in: I. Ghebre-Selassie (Ed.), *Modified Release Drug Delivery Technology*, Marcel Dekker, New York, NY, 2003.
28. Rosenberg J, Degenhardt M, Breitenbach J et al. Amorphous Embedding of a Lipophilic Drug Substance by Meltrex-technology. Abstract book 7th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Noordwijk aan Zee, Netherlands, 2002: 184-188.
29. Hülsmann S, Backensfeld T, Keitel S, Bodmeier R. Melt extrusion-an alternative method for enhancing the dissolution rate of 17-estradiol hemihydrate, *Eur. J. Pharm Biopharm* 2000; 49: 237-242.
30. Baert L, Elvire C, Verreck G, Thone D. Antifungal compositions with improved bioavailability, *Eur. Patent* 0,904,060, 1996.
31. Zeidler J, Neumann J, Liepold B et al. A fast-acting analgesic comprises as analgesic substance ibuprofen in an adjuvant matrix with a porous structure and a density of greater than 1 and up to 2.5 g/cm³. US Patent 6,322,816, 1997.
32. Phillips EM, Stella VJ. Rapid expansion from supercritical solutions: application to pharmaceutical processes. *Int J Pharm* 1993; 94: 1-10.
33. Beach S, Latham D, Sidgwick C et al. Control of the physical form of salmeterol xinofoate. *Org Proc Res Dev* 1999; 3: 370-376.
34. Lack E, Weidner E, Knez Z et al. Particle Generation with Supercritical CO₂, 1st Vienna International Conference: Micro- and Nano-Technology, March 9 - 11, 2005, The Austrian Tribology Society, Vienna, Austria.
35. Sethia S, Squillante E. Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method. *J Pharm Sci* 2002;91:1948-1957.
36. Senčar-Božič P, Srčič S, Knez Z, Kerč J. Improvement of nifedipine dissolution characteristics using supercritical CO₂. *Int J Pharm.* 1997;148:123-130.
37. Kerč J, Srčič S, Knez Z, Senčar-Božič P. Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide. *Int J Pharm.* 1999; 182: 33-39.
38. Juppo AM, Boiddier C, Khoo C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. *Int J Pharm* 2003; 250: 385-401.
39. York P, Wilkins SA, Storey RA, Walker SE, Harland RS, inventors. Bradford Particle Design PLC, Bristol-Myers Squibb. Coformulation methods and their products. World patent 0 115 664. 2001.

40. Berens AR, Huvard GS, Korsmeyer RW, Kunig RW. Application of compressed carbon dioxide in the incorporation of additives into polymers. *J Appl Polym Sci* 1992; 46: 231-242.
41. Kazarian SG, Martirosyan GG. Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP. *Int J Pharm.* 2002; 232: 81-90.
42. Seo A., Holm P., Kristensen G., Schaefer T. The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer. *Int. J Pharm.* 2003; 259,161-171.
43. Perissutti B, Rubessa F., Moneghini M., Voinovich D. Formulation design of carbamazepine fast-release tablets prepared by melt granulation technique. *Int J Pharm* 2003; 256: 53-63.
44. Passerini N, Albertini B, Perissutti, Rodríguez L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *Int J Pharm* 2006; 318: 91-102.
45. Passerini N, Perissutti B, Moneghini M et al. Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray congealing process using ultrasounds. *J Pharm Sci* 2002; 91: 3 699-707.
46. Ilić I, Dreu R, Burjak M et al. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. *Int J Pharm* 2009; v tisku.
47. Chen X, Young TJ, Sarkari M et al. Preparation of cyclosporine A nanoparticles by evaporative precipitation into aqueous solution. *Int J Pharm* 2002; 242: 3-14.
48. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibres and textiles. *Polym.* 2001; 42: 261-272.
49. Verreck G, Cun I, Peeters J et al. Preparation and characterization of nano fibres containing amorphous drug dispersions generated by electrostatic spinning. *Pharm Res* 2003; 20: 810-817.
50. Xianhong W, Fei T, Zhijun J, Ziuyang L. Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with b-cyclodextrin. *J Pharm Biom Anal* 2004; 34: 517-523.
51. Moneghini M, Bellich B, Baxa P, Princivale F. Microwave generated solid dispersion containing ibuprofen. *Int J Pharm* 2008; 125-130.
52. Takeuchi H, Naira S, Yamamoto H, Kawashima Y. Solid dispersion particles of tolbutamide prepared with fine silica particles by spray-drying method. *Powder Tech* 2004; 141: 187-195.
53. Takeuchi H, Nagira S, Tanimura S et al. Tableting of solid dispersion particles consisting of indomethacin and porous silica particles. *Cem Pharm Bull* 2005; 53(5): 487-491.

Farmakoterapija parodontalnih bolezni

Pharmacotherapy of periodontal diseases

Saša Obermajer

Povzetek: Za odstranjevanje zobnih oblog in zdravljenje gingivitisa so bolnikom na voljo številni izdelki. Njihov cilj je zmanjšanje vnetja dlesni in s tem preprečiti razvoj destruktivne parodontalne bolezni. Proizvodi so primarno v obliki zobnih past ali ustnih vod, ki vsebujejo aktivne učinkovine klorheksidin, triklosan, kositrov fluorid, kombinacijo eteričnih olj, antimikrobnih učinkovin in antibakterijskih peptidov. Primerna sestava zobnih past in ustnih vod je izrednega pomena za ohranitev biološke razpoložljivosti učinkovin in v nekaterih primerih za izboljšanje njihovih trajnosti. Novi lokalni dostavni sistemi, kot tudi genska terapija, nudijo možnosti izboljšanja terapije in hkrati preventive parodontalne bolezni. Sledeči sistematični pregled farmakoterapevtskih učinkovin predlaga za optimalno zdravje dlesni uporabo pripravkov za odstranjevanje plaka in zdravljenje gingivitisa kot dodatek bolnikovim oralnim higienskim navadam.

Ključne besede: periodontitis, gingivitis, klorheksidin, triklosan, antimikrobne učinkovine, kovinski ioni, antibakterijski peptidi

Abstract: Multiple antigingivitis and antiplaque products are available for patients. The goal of antiplaque, antigingivitis agents is to decrease gingival inflammation so that destructive periodontal disease will not develop. These products are primarily in the form of a dentifrice or a mouthrinse, and the active agents involved include chlorhexidine, triclosan, stannous fluoride, a combination of essential oils, antimicrobial agents and antibacterial peptides. The proper formulation of these active agents into dentifrices and/or mouthrinses is extremely important to maintain the bioavailability of the agents and, in some cases, to improve their substantivity. New local delivery systems as well as gene therapy will improve therapy as well as prevention of this prevalent disease. This systematic review suggests that for optimum gingival health, adults should add an antiplaque, antigingivitis agent to their oral hygiene regimen.

Keywords: periodontitis, gingivitis, chlorhexidine, triclosan, antimicrobials, metal ions, antibacterial peptides

1 Uvod

Bolezni obzobnih tkiv, tako gingivitis kot parodontitis, so resne infekcijske bolezni, ki, kadar ostanejo nezdravljene, vodijo v izgubo zob. Parodontalne bolezni se pojavljajo tako pri odraslih kot tudi pri otrocih in najstnikih. Gingivitis prizadane več kot 70 % otrok starejših od 7 let (1) in več kot 75 % odraslih ter se pri nekaterih odraslih populacijah približuje celo 100 % (2). Resni generaliziran parodontitis prizadane od 5 do 15 % populacije, medtem ko zmerne oblike parodontitisa prizadanejo večino prebivalstva (3). Pomembna je preventiva, zgodnje diagnosticiranje in zgodnje zdravljenje parodontalnih bolezni.

Namen članka je aktualen sistematičen pregled farmakoterapije pri zdravljenju parodontalnih bolezni.

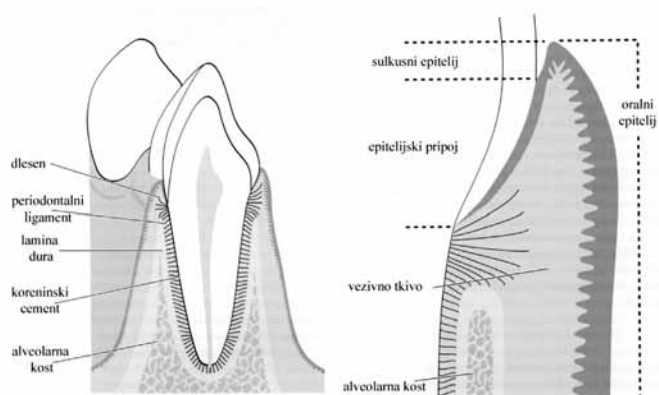
2 Razdelitev parodontalnih bolezni

Gingivitis in parodontitis sta dve glavni obliki infekcijskih bolezni, ki prizadaneeta parodontalno tkivo. Gingivitis je najmildejša oblika parodontalne

bolezni. Gre za vnetje gingive (dlesni), ki se klinično kaže z znaki kot so rdečica gingive, edem, krvavenje in povečan tok tekočine v gingivalnih žepih (4). Nezdravljen gingivitis lahko napreduje v parodontitis. Parodontitis je poleg vnetja gingive tudi vnetje vezivnega tkiva, parodontalnega ligamenta in kosti. Histopatologija lezije pri parodontitisu je sicer v mnogih pogledih podobna nastanku lezije pri gingivitisu, vendar sčasoma prevlada izguba parodontalnega tkiva z izgubo kosti ter nastanek parodontalnih žepkov (4,5). Parodontitis se tako klinično razlikuje od gingivitisa, pride namreč do izgube podpornih tkiv zoba, zaradi česar postane zob majav in v končni fazi izpade (4). Obe bolezni se klasificira glede na etiologijo, klinično sliko ali spremljajoče dejavnike, ki bolezni poslabšajo (5). Med parodontalnimi in sistemskimi boleznimi obstaja povezava (1).

Sprejeta klasifikacija parodontalnih bolezni:

1. gingivalne bolezni zaradi zobnih oblog (sem spadajo različni gingivitisi),
2. kronični parodontitis,
3. agresivni parodontitis,
4. parodontitis kot manifestacija sistemskih bolezni in nekrotizirajoče parodontalne bolezni (4).



Slika 1: Prikaz videza zdravega zoba in obzobnega tkiva.

Figure 1: Schematic representation of healthy tooth and periodontal tissue.

3 Vzroki za nastanek parodontalnih bolezni

Gingivitis je pogosto posledica neprimerne ustne higiene. Razvoj gingivitisa potrebuje prisotnost zobnih oblog in bakterij, ki direktno in indirektno izzovejo patološke spremembe v tkivu. Skoraj vse parodontalne bolezni so povezane z mikroorganizmi oziroma so le ti njihovi povzročitelji (4). Prekomerna rast biofilma, ponavadi zaradi nerednega čiščenja, je povezana z razvojem parodontalnih bolezni. (6).

Pomembno pa je poudariti, da imajo na parodontalno bolezen močan vpliv naslednji dejavniki:

- kajenje,
- genetika (do 30% populacije je gensko dovzetnih za razvoj parodontalne bolezni, kar pomeni, da navkljub dobri ustni higieni z večjo verjetnostjo razvijejo parodontalno bolezen),
- nosečnost, puberteta, menopavza (kot posledica hormonskih sprememb so dlesni bolj občutljive na prisotnost zobnih oblog, hkrati pa obstaja tudi obratna povezava parodontalne bolezni na nosečnost; noseče ženske s parodontalno boleznijo so bolj dovzetne za prezgodnji porod in nedonošenost novorojenčkov),
- stres oz. imunski status organizma,
- zdravila.

Med zdravili je potrebno posebej poudariti učinkovine fenitoin, natrijev valproat, ciklosporin A in blokatorje kalcijevih kanalov (npr. nifedipin), ki povzročajo hiperplazijo dlesni bodisi neodvisno ali v odgovor na prisotnost zobnih oblog. Tipični znaki so sprememba oblike in velikosti papile, lahko pa se poveča tudi preostala obzobna ter prirasla dlesni.

Na stanje povečane občutljivosti parodontalnih tkiv v odgovor na zobne obloge vplivajo tudi peroralni kontraceptivi in antidepresivi.

V širšem smislu pa na zdravje dlesni vplivajo tudi azatioprin, protirakave učinkovine in metotrexat, ki posredno povzročajo atrofijo, eritem ter ulceracije (7).

- stiskanje in škrtanje z zobni (bruksizem) ter okluzijska travma,
- sladkorna bolezen (pri sladkorni bolezni je prav tako opazna navzkrižna povezava, in sicer je pri bolnikih s parodontalno boleznijo

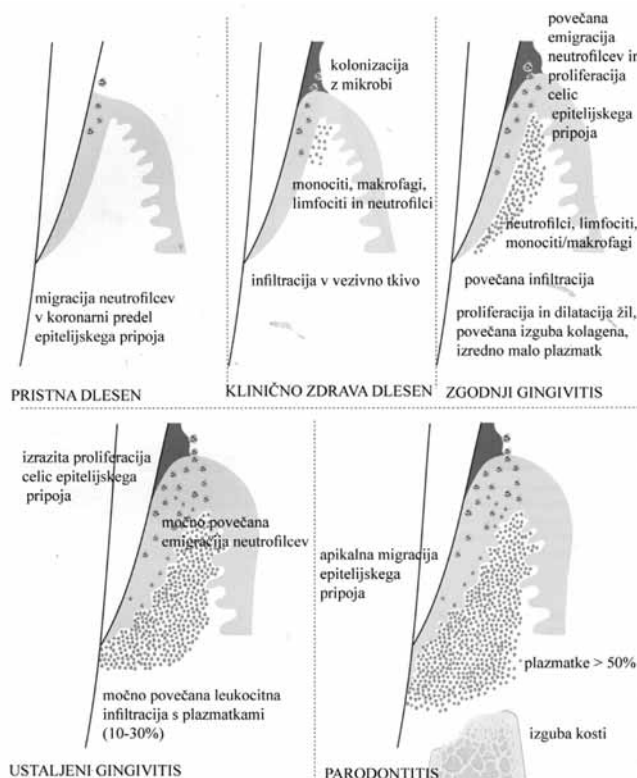
sama sladkorna bolezen težje obvladljiva zaradi vpliva parodontalne infekcije na zmožnost proizvodnje ter porabe inzulina),

- neustrezna prehrana,
- druge sistemske bolezni.

4 Zdravljenje parodontalnih bolezni

Gingivitis je reverzibilna bolezen. Osnovna terapija pri ljudeh s kroničnim gingivitisom je zmanjšanje števila ustnih bakterij in z njimi povezanih kalcificiranih in nekalcificiranih sedimentov. Terapevtski cilj odstranjevanja zobnega kamna in zobnih oblog ter luščenja in glajenja korenine zoba je zmanjšanje števila supra- in subgingivalnih bakterij pod nivo, ki je sposoben povzročiti klinično vnetje dlesni.

Parodontitis je pogojno reverzibilna bolezen. Terapevtsko zdravljenje razdelimo v tri glavne skupine: anti-infekcijsko zdravljenje oz. nekirurško terapijo, resektivno kirurško zdravljenje in regenerativno kirurško zdravljenje. Anti-infekcijsko zdravljenje odstrani etiološke dejavnike z odstranjevanjem zobnih oblog in zobnega kamna, supra- in subgingivalno z luščenjem in glajenjem korenine. Med najpogosteje izvajanimi resektivnimi kirurškimi parodontalnimi terapijami so gingivektomije, reženjske operacije (zmanjševanje globine parodontalnih žepov) z ali brez postopkov za podaljšanje klinične krone ter mehko tkivni presadki. Regenerativna terapija zajema regeneracijo ali rekonstrukcijo izgubljenega parodontalnega tkiva (5).



Slika 2: Shematski prikaz razvoja parodontalne bolezni.

Figure 2: Schematic representation of periodontal disease development.

4.1 Farmakoterapija parodontalnih bolezni

Proces nastanka zobnih oblog se lahko spremeni oz. zavre na več ravneh še predno masa in kompleksnost zobnih oblog dosežeta nivo, ki preprečuje zdravje dlesni. Farmakoterapija lahko tako učinkuje na kvaliteto in kvantiteto plaka, odvisno od napredovalosti bolezni. Pomembno je poudariti, da so bakterije v biofilmih bolj rezistentne na delovanje protimikrobnih agensov kot prostoživeče. Tako morajo biti farmakoterapevtiki učinkoviti predvsem proti zobnim oblogam, ne samo proti samim bakterijam slin.

Glede na mehanizem delovanja ločimo antiadhezivne dejavnike, ki učinkujejo na začetno adhezijo primarnih bakterij, ki ustvarjajo zobne obloge (delmopinol), antimikrobne dejavnike, ki imajo bakteriostatični ali baktericidni učinek, in dejavnike, ki zmanjšujejo količino nastalih oblog (hipoklorit, proteaze, dekstranaze, mutanaze). Glede na farmacevtsko-kemijsko klasifikacijo so to antibiotiki, encimi, bisbigvanidni antiseptiki (klorheksidin, aleksidin, oktenidin), kvartarne amonijeve spojine (benzalkonijev klorid, cetilpiridinijev klorid), fenoli (triklosan) in oljne esence, naravni proizvodi (zelišča in rastline), fluoridi, kovinske soli, oksidanti (peroksiborat), detergenti (natrijev-lavril-sulfat), aminoalkoholi (oktopenol, delmopinol), natrijev klorid ter drugi antiseptiki (povidon jod, heksetidin).

Da je lahko farmakoterapevtska učinkovina pri zdravljenju parodontalne bolezni učinkovita, mora zadostovati petim pogojem: inhibira ali zatire ustreznega patogena, doseči mora ustrezno mesto delovanja, imeti mora ustrezno koncentracijo, delovati mora dovolj dolgo in ne sme povzročati poškodb.

Farmakoterapija pri zdravljenju parodontitisa je lahko sistemska ali lokalna.

Lokalno učinkovine apliciramo v obliki zobne paste, ustne vode, sprejev, izpiralcev, premazov ali žvečilnih gum.

4.1.1 Antiseptiki

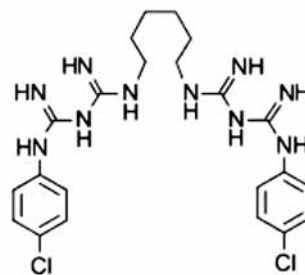
Antiseptiki obsegajo široko področje kemijskih kategorij, od alkoholov (etil alkohol, isopropyl alkohol), amidinov in gvanidov (klorheksidin), halogenov (triklosan), živosrebrih spojin (nitromersol), fenolov (eugenol, triklosan, timol), kvaternarnih amonijevih spojin (cetilpiridinijev klorid), kovin (cinkov citrate), barvil do drugih (heksetidin, očetna kislina). Različni mehanizmi delovanja antiseptikov potekajo preko inaktivacije encimov, spremembe normalne permeabilnosti bakterijske celične membrane, denaturacije proteinov, helacije in interkalacije v DNA. Idealni antiseptik mora imeti določene fizikalne, estetske (brez vonja, ne povzroča zabarvanja, bolečin...) in učinkovitostne (visoka germicidna aktivnost, širok spekter aktivnosti, dolgotrajna učinkovitost) lastnosti. Hkrati pa je potrebno poudariti, da idealnega antiseptika še niso odkrili.

Minimalna inhibitorna koncentracija antiseptika mora doseči bakterije na vseh izpostavljenih ustnih predelih. Dve področji, gingivalni žep in interproksimalno področje med zobmi, pomembna pri patogenezi parodontalne bolezni, pa s spiranjem z ustnimi vodami ne moremo doseči. Tovrstne težave lahko presežemo z uporabo lokalnih dostavnih sistemov (8) ter hkratnim mehanskim čiščenjem.

Čeprav so preučili že stotine učinkovin in preparatov, še vedno ni idealnega antiseptika (9). Za klorheksidin bi lahko rekli, da je nekakšen referenčni standard (9), saj se z njim primerjajo in ocenjujejo številni antiseptiki.

4.1.1.1 Klorheksidin (1,1'-Heksametilen bis(5-(p-klorofenil)bisgvanid))

Klorheksidin je antiseptik, član skupine bisgvanidov, in je še vedno referenčni standard (zlati standard), s katerim se ocenjuje in primerja številne druge oralne antiseptike; namreč klorheksidin še vedno velja za najučinkovitejše protimikrobno sredstvo pri peroralni uporabi.



Slika 3: Kemijska struktura klorheksidina.

Figure 3: Chemical structure of chlorhexidine.

Klorheksidin ima baktericidni in bakteriostatični učinek na Gram (+) in Gram (-) bakterije (vpliva na membransko prepustnost bakterij, pri višjih koncentracijah pa povzroča tudi koagulacijo citoplazme).

Najdemo ga v več kot 100 različnih proizvodih kot edino aktivno učinkovino ali v kombinaciji z drugimi učinkovinami. V Evropi se običajno uporablja koncentracija 0,2 %, v Združenih državah Amerike pa 0,12 % (9).

Uporablja se v obliki ustne vode, gelov, sprejev in premazov v koncentracijah 0,03-2%. Klorheksidin se v zobnih pastah redkeje uporablja zaradi anionske narave detergentov zobnih past, ki ga deaktivirajo. Indikacije za uporabo so: perioperativna uporaba (pred ali po operativnim posegom), v sklopu parodontalne terapije (gingivitis, parodontitis, nekrotizirajoči ulcerativni gingivitis/parodontitis), preventiva kariesa, ustni zadah, suha usta, kot dodatek ustni higieni in profesionalni profilaksi ter pri hendikepiranih osebah.

Uporaba klorheksidin ustne vode (0,1 do 0,2 %) dva- do trikrat dnevno je učinkovita pri zmanjšanju oblog in gingivitisu. Učinkovitost je večja kot pri ostalih ustnih vodah (10,11,12).

Klorheksidinske ustne vode naj bi se glede na izsledke posameznih študij uporabljale najprej 30 minut po zobnem ščetkanju oz. po uporabi zobnih past, saj le te vsebujejo snovi, ki lahko inaktivirajo klorheksidin (13,14,15).

Ob oralni uporabi ima številne stranske učinke: rjavo zabarvanje zob, zobnih materialov in jezika, motnje okusa, erozije ustne sluznice ter otekanje parotidne žleze. Rjavo zabarvanje zob naj bi pravzaprav povzročali prehodni elementi in žveplo, in sicer naj bi klorheksidin povečal akumuliranje žveplo-vsebujočih komponent zobnih oblog, ki nadalje interagirajo z železom ter tako povzročijo zabarvanje oblog (zabarvanje je tisti stranski učinek, ki prepreči dolgoročno uporabo klorheksidina v preventivne namene).

Omenimo lahko še sinergistično delovanje klorheksidina in bakra, ki omogoča 10- do 100 krat večje zmanjšanje števila živih celic kot pa ga daje sam klorheksidin.

Ena od oblik oralne aplikacije klorheksidina je klorheksidinski čip. Klorheksidinski čip je majhen biorazgradljiv film hidrolizirane želatine, v kateri je vgrajeno 2,5 mg klorheksidinijevega glukonata. Čip ima obliko nohta (5 x 4 mm) in je debel 0,35 mm. Prednosti uporabe sta biološka razgradljivost in enostavna aplikacija. Čip je samorencijski ter dostavlja učinkovino v koncentraciji 125 g/ml vsaj 7 dni (16). Pri tej koncentraciji klorheksidin uniči 99% subgingivalne mikroflore (17). Študije z uporabo klorheksidinskega čipa so pokazale, da zadržano sproščanje klorheksidina iz etil-celuloznih počasi-sproščujočih dostavnih sistemov učinkovito zmanjšuje število bakterij v žepih vsaj 17 tednov (18,19). Klorheksidinski čip, uporabljen kot adjuktivna terapija luščenju in glajenju korenin, poveča učinek mehanske terapije ter znatno zmanjša globino sondiranja gingivalnih žepov, krvavitev dlesni in izboljša nivo gingivalnega prirastišča (20,21). Tekom zdravljenja naj bi se bolnik izogibal ščetkanju zdravljenih zob. Priporočljiva pa je uporaba klorheksidinske ustne vode dvakrat dnevno, dva tedna. Za najbolj učinkovito uporabo čipa se je izkazala terapija žepov 5mm ali več vsake 3 mesece (zmanjšanje globine sondiranja in števila žepov dlesni nad 5mm ali več).

4.1.1.2 Triklosan (5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi) fenol)

Triklosan, kloriran bisfenol, je najbolj pogosto uporabljena protimikrobna učinkovina v peroralnih proizvodih. Učinkovit je proti glivicam, Gram (+) in večini Gram (-) bakterij ter ima omejeno učinkovitost proti *Pseudomonas spp.* Triklosan ni tako učinkovit antiseptik kot klorheksidin, vendar pa kaže tako protimikrobno kot protivnetno delovanje (inhibira številne pomembne mediatorje vnetja dlesni) (22,23). Njegovo delovanje se izboljša z izboljšanjem same oralne retencije triklosana, z uporabo kopolimerov ali v kombinaciji z drugimi komplementarnimi protimikrobnimi učinkovinami.

V kombinaciji s kopolimerom PVM/MA (polivinilmetileter maleinske kisline) je protimikrobna učinkovitost triklosana povečana, saj naj bi bil povečan privzem triklosana na sklenino in epiteljske celice (24). Triklosan v kombinaciji s PVM/MA značilno zmanjša zobne obloge in gingivitis v primerjavi s placebom (25,26,27). V kombinaciji s silikonskim oljem triklosan značilno zmanjša krvavenje ob sondiranju v primerjavi s samim triklosanom, saj se silikonsko olje adsorbira na trdne površine zob zaradi nizke površinske napetosti (28). Triklosan in ionski detergent natrijev laurilsulfat v ustni vodi značilno zmanjšata nastanek zobnih oblog (29). Sicer tudi ustna voda z 1,5% natrijevim laurilsulfatom zmanjša nastanek zobnih oblog, vendar je prednostno dodajanje triklosana, saj varuje pred tkivnimi poškodbami, ki jih povzroča natrijev laurilsulfat (30). Kombinacija triklosana in cinkovega citrata zmanjšuje nastanek plaka in tako pripomore pri ohranjanju zdravja dlesni (31). Triklosan in cinkov citrat imata skupaj komplementarni in aditivni protibakterijski učinek ter zavirata tvorbo zobnih oblog (zmanjšujeta rast bakterij, inhibirata metabolizem in prevzem glukoze pri bakterijah ter zmanjšujeta ekspresijo virulencnih dejavnikov bakterij – proteaze) (32).

Kombinacija triklosana in cinkovega citrata daje boljše lastnosti v primerjavi s triklosan-kopolimerom v smislu dostave in retencije triklosana na oralnih površinah in na zobnih oblogah (33).

V primerjalni študiji so ugotovili, da je triklosan slabše učinkovit v primerjavi s klorheksidinom ali s cetilpiridinijevim kloridom. Triklosan pri 0,1% daje omejeno inhibicijo plaka in je manj učinkovit kot 0,01% klorheksidin. Vse testirane spojine so bile sicer učinkovitejše od kontrole, vendar pri triklosanu ta razlika ni bila vedno statistično značilna (34).

Pozitivna lastnost uporabe triklosana je varnost ter malo neželenih stranskih učinkov, med katerimi je napogostejši kontaktni dermatitis. Prav tako ne povzroča zabarvanja zob.

4.1.1.3 Kovinske soli

Kovinske soli so baktericidne napram ustnim bakterijam, inhibirajo bakterijske encime in so učinkovite proti nastanku zobnih oblog (35). Kovinski ioni imajo protimikrobno delovanje v naslednjem vrstnem redu $Ag^+ > Cu^{2+} > Sn^{2+} > Zn^{2+} > Al^{3+}$. Kositer se uporablja najpogosteje, navadno v obliki kositrovega fluorida. Kositrove soli v obliki ustnih vod, gelov ali past so učinkovite pri zmanjšanju oblog in gingivitisa. Neželjena učinka uporabe sta zabarvanje zob in motnje okušanja (36). Cinkove soli se tudi pogosto dodajajo v zobne paste ali ustne vode (37). Cink ima prednost pred ostalimi kovinskimi ioni, saj ne povzroča zabarvanosti zob in nima škodljivih sistemskih učinkov ali učinkov na mehka tkiva kot ostali kovinski ioni (38). Zadržuje se v ustni votlini, hkrati pa njegova večkratna aplikacija povečuje koncentracijo cinkovih ionov v zobnih oblogah. Cink ima protimikrobno delovanje in inhibira nastanek zobnih oblog preko številnih inhibitornih mehanizmov (39,40). Inhibira tripsinu podobne proteaze bakterije *Porphyromonas gingivalis*, inhibira glikolizo in nastanek kislin bakterije *Streptococcus mutans* (31).

4.1.1.4 Fluorid

Fluorid je običajno prisoten v zobnih pastah (1.000-1.500 ppm v obliki natrijevega fluorida ali natrijevega monofluorofosfata). Ima predvsem protikariozni učinek, vendar pa ima le majhen učinek na zobne obloge ter komaj opazen protimikrobni učinek. Protikariozni mehanizem poteka preko inhibicije številnih bakterijskih encimov bodisi neposredno ali posredno, s čimer zmanjša hitrost nastajanja kislin v zobnih oblogah po zaužitju ogljikovih hidratov (42). Hkrati vpliva na remineralizacijo in demineralizacijo sklenine. Sub-ppm raven fluorida v slini poveča remineralizacijo sklenine, saj se poveča obarvanje kalcijevih fosfatov in tvorba fluorohidroksiapatita v zobnih tkivih (43). V obliki kositrovega fluorida ali amin fluorida pa ima zaradi nefluoridne komponente molekule znatne antibakterijske lastnosti. Amin naj bi imel površinsko aktivne lastnosti (44) in zavira adhezijo bakterij kot tudi samo rast bakterij. Kositrov fluorid pa deluje antibakterijsko, v večji meri zaradi kositrovega iona, ki je klinično učinkovit (45).

4.1.1.5 Eterična olja

Na tržišču je že več let prisoten proizvod, ki vsebuje mešanico eteričnih olj s timolom, evkaliptolom, metil salicilatom in mentolom. Je zelo učinkovit v preprečevanju nastanka supragingivalnih oblog in gingivitisa (46).

4.1.1.6 Ostali antiseptiki

Ustne vode z aminom in kositrovim fluoridom kažejo enako učinkovitost kot ustne vode z eteričnim oljem pri zmanjšanju nastanka zobnih oblog in pri ohranjanju zdravja dlesni, vendar imajo močnejši antibakterijski učinek (47). V primerjavi s klorheksidinom pa ustne vode z aminom in

kositrovim fluoridom slabše odstranjujejo zobne obloge, vendar povzročijo tudi značilno manjše zabarvanje zob.

Sinergistično delovanje kažeta tudi klorheksidin in baker (inhibicija rasti izbranih oralnih bakterij), in sicer zmanjšata število živih celic za 10- do 100 krat bolj kot ob uporabi samega klorheksidina.

Prihodnja leta bodo prinesla izboljšave pripravkov z antiseptiki. Nove generacije bi lahko vključevale kombinacije že znanih učinkovin, ki delujejo komplementarno in aditivno. S tem bi povečali učinkovitost ter selektivnost antimikrobnih učinkovin.

4.1.2 Protimikrobne učinkovine

Parodontalna bolezen je infekcijskega izvora, povzročena z zobnimi oblogami kompleksne sestave. Nastane z omejenim številom bakterijskih vrst, zato stalno in maksimalno zaviranje nastanka zobnih oblog ni edina rešitev za zdravljenje parodontalne bolezni. Pri posameznikih, ki imajo specifično patogeno infekcijo, je potrebna terapija z učinkovinami, usmerjenimi proti specifičnim patogenom (specifična hipoteza plaka) (48).

Poleg specifičnosti pa je pomembno poudariti, da so lahko nekateri patogeni za mehanske posege nedosegljivi zaradi sposobnosti invazije v tkivo (49) ali pa se nahajajo na mestih, ki so parodontalnim instrumentom nedosegljiva (koreninska razcepišča). Poleg tega pa lahko perzistirajoči patogeni rekolonizirajo zobne površine tudi iz nezobnih področij (hrbtišče jezika, tonzile).

Z ustreznimi učinkovinami lahko terapijo parodontalne bolezni usmerimo le proti posameznim patogenom (zdravilo mora pokazati delovanje in vitro proti patogenemu mikroorganizmu) in na področja, ki mehanskih tehnikam niso dostopna (dokazati je potrebno, da se učinkovita koncentracija zdravila, potrebna za uničenje mikroorganizma, lahko doseže v subgingivalnem okolju brez večjih lokalnih in sistemskih stranskih učinkov za zadosten čas, da signifikantno prizadane patogene).

V ta namen se pri farmakoterapiji parodontalne bolezni uporabljajo ozkospektralni antibiotiki, lahko lokalno ali sistemsko. Ker pa je subgingivalna flora ponavadi mešana (aerobna in anaerobna), je potrebna kombinirana antibiotična terapija.

4.1.2.1 Sistemska protimikrobna terapija

V parodontalni terapiji se v namen sistemskega protimikrobnega zdravljenja uporabljajo učinkovine: tetraciklin, penicilin, klindamicin, metronidazol ter kombinacija metronidazola, amoksisilina in klavulanske kisline.

Indikacije za uporabo sistemske antibiotične terapije so refraktarni parodontitis in agresivni lokalizirani parodontitis ter akutne infekcije (absces dlesni), v nekaterih primerih pa tudi kronični in agresivni parodontitis pri odraslem. Uporaba sistemske antibiotične terapije je priporočljiva tudi pri pacientih teden ali dva po regenerativnih posegih ali po vstavitvi vsadkov, saj je v teh primerih ključnega pomena, da ne pride do infekcij v zgodnjih fazah obnove tkiva. Tudi v nekaterih napredovalih primerih parodontalne bolezni lahko zelo specifične škodljive bakterije odstranimo s kratkotrajno terapijo s sistemskimi antibiotiki. Sistemska protimikrobna terapija je običajna tudi za zdravljenje akutnih infekcij (absces dlesni) ter pred terapijo bolnikov, ki

imajo določena kompromitirana bolezenska stanja (umetna srčna zaklopka, prolaps mitralne zaklopke z regurgitacijo...).

Praviloma pri večini parodontalnih bolezenskih stanj sistemska antibiotična terapija ni potrebna in učinkovita. Potrebno je poudariti, da je učinek antibiotikov kratkotrajen.

4.1.2.2 Nizkodozna sistemska antibiotična terapija

Zanimiv učinek nekaterih antibiotikov je, poleg uničevanja bakterij, ki povzročajo parodontalne bolezni, zmanjšanje telesne produkcije kolagenaze. Kolagenaza je encim, ki je med drugim potreben pri odstranjevanju starih tkiv in nadomestitvi z novimi tkivi. Njeno prekomerno nastajanje, ki je prisotno pri parodontalnih boleznih, pa uničuje tkivo dlesni. Antibiotik doksiciklin pri nizkih odmerkih, ki ne delujejo antibiotično, zavira učinke kolagenaze. Hkrati pa sta prednosti majhnih doz antibiotikov manjša možnost razvoja rezistence in manj stranskih učinkov.

4.1.2.3 Lokalna antimikrobna terapija

Lokalna dostava antimikrobnih učinkovin je rezultat več kot 20-letnega pionirskega raziskovalnega dela Goodsona iz raziskovalne ustanove Forsyth Dental Research Center. Cilj je dostava visokih koncentracij antibiotikov ali antimikrobnih učinkovin neposredno na mesto parodontalne okužbe. Dosežene koncentracije so znatno večje kot pri sistemski terapiji, pri čemer je sistemska dostava minimalna.

V uporabi so tetraciklinsko vlakno, klorheksidinski čip, doksiciklinski polimer, metronidazolski gel, minociklinsko mazilo.

a. Tetraciklinsko vlakno

Tetraciklinsko vlakno gradi polimer polietilen vinil acetata, ki je 25% nasičen s tetraciklinom. Vlakno je dolgo 23 cm in ima premera 0,5 mm ter vsebuje 12,7 mg tetraciklina. Vlakno je fleksibilno in ga zlahka vstavimo v parodontalni žep, ki ga skoraj povsem zapolni ter enakomerno sprošča učinkovino 14 dni. V primerjavi s sistemsko dostavo tetraciklina, je pri vlaknu koncentracija tetraciklina v tekočini dlesni 1590 g/ml napram 4 do 8 g/ml pri sistemski dostavi, medtem ko je serumska koncentracija 0,4 g/ml in manj napram 2 do 4 g/ml pri sistemski dostavi. Celokupni odmerek po desetih dnevih zdravljenja je 12,7 mg napram 10.000 g pri sistemski dostavi. Tekom zdravljenja naj bi se bolnik izogibal ščetkanju zdravljenih zob. Priporočljiva pa je uporaba klorheksidinske ustne vode dvakrat dnevno do enega tedna po odstranitvi vlaken (vlakna pustimo deloveti 7-14 dni). Terapija s tetraciklinskim vlaknom se je izkazala za učinkovitejšo glede globine sondiranja žepov dlesni, nivoja kliničnega prirastišča dlesni in krvavitve dlesni v primerjavi z luščenjem in glajenjem korenin (50). Optimalna mesta za uporabo tetraciklinskih vlaken so parodontalni žepi z globino sondiranja 5mm ali več, ki krvavijo ob sondiranju in se niso odzvala na mehansko terapijo.

b. Doksiciklinski polimer

Tekoč biorazgradljiv dostavni sistem (10% doksiciklin hiklat) trdi v parodontalnem žepu in omogoča kontrolirano sproščanje vgrajenega doksiciklina. Doksiciklin se tik pred aplikacijo zmeša s tekočim polimerom ter injicira v žep, ki se nato zapre s cianoakrilatom. Tekom zdravljenja naj bi se bolnik izogibal ščetkanju zdravljenih zob. Priporočljiva pa je uporaba klorheksidinske ustne vode. Doksiciklin je

bil izbran zaradi mehanizma delovanja, t.j. učinkovitosti proti številnim parodontalnim patogenom, zaradi česar je učinkovit pri zdravljenju parodontitisa (51,52,53). Doksiciklin znatno zmanjšuje globino sondiranja in krvavitev ob sondiranju. V primerjavi z luščenjem in glajenjem korenin dosega 100% rezultate luščenja in glajenja glede nivoja kliničnega prirastišča dlesni ter globine sondiranja (54).

c. Metronidazolski gel

Metronidazolski gel vsebuje 25% metronidazola. V žepe dlesni se nanese z injekcijo in topo kanilo. Sistem je biorazgradljiv, vendar pa zahteva večkratne aplikacije. Učinkovitost zdravljenja se je v številnih študijah izkazala za primerljivo luščenju korenin (55,56).

e. Minociklinsko mazilo

Minociklinsko mazilo vsebuje 2% minociklinskega hidroklorida. V žepe dlesni se nanese z injekcijo in topo kanilo. Zaradi biorazgradljivosti so potrebne večkratne aplikacije učinkovine. Minociklin je učinkovit pri uničevanju bakterij, ki naj bi povzročale parodontalne bolezni. Učinkovito zmanjšuje globino sondiranja, krvavitev ob sondiranju in izboljšuje nivo kliničnega prirastišča. Minociklinsko mazilo, kot adjuktivna terapija po luščenju in glajenju korenin, je bolj učinkovito kot pa izpiranje ust po luščenju in glajenju korenin (57).

Potrebno je poudariti, da uporaba lokalnih antimikrobnih učinkovin ne bo nadomestila terapevtske potrebe po temeljtem luščenju in glajenju korenin, ki ostaja najpomembnejša modalnost v parodontiki. Tetraciklinsko vlakno se priporoča za uporabo pri ponovnem pregledu, 4-6 tednov po luščenju in glajenju korenin, kadar so žepi še vedno večji kot 5 mm in krvavijo pri sondiranju. Doksiciklinski polimer in metronidazolski gel pa bi se lahko uporabljala kot nadomestilo luščenju in glajenju korenin.

Vsi primeri vnetnega parodontitisa niso primerni za lokalno zdravljenje. Kadar konvencionalna mehanska terapija ni povsem učinkovita, je potrebno dodatno in bolj agresivno zdravljenje. V primeru, ko po luščenju in glajenju korenin ostanejo lokalizirana mesta, ki se niso odzvala, je primerna uporaba kontroliranih lokalnih dostavnih sistemov. V primeru, da ostane prizadetih več zaporednih zob, pa je najverjetneje parodontalna operacija najučinkovitejša metoda. Ustrezna alternativa pri atipičnem parodontitisu (številna prizadeta mesta v vseh kvadrantih, ki ne odgovarjajo na mehansko terapijo) je tudi sistemsko zdravljenje z ustreznim antibiotikom, po laboratorijskem testiranju za prisotnost mikrobov.

Periimplantitis in parodontalni abscess sta tudi primerni indikaciji za uporabo lokalne antibiotične terapije. Nerazgradljivo tetraciklinsko vlakno omogoča ustrezno drenažo abscesa, hkrati pa dostavlja visoke koncentracije tetraciklina v sam absces.

Za izbor ustreznega dostavnega sistema je potrebno upoštevati učinkovitost učinkovin, njihovo dostopnost, težavnost rokovanja z njimi in stroške.

4.1.3 Antibakterijski peptidi

Možna alternativa antibiotikom so antibakterijski peptidi. Nekateri derivati antibakterijskih peptidov so že prešli faze razvoja, vključno humane klinične študije faze I-III. Uporaba humanih antibakterijskih peptidov kot zdravil doslej še ni zaživela, in sicer zaradi do sedaj še

neznanih bioloških funkcij teh molekul in velikih stroškov masovne proizvodnje (58).

Antibakterijski peptidi so raznolike skupine molekul z majhno molekulske maso (59), dolge od 6 do 50 aminokislin (60,61), s širokim spektrom baktericidnega in fungicidnega delovanja, zato jih imenujemo tudi naravni antibiotiki (62). Kljub širokemu spektru delovanja je njihova citotoksičnost do normalnih sesalskih celic zelo nizka.

Vloga antibakterijskih peptidov pa ni samo antimikrobno delovanje, ampak tudi povezovanje mehanizmov prirojene in pridobljene obrambe organizma (59). Nevretenčarji imajo le prirojeno imunost, pri vretenčarjih pa je obrambni mehanizem odvisen tako od prirojene kot od pridobljene imunosti (63). Antimikrobni peptidi so del prirojene imunosti pri nevretenčarjih, pri vretenčarjih pa dopolnjujejo pridobljeno imunost, saj so prva obramba pri vdoru patogenov (64). Hkrati so tudi del mehanizmov prirojene imunosti kot biosinteza antimikrobnih peptidov. Odvisno od organizma so prisotni konstitutivno znotraj sekretornih celic ali pa nastanejo inducibilno pri infekciji (63). Antimikrobni peptidi sodelujejo pri nekaterih aktivnostih imunskega sistema kot so pospeševanje akutnega vnetnega odziva (59).

Majhne koncentracije peptidov bi se lahko vezale na tkiva ter preprečile vezavo bakterij. Ta koncept so testirali v primerjalni študiji antibakterijskega peptida nisina in klorheksidina, ki je pokazala, da je nisin učinkovit pri odstranjevanju zobnih oblog in ne povzroča zabarvanja zob (65).

4.1.4 Genska terapija

Genska terapija v parodontiki še ni bila sprejeta z uspehom, primarno zaradi nepopolne tehnologije genske terapije, sekundarno pa ker je parodontalna bolezen posledica večih dejavnikov; mikrobne infekcije in gostiteljevega imunskega odgovora, modificirano z genskimi in okoliškimi dejavniki. Hkrati gre pri genetiki za probleme z genskimi variacijami pri različnih populacijah (multipli geni, interakcije med geni in okoljem, odsotnost določenega gena kot univerzalno priznani vzročni dejavnik). Trenutno je genska terapija na nivoju kliničnih raziskav na živalskih modelih in poteka v smeri spreminjanja gostiteljevega imunskega odgovora ter specifičnih parodontalnih patogenov.

Genska terapija poteka z vstavljanjem terapevtskega gena v pacientovo tarčno celico preko nosilne molekule oziroma vektorja. Najpogosteje uporabljen vektor je virus, ki je gensko spremenjen in nosi normalno človeško DNA. Klinična aplikacija genskega prenosa poteka lahko *in vivo* ali *ex vivo*. Omejitve genske terapije pa so kratkotrajnost same terapije, imunski odgovor pacienta, problemi z virusnimi vektorji, stroški in etični razlogi.

Rekonstruktivna kirurgija (autogeni ali alografitni vsadki) je za bolnika s signifikantno alveolarno izgubo kosti prednostna pred izgubo zoba, vendar je izid nepredvidljiv. Genska terapija poskuša uporabiti telesu lasten mehanizem tvorbe kosti z vnašanjem terapevtskega proteina v regenerativno mesto. Študije izvedene na živalih so obetavne, vendar bo pred razvojem genske terapije potrebno rešiti številne probleme povezane s prenosom genov.

a. Tkivno inženirstvo

Strategija tkivnega inženirstva je vstaviti terapevtski rastni faktor v regenerativno mesto. Vnos lahko poteka z *ex vivo* genskim prenosom

v tkivnih kulturah in nadaljnjim priraščanjem celic, ki izražajo terapevtski gen. Številne celice, kot so ne-osteogeni fibroblasti (iz dlesni in zobne pulpe), keratinociti, mioblasti, osteoblasti, po adenovirusnem vnosu izražajo BMP-7 in BMP-9 gen (BMP, bone morphogenic protein so multifunkcionalni rastni dejavniki) in so sposobne diferencirati v osteocite pri vstavitvi v kostno okvaro *in vivo*.

Adenovirusni vnos gena *in vivo* v okvarjeno kostno tkivo omogoča popravke kostnih okvar v razmeroma kratkem času. Mezenimske izvorne celice so pluripotentne izvorne celice in po genskem inženirstvu ter vnosu v kostni defekt z ekspresijo BMP-2 inducirajo novo kost v kostni okvari *in vivo*.

PDGF (ang. platelet derived growth factor) ima močan učinek na regeneracijo trdih in mehkih tkiv. Indukcija proliferacije je dosežena pri podaljšanem izpostavljenosti (> 7 ur) PDGF, ki pa nam jo omogoča adenovirusni sistem vnosa gena.

Tudi *in vivo* vnos gena za kostni sialoprotein v kostni defekt omogoča uspešno regeneracijo parodontalne alveolne kosti.

Nov način vnosa genov predstavlja vgradnja intaktne DNA v polimere, ki se lahko uporabijo kot obloge na vstavljenih pripravah kot so parodontalni implantati (položajno specifična genska terapija). Tovrstna genska sredstva bi lahko izboljšala biokompatibilnost parodontalnih implantatov.

Kostno remodeliranje učinkovito izboljša tudi *in vivo* vnos genov za številne proteine, ki sodelujejo pri remodeliranju z metodo elektroporacije.

b. Cepiva

Injiciranje plazmida z genom za fimbrialni protein bakterije *Porphyromonas gingivalis* v tkivo žleze slinavke sproži nastanek IgG in IgA protiteles, ki lahko neutralizirajo *P. gingivalis* ter omejijo njeno pritrjevanje in nastanek zobnih oblog. Znanstveniki so tudi dokazali učinkovitost cepljenja z gensko spremenjenim vektorjem *Streptococci gordonii*, ki izraža fimbrialni antigen *P. gingivalis*. Cepljenje z rekombinantnim hemaglutininom B, pomembnim virulentnim dejavnikom *P. gingivalis*, sproži produkcijo IgG protiteles ter IL-2, IL-10 in IL-4, kar zagotovi zaščito pred izgubo kosti.

Druge strategije prihodnosti genske terapije parodontalne bolezni so še genski pristop do antibiotične rezistence biofilma, antimikrobna genska terapija, vpliv genske terapije na adherenco bakterij, genska terapija v smeri laboratorijske rasti novih zob, razvoj genskih zdravil itd.

Lahko predvidevamo, da bo v prihodnosti genski pristop predstavljal vedno večji delež pri terapiji kot tudi preventivi parodontalnih bolezni. Za zdravnike dentalne medicine kot tudi farmacevte je pomembno, da sledijo napredku znanosti tako na področju biotehnologije in genskega inženirstva kot tudi dostavnih sistemov za lokalno zdravljenje parodontalnih bolezni, ki lahko bistveno pripomorejo k sami preventivi ter izboljšanju učinkovitosti kirurškega zdravljenja.

5 Literatura

- Oh TJ, Eber R, Wang HL. Periodontal diseases in the child and adolescent. J Clin Periodontol 2002, 29: 400-410.

- Witt J, Ramji N, Gibb R, Dunavent J, Flood J, Barnes J. Antibacterial and Antiplaque Effects of a Novel, Alcohol-Free Oral Rinse with Cetylpyridinium Chloride. J Cotemp Dent Pract, 2005; 6: 1-10.
- Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology: Academy Report. Epidemiology of Periodontal Diseases J Periodontol 2005, 76:1406-1419.
- Research, Science, and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology. The Pathogenesis of Periodontal Disease. J Periodontol 1999, 70: 457-470.
- American Academy of Periodontology-Research, Science and Therapy Committee. Threatment of Plaque-induced Gingivitis, Chronic Peridontitis, and Other Clinical Conditions. Endorsed by the American Academy of Pediatric Density 2004, 169-178.
- Frias J, Olle E, Alsina M. Periodontal Pathogens produce Quorum Sensing Signal Molecules. IAI 2001, 3432-3434.
- Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal menifestation of sistemmc disease. Aust Den J, 2001, 46:2-12.
- Tamaki Y, Nomura Y, Takeuchi H, Ida H, Arakawa H, Tsurumoto A, Kumagai T, Hanada N. Study of the clinical usefulness of a dental drug system for selective reductions of mutans streptococci using a case series. J Oral Sci 2006, 48:111-116.
- Bouwsma OJ. The status, future, and problems of oral antiseptics. Curr Opin Periodontol 1996, 3:78-84.
- Flotra L. A 4-month study on the effect of clorhexidine mouth washes on 50 soldiers. Scand J Dent Res 1972,80:10-17.
- de la Rosa M. The use of clorhexidine in the management of gingivitis in children. J Periodontol 1988,59:387-389.
- Brecx M. Efficacy of Listerine, Meridol and clorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. J Clin Periodontol 1990, 17:292-297.
- Barkvall P, Rolla G, Svendsen AK. Interaction between clorhexidine digluconat and sodium lauryl sulfate in vivo. J Clin Periodontol 1989, 16:593-595.
- Addy M, Jenkins S, Newcombe R. Studies on the effects of toothpaste rinses on plaque regrowth: 1. Influence of surfactants of clorhexidine efficacy. J Clin Periodontol 1989, 16:380-384.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effects of 0,5% clorhexidine and 0,2% triclosan containing toothpastes on salivary bacterial counts. J Clin Periodontol 1990, 17:85-89.
- Killoy WJ, Polson AM. Controlled local delivery of antimicrobials in the treatment of periodontitis. Advan in Perodont 1998, 42: 263-283.
- Wilson M, Stanley A, Bansal G. Effect of the Phenoxyethanol, clorhexidine and their combination on subgingival plaque bacteria. J Antimicrob Chemother 1990, 25:921.
- Soskolne A, Golomb G, Friedman M. New sustained release dosage form of clorhexidine for dental use: II. Use in periodontal therapy. J Periodont Res 1983, 18:330.
- Stabholz A, Sela MN, Friedman M. Clinical and microbiological effects of sustained release clorhexidine in periodontal pockets. J Clin Periodontol 1986, 13: 783.
- Soskolne WA, Heasman PA, Stabholz A. Sustained local delivery of clorhexidine in the treatment of periodontitis: A multi-center study. J Periodontol 1997, 68:32.
- Jeffcoat M, Palcanis K, Offenbacher S. Multicenter evaluation of a biodegradable clorhexidine /gelatin chip for the treatment of adult periodontitis. J Dent Res 1997, 76: 152.
- Gaffar A; Afflitto J, Nabi N. Chemical agents for the control of plaque and gingivitis: an overview. Eur J Oral Sci 1997, 105: 502-507.
- Gaffar A, Scherl D, Afflitto J et al. The effect of Triclosan on mediators of gingival inflammation. J Clin Periodontol 1995, 22:480-484.
- Nabi N. In vitro and in vivo studies on triclosan/PVM/MA copolymer NaF combination as an antiplaque agent. Am J Dent 1989, 2: 197-206.
- Palomo F. Plaque/gingivitis effect of triclosan dentifrices, J Dent Res 1993, 72: 334.
- Triratana T. Plaque/gingivitis effect of a triclosan/copolymer dentifrice. J Dent Res 1993, 72: 334.
- Linde J. The effect of a triclosan-containing dentifrice on establishment plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 1993, 20: 327-334.

28. Roll G, Gaare D, Ellingsen JE. Experiments with a toothpaste containing polymethylsiloxan/triclosan. *Scand J Dent Res* 1993, 101:130-132.
29. Waaler SM. Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulfate on dental plaque formation: a pilot study. *Scand J Dent Res* 1993, 101: 192-195.
30. van der Ouderaa FJ, Cummins D, Hull DMC. Use of Triclosan for the Manufacture of a medicament for the treatment of Periodontitis. 1993. European patent application number 92202287.6.
31. Marsh PD. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspect. *J Clin Periodontol* 1991, 18: 462-467.
32. Cummins D. Zinc citrate/Triclosan: a new antiplaque system for the control of plaque and the prevention of gingivitis: short term clinical and mode of actions studies. *J Clin Periodontol* 1991, 18_ 455-461.
33. Creeth JE, Abraham PJ, Barlow JA et al. Oral delivery and clearance of antiplaque agents from Triclosan-containing dentifrices. *Int Dent J* 1993, 43_ 387-397.
34. Jenkins S, Addy M, Nowcombe RG. A comparison of a cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque growth. *J Clin Periodontol* 1994, 21:441-444.
35. Marsh PD. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspect. *J Clin Periodontol* 1991, 18: 462-467.
36. Jackson RJ. Metal salts, essential oils and phenols-old or new? *Periodontol* 2000, 1997 15, 63-73.
37. Stadler P, Holler H. Toothpastes. *Int J Clin Pharm&Therapeutics* 1992. 30: 167-172.
38. Mandel ID. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 1988, 15: 488-498.
39. Gjermo P, Saxton CA. Antibacterial dentifrices. Clinical data and relevance with emphasis on zinc/Triclosan *J Clin Periodontol* 1991, 18: 468-472.
40. Phan TN, Buckner T, Sheng J, et al. Physiological actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Infect Immun*
41. Watson GK, Cummins D, van der Ouderaa FJG. Inhibition of acid production by *Streptococcus mutans* NCTC-10449 by zinc and effect of metal speciation. *Caries Res* 1991 25: 431-437.
42. Marsh PD. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspect. *J Clin Periodontol* 1991, 18: 462-467.
43. ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand* 1999, 57: 325-239.
44. Scheie AA. Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than chlorhexidine. *J Dent Res* 1989, 68: 1609-1616.
45. Gaffar A, Afflitto J, Nabi N. Chemical agents for the control of plaque and gingivitis: an overview. *Eur J Oral Sci* 1997, 105: 502-507.
46. Ross NM, Charles CH. Long term therapy of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. *J Clin Dent* 1989, 1: 92-95.
47. Zimmerman A. Gingivitis, plaque accumulation and plaque composition under long-term use of Meridol. *J Clin Periodontol* 1993, 20:346-351.
48. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res* 1979, 58:2404-12.
49. Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci* 2007, 12:3965-74.
50. Goodson JM, Cugini MA, Kent RL. Multi-center evaluation of tetracycline fiber therapy: I. Experimental design, methods, and baseline data. *J Periodont Res* 1997, 26:361.
51. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodontol* 1983, 54:580.
52. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity: A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodont Res* 1984, 19:651.
53. Gordon JM, Walker CB. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993, 64:760.
54. Garrett S, Adams D, Bandt C. Two multicenter clinical trials of subgingival doxycycline in the treatment of periodontitis. *J Dent Res* 1997, 76:153.
55. Klinge B, Attstrom & Karring T. 3 regimens of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults. *J Clin Periodontol* 1992, 19:708.
56. Pedrazzoli V, Killian M, Karring T. Comparative clinical and microbiological effects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. *J Clin periodontol* 1992, 19:751.
57. Nakagawa T, Yamada S, Oosuka Y. Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocline) following scaling and root planing in recurrent periodontal pockets. *Bull Tokyo Dent Coll* 1991, 32:63.
58. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 14614-14619.
59. Devine DA, Hancock REW. Cationic Peptides: Distribution and Mechanisms of Resistance. *Curr Pharm Des.* 2002, 8: 703-714.
60. Hwang PM, Vogel HJ. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 1998, 76: 235-246.
61. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? www.nature.com/reviews/micro, 2005, 3: 238-250.
62. Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology.
63. Bulet P, Stokli R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 2004, 198: 169-184.
64. Metz-Boutigue MH, Kieffer AE, Goumon Y, Lugardon K, Aunis D. Study of new antimicrobial peptides in cromaffin granules from bovine adrenal medulla: new aspects of innate immunity. *Cell Biology of the Cromaffin Cell* 2004, 129-1.
65. Howel TH, et al. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagledogs. *J Clin Periodontol* 1993, 20:335-339.

34. skupščina SFD

Jelka Dolinar

25 let je Slovensko farmacevtsko društvo organiziralo simpozije ob rednih letnih skupščinah v Avditoriju v Portorožu. Prvega na temo »Alergija in zdravila« leta 1983. V tem obdobju je lokacijo zamenjalo samo trikrat. Preselitev simpozija iz Avditorija v portoroški Bernardin je vodila želja po spremembi, ki bo hkrati omogočila ustrežno kakovost konferenčnih prostorov in storitev. Organizatorji, pa tudi udeleženci simpozija in razstavljalci, so bili s kongresnim centrom Bernardin zadovoljni.

V treh dneh srečanja so se zvrstile tri teme. Interaktivno vključevanje udeležencev v obravnavo praktičnih kliničnih primerov na temo AKUTNE BOLEČINE, se je tudi tokrat izkazalo kot učinkovit način za spodbujanje razprave. Satelitski simpozij je pripravil in vodil prof. dr. Aleš Mrhar. Glavna tema ZDRAVILA V ONKOLOGIJI IN PREHRANA ONKOLOŠKIH BOLNIKOV, ki jo je povezoval prof. dr. Borut Štrukelj je potekala v petek, 8. maja. Zadnji dan srečanja je bil na programu satelitski simpozij VLOGA IN UGLED LEKARNIŠKE SLUŽBE, kjer smo, kljub spodbudam moderatorja simpozija doc. dr. Aleša Mlinariča, zaman pričakovali živahno razpravo. Natrpan program prvih dveh dni je vplival na slabši odziv.

Srečanje smo zaključili z redno letno skupščino, na kateri so prisotni potrdili poročila o delu in poslovanju ter poročilo nadzornega odbora, dali razrešnico dosedanjim organom SFD ter sprejeli predlog manjših sprememb in dopolnitev temeljnega akta SFD.

V razpravi so delegati pozvali k intenzivnejši vlogi društva pri obravnavi sprememb in dopolnitev Zakona o zdravstveni dejavnosti, ki lahko bistveno vpliva na položaj stroke in poklica v zdravstvenem sistemu. Sprejet je bil sklep o sodelovanju predstavnikov Društva s Fakulteto za farmacijo in Lekarniško zbornico Slovenije pri pripravi pripomb na omenjeni zakon.

Razprava na skupščini je ponovno iznesla problematiko Farmakona. Neredno izhajanje ni le posledica težav z usklajevanjem vsebin znotraj uredniškega odbora, pač pa tudi premajhnega interesa strokovnjakov za pisanje prispevkov iz klinične prakse. Skupščina je podprla idejo o publiciranju druge oblike informativnega biltena v povezavi s FIC-em.

Za predsednika društva v mandatnem obdobju 2009-2011 je bil ponovno izvoljen dr. Gašper Marc. V naslednjem dveletnem obdobju si bo še naprej prizadeval za večjo prepoznavnost stroke v javnosti in za povezovanje vseh struktur v farmaciji.

Skupščina se potrdila tudi članarino za leto 2010, ki bo znašala za zaposlene farmacevte 32 €, za tehnike 25 €, za študente in seniorje pa 15 €.

Organi društva

mandat 2009 - 2011

izvoljeni na 34. skupščini SFD

Predsednik SFD	Gašper Marc
IZVRŠNI ODBOR	
(člani so bili potrjeni na občnih zborih)	
Podružnice	
Celjska podružnica	Marina Urbanc Mokotar
Dolenjska podružnica	Marjan Balkovec
Gorenjska podružnica	Tina Bukovec Kosmač
Ljubljanska podružnica	Tatjana Kogovšek Vidmar
Mariborska podružnica	Matjaž Tuš
Pomurska podružnica	Damir Domjan
Posavska podružnica	Alenka Koritnik
Primorska podružnica	Karolina Žvanut
Zasavska podružnica	Sabina Drobnič
Sekcije	
Homeopatska sekcija	Maruša Hribar – predsednica Tanja Šegula – članica IO
Sekcija bolnišničnih farmacevtov	Tajda Gala Miharija
Sekcija farmacevtskih tehnologov	Jernej Zadnik
Sekcija farmacevtskih tehnikov	Zdenko Taušič
Sekcija farmacevtskih znanosti	Aleš Obreza
Sekcija kliničnih farmacevtov	Nataša Faganeli
Sekcija farmacevtov javnih lekarn	Nina Pisk
Sekcija seniorjev	Lovro Dermota
Sekcija študentov	Petra Soršak
Sekcija za farmacevtsko kemijo	Lucija Peterlin Mašič
Regulatorna sekcija	Simona Cencelj
Nadzorni odbor	
Janez Kerč, Dionizij Petrič, Jasna Majdič	
Disciplinsko sodišče	
Aleš Krbavčič, Ivan Remškar, Darja Frankič	
Odbor za podeljevanje društvenih priznanj	
Aleš Mrhar, Franc Vrečer, Zofija Vitkovič, Martina Klanjšček, Breda Kosirnik, Slavko Rataj, Lovro Dermota	
Izdajateljski svet	
Mirjana Gašperlin, Anamarija Zega, Katja Razinger, Mojca Prah Klemenčič, Tanja Šegula, Mira Abazovič, Sonja Rupret	

Društvena priznanja za leto 2009

Aleš Mrhar, predsednik Odbora za podeljevanje društvenih priznanj



Prejemniki društvenih priznanj za leto 2009, skupaj s predsednikom SFD dr. Gašperjem Marcem (skrajno desno) in predsednikom Odbora za podeljevanje društvenih priznanj prof. dr. Alešem Mrharjem (skrajno levo)

Na 34. skupščini so društvena priznanja prejeli

Minařikovo odličje

prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.



Prof. dr. Aleš Mrhar je predstavil utemeljitev za podelitev Minařikovega odličja prof. dr. Borutu Štruklju.

Minařikova priznanja

Karmen Ambrožič Štefe, mag. farm. • doc. dr. Saša Baumgartner, mag. farm. • mag. Milena Beravs, mag. farm. Smiljana Bürgermeister, mag. farm., spec. • Simona Cencelj, mag. farm. • Tomislav Džankić, mag. farm., spec. mag. Mihael Florjanič, mag. farm. • Borislav Jagodič, mag. farm. • Silva Jenko, mag. farm., spec. • Marta Jericijo Valnea Jurečič, mag. farm. • doc. dr. Aleš Mlinarič, mag. farm.



Prejemniki društvenih priznanj za leto 2009 – v prvi vrsti Tartinijevega gledališča



Nastop Anje Bukovec na slavnostni podelitvi društvenih priznanj za leto 2009 v Tartinijevem gledališču

Utemeljitelj

Magistra **Karmen Ambrožič Štefe** s svojim strokovnim znanjem dopolnjuje zdravnikovo delo v dobro pacienta in s tem ustvarja dodano vrednost v lekarni, ko jo vodi. Ker se pacienti, ki vedo, da bodo v lekarni poleg izdelka (zdravila) dobili tudi storitev (nasvet), v to lekarno vračajo, lahko rečemo, da magistra Ambrožič v praksi udejanja princip izbrane lekarne. V raziskovalni nalogi z naslovom Sodelovanje med zdravniki in farmacevti, ki jo je predstavila na kongresu FIP 2002 v Nici, je povzela svoje izkušnje in prizadevanja na tem področju ter opozorila na nujnost izboljšanja tega sodelovanja v luči varnosti in učinkovitosti terapije. Kot predsednica regijskega Sindikata farmacevtov SIFARM Gorenjske aktivno sodeluje v timu, ki si prizadeva doseči ustrezno vrednotenje poklica farmacevta kot nosilca zdravstvene dejavnosti.

Izr. prof. dr. **Saša Baumgartner** je v slovenski farmacevtski stroki postala prepoznavna preko svojih aktivnosti v SFD. Kot predsednica Sekcije farmacevtskih tehnologov je uspešno organizirala tri letne simpozije sekcije z aktualnimi vsebinami za lekarniško in industrijsko farmacijo, bistven pa je bil njen prispevek pri organizaciji lanskoletnega 7. Centralno evropskega simpozija iz farmacevtske tehnologije in biodostavnih sistemov. Kot generalna sekretarka simpozija je z visoko motiviranostjo in vztrajnostjo predvsem pa z veliko mero človečnosti zaslužna za velik uspeh simpozija, tako po rekordnem številu udeležencev kot tudi po znanstveni relevanci. S tem simpozijem in z aktivnostmi v svojstvu univerzitetne profesorice je postala prepoznavna tudi v mednarodnem znanstvenem okolju, kar je odločilnega pomena za promocijo slovenske znanstvene misli. Sodeluje tudi v delovni skupini, ki pripravlja nacionalni dodatek k evropski farmakopeji Formularium Slovenicum in skupaj s slovaropisnimi strokovnjaki ZRC SAZU v skupini za pripravo slovenskega terminološkega slovarja. Obe aktivnosti prispevata h krepitvi vloge in pomena slovenskega jezika v farmacevtski stroki in znanosti.

Magistra **Milena Beravs** svojo profesionalno kariero posveča lekarniški delu v Zasavskih lekarnah, kjer je vodila tako bolnišnično kot tudi javno lekarno in si vseskozi prizadeva za povezanost bolnišničnega in lekarniškega farmacevta. Od leta 1979 kot direktorica vodi Javni zavod Zasavske lekarne. S svojim dolgoletnim uspešnim sodelovanjem z organi lokalne skupnosti in sekcijo javnih zavodov v okviru Lekarniške zbornice Slovenije je uspela promovirati pomen farmacevta tako v strokovni

kot laični javnosti in potrebo po permanentnem strokovnem izobraževanju in sodelovanju z zdravniki v svojem okolju. Bila je pobudnica in ustanoviteljica Zasavske podružnice SFD, ki jo je štiri mandate vodila kot predsednica. Opravljala je tudi funkcijo podpredsednice SFD in tožilke LZS. Magistra Beravs si aktivno prizadeva za pravično ovrednotenje ter ustrezno družbeno priznanje farmacevtskega poklica.

Magistra **Smiljana Buergermeister** je uspešno vodila centralni galenski laboratorij Pomurskih lekarn, za tem pa tudi kontrolno analizi laboratorij, kjer je bila zadolžena za organizacijo, nabavo opreme in uvajanje postopkov za vrednotenje farmacevtskih surovin in izdelkov. V Pomurskih lekarnah je uvedla pravila dobre laboratorijske prakse v lekarniških enotah ter vodenje dokumentacije in sledljivost strokovnega dela. Od 1997 do 2006 je vodila Galex d.d., ki je znana farmacevtska družba doma in v tujini, sedaj pa deluje kot strokovna direktorica. S svojim delom je bistveno pripomogla k razvoju farmacije v Pomurju, s tem pa tudi h krepitvi intelektualne in materialne baze pomurske regije.

Magistra **Simona Cencelj** si je vseskozi v svoji karieri prizadevala za uveljavitev visokih strokovnih standardov v farmaciji, sprva na področju zagotavljanja kakovosti v klinični praksi, kasneje pa pri uveljavljanju zakonodaje o zdravilih v praksi. Leta 2004 je dala pobudo za ustanovitev Regulatorne sekcije pri SFD, ki jo s kratko prekinitvijo ves čas tudi vodi. S tem je udeležila svojo željo, da poveže znanje, izkušnje in strokovnost farmacevtov, zaposlenih v različnih podjetjih in v okviru regulatorne sekcije, ki se je v teh letih razvila v enakopravnega sooblikovalca sodobne slovenske zakonodaje o zdravilih in dobre regulatorne prakse zakonodajnih organov. S svojim delom je dokazala, da je mogoče s konstruktivnim pristopom izboljšati regulatorne postopke in posledično omogočiti boljše preskrbljenost slovenskega trga z zdravili ter njihovo racionalno uporabo. Njeno delo je vzpodbuda vsem farmacevtom, da naredijo korak naprej za prepoznavnost in cenjenost farmacevtskega poklica.

Magister **Tomislav Džankić** je zaslužen za pomemben prispevek pri ohranjanju tradicije lekarništva, za napredek pri laboratorijski in polindustrijski izdelavi zdravil skladno z načeli dobre laboratorijske prakse ter za vzdrževanje poslovnih odnosov, še bolj pa strokovnih povezav med kolegi v Sloveniji in v bivši Jugoslaviji. Kot dolgoletni vodja galenskega laboratorija Mariborskih lekarn je skrbel za izpopolnjevanje izdelkov v vsebinskem in tehnološkem smislu,



Izr. prof. dr. Saša Baumgartner



Doc. dr. Aleš Mlinarič



Mag. Milena Beravs

pripravljaj pa je tudi vademekume, s čimer je širil strokovnost in prepoznavnost svojega zavoda. Kot rezultat njegovega dela so Mariborske lekarne kot prvi javni zavod pridobile standard SIST ISO 9001/95. S svojim delom je posredno vplival na nastanek novih galenskih laboratorijev v Zenici in na Reki.

Magister **Mihael Florjanič** je vodja službe za industrijsko lastnino v tovarni zdravil Krka. Kot tehnolog v proizvodnji se je na začetku kariere ukvarjal z Dobro proizvodno prakso, našel pa tudi čas za delo v SFD. En mandat je vodil Dolenjsko podružnico, kasneje pa je postal predsednik NO. Kot strokovnjak, ki je pripravljen deliti in prenašati svoje znanje na druge, se je izkazal tudi kot odličen mentor ter predavatelj doma in v tujini. Izkušnje v proizvodnji je nadgradil z delom na področju razvoja novih kemijskih tehnologij in njihovem prenosu v proizvodnjo. Je avtor več patentov in soavtor prve objave kristalne strukture polimorfa famotidina. Svojo pot je nadaljeval kot projektni vodja v farmacevtskem razvoju, kjer je povezoval in koordiniral aktivnosti na področju Krkinih kinolonov, kar je utrla pot Krkinim zdravilom na trge zahodne Evrope. Zaradi obsežnega znanja, izkušenj s področja kemije in farmacije je v prelomnem obdobju, ko je Slovenija med prvimi državami izven Evropske unije pristopila k Evropski patentni konvenciji, prevzel vodenje Službe za industrijsko lastnino in ima veliko zaslug za zgodnjo prilagoditev Krke na zahteve nove patentne zakonodaje, kar je zaščitilo Krkino znanje. To je omogočilo uspešno prilagoditev poslovanja Krke na zahteve najrazvitejših evropskih tržišč. Sodeluje v mednarodnem združenju za industrijsko lastnino AIPPI in pri evropskem združenju generičnih proizvajalcev EGA. Je eden redkih farmacevtov v evropskem in svetovnem merilu, ki se udelejuje na področju industrijske lastnine.

Magister **Borislav Jagodič** se je z društvenimi aktivnostmi srečal že v času študija, ko se je kot predstavnik slovenskih študentov farmacije udeležil kongresa na Švedskem in tako sodeloval pri začetkih mednarodnih izmenjav. Po končanem študiju farmacije se je zaposlil v Celjskih lekarnah kot farmacevt receptar, nekaj časa je vodil lekarno Gregorčičeva, kjer še vedno opravlja dela farmacevta receptarja. Je dober in uspešen mentor mladim sodelavcem, bil je predsednik Celjske podružnice SFD, predvsem pa je med slovenskimi farmacevti poznan po svoji dolgoletni uspešni publicistični dejavnosti. Članke o zdravilnih rastlinah je skozi več desetletij objavljaj v časopisih, pripravljaj mesečne kontaktne oddaje na Radiu Celje, deloval na info točki Celjskih lekarn, je soavtor številnih publikacij, izdal pa je tudi samostojni publikaciji Zdravilne zeli in Najboljše blago za zdravo telo. Magister Jagodič je zelo ugleden in spoštovan lekarniški farmacevt v Celju, predan stroki in rodnemu mestu, kjer že več mandatov opravlja tudi funkcijo mestnega svetnika.

Magistra **Silva Jenko** je s svojim strokovnim znanjem vseskozi prispevala k razvoju bolnišnične in klinične farmacije. Sodelovala je v projektih pri organizaciji bolnišnične farmacije v ljubljanskem kliničnem centru, posebno priznanje v svojem delovnem okolju pa je dosegla z imenovanji v strokovne komisije kliničnega centra za zdravila, za antibiotike in za informiranje. Na nacionalni ravni je sodelovala v komisiji za področje zdravil in za smiselno porabo protimikrobnih zdravil v Sloveniji. Kot plod tega dela je v soavtorstvu nastal priročnik *Priporočila za uporabo protimikrobnih zdravil v KC*, prva izdaja že leta 1989 in prenovljena izdaja 2006. Svoje znanje prenaša na mlajše generacije farmacevtov in skrbi za njihov strokovni razvoj kot mentorica dodiplomskim in podiplomskim študentom za področje bolnišnične in klinične farmacije, s predavanji in preko delavnic za kolege in druge zdravstvene delavce

v ljubljanskem kliničnem centru. Uspešno je zastopala bolnišnične farmacevte tudi na mednarodnih simpozijih in srečanjih z aktivno udeležbo v obliki posterjev in predavanj.

Marta Jericijo je skozi vso svojo delovno dobo dokazovala veliko pripadnost poklicu, ki ga je izbrala in ljudem, ki jim je skozi ta poklic služila, najprej v odmaknjenem Cerknem, kjer je 11 let delala sama v lekarniški podružnici in prebivalcem zagotavljala tudi stalno pripravljenost, nato v Novi Gorici, kjer je tudi v veliki lekarni znala ohraniti pozoren in individualen odnos do obiskovalcev lekarne in do svojih sodelavcev. V okviru Goriške lekarne je uspešno vodila zeliščno lekarno in s strokovnim pristopom vzgajala ljudi k pravemu odnosu do zdravilnih zelišč. Vseskozi je aktivno sodelovala v SFD, kot članica IO društva, IO sekcije farmacevtskih tehnikov in IO Primorske podružnice in še danes ostaja zvesta udeleženka vseh društvenih strokovnih in družabnih dogodkov.

Magistra **Valnea Jurečič** ja na začetku svoje poklicne poti sodelovala v Nacionalnem programu preprečevanja in zdravljenja odvisnih od nedovoljenih drog in se zavzemala za aktivnejšo vlogo farmacevtov v boju proti AIDS-u. O vlogi in možnostih lekarniških farmacevtov na teh področjih je nastopila tudi s predavanji. Kasneje je magistra Jurečič prevzela funkcijo nacionalne koordinatorice za program farmacevtske skrbi pri sladkorni bolezni in v tej vlogi program tudi pripravila in promovirala. Razvila je Protokol farmacevtske asistence pri samokontroli glukoze v kapilarni krvi in Protokol farmacevtske intervencije za zgodnje odkrivanje sladkorne bolezni, ki ju je leta 2003 sprejel RSK za lekarniško farmacijo. Program je večkrat predstavila farmacevtom in zdravnikom, pa tudi laični javnosti in bolnikom s sladkorno boleznijo v obliki predavanj in učnih delavnic. Magistri Jurečič je uspelo umestiti program farmacevtske skrbi v nastajajoči Nacionalni program za preprečevanje in zdravljenje diabetesa.

Doc. dr. **Aleš Mlinarič** je deloval že v evropski zvezi študentov s prispevki v revijah. Je avtor 80 strokovnih in poljudnih člankov, objavljenih v Farmacevtskem vestniku, Lekarništvu, Zdravniškem vestniku, v reviji Zdravje in drugih strokovnih in poljudnih revijah. Laično in strokovno javnost redno informira s pisnimi prispevki o novostih pri zdravilih naravnega izvora ter o prehranskih dopolnilih. S tem bistveno doprinaša k pravilnemu razumevanju pomena zdravil in vloge farmacevtov pri zdravljenju z njimi v strokovni in laični javnosti. Kot dobro prepoznan farmakolog predava na Medicinski fakulteti mariborske univerze farmakologijo s toksikologijo študentom 2. letnika medicine ter specializantom iz družinske medicine, poučuje na Srednji šoli za farmacijo, zdravniki pa ga vabijo na strokovne prireditve kot cenjenega predavatelja. Vodil je številne delavnice o interakciji med zdravili v okviru sodelovanja med Lekom in SFD ter delavnice v okviru vsakoletnih portoroških simpozijev ob skupščinah SFD. Dve leti je bil urednik biltena Farmakon, imenovan je bil za člana Komisije za zdravila II na tedanjem Uradu za zdravila in za člana Odbora za zdravila rastlinskega izvora pri EMEA-i. Letos je bil na predlog UO LZS imenovan za člana zdravstvenega sveta pri Ministrstvu za zdravje. V Mariborskih lekarnah vodi Službo za raziskave in razvoj.

Dobitnik Mlinaričkovega odličja

Prof. dr. **Borut Štrukelj** sodi med začetnike genskega inženirstva, t.j. razvoja bioloških in biotehnoloških postopkov za izdelavo zdravil. Skupaj s sodelavci mu je uspelo določiti zgradbo, t.j. nukleotidno zaporedje večjega števila genov iz živali, rastlin in gliv. Nekatere tujerodne gene so

tudi uspešno vnesli v dedno snov bakterij in gliv, da so tvorile tujerodne beljakovine. S sodelavci z univerze v Wageningenu je pripravil transgeno rastlino krompirja, ki je odporna proti koloradskemu hrošču, za kar so dobili mednarodni patent. Hkrati je proučeval uporabo rastlin kot bioreaktorjev za proizvodnjo učinkovin, npr. steroidnih hormonov. V zadnjem času je raziskovalna skupina prof. Štruklja razvila novo metodo za odkrivanje novih bioloških zdravil s pomočjo bakteriofagnega prikaza. Tržno je zanimiva proizvodnja tujerodne sladke beljakovine v mlečno-kislinskih bakterijah, ki bi lahko kot sladilo nadomestila pesni sladkor.

Navedenih je samo nekaj detajlov o njegovem znanstvenem opusu, ki govorijo o tem, da je prof. Štrukelj predvsem odličen znanstvenik, ki odstopa od povprečja v slovenskem in tudi mednarodnem akademskem okolju. O tem govorijo številna priznanja, ki jih je v svojstvu raziskovalca prejel do sedaj: Prešernova nagrada za diplomsko nalogo, štipendija evropske organizacije za molekularno biologijo, nagrada RS za znanstvene dosežke in leta 2007 Zoisovo priznanje za pomembne dosežke na področju farmacevtske biotehnologije. Odličnost na področju znanstveno-raziskovalnega dela na razumljiv in ilustrativen način prenaša tudi na pedagoško in strokovno področje. Generacijam študentov na različnih fakultetah Univerze v Ljubljani in drugih univerzah doma in v tujini ter lekarniških in industrijskih farmacevtov je poznan kot odličen predavatelj in sogovornik pri načrtovanju, izdelavi, vrednotenju in uporabi bioloških zdravil. Potrditev odličnosti njegove ekspertize se kaže tudi preko članstva v delovni skupini za biotehnologijo pri EMEA-i, deluje pa tudi kot zunanji ekspert pri Evropski farmakopeji. Ob tej priložnosti je potrebno ponovno spomniti na njegove avtorske in uredniške aktivnosti pri nastanku monografije Biološka zdravila, od gena do učinkovine, ki jo je v slovenskem jeziku izdalo in založilo SFD. S tem je bil narejen velik korak v razvoju slovenske terminologije na področju farmacevtske biotehnologije, slovenski farmacevtski stroki pa se je s tem odprla možnost, da v zaokroženi obliki spozna vse razsežnosti problematike bioloških zdravil.

Ker je prof. Štrukelj izjemno razgledan strokovnjak, odličen znanstvenik in pedagog ter cenjen predavatelj, svoje znanje pa uspešno prenaša v svoje okolje, mu IO SFD podeljuje Mlinařikovo odličje.



Prof. dr. Borut Štrukelj, prejemnik Mlinařikovega odličja za leto 2009, se je v imenu vseh nagrajencev zahvalil



Po končani prireditvi - iskrene čestitke vsem prejemnikom priznanj!

Poročilo o udeležbi na 2. PharmSci Fair v Nici 2009

Aleš Obreza

Med 8. in 12. junijem sem se kot delegat Slovenskega farmacevtskega društva, udeležil simpozija farmacevtskih znanosti PharmSciFair v Nici, Francija. SFD je bilo povabljen k sodelovanju kot eden izmed podpornikov dogodka in je imelo stojnico s promocijskim materialom.

Posebej za ta dogodek je bila namreč pripravljena posebna številka Farmacevtskega vestnika, v kateri so bili predstavljeni najpomembnejši rezultati, doseženi v zadnjih letih na področju farmacevtske znanosti. Povzetki več kot 200 člankov in monografij iz najbolj uglednih znanstvenih revij, indeksiranih z SCI indeksom so bili razvrščeni po posameznih področjih farmacije, spremljalo pa jih je tudi podporno slikovno gradivo. Zanimanje obiskovalcev za omenjeno brošuro je bilo

zelo veliko, številni delegati so tudi izrazili željo po bodočem sodelovanju s Fakulteto za farmacijo na raziskovalnem področju.

V omenjenih dneh so se vrstila številna predavanja in razstave posterjev, ki so zaradi širine predstavljene tematike vsakemu udeležencu nudila obilo možnosti, da zadovolji svoje želje in potrebe. Pri znanstvenem delu simpozija so sodelovali tudi drugi udeleženci iz Slovenije, zlasti s Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Slabost predavanj je bila le v tem, da so številni predavatelji predstavili svoje rezultate precej površno, nekateri pa so ostali precej za časom in predstavili dosežke izpred nekaj let.

V spomin mag.sc. NATAŠI PONIŽ, univ.dipl.biol.



V nedeljo, 5. aprila 2009, je umrla biologinja mag. Nataša Poniž, kljub upokojitvi še naprej zvesta članica Slovenskega združenja za klinično kemijo in Slovenskega farmacevtskega društva.

Rodila se je 3. julija 1925 v Ljubljani. Starše je izgubila že zgodaj. Šolala se je na realni gimnaziji in med vojno postala mladinska aktivistka OF. Na naravoslovni fakulteti v Ljubljani je študirala biologijo in bila po diplomu 1957 sprejeta v službo

najprej na Fizikalnem inštitutu ljubljanske medicinske fakultete. Leta 1960 so jo povabili na Onkološki inštitut v Ljubljani za vodjo kliničnega laboratorija. Tu je bil njen prvi direktor prof. dr. Leo Šavnik; vedno ga je omenjala z velikim spoštovanjem. Na Onkološkem inštitutu je skrbela za nemoteno strokovno delo zaposlenih v osrednjem kliničnem laboratoriju in v manjših laboratorijskih enotah, razmeščenih po vseh stavbah inštituta. Uvajala je nove, sodobne hematološke in urinske analize. Sama se je posvečala najtežjim področjem laboratorijske hematologije. S kakovostnim diferenciranjem krvnih celic v periferni krvi in kostnem mozgu je veliko pripomogla, da so se diagnostični postopki pri bolnikih končali s pravilnimi ugotovitvami; te so povečale možnost za uspešno zdravljenje. Takoj so jo povabili tudi k znanstvenoraziskovalnemu delu v onkologiji; o dosežkih priča njena bibliografija.

Odločila se je še za podiplomski študij. Vpisala ga je na zagrebški univerzi in ga 1972 končala z magistrskim delom Citokemijske spremembe v nevtrofilnih granulocitih periferne krvi pri bolnicah s karcinomom dojke; posebej se je posvetila raziskovanju sprememb

fosfataznega indeksa v nevtrofilnih granulocitih v zgoraj naštetih primerih. Njen mentor prof. dr. Erik Hauptman s tamkajšnje medicinske fakultete ter članica izpitne komisije dr. Inga Črepinko iz laboratorija za citologijo v bolnišnici Dr. Ozren Novosel veljata za legendi zagrebške hematološke in citološke šole. Na to je bila magistra upravičeno ponosna, saj je ob obsežnem znanju svojih učiteljev lahko pripravila najboljšo magistrsko delo. Kateri resni učenec tega ne bi bil vesel!

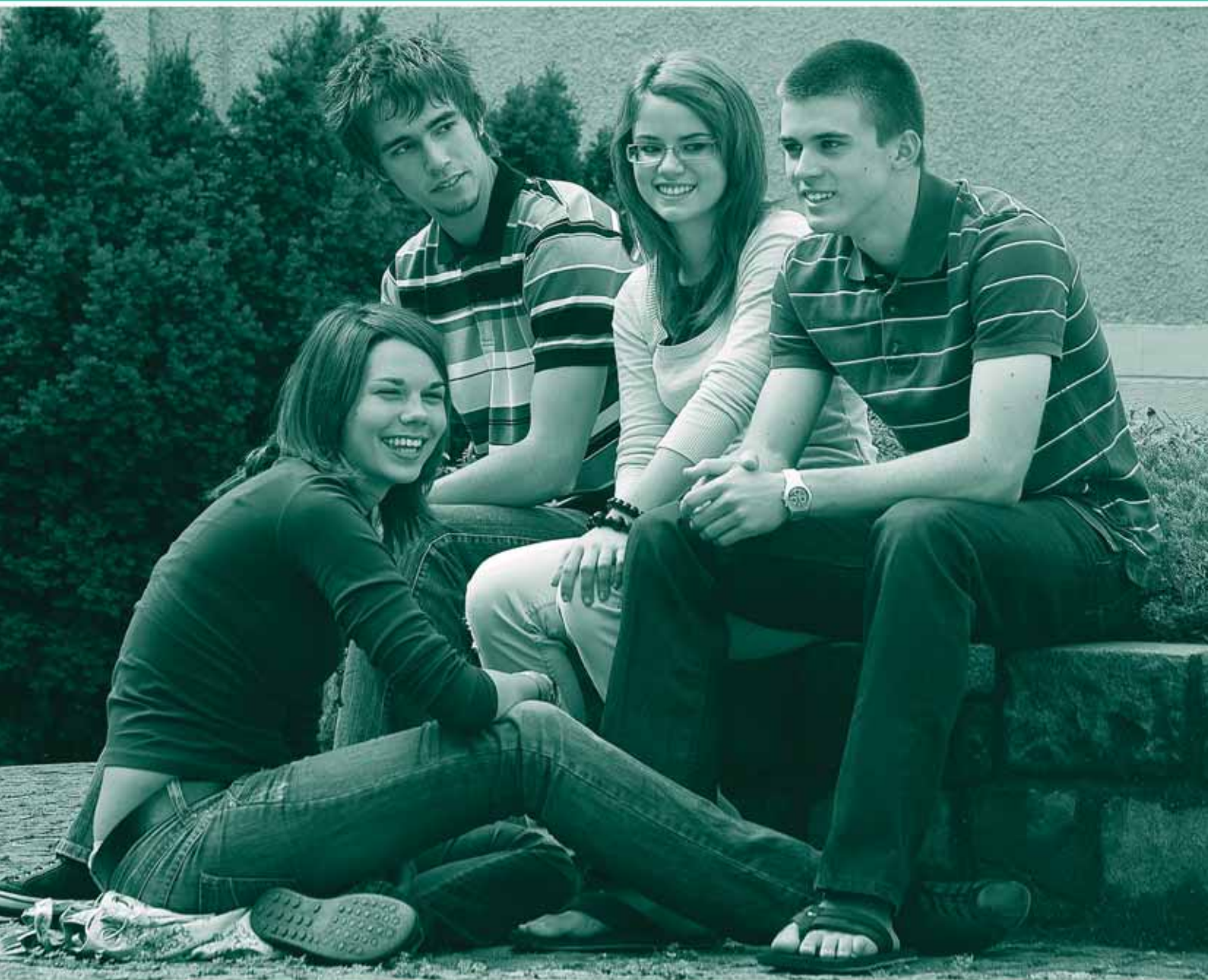
Ves čas svojega poklicnega obdobja se je magistra Poniž zavzeto seznanjala z novostmi v svoji stroki in jih prenašala v redno delo za bolnike. Vzgojila je mnogo laboratorijskih delavcev različnih izobrazbenih stopenj. Spominjali se je bomo kot predane strokovnjakinje, ki je z veseljem opravljala svoj poklic. Delovno dobo na Onkološkem inštitutu je sklenila 1990 kot konzultantka; v pokoju je še naprej z zanimanjem prebirala strokovne članke.

Magistra je bila zelo pogumen človek. Dan za dnem se je spoprijemala s težavami, ki so spremljale njeno dolgoletno kronično bolezen, jih brez jadtovanja trpela in premagovala, ob tem pa vestno opravljala svoje službene dolžnosti. Za vse to si zasluži naše posebno spoštovanje. Čeprav zahtevna do sebe je premogla veliko razumevanja za stiske ljudi, ki so jo obkrožali; tudi kot upokojenka je ostala prijateljsko povezana s prejšnjimi sodelavci.

Približno v istem času, ko je bila mag. Nataša Poniž vodja kliničnega laboratorija, je vodila biokemični laboratorij Onkološkega inštituta njena vrstnica kemičarka dr. Slava Šebek. Skoraj 26 let sta sodelovali v medsebojni naklonjenosti in si pomagali pri strokovnih in organizacijskih nalogah. Naključje je hotelo, da se je tudi njun zemeljski vek iztekel le z nekaj meseci razlike. Od magistre Poniž smo se poslovili 10. aprila tega leta na ljubljanskih Žalah.

Vera Čoroli
Marta Kramberger

5. Dan slovenskih lekarn - 26. september 2009
O PRAVILNI IN VARNI UPORABI ZDRAVIL



Zdravila in mladostniki

Zdravilo je učinkovito in varno le, če ga pravilno uporabite.
Posvetujte se s svojim farmacevtom v lekarni, če želite storiti več za svoje zdravje.



SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO
SEKCIJA FARMACEVTOV JAVNIH LEKARN



LEKARNIŠKA ZBORNICA SLOVENIJE

Hitro odpravi bolečino.

www.nalgesin.si



Hitra rešitev.

Pri glavobolu, zobobolu,
menstrualnih bolečinah,
bolečinah v mišicah
in sklepih.

hitro odpravi bolečino
10 filmsko obloženih tablet

KRKA

www.krka.si

KRKA

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

Nalgesin S vsebuje naproksen natrij.

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