

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 6 • D E C E M B E R 2 0 0 8 • L E T N I K 5 9

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Andrijana Tivadar

Uredniški odbor

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

Izdajateljski svet

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

Naslov uredništva / 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\$.

Avtor fotografije na naslovnici, Maj Klemenčič

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.200 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

Letnik 2008 sofinancira

Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.

UVODNIK

Prihaja čas veselja, obdarovanja in čas za pogled nazaj, na preteklo leto. Analiziramo, kako je bilo uspešno, kaj nam je prineslo, koliko nalog in želja smo izpolnili. Kar zadeva Farmaceutski vestnik, smo lahko kar zadovoljni. Izšlo je šest rednih in ena izredna številka FV, kar nam dosedaj še ni uspelo. In kakšne so bile vsebine? V uredništvu smo se trudili, da je Vestnik prinašal najnovejše vesti iz sveta farmacije, pri preglednih člankih pa smo poskušali zaobjeti kar najširše področje multidisciplinarnih ved in znanosti, ki predstavljajo del farmacije. Tako je bilo objavljeno 8 člankov s področja farmacevtske tehnologije, 6 s področja farmacevtske kemije, 10 s širšega področja medicinskih ved, 6 iz lekarniške in socialne farmacije, 3 iz področja biofarmacije, farmakokinetike in farmakodinamike, 11 s področja farmacevtske biologije in 6 s področja klinične biokemije. Pestra izbira, na katero smo lahko ponosni. Tudi v naslednjem letu se bomo trudili, da bodo zastopane vse strokovne in znanstvene veje farmacije, a seveda le z vašo pomočjo, zato se vsem avtorjem prispevkov v letu 2008 iskreno zahvaljujem in vam, da enako zavzeto doprinesejo k raznolikosti Vestnika tudi v letu 2009.

Z željo, da bo naslednji letnik Farmaceutskega vestnika, ki bo praznoval jubilejno šestdesetletnico svojega izhajanja, vsebinsko še bogatejši, vas, spoštovane bralke in bralci, v imenu uredništva v prihajajočem letu 2009 prisrčno pozdravljam in želim uresničitev vaših največjih želja.

Prof.dr. Borut Štrukelj

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Karmen Teskač, Natalija Hudournik, Romana Marinšek-Logar, Julijana Kristl Pomen probiotikov kot prehranskih dopolnil in zdravil <i>Importance of probiotics as food supplements or drugs</i>	287
Polona Smrdel, Marija Bogataj, Aleš Mrhar Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem <i>Alginate in controlled drug delivery systems</i>	293
Vojko Berce, Uroš Potočnik Farmakogenomika v zdravljenju astme <i>Pharmacogenomics in asthma treatment</i>	303
Lucija Lipičnik Rozman Uporaba zdravilnih rastlin med nosečnostjo <i>Use of medicinal herbs during pregnancy</i>	307
Petra Finderle, Marija Prezelj Primerjava metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov <i>Comparison of methods for measurement of carbohydrate deficient transferrin</i>	311

Izvirni znanstveni članek – Original scientific article

Nadja Plazar, Mihaela Jurdana, Rado Pišot Vpliv 35 dnevnega mirovanja na koncentracijo homocisteina v krvi <i>The effect of 35-day bed rest on plasma homocysteine concentration</i>	319
---	------------

<i>Novice iz sveta farmacije</i>	323
----------------------------------	------------

<i>Zahvala recenzentom</i>	324
----------------------------	------------

<i>Letno kazalo</i>	325
---------------------	------------

Pomen probiotikov kot prehranskih dopolnil in zdravil

Importance of probiotics as food supplements or drugs

Karmen Teskač, Natalija Hudournik, Romana Marinšek-Logar, Julijana Kristl

Povzetek: Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki po zaužitju ugodno vplivajo na zdravje. Kadar je gostiteljeva fiziologija prizadeta zaradi porušenega ravnotežja črevesne mikrobiote, je zelo dobrodošla zunanja probiotična podpora. Učinkovitost probiotikov je odraz njihovega delovanja po različnih medsebojno prepletenih mehanizmih in tako opravljajo veliko koristnih nalog. Predvsem zmanjšajo pogostnost okužb, prek metabolnih procesov uravnajo fiziologijo organizma ter okrepijo gostiteljev imunski sistem.

Tržno dostopni probiotični izdelki so namenjeni samozdravljenju in so neomejeno dostopni uporabnikom. Zato morajo biti varni, imeti majhno tveganje za neželene učinke ter ne smejo biti niti genotoksični niti kancerogeni. Proizvajalci teh izdelkov morajo zagotoviti izbiro probiotikov, izdelanih po natančno določenih selekcijskih merilih varnostne, funkcionalne in tehnološke kakovosti. Samo probiotiki, ki izpolnjujejo te kriterije, zmorejo preživeti neugodne pogoje v prebavilih in se naseliti v okolju debelega črevesa, kjer lahko izrazijo svoj probiotični učinek.

Ključne besede: probiotiki, črevesna mikrobiota, varnost, učinkovitost, tržni izdelki

Abstract: Probiotics, which are living microorganisms and are able to express beneficial effects on health when ingested, are presented. When host physiology is affected due to the demolished microbiota balance, the consumption of probiotics is advised. Complex mechanisms of action lead to many beneficial probiotic effects. The most prominent are decreased frequency of infections, normalization of physiology through metabolic processes, and strengthening of host immune system as well.

Probiotic products available on the market are used for self-treatment and are limitlessly available to the consumers. For this reason they should be safe, have low potential for undesired effects and must not be genotoxic or carcinogenic. Manufacturer of these products have to assure that a selection of probiotic covers safety, functional and technological views. When probiotics suit these criteria, they can survive unfavorable conditions of gastrointestinal tract and colonize large intestine where probiotic effect can be sufficiently expressed.

Key words: probiotics, gastric microbiota, safety, efficacy, market products

1 Uvod

Ponudniki vse več tržno dostopnih probiotičnih izdelkov nas prepričujejo, da njihovo uživanje pozitivno vpliva na naše zdravje, ki ga najbolj prizadenejo negativne posledice današnjega hitrega življenjskega tempa. Navodilo enega od probiotičnih pripravkov pravi, da: »... dodatek probiotika X k hrani zagotavlja uravnoteženje črevesne mikrobiote, ki je nepogrešljiva za dobro počutje in močan imunski sistem. Izdelek vsebuje probiotične kulture in se priporoča kot dodatek k zdravljenju z antibiotiki, ko pride pogosto do motenj v ravnovesju črevesne flore, predvsem zaradi naselitve množice zdravju škodljivih bakterij in klic ...«. Je torej uživanje probiotikov ena od skrivnosti zdravega in dolgega življenja?

2 Probiotiki kot podpora naravni črevesni flori

Danes je veljavna definicija, ki so jo sprejeli tudi organi Organizacije združenih narodov (OZN), pristojni za zdravje in prehrano, pri Svetovni zdravstveni organizaciji (SZO) (World Health Organization - WHO) in Organizaciji za prehrano in kmetijstvo (The Food and Agriculture Organization - FAO). Po njej so probiotiki živi mikroorganizmi, ki dodani prehrani ali krmi vplivajo na gostiteljevo fiziologijo tako, da okrepijo črevesni in sistemski imunski odgovor ter izboljšajo prehransko in mikrobno ravnovesje v prebavilih (1).

Črevesna mikrobiota spada med najbolj celostne sisteme, na splošno je dobro prilagojena, izjemno stabilna in precej specifična za posameznika. Porazdelitev mikrobiote v prebavilih je v posameznih predelih zelo raznolika, medtem ko število mikroorganizmov narašča vzdolž prebavne poti (slika 1) (2). Trenutno je poznanih okoli 1250 različnih filotipov črevesnih bakterij, pretežno striktnih anaerobov, od katerih je približno 85 % nujno potrebnih za normalno delovanje črevesja, v manjšem obsegu pa so prisotne tudi potencialno patogene bakterije (3). V normalnih pogojih stabilnega delovanja prebavil prevladujejo nevtralni in zdravju koristni mikroorganizmi (4). Navadno se črevesna mikrobiota stabilizira pri dvehletnih otrocih. S staranjem se začne obseg dobre flore zmanjševati, črevesna stena pa slabše vsrkavati hranila. Na ravnovesje črevesne mikrobiote negativno vpliva sodoben način življenja, ki lahko pripelje do prevlade patogenih mikroorganizmov, kar poruši mikrobno ravnotežje in povzroči preobrat iz koristnega v škodljivo delovanje (5). V tovrstnih primerih je zelo dobrodošla zunanja podpora s probiotiki, kar je potrjeno s številnimi znanstvenimi prispevki.

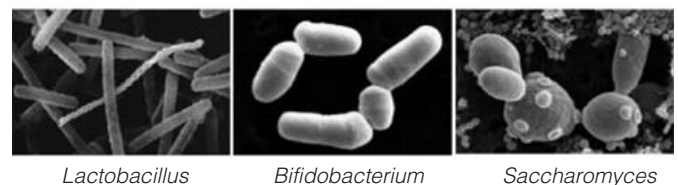
	CELOKUPNO ŠTEVILO BAKTERIJ	ŠTEVILO BIFIDO- BAKTERIJ	ŠTEVILO LAKTO- BACILOV
ŽELODEC	0-10 ⁴	0-10 ²	0-10 ³
TANKO ČREVO			
JEJUNUM	0-10 ⁵	0-10 ⁴	0-10 ⁴
ILEUM	10 ⁴ – 10 ⁹	10 ³ – 10 ⁸	10 ² – 10 ⁵
DEBELO ČREVO	10 ⁹ – 10 ¹²	10 ⁸ – 10 ¹¹	10 ⁶ – 10 ⁸

Slika 1: Poseljenost posameznih delov prebavil z mikrobioto. Številke izražajo število vseh bakterij oz. samo bifidobakterij in laktobacilov na gram vsebine (CFU/g; colony forming units). Skupno število bakterij v želodcu je običajno pod 10⁴ CFU/g vsebine, kar je posledica kislega pH v želodcu. V tankem črevesu je število med 10⁴ v začetnem delu do 10⁸ CFU/g v končnem. Glavni omejevalni dejavniki so hiter prehod hrane, izločkov žolča in encimov slinavke. Najpogosteje je poseljeno debelo črevo, kjer gram vsebine vsebuje do 10¹² bakterij (2).

Figure 1: Distribution of microbiota in gastrointestinal tract. Data present the quantity (CFU/g) of all bacteria or only *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, respectively. In stomach, the number of bacteria is under 10⁴ CFU/g of content due to the low pH. In the small intestine, the presence of microbiota is increasing from 10⁴ CFU in the upper part to 10⁸ CFU/g in the lower. The reasons are fast food passage and secreting products of bile and pancreatic enzymes. The most colonized is large intestine where a gram of content contains 10¹² CFU (2).

3 Vrste probiotikov

Na trgu dosegljivi pripravki vsebujejo bakterijske seve, ki so enaki oz. karseda podobni mikrobioti, katera je naravno prisotna v prebavilih. Tako prevladujejo bakterije iz roda *Lactobacillus* (npr. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosa* GG ...) in *Bifidobacterium* (npr. *B. bifidum*, *B. thermophilum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* ...) (slika 2), velikokrat pa so prisotni še sevi rodov *Lactococcus* (npr. *L. lactis*) in *Enterococcus* (npr. *E. faecium*). Čeprav rod *Bifidobacterium* ne pripada mlečnokislinskim bakterijam, ima kar nekaj njihovih lastnosti, npr. gram-pozitivnost, fermentativnost, tvorbo laktata in druge. Zato so med mlečnokislinske bakterije povečini uvrstili vse navedene rodove, vključno z rodom *Bifidobacterium*. Probiotikom podobne učinke pripisujejo tudi nekaterim drugim mikroorganizmom, ki niso naravno prisotni v prebavilih, npr. kvasovkam (*Saccharomyces boulardii*) (slika 2) (6).



Slika 2: Morfologija nekaterih probiotičnih bakterij (Avtorji fotografij: SciMAT/Photo Researchers).

Figure 2: Morphology of some probiotic microorganisms (Photo Credit: SciMAT/Photo Researchers).

4 Osnovni mehanizmi probiotičnega delovanja

Probiotiki delujejo po različnih mehanizmih, med drugim so sposobni tvoriti kratkoveržne maščobne kisline, ustvarjati neugodne življenjske pogoje za patogene bakterije ter uravnavati homeostazo obrambnih mehanizmov,

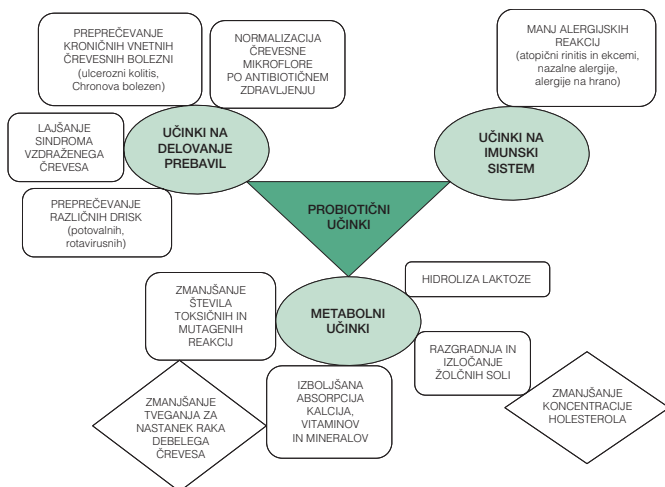
Probiotiki ojačijo epitelno pregrado črevesne stene ter pospešijo njeno obnovo posredno s fermentacijsko tvorbo kratkoveržnih maščobnih kislin, ki so prisotne v obliki soli, kot so acetat, butirat in propionat. Našteti metaboliti so neposredni hranilni substrati za sluznične celice, zato pospešujejo njihovo rast. Prav tako povečujejo absorpcijo vode in neposredno vplivajo na tvorbo proteinov akutne faze ter vnetnih mediatorjev, kot so interleukini IL-6, IL-10 in drugih. Sodelujejo tudi pri procesih programirane apoptoze (7).

Probiotične bakterije so sposobne z mehanizmom kompetitivnega izločanja zasesti mesto na črevesni sluznici, kamor se sicer pripenjajo patogene bakterije, ki tako sprožijo črevesno okužbo. Probiotiki dosegajo odpornost proti naselitvi patogenih bakterij tudi z ustvarjanjem neugodnih življenjskih pogojev, kot je tvorba bakteriocinov in laktata, ter s kompeticijo za hranilne snovi (8).

Probiotiki uravnavajo tudi homeostazo obrambnih mehanizmov, saj so sposobni z aktivacijo imunskih celic inducirati imunske mehanizme proti kroničnim okužbam (9). Izredno močan vpliv na imunski sistem imajo tudi zato, ker je v črevesju kar 70-odstotni delež imunskega sistema (gut associated lymphoid tissue - GALT).

5 Učinki probiotikov

Probiotično delovanje se prepleta s številnimi koristnimi učinki na gostiteljevo črevesno mikrobioto in vzdrževanje homeostaze. Povzetek probiotičnih učinkov shematično prikazuje slika 3 (10).



Slika 3: Spekter koristnih probiotičnih učinkov, doseženih z delovanjem na gostiteljevo prebavno pot.

Figure 3: Spectra of beneficial probiotic effects achieved by their action on the host gastrointestinal tract.

Tako je npr. protitumorski učinek (oz. pozitivni učinek 'podpornega' zdravljenja raka na debelem črevesu) rezultat kombinacije procesov, kot so: povečan imunski odziv; zaviranje delovanja določenih bakterij ali encimov, ki tvorijo karcinogene iz prokarcinogenov; vezava in razgradnja karcinogenov oz. mutagenih snovi; ter tvorjenje protitumorskih snovi (11). Nekatere učinke pa pripisujejo samo določenim vrstam mikroorganizmov. Za bifidobakterije so npr. ugotovili, da v prebavilih sintetizirajo vitamine, kot so vitamin B₁, B₂, B₆ in K. Tako gostitelja oskrbijo z določenimi biološko aktivnimi snovmi, ki jih sam ne more tvoriti. Bifidobakterije so sposobne sintetizirati tudi nekatere pomembne aminokisliline. Zraven šibke proteolitične aktivnosti mlečnokislinskih bakterij tudi povečajo absorpcijo kalcija iz prebavil (12). Kljub vsem naštetim lastnostim, ki opravičujejo uporabo probiotikov v številne koristne namene, je njihov glavni cilj najpogosteje zmanjšanje pojavnosti prebavnih težav, predvsem drisk in drugih okužb, povzročenih npr. z bakterijama *Clostridium difficile* ali *Helicobacter pylori*.

6 Merila za izbiro varnih, učinkovitih in tehnološko sprejemljivih probiotičnih sevov

Probiotiki so namenjeni samozdravljenju oz. preprečevanju, lajšanju in odpravljanju simptomov in zdravstvenih težav, ki ne zahtevajo posvetovanja z zdravnikom. To pomeni, da mora biti verjetnost nepravilnega prepoznavanja bolezni in nepravočasnega zdravljenja zmanjšana na najmanjšo mero. Ker so probiotični izdelki neomejeno

dostopni uporabnikom, morajo biti čim bolj varni po sestavi, torej imeti veliko terapevtsko širino in majhno tveganje za neželene učinke ter ne smejo biti genotoksični niti kancerogeni. Proizvajalci probiotikov morajo zagotoviti, da bo celoten nabor pripravkov izdelan po natančno določenih selekcijskih merilih (13), ki določajo varnostne, funkcionalne in tehnološke postavke.

6.1 Varnostni profil probiotičnih sevov

Kljub dolgotrajni zgodovinski uporabi mlečnokislinskih bakterij oz. njihovi normalni prisotnosti v človeški mikrobioti se moramo zavedati, da gre za živa bitja s spremenljivim genomom, zaradi česar obstaja možnost, da bi okužila gostitelja (14). Za nekaj sevov iz rodu *Enterococcus* se je izkazalo, da so zmožni povzročiti okužbe, saj so bili tkivno izolirani v primerih endokarditisa, okužb ran in sečil ter še nekaterih drugih zapletih (15). Opisali so tudi pojav fungemije v povezavi s kvasovko *Saccharomyces boulardii* (16). Primeri okužb s sevi iz rodu *Lactobacillus* so izjemno redki in večinoma omejeni na bolnike z oslabiljeno imunostjo. Opisana je tudi možnost čezmerne stimulacije imunskega sistema pri bolnikih z artritisom (17).

V okviru evropskega projekta (Biosafety evaluation of probiotic lactic acid bacteria used for human consumption – PROSAFE), ki je v obdobju 2002 do 2006 proučeval varno uporabo probiotičnih mlečnokislinskih bakterij za humano uživanje, so prišli do nekaterih novih dognanj. Na njihovi osnovi so priporočili merila, standarde, zakonodajo in postopke ter uvedli nove standardizirane metode za preizkušanje varnosti probiotikov pred prihodom na tržišče in tudi na tržišču. Pomembne cilje projekta PROSAFE prikazuje preglednica I (18).

6.2 Funkcionalni vidik probiotičnih sevov

Probiotični sev mora zadostiti tudi kriterijem funkcionalnosti, ki so rezultat sklopljenosti zgoraj opisanih probiotičnih mehanizmov, kateri se lahko prevesijo v človeku škodljivo delovanje.

Adhezijska in kolonizacijska sposobnost probiotika podaljša čas njegovega zadrževanja v prebavilih in poveča učinkovitost odstranjevanja neželenih črevesnih bakterij. Prav tako obstaja večja verjetnost spodbujanja imunskega sistema, saj omogoča probiotikom stik z limfoidnim tkivom debelega črevesa, ki je posrednik tako lokalnih kot sistemskih imunskih odgovorov. Vendar lahko adhezijska in kolonizacijska sposobnost povečata pojavnost okužb, kar se je pokazalo pri laktobacilih. Njihov izolat iz tkiva z endokarditisom je izkazoval povečano vezavo na fibronektin, fibrinogen in kolagen. Kljub vsemu še nimamo prepričljivih dokazov o povezavi med adhezijskimi sposobnostmi bakterij in njihovo varnostjo (19). Znano je, da se probiotični mikroorganizmi zadržijo v prebavnih poteh le nekaj dni. Torej lahko sklepamo, da učinek hitro izgine, ko nehamo uživati probiotični izdelek (20).

Dolgotrajna uporaba mlečnokislinskih bakterij in dosedanje *in vivo* raziskave kažejo na izredno pozitivno sprejemljivost probiotikov. Tako sta npr. probiotika *L. rhamnosus GG* in *L. reuteri SD2222* izkazala dobre rezultate v drugi fazi kliničnih raziskav, saj sta statistično izboljšala bolezensko stanje in kakovost življenja. Zmanjšala se je tudi pogostnost zbolevanja. Ugotovili so hitrejšo okrevanje ob jemanju probiotika v primerjavi s placebom. Podobne rezultate so dosegli tudi v tretji fazi kliničnih raziskav, v kateri so učinkovitost probiotika primerjali s standardno terapijo. Alternativa pri zdravljenju vse

Preglednica 1: Priporočena varnostna opredelitev mlečnokislinskih bakterij (povzeto po 18)

Table 1: Recommended safety assessments of lactic acid bacteria (summarized from 18)

RAZISKOVALNI CILJI	METODOLOGIJA
TAKSONOMSKI OPIS MKB	→ biokemijske in molekulske metode (npr. sekvenčna analiza 16S rDNK v neodvisnem taksonomsko ekspertnem laboratoriju)
ODKRIVANJE ANTIBIOTIČNE ODPORNOSTI IN UGOTAVLJANJE NJIHOVEGA HORIZONTALNEGA PRENOSA PRI MKB	→ določanje minimalne inhibicijske koncentracije protimikrobnega zdravila (test mikrorazredčevanja gojišča LSM)
ODKRIVANJE ZNANIH IN NOVIH VIRULENTNIH DEJAVNIKOV PRI MKB	→ prisotnost sekundarnih prostih žolčnih kislin, ki so domnevno mutagene (test določanja dekonjugacije primarnih žolčnih soli, ki so končni produkti metabolizma holesterola). (Izkazala se je tudi pozitivna stran omenjene pretvorbe v smislu zniževanja ravni serumskega holesterola.) → analiza probiotičnih metabolitov ter virulentnih dejavnikov (genov), kot so hemolizini, hialuronidaza, adhezini, gelatinaza, agregacijska snov, citolizin (uporaba <i>in vitro</i> modela kolona)
UGOTAVLJANJE MOŽNIH NEGATIVNIH UČINKOV NA IMUNSKI SISTEM	→ model podganjega endokarditisa [laktobacili so izkazali 100- do 10.000-krat manjšo kužnost od običajnih povzročiteljev endokarditisa, kot sta <i>Staphylococcus aureus</i> in <i>Streptococcus viridans</i>] → mišji model imunske oslabilnosti (kontrola spreminjanja mase živali, anatomskih parametrov, ugotavljanje translokacije bakterij v kri, vranico in jetra ...)
VARNOST PRI LJUDEH	→ ugotavljanje preživetja, poselitve ter genotipske in fenotipske stabilnosti MKB po peroralnem vnosu (1. faza kliničnih raziskav)

Legenda: MKB - mlečnokislinske bakterije; LSM - gojišče, primerno za proučevanje mlečnokislinskih bakterij (*Lactic Acid Bacteria Susceptibility test Medium*)

pogostnejših hiperholesterolemij bi lahko bile tudi mlečnokislinske bakterije *L. reuteri* CRL1098. Po njihovem jemanju (10^4 na dan - sedemdnevna terapija) se je za 17 % povečalo razmerje HDL/LDL, ne da bi se ob tem pojavili kakršni koli pomembni neželeni učinki (21).

6.3 Tehnološki vidik probiotičnih sevov

Če probiotični sev ustreza prvima dvema meriloma (o varnosti in funkcionalnosti), sledi preverjanje tehnoloških parametrov, ki opredeljujejo obstojnost probiotika med proizvodnjo. Zaradi izrazite raznolikosti probiotičnih sevov se veliko proizvajalcev odloča za lastno gojenje določenega probiotičnega seva z definirano funkcionalnostjo in robustnostjo. Samo dovolj stabilni probiotični sevi zmorejo preživeti tehnološke postopke, skladiščenje in distribucijo. Zaželeno je, da dodani probiotični sev nima negativnega vpliva na senzorične lastnosti izdelka.

Po drugi strani pomeni velik izziv za proizvajalce vključevanje probiotičnih sevov v zanje nenaravna okolja oz. v 'nemlečne' izdelke. S primerno izbiro farmacevtske oblike in z optimizacijo proizvodnih postopkov je možno zmanjšati obremenitev probiotikov in tako povečati njihovo obstojnost pri izpostavljenosti povišani temperaturi, vlagi, kisiku, kislem želodčnem okolju, žolčnim kislinam in prebavnim encimom ter tako prispevati k večjemu preživetju probiotičnih mikroorganizmov. Samo doseg dovolj visoke koncentracije probiotika v debelem črevesu zagotavlja določeno učinkovitost. Upoštevati je potrebno, da je uporabnikom najprijaznejše peroralno jemanje, predvsem v trdni farmacevtski obliki. Te vsebujejo probiotike v suhem stanju, kar omogoča večjo obstojnost probiotikov in tudi enostavnejšo distribucijo. Zaradi občutljivosti probiotikov za povišane temperature

je kljub finančno ugodnejšemu sušenju z razprševanjem primernejša metoda liofilizacija (sušenje z zamrzovanjem) (20). Z upoštevanjem navedenega se uspešno uveljavlja mikrokapsuliranje in oblaganje probiotičnih sevov z gastrorezistentno oblogo ter tudi dodajanje prebiotikov (22). Slednji so vlaknine, največkrat inulin, ki jih bakterije debelega črevesa med fermentacijo pretvorijo v nižje maščobne kisline (glejte poglavje 4. *Osnovni mehanizmi probiotičnega delovanja*) (23). Nenazadnje pa so se mlečnokislinske bakterije (*Lactococcus lactis*) izkazale tudi kot primeren sistem za izražanje proteina sladkega okusa, npr. brazeina, s čimer bi se lahko v prihodnosti izognili vse prepoznanim nezdravim sladilom v mlečnih probiotičnih izdelkih (24).

7 Probiotični izdelki

Skoraj neverjetno je pričakovati, da bi lahko z vnosom probiotikov v tako celosten in specifičen mikroben sistem, kot vlada v prebavilih, dosegli opazno spremembo. Vendar se je izkazalo, da učinki probiotikov prispevajo k stabilnosti mikrobiote in v določenih patoloških stanjih ugodno spremenijo potek bolezni (25). Tako kljub temu, da so le redke probiotične bakterije dovolj znanstveno proučene v smislu njihovega vpliva na zdravje, tržišče beleži izrazit porast probiotičnih izdelkov. Po pričakovanju mora proizvajalec zagotavljati pravilno deklariran, funkcionalen in varen izdelek. Žal se proizvajalci pogosto zanašajo le na uveljavljeni status laktobacilov in bifidobakterij kot varnih bakterij (Generally Recognized as Safe - GRAS), pri tem pa zanemarijo številne pomembne kriterije, ki opredeljujejo varnost mlečnokislinskih bakterij (26).

Probiotične izdelke lahko najdemo v trgovinah z živili, specializiranih prodajalnih in lekarnah, kot živila, prehranska dopolnila ali zdravila. Kako torej v današnji pestri ponudbi probiotičnih izdelkov izbrati varen in učinkovit pripravek?

I. Fermentirani mlečni izdelki so naravno ekološko okolje probiotikov, zato jih uvrščamo v skupino funkcionalne hrane. Telesu nudijo nekaj več od osnovne hrane, saj izkazujejo pozitiven učinek na zdravje, s čimer zabrišejo mejo med hrano in zdravili. Ker so največkrat prisotne bakterije s statusom GRAS, morajo ti izdelki zadostiti merilom, ki veljajo za vso hrano. Priporočljivo je upoštevati rok uporabe, saj se v času do njegovega izteka količina koristnih bakterij v izdelku zmanjšuje in pade na vrednost, pri kateri več ne doseže probiotičnega učinka.

II. V zdravilih in prehranskih dopolnilih v obliki kapsul ali tablet se probiotiki najpogosteje nahajajo kot koncentrirani in stabilizirani mikroorganizmi (preglednica II), ki večinoma ustrezajo priporočilu, da mora biti za doseganje probiotičnega učinka dnevni odmerek vsaj 10^8 CFU (27).

a) Na slovenskem tržišču so kot zdravilo brez recepta registrirane samo kapsule Linex®. Klasifikacija ATC jih uvršča v farmakoterapevtsko skupino A (Zdravila za bolezni prebavil in presnove): A07 (Antidiaroiiki, protivnetna in protimikrobna zdravila), A07FA (Mikroorganizmi z antidiaroičnim delovanjem), A07FA01 (Mlečnokislinske bakterije) (28). Po definiciji je zdravilo med drugim namenjeno tudi za preprečevanje bolezni ali bolezenskih stanj in mora imeti preverjene kakovost, varnost in učinkovitost, za kar poskrbijo proizvajalci in nadzorujejo pristojni državni organi.

b) Druga skupina farmacevtskih oblik, ki vsebujejo probiotike, so prehranska dopolnila. Pravilnik o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 82/03 in 44/04) v 3. členu dopušča prisotnost mikroorganizmov v teh izdelkih. Izkazani morajo biti hranilni ali fiziološki učinki, njihova varnost za prehrano ljudi pa znanstveno utemeljena. Namen prehranskih dopolnil je dopolnjevati običajno prehrano (2. člen pravilnika) in ne zdraviti ali preprečevati bolezni in bolezenskih stanj (7. člen pravilnika). Jasno mora biti označena kakovostna in količinska vsebnost, priporočeni dnevni odmerek ter nevedbi: »Prehransko dopolnilo« ter »Prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano.« in opozorili: »Priporočenega dnevnega odmerka ne smemo prekoračiti.« ter »Shranjevati nedosegljivo otrokom!« (8. člen pravilnika). Ustreznost izdelka nadzoruje uradni organ. Slovenska zakonodaja sicer ne predpisuje, da bi neodvisni državni organi predhodno morali preverjati dejansko sestavo prehranskega dopolnila, vendar se kontrole kvantitativne sestave na slovenskem tržišču občasno izvajajo. Ministrstvo za zdravje lahko zahteva od proizvajalca oz. uvoznika dodatno strokovno dokumentacijo (znanstveno raziskavo), da gre za prehransko dopolnilo (11. člen pravilnika) (30).

Oznaka 'prehransko dopolnilo' prihrani proizvajalcu kar nekaj časa in stroškov, čeprav nemalo prehranskih dopolnil podpirajo izvedeni klinični poskusi. Veliko teh izdelkov je proizvedenih v drugih evropskih državah, kjer so na tržišču kot prehranska dopolnila in so kot taka prišla na tržišče tudi v Slovenijo. Prehranska dopolnila in živila naj bi bila kakovostna in varna.

Preglednica I: Nekateri probiotični izdelki, dosegljivi v Sloveniji kot zdravila brez recepta ali prehranska dopolnila za peroralno uporabo.

Table II: Some of probiotic products in Slovenia in a form of drugs available without prescription or food supplements for peroral use.

Probiotični izdelek	Vrsta mikroorganizmov	Število mikroorganizmov
Linex® - kapsule	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Ena kapsula vsebuje $1,20 \times 10^7$ liofiliziranih MKB
Prolife® - kapsule	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	$6,0 \times 10^8$
Prolife® - pastile	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	$5,0 \times 10^8$
Probio® - kapsule	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$22,5 \times 10^8$ $7,50 \times 10^8$ $2,50 \times 10^8$ $7,50 \times 10^8$ $0,50 \times 10^8$ $5,00 \times 10^8$
Bion 3 (Junior)® - tablete	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Ni podatka
Acidophillus NOW 4x6® - kapsule	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	$2,00 \times 10^9$ $1,20 \times 10^9$ $0,20 \times 10^9$ $0,20 \times 10^9$ $0,20 \times 10^9$ $0,20 \times 10^9$

Legenda: MKB – mlečnokislinske bakterije

Velikokrat trgovci ne upoštevajo določil o nenavajanju ali neoglaševanju zdravilnega učinka svojega izdelka in v želji po zaslužku pogosto izkoriščajo lahkovernost ljudi. V tem oziru je pomembno, da izpostavimo lekarniško dolžnost varovanja potrošnikov pred zavajanjem in lažnimi obljubami o zdravilnih učinkih določenega izdelka. Vsi učinki morajo biti metodološko in statistično dokazani ter preverjeni po določilih Pravidnika o farmakološko-toksikološkem preskušanju zdravil in Pravidnika o kliničnem preskušanju zdravil. Izdelki morajo biti predstavljeni čim bolj objektivno in brez pretiravanj ter olepševanj. Kljub omenjenim varnostnim ukrepom in neprestanemu državnemu nadzoru je pri tovrstnih izdelkih in načinu njihove prodaje bistvena končna odločitev uporabnika oz. kupca, ki bi moral biti bolj osveščen. Žal so obljube velikokrat prepričljivejše od realnih strokovnih mnenj in svetovanj. Tako postanejo najzanimivejši predvsem izdelki, ki naj bi čudežno rešili težave, ne da bi bilo potrebno kakorkoli spreminjati nezdravi slog življenja.

8 Sklep

Sodoben življenjski slog negativno vpliva na ravnotežje mikrobnih populacije in imunski status v človeškem telesu. Tako normalna mikrobiota kloni pred patogenim bakterijam, kar prizadene številne funkcije in vodi v hiter porast sodobnih bolezni, kot so obolenja srca in ožilja, rakava obolenja, povišan krvni tlak, sladkorna bolezen, alergije, avtoimunske in vnetne bolezni. V teh primerih lahko s probiotičnimi izdelki, ki vsebujejo zdravju koristne mikroorganizme, ponovno vzpostavimo ravnovesje črevesne mikrobiote, zmanjšamo možnost okužb ter okrepimo črevesni obrambni mehanizem. Zato je povsem pričakovan porast probiotičnih izdelkov, ki učinkujejo na sestavo in aktivnost mikrobiote v prebavilih.

Oblikovani so enotni selekcijski kriteriji za probiotične seve, ki morajo biti izpolnjeni, da lahko pričakujemo probiotični učinek. Zaželeno je, da bi bili na trgu dosegljivi oz. uporabljeni probiotiki taksonomsko identificirani, nepatogeni ter fizikalno odporni proti določenim tehnološkim procesom. Optimizacija proizvodnje in izbira primerne farmacevtske oblike povečata preživetje probiotikov pri prehodu skozi prebavila do debelega črevesa, kjer izrazijo svoj probiotični učinek v smislu izboljšanja gostiteljeve fiziologije.

9 Literatura

1. Naidu AS, Bidlac WR, Clemens RA. Probiotic spectra of Lactic Acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1999; 38: 113-126.
2. Medigan MT, Martinko JM. *Microbial Interactions with Humans*. V: Brock Biology of Microorganisms. Pearson Prentice Hall, 2005: 700-725.
3. Zoetendal EG. Microbial players in the human GI tract. *Folia Microbiologica* 2008; in press.
4. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*, 2001; 73 (suppl): 410S-414S.
5. Gismondo MR, Drago L, Lombardi A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int J Antimicrob Agents*, 1999; 12: 287-292.
6. Salminen S. Gut bacteria and health foods – the European perspective. *Int J Food Microbiology*, 2002; 78 (1-2): 99-117.
7. Rogelj I. Probiotiki v vlogi prehranskih dopolnil in zdravil. V: Milnarič A, Kristl J. Prehranska dopolnila – zdravila ali hrana (podiplomsko strokovno izobraževanje); Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2002: 105-115.
8. Arribas B, Rodriguez ME, Camuesco D in sod. Therapeutic applications of probiotics. *Ars Pharm*, 2008; 49 (1): 5-30.
9. McCracken VJ, Gaskins HR. Probiotics and the immune system. V: Tannock GW. *Probiotics: a critical review*. Norfolk, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 1999: 85-111.
10. Shah NP. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J*, 2007; 17: 1262-1277.
11. Morelli L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Inter Dairy J*, 2007; 17: 1278-1283.
12. Singhi S. Probiotics in the critically ill: Handle with care. *Pediatr Crit Care Med*, 2007; 8 (5): 499-501.
13. Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R in sod. Gut bacteria and health foods – the European perspective. *Int J Food Microbiol*, 2002; 78 (1-2): 99-117.
14. Reid G, Jass J, Sebulsky MT in sod. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16(4): 658-672.
15. Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol*, 1999; 47:1-24.
16. Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A in sod. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000; 19: 16-20.
17. Senok AC, Ismaeel AY, Botta GA. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect*, 2005; 11(12): 958-66.
18. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M in sod. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science & Technol*, 2008; 19 (2): 102-114.
19. Rastall RA, Gibson GR, Gill HS in sod. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005; 52 (2): 145-152.
20. Mattila-Sandholm T, Myllylaerinen P, Crittenden R in sod. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J*, 2002; 12: 173-182.
21. Taranto MP, Medici M, Perdigon G in sod. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J Dairy Sci*, 2000; 83: 401-403.
22. Prakash S, Bhatena J. Live immobilized cells as new therapeutics. *J Drug Del Sci Tech*, 2008; 18 (1): 3-14.
23. Kreft S. Polisaharidi v prehrani. V: Milnarič A, Kristl J. Prehranska dopolnila – zdravila ali hrana (podiplomsko strokovno izobraževanje); Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2002: 90-96.
24. Berlec A, Jevnikar Z, Majhenic AC, Rogelj I, Strukelj B. Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006; 73 (1): 158-65.
25. Saxelin M, Tynkynen S, Mattila-Sandholm T in sod. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2005; 16 (2): 204-211.
26. Penner R, Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and nutraceuticals: Non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 2005; 5: 596-603.
27. Douglas LC, Sanders ME. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *J Am Dietetic Assoc*, 2008; 108 (3): 510-521.
28. http://www.ivz.si/knjiznica/arhiv/reg_zdravil2/RZ_ATC.HTM
29. http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r00/predpis_ZAKO4280.html
30. http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r01/predpis_PRAV4401.html

Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem

Alginate in controlled drug delivery systems

Polona Smrdel, Marija Bogataj, Aleš Mrhar

Povzetek Dostavni sistemi s prirejenim sproščanjem nudijo v mnogih primerih, tako s stališča učinkovitosti kot tudi varnosti, prednost pred farmacevtskimi oblikami s takojšnjim sproščanjem. Za doseganje prirejenega sproščanja zelo pogosto uporabimo najrazličnejše polimere. Alginat je naraven polisaharid, ki ga pridobivamo iz različnih vrst rjavih alg. Je linearen polimer, sestavljen iz homogenih odsekov D- manuronske in L-guluronske kisline in odsekov, kjer se kislini izmenjujeta. Njegova lastnost je tvorba dveh vrst gelov – t.i. kislinski gel v kislem in ionotropni gel v prisotnosti večvalentnih kationov. Zaradi sposobnosti geliranja in nabrekanja ter nekaterih drugih lastnosti je zelo primeren za pripravo dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem. Priprava alginatnega ogrodja pod milimi pogoji omogoča tudi vgradnjo celic in biomolekul, kot so proteini, encimi in DNK, brez izgube biološke aktivnosti. Izbira ustreznega tipa alginata in strukture ter sestave dostavnega sistema omogoča pripravo farmacevtske oblike s časovno in/ali prostorsko nadzorovanim sproščanjem.

Ključne besede: alginat, ogrodni sistem, ionotropno geliranje, prirejeno sproščanje

Abstract Controlled drug delivery systems frequently offer significant benefit in comparison with immediate release dosage forms from the efficiency and safety viewpoint. Controlled release can be achieved using various polymers. Alginate is naturally occurring polysaccharide extracted from kelp. It is linear polymer, composed of homopolymeric D-mannuronic and L-guluronic acid blocks and heteropolymeric blocks where the monomers alternate. An important property is the formation of two types of gel, i.e. an acid gel in acidic medium and ionotropic gel in the presence of multivalent cations. Due to its ability to gel and swell and some other properties, alginate is very suitable for the design of controlled release drug delivery systems. Furthermore, the preparation of alginate matrix under mild conditions enables also the incorporation of cells and biomolecules like proteins, enzymes and DNA with retention of full biological activity. By the selection of an appropriate type of alginate and structure and composition of drug delivery system time and/or region controlled delivery can be achieved.

Key words: alginate, matrix system, ionotropic gelation, controlled release

1 Uvod

Razvoj sistemov s prirejenim sproščanjem učinkovine je izredno napredoval, saj uporaba tovrstnih sistemov v primerjavi s farmacevtskimi oblikami s takojšnjim sproščanjem v mnogih primerih nudi vrsto prednosti, ki se odražajo v učinkovitejšem, varnejšem in pacientu sprejemljivejšem načinu zdravljenja (1). S farmacevtskimi oblikami s prirejenim sproščanjem lahko sproščanje učinkovine časovno in prostorsko nadzorujemo, kar omogoča zmanjšanje dnevnih odmerkov in števila odmerjanj ter pripomore k manjšemu nihanju plazemskih koncentracij učinkovine, vse to pa prispeva k manj izraženim stranskim učinkom in učinkovitejši terapiji.

Prirejeno sproščanje najpogosteje dosežemo z uporabo polimerov, ki tvorijo ogrodni sistem ali oblogo, ki kontrolirata sproščanje učinkovine. Med obilico danes dostopnih polimerov postajajo vedno bolj zanimivi nekateri naravni polisaharidi, katerih glavne prednosti v primerjavi s sintezniimi so netoksičnost, široka dostopnost in nižja cena (2). V skupino naravnih polisaharidov spada tudi alginat, ki se že dalj časa uporablja v prehranski industriji kot zgoščevalo, gelirno sredstvo in

utrjevalo, vedno bolj pogosto pa ga lahko srečamo tudi v farmacevtski industriji. Namen članka je predstaviti možnosti uporabe alginata v farmaciji s poudarkom na ogrodnih sistemih s prirejenim sproščanjem.

2 Alginat

2.1 Struktura alginata

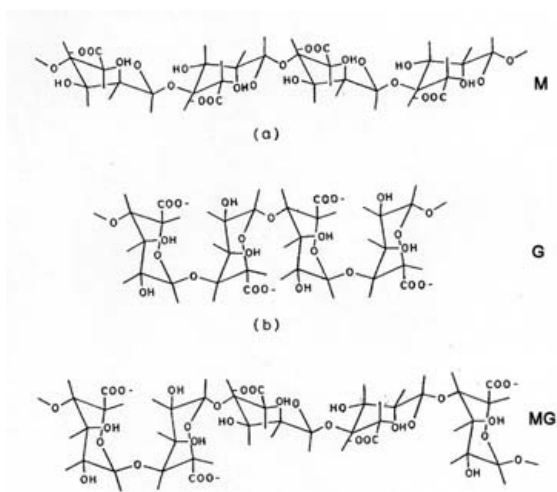
Alginska kislina je naraven polisaharid, ki se v glavnem nahaja v različnih vrstah rjavih morskih alg v obliki kalcijevih, natrijevih, stroncijevih, barijevih in magnezijevih soli. Kemijsko je to linearen nerazvejan polisaharid, sestavljen iz monomernih enot, β -D-manuronske (M) in α -L-guluronske (G) kisline, povezanih z 1,4 glikozidno vezjo. Kislini sestavljata homogene poli-M in poli-G odseke, ki so ločeni s predeli, kjer se monomerni enoti izmenjujeta (MG, slika 1). Fizikalne lastnosti alginata so odvisne od molekulske mase in sestave (razmerja med monomernimi enotami in dolžine posameznih

blokov). Slednjo pogojujejo vrsta organizma in del alge, iz katere se alginat pridobiva, pa tudi rastišče in letni čas žetve (3-6).

2.2 Tvorba gela

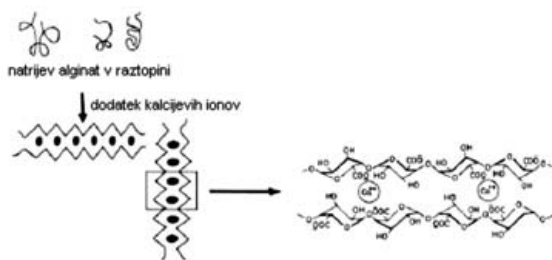
Alginska kislina je v neionizirani obliki v vodi netopna, medtem ko je topnost njenih soli odvisna tako od pH kot od vrste prisotnih kationov. Alginat tvori dve vrsti gela:

- **kislinski gel:** pri določenih pogojih lahko z zniževanjem pH raztopine pod pKa guluronske (pKa= 3.65) in manuronske (pKa = 3.38) kisline preide raztopina alginata iz sol v gel stanje in nastane t.i. kislinski gel, ki je domnevno stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi. Zniževanje pH-ja mora potekati počasi, saj se ob hitri spremembi pH alginska kislina izobori. Glavni gradniki tega gela so poliguluronski odseki, vendar pa k tvorbi gela nekoliko prispevajo tudi polimanuronski odseki. Najmočnejši gel nastane iz



Slika 1: Struktura polimanuronskega (M) in poliguluronskega (G) odseka alginata ter odseka, kjer se manuronski in guluronski kislini izmenjujeta (MG) (4).

Figure 1: Structure of polymannuronic (M) and polyguluronic (G) blocks of alginate and block with alternating sequence of uronic acids (MG) (4).



Slika 2: Shematski prikaz nastanka ionotropnega gela z modelom škatle za jajca (4)

Figure 2: Schematic presentation of ionotropic gelation process using egg box model (4).

alginatov z visokim deležem guluronskih odsekov in nizkim deležem alternirajočih odsekov (9, 10).

- **ionski (ionotropni) gel:** nastane z interakcijo večvalentnih kationov, kot so Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , itd in polimernih verig. Izjema so alginatne soli magnezijevih ionov, ki tako kot soli monovalentnih ionov tvorijo v vodi viskozne koloidne raztopine. Pri ionotropnem geliranju gre za izmenjavo natrijevih ionov s soli guluronskih kislin z npr. Ca^{2+} ioni, ki povežejo odseke guluronskih kislin in povzročijo njihovo preureditev tako, da nastane urejena tridimenzionalna struktura, dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi, ki spominja na škatlo za jajca (slika 2). Interakcije niso le elektrostatske narave, temveč tudi koordinativne z večvalentnim kationom kot kelatnim centrom. Za razliko od kislinskega gela, v tem primeru k tvorbi gela prispevajo le poliguluronski odseki, ki imajo zaradi prostorske razporeditve kisikovih atomov v hidroksilnih in karboksilnih skupinah večjo afiniteto do večvalentnih kationov (4, 5, 10, 11). Dejavniki, ki vplivajo na lastnosti ionotropnega gela, so predstavljeni v Preglednici 1.

2.3 Uporaba alginata v farmaciji

Sposobnosti geliranja in nabrekanja omogočata široko uporabo alginata v farmaciji. Nekateri avtorji govorijo tudi o mukoadhezivnosti alginata. V številnih preglednih člankih pa so navedene tudi druge lastnosti alginata, kot so biokompatibilnost, biorazgradljivost in netoksičnost, čeprav je o teh lastnostih relativno malo podatkov, ki si včasih celo nasprotujejo (4, 5, 6, 7). V prebavnem traktu se alginat razgradi v debelem črevesju z encimi, ki jih izločajo bakterije kolonske mikroflore. Pri peroralni uporabi alginata ni bilo opaženih večjih imunskih reakcij in avtorji (6) za ta način aplikacije navajajo, da je alginat netoksičen in biorazgradljiv polimer. Glede biokompatibilnosti in biorazgradljivosti alginatnih vsadkov pa v literaturi najdemo nasprotujoče si podatke. Nekateri avtorji navajajo, da v živalsko tkivo implantirano alginatno ogrodje na mestu vsadka ne povzroča izrazitega vnetja (imunogenost naj bi bila posledica nečistot v alginatu) in da ogrodje s časom izgine, se resobira (4, 5), drugi pa ugotavljajo, da alginat na mestu vsadka povzroči fibrotično reakcijo, se ohrani dalj časa in ga je potrebno operativno odstraniti (13).

V sistemih s prirejenim sproščanjem za peroralno aplikacijo lahko alginat uporabimo kot ogrodni polimer za izdelavo večletnih ogrodnih sistemov ali enoletnih ogrodnih tablet, kot polimer za oblaganje farmacevtskih oblik ali za izdelavo mikrokapsul (3, 4, 14). Alginat pa uporabljamo tudi v oblogah za vlažno celjenje ran, v obliki raztopine za okularno ali peroralno aplikacijo, ki po stiku z večvalentnimi kationi in situ gela, intenzivno pa se raziskuje tudi v biotehnologiji kot ogrodje za vgradnjo biomolekul in celic, namenjeno uporabi v tkivnem inženirstvu (3, 7, 8).

3 Alginat v večletnih ogrodnih sistemih

3.1 Metode priprave alginatnih delcev z ionotropnim geliranjem

V primeru večletnih alginatnih ogrodnih sistemov se najpogosteje raziskujejo delci pripravljene z metodo ionotropnega geliranja

(Preglednica 2). Pri t.i. kapljčni metodi kapljamo koloidno raztopino alginata v raztopino večvalentnega kationa (najpogosteje kalcija). V raztopini polimera lahko dispergiramo različne učinkovine in pomožne snovi. Po interakciji kapljic disperzije alginata z večvalentnimi ioni nastanejo kroglice gela, delci, v katerih je učinkovina enakomerno porazdeljena po celotnem ogrodju kroglice. Slab izkoristek vgradnje majhnih vodotopnih učinkovin zaradi difuzije učinkovine v medij za utrjevanje lahko izboljšamo z optimizacijo časa utrjevanja delcev (15, 16,17) ali s kapljanjem alginatne disperzije v raztopino utrjevalca nasičeno z učinkovino (15, 18, 19), v primeru ionskih učinkovin pa lahko s spreminjanjem pH medija za utrjevanje vplivamo na topnost učinkovine in posledično na izkoristek vgradnje (25).

Manjše delce (mikrosfere) lahko izdelamo z razprševanjem oz. atomizacijo alginatne disperzije z učinkovino v raztopino za utrjevanje ali z emulzifikacijsko metodo (Preglednica 2).

3.2 Sproščanje učinkovin iz večletnih ogrodnih alginatnih sistemov

Delci iz kalcijevega alginata so hidrofilni ogrodni sistem, ki lahko nabreka. Učinkovina se lahko sprošča po dveh mehanizmih: z difuzijo raztopljenih učinkovin skozi pore ogrodja in/ali z erozijo površine ogrodja. Dejavniki, ki pogojujejo sproščanje učinkovine iz alginatnih delcev, so navedeni v Preglednici 3 in podrobneje predstavljeni v nadaljevanju.

• Lastnosti medija za sproščanje

Nabrekanje delcev je odvisno od pH medija, pa tudi od ionske sestave in ionske moči medija (27). V kislem (npr. v želodcu) se

kalcijev alginat pretvori v netopno alginatno kislino, zato je nabrekanje delcev zanemarljivo. V tem primeru se učinkovina sprošča z difuzijo skozi netopno ogrodje. Nasprotno v nevtralnem (npr. v tankem črevesu) delci intenzivno nabrekajo, zato sproščanje učinkovine pogojuje nabrekanje in erozija alginatnega ogrodja (3). Nabrekanje je posledica ionske izmenjave kalcijevih ionov v delcih z natrijevimi ioni prisotnimi v mediju za raztapljanje. V začetni fazi se izmenjajo natrijevi ioni s kalcijevimi ioni, vezanimi na karboksilne skupine manuronskih odsekov. Nastali elektrostatični odboj med negativno nabitimi karboksilnimi skupinami pospeši nabrekanje ogrodja. V drugi fazi nabrekanja se zaradi izstopa kalcijevih ionov, ki povezujejo homoguluronske odseke, razrahlja močna struktura ogrodja, ki spominja na škatlo za jajca. To omogoči vstop dodatnih količin vode v ogrodje in sčasoma popolno raztopitev alginatnega ogrodja (11).

• Lastnosti alginatnega ogrodja

Hitrost in obseg nabrekanja pogojujejo tudi vrsta in količina iona za premrežitev ter sestava, koncentracija in molekulska masa alginata (Preglednica 1).

• Lastnosti učinkovine

Doseganje prirejenega sproščanja z vgradnjo učinkovine v alginatne delce je odvisno tudi od lastnosti učinkovine.

Učinkovine z majhno molekulsko maso

Sproščanje majhnih molekul je odvisno od njihove topnosti v mediju za raztapljanje. V primeru majhnih v vodi dobro topnih učinkovin je njihovo sproščanje le z vgradnjo v delce kalcijevega alginata težko nadzorovati. Učinkovina se namreč hitro raztopi v mediju, ki vstopi v

Preglednica 1: Dejavniki, ki vplivajo na lastnosti ionotropnega gela (4, 5, 9, 11, 12).

Table 1: Factors influencing ionotropic gel properties (4, 5, 9, 11, 12).

Dejavnik	Lastnosti gela	
Lastnosti alginata		
• Kemijska sestava (4, 5)	Visok delež G enot	• Stabilni, mehansko bolj odporni na erozijo, porozni
	Visok delež M enot	• Elastični, manj porozni, manj odporni na erozijo
• Molekulska masa (5, 9)		• Pod določeno molekulsko maso je sposobnost geliranja omejena, nad molekulsko maso $2,4 \times 10^5$ je jakost gela neodvisna od molekulske mase
• Sekvenčna sestava (4)	Dolžina / število MM, GG in MG odsekov	• Alginati z daljšimi in številčnejšimi G sekvencami imajo večjo afiniteto do premrežitve
		• Afiniteta do premrežitve narašča v naslednjem zaporedju MM<MG<GG
		• Jakost gela narašča v naslednjem zaporedju MG <MM <GG
Lastnosti premreževalnega kationa		
• Valenca (11, 12)	Monovalentni	• Geliranje ne poteče
	Divalentni (z izjemo Mg ²⁺)	• Afiniteta kationov do alginata pada v naslednjem zaporedju Cd ²⁺ > Ba ²⁺ > Cu ²⁺ > Ca ²⁺ > Ni ²⁺ > Co ²⁺ > Mn ²⁺
	Trivalentni	• Ioni z večjo afiniteto tvorijo bolj rigidni gel, z grobo, nagubano površino
• Velikost, premer iona (11)		• Premrežitev poteče v treh plasteh
		• Ioni z večjim premerom zapolnijo večji prostor med alginatnimi verigami, nastane stabilnejši gel, ki manj nabreka, npr. Ba ²⁺ (1,74 Å) bolje zapolni prostor kot Ca ²⁺ (1,14 Å)

ogrodje, in raztopljena difundira skozi pore iz ogrodja. Ogrodje kalcijevega alginata je dokaj porozno (velikost por suhega ogrodja je v območju od 5 do 200 nm, (5)) in za majhne molekule ne predstavlja difuzijske bariere, ki bi bistveno upočasnila sproščanje. V primeru majhnih, v vodi slabo topnih učinkovin je sproščanje iz alginatnih delcev odvisno od hitrosti raztapljanja učinkovine, pa tudi od nabrekanja in erozije alginatnega ogrodja. V kislem mediju je sproščanje slabo topnih učinkovin iz alginatnih delcev minimalno, medtem ko je v nevtralnem, zaradi nabrekanja delcev, povečan vstop medija za raztapljanje, kar omogoča raztapljanje učinkovine. Raztopljena učinkovina difundira iz ogrodja, neraztopljena pa se sprošča z erozijo ogrodja in raztapljanjem, ki sledi eroziji (28). Zato velja, da je za doseganje prirejenega sproščanja ogrodje iz kalcijevega alginata primerno za slabo topne učinkovine in učinkovine z veliko molekulsko maso. Kljub temu je v literaturi moč najti nekaj pristopov za upočasnitev sproščanja majhnih, dobro topnih molekul iz alginatnih delcev, ki temeljijo tudi na premrežitvi alginata z naravnimi ali sintezniimi polikationskimi polimeri (npr. hitosan (29), polilizin (30)) ali s kemijskimi premreževalci (npr. formaldehid, glutaraldehid (4), epiklorhidrin (21)). Slednji kovalentno premrežijo polimer, posledica česar je nastanek bistveno bolj stabilnega ogrodja z manjšimi porami, ki počasneje erodira. Kemijski premreževalci so s stališča toksičnosti nesprejemljivi, zato je veliko boljši pristop uporaba polikationov, ki premrežijo alginat preko ionskih interakcij. Najpogosteje se te polikatione uporabi za tvorbo obloge, sestavljene iz kompleksa med alginatom in polikationom. Tako je npr. Ueng s sodelavci (30) z oblaganjem alginatnih delcev s poli-L-lizinom uspel zadržati

sproščanje vankomicina, Sezer in Akabuga (29) pa sta alginatne delce dodatno obdelala s hitosanom, kar je omogočilo prirejeno sproščanje timolol maleata.

Učinkovine z veliko molekulsko maso

Pri učinkovinah z večjo molekulsko maso (npr. cepiva, proteini in polipeptidi) ponuja vgradnja v alginatne delce več možnosti za doseganje prirejenega sproščanja (4). Tudi v tem primeru je sproščanje nadzorovano z difuzijo učinkovine skozi polimerno ogrodje in z erozijo ogrodja. Nadzor sproščanja z difuzijo je bolj zaželen, saj se v primeru razpada alginatnega ogrodja učinkovina sprosti naenkrat, hitro in nenadzorovano (6). Hitrost difuzije je odvisna tako od lastnosti alginatnega ogrodja kot od molekulske mase učinkovine. Kikuchi in Okano (31) sta s poskusi z dekstranom različnih molekulskih mas ugotovila, da je hitrost difuzije obratno sorazmerna z molekulsko maso dekstrana, pri molekulski masi 145000 pa se je učinkovina sproščala le z erozijo alginatnega ogrodja. Do enakih zaključkov je s proteini različnih molekulskih mas prišel tudi Martinsen s sodelavci (32). S preskušanjem alginatov različne sestave so ugotovili, da alginati z višjim deležem gularonskih enot tvorijo bolj rigidne gele, ki se manj skrčijo in je zato velikost por večja, posledica česar je lahko hitrejša difuzija makromolekul. Po drugi strani pa so tovrstni geli bistveno bolj odporni na erozijo v primerjavi z geli iz alginatov z visokim deležem manuronskih enot, in lahko zato dalj časa nadzorujejo sproščanje. Na lastnosti alginatnih delcev in posledično na hitrost sproščanja makromolekul vplivajo tudi pogoji priprave delcev, kot npr. čas in način sušenja, čas utrjevanja, vrsta in

Preglednica 2: Metode za pripravo alginatnih delcev z ionotropnim geliranjem
Table 2: Methods for preparation alginate beads using ionotropic gelation

Metoda	Prednosti	Slabosti
<p>Kapljična metoda (3-5)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kapljanje disperzije alginata in učinkovine v vodno raztopino večvalentnega kationa • Delci > 1 mm • Lastnosti delcev (vsebnost, kinetika sproščanja, oblika, morfologija) odvisne od (15-24): → lastnosti alginata in sestave dostavnega sistema (vrsta učinkovine, tip, koncentracija alginata, razmerje učinkovina/alginat, dodatek pomožnih snovi) → procesnih parametrov (čas utrjevanja, vrsta, koncentracija večvalentnih ionov, način sušenja...) • Atomizacija, razprševanje alginatne disperzije → delci < 1 mm 	<ul style="list-style-type: none"> • Enostavna metoda • Mili pogoji priprave → vgradnja proteinov, encimov, celic 	<ul style="list-style-type: none"> • Difuzija majhnih vodopnih molekul v medij za utrjevanje → slab izkoristek vgradnje
<p>Emulzifikacijska metoda (4, 5, 21, 26)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Emulzija tipa voda v olju, notranja faza: vodna disperzija alginata in snovi, ki jo želimo vgraditi, zunanja faza: organsko topilo • Interna premrežitev: dodatek netopnega kalcijevega kompleksa (kalcijev karbonat, citrat) v alginatno disperzijo, kalcijevi ioni se sprostijo ob nakisanju – dodatku ledocetne kisline v zunanjo fazo • Eksterna premrežitev: dodatek raztopine CaCl₂ v organsko fazo – koalescenca ob stiku s kapljicami alginatne disperzije • Velikost delcev odvisna od hitrosti mešanja in hitrosti dodajanja raztopine utrjevalca 	<ul style="list-style-type: none"> • Priprava majhnih delcev (1-150 μm) 	<ul style="list-style-type: none"> • Uporaba organskih topil

koncentracija utrjevalca, velikost delcev (31-33). Zlasti način sušenja delcev izrazito vpliva na velikosti por. Delci posušeni z liofilizacijo imajo bistveno večje pore kot delci posušeni na zraku, ki se s sušenjem močno skrčijo. Prav zaradi skrčenja lahko pri delcih posušeni na zraku ogrodje na površini počni, kar lahko pri ponovni rehidraciji v mediju za raztapljanje olajša erozijo na površini in pospeši sproščanje (5). Vpliv procesnih parametrov na sproščanje učinkovine je bistveno bolj izrazit pri učinkovinah z večjo molekularno maso.

Zaradi pH odvisnega nabrekanja delci iz kalcijevega alginata v kislem mediju učinkovito nadzorujejo sproščanje majhnih slabo topnih molekul in makromolekul. Problematičen je dokaj hiter razpad delcev v nevtralnem mediju, posledica česar je nenadna nenadzorovana sprostitve preostale učinkovine. Kot že razloženo lahko razpad alginatnega ogrodja preprečimo z dodatnim premreženjem, stabilnost v medijih z višjim pH pa se poveča tudi s kovalentnimi kemijskimi modifikacijami alginata. Taka primera sta alginat, na katerega je z amidno vezjo vezan L-cistein (tioliran alginat), in amfilni derivat alginata, ki ima prek esterskih vezi na polisaharidno ogrodje vezane dolge alkilne verige. Obe modifikaciji izredno pripomoreta k odpornosti alginata na erozijo, tioliran alginat pa, zaradi možnosti

tvorbe disulfidnih vezi z cisteinskimi tiolnimi skupinami na glikoproteinih mukusa, pridobi še boljše mukoadhezivne lastnosti (6).

Naboj učinkovine

Tako pri učinkovinah z nizko kot z veliko molekularno maso lahko na sproščanje iz alginatnih delcev izjemno vpliva naboj učinkovine. Pozitivno nabiti proteini (5, 6) in učinkovine (4) lahko interagirajo z negativno nabitim alginatom, kar zavira sproščanje iz ogrodja. V primeru proteinov lahko tovrstna interakcija povzroči celo njihovo inaktivacijo. Ta problem so v primeru TGFβ1 rešili z dodatkom anionskega polimera akrilne kisline, ki je zaščitil TGFβ1 pred interakcijo z alginatom in ohranil njegovo aktivnost (6). V nasprotju s pozitivno nabitimi učinkovinami je sproščanje negativno nabitih učinkovin iz alginatnega ogrodja zaradi odbojnih interakcij hitrejše. Tako privlačne kot odbojne interakcije med učinkovino in alginatom so v kislem mediju, kjer so karboksilne skupine alginata v neionizirani obliki, bistveno manj izrazite kot v nevtralnem mediju (4).

4 Alginat v ogrodnih tabletah

Alginat se pogosto uporablja tudi kot pomožno sredstvo pri tabletiranju. Njegova vloga je odvisna od uporabljene količine. V

Preglednica 3: Poglavitni dejavniki, ki vplivajo na sproščanje učinkovine iz alginatnih delcev

Table 3: Factors influencing drug release from alginate beads

Dejavnik	Opombe
pH medija (3, 27)	<ul style="list-style-type: none"> Pogojuje nabrekanje ogrodja in posledično mehanizem sproščanja učinkovine → v kislem: difuzija raztopljene učinkovine skozi netopno ogrodje alginatne kisline → v nevtralnem: difuzija raztopljene učinkovine skozi nabreklo zvezno plast in z erozijo ogrodja
Lastnosti učinkovine Velikost in topnost	<ul style="list-style-type: none"> Majhne, dobro topne učinkovine (5, 28) sproščanje z difuzijo, praktično neodvisno od pH medija Večje, slabo topne učinkovine (5, 6, 31-33) sproščanje odvisno od velikosti in hitrosti raztapljanja učinkovine ter nabrekanja in erozije ogrodja → v kislem: sproščanje minimalno → v nevtralnem: difuzija raztopljene učinkovine skozi nabreklo plast in z erozijo ogrodja → hitrost difuzije obratno sorazmerna z molekularno maso učinkovine
Naboj (4-6)	<ul style="list-style-type: none"> Pozitivno nabite učinkovine → relativno počasnejše sproščanje Negativno nabite učinkovine → relativno hitrejše sproščanje Vpliv naboja v kislem manj izrazit
Lastnosti ogrodja Kemijska sestava alginata (Preglednica 1)	<ul style="list-style-type: none"> Večji vpliv pri učinkovinah z večjo molekularno maso
Premrežitev	<ul style="list-style-type: none"> Večvalentni kationi pomembna vrsta, valenca, velikost kationa (Preglednica 1) Polikationski polimeri (hitosan, polilizin) tvorba polielektrolitskega kompleksa z alginatom → upočasnitev sproščanja (29, 30) Kovalentni premreževalci (formaldehid, glutaraldehid, epiklorhidrin) kovalentna premrežitev ogrodja, manjše pore, bolj stabilno ogrodje, odporno na erozijo → upočasnitev sproščanja (4, 21)
Kovalentne kemijske modifikacije alginata	<ul style="list-style-type: none"> Alginat s kovalentno vezanim cisteinom, amfilni derivat alginata z alkilnimi verigami) → povečana odpornost ogrodja na erozijo (6)

koncentracijah od 1 do 5% oz. od 2 do 10% deluje kot vezivo oziroma razgrajevalo (34, 35). Kot je že uvodoma predstavljeno, je alginat hidrofilni polimer, ki v vodi nabreka in tvori viskozno koloidno raztopino, zato ga lahko v večjih koncentracijah uporabimo tudi kot polimerni nosilec za izdelavo ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem.

4.1 Sproščanje učinkovin iz alginatnih ogrodnih tablet

Ob stiku ogrodne tablete iz hidrofilnega polimera z vodnim medijem hidrofilna koloidna komponenta nabreka, kar vodi v nastanek viskozne koloidne plasti na površini tablete. Ta plast nadzoruje vstop vode v ogrodje ter izstop raztopljenih snovi iz ogrodja. Sproščanje učinkovin iz takih sistemov poteka po dveh mehanizmih: vodotopne učinkovine se v glavnem sproščajo z difuzijo raztopljene učinkovine skozi nabreklo plast (plast gela), medtem ko se slabo topne učinkovine sproščajo pretežno z erozijo ogrodja. Vpliv posameznega mehanizma na sproščanje učinkovine je odvisen tako od topnosti učinkovine kot tudi od mehanskih in fizikalnih lastnosti nabrekle plasti okrog tablete (36, 37). Dejavniki, ki vplivajo na sproščanje učinkovine iz ogrodnih alginatnih tablet, so navedeni v Preglednici 4 in podrobneje predstavljeni v nadaljevanju.

• pH medija in topnost učinkovine

Hodsdon in sodelavci (36) so preučevali vpliv pH medija na sproščanje klorfeniramin maleata kot modelne dobro topne

učinkovine in hidroklortiazida kot modelne slabo topne učinkovine iz ogrodnih tablet iz natrijevega alginata. Sproščanje učinkovin iz tablet so vrednotili ločeno v umetnem želodčnem soku s pH 1,2 in umetnem črevesnem soku s pH 7,5. Ugotovili so, da pH medija vpliva na nabrekanje alginata oz. strukturo hidratirane plasti, kar se odraža tudi v kinetiki sproščanja učinkovine. Avtorji navajajo, da se v kislem alginat pretvori v alginsko kislino, ki je v vodi netopna, vendar nabreka. Zato je v kislih pogojih zunanja plast tablete manj hidratirana, čvrsta in elastična, s porozno in zrnato strukturo. Sestavljena je iz predelov, kjer je večina polimera neraztopljenega in zato le-ta ne prispeva k difuzni barieri. V nevtralnem mediju natrijev alginat intenzivno nabreka, kar vodi v nastanek zvezne viskozne plasti na površini tablete, ki predstavlja učinkovito difuzijsko bariero. Za dobro topno učinkovino je omenjena skupina raziskovalcev ugotovila, da je v kislem na račun večje poroznosti hidratirane plasti v prvi uri sproščanje iz alginatne ogrodne tablete hitrejše kot v mediju s pH 7,5. Sproščanje učinkovine je potekalo s kinetiko, ki jo opisuje Higuchijeva enačba (linearno s kvadratnim korenom iz časa), kar nakazuje, da je v kislem sproščanje iz alginatnega ogrodja nadzorovano predvsem z difuzijo raztopljene učinkovine skozi netopno ogrodje. V nevtralnem k sproščanju pomembno prispeva tudi erozija ogrodja, kar je v profilu sproščanja opazno kot odklon od omenjene linearnosti. Pri slabo topni učinkovini hidroklortiazidu so bile ugotovitve ravno obratne. Medtem ko se je v nevtralnem iz alginatnih ogrodnih tablet v 4 urah sprostito 83% učinkovine, se je v kislem mediju sprostito le 15%. Tako izrazita razlika v sproščanju je pogojena s topnostjo oz. stabilnostjo alginatnega ogrodja v odvisnosti od pH. V nevtralnem namreč

Preglednica 4: Dejavniki, ki vplivajo na sproščanje učinkovine iz ogrodnih alginatnih tablet (36, 37)

Table 4: Factors influencing drug release from alginate matrix tablets (36, 37)

Dejavnik	Kisla	Nevtralen
pH medija		
<ul style="list-style-type: none"> vpliva na strukturo hidratirane plasti pogojuje mehanizem sproščanja učinkovine 	<ul style="list-style-type: none"> difuzija raztopljene učinkovine skozi netopno ogrodje alginske kisline 	<ul style="list-style-type: none"> difuzija raztopljene učinkovine skozi nabreklo zvezno plast erozija ogrodja
Lastnosti alginata		
^a Sestava		
<ul style="list-style-type: none"> vpliv odvisen od hitrosti / obsega nabrekanja alginata 	<ul style="list-style-type: none"> sproščanje bolj zadržano pri alginatih z višjim deležem M enot 	<ul style="list-style-type: none"> sproščanje bolj zadržano pri alginatih z višjim deležem G enot
^a Viskoznost		
<ul style="list-style-type: none"> vpliv odvisen od hitrosti / obsega nabrekanja alginata 	<ul style="list-style-type: none"> sproščanje bolj zadržano pri alginatih z nižjo viskoznostjo 	<ul style="list-style-type: none"> sproščanje bolj zadržano pri alginatih z višjo viskoznostjo
^b Velikost delcev		
<ul style="list-style-type: none"> manjši delci → tvorba bolj hidratirane, bolj zvezne difuzne bariere → počasnejše sproščanje 		
Lastnosti učinkovine		
<ul style="list-style-type: none"> Majhne, dobro topne učinkovine se sproščajo z difuzijo Večje in/ali slabo topne učinkovine se sproščajo z difuzijo in erozijo ogrodja 		

^a Način vpliva sestave in viskoznosti alginata odvisen od pH medija za sproščanje

^b Način vpliva velikosti delcev alginata neodvisen od pH medija za sproščanje

alginatno ogrodje erodira, medtem ko ostane v kislem mediju močno elastično ogrodje tablete. To potrjuje, da je glavni mehanizem sproščanja slabo topnih učinkovin iz alginatne ogrodne tablete nadzorovan z erozijo ogrodka (36).

• Lastnosti alginata

Velikost delcev alginata

Liew in sodelavci (37) so sistematično ovrednotili vpliv velikosti delcev, viskoznosti in kemijske sestave natrijevega alginata na sproščanje iz alginatnih ogrodnih tablet. V poskusih so nazorno pokazali, da se z zmanjševanjem velikosti delcev alginata do mejne vrednosti 80 – 100 µm hitrost sproščanja učinkovine upočasni in zmanjša začetno hitro sproščanje (»burst« efekt). Pri konstantni količini alginata se z zmanjšanjem velikosti delcev poveča njihovo število, zato lahko učinkoviteje prekrijejo površino tablete, s tem pa se zmanjša verjetnost nastanka predelov na tableti brez polimernih delcev, ki so ključni za začetno hitro sproščanje pred nastankom zvezne difuzne plasti. Poleg tega manjši delci hitreje hidratirajo (nabrekajo), kar vodi v hitrejši nastanek difuzne bariere. Hkrati pa izboljšan stik med manjšimi delci pripomore k boljšemu združenju polimernih delcev in nastanku manj permeabilne bariere, ki učinkoviteje zadrži sproščanje učinkovine. Vpliv velikosti delcev alginata na sproščanje je ključnega pomena zlasti pri nižji vsebnosti alginata, ker je v tem primeru poroznost nabrekle plasti pogojena z zadostnim številom delcev na površini tablete. Pri višji vsebnosti alginata je delcev že zaradi večje količine alginata dovolj, da tvorijo stabilno (zvezno) difuzno plast. Vpliv velikosti delcev je neodvisen od sestave alginata.

Kemijska sestava alginata

Velik vpliv na sproščanje ima tudi kemijska sestava natrijevega alginata. Vpliv kemijske sestave je izrazitejši pri višjih vsebnostih alginata (30% in 50%) in je odvisen tudi od pH medija za sproščanje. V kislem alginat z večjim deležem manuronskih enot hitreje nabreka, kar vodi v hitrejši nastanek difuzijske bariere in počasnejše sproščanje. Nasprotno pa je v nevtralnem sproščanje bolj zadržano iz alginatne ogrodne tablete z višjim deležem guluronskih enot, kar je posledica tvorbe stabilnejšega gela, ki je v primerjavi z gelom alginata z visokim manuronskim deležem bolj odporen na erozijo (37).

Viskoznost alginata

Kot je že uvodoma predstavljeno, so fizikalne lastnosti alginata, med njimi tudi viskoznost alginatne raztopine odvisne od molekulske mase in sestave polimera (M/G razmerje, dolžine posameznih odsekov). V nadaljevanju besedila in Preglednici 4 se izraz »viskoznost alginata« nanaša na tip alginata z določeno viskoznostjo; izmerjeno v 1% (ut./ut.) vodni raztopini alginata, pri 37°C. Vpliv viskoznosti alginata na sproščanje iz ogrodnih tablet je prav tako pogojen s pH medija za raztapljanje. V kislem je sproščanje iz tablet iz alginata z nižjo viskoznostjo počasnejše kot iz tablet iz bolj viskoznega alginata. Nasprotno pa v nevtralnem sproščanje učinkovine bistveno bolj zadržimo z uporabo bolj viskoznega alginata. Vzrok temu nasprotujočemu vplivu v odvisnosti od pH pripisujejo razlikam v hitrosti nabrekanja različno viskoznih alginatov. Alginat z nizko viskoznostjo hitro nabreka takoj po stiku s kislim medijem za raztapljanje, medtem ko naj bi bila pri alginatu z višjo viskoznostjo v

kislem upočasnjena hidracija alginatnih delcev, ki je nujna za hiter nastanek difuzijske bariere. Pri višjem pH pa je situacija ravno obratna, saj alginat z višjo viskoznostjo tvori bistveno bolj viskozno in na erozijo odporno nabreklo plast, ki izrazito upočasni sproščanje učinkovine.

Rezultati študije dokazujejo, da lahko s pravilno izbiro velikosti delcev, sestave in viskoznosti alginata izdelamo ogrodne tablete z želenim profilom sproščanja (37).

5 Alginat v dostavnih sistemih s ciljano dostavo

S pomočjo alginata lahko izdelamo dostavne sisteme, ki omogočajo časovno nadzorovano sproščanje učinkovine in dostavo le-te na želeno mesto v prebavnem traktu (npr. želodec, kolon).

5.1 Alginat v dostavnih sistemih s podaljšanim časom zadrževanja v prebavnem traktu

Čas zadrževanja v želodcu je zlasti pomemben pri učinkovinah z absorpcijskim oknom v zgornjem delu prebavnega trakta. Zadrževanje dostavnega sistema v želodcu lahko podaljšamo z izdelavo plavajočih dostavnih sistemov. Glavni pogoj za doseganje plovnosti je nižja gostota dostavnega sistema od želodčne tekočine (vsebine). Poroznost in posledično tudi gostota delcev iz kalcijevega alginata je odvisna od načina sušenja. S sušenjem z zamrzovanjem (liofilizacija) dobimo zelo porozne delce z dovolj nizko gostoto, da plavajo na površini medija za raztapljanje. Na ta način je Whitehead s sodelavci pripravil plavajoče alginatne delce z amoksicilinom (38). Plovnost delcev iz kalcijevega alginata pa lahko dosežemo tudi z vgradnjo dodatkov z nižjo gostoto, npr. rastlinskega olja. Tovrstni dodatki lahko izrazito vplivajo na sproščanje učinkovine. V primeru metronidazola so ugotovili, da je hitrost sproščanja obratno sorazmerna s količino vgrajenega olja (39).

Drugi pristop za podaljšanje časa prehoda farmacevtske oblike skozi prebavni trakt je izdelava bioadhezivnih dostavnih sistemov. *In vitro* raziskave so pokazale, da ima alginat zaradi karboksilnih skupin odlične bioadhezivne lastnosti, kar bi potencialno lahko prispevalo k podaljšanemu času zadrževanja alginatnih dostavnih sistemov na gastrointestinalni ali nosni sluznici in tako omogočilo učinkovitejšo dostavo učinkovine (3, 5). Pri postavljanju zaključkov o podaljšanem času zadrževanja peroralno apliciranih dostavnih sistemov zaradi bioadhezije je potrebna previdnost. Namreč nekateri avtorji zagovarjajo stališče, da je bioadhezija v prebavnem traktu vprašljiva, predvsem zaradi hitre obnove mukusa. Čas zadrževanja bioadhezivnega sistema na črevesni sluznici je namreč omejen s časom, potrebnim za obnovo mukusa (na črevesni sluznici od 50 do 270 min), ker novonastali mokus izpodriva starega v lumen prebavnega trakta, s tem pa se odluči tudi adheriran dostavni sistem. Poleg tega lahko molekule odlučenega mukusa v lumnu prebavnega trakta interagirajo z dostavnim sistemom in na ta način onemogočijo njegovo adhezijo na sluznico črevesne stene (40, 41).

5.2 Alginat v sistemih za ciljano dostavo v kolon

Alginat je eden izmed številnih polisaharidov, ki ga v prebavnem traktu selektivno razgradijo encimi kolonske bakterijske mikroflore. To

lastnost alginata lahko izkoristimo za pripravo dostavnih sistemov s ciljno dostavo v kolon (42). Glavna omejitev polisaharidnih sistemov za ciljno dostavo v kolon je, da so to hidrofilni polimeri, ki sami po sebi ne uspejo zadržati sproščanja učinkovine do kolona. Z uporabo različnih polimernih oblog, ki se raztopijo po določenem času in/ali ob spremembi pH, lahko zagotovimo prihod dostavnega sistema v kolon brez prezgodnjega sproščanja učinkovine. Po prihodu alginatnega dostavnega sistema v kolon pa sproščanje učinkovine poteka zelo hitro zaradi razgradnje alginatnega ogrodja z bakterijskimi encimi.

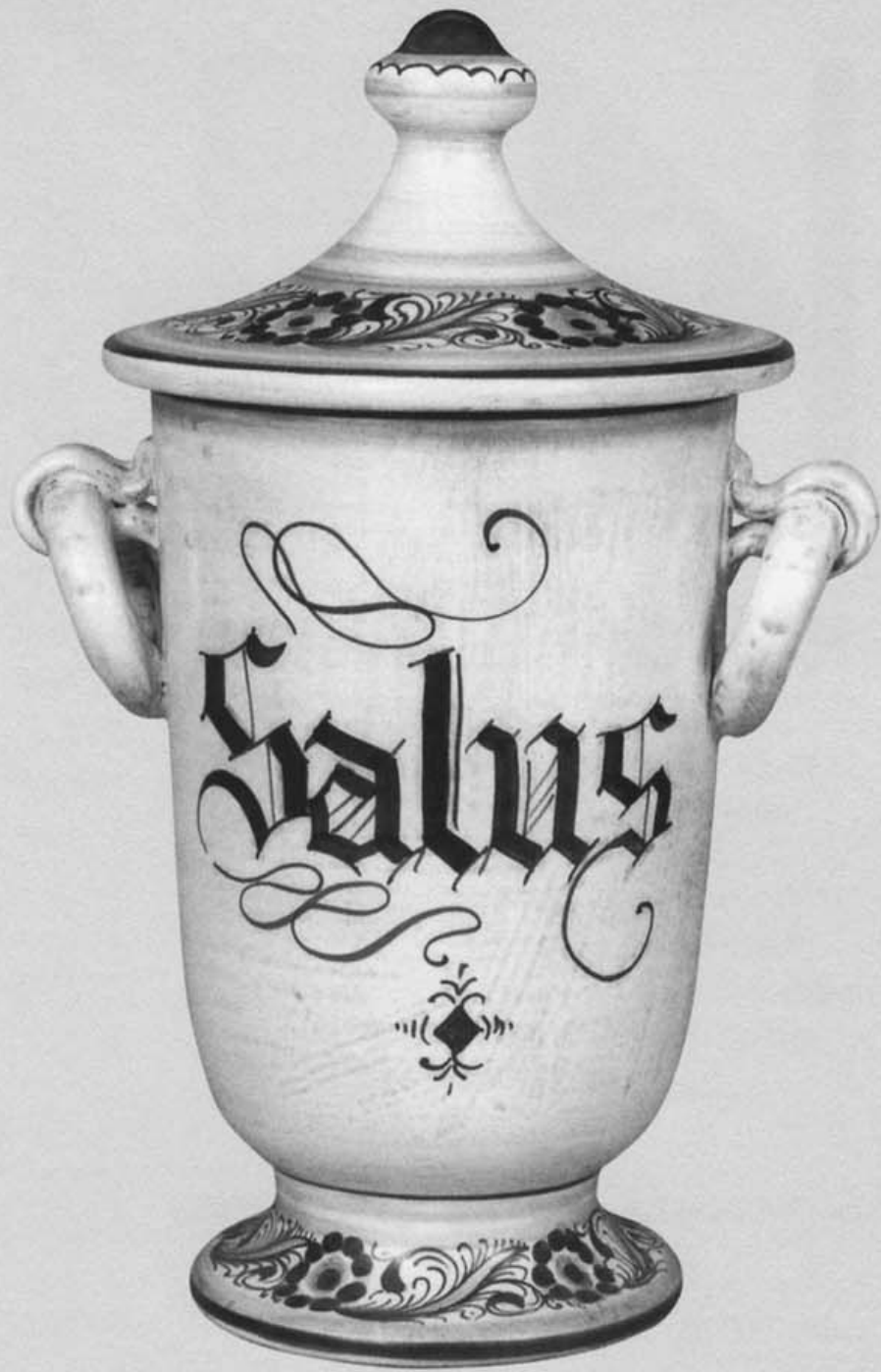
6 Zaključek

Alginat je naraven polisaharidni polimer, ki ga zaradi svojih lastnosti, kot so nabrekanje in geliranje v prisotnosti različnih premeževalcev ali spremembi pH ter nekaterih drugih lastnosti, vedno pogosteje srečamo v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem za različne učinkovine, vključno s proteini in encimi. Z izbiro ustreznega tipa alginata ter pogojev priprave alginatnega ogrodja lahko izdelamo dostavni sistem s časovno in/ali prostorsko prirejenim sproščanjem.

7 Literatura

1. Kumar MNVR, Kumar N. Polymeric controlled drug delivery systems: perspective issues and opportunities. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27 (1): 1-30.
2. Bhardwaj TT, Kanwar M, Lal R et al. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26 (10): 1025-1038.
3. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 621-630.
4. Shilpa A, Agrawal SS, Ray AR. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *J Macromol Sci Polym Rev* 2003; C43 (2): 187-221.
5. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Del Rev* 1998; 31: 267-285.
6. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. *J Control Release* 2006; 114: 1-14.
7. Malafaya BF, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 207-233.
8. Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release*, 2007; 119: 5-24.
9. Draget KI, Skjåk Braek G, Smidsrød O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrate Polym* 1994; 25: 31-38.
10. Draget KI, Skjåk Braek G, Stokke BT. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. *Food Hydrocoll* 2006; 20: 170-175.
11. Bajpai SK, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *React Funct Polym* 2004; 59: 129-140.
12. Ouwerx C, Velings N, Mestdagh MM et al. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads with various divalent cations. *Polym Gels Netw* 1998; 6: 393-408.
13. Suzuki Y, Tanihara M, Nishimura Y et al. In vivo evaluation of a novel alginate dressing. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1999; 48: 522-527.
14. Homar M, Šuligoj D, Gašperlin M. Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method. *J Microencapsul* 2007; 24 (1): 72-81.
15. Smrdel P, Bogataj M, Podlogar F et al. Characterization of calcium alginate beads containing structurally similar drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 2006; 32: 623-633.
16. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A. The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelatination. *Sci Pharm* 2008; 76: 77-89.
17. El – Kamel AH, Al–Gohary OMN, Hosny EA. Alginate–diltiazem hydrochloride beads: optimization of formulation factors, in vitro and in vivo availability. *J Microencapsul* 2003; 20 (2): 211-225.
18. Østberg T, Vesterhus L, Graffner C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. Effect of process and formulation factors on matrix properties. *Int J Pharm* 1993; 97: 183-193.
19. Rousseau I, Le Cerf D, Picton L et al. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. *Eur Polymer J* 2004; 40 (12): 2709-2715.
20. Almeida PF, Almeida AJ. Cross-linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. *J Control Release* 2004; 97: 431-439.
21. Fundueanu G, Nastruzzi C, Carpov A. Physico-chemical characterization of Ca–alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* 1999; 20: 1427-1435.
22. Puttipathkachorn S, Pongjanyakul T, Priprem A. Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminium silicate, and their physical characteristics. *Int J Pharm* 2005; 293 (1-2): 51-62.
23. Zohar-Perez C, Chet I, Nussinovitch A. Irregular textural features of dried alginate-filler beads. *Food Hydrocoll* 2004; 18: 249-258.
24. Smrdel P, Bogataj M, Zega A et al. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *J Microencapsul* 2008; 25 (2): 90-105.
25. Kedzierewicz F, Lombry C, Rios R et al. Effect of the formulation on the in-vitro release of propranolol from gellan beads. *Int J Pharm* 1999; 178: 129-136.
26. Poncelet D, Babak V, Dulieu C et al. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 1999; 155: 171-176.
27. Østberg T, Lund EM, Graffner C. Calcium alginate matrices for oral multiple administration: IV. Release characteristics in different media. *Int J Pharm* 1994; 112: 241-248.
28. Sugawara S, Imai T, Otagiri M. The controlled release of prednisolone using alginate gel. *Pharm Res* 1994; 11 (2): 272-277.
29. Sezer AD, Akbuga J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II: Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. *J Microencapsul* 1999; 16 (6): 686-696.
30. Ueng SW, Lee SS, Lin SS et al. Biodegradable alginate antibiotic beads. *Clin Orthop* 2000; 380: 250-259.
31. Kikuchi A, Okano T. Pulsatile drug release control using hydrogels. *Adv Drug Del Rev* 2002; 54: 53-77.
32. Martinsen A, Skjåk Braek G, Smidsrød O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1989; 33: 79-89.

-
33. Kim CK, Lee EJ. The controlled release of blue dextran from alginate beads. *Int J Pharm* 1992; 79 (1-3): 11-19.
 34. McGinity JW, Repka MA. Alginic acid. In: Rowe CR, Sheskey PJ, Owen SC. *Pharmaceutical excipients*. London, Pharmaceutical Press, Electronic version, 2006.
 35. Holte Ø, Onsøyen E, Myrvold R et al. Sustained release of water soluble drug from directly compressed alginate tablets. *Eur J Pharm Sci* 2003; 20: 403-407.
 36. Hodsdon AC, Mitchell JR, Davies C et al. Structure and behaviour in hydrophilic matrix sustained release dosage forms:3. The influence of pH on the sustained-release performance and internal gel structure of sodium alginate matrices. *J Control Release* 1995; 33: 143-152.
 37. Liew CW, Chan LW, Ching AL et al. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *Int J Pharm* 2006; 309: 25-37.
 38. Whitehead L, Collet JH, Fell JT. Amoxicillin release from a floating dosage form based on alginate. *Int J Pharm* 2000; 210 (1-2): 45-49.
 39. Murata Y, Sasaki N, Miyamoto E. Use of floating gel beads for stomach-specific drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 20 (2): 221-226.
 40. Lehr CM. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J Control Release* 2000; 65: 19-29.
 41. Junginger HE. Mucoadhesive hydrogels. *Pharm Ind* 1991; 53 (11): 1056-1065.
 42. Bogataj M, Mrhar A, Lavrič A, Černe M, Tibaut D, Štalc A, Urleb U, Mateović T, Cof G, Kerč J, Dreu R, Yoneda F, Muraoka S. Gastroresistant pharmaceutical dosage form comprising N-(2-(2-phthalimidoethoxy-) acetyl)-L-alanyl-D-glutamic acid (LK-423). *Publish Int Patent Appl WO 2005/092295 A1*, 6 October 2005.



SALUS

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

Farmakogenomika v zdravljenju astme

Pharmacogenomics in asthma treatment

Vojko Berce, Uroš Potočnik

Povzetek Med posamezniki obstajajo velike razlike v učinku protiastrmatične terapije, ki so pogojene predvsem z različnim genetskim zapisom. Namen farmakogenomike je poiskati tiste polimorfizme, ki so povezani z vsemi učinki določenega zdravila. Farmakogenomika pri astmi zaenkrat proučuje predvsem vpliv genov, ki kodirajo receptorje za zdravila, komponente postreceptorske signalne transdukcije in transkripcijske dejavnike. Največ raziskav je bilo narejenih na področju farmakogenomike beta2 agonistov. Mutacija Arg/Arg na mestu 16 gena ADRB2, ter mutacije v genih LTC4S, ALOX5 in CRHR1 spremenijo odziv na protiastrmatično terapijo. Cilj farmakogenomike astme pa je poiskati čimbolj učinkovito protiastrmatično zdravilo z čimmanj stranskimi učinki individualno za vsakega posameznika na podlagi njegovega genotipa.

Ključne besede: farmakogenomika, astma, polimorfizmi

Abstract: There are substantial differences in the effect of antiasthmatic therapy between individuals which are dependent on the diversity of the genetic code. The purpose of pharmacogenomics is to find out those polymorphisms, which are connected with all effects of certain drug. For now the pharmacogenomics of asthma above all study the influence of the genes which code for drug receptors, signal transduction components and transcription factors. Most studies were done in the field of pharmacogenomics of beta2 agonists. Gene mutations that are known to alter the response to asthma therapy include Arg/Arg at position 16 in ADRB2 gene, mutations of LTC4S and ALOX5 and CRHR1 variants. The goal of pharmacogenomics is to find out most efficient drug without adverse side effects individually suited for each patient on basis of his genotype.

Key words: pharmacogenomics, asthma, polymorphisms

1 Uvod

Pri zdravljenju astme obstajajo velike razlike v odzivu na terapijo, ki so pogojene tudi z razlikami v genetskem zapisu med zdravljenimi osebami – polimorfizmi. Polimorfizmi posameznega nukleotida (single nucleotide polymorphism – SNP) so najpogostejša oblika polimorfizmov v našem genomu (1). Farmakogenomika preučuje odnos med genotipom in odzivom na terapijo. Namen farmakogenomike je poiskati tiste polimorfizme v našem genomu, ki so povezani z vsemi učinki terapije. Cilj farmakogenomike je stratifikacija bolnikov glede predvidenega odziva na terapijo in stranskih učinkov terapije. Zaenkrat se praktično vse farmakogenomske študije pri astmi ukvarjajo s področjem farmakodinamike in ugotavljajo vpliv genetskega zapisa za receptor ali druge beljakovine, ki sodelujejo v poti delovanja zdravila na sam učinek zdravila (2). V etiopatogenezo astme in v odziv na terapijo se poleg genetskih dejavnikov vpletajo tudi številne druge lastnosti posameznika in vplivi okolja. Komponenta te kompleksnosti je tudi zelo variabilen odziv na terapijo. Verjetno pa vpliv genetskega zapisa predstavlja kar okrog 80% celokupne variabilnosti v odzivu na

protiastrmatično terapijo med posamezniki. Kljub temu s pomočjo farmakogenomike zaenkrat še ne moremo celovito predvideti odziva na protiastrmatično terapijo (3).

Pri zdravljenju astme uporabljamo več skupin zdravil:

- Agoniste beta2 adrenergičnih receptorjev (β agonisti), ki delujejo kot bronhodilatatorji
- Glukokortikoide, ki delujejo protivnetno in jih lahko apliciramo neposredno v dihala ali sistemsko
- Inhibitorje sinteze ali delovanja cisteinil levkotrienov
- Zdravila, ki jih pri nas redko uporabljamo za zdravljenje astme in za katere obstaja malo farmakogenomskih podatkov (teofilin, nedokromil).

Za prve tri skupine zdravil že obstajajo relevantne farmakogenomske študije. Kandidatni geni pri farmakogenomiki astme so predvsem tisti, ki kodirajo receptorje za zdravila, komponente postreceptorske signalne transdukcije in transkripcijske dejavnike. Upoštevati pa moramo tudi gene, ki sodelujejo v metabolizmu tarč posameznega zdravila (2). Najpomembnejši kandidatni geni pri farmakogenomiki astme in njihovi polimorfizmi so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Kandidatni geni in polimorfizmi pri farmakogenomiki astme

Table 1: Candidate genes and polymorphisms in the pharmacogenomics of asthma

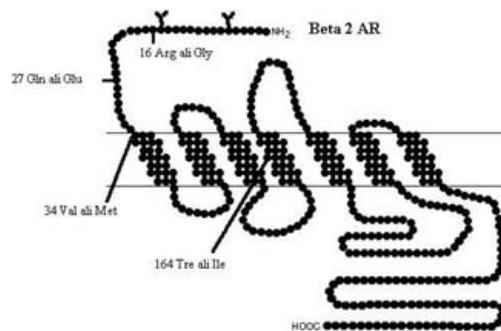
BELJAKOVINA	GEN	GENOTIP	ZDRAVILO	POMEN
Beta2 adrenergični receptor	ADRB2	16 Arg/Arg	Kratkodelujoči beta2 agonisti Dolgodelujoči beta2 agonisti	Boljši akutni učinek zdravila (6) Več poslabšanj astme in tahifilaksija ob dolgotrajni uporabi (7, 8) Brez učinka tudi v kombinaciji s steroidi (8)
Adenilil ciklaza 9	ADCY9	772 Met/Met	Beta2 agonisti in steroidi	Močnejši bronhodilatacijski učinek ob hkratni uporabi steroidov (11)
5-lipooksigenaza	ALOX5	Mikrosatelit (GGGCGG)5	Antagonisti levkotrienskih receptorjev	Dober protivnetni učinek (15)
Levkotrien C4 sintaza	LTC4S	-444 C/C	Antagonisti levkotrienskih receptorjev	Dober protivnetni učinek (16)
CRH receptor	CRHR1 CRHR2	rs242941 rs7793837	Glukokortikoidi Beta2 agonisti	Protivnetni učinek (18) Bronhodilatacijski učinek (12)

2.1 Farmakogenomika agonistov beta2 adrenergičnih receptorjev pri astmi

Agonisti beta2 adrenergičnih receptorjev delujejo preko beta2 adrenergičnega receptorja (beta2AR), ki je površinski celični receptor združen s proteinom G (slika 1). Največ študij obstaja za vpliv polimorfizma Arg16Gly na učinek beta2 agonistov. Varianta Gly16 je vsaj "in vitro" povezana z zmanjšano aktivnostjo beta2AR (4, 5). V farmakogenomski študiji, ki je zajela 255 bolnikov z blago astmo pa paradoksalno ugotavljajo zmanjšano aktivnost beta2AR in tahifilaksijo po nekajtedenski redni uporabi beta2 agonistov samo pri genotipu Arg/Arg na aminokislinskem mestu 16 v genu za beta2AR. Pri astmatikih s takim genotipom je po koncu obdobja stalne uporabe beta2 agonistov prišlo tudi do pogostejših poslabšanj astme. Ligetov dinamični model kinetike receptorjev zato predpostavlja, da imajo homozigoti Gly/Gly že pred uporabo eksogenih beta2 agonistov zmanjšano aktivnost beta2AR. Genotip Gly/Gly je povezan z večjo »občutljivostjo« receptorja, katerega aktivnost zavirajo že endogeni kateholamini in zato do dodatnega padca aktivnosti ter tahifilaksije po redni uporabi beta2 agonistov ne pride. Pri osebah z genotipom Arg/Arg pa je beta2AR manj občutljiv na endogene kateholamine in do zmanjšanja aktivnosti receptorjev pride šele po dolgotrajni vsakodnevni uporabi beta2 agonistov. V skladu s temi domnevami je tudi ugotovitev, da ob enkratni uporabi beta2 agonistov (bronhodilatacijski test) FEV1 pri astmatikih in neastmatikih bolj poraste pri genotipu Arg/Arg (6). Nekatere študije kažejo, da tudi dolgotrajna uporaba dolgo delujočih beta2 agonistov z vidika pojava rezistence na beta2 agoniste bolj škodi astmatikom z genotipom Arg/Arg (7, 8). Vendar so si rezultati študij o vplivu genotipa na učinek dolgodelujočih beta2 agonistov nasprotujoči. Novejše študije tega vpliva ne potrjujejo (9).

Nekatere študije ugotavljajo tudi vpliv SNP na aminokislinskem mestu 27 (Glu27Gln), vendar je učinek tega SNP, ki se pogosto deduje vezano z SNP Arg16Gly, veliko manj pomemben (10). SNP Arg16Gly

je edini izmed polimorfizmov na področju farmakogenomike astme za katerega že sedaj obstaja dovolj dokazov o vplivu, ki bi ga lahko upoštevali (morali upoštevati?) pri načrtovanju terapije v klinični praksi. Posamezen SNP ali haplotip v enem genu ne more docela pojasniti velikih razlik v odzivu na terapijo z beta2 agonisti. Verjetno bi enigmo farmakogenomike beta2 agonistov lažje razrešili, če bi hkrati analizirali še vpliv polimorfizmov v signalni kaskadi postreceptorskega delovanja agonistov beta2 adrenergičnih receptorjev in polimorfizmov v genih za proteine, ki sodelujejo pri kontrakciji/relaksaciji gladkih mišic (8). Eden takih polimorfizmov je SNP Met772Ile v genu za adenilil ciklazo tipa 9. Ta encim sodeluje pri signalni transdukciji beta2 agonistov. Aktivira ga protein Gs, ki je pridružen beta2AR. Alel Met 772 ojača signalno transdukcijo in s tem učinek beta2 agonistov, vendar samo ob hkratni terapiji s glukokortikoidi. Verjetno obstaja tudi interakcija med polimorfizmi v genu za beta2AR, polimorfizmom Met772Ile v genu za adenilil ciklazo 9 in uporabo glukokortikoidov pri vplivu na učinek beta2 agonistov (11).



Slika 1: Beta2 adrenergični receptor in nekateri pomembni polimorfizmi

Figure 1: Beta2 adrenergic receptor and some important polymorphisms

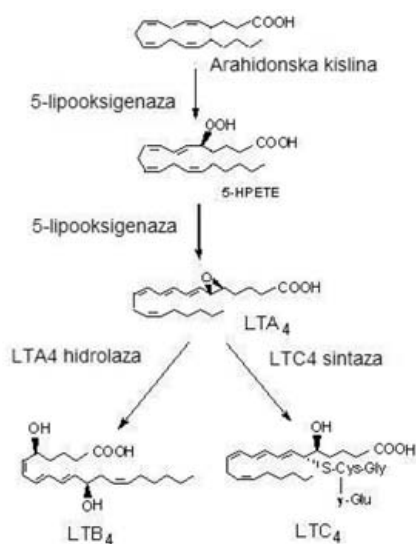
Na 5' koncu gena, ki kodira receptor za CRH (corticotrophin releasing hormone receptor - CRHR2) je pet polimorfizmov, ki v različnih študijah kažejo vpliv na odziv na terapijo z beta2 agonisti. Za polimorfizem rs7793837 ugotavljajo vpliv pri različnih populacijah (12).

Na področju farmakogenomike beta2 agonistov pri astmi ostajajo številna odprta vprašanja. Proučiti je potrebno vpliv genotipa na pojav nekaterih neželenih učinkov beta2 agonistov (predvsem na kardiovaskularni sistem). Z ozirom na široko uporabo dolgodelujočih agonistov beta2 adrenergičnih receptorjev (LABA) je potrebno glede na genotip opredeliti tiste skupine bolnikov, pri katerih lahko dolgotrajna uporaba LABA povzroči toleranco na kratkodelujoče beta2 agoniste ali celo poslabšanje astme (13).

2.2 Farmakogenomika zdravil proti levkotrienom

Levketrieni so produkti metabolizma arahidonske kisline. V patogenezi astme je najbolj raziskana vloga cisteinil levkotrienov (LTC₄, LTD₄ in LTE₄) ter LTB₄. Encim 5-lipooksigenaza (5-LO oziroma ALOX5) je vpleten v sintezo vseh bronhokonstriktornih levkotrienov. Inhibitorji encima 5-LO in antagonisti receptorjev za cisteinil levkotriene se uporabljajo za zdravljenje astme (14). Pot sinteze levkotrienov prikazuje slika 2.

Promotor gena za 5-LO vsebuje številna vezavna mesta za transkripcijske faktorje. Vezavno mesto za transkripcijski dejavnik Sp-1, ki se nahaja 100 baznih parov pred kodonom start je visoko polimorfno mikrosatelitno mesto s 3 do 6 ponovitvami sekvence šestih baznih parov. Večina belcev in afro-američanov ima na tem lokusu 5 ponovitev sekvence – divji tip. Pri kateremkoli drugem številu ponovitev je zmanjšana ekspresija gena za 5-LO in s tem sinteza najpomembnejših levkotrienov. Astmatiki, ki nimajo divjega tipa alela s petimi ponovitvami, so manj dovzetni za delovanje protilevketrienskih zdravil, ker pri njihovi astmi levkotrieni nimajo pomembnejše vloge. Tak genotip ima okrog 6 % astmatikov in ti



Slika 2: Pot sinteze levkotrienov (povzeto po 14, 15, 16)

Picture 2: Leukotriene synthesis pathway (summarised from 14, 15, 16)

bolniki so dejansko neodzivni na zdravljenje z inhibitorji 5-LO. Tudi ob terapiji z zafirlukastom - antagonistom levkotrienskih receptorjev, ugotavljajo učinek samo pri tistih astmatikih, ki imajo vsaj eno kopijo divjega tipa na vezavnem mestu za Sp-1 (15).

Encim LTC₄ sintaza sodeluje pri spajanju glutationa z osnovnim skeletom arahidonske kisline. Polimorfizem na nukleotidnem mestu A-444C v promotorju gena za LTC₄ sintazo vpliva na sintezo vseh cisteinil levkotrienov. Alel 444C omogoči funkcionalno vezavno mesto za aktivatorski protein. Astmatiki s 444C varianto imajo povečano sintezo cisteinil levkotrienov in boljši odziv na zafirlukast. Tudi padec vrednosti dušikovega monoksida (NO) po terapiji z montelukastom je izrazitejši pri homozigotih C/C ali heterozigotih A/C na tem lokusu v primerjavi z genotipom A/A (16).

Domnevamo lahko, da imajo astmatiki z določenimi precej pogostimi polimorfizmi bodisi v genu za 5-LO ali za LTC₄ sintazo manj ugoden odziv na protilevketrienska zdravila. Študij, ki bi preučevale učinek kombinacije teh polimorfizmov pa zaenkrat še ni. Prav tako ni študij, ki bi pojasnile morebitni vpliv genotipa na pojav neželenih stranskih učinkov zdravil proti levkotrienom. Nekaj odstotkov astmatikov, ki prejemajo inhibitorje 5-LO ima povišane aminotransferaze in verjetno je tudi ta pojav genetsko pogojen (17).

2.3 Farmakogenomika glukokortikoidov pri astmi

Razlika v odzivu na inhalacijske kortikosteroide med posamezniki je ponovljiva, zato domnevamo, da zanjo obstaja genetska podlaga. Nekateri študije ugotavljajo, da pri petini astmatikov pride celo do poslabšanja pljučne funkcije po nekajtedenski uporabi inhalacijskih kortikosterooidov. Pri več kot 30% astmatikov pa steroidi nimajo pomembnejšega učinka (1, 18). Asociacijska študija, ki jo je leta 2004 objavil Tantisira s sodelavci je poizkušala povezati številne polimorfizme v genih, ki kodirajo beljakovine vpletene v sintezo in delovanje steroidnih hormonov na eni strani in učinek terapije z inhalacijskimi kortikosteroidi na drugi. V študiji ugotavljajo vpliv nekaterih polimorfizmov v genu, ki kodira receptor za CRH (corticotrophin releasing hormone) – CRHR1. Domnevajo, da ima receptor CRHR1 pomembno vlogo pri regulaciji endogene sinteze steroidnih hormonov. Vpliv na učinek terapije kaže tudi kombinacija alelov v genu za CRHR1 združena v t.i. haplotip GAT. Ta haplotip ima okrog 27% ljudi. Verjetno pa so analizirani polimorfizmi samo v neravnotežju vezave z odseki gena, ki dejansko vplivajo na terapevtski odziv (19).

Podobno kot pri levkotrienih je tudi pri steroidih učinek terapije lahko vezan na aktivnost določene poti sinteze ali delovanja vnetnih mediatorjev na katere zdravilo učinkuje. Ugotavljajo, da je protiastmatski učinek inhalacijskih steroidov vezan na različen vpliv nekaterih interleukinov (IL-13) in receptorjev zanje (IL-4R) pri določenih podskupinah astmatikov. Pri astmatikih z večjo vlogo teh beljakovin je tudi učinek steroidov izrazitejši (20).

Tudi polimorfizem v genu TBX21, ki kodira transkripcijski dejavnik T-bet je povezan z učinkom steroidov pri astmi, vendar je delež astmatikov z redkejšim (minor) alelom zelo majhen in je temu ustrezen tudi splošni pomen tega polimorfizma za terapijo astme v celoti (21).

Neodzivnost na zdravljenje z glukokortikoidi je verjetno posredovana tudi z glukokortikoidnim receptorjem (GR). GR se nahaja v citosolu, po vezavi z ligandom pa se receptor aktivira in pride do translokacije kompleksa v jedro. GR v jedru aktivira prepisovanje genov za protivnetne beljakovine. Hkrati pa GR v jedru inhibira nekatere transkripcijske dejavnike, ki spodbujajo prepisovanje genov za provnetne beljakovine. Obstajata dve obliki GR, kar je posledica alternativnega izrezovanja intronov. Pogostejša oblika GR α deluje protivnetno. GR β pa nima učinka, a zasede vezavna mesta za GR in na ta način deluje dominantno negativno. Pri astmatikih, ki niso odzivni na steroide ugotavljajo povečano razmerje med mRNA za GR β in mRNA za GR α v limfocitih periferne krvi (22, 23).

Verjetno imajo tudi nekateri stranski učinki, ki se lahko pojavijo ob terapiji s sistemskimi (osteoporoza) ali inhalacijskimi (katarakta, glavkom) glukokortikoidi svoj vzrok v genetskem zapisu (2).

3 Zaključek

Cilj farmakogenomike je predvideti terapevtski odziv in morebitne neželene učinke na podlagi predhodnega genetskega testiranja. Pri astmi je vpliv posameznega gena na učinek terapije pogosto maskiran z genskimi interakcijami, lastnostmi osebe (starost, spol, rasa) in dejavniki okolja. Ugotovitve farmakogenomskih študij pri astmi tako veljajo samo za populacijo iz katere vzorec izhaja.

Med dejavniki okolja je predvsem kajenje tisto, ki lahko modificira vpliv polimorfizmov, kar ugotavljamo tudi v primeru beta2 AR. V celoti gledano pa je vpliv genetskega zapisa na učinek terapije prevladujoč in pomembnejši od ostalih vplivov.

Podatki pridobljeni s farmakogenomskimi študijami bodo prispevali k individualizaciji protiastrmatične terapije. Tako bomo lahko na podlagi predhodnega genetskega testiranja posamezno zdravilo usmerili k tistim ciljnim skupinam astmatikov, kjer pričakujemo ugoden terapevtski odziv. Zdravila pa ne bomo uvajali osebam z genotipom, ki je podlaga za pogostejše pojavljanje neželenih učinkov. Verjetno bomo pri genetskem testiranju uporabili nabor nekaj ključnih polimorfizmov, kateri nam bodo pred uvedbo določenega zdravila najbolje predvideli njegove koristi in morebitne stranske učinke. Naloga farmakogenomike je določiti te ključne polimorfizme. Pričakujemo lahko, da bomo genetsko testiranje pred uvedbo protiastrmatičnih zdravil v naslednjih nekaj letih že pričeli uporabljati v klinični praksi.

4 Literatura

1. Wechsler ME, Israel E. How pharmacogenomics will play a role in the management of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 12-18.
2. Palmer LJ, Silverman ES, Drazen JM, Weiss ST. Pharmacogenomics of asthma treatment. In: Licino J, Wong ML. *Pharmacogenomics: The search for individualized therapies*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2002: 215-234.
3. Palmer LJ, Cookson WOCM. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* 2000; 10: 1280-1287.
4. Ligett SB. The pharmacogenetics of beta2-adrenergic receptors: relevance to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 487-492.
5. Tan S, Hall IP, Dewar J et al. Association between beta 2-adrenoreceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitization in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* 1997; 350: 995-999.
6. Drazen MJ, Israel E, Boushey HA et al. Comparison of regularly scheduled with as-needed use of albuterol in mild asthma. *Asthma Clinical Research Network. N Engl J Med* 1996; 335: 841-847.
7. Taylor DR. Pharmacogenetics of beta2-agonist drugs in asthma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 31: 247-258.
8. Bhatnagar P, Guleria R, Kukreti R. Pharmacogenomics of beta2-agonist: key focus on signaling pathways. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 919-933.
9. Bleeker ER, Postma DS, Lawrance RM et al. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet* 2007 22; 370: 2118-2125.
10. Cho SH, Oh SY, Bahn JW et al. Association between bronchodilating response to short-acting beta-agonist and non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of beta-adrenoceptor gene. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 1162-1167.
11. Tantisira KG, Small KM, Litonjua AA et al. Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: interaction between beta-agonist and corticosteroid pathways. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1671-1677.
12. , , et al. Association of corticotropin-releasing hormone receptor-2 genetic variants with acute bronchodilator response in asthma. 2008; 18: 373-382.
13. Kelly HW. Risk versus benefit considerations for the beta(2)-agonists. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 164S-174S.
14. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 1999; 340: 197-206.
15. Drazen JM, Yandava CN, Dube L et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promotor genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nature Genet* 1999; 22: 168-170.
16. Lam BK, Austen KF. Leukotriene C-4 synthase – a pivotal enzyme in the biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 16-19.
17. Sanak M, Simon H-U, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* 1997; 350: 1599-1600.
18. . Implications of pharmacogenomics in the current and future treatment of asthma. 2007; 13: 497-505.
19. Tantisira KG, Lake S, Silverman ES et al. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1353-1359.
20. Szeffler SJ. Pediatric asthma: an approach to pharmacogenetics analysis. *Chest* 2003; 123: 434S-438S.
21. Tantisira KG, Hwang ES, Raby BA et al. TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18099-18104.
22. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid – insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1600-1604.
23. Goleva E, Li LB, Eves PT et al. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid – insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 607-616.

Uporaba zdravilnih rastlin med nosečnostjo

Use of medicinal herbs during pregnancy

Lucija Lipičnik Rozman

Povzetek: Nosečnice v želji po preprečevanju in zdravljenju zdravstvenih težav med nosečnostjo pogosto posežejo po zdravilnih rastlinah. O učinkovitosti in varnosti uporabe zdravilnih rastlin med nosečnostjo obstajajo omejene informacije. Ni varno domnevati, da so zdravilne rastline, ki so naravne in dosegljive brez recepta, hkrati tudi vselej varne. Kadar so na voljo le pičle informacije o uporabi med nosečnostjo, se je zdravilnim rastlinam priporočljivo izogniti, razen če so sicer skope informacije podkrepljene z dokazi, da obstajajo signifikantne koristi za zdravljenje. V prispevku je prikazan pregled najpogosteje uporabljenih zdravilnih rastlin med nosečnostjo.

Ključne besede: nosečnost, plod, zdravilne rastline, varnost, učinkovitost

Abstract: Pregnant women during their pregnancy often use medicinal herbs for prevention and healing of different health problems. It is not reasonable to believe, that medicinal herbs which are natural and attainable without prescription, are always safe to use. When there is only scant information available regarding their use during pregnancy, it is recommendable to avoid medicinal herbs, unless better information is available and its significant benefit for health proven. In the paper the list of most used medicinal herbs during pregnancy is presented.

Key words: pregnancy, embryo, herbal medications, safety, efficiency

1 Uvod

Zaradi vse večje osveščenosti o koristnosti čim manjšega izpostavljanja zdravilnim učinkovinam med nosečnostjo (tragične posledice jemanja talidomida v šestdesetih letih so močno dvignile zanimanje in preučevanje škodljivega delovanja zdravilnih učinkovin na plod) je upadla uporaba zdravil na recept, presenetljivo pa se je povečala uporaba zdravilnih rastlin in ostalih pripravkov dosegljivih brez recepta.

Povečano zanimanje za uporabo zdravilnih rastlin je mogoče delno pripisati zmotnemu prepričanju, da so naravni produkti, ne glede na okoliščine, varni. Čeprav je večina zdravilnih rastlin varnih pod določenimi pogoji, so nekatera pri visokih dozah toksična ali povzročajo stranske učinke. Veliko je primerov poškodb ali celo smrti, ki so bili posledica zlorabe, kontaminacije in / ali poneverbe zdravilnih rastlin. Pogosto uporabo zdravilnih rastlin gre pripisati tudi prepričanju uporabnikov, da so zdravilne rastline zaradi dosegljivosti brez vednosti zdravnika hkrati brez morebitnih nevarnosti za nosečnico.

V zvezi z možnimi škodljivimi reproduktivnimi, imunološkimi ali nevrološki učinki ter kancerogenezo, ki bi lahko bili povezani z visokimi dozami ali predolgotrajno uporabo teh produktov, je bilo narejenih zelo malo raziskav.

Problem varnosti in nekontrolirane uporabe zdravilnih rastlin je še povečan z aktualno zakonodajo, saj Svet Evrope razvršča zdravilne rastline v enak pravni položaj kot so hrana oziroma prehranska

dopolnila. Slovenska odredba pa prav tako razvršča zdravilne rastline, ki so po vseh znanih podatkih varne v enak pravni položaj kot hrana. Na tak način so zdravilne rastline izvzete iz testiranj o varnosti in učinkovitosti, tako kliničnih kot predkliničnih, ki so sicer obvezna za vsa sintetizirana zdravila. Pojem čistosti, doziranja, učinkovitosti in stranskih učinkov zdravilnih rastlin je s tem nedorečen in nezanesljiv.

Fiziološko stanje nosečnic se med nosečnostjo močno spremeni, zato se je pri izbiri zdravilnih pripravkov zanje potrebno prilagoditi. Fiziološke spremembe povzročajo farmakokinetične spremembe. Farmakokinetično se spremeni absorpcija, porazdelitev in izločanje zdravilnih pripravkov. Fiziološke in farmakokinetične spremembe lahko vplivajo na doziranje, učinkovitost in varnost zdravilnih rastlin.

Velika zadrega se pojavi, kadar želimo ugotoviti delovanje zdravilne rastline na nosečnico in na razvijajoči se plod. Večina učinkovin (sintetizirana zdravila), ki so na tržišču prisotne že dalj časa, ima opravljene epidemiološke raziskave. Medtem so o novejših učinkovinah, ki še niso dolgo na tržišču (zdravilne rastline, katerih uporaba se je močno razširila šele po tragični uporabi talidomida med nosečnostjo v šestdesetih letih) na razpolago le redki podatki o uporabi med nosečnostjo. V mnogih primerih so edine informacije v povezavi s procesom reprodukcije pridobljene iz živalskih študij, ki v večini primerov vključujejo tako visoke doze, da lahko predstavljajo nevarnost za človeka in na ta način ne odražajo dejanske slike (razlika med vrstami). Dosedanja uporaba zdravil med nosečnostjo je pokazala, da naj bo izpostavljanje matere zdravilom, ki so slabo

strokovno preučena, čim manjše. Večina učinkovin naj bi bila med nosečnostjo odmerjena čim bolj skopo oziroma se naj ne bi uporabila.

Informacije, s katerimi bi ocenili tveganje uporabe zdravilnih rastlin med nosečnostjo, so v literaturi omejene. Primera literature, ki obravnava uporabo zdravilnih rastlin med nosečnostjo sta *Botanical Safety Handbook* in *The Complete German Commission E Monographs* (1, 2).

Botanical Safety Handbook v svoji vsebini našteva dvesto zdravilnih rastlin izmed šestoštiriinštiridesetih, ki se med nosečnostjo naj ne bi uporabljale (1). Vendar ta seznam vključuje le malo podatkov kako so reproductivno toksičnost zdravilnih rastlin ovrednotili.

Zdravilni rastlini, ki sta uvrščeni na ta seznam (razred 2b) in sta v nadaljevanju članka naštet kot najpogosteje uporabljeni zdravilni rastlini med nosečnostjo sta beli vratič in ingver (posušena korenina).

Zdravilne rastline, okarakterizirane kot rastline, ki so lahko varno zaužite, če jih uporabljamo pravilno (razred 1) in so v nadaljevanju članka našete kot najpogosteje uporabljene zdravilne rastline med nosečnostjo so ginko biloba, ehinaceja, ingver (sveža korenina) in baldrijan.

Izmed zdravilnih rastlin, najpogosteje uporabljenih med nosečnostjo, sta šentjanževka in ginseng okarakterizirana s trditvijo, da je omejena uporaba zaradi drugih omejitev, ne zaradi nosečnosti (razred 2d).

The Complete German Commission E Monographs vsebuje seznam zdravilnih rastlin, ki so med nosečnostjo kontraindicirane, če obstajajo bibliografski podatki, da je bilo zdravilno rastline uspešno uporabljeno kot abortiv ali če obstajajo eksperimentalni podatki, ki dokazujejo genotoksično tveganje (2). Zdravilna rastlina, ki je uvrščena na seznam in je omenjena v nadaljevanju članka kot najpogosteje uporabljena zdravilna rastlina med nosečnostjo je ehinaceja (parenteralna uporaba).

2 Najpogosteje uporabljena zdravilna rastlina med nosečnostjo

V nadaljevanju članka so navedene zdravilne rastline, po katerih nosečnice za zdravljenje z nosečnostjo povezanih težav najpogosteje posegajo (3, 4).

Šentjanževka (*Hypericum perforatum*), družina Krničevke – Hypericaceae je aromatična trajnica. Drogo predstavljajo socvetja, listi in stebela.

Skoki zgodovino se je uporabljala za zdravljenje prebavnih motenj, glist, zdravljenje ran, vročine in pikov kač. Danes se šentjanževka najpogosteje uporablja za zdravljenje blage do zmerne depresije (5). Med nosečnostjo doživi depresivno epizodo približno 10 % žensk (5). Tako se pojavi klinična dilema pri odločitvi ali izpostaviti plod potencialnim toksinom droge ali zmanjšati tveganje zaradi nezdravljenih psihičnih motenj matere kot je depresija. Zdravilne učinkovine, ki jih šentjanževka vsebuje so: hipericin, flavonoidi (kvercetin, kvercetrin, amentoflavon, hiperin), hiperforin, adiperforin in

eterična olja. Manjše število raziskav na bregih živalih kaže, da šentjanževka ne prizadene kognitivnih sposobnosti, ne povzroča vedenjskih motenj in ne prizadene rasti in telesnega dozorevanja mladičev (5).

Druge študije opravljene na živalih pa poročajo o manjši porodni teži mladičev v primerih materinega zauživanja šentjanževke med brejestjo (5). Pri študijah na živalih so opazili rahlo uterotonično delovanje, vendar po zauživanju šentjanževke pri ljudeh ali živalih abortivnega delovanja niso opazili (3).

Obstajajo tudi sporni, navzkrižni dokazi o teratogenosti hipericina kljub nemutagenemu delovanju celotne rastline (5).

Zaradi pomanjkanja podatkov o strupenosti in zaradi zmožnosti povzročanja preobčutljivostne reakcije na svetli, občutljivi koži (hipericin lahko povzroči fotodermatitis) se med nosečnostjo uporaba šentjanževke odsvetuje.

Ginko (*Ginkgo biloba*), družina Ginkovke – Ginkgoaceae

Drogo predstavljajo posušeni listi. Zdravilne učinkovine, ki jih list ginka vsebuje so flavonoidi (rutin, izoramnetin, kvercetin, kemferol, proantocianidi), terpenoidi (ginkolidi A, B, C, M, J in bilobalid) in organske kisline. Le - te izboljšajo možgansko in periferno krvno cirkulacijo, zmanjšujejo prepustnost kapilar, reducirajo agregacijo trombocitov in vežejo proste radikale.

Med nosečnostjo predstavlja glavno nevarnost, povezano z uporabo ginkovih listov, sposobnost preprečevanja strjevanja krvi, kar je dokumentirano v živalskih in v in-vitro študijah, saj se lahko podaljša čas krvavljenja med porodom (6).

V izpisku o toksičnosti zdravilnih rastlin so poročali da obstaja šibek dokaz, da je ekstrakt ginka emenagog in da lahko povzroča hormonske spremembe (6).

Omejene študije, opravljene na laboratorijskih živalih, niso dokazale teratogenosti (3).

Glede na neraziskano področje te zdravilne rastline se uporaba med nosečnostjo odsvetuje (3).

Ehinaceja, ameriški slamnik (*Echinacea purpurea*), družina Nebinovke – Asteraceae

Drogo predstavljajo korenine in nadzemni deli rastline. Znanih je več pripravkov iz ehinaceje, vendar se zaradi različnega postopka izdelave med seboj razlikujejo. Bistvenega pomena je, katero topilo se uporabi pri izdelavi pripravka.

Zdravilne učinkovine, ki se nahajajo v drogi so: derivati kofeinske kisline (ehinokozidi, cinarin, cihorična kislina), polisaharidi, glikoproteini, alkamidi.

Ehinaceja ima antivirusne, antibakterijske, antimikotične, imunostimulativne, protivnetne lastnosti. Obstaja dober znanstveni dokaz, pridobljen v prospektivni kohortni študiji, da oralno zauživanje ehinaceje med prvim tromesečjem nosečnosti ne poveča tveganja za pojav večjih malformacij (7).

Nadaljnji teoretični dokazi, ki temeljijo na mnenju strokovnjakov botanične medicine so pokazali, da je oralna uporaba ehinaceje v priporočenih dozah varna pri uporabi med nosečnostjo (7).

Na voljo je veljavna študija katere rezultati so pokazali, da do presežka pojava malformacij ali izgube otroka pri nosečnicah, ki so uporabljale ehinacejo, ni prišlo (3).

Uporaba ehinaceje med nosečnostjo ne povzroča teratogenosti.

Pravi ženšen, ginseng (*Panax ginseng*), družina Bršljanovke – Araliaceae

Drogo predstavljajo posušene korenine, ki se narežejo za pripravo čajev, praškov in drugih pripravkov.

Ginseng se uporablja kot tonik za poživitev in utrjevanje v obdobju utrujenosti in izčrpanosti, pri pojemanju moči in koncentracije za delo.

Ginseng se je tradicionalno uporabljal med nosečnostjo (8).

Zelo močni dokazi, pridobljeni v kohortni študiji, so dokazali, da *Panax ginseng*, uporabljen med nosečnostjo, ne povzroča stranskih učinkov (9).

O trditvi, da *panax ginseng* povzroča estrogene in androgene učinke, obstajajo sporni dokazi (9).

In vitro so dokazali teratogeno delovanje kadar je organizem izpostavljen ginsenzoidom (9). Študije na živalih in preliminarne študije na ljudeh so pokazale potencialno varnost uporabe ginsenga pri nosečnicah, čeprav varnost uporabe pri ljudeh ni bila jasno dokazana (8).

Poročilo o smrti novorojenčka in o razvoju moških lastnosti pri razvijajoči se novorojeni deklici poroča o posledicah zauživanja ginsenga matere med nosečnostjo (8).

Varnost ginsenga med nosečnostjo v človeških študijah ni bila potrjena, zato uporaba ginsenga med nosečnostjo ni priporočljiva.

Ingver (*Zingiber officinale*), družina Ingverjevke - Zingiberaceae je trajnica, katere drogo predstavljajo korenike, ki vsebujejo eterično olje ketone (gingerol). Ingver deluje kot antioksidant, antimikrobna učinkovina, antimikotik in antihipertenziv. Nedosledni ali s kvaliteto omejeni dokazi, narejeni na pacientih, poročajo, da je oralno zaužit ingver varen in najbrž učinkovit pri zdravljenju nosečniške slabosti in bruhanja (10).

Dva kontrolirana preizkusa, ki sta preučevala uprašeno ingverjevo koreniko, sta pokazala signifikantno redukcijo slabosti in bruhanja pri ženskah, ki so se zdravile z ingverjem (11).

Rezultati študije o preučevanju žensk, ki so zauživale ingver v nosečnosti, so pokazali, da ni bilo opaziti povečane pojavnosti malformacij, opazili pa so blago zmanjšanje slabosti in bruhanja (11).

Študija, opravljena na podganah, je pokazala povezavo med izpostavitvijo matere ingverju pred porodom in povečano izgubo plodov, kot tudi povečano plodovo težo in dozorevanje kosti (3).

V študiji, v kateri so nosečnice zdravili z ingverjem zaradi hiperemeze, je več pacientk, v primerjavi s placebo skupino, čutilo olajšanje simptomov (3).

Druga študija poroča o boljšem počutju nosečnic zdravljenih z ingverjem, z manj slabosti in manj epizodami bruhanja kakor pri kontrolni skupini žensk. Ingver naj ne bi povzročal stranskih učinkov pri materah ali njihovih dojenčkih, čeprav je dodano opozorilo, da je potrebno več raziskav za potrditev teh ugotovitev (3).

Drugi viri opominjajo, da lahko ingver povzroči aktivnost maternice in da lahko ta aktivnost kot inhibitor tromboksana sintetaze teoretično deluje na vezavo na testosteronske receptorje (3).

Čeprav so podatki preveč pomanjkljivi, da bi ingverjeve pripravke priporočili vsesplošno, lahko glede na opravljene študije zaključimo, da je ingver droga za zdravljenje slabosti in bruhanja v nosečnosti, ki predstavlja malo tveganja in je učinkovita. Zato bi lahko bil primerna alternativa za zdravljenje pacientov, ki ne odreagirajo na glavno terapijo (12).

Beli vratič (*Tanacetum parthenium*), družina Nebinovke - Asteraceae je trajnica, katere najpomembnejša sestavina je partenolid (seskviterpenski lakton). Le-ta lajša vnetja in sprošča krče.

Študij, ki bi se nanašale na izpostavljanje drogi med nosečnostjo, bodisi na laboratorijskih živalih, bodisi na ljudeh ni, zato je beli vratič kontraindiciran na osnovi trditve kot tudi ob dejstvu, da ima lastnosti abortiva in da lahko povzroči hemoragijo pri novorojenčkih (3).

V in vivo in in vitro testu na podganjem modelu so brejim podganam dozirali beli vratič, jih na 20 dan brejosti žrtvovali in zbrali njihove plodove, placentne in jajčnike. Plodove so stehali in pregledali zaradi morebitnih malformacij. Plodovi so bili manjši kot v kontrolni skupini (13). Opaziti je bil upad materine teže (13). Beli vratič se je izkazal toksičen, ko so ga 10, 5 dan brejosti aplicirali v serum brejih podgan za obdobje šestindvajsetih ur (13).

Baldrijan (*Valeriana officinalis*), družina Špajkovke - Valerianaceae je trajnica, katere drogo predstavljajo posušene korenike. Vsebuje eterično olje z monoterpeni in seskviterpeni (valerenska kislina). Baldrijan se uporablja za stanja nemira in motenj spanja, ki temeljijo na živčnih motnjah (2).

Tradicionalno je baldrijan kontraindiciran med nosečnostjo, vendar študij, ki bi potrdile to opozorilo ni (14).

Informacije o varnosti baldrijana med nosečnostjo so pomankljive (4).

Štiri študije poročajo, da se tveganje za plod z uporabo baldrijana med nosečnostjo ne poveča (4).

Razvojni toksični - presejalni test je proučeval toksičnost baldrijana pri brejih podganah. Znakov toksičnosti na samicah ni bilo opaziti. Rezultati testa so pokazali, da baldrijan ne povzroča stranskih učinkov zoper plodnost ali za razvoj plodu (14).

Zaradi pomanjkljivih podatkov o varni uporabi baldrijanovih pripravkov med nosečnostjo uporaba ni priporočljiva.

3 Sklep

Nosečnice pogosto posežejo po zdravilnih rastlinah zaradi zdravstvenih težav, ki se pojavijo med nosečnostjo. Problem, povezan z uporabo zdravilnih rastlin, predstavlja mnenje, da so zdravilne rastline varnejše in učinkovitejše kot sintetična zdravila, ker so naravne in se dobijo brez recepta. Ta problem je posebej pereč, ker

ne obstajajo natančne in dobro vodene raziskave, ki bi okarakterizirale varnost in učinkovitost rabe zdravilnih rastlin med nosečnostjo.

Ker tradicionalna in splošna uporaba ne izkazujeta dovolj jasne slike o tveganjih pri uporabi zdravilnih rastlin med nosečnostjo, je očitno na tem področju potrebnih bistveno več raziskav. Dokler ne bodo izvršene nadaljnje visoko kvalitetne raziskave, ki bi potrdile varnost in učinkovitost uporabe zdravilnih rastlin, uporabe le - teh med nosečnostjo na splošno ne moremo priporočiti.

4. Literatura

1. McGuffin M, Hobbs D, Upron R & Goldberg A (eds) American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook. Boca Raton: CRC Press, 1997: 183 – 184.
2. Blumenthal M, ed. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Boston MA: Integrative Medicine Communications, 1998
3. Conover EA. Herbal agents and over – the – counter medications in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 17: 237 – 251.
4. www.interscience.wiley.com, Holst L, Nordeng H, Haavik S. Use of herbal drugs during early pregnancy in relation to maternal characteristics and pregnancy outcome. *Pharmacoepidemiology and drug safety* 2007
5. Dugoua J, Mills E, Perri D, Koren G. Safety and Efficacy of St. John's Wort (*Hypericum*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 2006; 13 (3): 268 – 276.
6. Dugoua J, Mills E, Perri D, Koren G. Safety and Efficacy of Ginkgo (*Ginkgo biloba*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 2006; 13 (3): 277 – 284.
7. Perri D, Dugoua J, Mills E, Koren G. Safety and Efficacy of Echinacea (*Echinacea Angustifolia*, *E. Purpurea* and *E. Pallida*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 2006; 13 (3): 262 – 267.
8. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/patient-ginseng>
9. Seely D, Dugoua JJ, Perri D, Mills E, Koren G. Safety and Efficacy of Panax Ginseng during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 2008; 15 (1): 87 – 94.
10. Chandra K, Einerson A, Koren G. Taking ginger for nausea and vomiting during pregnancy. *Can Fam Physician* 2002; 48: 1441 – 1442.
11. http://otispregnancy.org/otis_fact_sheets.asp
12. Boone SA, Shields KM. Treating Pregnancy –Related Nausea and Vomiting with Ginger. *The Annals of Pharmacotherapy* 2005; 39: 1710 – 1713.
13. Yao M, Ritchie HE, Brown – Woodman PD. A reproductive screening test of feverfew: is a full reproductive study warranted? *Reprod Toxicol* 2006; 22 (4): 688 – 93.
14. Yao M, Ritchie HE, Brown – Woodman PD. A developmental toxicity – screening test of valerian. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113 (2): 204 – 209.

Primerjava metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov

Comparison of methods for measurement of carbohydrate deficient transferrin

Petra Finderle, Marija Prezelj

Povzetek: Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT, carbohydrate deficient transferrin) se pojavlja v povečani koncentraciji pri škodljivi rabi etanola. CDT se običajno določa s kromatografskimi ali elektroforetskimi metodami. Pri našem delu smo primerjali tri metode za določanje odstotka CDT: ločevanje z ionsko izmenjevalnimi kolonami z imunoturbidimetrično detekcijo, kapilarno elektroforezo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, high performance liquid chromatography). Statistično ovrednotenje rezultatov je pokazalo, da so vse tri metode primerljive, vendar smo z ionsko izmenjevalnimi kolonami dobili 10 % več povišanih rezultatov. S kapilarno elektroforezo in HPLC so rezultati podani z grafičnim izpisom ločenih transferinskih oblik, to nam omogoča, da ugotovimo ali so v vzorcu moteče snovi in genetske variante transferina. Iz našega dela in pridobljenih izkušenj pri določanju CDT sledi priporočilo, da so metode z ionsko izmenjevalnimi kolonami in druge metode, s katerimi dobimo le številčno vrednost CDT, primerne kot presejalni testi, HPLC in kapilarna elektroforeza pa se lahko uporabljata kot potrditveni metodi.

Ključne besede: CDT, transferin, etanol, HPLC, kapilarna elektroforeza

Abstract: Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is elevated in harmful use of alcohol. Usually, CDT is determined with chromatographic or electrophoretic methods. In our work we compared three methods for CDT determination: separation on ion exchange columns with immunoturbidimetric detection, capillary electrophoresis, and high performance liquid chromatography (HPLC). Statistical evaluation of the results showed no difference between all three methods, but with ion exchange columns method 10 % more elevated results has been determined compared with HPLC and capillary electrophoresis. Capillary electrophoresis and HPLC has a graphical pattern output of separated transferrin isoforms. This enables to detect interfering substances or transferrin genetic variants in the sample. Based on this work and gained experiences in the determination of CDT, we recommend to use methods that give only a numerical CDT result (like ion exchange columns method) as a screening tests; HPLC and capillary electrophoresis methods can be used as confirmation tests in CDT determination.

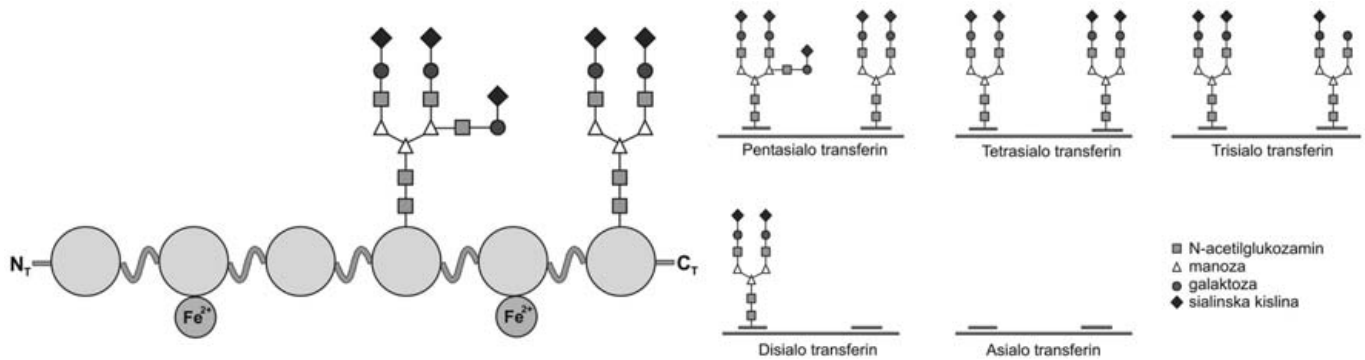
Keywords: CDT, transferrin, ethanol, HPLC, capillary electrophoresis

1 Uvod

Transferin (Tf) je globularni protein, ki prenaša železo v telesu. Je glikoprotein z molekulsko maso 79.750 Da in proteinskim ogrodjem s 679 aminokislinami. Sestoji iz ene same polipeptidne verige, na katero sta na N-koncu pripeti dve oligosaharidni verigi. Strukturno je molekula Tf sestavljena iz dveh globularnih domen (N-terminalne in C-terminalne), kateri neodvisno druga od druge vežeta po en atom železa. Normalno je okoli 30 % celotnega serumskega Tf nasičenega z železom. Celotna količina ogljikovih hidratov v molekuli Tf znaša okoli 6 %. Obe N-glikanski verigi se razlikujeta po stopnji razvejanosti (di-, tri- in tetraantenska struktura) in vsaka N-glikanska veriga se

konča z molekulo sialinske kisline (1, 2). Glede na stopnjo sialiniziranosti ločimo sedem glavnih izooblik transferina: od asialo (brez sialinskih kislin) do heksasialo (s šestimi sialinskimi kislinami) (2, 3). Najpogostejša izooblika je tetrasialotransferin (64–80 %), nizko silainizirane izooblike (asialo-, monosialo- in disialotransferin) pa so le v sledeh (do 5 %) (slika 1) (2 - 4).

Danes je transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT, carbohydrate deficient transferrin) definiran kot delež disialo-, monosialo- in asialotransferina glede na celotno količino transferina. Do leta 2000 je bilo v CDT vključenih tudi 50 % trisialotransferina, vendar so študije pokazale, da ni medsebojne odvisnosti med



Slika 1: Shematski prikaz molekule Tf in pregled izooblik Tf glede na sialiniziranost.
Figure 1: Schematic representation of transferrin molecule and transferrin isoforms

škodljivim vnosom etanola in trisialotransferinom (3, 5, 6). Dokaz o transferinu z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT) v serumu potrди sum za povečan oziroma škodljiv vnos etanola v telo (3). Velja, da dnevno uživanje 60-80 g etanola 14 dni zaporedoma povzroči povečano serumsko vrednost CDT. Tako količino čistega etanola vsebujejo 3 pollitrske steklenice piva, 7 dL vina ali 2 dL žganja (7, 8, 9). Vrednosti CDT se normalizirajo v treh tednih abstinence (9). CDT-izooblike transferina nastanejo zaradi škodljivega učinka etanola oziroma njegovih metabolitov (predvsem acetaldehida) v telesu. Med drugim se aktivnost glikoziltransferaze v hepatocitih zmanjša in to moti normalno glikozilacijo beljakovinskih molekul, ki nastajajo v jetrnih celicah. Zato se ob povečanem vnosu etanola pojavijo nepopolnoma oziroma nizko sialinizirane izooblike Tf (3, 7).

CDT velja danes za najzaneslivejši pokazatelj škodljive rabe etanola. Različni viri navajajo različne vrednosti diagnostične občutljivosti in specifičnosti, glede na uporabljeno metodo in glede na obravnavano skupino preiskovancev (abstinenti, normalni in občasni pivci, alkoholiki). Definicija normalnega oziroma neškodljivega pitja etanola je subjektivna in težko določljiva, saj se posamezne države razlikujejo po kulturi pitja alkoholnih pijač. Zato v povprečju velja za CDT kot merilo škodljive rabe etanola, 85-odstotna (do 98-odstotne) diagnostična specifičnost in 65-odstotna (do 93-odstotne) diagnostična občutljivost (3, 5, 10).

Metode za določanje CDT so osnovane na kvantifikaciji ločenih izooblik transferina glede na njihov naboj in izoelektrično točko (pI od 5,2 do 5,9) (3, 11). Izooblike Tf se ločijo med seboj glede na stopnjo sialiniziranosti in glede na stopnjo nasičenosti z železom. Zato ločevanje izooblik glede na sialiniziranost vedno zahteva predpripravo vzorcev, da se nasitijo transferinske molekule z železom (3, 7, 5, 12).

Od leta 1976 se je CDT določal z izoelektričnim fokusiranjem (IEF), ki je do nedavnega veljalo za referenčno metodo. Po letu 1985 so se na tržišču začeli pojavljati reagenčni kompleti, ki so izooblike Tf ločevale na anionsko izmenjevalnih kolonah (mikrokolone) in z imunokemično (RIA, EIA, TIA) detekcijo Tf v eluatu. Po letu 1990 so se pojavile številne druge polavtomatizirane kromatografske in elektroforezne metode za določanje CDT (tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, high performance liquid chromatography), kapilarna

elektroforeza (CE, capillary electrophoresis)) (3, 7, 5). Leta 2005 je bila predstavljena na tržišču novost: reagenčni komplet za neposredno določanje CDT z imunonefelometrično detekcijo (13, 14). Danes velja, da je HPLC referenčna metoda, vendar samo dotlej, dokler ne bo na voljo metoda z masno spektroskopsko detekcijo izooblik Tf (15).

Naše delo je bilo usmerjeno v primerjavo med metodami za določanje CDT, ki se najpogosteje uporabljajo, z namenom podati mnenje o uporabnosti teh metod v kliničnem laboratoriju ter opozoriti na potrebno previdnost pri interpretaciji rezultatov CDT.

2 Materiali in metode

Pri našem delu smo primerjali tri metode za določanje CDT: ionskoizmenjevalno kromatografijo z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC, ion exchange columns), CE in HPLC. Analizirali smo 118 vzorcev seruma naključno izbranih preiskovancev, ki so imeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo redno naročeno analizo CDT. Vsem obravnavanim vzorcem smo določili CDT s testiranimi metodami ter aktivnosti encimov gama-glutamilttransferaza (GGT), aspartat-aminottransferaza (AST), alanin-aminottransferaza (ALT) in alkalna fosfataza (AP). Med vzorci smo ločeno obravnavali 12 gastroenteroloških bolnikov. Vsi vzorci so bili do analize shranjeni pod pogoji, ki zagotavljajo stabilnost izooblik Tf pri 4 °C največ 7 dni (16). Za primerjavo smo upoštevali priporočila National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) glede nabora vzorcev in vrednotenja rezultatov (10). Statistično oceno primerljivosti med metodami smo določili z metodo najmanjših kvadratov ter t-testom v programu Statistica for Windows.

2.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo

Na ionskoizmenjevalnih kolonah smo izooblike Tf ločili med seboj glede na njihovo izoelektrično točko oziroma glede na različno afiniteto do nasprotno nabitih funkcionalnih skupin v stacionarni fazi (17).

Za analizo smo uporabili reagenčni komplet Tina-quant® %CDT (Roche Diagnostics) ter biokemični analizator Hitachi 917 (Roche

Diagnosics). Predpripravo vzorcev in analizo smo opravili po proizvajalčevih navodilih. Serumski vzorec smo po inkubaciji z raztopino železa prenesli na ionsko izmenjevalno kolono ter spirali s pufrom (Bis-Tris, pH 6,5). V eluatu z višjo izoelektrično točko (nad 5,7) smo imunoturbidimetrično določili koncentracijo CDT-izoblik. Celotno koncentracijo Tf smo določili v vzorcu po nasičenju z raztopino železa. Vrednost CDT smo podali kot delež izoblik CDT glede na celotno koncentracijo Tf. Proizvajalčeva priporočena referenčna vrednost CDT po tej metodi je <3,0 %.

2.2 Kapilarna elektroforeza

To je tehnologija, pri kateri se molekule ločijo po velikosti in naboju znotraj tanke kapilare. Metoda temelji na delovanju dveh nasprotno usmerjenih tokov v kapilari: elektroosmoze in električnega polja.

Izoblike CDT smo določili z analizatorjem Capillarys 2 (Sebia, Francija) s pripadajočim reagenčnim kompletom. Postopek je popolnoma avtomatiziran, pri katerem se molekule Tf nasitijo z železom avtomatično v samem analizatorju. Nabiti delci se ločijo v stekleni kapilari s SiO₂, pri napetosti 9,2 kV, glede na njihovo elektroforezno gibljivost v alkalnem pufru (pH 8,8) in elektroosmoznega toka pufra. Ločene izoblike Tf se zaznajo na katodnem delu kapilare pri 200 nm; tu je del kapilare detekcijska celica. Izoblike Tf so grafično prikazane kot ločene frakcije asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- in pentasialotransferina. Rezultati analize so na voljo po 20 minutah od začetka celotnega avtomatiziranega analiznega postopka. Ločevanje v kapilarah poteče v 8 minutah pri vseh 7 nanesenih vzorcih hkrati. V dobljenem elektroferogramu smo določili odstotek CDT iz deleža ločenih izoblik Tf. Referenčna vrednost za CDT, ki jo priporoča proizvajalec, je <1,3 %.

2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

CDT smo določili z gradientnim HPLC-sistemom Variant (Bio-Rad, Nemčija) in ustreznim reagenčnim kompletom. Gradientna HPLC predstavlja modifikacijo klasičnega postopka HPLC s programiranim spreminjanjem elucijske moči mobilne faze.

Serumske vzorce smo pred nanosom v kolono nasitili z raztopino železovega (III) klorida ter oborjene lipoproteine odstranili s

centrifugiranjem. Izoblike Tf so se ločile v 6,30 minutah pri tlaku 10 kg/cm² in pretoku 1,4 mL/min, z anionsko izmenjevalno stacionarno fazo in pufrom Bis-Tris z različno ionsko močjo. Merjenje absorbance je potekalo pri valovni dolžini 460 nm, značilni za kompleks Tf-železo. V kromatogramu smo vrednost CDT določili iz izračunane količine posameznih ločenih izoblik Tf glede na celotni Tf, kot delež površine pod krivuljo. Po proizvajalčevih priporočilih je referenčna vrednost CDT <1,9 %.

3 Rezultati in razprava

Iz statističnega vrednotenja rezultatov smo izključili vzorec, ki je kazal genetsko varianto molekule Tf ter skupino vzorcev preiskovancev z gastroenterološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Pri 105 analiziranih vzorcih (skupina I) smo izračunali enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient za vse tri pare kombinacij. Rezultati CDT vseh treh analiznih tehnik so v medsebojni odvisnosti (metoda najmanjših kvadratov), statistična analiza s t-testom pa je pokazala signifikantno razliko med paroma CE in IEC (p<0,01), ter HPLC in IEC (p<0,01); med HPLC in CE ni signifikantne razlike (p>0,05).

Večja spremenljivost rezultatov se je pokazala v skupini gastroenteroloških bolnikov (skupina II); pri tej smo v vseh vzorcih ugotovili povišano aktivnost jetrnih encimov. Med vrednostmi CDT in aktivnostmi jetrnih encimov ni bilo nobene medsebojne odvisnosti. V tabeli 1 so zbrani rezultati opazovanih parametrov med obema obravnavanima skupinama.

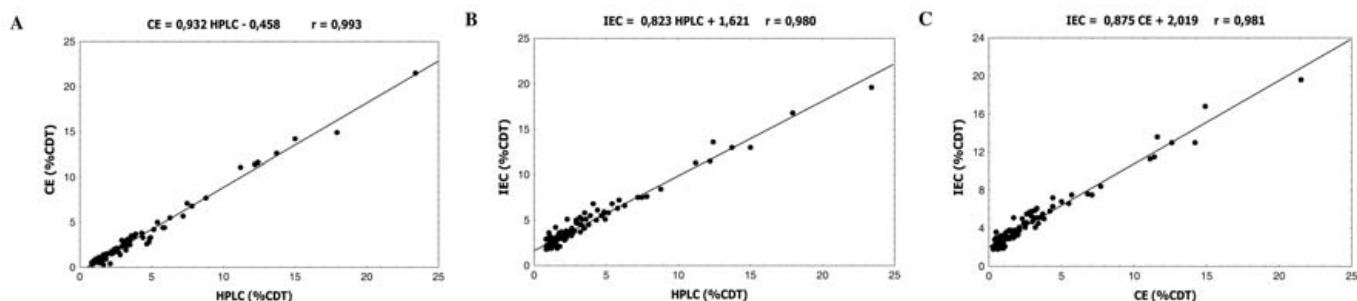
V opravljeni primerjalni študiji smo bili pozorni na vzorce s povišanim CDT. Med 105 vzorci smo s HPLC določili 52 %, s CE 53 % in z IEC 64 % vzorcev z vrednostmi CDT nad priporočeno referenčno vrednostjo. Ni znano kakšen vpliv ima pri zdravnikih razlaga rezultatov CDT, določenih z IEC metodo (10 % več pozitivnih rezultatov glede na ostali dve testirani metodi). Iz poznavanja kliničnega ozadja teh 10 % primerov bi lahko sklepali, da IEC daje lažno pozitivne rezultate. Vzrok bi lahko iskali v neznanosti specifičnosti reakcije antigen-protitelo ter v samem postopku kromatografskega ločevanja, na katerega vplivata okolje in ročno delo (5, 12, 18). Vendar so številne študije z izoelektričnim fokusiranjem in HPLC pokazale, da je ločevanje izoblik

Tabela 1: Pregled priporočenih referenčnih vrednosti, srednjih vrednosti (\bar{x}), standardnih deviacij (sd), najnižjih (min) in najvišjih (max) vrednosti za izmerjene odstotke CDT s testiranimi metodami (HPLC, CE in IEC) v kontrolni skupini 105 vzorcev (skupina I) in skupini 12 vzorcev gastroenteroloških bolnikov (skupina II) ter rezultati t-testa

Table 1: Review of recommended reference values, average values (\bar{x}), standard deviations (sd), minimum (min) and maximum (max) of CDT-percentage results measured with the three tested methods (HPLC, CE, and IEC) in the control group of 105 samples (group I) and in the group of 12 samples of gastroenterological patients (group II), and t-test results

CDT metoda	ref.vred. [%]	skupina I (N = 105)			skupina II (N = 12)		
		$\bar{x} \pm sd$	min	max	$\bar{x} \pm sd$	min	max
HPLC ^{a), b)}	1,9	3,4 ± 3,7	0,8	23,4	2,0 ± 0,7	1,1	3,0
CE ^{a), c)}	1,3	2,7 ± 3,5	0,3	21,5	1,1 ± 0,8	0,4	2,7
IEC ^{b), c)}	3,0	4,4 ± 3,1	1,8	19,6	3,9 ± 1,9	1,4	7,8

t-test: ^{a)}p>0,05 med paroma HPLC in CE; ^{b)}p<0,01 med paroma HPLC in IEC; ^{c)}p<0,01 med paroma CE in IEC



Slika 2: Medsebojna odvisnost med metodami A-HPLC/CE, B-HPLC/IEC, C-CE/IEC opisanimi z enačbo regresijske premice s Pearsonovim koeficientom korelacije

Figure 2: Method correlation between A-HPLC/CE, B-HPLC/IEC, and C-CE/IEC represented with the regression line equation and the Pearson correlation coefficient

Tf na kolonah ustrezno in da se med imunoturbidimetrično reakcijo zaznajo CDT-specifične frakcije (4, 11, 17, 19-22).

Odstopanje rezultatov testirane metode od referenčne metode nam v kliničnem laboratoriju poda primerljivost med rezultati obeh metod. Običajno se razlike razpršijo okoli abscise, kar kaže, da metodi dajeta primerljive rezultate. Če imata primerjani metodi različne referenčne vrednosti, se rezultati odstopanja razpršijo okoli vrednosti razlike med referenčnima vrednostma; to se je tudi pokazalo pri našem delu. Različne referenčne vrednosti ovirajo primerjanje rezultatov CDT med laboratoriji. Danes se je pokazala potreba po uskladitvi metod za določanje CDT. Nekateri poskusi so bili usmerjeni v uvedbo različnih faktorjev (izračun razmerja med disialo- in tetrasialotransferinom ter med disialotransferinom in celokupno koncentracijo transferina v serumu), vendar so le-ti uporabni samo pri metodah, s katerimi lahko določimo posamezne izooblike Tf (HPLC, CE). Kontrolni reagenti so pripomogli k verodostojnemu podajanju rezultatov CDT, vendar danes še vedno ostaja potreba po mednarodnem standardu CDT (3, 4, 23, 24). Leta 2007 je skupina znanstvenikov v okviru Mednarodnega združenja klinične kemije in laboratorijske medicine (IFCC, International federation of clinical chemistry and laboratory medicine) objavila smernice za standardno določanje CDT (15).

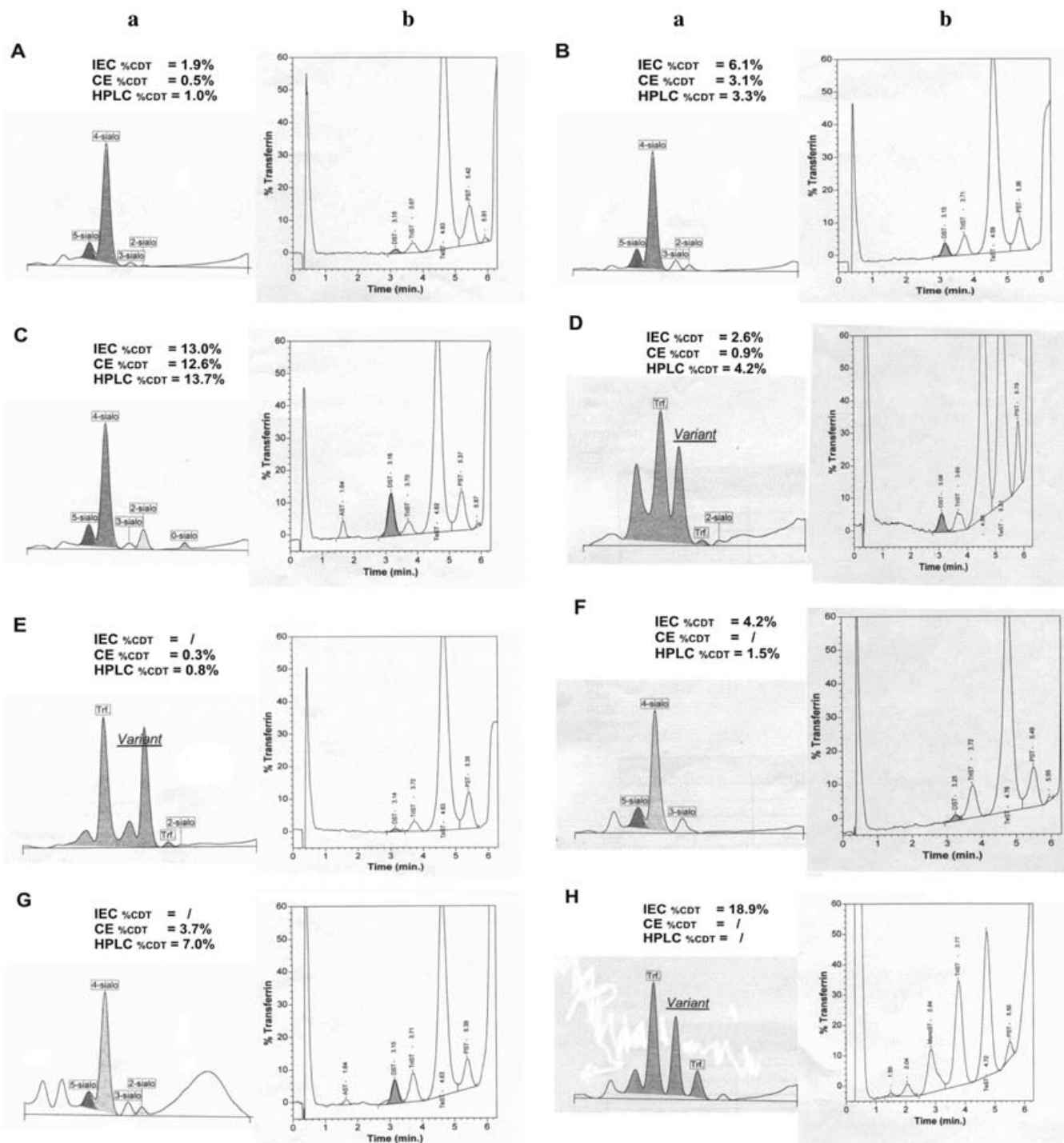
Na sliki 3 so predstavljeni elektroferogrami in kromatogrami testiranih vzorcev. Slika vzorca z vrednostjo CDT znotraj referenčnih mej (slika 3A) predstavlja normalno razporeditev izooblik Tf. Pri povečanem vnosu etanola se vrednost CDT poviša zaradi povišanega deleža disialotransferina (slika 3B) in asialotransferina (slika 3C). Znano je, da je asialotransferin prisoten le v izredno redkih primerih, povezanih s kroničnim alkoholizmom (5, 25). Pri našem delu smo asialotransferin določili 22 odstotkom vzorcev s HPLC in 14,8 odstotkom vzorcev s CE. Ta razlika je verjetno posledica spodnje meje detekcije, ki jo navajata proizvajalca CE do 0,4 % in HPLC do 0,3 %. Na prvi pogled sta obe meji detekcije podobni, vendar ob upoštevanju priporočenih referenčnih vrednosti (CE do 1,3 % in HPLC do 1,9 %) lahko sklepamo, da ima HPLC nižjo mejo detekcije. Razlike v rezultatih pri vzorcih z asialotransferinom niso imele večjega vpliva na klinično interpretacijo izvida, saj je bil CDT v vseh primerih povišan in primerljiv.

Metode, ki podajo grafični izpis rezultatov, omogočajo določitev genetskih variant Tf; to smo potrdili tudi z našim delom (slika 3D). Iz

samih rezultatov CDT, dobljenih z IEC metodo ne moremo določiti genetskih variant, lahko le posumimo vanje, ko je rezultat CDT (z metodo IEC) izredno visok, jetrni encimi pa ne kažejo na patofiziološke poškodbe jeter. V takih primerih je nenadomestljiva analiza CDT z metodo, ki omogoča določanje posameznih izooblik transferina (HPLC ali CE). Genetske variante Tf so bile najprej odkrite leta 1957 z izoelektričnim fokusiranjem. Poleg najpogostejše skupine variante TfC (common) so bile odkrite še anodne (nizka pI) variante TfB in katodne (visoka pI) variante TfD (4, 12, 25). TfC je najpogostejša varianta Tf pri kavkaški populaciji; pri tej je poznanih okoli 16 podtipov (1). Najpogosteje se v naravi pojavljajo mešane (heterozigotne) genetske variante Tf. Švedska študija (Beckman et al. 1998) je pokazala, da se varianta BC pojavlja v približno 0,7 %, varianta CD v približno 0,2 % ter varianta C2C3 v približno 0,6 % (2, 4). Pri našem delu smo določili 1 genetsko varianto BC (slika 3D), kar se sklada z navedeno razširjenostjo genetskih variant Tf.

Variante BC in CD imajo značilne kromatografske slike, z značilnimi retencijskimi časi in višinami pikov C, B ali D, zato jih ni težko določiti. Vrednosti CDT, izmerjene z metodami, ki omogočajo določanje posameznih izooblik transferina, so pri BC visoke glede na CDT, izmerjene z metodo IEC, pri variantah CD pa je ravno obratno (4). Pri redki genetski varianti C2C3 ne pride do ločitve med disialotransferinom in trisialotransferinom; ta varianta je opisana z nizko vrednostjo CDT, določeno s CE in HPLC ter z visokimi vrednostmi CDT z IEC (4, 12, 16). Vendar je pri tem potrebna previdnost, saj so primeri neločenih pikov disialotransferina in trisialotransferina pogosti, kljub nizki pogostnosti genetske variante C2C3 (~0,6 %). Tak primer vidimo na sliki 3F, kjer nizka celotna količina Tf v vzorcu ter klinično ozadje preiskovanca z ustreznimi vrednostmi aktivnosti jetrnih encimov (GGT, AST, ALT) kažejo na cirozo jeter. Med vsemi 118 vzorci se v 5 primerih frakciji disialotransferina in trisialotransferina nista ločili.

Meritev CDT se danes lahko uporablja tudi kot presejalni test v diagnostiki CDG-sindroma (congenital disorder of glycosilation, prirojena motnja glikozilacije). Pri tem ne gre za spremembe v proteinski strukturi Tf, ampak za moteno glikozilacijo vseh beljakovin, ki se tvorijo in glikozilirajo v jetrih. Zaradi motene gradnje glikozidnih verig se količina tetrasialotransferina zmanjša na račun povečanja deleža trisialo- in ostalih nizkosialiniziranih izooblik Tf (slika 3H) (26).



Slika 3: Elektroferogrami (a) in kromatogrami (b) vzorcev: A-normalen CDT, B-povišan CDT, C-povišan CDT z vsebovanim asialotransferinom, D-genetska varianta Tf, E-sum za genetsko varianto Tf, F-združena trisialo- in disialotransferin (ciroza jeter), G- imunoglobulini zakrivajo asialotransferin, H-CDG sindrom tip II

Figure 3: Electropherograms (a) and chromatograms (b) of samples: A-normal CDT, B-high CDT, C-high CDT with asialotransferrin, D-genetic variant of Tf, E-possible genetic variant of Tf (not defined), F-associated threesialo- and disialotransferrin (hepatic cirrhosis), G- immunoglobulins are covering asialotransferrin, H-CDG sindrom type II

Testirane analizne metode so več ali manj avtomatizirane in so primerne za rutinsko uporabo v kliničnih laboratorijih. Danes je vedno pogostejše povpraševanje po določanju CDT, zato morajo biti metode hitre, zanesljive in z nizkim časom analize vzorca (TAT, turnaround time) ter morajo omogočati sledenje in neposredno dokumentiranje rezultatov. Glede tega ima prednost popolnoma avtomatiziran postopek določanja CDT s kapilarno elektroforezo na Capillarys 2, kjer lahko analiziramo 38 vzorcev na uro; predpriprava vzorcev se izvede v samem analizatorju ter omogoča grafični pregled ločenih izooblik Tf. Pri HPLC prav tako dobimo grafični izpis ločenih izooblik Tf, vendar je tu predpriprava vzorcev ročna, a nezahtevna. S to metodo smo lahko analizirali 6 vzorcev na uro. Postopek z IEC zahteva več ročnega dela – inkubacijo vzorcev, elucijo na anionsko izmenjevalnih kolonah, redčenje vzorcev ter še končno računanje vrednosti odstotka CDT. Poleg tega pri IEC nimamo vpogleda na ločevanje izooblik Tf, ampak se s protitelesi (antiserum proti humanemu transferinu) ugotavljajo različne izooblike Tf hkrati, zato ne dobimo nobenih podatkov o prisotnih izooblikah ali variantah Tf. Specifičnost reakcije protiteleso-transferin je neznana, kar lahko vodi v lažne rezultate (lažno pozitivne, lažno negativne), in sicer v primerih, ko so v vzorcu snovi, ki se nespecifično vežejo na protitelesa proti transferinu. S tega stališča predstavlja nedvomno prednost določanje CDT z metodami, ki omogočajo detekcijo posameznih izooblik transferina (HPLC, CE).

Pri CE in HPLC se meri CDT pri različnih valovnih dolžinah. Pri 200 nm ima absorpcijski maksimum peptidna vez, zato lahko pri tem zaznamo vse beljakovine. Kompleks transferin-železo selektivno absorbira pri 460 nm (11). Zato je pričakovano, da je več snovi, ki lahko motijo zaznavanje in kvantifikacijo izooblik Tf pri CE. Upoštevati moramo predvsem elektroforezno gibljivost Tf v območju beljakovin beta-2, kjer lahko vsebnost monoklonskih protiteles ali visoko poliklonsko ozadje onemogoči ustrezno določitev CDT (slika 3G). Tudi v primeru, kot je prikazan na sliki 3E, ne moremo z gotovostjo trditi, da gre za genetsko varianto. Zato je nujna previdnost pri razlagi odstotka in izdajanju izvida CDT.

4. Sklepi

Laboratorijska diagnostika škodljive rabe etanola zahteva obširno anamnezo in ustrezen izbor laboratorijskih testov. V te namene se običajno uporabljajo serumske encimske aktivnosti gama-glutamilttransferaze (GGT), aspartat-aminotransferaze (AST) in alanin-aminotransferaze (ALT), De Ritisov koeficient (AST/ALT) ter povprečni volumen eritrocitov (MCV). Vsak posamezni test ima v te namene nizko diagnostično občutljivost, vendar so ti parametri v kombinaciji z vrednostjo CDT učinkovit pripomoček v diagnostiki in spremljanju škodljive rabe etanola (24, 23, 4, 7).

Povišan rezultat CDT ima velik socialni vpliv, zato določanje CDT zahteva zanesljive postopke preanalize, analize in interpretacije rezultatov (23).

Vse tri metode, ki smo jih testirali pri našem delu, so se pokazale kot zanesljive in med seboj primerljive za uporabo v kliničnih laboratorijih. Nedvomno imajo prednost metode, ki omogočajo določanje posameznih izooblik transferina (HPLC in CE), ker lahko spremljamo ločevanje izooblik Tf in lahko ugotavljamo vsebnost variant Tf. Pri vseh

metodah, s katerimi dobimo kot rezultat samo številčno vrednost CDT (IEC, direktna imunonefelometrija), je potrebna večja previdnost pri navajanju rezultatov s povišanim CDT. Vedno moramo upoštevati vpliv motečih snovi, genetskih variant, hudih poškodb jeter, ki niso nastale zaradi škodljive rabe etanola in onemogočajo pravilno interpretacijo rezultatov. Zato morajo zdravniki oceniti celotno klinično sliko in ozadje preiskovancev (4, 5, 23, 18).

Iz našega dela sledi ugotovitev, da je določanje CDT z aparatom Capillarys 2 (Sebia) primerno za vsakdanje, rutinsko delo v kliničnih laboratorijih in ustreza kot zamenjava za metodo IEC. Vendar poudarjamo, da HPLC velja danes za referenčno metodo (začasno, dokler ne bo na voljo metoda z masno spektroskopijo) pri določanju CDT. Priporočamo, da se vsi vzorci s CDT nad referenčno vrednostjo pri preiskovancih, pri katerih ni škodljive rabe etanola, ponovno analizirajo z začasno referenčno metodo (HPLC) v laboratoriju, ki ima izkušnje z vsemi omenjenimi metodami. To velja predvsem za primere, če CDT ni bil določen z metodami, ki omogočajo določitev posameznih izooblik transferina (HPLC ali CE).

5. Literatura

1. Das SK, Vasudevan DM. Should we use carbohydrate deficient transferrin as a marker for alcohol abusers? *Indian J Clin Biochem* 2004; 19 (2): 36-44.
2. De Jong G, van Dijk J P, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990; 190: 1-46.
3. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. *Clin Chem* 2001; 47 (1): 13-27.
4. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO. Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. *Clin Chem* 2001; 47:1225-1233.
5. Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001–2005. *J Chromatogr B*. 2006; 841: 96–109.
6. Dibbelt L. Does Trisialo-Transferrin Provide Valuable Information for the Laboratory Diagnosis of Chronically Increased Alcohol Consumption by Determination of Carbohydrate-deficient Transferrin? *Clin Chem* 2000; 46: 1203 - 1205.
7. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991; 37: 2029 - 2037.
8. Prezelj M, Zorec Karlovšek M. Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov v diagnostiki škodljive rabe alkohola. *Farm Vestn* 2002; 53: 41-49.
9. Storey EL, Mack U, Powell LW, Halliday JW. Use of chromatofocusing to detect a transferrin variant in serum of alcoholic subjects. *Clin Chem* 1985; 31: 1543-1545.
10. NCCLS approved guideline EP9-A2: Method comparison and bias estimation using patient samples. *Clinical and laboratory standards institute*, 2002; 22(19).
11. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993; 39: 2115-2120.

12. Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Wauters A, Neels H, Janssens J. Determination of Carbohydrate-deficient Transferrin Using Capillary Zone Electrophoresis. *Clin Chem* 2001; 47: 247-255.
13. Dade Behring (P. Overstreet-Miller): Dade Behring Launches N Latex CDT for Use on Its BN Systems; First Direct Immunoassay to Identify Chronic Alcohol Abuse. Dade Behring home page, Journalists, Press Release Article 2005; <http://media.dadebehring.com/phoenix.zhtml?c=194559&p=irol-newsArticle&ID=778467&highlight=>
14. Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, Born C, Yagmur E, Gentzer W, Althaus H. Development and Multicenter Evaluation of the N Latex CDT Direct Immunonephelometric Assay for Serum Carbohydrate-Deficient Transferrin. *Clin Chem* 2007; 53:1115-1121.
15. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JP, Anton RF, Whitfield JB, Helander A; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardization of Carbohydrate-deficient Transferrin (IFC-WG-CDT). Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007; 45: 558-562.
16. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC Method for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum. *Clinical Chemistry*. 2003; 49: 1881-1890.
17. Schwarz MJ, Domke I, Helander A, Janssens PMW, van Pelt J, Springer B, Ackenheil M, Bernhardt K, Weigl G, Soyka M. Multicentre evaluation of a new assay for determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Alcohol* 2003; 38: 270 - 275.
18. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M, Tagliaro F. Analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin: Comparative Evaluation of Turbidimetric Immunoassay, Capillary Zone Electrophoresis, and HPLC. *Clin Chem* 2005; 51: 2368-2371.
19. Turpeinen U, Methuen T, Alfthan H, Laitinen K, Salaspuro M, Stenman UH. Comparison of HPLC and Small Column (CDTect) Methods for Disialotransferrin. *Clin Chem* 2001; 47:1782-1787.
20. Legros F et al. Carbohydrate-deficient Transferrin Isoforms Measured by Capillary Zone Electrophoresis for Detection of Alcohol Abuse. *Clin Chem* 2002; 48: 2177-2186.
21. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer JR. Investigation by Isoelectric Focusing of the Initial Carbohydrate-deficient Transferrin (CDT) and non-CDT Transferrin Isoform Fractionation Step Involved in Determination of CDT by the ChronAlcol.D. Assay. *Clin Chem* 2000; 46: 483-492.
22. Arndt T, Hackler R, Kleine TO, Gressner AM. Validation by isoelectric focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDTect assay. *Clin Chem* 1998; 44: 27 - 34.
23. Arndt T, Kropf J: Alcohol Abuse and Carbohydrate-deficient Transferrin Analysis: Are Screening and Confirmatory Analysis Required? *Clin Chem* 2002; 48: 2072-2074.
24. Das SK, Nayak P, Vasudevan DM. Biochemical markers for alcohol consumption. *Indian J Clin Biochem* 2003; 18: 111-118.
25. Arndt T. Asialotransferrin—An Alternative to Carbohydrate-deficient Transferrin? *Clin Chem* 2003; 49: 1022-1023.
26. Helander A, Bergström J, Freeze HH. Testing for Congenital Disorders of Glycosylation by HPLC Measurement of Serum Transferrin Glycoforms. *Clin Chem* 2004; 50: 954-958.



FARMACEVTIKA - DENTAL

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



FARMADENT

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

Vpliv 35 dnevnega mirovanja na koncentracijo homocisteina v krvi

The effect of 35-day bed rest on plasma homocysteine concentration

Nadja Plazar, Mihaela Jurdana, Rado Pišot

Povzetek: Telesna neaktivnost je drugi najpomembnejši dejavnik tveganja za razvoj kroničnih nenalezljivih bolezni v razvitih državah. Stanje se v zadnjih letih nekoliko izboljšuje, vendar je še vedno le 20% populacije aktivne do te mere, da zmanjšuje verjetnost pojava srčno-žilnih zapletov. Epidemiološke raziskave so potrdile, da redna telesna aktivnost in prehrana, ki vsebuje dovolj folne kisline, vitamina B6 in B12 znižuje količino homocisteina v krvi. V naši raziskavi smo preučevali vpliv dolgotrajnega mirovanja na koncentracijo homocisteina in folne kisline v krvi. Deset moških preiskovancev je v bolnišničnem okolju preležalo 35 dni v vodoravnem položaju. Po 35 dnevih ležanja smo zabeležili statistično značilno povečano koncentracijo homocisteina in znižano koncentracijo folne kisline, kljub nadzorovani prehrani. Zaključimo lahko, da je dolgotrajna telesna neaktivnost lahko samostojni, neodvisni dejavnik tveganja za razvoj srčno-žilnih obolenj.

Ključne besede: simulirana breztežnost, telesna neaktivnost, homocistein, folna kislina

Abstract: Physical inactivity is the second most significant risk factor for chronic non-infectious contagious diseases in developed countries. However, conditions have slightly improved in the past few years, still, only 20% of the population is being active in a fashion to reduce the probability of cardio-vascular complications. Epidemiological research has confirmed that regular physical activity and nutrition containing sufficient quantities of folic acid, vitamins B6 and B12, reduce the level of homocysteine in blood. In our research, we studied the influence of long-lasting inactivity on the concentration of homocysteine and folic acid levels in blood. Ten male subjects were resting in horizontal position for 35 days in clinical setting. After 35 days of resting we documented statistically relevant increase in homocysteine concentration and decrease of folic acid concentration, despite supervised nutrition. We can conclude, that prolonged physical inactivity is an autonomous, independent risk factor for the cardio-vascular disease development.

Key words: microgravity, physical inactivity, homocysteine, folic acid.

1 Uvod

Telesna aktivnost ima pomembno vlogo v našem življenju, saj je najcenejša oblika krepitve zdravja. Nič manj pomembno se zdi spoznanje, da s telesno aktivnostjo zmanjšujemo dejavnike tveganja za razvoj srčno-žilnih obolenj, ki zavzemajo vodilno mesto med kroničnimi nenalezljivimi obolenji.

Znanstveniki potrjujejo, da program redne telesne aktivnosti preprečuje razvoj debelosti, izgubo mišične mase, izgubo odzivnosti tkiv na inzulin ter kardiovaskularna obolenja, tako pri sedentarnih zdravih ljudeh, kakor tudi pri bolnikih s kroničnimi obolenji (1).

Homocistein, aminokislina v krvi, ki nastaja pri presnovi metionina, predstavlja tveganje za razvoj srčno-žilnih obolenj (2, 3). Spoznana je, kot dejavnik tveganja za žilno bolezen, kot je koronarna srčna bolezen, okulzivna bolezen perifernih arterij, ishemična cerebrovaskularna bolezen in venska tromboza (4). Koncentracija

homocisteina je prav tako zvišana v plazmi bolnikov z ledvičnim popuščanjem ali ledvično odpovedjo in predstavlja neodvisni dejavnik tveganja za razvoj srčno-žilnih obolenj (5).

Na raven homocisteina v krvi močno vplivajo življenjske navade, kot so prehrana, stres, in uživanje alkohola (6, 7, 8). Predvsem pomembna je prehrana in mikronutrienti, kot so folna kislina, vitamina B6 in B12, ki sodelujejo kot koencimi v presnovi homocisteina. Več študij je potrdilo, da so višje ravni vitaminov skupine B vsaj deloma povezane z nižjimi koncentracijami homocisteina (9, 10). Drugi novejši dokazi kažejo, da so najnižje koncentracije folne kisline v krvi povezane s povečanim tveganjem za pogubno bolezen koronarne arterije in možgansko kapjo (10, 11, 12).

Svetovna zdravstvena organizacija ugotavlja, da letno po celem svetu zaradi pomanjkanja telesne aktivnosti umre 1,9 milijona ljudi, od tega 600.000 v Evropi in da je pri tistih, ki niso vsaj minimalno telesno dejavni, verjetnost za obolevnost srca in ožilja 50% večja (13).

Telesna aktivnost dokazano znižujejo koncentracijo celokupnega plazemskega homocisteina in s tem verjetnost za razvoj bolezni srca in ožilja pri zdravih in že obolelih ljudeh (14, 15). V študiji, ki je zajela 620 ljudi so na podlagi vprašalnika, ki je vključeval vsebinska vprašanja o količini tedenske telesne aktivnosti, vprašanja o življenjskem slogu ter na osnovi izmerjene koncentracije homocisteina ugotovili, da je telesna aktivnost neodvisni dejavnik življenjskega sloga povezan z nižjimi koncentracijami homocisteina v krvi (16).

Višje vrednosti homocisteina najdemo pri moških, kot pri ženskah v rodni dobi. Pri štiridesetih letih je pri ženskah v povprečju koncentracija homocisteina za približno 2 $\mu\text{mol/l}$ nižja kot pri moških, kar pripisujejo delovanju estrogena, saj se po menopavzi vrednosti homocisteina približajo moškim vrednostim (17). V študiji, ki je zajela 28263 zdravih žensk po menopavzi, se je v treh letih poteka raziskave pri 122 razvila srčnožilna bolezen. Pri teh je bila koncentracija homocisteina značilno višja (14,1 proti 12,4 $\mu\text{mol/L}$) (18).

Vrednosti homocisteina naraščajo s starostjo, kar je posledica počasnejše presnove, slabše absorpcije in nezadostnega uživanja folatov ter vitaminov B12 in B6 (19).

Glede na vlogo in pomen telesne aktivnosti v preventivi pred srčno-žilnimi obolenji, smo se vključili v raziskavo »Vpliv simulirane breztežnosti na človeški organizem«, da bi poskušali ugotoviti povezavo med dolgotrajno telesno neaktivnostjo, koncentracijo homocisteina ter folne kisline v krvi. Zanimalo nas je ali je telesna neaktivnost samostojni, neodvisni dejavnik tveganja za razvoj srčno-žilnih obolenj.

2 Materiali in metode

2.1 Preiskovanci

Vpliv simulirane breztežnosti na človeško telo smo izvedli z raziskavo *Bed rest* (BR), kjer so preiskovanci mirovali 35 dni v horizontalnem položaju. Na osnovi izbranih kriterijev (nekadilci, ne alkoholiiki, moškega spola, določena starost med 20. in 30. letom), osebnega razgovora in zdravniškega pregleda smo izmed vseh prijavljenih prostovoljcev izbrali deset preiskovancev, brez zgodovine živčno-mišičnih in srčno-žilnih obolenj, starosti $24,3 \pm 2,6$ let (\pm S.D.). Preiskovanci so bili po predhodnih zdravstvenih testih vključeni v raziskavo, na katero so pristali s podpisom privolitve. Raziskava je potekala julija in avgusta 2007 v bolnišničnih prostorih Ortopedske bolnišnice Valdoltra, ki je nudila zdravstveno nego in tehnično podporo. Vse dnevne aktivnosti preiskovancev so se izvajale v ležečem položaju. Fizična aktivnost je bila strogo prepovedana skozi celotno 35-dnevno obdobje raziskave. Preiskovanci so imeli organizirano pasivno razgibavanje sklepov in masažo trikrat tedensko, pod vodstvom fizioterapevta. Prehrana je bila individualno dimenzionirana po načelih zdrave prehrane, s ciljem ohranjanja telesne teže. Prehrana je bila na začetku uravnotežena po sestavi in količini glede na izračun bazalnega metabolizma preiskovancev. Med raziskavo smo izračune ponavljali v tedenskih presledkih, da bi ohranjali nespremenjeno telesno težo in maščobno maso. obroki hrane so bili po sestavinah in količinsko uravnoteženi, preiskovanci so morali pojesti celotne obroke, brez dodatnih prehranskih vnosov.



Slika 1: Preiskovanec med 35 dnevnim mirovanjem

Vse aktivnosti preiskovancev smo spremljali s 24-urnim video nadzorom. Preiskovanci so bili predhodno podrobno obveščeni o poteku raziskave in stopnji tveganja.

Raziskava je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko in izvedena v skladu z načeli Helsinško-Tokijske deklaracije.

2.2 Telesna teža in višina

Pred raziskavo in med samim potekom raziskave, smo spremljali nekatere morfološke parametre. Da bi preprečili izgubo telesne mase, smo redno, trikrat dnevno ter individualno poskrbeli za redne obroke prehrane ter spremljali njihov dnevni vnos. Telesno težo (TT v kg) in višino (TV v cm) smo merili z uporabo klasičnih merilnih inštrumentov ter spremljali indeks telesne mase (BMI v kg/m^2). Telesno višino smo merili pred preiskavo ter po njej, telesno težo pa smo beležili tedensko.

2.3. Odvzem krvnih vzorcev

Preiskovancem smo opravili odvzem krvi pred in po zaključeni »bed rest« študiji. Venska kri je bila odvzeta na tešče v jutranjih urah (med 7.00 in 7.30) v mililitrske vakumske epruvete (Beckton-Dickinson, Rutherford, ZDA). Za biokemične preiskave je bila kri odvzeta v epruvete z litijevim heparinatom, kot antikoagulantom in s separacijskim gelom. Vzorce krvi smo z obračanjem epruvete premešali z antikoagulacijskim sredstvom in jih do centrifugiranja shranili v ledeni kopeli, da bi zmanjšali prehod homocisteina iz krvnih celic v plazmo. Plazmo za določanje homocisteina in folata smo pripravili s centrifugiranjem. Del tako pripravljene plazme smo prelili v manjše plastične epruvete in jih zamašene hranili do analize pri -70°C .

2.4 Koncentracija celokupnega plazemskega homocisteina

Koncentracijo celokupnega plazemskega homocisteina smo merili v plazmi s polarizacijsko imunofluorescenčno metodo (FPIA) na aparatu IMX (Abbott Laboratories, IL, ZDA) s tovarniško pripravljenimi reagenti, kalibracijskim in kontrolnim materialom (Abbott Park, IL, ZDA).

2.5 Koncentracije folatov

Koncentracijo folatov smo merili v plazmi s polarizacijsko imunofluorescenčno metodo (FPIA) na aparatu AXSYM (Abbott

Laboratories, IL, ZDA) s tovarniško pripravljenimi reagenti, kalibracijskim in kontrolnim materialom (Abbott Park, IL, ZDA).

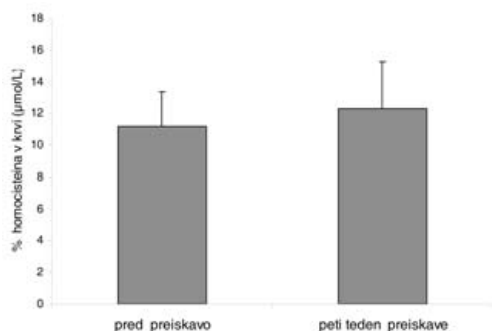
2.6 Statistika

Podatki so prikazani s povprečnimi vrednostmi in ustreznimi standardnimi odkloni. Statistična značilnost sprememb je bila izračunana z uporabo statističnega paketa SPSS 15.0 s parnim *t*-testom.

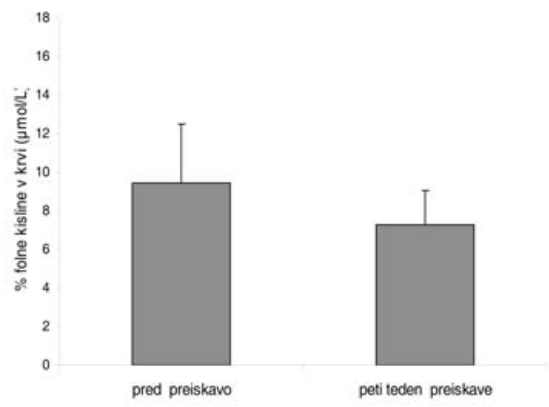
3 Rezultati

3.1 Telesna višina in telesna teža

Telesna višina se po zaključeni raziskavi ni značilno spremenila ($P=0,46$). Ob BR0 (pred bed rest preiskavo) je znašala $179,7 \pm (8,0)$ cm in ob BR5 (po petem tednu bed rest preiskave) $179,4 \pm (7,5)$ cm, medtem ko je telesna teža po tretjem tednu (BR3) začela upadati do zaključka raziskave, oziroma do petega tedna ležanja (BR5). Izguba telesne teže v tretjem tednu BR3 je znašala 1.6 % ($p<0,001$), v petem tednu (BR5) pa 3 %, ($p<0,001$).



Slika 2: Koncentracija homocisteina v krvi preiskovancev med 35-dnevnim mirovanjem. Koncentracija homocisteina se je v času petih tednov raziskave (do zadnjega odvzema krvi), statistično značilno povečala, vendar ni presegla kritične meje. $p=0,014$



Slika 3: Prikaz koncentracije folatov v krvi preiskovancev pred začetkom in v petem tednu raziskave. Koncentracija se je v času petih tednov statistično značilno znižala. $p=0,007$

3.2 Koncentracija homocisteina ter folatov

V naši raziskavi smo primerjali vrednosti celokupnega homocisteina ter folatov pred začetkom bed rest študije (BR0) ter zadnji, peti teden, tik pred vstajanjem (BR5). Raziskava je pokazala statistično značilne razlike v koncentraciji homocisteina, ki je pred študijo znašala $11,19 \pm 2,19$ µmol/L, po študiji pa $12,28 \pm 2,96$ µmol/L ($p=0,014$), $n=10$, slika 2. Prav tako se je med preiskavo značilno znižala koncentracija folatov v krvi iz $9,46 \pm 3,06$ µmol/L na $7,28 \pm 1,80$ µmol/L ($p=0,007$), $n=10$; slika 3.

4 Razprava

Vseh deset preiskovancev, ki so bili vključeni v raziskavo je uspešno prestalo 35-dnevno horizontalno ležanje, kakor tudi nekajtedensko rehabilitacijo. Glede na to, da je bila prehrana preiskovancev vodena individualno s stališča zagotavljanja nevtralne energijske bilance, so bili preiskovanci primorani pojesti celotne obroke, brez nikakršnih prehranskih dodatkov. Ker je bil kaloričen vnos obrokov izračunan glede na tedensko izmerjeno telesno težo preiskovancev, smo preprečili večje izgube telesne teže, predvsem pa smo zavrli pridobivanje odvečne maščobne mase. Kljub temu, da je bilo prehranjevanje nadzorovano z kontroliranim vnosom posameznih sestavin živil in mikronutrientov, med njimi tudi folne kisline, se je koncentracija folne kisline po pettedenskem mirovanju značilno znižala, vendar v območju referenčnih vrednosti. Prav tako smo po pettedenskem mirovanju zabeležili zmerno hiperhomocisteinemijo, koncentracija nevarnega homocisteina se je značilno povečala in presegla referenčne vrednosti. Slednje dokazuje obratno sorazmerno povezavo med koncentracijo folne kisline in homocisteina, ki so jo potrdile že predhodne študije (9, 10). Povišan homocistein naj bi bil odgovoren za najmanj 10% tveganja za razvoj ateroskleroze, zlasti pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi (20), zmerna hiperhomocisteinemija pa je približno enako pomemben dejavnik tveganja za nastanek ateroskleroze, kot kajenje in hiperlipidemija (21).

Raziskava »Bed rest« ali »Vpliv simulirane breztežnosti na človeško organizem« je mednarodna raziskava interdisciplinarnega značaja v katero so vključeni številni tuji in domači znanstveniki. Cilj raziskave je proučevanje vpliva gibalne neaktivnosti na človeško telo, predvsem pa učinek simulirane breztežnosti na skeletno-mišični, termoregulacijski in nenazadnje na srčno-žilni sistem. Tovrstne raziskave so pomembne, tako za priprave za polet v vesolje, kakor tudi za proučevanje posledic dolgotrajnega ležanja po operaciji. Prav v tem se križajo interesi »vesoljske« in »zemeljske« medicine.

Z gradnjo mednarodne vesoljske postaje Freedom postaja človeška prisotnost v vesolju čedalje večja. Najdaljša bivanja astronautov v vesolju so do sedaj bila približno eno leto. Na podlagi izkušenj iz vesolja, kot tudi zemeljskih poskusov, se zavedamo, da breztežnostno stanje povzroča določene spremembe, ki so po daljšem bivanju v vesolju lahko škodljive. Trenutne raziskave na Zemlji so usmerjene k razumevanju vzrokov teh sprememb in k razvijanju ukrepov, ki bi preprečili škodljive fiziološke spremembe (22). V raziskavi smo ugotavljali in spremljali, kako dolgotrajno mirovanje ali neaktivnost, vpliva na nivo nevarnega homocisteina v krvi ter povezavo med koncentracijo homocisteina in folatov. Rezultati raziskave bodo koristni ne samo za bodoče delavce v vesolju, temveč tudi za razumevanje fizioloških sprememb pri imobiliziranih pacientih.

Znanje o fizioloških spremembah, vidnih pri pacientih, ki morajo dalj časa mirovati, je pomanjkljivo. Spremembe pri pacientih je težko ovrednotiti, ker je nemogoče oceniti prvotno, zdravo stanje pred imobilizacijo. Spremljamo lahko samo spremembe ob prisotnem patološkem stanju, zaradi katerega je pacient nepremičen. Težko je torej ločiti patološko izzvano spremembo, ki so izključno posledica razbremenitve. Opisane „vesoljske raziskave“ so zaradi navedenih razlogov ključnega pomena tudi za zdravstvo, še posebno ortopedske klinike in rehabilitacijske ustanove, ki imajo opravka z nepremičnimi pacienti (22).

Horizontalno mirovanje v postelji oziroma simulirana breztežnost (mednarodno *bed rest* – BR) je ena izmed najpogosteje uporabljenih oblik spremljanja posledic popolne gibalne neaktivnosti (23, 24). Ker mnoge raziskave navajajo, da je telesna aktivnost samostojni neodvisni dejavnik življenjskega sloga, ki je povezan z nižjimi koncentracijami homocisteina (16), bi lahko z našo preiskavo trdili, da je telesna neaktivnost, samostojni neodvisni dejavnik tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni, čeprav ne moremo natančno zagotoviti ali se je nivo nevarnega homocisteina po petih tednih povečal nad kritično mejo zaradi telesne neaktivnosti ali znižanja folne kisline.

5 Sklep

Raziskave, ki preučujejo »Vpliv simulirane breztežnosti na človeški organizem« so bile predstavljene v Sloveniji leta 2000/2001, ko je potekala prva tovrstna študija simulacije breztežnostnega prostora. Do danes smo izvedli že tretjo tovrstno študijo, in v tem času prišli do pomembnih odkritij, ne le za slovenski in evropski prostor, temveč tudi za svetovni prostor.

Zaključki, ki izhajajo iz naše raziskave so potrdili pomen gibalno-športne aktivnosti pri preprečevanju srčno-žilnih obolenj. Iz raziskave je razvidno, da dolgotrajno mirovanje zvišuje nivo homocisteina v krvi, kar slabo vpliva na srčno-žilni sistem. Slednje pa pojasnjuje, da dolgotrajna telesna neaktivnost v vsakdanjem življenju ima enake posledice.

7 Literatura

1. Biolo G, Ciochi B, Stulle M, et al. Metabolic consequence of physical inactivity. *J Ren Nutr* 2005; 15(1): 49-53.
2. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274(19):1526-1533.
3. Shai I, Stampfer MJ, Ma J, et al. Homocysteine as a risk factor for coronary heart diseases and its association with inflammatory biomarkers, lipids and dietary factors. *Atherosclerosis* 2004; 177(2):375-381.
4. Stegnar M. Hiperhomocisteinemija in žilna bolezen. *Farm Vestn* 2002; 343-346.
5. Van Guldener C, Stehouwer C. Homocysteine metabolism in renal disease. *Clin Chem Lab Med* 2003; (41): 1412-1417.
6. Boden-Albala B, Sacco RL. Lifestyle factors and stroke risk: Exercise, alcohol, diet, obesity, smoking, drug use and stress. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2(2): 160-166.
7. El-Khairi L, Ueland PM, Nygard O, et al. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1999; 70(6): 1016-1024.
8. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Epidemiol* 2001; 54(2): 150-154.
9. Homocysteine and risk of coronary artery disease: Folate is the important determinant of plasma homocysteine concentration. *Nutrition* 2003; (19): 577-583.
10. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ. Vitamins B6, B12, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998; 17(5): 435-441.
11. Robinson K, Arheart K, Refsum H, et al. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998; 97(5): 421-424.
12. Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, et al. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(5): 989-995.
13. Kraševc-Ravnik E, Bevc-Stankovič M. Svetovni dan gibanja 2008: Telesna dejavnost za vse. (2008): <http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=1528>
14. Joubert LM, Manore MM. Exercise, nutrition, and homocysteine. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2006; 16(4): 341-61.
15. Gaume V, Maougin F, Figard H, et al. Physical training decreases total plasma homocysteine and cysteine in middle-aged subjects. 2005; 49(2): 125-31.
16. Dankner R, Chetrit A, Dror GK et al. Physical activity is inversely associated with total homocysteine levels, independent of C677T MTHFR genotype and plasma B vitamins. *Age* 2007; (29): 219-227.
17. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, et al. DACH-LIGA Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus paper on the regional clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 392-1403.
18. Ridker PM, Rifkin PM, Monson JE, Buring JE et al. Homocystein and risk of cardiovascular diseases among postmenopausal women. *JAMA* 1999; (281): 1817-1821.
19. Ueland PM, Mosen AL. Hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiencies in infants and children. *Clin Chem lab* 2003; 41:1418-1426.
20. Clarke R, Levington S, Donald A et al. Underestimation of the importance of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in epidemiological studies. *J Cardiovasc Risc* 2001; 8: 396-399.
21. Chen P, Poddar R, Tipa EV et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 1999; 39:93-109.
22. Eiken O, Mekjavic IB. The Valdostra Bedrest Study: Effects of 35 days of horizontal bedrest on the function of peripheral blood vessels, the thermoregulatory system and on the function and structure of the musculoskeletal system. Report No. FOI-R-0748-SE. Swedish Defence Research Agency (FOI), NBC Defence, Defence Medicine: Umea. (2002).
23. Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA et al. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996; 270: 627-633.
24. Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* 2003; 95(6): 2185-2201.

Novice iz sveta farmacije

EMA priporočila preklop zdravila na recept, registriranega po centraliziranem postopku, v zdravilo brez recepta

Borut Štrukelj

Evropska komisija za zdravila (EMA) je prvič doslej priporočila, da se zdravilo, ki vsebuje učinkovino orlistat, začne tržiti kot zdravilo brez recepta (OTC), kljub temu, da je bilo zdravilo registrirano po centraliziranem postopku. Doslej so bila tako registrirana le zdravila na recept. Zdravilo z orlistatom se uporablja za zdravljenje prekomerne debelosti. Predpisujejo ga uporabnikom, kjer je indeks telesne mase večji od 30. Orlistat je inhibitor lipaze, ki cepi maščobe v prebavnem traktu na monoacil- in diacilglicerolne derivate. Z inhibicijo lipaze se do 30 % maščob ne absorbira iz prebavnega trakta in se izloči z blatom. Neželeni učinek orlistata je predvsem oljno blato, napenjanje, krči in bolečine v prebavilih, pri 1 % uporabnikov pa ugotavljajo nekoliko manjšo odpornost proti nekaterim virusom. Farmacevtska družba je zaprosila za dovoljenje za promet za zdravilo, ki vsebuje le 60 mg orlistata in naj bi se izdajalo kot zdravilo brez recepta, uporabljali pa naj bi ga kot pomoč pri shujševalnih dietah, pri uporabnikih z indeksom telesne mase 28 in več. Prvo registrirano zdravilo za zmanjševanje telesne mase z orlistatom se še vedno trži kot zdravilo na recept in vsebuje 120 mg orlistata. EMA je priporočilo glede preklopa izdala po skrbnem pregledu učinkovitosti, preučitvi neželenih učinkov in po pregledu varnosti pripravka. Ugotavljajo, da je odmerek 60 mg orlistata učinkovit skupaj z malokalorijsko dieto, neželeni stranski učinki pa so milejši, kot pri standardnem odmerku 120 mg. Strokovnjaki, ki se ukvarjajo s sistemom izdajanja zdravil, pa opozarjajo na nevarnost slabšega nadzora, saj bo pri zdravilu brez recepta težje nadzorovati izdajo le tistim uporabnikom, ki presegajo določeni indeks telesne mase, vprašljivo pa ostaja tudi odmerjanje, saj je znano, da uporabniki pogosteje presegajo priporočeno odmerjanje pri zdravilih brez recepta. Končno odločitev o preklopu zdravila bo, glede na uveljavljen postopek, izrekla Evropska komisija v Bruslju.

Vir: EMA Latest Press Release/ 23.10.2008

Etičnost testiranja mutacij pri otrocih in rak dojk ter jajčnikov

Bojan Doljak

Zaradi vedno večje dostopnosti genetskih testov se v ZDA vedno več žensk odloča za testiranje prisotnosti mutacij dveh tumor supresorskih genov (BRCA 1 in BRCA 2), udeleženih pri nastanku raka dojk in jajčnikov. Leta 2007 so tam opravili 100.000 takšnih testov, kar je dvakrat več kot leta 2005. Nosičke (in nosilci) mutacije imajo tudi do 80-odstotno verjetnost, da bodo do 70. leta zboleli za rakom dojk, jajčnikov (oz. prostate). Seveda se mutacije, ki so prisotne pri starših, lahko prenesejo na potomce. Strokovnjaki svetujejo genetsko testiranje šele pri starosti 25 let ali kasneje, saj je pogostost raka dojk in jajčnikov pred tem zelo nizka. Kljub temu se nekateri starši (v ZDA) odločajo za genetska testiranja svojih otrok še pred polnoletnostjo, v ekstremnih primerih so test izvedli celo pri punčkah, starih samo 4 leta. Strokovnjaki opozarjajo, da lahko prezgodnja informacija o genetski mutaciji škoduje, saj povzroči nepotrebne skrbi takrat, ko terapija oz. drastična preventiva (odstranitev dojk in/ali jajčnikov) ni primerna. Pri tem se postavlja tudi vprašanje etičnosti takšnega početja, pri čemer starši zagovarjajo pravico do informacije. Iz anket, ki so jih izvedli med zdravimi odraslimi osebami s potrjeno mutacijo, je razvidno, da jih ena tretjina pri tem čuti nelagodje in strah, po drugi strani pa je zavest za zdrav način življenja pri njih veliko večja, saj je npr. kar 5 od 7 kadilcev, prenehalo s kajenjem potem, ko so izvedeli, da nosijo mutacijo.

Vir:

<http://edition.cnn.com/2008/HEALTH/09/22/Kids.test.gene.ap/index.html>, 22. 9. 2008.

Zahvala

Spoštovani bralci, bralke, avtorji, avtorice, recenzenti in recenzentke!

Vznemirljiv predbožični in prednovoletni čas prinaša tudi zadnjo letošnjo številko Farmaceutskega vestnika. »Vsake oči imajo svojega malarja.« Tisti, ki ste samo bralci, prav gotovo gledate na Farmaceutski vestnik drugače, kot tisti, ki zanj kdaj tudi kaj napišete. Nekdo, ki najde v reviji objavljen članek, ki ga je pred kratkim recenziral, pa ga bere spet drugače. Odgovorni urednik še pred izidom revije skrbno prebere krtačne odtise člankov, da lahko napiše že tradicionalen uvodnik. Glavna urednica, torej jaz, si oddahnem vsakič, ko pošljem Jelki ustrezno število za objavo pripravljenih člankov, nato pa še enkrat, ko dobim krtačne odtise, kjer ne mrgoli napak tiskarskih škratov. Če je vse v redu s slikami, potem so tudi v tiskarni zadovoljni. Gospa Jelka Dolinar poskrbi za pošiljanje prispevkov v tiskarno in za korekture, vmes pa je še tisoč enih stvari, ki jih mora urediti, da lahko Farmaceutski vestnik pride v naš poštni predal ali na delovno mesto.

Običajno je ta stran v zadnji številki Farmaceutskega vestnika namenjena zahvali recenzentom, ki so med letom anonimni, pri čemer brez plačila prebirajo različne prispevke anonimnih avtorjev in jih skušajo vzpodbuditi, da kakšno stvar napišejo še bolje, bolj jasno, bolj strokovno ... Tokrat izkoriščam to priložnost tudi za to, da se opravičim in še posebej zahvalim avtorjem za potrpežljivost, kajti letos je šlo kdaj pa kdaj res preveč vse narobe, menjava e-poštnega naslova, vse manj časa in pogoste odsotnosti glavne urednice, celo pozabljenost (kaj je že to?) so le eni od razlogov, da včasih res preveč Save steče mimo tacenskih brzic, preden je kakšen članek objavljen. Torej letos najprej hvala avtorjem in avtoricam. Pišite, še pišite. Ne nazadnje pa kot običajno hvala tudi recenzentkam in recenzentom. Letos objavljene prispevke, ki so šli večinoma skozi dolgotrajno proceduro, polno presenečenj in zapletov, so strokovno ocenjevali že uveljavljeni recenzenti in recenzentke, pa tudi nekateri novi, večinoma mladi raziskovalci, ki so se odlično odrezali.

Hvala vam

Ahlin Pegi • Anderluh Marko • Berlec Aleš • Berovič Marin
Božič Borut • Bratkovič Tomaž • Burjak Mateja • Černe Darko
Doljak Bojan • Farazin Urša • Gobec Stanko • Homar Miha
Janeš Damjan • Jerin Aleš • Jurkovič Polona • Karas Kuželički Nataša
Kikelj Danijel • Kočever Nina • Komel Radovan • Kores Plesničar Blanka
Kos Janko • Krbavčič Aleš • Kreft Samo • Lukač Bajalo Jana
Lunder Mojca • Maček Vasilija • Marc Janja • Mlinar Barbara
Nadrah Kristina • Obermajer Nataša • Obreza Aleš • Pečar Slavko
Petan Toni • Pišek Robert • Planinšek Odon • Podlogar Filip
Razinger Barbara • Slanc Može Petra • Štrukelj Borut • Šuškovič Stanislav
Umek Andrej • Zajc Natalija • Zorko Matjaž

in ostali, ki sem vas nenamenoma morda pozabila imenovati.
Hvala vsem, ki ste sodelovali v letu 2008, ter vsem, ki boste brali Farmaceutski vestnik ali v njem objavljali tudi v letu 2009.

Andrijana Tivadar

Farmaceutski vestnik

Letnika 59 - Vsebina

Pregledni znanstveni članki

Toksični vidiki galaktoze – je mleko res zdrava hrana v vseh življenjskih obdobjih? (Karas Kuželički N.)	3	Interpolimerni kompleksi (Pavli M, Vrečer F, Baumgartner S)	121
Sekretorne fosfolipaze A ₂ in njihova (pato)fiziološka vloga (Jerman B, Pungercar J)	9	Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi (Bratkovič T, Preželj A)	129
Molibden kot pomemben element v sledovih (Obreza A)	16	Svetloba, radikali in fotodinamična terapija (Pečar S)	135
Encimi vključeni v biosintezo glivnega melanina – potencialne tarče za razvoj novih antimikotikov (Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J)	21	Uporaba in vrednotenje varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem (Kumperščak Duh M)	138
Kronična vnetna črevesna bolezen (Kocijančič B)	43	Ali lahko vitamin A ali E in omega-3 ali 6-maščobne kisline izboljšajo izid zdravljenja shizofrenije? (Boškovič M, Vovk T)	167
Treatment of Inflammatory Bowel Disease (Krejs GJ)	46	Sistem RANKL/RANK/OPG – nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze (MencejS, Marc J)	175
Biološke učinkovine pri zdravljenju Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa (Bratkovič T)	47	Sladki koren (Kočevar N)	179
Etiologija Alzheimerjeve bolezni in drugih najpogostejših demenc (Kogoj A)	55	Razvoj kelatne terapije za odstranjevanje plutonija in ostalih aktinoidov iz organizma (Perdih F)	183
Parkinsonova bolezen (Trošt M)	60	Problematika prehranskih dopolnil v športu (Farazin U)	189
Motnje spomina in motnje spanja pri starostnikih (Dolenc Grošelj L)	64	Tabletiranje snovi, občutljivih na povišan tlak (Joksimović T, Baumgartner S)	193
Pregled relevantnih zdravilnih učinkovin, ki se izdajajo na recept (Obreza A)	68	Fiziološke spremembe v nosečnosti in zdravljenje (Geršak K)	201
Pregled učinkovin brez recepta in prehranskih dopolnil za bolezen centralnega živčnega sistema (Janeš D)	75	Zdravila v času nosečnosti (Kerec Kos M)	207
Odmerjanje zdravil za zdravljenje Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni (Locatelli I, Mrhar A)	79	Prirojene razvojne nepravilnosti (Geršak K, Geršak BM)	212
Kognitivna terapija pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo (Orešnik M)	86	Poporodno obdobje in laktacija (Geršak K, Bratanič B)	217
Farmakoekonomika zdravil za zdravljenje Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni (Obradovič M)	90	Zdravila med dojenjem (Nagelj Kovačič N, Mrhar A)	223
Vloga farmacevta v skrbi za starostnike (Potočnik Benčič D, Urbanc Mokotar M)	99	Samozdravljenje v nosečnosti in med dojenjem (Turčin M)	229
Izkušnje in težave medicinskih sester pri dajanju zdravil v domovih za ostarele (Leskovic L)	104	Odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin v lesnih glivah (Janeš D)	239
Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila (Berlec A, Štrukelj B)	115	Zgodovina uporabe anorganskih arzenovih spojin v terapiji (Obreza A)	245
		Zdravila v alternativni medicini (Kreft S)	251
		Fulerenol C ₆₀ (OH) ₂₄ kot potencialna učinkovina (Injac R, Kočevar N, Štrukelj B)	257
		Samo(mikro)emulgirajoči sistemi - alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin (Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J)	263

Aciliranje peptidov in proteinov z derivati maščobnih kislin (Kočevar N, Kreft S)	269	Primerjava alelnih frekvenc mutacij ključnih encimov presnove homocisteina med vzorci Slovencev in drugih narodov (Plazar N, Ostanek B)	143
Pomen probiotikov kot prehranskih dopolnil in zdravil (Teskač K, Hudournik N, Marinšek-Logar R, Kristl J)	287	Obravnavanje astme v Sloveniji. Prospektivna opazovalna raziskava (Šuškovič S)	151
Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem (Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A)	293	Razvoj polielektrolitne nanoobloge na mikrodelcih učinkovine (Dolenc A, Kristl J)	273
Farmakogenomika v zdravljenju astme (Berce V, Potočnik U)	303	Vpliv 35 dnevnega mirovanja na koncentracijo homocisteina v krvi (Plazar N, Jurdana M, Pišot R)	319
Uporaba zdravilnih rastlin med nosečnostjo (Lipičnik Rozman L)	307	Posebna izdaja - razširjeni povzetki s simpozija - 7 th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery Systems, September 18–20, 2008	
Primerjava metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (Finderle P, Prezelj M)	311	<i>Zanimivosti iz stroke</i>	34, 155, 278, 323
		<i>Iz društvenega življenja</i>	157
<i>Izvirni znanstveni članki</i>		<i>Osebnosti</i>	39, 163, 281
Hiperprolaktinemija pri antipsihotični terapiji (Kravos M, Malešič I)	27		

Farmaceutski vestnik Volumen 59 - Content

Review scientific articles

Galactose toxicity – is milk a healthy food for all age groups? (Karas Kuželički N.)	3	Overview of relevant prescription drugs (Obreza A)	68
Secretory phospholipase A ₂ enzymes and their (patho)physiological role (Jerman B, Pungerčar J)	9	A review of OTC drugs and food supplements for neurodegenerative diseases (Janež D)	75
Molybdenum as important trace element (Obreza A)	16	Dosage regimens of drugs used in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease (Locatelli I, Mrhar A)	79
Enzymes involved in fungal melanin biosynthesis – potential targets for the development of new antimicrobial drugs (Brunskole M, Lanišnik Rižner T, Stojan J)	21	Cognitive therapy of Alzheimer's disease (Orešnik M)	86
Kronična vnetna črevesna bolezen (Kocijančič B)	43	Pharmacoeconomics of drugs used in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease (Obradovič M)	90
Treatment of Inflammatory Bowel Disease (Krejs GJ)	46	The role of a pharmacist - care of the elderly (Potočnik Benčič D, Urbanc Mokotar M)	99
Biological therapy of Crohn's disease and ulcerative colitis (Bratkovič T)	47	Experiences and problems of medical nurses with administering medicine in homes for the elderly (Leskovic L)	104
Etiologija Alzheimerjeve bolezni in drugih najpogostejših demenc (Kogoj A)	55	Genetically modified lactic acid bacteria as delivery systems for biopharmaceuticals	115
Parkinson's disease (Trošt M)	60	Interpolymer complexes (Pavli M, Vrečer F, Baumgartner S)	121
Memory and sleep disorders in the elderly (Dolenc Grošelj L)	64	Bacteriophage therapy (Bratkovič T, Preželj A)	129
		Svetloba, radikali in fotodinamična terapija (Pečar S)	135

Uporaba in vrednotenje varovalnih kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem (Kumperščak Duh M)	138	Self(micro)emulsifying systems - alternative approach for improving bioavailability of lipophilic drugs (Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J)	263
Can supplementation with vitamin E or C and omega-3 or -6 fatty acids improve the outcome of schizophrenia? (Bošković M, Vovk T)	167	Peptide and protein fatty acylation (Kočevar N, Kreft S)	269
RANKL/RANK/OPG system – new target for drugs for osteoporosis treatment (MencejS, Marc J)	175	Importance of probiotics as food supplements or drugs (Teskač K, Hudournik N, Marinšek-Logar R, Kristl J)	287
Glycyrrhiza glabra (Kočevar N)	179	Alginate in controlled drug delivery systems (Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A)	293
The development of chelating therapy for plutonium and other actinoides decorporation (Perdih F)	183	Pharmacogenomics in asthma treatment (Berce V, Potočnik U)	303
The question of the food supplements in sport (Farazin U)	189	Use of medicinal herbs during pregnancy (Lipičnik Rozman L)	307
Tabletting of Pressure-Sensitive Materials (Joksimović T, Baumgartner S)	193	Comparison of methods for measurement of carbohydrate deficient transferrin (Finderle P, Prezelj M)	311
Physiologic changes during pregnancy and therapy (Geršak K)	201	<i>Original scientific articles</i>	
Drugs in pregnancy (Kerec Kos M)	207	Hyperprolactinemia in antipsychotic therapy (Kravos M, Malešič I)	27
Inherent fetal anomalies (Geršak K, Geršak BM)	212	Development of polyelectrolyte nanocoating on drug microparticles (Dolenc A, Kristl J)	273
Puerperium and lactation (Geršak K, Bratanič B)	217	Allele frequency of mutations of homocysteine metabolism key enzymes in Slovene population in comparison to that in other populations (Plazar N, Ostanek B)	143
Drugs in lactation (Nagelj Kovačič N, Mrhar A)	223	Managing of asthma in Slovenia. Prospective observational study (Šuškovič S)	151
Self-medication in pregnancy and lactation (Turčin M)	229	The effect of 35-day bed rest on plasma homocysteine concentration (Plazar N, Jurdana M, Pišot R)	
Discovery of new antimicrobial compounds in wood-colonising fungi (Janeš D)	238	Special Issue – extended abstracts from the 7 th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery Systems, September 18 -20, 2008	
History of use of inorganic arsenic compounds in therapy (Obreza A)	245		
Medicinal products in alternative medicine (Kreft S)	251		
Fullerenol C ₆₀ (OH) ₂₄ as a potential drug (Injac R, Kočevar N, Štrukelj B)	257		

Avtorsko kazalo - index of authors

Baumgartner S	121, 193	Kocijančič B	43	Pečar S	135
Berce V	303	Kočevar N	179, 257, 269	Perdih F	183
Berlec A	115	Kogoj A	55	Pišot R	319
Bogataj M	293	Kravos M	27	Plazar N	143, 319
Bošković M	167	Kreft S	251, 269	Potočnik Benčič D	99
Bratanič B	217	Krejs GJ	46	Potočnik U	303
Bratkovič T	47, 129	Kristl J	287, 263, 273	Prezelj M	311
Brunskole M	21	Kumperščak Duh M	138	Preželj A	129
Dolenc A	273	Lanišnik Rižner T	21	Pungerčar J	9
Dolenc Grošelj L	64	Leskovic L	104	Smrdel P	293
Farazin U	189	Lipičnik Rozman L	307	Stojan J	21
Finderle P	311	Locatelli I	79	Štrukelj B	115
Gašperlin M	263	Malešič I	27	Štrukelj B	257
Geršak BM	212	Marc J	175	Šuškovič S	151
Geršak K	201, 212, 217	Marinšek-Logar R	287	Teskač K	287
Hudournik N	287	Mencej S	175	Trošt M	60
Injac R	257	Mrhar A	79, 223, 293	Turčin M	229
Janeš D	75, 239	Nagelj Kovačič N	223	Urbanc Mokotar M	99
Jerman B	9	Obradovič M	90	Vovk T	167
Joksimović T	193	Obreza A	16, 68, 245	Vrečer F	121
Jurdana M	319	Orešnik M	86	Zvonar A	263
Karas Kuželički N	3	Ostanek B	143		
Kerec Kos M	207	Pavli M	121		