

PREBAVNE LIPAZE IN NJIHOV POMEN PRI APLIKACIJI ZDRAVIL

DIGESTIVE LIPASES AND THEIR SIGNIFICANCE IN DRUG DELIVERY

AVTORICI / AUTHORS:

asist. dr. Katarina Rede, mag. farm.
prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: marija.bogataj@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Prebavni encimi imajo pomembno vlogo pri razgradnji hrane, saj katalizirajo kemijske reakcije razgradnje večjih molekul hranil v manjše enote, ki se lahko absorbirajo v prebavnem traktu. Ključni so pri razgradnji vseh treh skupin

POVZETEK

Prebavni encimi imajo pomembno vlogo pri razgradnji hrane in marsikdaj tudi pri peroralni dostavi zdravilnih učinkovin. Ena izmed skupin prebavnih encimov so lipaze, katerih naloga je kataliza hidrolize lipidov, pri čemer nastanejo razgradni produkti, ki se lahko absorbirajo. Najpomembnejši prebavni lipazi pri človeku sta želodčna in pankreasna lipaza. Želodčna lipaza je acidostabilen encim, ki se izloča iz želodčne sluznice in začne z razgradnjo lipidov. Pankreasna lipaza, ki k lipolizi prispeva v največjem obsegu, se izloča iz trebušne slinavke v dvanajstnik in nadaljuje z razgradnjo lipidov. Proces razgradnje lipidov lahko vpliva na biološko uporabnost zdravilnih učinkovin, ki so vgrajene v lipidne dostavne sisteme, saj se lahko s pomočjo lipaz razgradijo komponente teh sistemov, in tudi na peroralna lipidna predzdravila. Poznavanje delovanja lipaz je zato pomemben dejavnik pri razvoju tovrstnih dostavnih sistemov in njihovem biofarmacevtskem vrednotenju.

KLJUČNE BESEDE:

encim, lipidni dostavni sistemi, pankreasna lipaza, prebava, želodčna lipaza

ABSTRACT

Digestive enzymes play an important role in food breakdown and they are also frequently involved in oral drug delivery. One of digestive enzyme groups is lipases, which catalyze the hydrolysis of lipids, resulting in the formation of digestion products that can be absorbed. The most important digestive lipases in humans are gastric and pancreatic lipases. Gastric lipase is an acid-stable enzyme, which is secreted from gastric mucosa. It initiates lipid digestion. Pancreatic lipase, which contributes to lipolysis to the greatest extent, is secreted from the pancreas into the duodenum and continues lipid digestion. The process of lipid digestion can also influence the bioavailability of a drug incorporated into lipid-based drug delivery systems, as components of these systems can be digested by lipases, and it can also affect oral lipid prodrugs. Therefore, knowledge about lipase activity is an important factor in the development



of these drug delivery systems and their biopharmaceutical evaluation.

KEY WORDS:

enzyme, digestion, gastric lipase, lipid-based drug delivery systems, pancreatic lipase

ALI STE VEDELI?

- Tetrahidrolipstatin, bolj znan pod imenom orlistat, zavira delovanje želodčne in pankreasne lipaze (25).
- Pankreasna lipaza pri zdravih osebah ni prisotna v želodcu (6, 28).
- Pri novorojenčkih, še zlasti pri nedonošenčkih, lahko želodčna lipaza delno kompenzira nizko aktivnost pankreasne lipaze (32).
- Aktivnost želodčne lipaze se s starostjo zmanjšuje. Velik preskok je viden po 50. letu starosti, saj se specifična aktivnost encima z 4700 U/g mukoze pred 50. letom zmanjša na 700 U/g mukoze po 60. letu (11).

makrohranil – ogljikovih hidratov, proteinov in maščob. Vendar prebavni encimi niso pomembni le pri prebavi hrane, temveč marsikdaj tudi pri aplikaciji zdravil.

Peroralni dostavni sistemi so po zaužitju izpostavljeni tem encimom, ki lahko vplivajo tako na zdravilno učinkovino kot na pomožne snovi. Dobro poznan primer je razgradnja peptidnih in proteinskih zdravilnih učinkovin s proteolitičnimi encimi v prebavilih, kar otežuje razvoj dostavnih sistemov za peroralno aplikacijo tovrstnih učinkovin. Manj pa je poznano, da so lahko tudi lipaze v prebavnem traktu pomembne za obnašanje nekaterih zdravil. Vplivajo lahko na lipidne dostavne sisteme, ki so eden izmed inovativnih pristopov za izboljšanje biološke uporabnosti težko topnih zdravilnih učinkovin. Namen članka je prikazati fiziološke lastnosti lipaz in predstaviti njihov pomen pri aplikaciji zdravil.

2 FUNKCIJA IN VRSTE PREBAVNIH LIPAZ

Lipaze so encimi, ki razgrajujejo trigliceride do digliceridov, monogliceridov, prostih maščobnih kislin in glicerola. Odgovorne so za prebavo prehranskih lipidov in tako ključne za absorpcijo lipidnih molekul v tankem črevesu (1, 2). Li-

pidi, ki jih uporabljamo v prehrani, so večinoma mešanice različnih trigliceridov, v manjšem deležu so prisotni še fosfolipidi, holesterol in vitamini, topni v maščobah (3, 4). Priporočen dnevni vnos maščob za odrasle je okoli 80 g na dan oz. približno 30 % energije naj bi pridobili z uživanjem maščob (5). V industrializiranih državah je dnevni vnos maščob pogosto večji – v povprečju med 100 in 150 g maščob dnevno (4, 6, 7). Navadno se absorbira več kot 95 % prehranskih lipidov, ki jih zaužijemo (4, 7). Ob odsotnosti oz. zmanjšani aktivnosti lipaz se trigliceridi ne razgradijo in zato ne absorbirajo, ampak se izločijo z blatom, kar ima lahko za posledico npr. izgubo tekočine, zmanjšanje telesne mase in pomanjkanje lipidotopnih vitaminov (2). Najpomembnejša dela prebavnega trakta, kjer poteka razgradnja lipidov, sta želodec in tanko črevo. Lipolitična aktivnost v prebavilih je rezultat delovanja večjega števila lipaz, ki so humana želodčna lipaza (HGL), humana pankreasna lipaza (HPL), kolipaza, karboksil ester hidrolaza, pankreasna fosfolipaza A2 in pankreasni lipazi podoben protein 2. Med njimi sta najpomembnejši HGL in HPL (8, 9). Lipolitično delovanje so zaznali tudi v ustni votlini, vendar je bilo to v primerjavi z aktivnostjo HGL zanemarljivo majhno (10, 11). Prav tako ni potrjeno, ali gre za lipazo, ki se izloča v ustno votlino (jezična lipaza), ali za encim mikrobnege izvora, ki je produkt ustne mikroflore, ali za posledico refluksa želodčne vsebine (12).

3 DELOVANJE PREBAVNIH LIPAZ

Lipaze sodijo v skupino esteraz, vendar so njihovi substrati molekule, ki so v vodi težko topne, za razliko od klasičnih esteraz, ki delujejo na vodotopne substrate. Lipaze so vodotopni encimi, toda njihova značilnost je delovanje na medfazni površini med vodo in oljem, tj. na površini maščobnih kapljic. Pomembno je, da se tudi njihovi substrati nahajajo na medfazi olje-voda, in posledično je aktivnost lipaz odvisna od koncentracije substrata na medfazni površini in od velikosti medfazne površine (8, 9, 13, 14). Prebava lipidov je kompleksen proces, ki poteka v več stopnjah: emulgiranje, hidroliza, micelizacija in na koncu absorpcija lipidnih razgradnih produktov v enterocite (15). Pri tem HGL in HPL ter drugi lipolitični encimi delujejo komplementarno in sinergistično (9, 16). Prebava lipidov se začne v želodcu z delovanjem HGL. K procesu še dodatno prispevajo kontrakcije želodčne mu-

skulature, ki želodčno vsebino dobro premešajo, da nastane emulzija. Prebava se nato nadaljuje v dvanajstniku z delovanjem HPL (slika 1) (15), ki se izloča iz trebušne slinavke skupaj z drugimi prebavnimi encimi in alkalno tekočino, ki nevtralizira kislino želodčno vsebino in regulira pH v lumnu tankega črevesa (9). V dvanajstnik se izloča tudi žolč, ki ima pomembno vlogo pri emulgiranju lipidov in lipidnih prebavnih produktov ter obenem prispeva k regulaciji pH. Soli žolčnih kislin in druge površinsko aktivne komponente žolča vključujejo lipidne molekule v različne koloidne strukture, kot so vezikli, mešani miceli in miceli, kar poveča solubilizacijsko kapaciteto tankega črevesa za lipidne razgradne produkte in tudi za zdravilne učinkovine. Solubilizacija lipidnih razgradnih produktov le-te odstrani z medfazne površine, kar olajša nadaljnjo razgradnjo lipidov in tako izboljša njihovo absorpcijo. Razgradni produkti, ki nastanejo pri lipolizi, se nato absorbirajo v enterocite (15, 17).

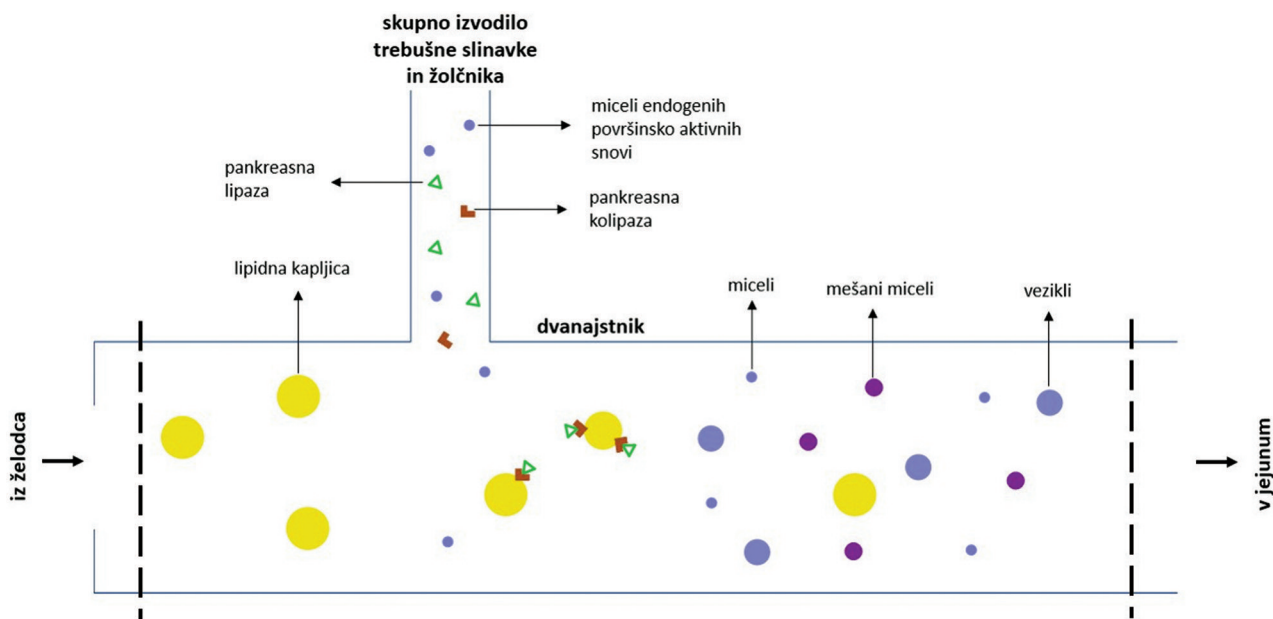
Lipaze cepijo estrsko vez med maščobno kislino in glicerolom (slika 2). V prvi stopnji razgradnje triglicerida nastane diglicerid in prosta maščobna kislina. Digliceridi so težko vodotopni in se preferenčno nahajajo na medfazi olje-voda. V drugi stopnji razgradnje se od diglicerida odcepi še ena prosta maščobna kislina in nastane monogli-

cerid. Monogliceridi so bolj polarni in lahko v vodnem okolju tvorijo in se vključujejo v različne koloidne strukture. V zadnji stopnji razgradnje iz monoglicerida nastane prosta maščobna kislina in glicerol (8). Za popolno absorpcijo lipidov je dovolj že razgradnja do monoglicerida in dveh prostih maščobnih kislin, saj se lahko v enterocite absorbirajo monogliceridi in proste maščobne kisline (15, 16). Vloga najpomembnejših encimov pri razgradnji trigliceridov, HGL in HPL, je podrobneje opisana v nadaljevanju.

4 ŽELODČNA LIPAZA

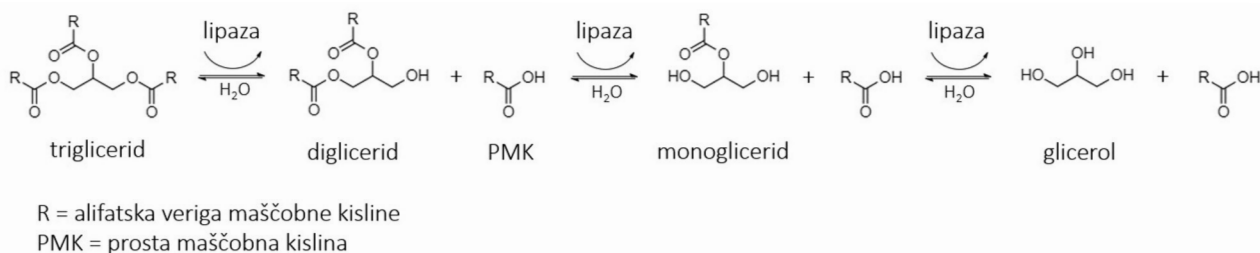
Hidroliza trigliceridov iz hrane se pri ljudeh začne v želodcu z delovanjem HGL, ki nastaja v glavnih celicah proksimalnega dela želodca (fundusa) (11) in se v lumen želodca izloča skupaj s pepsinogenom. Izločanje stimulira zaužitje obroka preko delovanja holinergičnega sistema (18). Za delovanje ne potrebuje koencima (19, 20).

Prisotnost encima navadno vrednotimo preko določanja njegove aktivnosti in ne le preko podajanja koncentracije,



Slika 1: Shema prebave lipidov v dvanajstniku. Težko vodotopna zdravilna učinkovina se med prebavo lahko nahaja v lipidni kapljici in v različnih koloidnih strukturah, kot so vezikli, mešani miceli in miceli (prirejeno po (15)).

Figure 1: Scheme of lipid digestion in duodenum. During digestion, a poorly water-soluble drug may be present in a lipid droplet and in different colloid structures such as vesicles, mixed micelles and micelles (adapted from (15)).



Slika 2: Kemijska reakcija razgradnje trigliceridov, ki jo katalizirajo lipaze.

Figure 2: Lipase-catalyzed chemical reaction of triglyceride degradation.

saj je delovanje encima odvisno od pogojev, ki jim je izpostavljen. Posledično se podatki o specifični aktivnosti HGL med seboj zelo razlikujejo, saj so odvisni od pogojev, pri katerih so izmerjeni, ali so določeni v celotni želodčni tekočini ali le za izoliran encim, od metode *in vitro*, uporabljene za vrednotenje aktivnosti, izbranega substrata, pH medija in sestave medija (16, 21–23). Za primerjavo – specifične aktivnosti encima, določene pri optimiziranih pogojih pri uporabi tributirina kot substrata, so bile bistveno višje (1300 U/mg) kot pri uporabi trdnega ali tekočega obroka za substrat (okoli 30 U/mg), torej kot pri pogojih, ki jih navadno najdemo v prebavnem traktu (21). Tudi *in vivo* je aktivnost HGL odvisna od številnih dejavnikov, kot so pH vrednost želodčne vsebine, motiliteta želodčne muskulature, koncentracija površinsko aktivnih snovi in od tega odvisno emulgiranje lipidov in velikost kapljic emulzije (24). HGL je acidostabilna in je aktivna pri pH med 2 in 7; izven tega območja pH se njena aktivnost naglo zmanjšuje. Največjo aktivnost izkazuje pri pH med 3 in 5 (23). Koncentracija HGL v želodčni tekočini na tešče (bazalni želodčni tekočini) znaša 100 µg/mL (16), vendar je možno tudi, da v stanju na tešče zaradi nizkega pH želodčne vsebine sploh ni aktivna (23, 25). Prisotnost HGL v bazalni želodčni tekočini so namreč dokazali preko vrednotenja aktivnosti pri višjih pH in/ali z optimalnimi substrati (22, 23, 26), kar pa ne odraža pogojev na tešče.

Po zaužitju obroka se pH v lumnu želodca dvigne z zelo nizkih vrednosti v stanju na tešče (1,0–1,5 po viru (27)) na vrednosti med 5 in 7. Dvig pH je odvisen od vrste obroka in njegove pufrne kapacitete (27). Aktivnost HGL se z dvigom pH poveča (22, 23, 25). Bazalna želodčna tekočina se z zaužitjem hrane razredči, kar sicer vpliva v smeri zmanjšanja koncentracije encima, vendar pride hkrati do povečanega izločanja HGL iz želodčne sluznice. Aktivnost encima v želodcu je tako močno odvisna od časa po obroku in od hitrosti praznjenja želodca, kljub temu da je izločanje HGL med prebavo obroka ves čas konstantno.

Bazalna koncentracija encima in pH sta bila v opisanih raziskavah dosežena po približno štirih urah od zaužitja obroka oz. ko je vsa hrana zapustila želodec (6, 16, 27, 28). HGL ostaja aktivna tudi pri pH dvanajstnika in naj bi bila pri zdravih posameznikih odgovorna za 7 oz. 7,5 % lipolize s hrano vnesenih maščob v tankem črevesu (16, 29). Celokupno, v želodcu in tankem črevesu, je pri zdravih osebah prispevek HGL k razgradnji trigliceridov 10–30 %; deleži se med raziskavami nekoliko razlikujejo (6, 16, 28, 30).

HGL je sposobna katalizirati razgradnjo dolgo- in kratkoverižnih trigliceridov s primerljivo hitrostjo (22), vendar pri dolgoverižnih trigliceridih nastanejo dolgoverižne proste maščobne kisline, ki so v vodi težko topne. Slednje nato zasedejo površino maščobnih kapljic in zavirajo delovanje HGL (22, 30, 31). Mehanizem tega procesa še ni povsem pojasnjen. Inhibicija naj bi se zgodila približno eno uro od začetka razgradnje lipidov, vendar je pri emulzijah z drobnimi kapljicami proces lahko zakasnen (31). Po prehodu želodčne vsebine v dvanajstnik endogene površinsko aktivne snovi solubilizirajo dolgoverižne proste maščobne kisline, kar naj bi omogočilo ponovno delovanje HGL v lumnu zgornjega tankega črevesa (30). V pogojih *in vitro* bi lahko HGL sama, brez prisotnosti HPL, v celoti razgradila lipide iz obroka, vendar bi za to potrebovala več časa kot HPL, ker je prisotna v nižjih koncentracijah in ne zaradi manjše specifične aktivnosti v primerjavi s HPL. Da bi bila HGL enako učinkovita kot HPL pri razgradnji lipidov iz hrane, bi morala biti njena koncentracija v prebavnem traktu šestkrat večja (21). Novorojenčki, predvsem nedonošenčki, imajo fiziološko znižano koncentracijo HPL, ki se kompenzira preko delovanja HGL (32).

Pri osebah z zmanjšanim eksokrinim delovanjem trebušne slinavke (posledica kroničnega pankreatitisa, alkoholizma, cistične fibroze ipd.) je celokupna lipolitična aktivnost v prebavnem traktu manjša kot pri zdravih osebah, saj se HPL v manjši meri izloča iz trebušne slinavke. Delež pri-

spevka HGL k lipolitični aktivnosti je lahko tako bistveno večji kot pri zdravih posameznikih, vendar je kljub temu celokupna lipolitična aktivnost zmanjšana (29, 30, 33). Večji prispevek HGL k razgradnji lipidov pri teh posameznikih predvidoma ni posledica povečanega izločanja HGL v želodcu, ampak večje aktivnosti HGL v dvanajstniku v primerjavi z zdravimi osebami. To se verjetno zgodi zaradi nižjega pH v tankem črevesu, ki ga imajo ti bolniki v primerjavi z zdravimi (29, 33). Klinične raziskave so pokazale, da v primerih hude oblike insuficience eksokrine funkcije trebušne slinavke HGL lahko le delno kompenzira pomanjkanje HPL, ne more pa celokupno normalizirati lipolitične aktivnosti v prebavnem traktu (30).

5 PANKREASNA LIPAZA

Najpomembnejši lipolitični encim pri človeku je HPL, saj ga je količinsko daleč največ izmed prebavnih lipaz (8, 16, 21). HPL nastaja v acinarnih celicah trebušne slinavke in se izloča skozi njeno izvodilo ter nato preko skupnega izvodila trebušne slinavke in žolčnika v lumen dvanajstnika (1, 8, 9). Izločanje je stimulirano z delovanjem holinergičnega živčevja in hormonskega sistema (holecistokinin), ki se aktivirata po zaužitju obroka (18). Več kot je maščob v hrani, večje je izločanje HPL (30). Izločanje HPL je uravnava tudi s praznjenjem želodca (16).

Molekula HPL je glikoprotein s polipeptidno verigo, ki tvori dve ločeni domeni – ena je pomembna za vezavo na medfazno površino in vsebuje aktivno mesto, druga vsebuje vezavno mesto za kolipazo (34–36). Ko se HPL izloči iz trebušne slinavke, mora najprej priti do obsežnih konformacijskih sprememb, da se substrat lahko veže v aktivno mesto (9, 36). V zaprti konformaciji je namreč aktivno mesto pokrito z zanko, kar onemogoča dostop substrata. Za odprtje zanke oz. za pretvorbo v odprto konformacijo je potrebna vezava HPL na medfazno površino. V tankem črevesu so medfazne površine večinoma zasedene zaradi prisotnosti površinsko aktivnih snovi (soli žolčnih kislin, fosfolipidi) in proteinov, zato je za vezavo HPL na medfazno površino potrebna prisotnost kolipaze (37).

Kolipaza je polipeptidni kofaktor, ki se v dvanajstniku izloča iz trebušne slinavke v neaktivni obliki (prokolipaza) in se aktivira šele pod vplivom delovanja tripsina. Kolipaza sama nima lipolitične aktivnosti, ampak se veže na HPL v razmerju 1 : 1 in s tem omogoči vezavo HPL na površino li-

pidne kapljice (38). Do nastanka kompleksa med HPL in kolipazo lahko pride v raztopini, afiniteta vezave pa je povečana ob prisotnosti lipidov (39).

V želodčni vsebini, ki zapusti želodec in preide v dvanajstnik, so lipidi večinoma prisotni v obliki lipidnih kapljic (tj. emulgirani). K temu prispeva mehanska obremenitev vsebine želodca in delna razgradnja trigliceridov, ki jo katalizira delovanje HGL. Produkti lipolize namreč sodelujejo pri emulgiranju in prispevajo k povečanju medfazne površine, ki je nato na voljo za delovanje HGL (6, 28). Prebavljajoča se hrana ob vstopu v dvanajstnik tako vsebuje okoli 10–20 % prostih maščobnih kislin, ki so pri pH dvanajstnika delno ionizirane in prispevajo k tvorbi emulzije (9). Delovanje HGL uravnava emulgiranje lipidov, hkrati pa obseg emulgiranja lipidov uravnava hitrost lipolize, saj preko spremembe medfazne površine in drugih mehanizmov vpliva na delovanje HGL in HPL (6, 21, 22, 40). V dvanajstniku so prisotni tudi drugi lipolitični encimi, ki se prav tako izločajo iz trebušne slinavke (karboksil ester hidrolaza, pankreasna fosfolipaza A2 in pankreasni lipazi podoben protein 2). To se odraža v še nekoliko večji lipolitični aktivnosti, kar so pokazali z *in vitro* primerjavo lipolitične aktivnosti črevesne tekočine in izolirane HPL (21).

Višji pH v dvanajstniku glede na kisel pH v želodcu je ključen za delovanje HPL (1), saj pride pri pH pod 3 do ireverzibilnih strukturnih sprememb in encim agregira. HPL je stabilna v območju pH med 3 in 6,5, čeprav lahko že pri pH, manjšem od 5, vidimo strukturno destabilizacijo, ki je reverzibilna (41). Podatki o območju pH, v katerem je HPL aktivna, se med viri precej razlikujejo; omenjene vrednosti so znotraj intervala pH 4,5 in 9,5 (1, 8, 9). Navedeno območje pH so določili *in vitro*, pri aplikaciji *in vivo* pa tako visoke vrednosti pH niso dosežene.

Po zaužitju obroka se koncentracija HPL poveča pet- do desetkrat v primerjavi s stanjem na tešče (42). Koncentracija HPL po obroku je odvisna od količine lipidov v obroku in časa, ki je minil od zaužitja obroka (30). Aktivnost HPL je povezana s koncentracijo encima in pogoji, v katerih se encim nahaja, odvisna je od metode *in vitro*, ki jo uporabimo za vrednotenje aktivnosti, od substrata in od tega, ali je aktivnost določena v celotni črevesni tekočini ali le za izoliran encim (16, 21, 43). Tako je bila specifična aktivnost HPL, določena pri optimiziranih pogojih s tributirinom, 8000 U/mg, pri uporabi tekočega ali trdnega obroka, tj. pogojih, ki jih navadno najdemo v prebavnem traktu, pa 12 oz. 47 U/mg (21).

Med posamezniki so velika nihanja v aktivnosti HPL, ki jih lahko pojasnimo z razlikami v izločanju HPL, praznjenju želodca in redčitvijo črevesne tekočine z obrokom (43).



Pomembne so prehranjevalne navade posameznika (30), aktivnost HPL pa se zmanjšuje tudi s staranjem (11). Prav tako je pri določenih bolezenskih stanjih, kot je npr. kronični pankreatitis, aktivnost HPL lahko zmanjšana. Pri bolnikih s hudo obliko te bolezni so izmerili okoli 10–40-krat manjšo aktivnost kot pri zdravih posameznikih (30).

6 POMEN LIPAZ ZA ZDRAVILA

Vpliv delovanja prebavnih lipaz na zdravila so najpogosteje proučevali pri lipidnih dostavnih sistemih, med katere uvrščamo lipidne raztopine, emulzije, liposome, trdne lipidne nanodelce, nanostrukturirane lipidne nosilce in samoemulgirajoče dostavne sisteme. Najpogosteje vsebujejo olja, površinsko aktivne snovi in/ali sotpila (1). Lahko gre za relativno enostavne formulacije z eno lipidno pomožno snovjo (npr. oleinska kislina, koruzno olje itd.) ali zapletene dostavne sisteme z več kot štirimi komponentami, ki jih združimo v ustreznem razmerju. V zadnjem obdobju so zelo aktualni samoemulgirajoči sistemi. Gre za brezvodne predkoncentrate, ki se v prebavnem traktu dispergirajo in tvorijo emulzijo, ki nato predstavlja rezervoar za prenos zdravilne učinkovine v raztopljenem stanju do mesta absorpcije. Zlasti velik potencial za peroralno dostavo zdravilnih učinkovin so pokazali predkoncentrati, ki po dispergiranju tvorijo mikroemulzijo, saj imajo obsežno zmožnost solubilizacije težko topnih učinkovin (3).

V lipidne dostavne sisteme navadno vgrajujemo težko topne zdravilne učinkovine, saj lipidne pomožne snovi pripomorejo k njihovi solubilizaciji in posledično boljši biološki uporabnosti teh zdravilnih učinkovin. Vendar pa so lahko lipidne pomožne snovi po aplikaciji podvržene delovanju lipaz v prebavnem traktu, kar pogosto vpliva na sproščanje zdravilne učinkovine in na njeno absorpcijo. Posledica delovanja lipaz je lahko obarjanje zdravilne učinkovine, kar je možno do neke mere ponazoriti s poskusi sproščanja *in vitro*, kjer je upoštevana razgradnja lipidnih komponent (1, 44). Na primeru lipidnih formulacij z danazolom so pokazali, da je do obarjanja zdravilne učinkovine, opaženega *in vitro*, verjetno prišlo tudi *in vivo* in se odražalo v nižjih plazemskih koncentracijah (45). Poznavanje vplivov prebavnih lipaz na posamezne lipidne pomožne snovi in na lipidne dostavne sisteme kot celoto je torej relevantno za uspešno pripravo in biofarmacevtsko vrednotenje takšnih zdravil (1, 44). Primeri zdravilnih učinkovin, ki so na trgu v obliki peroralnih li-

pidnih dostavnih sistemov so ciklosporin A, ritonavir, sakvinavir, tretinoin, kalcitriol in dutasterid (3).

Lipaze imajo ključno vlogo tudi pri lipidnih predzdravilih. V lipidnih predzdravilih imajo zdravilne učinkovine kovalentno vezano lipidno molekulo, kot so maščobne kisline, digliceridi ali fosfogliceridi. Lipaze v prebavilih cepijo vez med zdravilno učinkovino in lipidnim delom molekule ter tako omogočijo sprostitve aktivne oblike učinkovine. Namen oblikovanja lipidnih predzdravil je lahko zmanjšanje neželenih učinkov, npr. zaščita želodčne sluznice, in načrtovanje absorpcije preko limfatičnega sistema (46). Raziskava na podganah je tako pokazala, da lipidno predzdravilo acetylsalicilne kisline ne draži želodčne sluznice, medtem ko so neželeni učinki same acetylsalicilne kisline na sluznico prebavnega trakta pogosti (47). Za peptidno učinkovino v obliki lipidnega predzdravila so v raziskavi *in vitro* pokazali večjo stabilnost ob izpostavljenosti α -kimotripsinu, v primerjavi s samo učinkovino. Test *in vitro* je tudi pokazal, da je peptidna učinkovina po razgradnji predzdravila s pankreasno lipazo izkazovala ustrezno aktivnost (48).

7 SKLEP

Poznavanje delovanja lipaz in procesa hidrolize lipidov iz hrane je pomemben del razumevanja fizioloških dogajanj v prebavnem traktu. Dodatno imajo prebavne lipaze ključno vlogo pri dogajanju po peroralni aplikaciji nekaterih zdravil, saj lahko vplivajo na sproščanje in s tem tudi na absorpcijo zdravilnih učinkovin preko delovanja na pomožne snovi v formulaciji pri lipidnih dostavnih sistemih ali preko neposrednega delovanja na lipidna predzdravila. Dobro poznavanje vpliva encimov na dostavne sisteme je tako pomembno pri razvoju novih lipidnih dostavnih sistemov in modelov *in vitro* za njihovo vrednotenje, saj encimska razgradnja lahko močno vpliva na obnašanje teh sistemov.

8 LITERATURA

1. Joyce P, Whitby CP, Prestidge CA. Nanostructuring biomaterials with specific activities towards digestive enzymes for controlled gastrointestinal absorption of lipophilic bioactive molecules. *Adv Colloid Interface Sci.* 2016;237:52-75.

2. Lowe ME. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:141-58.
3. Gibson L. Lipid-based excipients for oral drug delivery. In: Hauss DJ, editor. *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs.* New York: Informa Healthcare; 2007. p. 33-61.
4. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci.* 2007;52(1):1-17.
5. NIJZ. Referenčne vrednosti za energijski vnos ter vnos hranil [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 17]. Available from: https://www.dobertekslovenija.si/wp-content/uploads/2017/10/2016_referencne_vrednosti_za_energijski_vnos_ter_vnos_hranil_17022016.pdf
6. Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, et al. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):G372-81.
7. Mu H, Hoy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res.* 2004;43(2):105-33.
8. Bakala N'Goma JC, Amara S, Dridi K, Jannin V, Carriere F. Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Ther Deliv.* 2012;3(1):105-24.
9. Scharpé S, Uyttenbroeck W, Samyn N. Pancreatic enzyme replacement. In: Albert L, Simon S, editors. *Pharmaceutical enzymes.* New York: Taylor & Francis; 1997. p. 187-221.
10. DeNigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC, Hamosh P. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1988;959(1):38-45.
11. Moreau H, Laugier R, Gargouri Y, Ferrato F, Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology.* 1988;95(5):1221-6.
12. Lai WYW, Chua JWM, Gill S, Brownlee IA. Analysis of the lipolytic activity of whole-saliva and site-specific secretions from the oral cavity of healthy adults. *Nutrients.* 2019;11(1):191.
13. Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME, Miller R. Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009;147-148:237-50.
14. Saktaweewong S, Phinyocheep P, Ulmer C, Marie E, Durand A, Inprakhon P. Lipase activity in biphasic media: Why interfacial area is a significant parameter? *J Mol Catal B Enzym.* 2011;70(1):8-16.
15. Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(3):231-48.
16. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology.* 1993;105(3):876-88.
17. Holm R, Mullertz A, Mu H. Bile salts and their importance for drug absorption. *Int J Pharm.* 2013;453(1):44-55.
18. Borovicka J, Schwizer W, Mettraux C, Kreiss C, Remy B, Asal K, et al. Regulation of gastric and pancreatic lipase secretion by CCK and cholinergic mechanisms in humans. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 1):G374-80.
19. Bodmer MW, Angal S, Yarranton GT, Harris TJ, Lyons A, King DJ, et al. Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1987;909(3):237-44.
20. Roussel A, Canaan S, Egloff MP, Riviere M, Dupuis L, Verger R, et al. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J Biol Chem.* 1999;274(24):16995-7002.
21. Carriere F, Renou C, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, et al. The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. *Gastroenterology.* 2000;119(4):949-60.
22. Gargouri Y, Pieroni G, Riviere C, Sauniere JF, Lowe PA, Sarda L, et al. Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology.* 1986;91(4):919-25.
23. Ville E, Carriere F, Renou C, Laugier R. Physiological study of pH stability and sensitivity to pepsin of human gastric lipase. *Digestion.* 2002;65(2):73-81.
24. Koziolk M, Carriere F, Porter CJH. Lipids in the stomach - implications for the evaluation of food effects on oral drug absorption. *Pharm Res.* 2018;35(3):55.
25. Carriere F, Renou C, Ransac S, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, et al. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):G16-28.
26. Pedersen PB, Vilmann P, Bar-Shalom D, Mullertz A, Baldursdottir S. Characterization of fasted human gastric fluid for relevant rheological parameters and gastric lipase activities. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3 Pt B):958-65.
27. Sams L, Paume J, Giallo J, Carriere F. Relevant pH and lipase *in vitro* models of gastric digestion. *Food Funct.* 2016;7(1):30-45.
28. Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, et al. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol.* 1996;271(1 Pt 1):G172-83.
29. Abrams CK, Hamosh M, Dutta SK, Hubbard VS, Hamosh P. Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology.* 1987;92(1):125-9.
30. Carriere F, Grandval P, Renou C, Palomba A, Prieri F, Giallo J, et al. Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(1):28-38.
31. Pafumi Y, Lairon D, de la Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, et al. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *J Biol Chem.* 2002;277(31):28070-9.
32. Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB, Hamosh P. Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants. *J Clin Invest.* 1981;67(3):838-46.
33. Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dutta SK, Hamosh P. Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin Invest.* 1984;73(2):374-82.
34. De Caro A, Figarella C, Amic J, Michel R, Guy O. Human pancreatic lipase: a glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1977;490(2):411-9.
35. Lowe ME, Rosenblum JL, Strauss AW. Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA. *J Biol Chem.* 1989;264(33):20042-8.
36. Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature.* 1990;343(6260):771-4.
37. van Tilbeurgh H, Egloff MP, Martinez C, Rugani N, Verger R, Cambillau C. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* 1993;362(6423):814-20.
38. Erlanson-Albertsson C. Pancreatic colipase. Structural and physiological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1125(1):1-7.
39. Patton JS, Albertsson PA, Erlanson C, Borgstrom B. Binding of porcine pancreatic lipase and colipase in the absence of substrate studies by two-phase partition and affinity chromatography. *J Biol Chem.* 1978;253(12):4195-202.



40. Bernback S, Blackberg L, Hernell O. Fatty acids generated by gastric lipase promote human milk triacylglycerol digestion by pancreatic colipase-dependent lipase. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1001(3):286-93.
41. Ranaldi S, Belle V, Woudstra M, Rodriguez J, Guigliarelli B, Sturgis J, et al. Lid opening and unfolding in human pancreatic lipase at low pH revealed by site-directed spin labeling EPR and FTIR spectroscopy. *Biochemistry*. 2009;48(3):630-8.
42. Riethorst D, Mols R, Duchateau G, Tack J, Brouwers J, Augustijns P. Characterization of human duodenal fluids in fasted and fed state conditions. *J Pharm Sci*. 2016;105(2):673-81.
43. Sternby B, Nilsson A, Melin T, Borgstrom B. Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents. Radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand J Gastroenterol*. 1991;26(8):859-66.
44. Fatouros DG, Müllertz A. Using *in vitro* dynamic lipolysis modeling as a tool for exploring IVIVC relationships for oral lipid-based formulations. In: Hauss DJ, editor. *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs*. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 257-71.
45. Cuine JF, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Porter CJ. Increasing the proportional content of surfactant (Cremophor EL) relative to lipid in self-emulsifying lipid-based formulations of danazol reduces oral bioavailability in beagle dogs. *Pharm Res*. 2007;24(4):748-57.
46. Zaro JL. Lipid-based drug carriers for prodrugs to enhance drug delivery. *AAPS J*. 2015;17(1):83-92.
47. Carter GW, Young PR, Swett LR, Paris GY. Pharmacological studies in the rat with [2-(1,3-didecanoyloxy)-propyl]2-acetyloxybenzoate (A-45474): an aspirin pro-drug with negligible gastric irritation. *Agents Actions*. 1980;10(3):240-5.
48. Delie F, Couvreur P, Nisato D, Michel JB, Puisieux F, Letourneux Y. Synthesis and *in vitro* study of a diglyceride prodrug of a peptide. *Pharm Res*. 1994;11(8):1082-7.