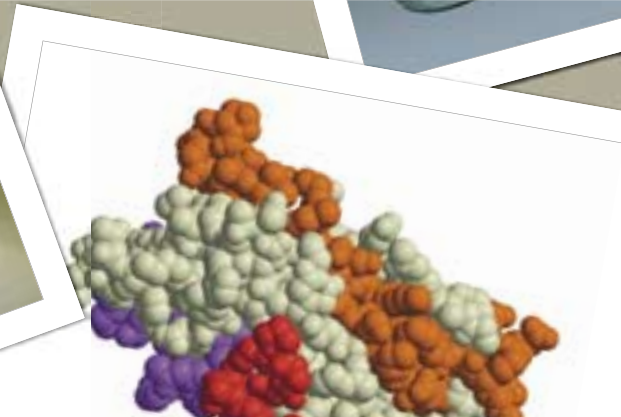
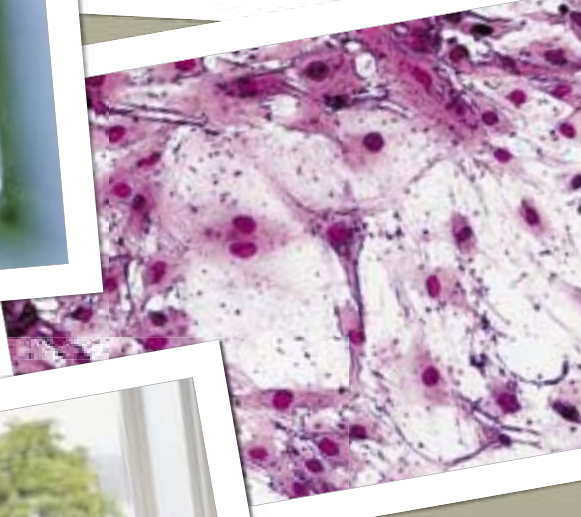
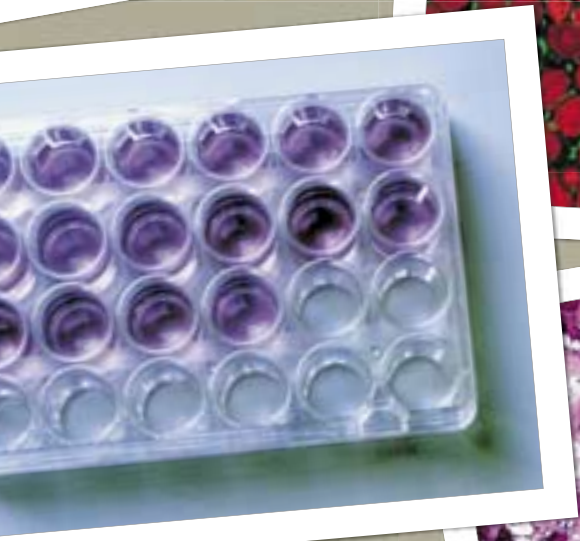


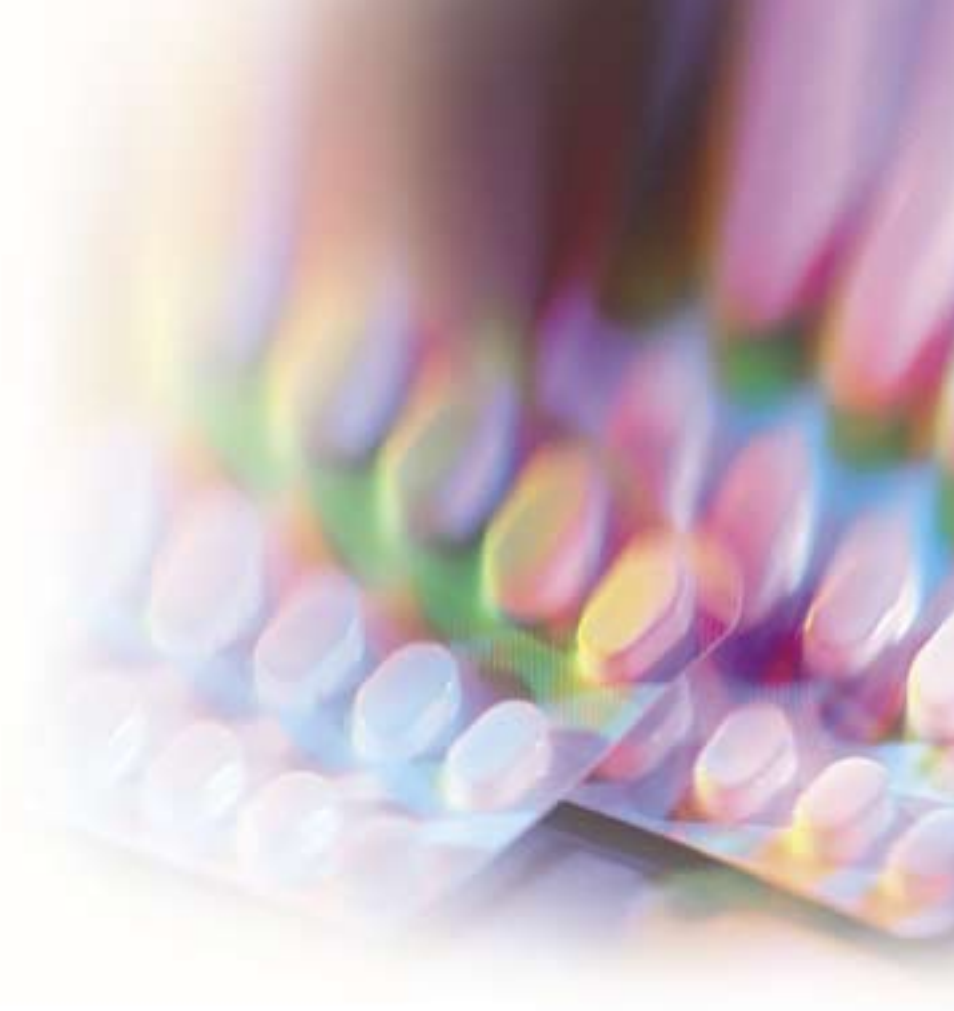
Lægemiddelforskning

2003



THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES





FORMIDLING AF FORSKNING

Forskning drejer sig grundlæggende om at skabe viden, men for at få den optimale nytte af forskningsresultater, er det væsentligt, at den skabte viden gøres tilgængelig ikke alene for forskersamfundet, men for samfundet i bred forstand. Derfor er videnformidling en helt central opgave for universiteterne, hvorfor vi igen i år bedt en række forskere på DFU fortælle om deres forskning på en populærvidenskabelig form, således at læseren af »Lægemedelforskning« kan få et indblik i en række af de spændende og udfordrende forskningsprojekter, der udspringer fra DFU. Vi håber, at resultatet vil være til inspiration og samtidig afspejle, at DFU som universitet er en mindre - men dynamisk uddannelses- og forskningsinstitution.

Sven Frøkjær, rektor

På www.dfuni.dk optræder - i forbindelse med DFU's fem institutter - en gennemgang af Universitetets forskningsområder.

På www.dfuni.dk/gymnasier findes oplysninger om mulighederne for at besøge DFU med kemi- og biologiklasser.

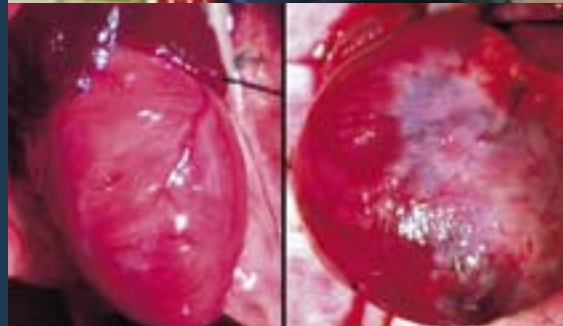
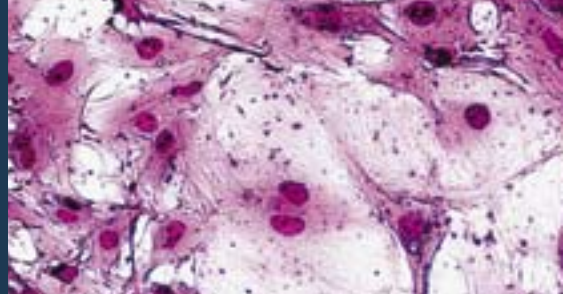
På www.dfuni.dk/farmaceut er der information om farmaceutuddannelsen og dens mange erhvervs muligheder.

På www.dfuni.dk/publikationer kan man hente inspiration i de tidligere årgange af Lægemedelforskning.

Ønskes yderligere trykte eksemplarer af Lægemedelforskning? Send din bestilling til bestil@dfuni.dk

Indhold

1. Design er kommunikation 4-5
Af Sven Frøkjær og Jesper Munck
2. Børn og unge bruger mere medicin 6-7
Af Ebba Holme Hansen
3. Hurtige genveje til nye lægemidler 8-9
Af Christian Adam Olsen, Henrik Franzyk og Jerzy W. Jaroszewski
4. Metalioner – en nøgle til nye lægemidler 10-11
Af Ole Farver
5. Integreret computerdesign og syntese 12-13
Af Ulf Madsen, Esben J. Bjerrum, Jeremy R. Greenwood og Tommy Liljefors
6. Fluorescens viser farmakologi! 14-15
Af Mette Strange og Hans Bräuner-Osborne
7. Øget vandopløselighed af lægemidler 16-17
Af Anders Bach Nielsen og Claus Selch Larsen
8. Kan lægemiddelstoffer smugles ind i organismen? 18-19
Af Jon Våbenø, Carsten Uhd Nielsen, Bente Steffansen og Flemming Steen Jørgensen
9. Fra nyrerne til blodet 20-21
Af Silvina A. Bravo, Carsten Uhd Nielsen, Sven Frøkjær og Birger Brodin
10. Effektiv analyse af binding mellem proteiner og lægemiddelstoffer 22-23
Af Jesper Østergaard, Claus Selch Larsen, Christian Schou og Niels H. H. Heegaard
11. På opdagelse i grænsefladen 24-25
Af Susanne Møllmann, Ulla Elofsson, Marco van de Weert, Jens Thostrup Bukrinsky og Sven Frøkjær
12. Skal alle børn med leukæmi have samme dosis medicin? 26-27
Af Kamilla Buchberg Petersen, Mette Rasmussen og Kjeld Schmiegelow
13. Når kroppen overreagerer ved kronisk hjertesvigt 28-29
Af Simon Trautner og Majid Sheykhzade
14. Kommunikation og Stress 30-31
Af Tine Holst Kjeldsen, Erik Wind Hansen, Jens Dencker Christensen og Lise Moesby
15. Struktur på allergiens signalveje 32-33
Af Bente Vestergård, Osman Mirza, Jette Sandholm Kastrup og Michael Gajhede
16. Lægemidlers usynlige spor 34-35
Af Henrik Tang Vestergaard og Uffe Kristiansen
17. Liberaliseringen, der blev væk 36-37
Af Jakob Bjerg Larsen og Janine M. Traulsen
18. Nye kemiske analysemetoder finder østrogener i ng/l niveau 38-39
Af Flemming Ingerslev, Henrik R. Andersen, Anne-Marie Jacobsen, Kristine Andersen Krogh, Tue Søborg, Martin Hansen og Bent Halling-Sørensen



Design er kommunikation

Som allerede nævnt i sidste års udgave af Lægemedelforskning ændrede Danmarks Farmaceutiske Højskole allerede ved årsskiftet 2002/03 navn til Danmarks Farmaceutiske Universitet. Når det gamle logo alligevel skulle vige pladsen for et nyt, besluttede man sig for, at gå alle grafiske elementer efter i sømmene, og ved samme lejlighed at indføre en helt ny grafisk identitet.

Af Sven Frøkjær og Jesper Munck

En af bevæggrundene har fra DFU's side været ønsket om en visuel identitet, der i højere grad end tidligere var i stand til at signalere »moderne og omstillingsparat forsknings- og uddannelsesinstitution«, og visualisere Danmarks Farmaceutiske Universitets rolle som formidler og forskningsinstitution i en foranderlig farmaceutisk verden, nationalt som internationalt.

For at understrege Danmarks Farmaceutiske Universitets internationale rolle er løsningen blevet en sammenstilling af det danske og engelske navnetræk. Da Universitetets danske oprindelse ønskes fastholdt, skrives det danske navn tydeligst.

Det har været vores ønske, at få udviklet et stærkt design, der klart og kvalitetspræget evner at skabe opmærksomhed om Universitetet. Det har vi fået opfyldt med det nyudviklede designprogram. Løsningen med sammenskrivning af det danske og engelske navn til ét navnetræk finder vi særdeles spændende.

Skiftende bomærker

I tilknytning til det dansk-engelske navnetræk optræder skiftende bomærker. Der er således ikke knyttet ét bestemt bomærke til

logotype (navnetræk), men p.t. ikke mindre end 36 af slagsen - i forskellige kombinationer. Bomærket, som bl.a. kan ses øverst på højresiderne i nærværende udgave af Lægemedelforskning, kan ændre sig i uendelige variationer, og nye mønstre kan til stadighed udvikles. Mønstrene er abstrakte, og har ikke til hensigt at danne konkrete symboler. Genkendeligheden ligger i de altid 81 punkter store kvadrater og måden hvorpå punkterne i kvadraterne ændrer størrelse og dermed danner nye symboler.

Navnetrækket kombineret med det altid kvadratiske bomærke sikrer, at Danmarks Farmaceutiske Universitets visuelle identitet fastholdes på trods af bomærkets foranderlighed.

Den synlige del af isbjerget

Udadtil skal mærket optimalt set dels sikre genkendelighed, dels via sit udtryk skabe forventninger gående i den af afsenderen ønskede retning. Mærket er den synlige del af isbjerget, den del der fortæller historien om resten. Indadtil skal et godt mærke også være i stand til at fungere som samlingspunkt for - i dette tilfælde - ansatte og studerende.

For Britt Karlsen, designer hos Rumfang og idékvinde bag det nye design, har det foranderlige bomærke været symbol på den foranderlige verden og de nye og uopdagede muligheder, som forskeren hele tiden søger at afdække. »Det har været min tanke at illustrere, at Danmarks Farmaceutiske Universitet har til opgave at formidle og producere ny erkendelse i en omskiftelig verden,» siger Britt Karlsen. Blandt overvejelserne har også været, at et universitet underlagt forandringer nødvendigvis må være dynamisk, innovativt og visionært, hvilket også afspejles i bomærket.



Farvel...



THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES



... og goddag.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci og rektor ved DFU.



Cand.mag. Jesper Munk er leder af Informationskontoret på Danmarks Farmaceutiske Universitet.



TILBUD TIL LÆRERE OG ELEVER I GYMNASIESKOLERNE

Både navneskift og ny grafisk identitet skal ses i lyset af ønsket om mere præcist og tidssvarende at kunne kommunikere, hvad der foregår bag DFU's facader. Et vigtigt led i denne proces er at give landets gymnasieklasser mulighed for et indblik i hvad det er, vi som landets eneste farmaceutiske universitet står for i forsknings- og undervisningsmæssig sammenhæng.

I den anledning sætter vore forskere fokus på mere end 20 forskellige emner for gymnasieelever, hvor omdrejningspunktet er, hvordan kemien og biologien, som eleverne kender den fra gymnasiet, bliver anvendt i lægemiddelforskningen her på Universitetet.

Besøgene på DFU er ment som et supplement og en inspiration til den daglige undervisning i gymnasieskolerne. Foredragene giver klasserne indsigt i den nyeste forskning inden for forskellige naturvidenskabelige og sundhedsvidenskabelige fagområder – områder, der lægger op til debat eleverne imellem, og som giver mulighed for at perspektivere kemiske og biologiske emner gennem ud fra nye vinkler.

Et besøg varer i reglen tre timer, og består af to forskellige »forelæsninger« fra nedenstående liste med efterfølgende rundvisning i laboratorierne. Endelig indgår et møde med en repræsentant for de farmaceutstuderende, som fortæller om studiet og DFU, også i besøgspakken.

Vi kan i øjeblikket bl.a. tilbyde følgende spændende emner:

- Antistoffer og genteknologi
- De ekshibitionistiske gener
- Den medicinerede normalitet
- Fiskeolier
- Forsøgsdyr og in-vitro metoder
- Forurening af vandmiljøet med steroidhormoner
- Hvordan studeres kroppens omdannelse af lægemidler?
- Kemishow
- Kommunikation i hjernen på cellulært niveau
- Lægemiddeldesign og Alzheimers sygdom
- Lægemidler mod hjernens sygdomme
- Lægemidler og smerte
- Medicinalkemi, neurotransmission og den røde fluesvamp
- Moderne lægemiddeludvikling
- Naturlægemidler: Hvad kan de bruges til?
- Naturstoffer og malaria
- Naturstoffer: Kommunikation eller krigsførelse
- Rusmidler - i kemisk og biologisk belysning
- Selen: Et nødvendigt - og giftigt - grundstof
- Stereokemi og lægemiddeludvikling

Læs mere om emnerne og om hvordan man tilmelder sig på www.dfuni.dk/gymnasier

Børn og unge bruger mere medicin

På blot ti år er 15-åriges forbrug af medicin mod hovedpine og mavepine steget med 50 procent blandt pigerne, mens drengenes forbrug er fordoblet. Samtidig vokser forbruget af nervepiller og sovemedicin.

Af Ebba Holme Hansen

Mange sundhedsvaner grundlægges i alderen fra 10 til 16 år, men alligevel er medicinforbruget i aldersgruppen meget dårligt belyst. Forskere har mest interesseret sig for antibiotikarecepter til småbørn og ordination af psykofarmaka til små og lidt større børn. Nu er en projektgruppe i færd med at råde bod på det forsømte gennem en undersøgelse af 11-15 åriges forbrug af medicin mod smerter og psykiske problemer.

Resultaterne dokumenterer, at der er sket en signifikant stigning i antallet af unge medicinbrugere siden 1980'erne. Samtidig er der en social skævhed i forbruget med det største medicinforbrug i de lavere socialgrupper. Studiet viser også, at drenge og pigers forbrug af lægemidler skifter med alderen. Blandt de yngste er der en overvægt af medicinbrugere blandt drengene, mens der blandt de lidt ældre børn er flest piger, som jævnligt indtager medicin.

Undersøgelsen indgår i et internationalt projekt om sundhedsadfærd blandt 11-15-årige, hvor der er indsamlet data om brug af medicin mod smerter og psykiske problemer siden midten af 1980'erne. Det internationale studie viser, at der er betydelige forskelle i medicinforbruget fra land til land.

Den danske projektgruppe består af professor Bjørn E. Holstein og lektor Pernille Due fra Københavns Universitet samt professor Ebba Holme Hansen fra Danmarks Farmaceutiske Universitet. Nogle af resultaterne er publiceret for nylig, mens andre publiceres i nær fremtid.

Har børn og unge det skidt? Undersøgelser af skolebørn fra flere lande viser, at antallet af 11-15 årige medicinbrugere er steget markant siden 1980'erne.

Skolebørn i 28 lande

Data om medicinbrug indsamles som led i det internationale projekt Health Behaviour in School-Aged Children (HBSC), som koordineres af Verdens Sundhedsorganisationen, WHO. Metoden er en spørgeskemaundersøgelse, som gennemføres med ca. fire års mellemrum. I 1998 deltog 28 lande i undersøgelsen.

Spørgeskemaer udfyldes af elever i 5., 7. og 9. klasse fra et repræsentativt udvalg af skoler. Børnene er i gennemsnit 11,5, 13,5 og 15,5 år gamle. 123.227 børn medvirkede i 1998-undersøgelsen, heraf 5.066 fra Danmark.

Skemaerne indeholder omkring 150 spørgsmål om elevernes adfærd i forhold til sundhed og sygdom samt om sociale forhold, familie, netværk med videre. De mange spørgsmål giver mulighed for et væld af analyser, som kan beskrive og forklare, hvad der har betydning for forbruget af lægemidler.

Selve medicinforbruget undersøges ved et simpelt spørgsmål: Har du inden for den sidste måned taget piller eller medicin? Spørgsmålet stilles for fire symptomer, som er relativt hyppige i aldersgruppen; hovedpine, mavepine, problemer med at falde i søvn og nervøsitet. Svarkategorierne er: Nej; Ja, en gang; Ja, flere gange.

Symptomer og forbrug

Det er mest almindeligt at bruge medicin mod hovedpine i aldersgruppen. I 1998 tog 55 procent af de 15-årige danske piger og 36 procent af de 15-årige danske drenge medicin mod hovedpine en eller flere gange inden for en måned. Medicin mod mavepine blev anvendt knap så hyppigt. 33 procent af de 15-årige piger brugte det, men kun 3 procent af de 15-årige drenge. Medicin mod søvnproblemer og nervøsitet blev brugt i omtrent samme omfang, nemlig af mellem 1 og 6 procent af de 11-15-årige.

Undersøgelser af receptmedicin har vist, at små drenge får ordineret mere medicin end små piger, men at forskellen udviskes med alderen.

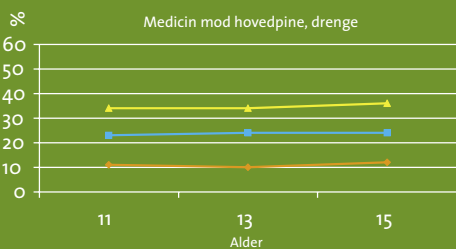
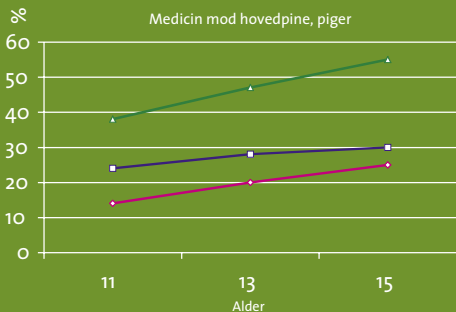
Vores undersøgelse viser, at kønsforskelle og aldersforskelle udvikler sig forskelligt for de undersøgte medicingrupper. Hovedpinemedicin anvendes allerede blandt de 11-årige oftere af piger end af drenge, og forskellen mellem drenge og piger øges

BIVIRKNINGER OG RISICI

De medecintyper, som anvendes til at behandle hovedpine, mavepine, søvnproblemer og nervøsitet, kan være forbundet med forskellige former for bivirkninger og andre risici. Smertestillende medicin kan ved hyppig anvendelse og brug i store doser resultere i leverskader, nyreskader og maveblødning. Desuden er smertestillende håndkøbsmedicin det hyppigste selvmordsmiddel blandt unge. Brug af nervemedicin og sovemedicin kan resultere i afhængighed og misbrug og kan desuden reducere indlæringssevnen hos brugerne.

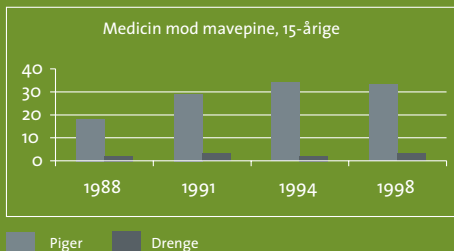
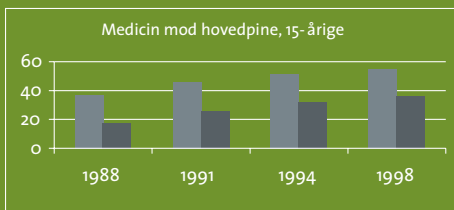


Andel af 11-15-årige danske piger og drenge, der har taget medicin mod hovedpine i 1998 (i %)



- Piger, brugt > 1 gang sidste måned
- Piger, brugt 1 gang sidste måned
- Piger, brugt i alt
- Drenge, brugt > 1 gang sidste måned
- Drenge, brugt 1 gang sidste måned
- Drenge, brugt i alt

Andelen af 15-årige danske piger og drenge, der har taget medicin mod hovedpine og mavepine i 1988 til 1998 (i %).



Forbruget af medicin mod hovedpine blandt 11-15 årige danske piger og drenge.

med alderen. Brug af medicin mod mavepine falder med alderen blandt drenge, men stiger meget blandt piger, hvilket hænger sammen med pigernes menstruationssmerter. Medicin mod nervøsitet og søvnproblemer anvendes hyppigere af de 11-årige end af de 15-årige. Desuden sker der med alderen et skift fra en overvægt af drenge til en overvægt af piger, der bruger disse typer medicin. Receptundersøgelser viser, at brugen af nervemedicin og sove-medicin er lavest blandt de ca. 15-årige. Senere stiger forbruget blandt begge køn, men pigerne bruger mest. Voksne kvinder bruger generelt mere end dobbelt så meget medicin som mænd i disse kategorier.



M.Sc. Ebba Holme Hansen er professor ved Institut for Samfundsfarmaci.

Internationale variationer

Vi har sammenlignet brugen af medicin for 28 lande i 1998. Her viser det sig, at der er kolossale forskelle fra land til land. Andelen af de 11-15 årige drenge, som havde taget medicin mod hovedpine i den foregående måned, varierer fra 21,1 procent i Slovakiet til 49,9 procent i Skotland. Pigernes forbrug ligger på et betydeligt højere niveau, men forskellene mellem landene er lige så udtales. Danmark er i en midterposition set i den internationale sammenhæng. Men der er forskel på, hvor i rangordenen landene er placeret for de forskellige typer af medicin. Således ligger Israel langt over gennemsnittet for medicin mod nervøsitet og søvnproblemer, som bliver taget af en femtedel af de israelske piger. I den anden ende af skalaen ligger Norge med ca. 1 procent. Den internationale sammenligning viser desuden, at de kønsforskelle og aldersforskelle, som blev fundet i Danmark, går igen i andre lande. Det vil sige, at der med alderen sker et skift fra en overvægt af medicinbrugere blandt drenge til en overvægt blandt piger, uanset hvilket niveau landets forbrug ligger på.

Markant stigning

De samme spørgsmål om medicinbrug er anvendt i undersøgelserne siden midten af 1980'erne, og derfor er det muligt at analysere, hvordan forbruget udvikler sig. På tværs af de forskellige typer af medicinbrug har vi fundet en signifikant stigning i andelen af brugere over årene. Et eksempel er udviklingen i forbruget af medicin mod hovedpine og mavepine blandt 15-årige danske drenge og piger. På ti år er der sket en stigning med 50 procent blandt pigerne og 100 procent blandt drengene, selv om drengene ligger på et noget lavere niveau. Vi ser tilsvarende stigninger i de ni andre lande, hvor vi har tilsvarende data. Det første spørgsmål, man stiller sig, er, om symptomerne er steget tilsvarende, men det er ikke tilfældet. Forklaringerne på det øgede forbrug skal derfor findes i andre forhold, som vi endnu ikke har undersøgt.

Grund til bekymring

Medicinforbruget blandt 11-15-årige er altså højt og markant stigende. Udviklingen er bekymrende, fordi medicinen kan have skadevirkninger, og fordi et højt forbrug i ungdommen må forventes at fortsætte ind i voksenlivet. Kønsforskellen blandt voksne i brug af smertestillende medicin og psykofarmaka med en overvægt hos kvinderne udvikles i teenagealderen. Børns og unges medicinanvendelse er ikke blot et forsømt forskningsområde, men også et forsømt område i sundhedspolitikken. Der er behov for en politik på området og for mere oplysning om medicin til børn, forældre og andre, der omgås børn og unge.

OVERRASKENDE STOR SOCIAL SLAGSIDE

Det er velkendt, at de lavere socialgrupper har flere helbredsproblemer end de højere socialgrupper, og derfor er det ikke overraskende, at børn, hvis forældre tilhører de lavere socialgrupper, bruger mere medicin end andre børn. Det er derimod overraskende, at vi har fundet signifikante forskelle mellem socialgrupperne, også efter at have korrigeret for forekomsten af symptomer. Vi udlægger dette som en følge af forskelle i holdninger og adfærd i forhold til sundhed og sygdom i de forskellige socialgrupper.

Hurtige genveje til nye lægemidler

Livsstilssygdomme som sukkersyge og hjerte-karsygdomme rammer nu selv unge mennesker, og forekomsten af aldersbetingede lidelser stiger. Samtidig skaber resistente bakterier øget risiko for at dø af infektioner. Derfor er der akut behov for hurtig udvikling af nye lægemidler.

Af Jerzy W. Jaroszewski, Henrik Franzyk og Christian Adam Olsen

Forekomsten af livsstilssygdomme som fedme, sukkersyge og hjerte-karsygdomme stiger, og sygdommene rammer nu også relativt unge mennesker. Samtidig medfører den stadigt højere gennemsnitlige levealder, at flere og flere lider af aldersbetingede sygdomme.

Især sygdomme i centralnervesystemet er blevet et stort sundhedsproblem, som forringer livskvaliteten for mange ældre og øger udgifterne i sundhedssektoren. Sygdommene medfører

Fast-fase syntese i laboratoriet.



nedsatte motoriske evner som i Parkinsons syge, senil demens som i Alzheimers syge eller følelsesrelaterede lidelser som depression. Årsagen til sygdommene er oftest fejl eller svigt i syntese, lagring, udskillelse og nedbrydning af signalstoffer i hjernen og rygmærven.

Samtidig stiger risikoen for, at infektionssygdomme som tuberkulose igen bliver dødelige, fordi bakterierne udvikler resistens overfor den medicin, der kendes i dag. Der er således et akut behov for hurtig udvikling af helt nye lægemidler samt for forbedringer af de eksisterende typer af medicin.

Hurtig syntese og screening

Omkring 30 procent af alle lægemidler har deres oprindelse i naturstoffer fra mikroorganismer, planter eller dyr. I forskningsfeltet bioorganisk kemi kombineres isolering af nye naturstoffer med moderne organisk-kemiske syntesemetoder. På den måde kan man finde og udvikle nye biologisk aktive stoffer, som kan bruges til udvikling af nye lægemidler og til at opnå vigtig viden om biokemiske processer i organismen.

I det sidste årti har medicinalindustrien for alvor effektiviseret den kemiske del af lægemiddeludviklingen. Et lysende eksempel er kemisk syntese på overfladen af faste partikler – en metode, som er blevet en vigtig metode til hurtig fremstilling af et stort antal lægemiddelkandidater.

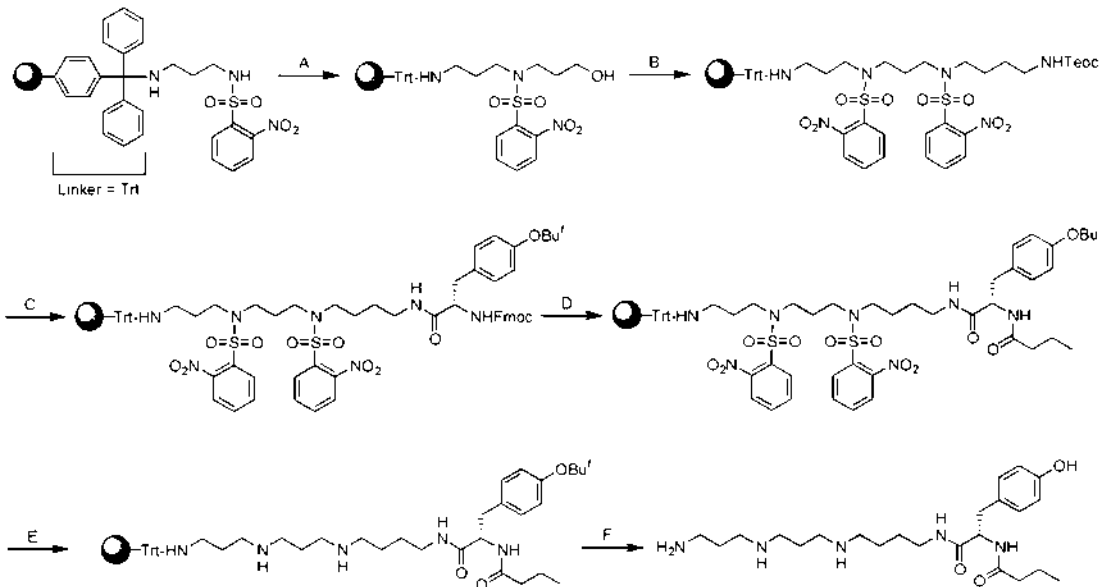
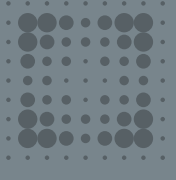
Samtidig er der udviklet screeningsmetoder, hvor automatisering i form af robotter og computerstyrede processer gør det muligt at undersøge store biblioteker af enkeltstoffer på meget kort tid. Normalt testes stofferne på intakte celler eller på cellekomponenter som enzymer eller receptorer. En receptor er typisk et protein i cellemembranen, som lægemidlet binder sig til, hvilket skaber et respons i cellen. Ved screeningen kan man hurtigt se, hvordan nye lægemiddelstoffer vekselvirker med deres mål i organismen.

Fra naturstoffer til lægemidler

I naturstofgruppen på DFU videreudvikler vi de nævnte syntesemetoder. Udgangspunktet er naturstoffer, som gennemgår en medicinalkemisk udviklingsproces for at fremstille nye stoffer med den rette selektivitet og dermed minimale bivirkninger.

Der er mange eksempler på, hvordan det er lykkedes at forfine naturstoffer. Metadon til afvænnning af narkomaner er fremstillet med udgangspunkt i morfin, mens kinin fra kinabark har givet os stoffet klorokin, som er den mest brugte medicin til behandling af malaria. Desuden har videreudvikling af penicillin isoleret fra mikroorganismer ført frem til en lang række semisyntetiske penicilliner med stærkt forbedrede egenskaber.

Netop nu forsker vi intenst på en videreudvikling af visse hvepsegiftstoffer, som i øvrigt har en stor strukturel lighed med giftstoffer fra edderkopper. Stofferne er farmakologisk interessante i forbindelse med udvikling af lægemidler til at modvirke den fremadskridende nervedød i Alzheimers syge og Parkinsons syge. Nervedøden skyldes bl.a. overaktivitet i nogle af nervecellernes



A: Resinbundet sulfonamid (aktiveret aminderivat) forlænges med dialkohol byggesten under Mitsunobu-betingelser. B: Resinbundet alkohol-gruppe forlænges med en diaminbyggesten ($Ns-NH-(CH_2)_4-NHTeoc$, Ns = nitrobenzenesulfonamid, $Teoc$ = beskyttelsesgruppe). Bemærk, at de tertiære sulfonamider herefter fungerer som beskyttelsesgrupper. C: Teoc-gruppen fjernes, og tyrosinbyggestenen kobles ($Fmoc$ og Bu^t = beskyttelsesgrupper). D: $Fmoc$ -gruppen fjernes og smørsyre-byggestenen kobles. E: Afbeskyttelse af Ns -grupperne. F: Endelig afbeskyttelse og kløvning fra resin giver toksinet ($PhTX-433$).

signalsystemer, hvilket giftstofferne kan dæmpe i forsøg med cellekulturer.

Som udgangspunkt bruger vi philanthotoksinet $PhTX-433$, der er opbygget af en lang polyaminkæde, aminosyren tyrosin, samt en smørsyrestoff. Stoffets lineære struktur gør det velegnet til kombinatorisk parallelsyntese på overfladen af faste partikler.

Nye selektive stoffer

De naturlige giftstoffers funktion er at lamme eller dræbe mange forskellige byttedyr, så deres farmakologiske effekt er meget uspecifik, mens lægemidler skal være meget selektive for at opnå en præcis terapeutisk effekt.

Syntese af toksinanaloger medfører et behov for at udvikle metoder til opbygning af polyaminkæden og til at binde de forskellige dele af molekylet sammen. Målet er at udforske syntetiske analogers effekter på forskellige typer receptorer på humane nerveceller. Vi har nu syntetiseret adskillige nye stoffer med en ændret struktur af såvel polyamindelen som aminosyreledet og acylgruppen. Forskningen har allerede resulteret i nye toksiner med særligt lovende evner til selektivt at hindre overstimulering af nerveceller. Dette opnås ved at blokere receptorer for en bestemt type signalstoffer.

Med de nyudviklede syntesemetoder vil det være muligt at opnå en stor strukturdiversitet inden for denne type toksiner, hvilket forøger chancen for at finde nye højpotente og selektive stoffer med mulige anvendelser som lægemidler til behandling af sygdomme i centralnervesystemet.

KOMBINATORISK PARALLELSYNTese

Kombinatorisk parallelsyntese er en metode til effektiv fremstilling af et stort antal lægemiddelstoffer, og metoden kan anvendes til systematisk opbygning af store stofbiblioteker. F.eks. kan man med udgangspunkt i de 20 naturlige aminosyrer fremstille et bibliotek af peptider med tre aminosyrer. Kombinatorisk set kan der dannes $20 \times 20 \times 20$ forskellige tripeptider; i alt 8000.

Syntesen finder sted i en reaktor med 20 små brønde. Først kobles de 20 aminosyrer hver for sig til faste partikler ved hjælp af et bindeled. Derefter blandes alle kuglerne sammen og fordeles igen i brøndene. I næste trin kobles et nyt sæt byggesten på kuglerne i hver sin brønd, og når proceduren gentages, vil det give de i alt 8000 forskellige peptider med tre aminosyrer. Den trinvis opbygning af mål-molekylerne kan være mere eller mindre automatiseret.

Under syntesen anvendes beskyttelsesgrupper, som bindes til funktionelle grupper, der ikke skal deltage i de reaktioner, der opbygger mål-molekylet. Nogle beskyttelsesgrupper fjernes igen undervejs i syntesen for at frigøre en funktionel gruppe, der skal deltage i en efterfølgende reaktion. Ud over beskyttelsesgrupper anvender man aktiverende grupper og reagenser, som fremmer den ønskede reaktion.



Cand.polyt. Christian Adam Olsen er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.

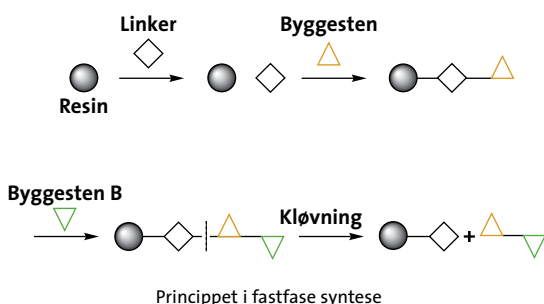


Ph.d. Henrik Franzyk er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Jerzy W. Jaroszewski er professor ved Institut for Medicinalkemi.

SYNTESE PÅ FASTE PARTIKLER



Fastfase-syntese adskiller sig fra almindelig syntese i opløsning ved, at udgangsstoffet via et kemisk bindeled kobles til uopløselige, porøse, kugleformede partikler med diametre på mellem 0,1 og 0,4 millimeter.

Mål-molekylet opbygges trinvis ved hjælp af et antal kemiske byggesten. Da mål-molekylet stadig er bundet til partiklerne, kan man let frafiltrere reagenser og biprodukter, der befinder sig i opløsningen. Hvis reaktionen ikke når til fuld omsætning, kan den gentages, indtil alt bundet udgangsstof er omdannet.

Når syntesen er færdig, spaltes den kemiske binding mellem bindeledet og mål-molekylet selektivt. Slutproduktet er nu i opløsning og kan isoleres ved simpel frafiltrering af partiklerne og efterfølgende fordampning af opløsningsmidlet og eventuelle reagenser.

Metalioner – en nøgle til nye lægemidler

Metalioner og metalholdige proteiner styrer de mest fundamentale livsprocesser. Over halvdelen af enzymerne i den menneskelige organisme indeholder metalioner, som derfor bliver oplagte mål for lægemidler.

Af Ole Farver

Mange vil sikkert betragte lægemidler og uorganisk kemi som to uforenelige begreber. Ikke desto mindre har de allerfleste grundstoffer i det periodiske system potentielle muligheder i design af nye lægemidler.

Især metaller er farmakologisk interessante. Mange lægemidler påvirker enzymer i kroppen, og over halvdelen af alle enzymerne i den menneskelige organisme indeholder metalioner, som derfor bliver oplagte mål for lægemidler. Samtidig styrer metalioner fundamentale biokemiske processer som replikation af arveanlæggene DNA og RNA. For levende organismer giver det ingen mening at skelne mellem "organisk" og "uorganisk"; denne skellen er udelukkende historisk betinget.

Uorganiske forbindelser har da også været benyttet i medicinen i flere tusinde år. Oldtidens ægyptere brugte for 5.000 år siden kobber til sterilisering af drikkevand, og på samme tidspunkt anvendte kineserne guld til eliksirer bl.a. med det noble formål at sikre udødelighed. Kalomel (kviksølv(I)chlorid) har været benyttet som vanddrivende middel siden renaissanceen og helt op til 1950'erne. Arsenforbindelser var de første succesfulde medikamenter til behandling af syfilis. Guldcyanid har været et relativt effektivt middel i kampen mod tuberkulose, og guldkure bruges stadig ved behandling af visse gigtformer. Men det mest kendte uorganiske lægemiddel er utvivlsomt cisplatin, som i kemoterapi har revolutioneret behandlingen af mange kræftformer.

ANALYSE PÅ NANOSEKUNDER

Oxidation og reduktion kaldes med en fælles betegnelse for redoxprocesser.

En af de metoder, vi benytter til at undersøge de lynhurtige redoxprocesser, er puls-radiolyse. Her skydes korte pulse af elektroner, som kun varer få nanosekunder, ind i proteinerne. Kunsten er at ramme det rigtige center i molekylerne - noget, som det har taget mange år at beherske tilfredsstillende - og derefter at registrere de hurtige ændringer i enzyms redoxtilstand.

Her kommer de optiske egenskaber af de jern- og kobberholdige proteiner til deres ret. De har alle intensive farver, som gør det muligt at arbejde med meget små koncentrationer, hvilket er afgørende, når proteinerne skaffes fra levende organismer lige fra bakterier til mus og andre forsøgsdyr.

Det er karakteristisk for alle disse lægemidler, at de blev opdaget ved tilfældigheder. Moderne lægemiddeludvikling er anderledes rationel. I dag satser vi på at forstå de grundlæggende mekanismer for reaktionerne mellem de uorganiske forbindelser og proteiner i kroppen for så at udnytte den opnåede viden til målrettet design af lægemidler.

Omsætning af ilt

Oxidation, hvor elektroner fjernes fra en forbindelse, og reduktion, hvor der tilføres elektroner, spiller en meget stor rolle i al biologisk kemi. Nogle eksempler er fotosyntesen i planter og respirationen hos mennesker og dyr, som er baseret på en kaskade af elektronoverførsler.

Jern og kobber spiller hovedrollerne i alle de processer, hvor ilt omsættes i organismen, og det er bemærkelsesværdigt, at kobber- og jernholdige proteiner stort set udfører identiske funktioner, men forskellige steder i organismen. Hvorfor denne usædvanlige ekstravagance fra naturens side?

Det skyldes primært, at kobberioner danner mere robuste komplekser end jern. Jernholdige forbindelser opererer derfor næsten udelukkende inde i cellerne, mens de mere stabile kobberforbindelser fungerer i tilsvarende processer uden for cellerne.

Frie radikaler

En pris må vi betale for den livgivende ilt; vi må beskytte os mod uønsket dannelse af frie radikaler – som iltforbindelser, der indeholder en uparret elektron. Frie radikaler spiller bl.a. en vigtig rolle for de celleforandringer, som fører til, at cellerne ældes. Viden om hvordan og hvorfor cellerne ældes, har betydning for udvikling af nye lægemidler.

En potentiel kilde til celleforandringer er radikal oxidation af cellemembraner. Et af de uønskede frie radikaler, som dannes ved omsætningen af ilt i kroppen, er superoxid-ionen, som med sin ene uparrede elektron reagerer aggressivt med cellevægge og væv. Derfor findes der enzymer, superoxid-dismutaser (SOD), som katalyserer nedbrydningen af radikalet.

SOD er et af de aller mest effektive enzymer, som overhovedet kendes. Alligevel diskuterede man længe, om formålet med SOD faktisk er at nedbryde superoxid. Et af modargumenterne var, at frie kobberioner tilsyneladende er lige så effektive. Så hvorfor investere i opbygningen af et stort enzym, når en enkelt metalion er lige så virkningsfuld? Men her glemte man en meget vigtig pointe: Frie kobberioner er ikke specifikke, men vil kunne indgå i mange andre processer, hvor de kan være ekstremt farlige.

Det er altså af meget stor vigtighed, at der aldrig findes frie redoxaktive metalioner i organismen. I SOD er metalionerne placeret i enzymet i en struktur, der specifikt binder og omdanner superoxid. Ved alle store hjerteoperationer tilføres SOD til patienten for at undgå, at vævet i det åbne sår nedbrydes ved angreb af superoxid.

Det er karakteristisk for alle metalholdige proteiner, at de består



Puls-radiolyseudstyret på universitetet i Jerusalem består af en ca. 6 m lang accelerator, som kan udsende elektronpulse i nanosekund-perioder. Pulsene sendes gennem prøven, som er anbragt i en 1 cm optisk celle (ses ikke på billedet).



Dr.scient. Ole Farver er professor ved Institut for Analytisk Kemi.

af en eller flere metaller bundet til aminosyregrupper eller andre molekyler, som er fast forankrede i de store proteiner. Proteinstrukturen sørger for specificiteten, og metalionen udfører herefter arbejdet i samarbejde med de omkringliggende grupper.

Kobber i hjernen

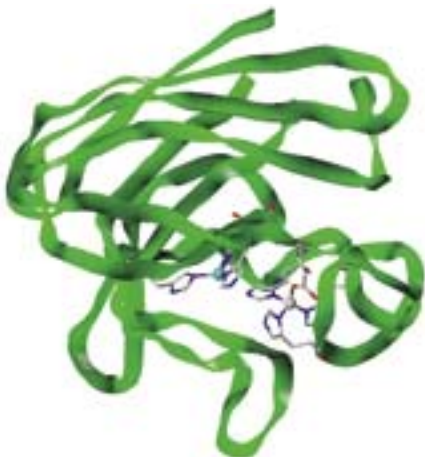
Hjernen er det organ, hvor de fleste kobberholdige enzymer findes. Enzymerne er oplagte mål for lægemidler, der kan binde til kobberionen.

Mange af de kobberholdige proteiner katalyserer dannelse af små molekyler, som indgår i nervecellernes kommunikation. Vi har her arbejdet med et enzym, peptidylamidase, som producerer peptidhormonerne vasopressin og oxytocin i hypofysen. Vasopressin er med til at opretholde væskebalancen i kroppen, mens oxytocin spiller en vigtig rolle i forbindelse med fødsel ved stimulering af livmoderens sammentrækning. Dannelsen af hormonerne finder sted i et samspil mellem kobberprotein, C-vitamin og ilt. Hormonerne skal også fjernes hurtigt og effektivt, når der ikke længere er behov for dem. Det foregår også ved hjælp af kobberholdige enzymer.

Genetisk betingede fejl i kobberstofsiftet fører til alvorlige lidelser. Når kobber ikke omsættes effektivt nok, ophobes metallet i leveren og hjernen, hvilket uden behandling fører til skader på organerne og til tidlig død.

Mangel på kobber er lige så katastrofalt. Et eksempel er den arvelige lidelse, Menkes sygdom, som kan ramme drenge, der ofte dør under svære lidelser, inden de bliver tre år. Sygdommen skyldes defekter i et kobbertransportørprotein, Menkes protein. Generne for både det intakte og det defekte protein er blevet isoleret og klonet, og vi har studeret kobberbinding til proteinerne. Analyserne af sammenhængen mellem proteinets struktur og funktion har ført til en tilbudsående forståelse af mekanismerne og åbner hermed mulighed for bedre behandling af sygdommen.

Betydningen af uorganisk kemi i biologien har efterhånden opnået betydelig anerkendelse, og metalioners og metalholdige proteiners rolle i sundhed og sygdom har tiltrukket sig molekylærbiologers og cellebiologers opmærksomhed. Der er ingen tvivl om, at den grundvidenskabelige forskning i metalloprotein kemi vil udvikle sig voldsomt i de kommende år, og at den indhentede viden vil danne basis for en mere rationel og målrettet udvikling af nye lægemidler.



Enzymet superoxid-dismutase (SOD) nedbryder den frie radikal-ion superoxid, der ødelægger cellevægge og væv. Det aktive center i enzymet findes omkring kobber- og zinkionerne, som er markeret med henholdsvis cyan og gråt. Proteinets "rygrad" er vist som et grønt bånd. De aminosyresidekæder, som holder metalionerne på plads, er også vist.



Menkes protein transporterer kobber i organismen. I Menkes sygdom er proteinet defekt, hvilket fører til akut kobbermangel og en tidlig død. Analyser af sammenhængen mellem proteinets struktur og funktion har ført til en bedre forståelse af sygdomsprocessen, hvilket åbner mulighed for at udvikle en medicinsk behandling. Kobberionen (cyanfarvet) er bundet til to svovlatomer (gule). Peptidskelettet er vist som et magentafarvet bånd.

Integreret computerdesign og syntese

Angrebepunktet for mange lægemidler er store proteiner med en kompliceret tredimensionel struktur. Kendskabet til receptorernes rumlige opbygning vokser hastigt. Den opnåede viden anvendes til udvikling af lægemidler med computerbaserede metoder.

Af Ulf Madsen, Esben J. Bjerrum, Jeremy R. Greenwood og Tommy Liljefors

Tidligere blev mange lægemidler fundet mere eller mindre tilfældigt. Normalt var udgangspunktet iagttagelser fra dyreforsøg, som blev brugt til at udvikle ny medicin, men ofte skete det helt uden kendskab til, hvordan lægemidlet virkede i den menneskelige organisme. Man vidste ikke, hvilke molekyler i kroppen lægemidlet påvirkede, og virkningsmekanismen var ukendt. Metoden har givet et væld af gode lægemidler, hvoraf mange stadig anvendes. Men opdagelsen af lægemidlerne var afhængig af tilfældigheder og ikke rationel og målrettet.

I nyere tid har udviklingen af lægemidler været mekanismebaseret. På grundlag af kendskabet til mekanismerne bag en sygdom kan nye lægemidler udvikles på et rationelt grundlag. Mange lægemidler påvirker bestemte receptorer i kroppen med funktioner, der er relateret til den sygdom, som ønskes behandlet. Ved målrettet udvikling af stoffer med virkning på en given receptor bliver chancen for at finde et godt lægemiddelstof meget større. I den for de senere år er kendskabet til mekanismerne bag mange sygdomme nået helt ned på det molekylære niveau, og det har gjort strukturbaseret lægemiddeludvikling mulig. Et detaljeret kendskab til den rumlige opbygning af en receptor og i særdeleshed den del af receptoren, som et lægemiddelstof bindes til, er nu et meget vigtigt redskab ved design af nye potentielle lægemiddelstoffer. Langt de fleste receptorer er store proteiner med en kompliceret tredimensionel struktur.

Receptorer for glutaminsyre

Et af vore mål er at udvikle lægemiddelstoffer, som selektivt påvirker bestemte undertyper af hjernens receptorer for signalstoffet

glutaminsyre. Receptorerne er opdelt i et meget stort antal undertyper med forskellige funktioner både i den normalt fungerende hjerne og i en række sygdomstilstande.

Det samlede billede af de enkelte undertypers funktion er langt fra klarlagt. Ved at udvikle stoffer, som selektivt påvirker enkelte undertyper, bliver det muligt at studere disse undertypers funktion, og den opnåede viden kan anvendes i bestræbelserne på at udvikle nye og bedre lægemidler.

Når glutaminsyre bindes til receptorerne, udløses et respons i nervecellerne. Glutaminsyre aktiverer alle receptorerne, men ved behandling af en sygdom er det ofte ønskeligt at stimulere eller blokere enkelte undertyper.

Der er kun små forskelle i opbygningen af receptorproteinet i mange af undertyperne, men de små forskelle kan alligevel udnyttes til at udvikle selektive stoffer. Nogle gange kan man opnå selektivitet selv ved meget små ændringer i lægemiddelstoffernes struktur.

Selektive lægemiddelstoffer

En af undergrupperne af receptorerne for glutaminsyre hedder AMPA-receptorer, og de kan yderligere opdeles i fire undertyper, der kaldes GluR1-4.

Hidtil har det været meget vanskeligt at udvikle stoffer med selektiv virkning på disse undertyper. Detaljeret kendskab til den rumlige struktur af bindingslommen og anvendelse af computerbaserede metoder har nu skabt et gennembrud med hensyn til at opnå den ønskede selektivitet.

Når det gælder GluR2, har man opnået et helt nøjagtigt billede af den rumlige opbygning af bindingslommen ved hjælp af røntgenkrystallografi. Med genteknologiske metoder er det samtidig lykkedes at fremstille en version af GluR2 receptoren, som i sin aminosyresammensætning svarer til GluR3. Også denne GluR3-lignende receptor er det lykkedes at få et præcist tredimensionelt billede af. De to strukturer har dannet udgangspunkt for at designe stoffer, som selektivt kan påvirke GluR2 og GluR3 undertyperne.

Computeren viser vejen

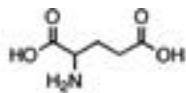
På en computer kan man anbringe tredimensionelle modeller af de stoffer, man satser på at syntetisere, i bindingslommen på de ønskede receptorer. Metoden involverer beregninger og visuel inspektion, som kan afsløre, hvor godt forskellige stoffer passer ind i bindingslommen på de forskellige undertyper.

Tidligere forsøg har vist, at stoffet Br-HIBO påvirker GluR1 og 2 stærkere end GluR3 og 4. Computerberegninger af Br-HIBO's samspil med bindingslommen i GluR2 og i den GluR3-lignende struktur viste, at bromatomet er af afgørende betydning for selektiviteten. Men beregningerne pegede også på, at udskiftning af brom med klor sandsynligvis ville føre til langt højere selektivitet. Efter syntese af Cl-HIBO viste dette sig at holde stik. I samarbejde med Institut for Farmakologi gennemførte vi undersøgelser, som

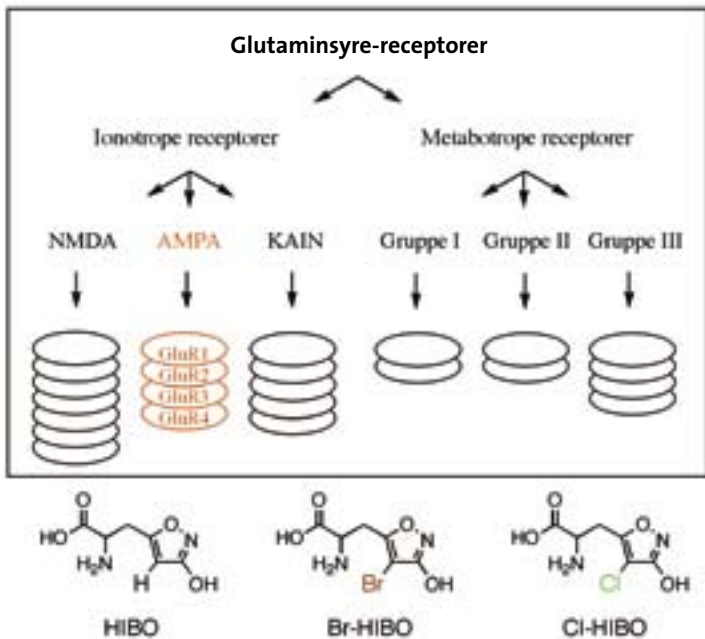
GLUTAMINSYRE OG NEUROLOGISKE SYGDOMME

Signalstoffet glutaminsyre er det vigtigste stimulerende signalstof i centralnervesystemet, og stort set alle nerveceller i hjernen påvirkes af glutaminsyre. Derfor spiller nervecellernes receptorer for glutaminsyre en central rolle i hjernens normale funktion.

Men receptorerne er også involveret i en række meget alvorlige neurologiske sygdomme som Alzheimers syge, epilepsi og Parkinsons syge. Derfor er de vigtige mål for udvikling af nye lægemiddelstoffer.



Glutaminsyre



Hjernens glutaminsyre-receptorer inddeles i ionotrope og metabotrope receptorer, der hver især er opdelt i tre undergrupper, som yderligere er opdelt i et antal undertyper. Af de i alt 24 undertyper er der kun angivet navne på de fire AMPA undertyper, som er relevante for dette projekt. Øverst ses strukturen af glutaminsyre, som påvirker alle receptortyperne, og nederst de tre analoger HIBO, Br-HIBO og Cl-HIBO, hvoraf sidstnævnte udviser stor selektivitet på GluR1 og 2 i forhold til GluR3 og 4.



Ph.d. Ulf Madsen er lektor ved Institut for Medicinskemi.



Cand.pharm. Esben J. Bjerrum har netop afsluttet sit speciale ved Institut for Medicinskemi.



Ph.d. Jeremy R. Greenwood er adjunkt ved Institut for Medicinskemi.



Ph.d. Tommy Liljefors er professor ved Institut for Medicinskemi.

viste, at Cl-HIBO har en aktivitet, som er 275-1600 gange stærkere på GluR1 og 2 end på GluR3 og 4, hvorimod Br-HIBO's aktivitet kun er 3-37 gange stærkere.

Kloratomet i Cl-HIBO er langt mindre end bromatomet i Br-HIBO, men størrelsen er ikke den afgørende faktor. Det kan vi se, fordi forbindelsen HIBO med et lille brintatom i samme position er endnu mindre selektivt end Br-HIBO. Den øgede selektivitet skyldes, at kloratomet påvirker molekylets elektroniske forhold på en optimal måde for GluR1 og 2 i forhold til GluR3 og 4.

Sundhed og sygdom

Stoffet Cl-HIBO kan anvendes til undersøgelse af GluR1 og 2-undertypernes betydning i såvel den normalt fungerende hjerne som i sygdomsmodeller.

Stoffets aktivitet er blevet grundigt karakteriseret og netop publiceret, og stoffet vil være tilgængeligt gennem firmaet Tocris, som forhandler forbindelser til eksperimentel brug.

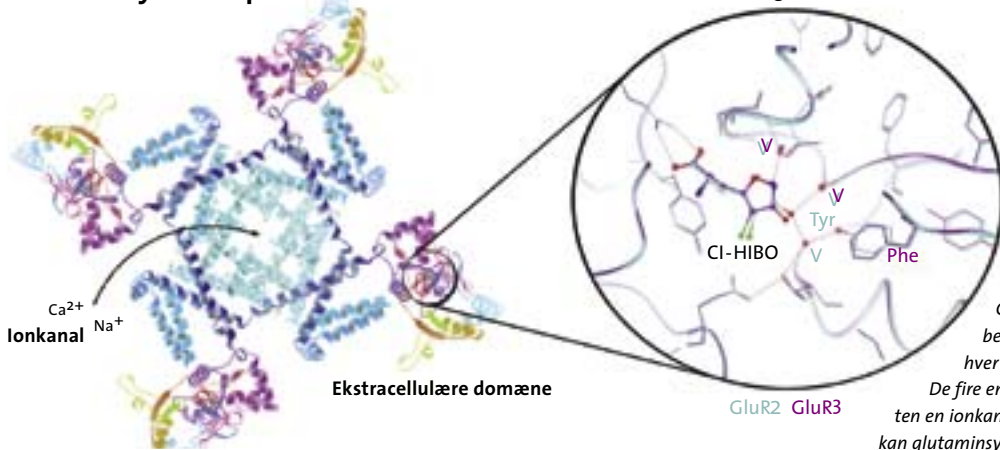
Cl-HIBO i sig selv forventes ikke at kunne anvendes som lægemiddel, fordi det stimulerer receptorerne for glutaminsyre, og det er primært blokerende stoffer, man ønsker at bruge i terapeutisk

sammenhæng. Men forsøg med stoffet kan vise, om den ene eller anden gruppe af receptorer har betydning ved forskellige sygdomme, og dermed bane vejen for rationelt udviklede lægemidler.

FØRST MODEL, SÅ SYNTSE

Ved hjælp af computerprogrammer kan man konstruere tredimensionelle modeller af de lægemiddelmolekyler, som man ønsker at syntetisere. Derefter kan man undersøge, om modellerne passer i bindingslommen på den ønskede receptor. På computeren kan man altså undersøge et stofs evne til at binde til en receptor, før det syntetiseres. Metoden kan endnu ikke med sikkerhed afsløre, hvor godt et stof vil virke på receptoren. Men beregningerne er et vigtigt redskab i udvælgelsen af, hvilke stoffer man skal syntetisere for at finde ud af, hvorfor nogle stoffer påvirker flere typer af receptorer, mens andre virker selektivt.

Glutaminsyre-receptor



GluR2-receptoren består af fire enheder på hver ca. 900 aminosyrer. De fire enheder danner i midten en ionkanal, og i hvert hjørne kan glutaminsyre bindes og dermed

åbne ionkanalen. Bindingslommen er forstørret i billedet til højre, og her sammenlignes binding af Cl-HIBO i GluR2 og GluR3. I bindingslommen er bl.a. vist de to aminosyrer (Tyr og Phe), som er forskellige i de to strukturer. Derudover er vist vandmolekyler (V), som specielt i GluR2 giver en bedre binding af Cl-HIBO og dermed kan forklare den selektive aktivitet på netop denne receptor undertype.

Fluorescens viser farmakologi!

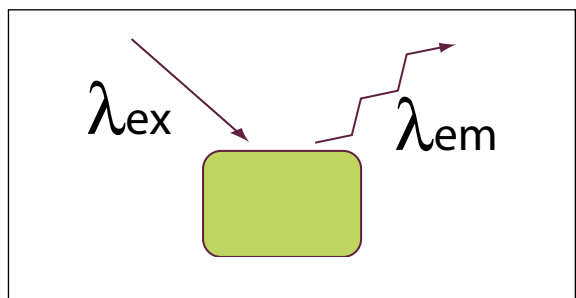
Tidligere måtte man bruge mange forskellige testsystemer for at opklare de farmakologiske egenskaber af nye lægemiddelstoffer. Nu kan tests baseret på fluorescens give svaret, selv om de proteiner, stofferne skal påvirke, fungerer vidt forskelligt.

Af Mette Strange og Hans Bräuner-Osborne

Mange molekyler exciteres af lys med en bestemt bølgelængde, hvilket får dem til at udsende lys ved en anden bølgelængde; molekylerne fluorescerer. I medicinsk forskning har brugen af fluorescens i de seneste år revolutioneret mulighederne for at bruge cellekulturer til at teste, hvordan nye lægemiddelstoffer vil påvirke deres mål i kroppen.

Undersøgelserne kan f.eks. foregå ved hjælp af et NOVostar™ apparat, som Institut for Medicinalkemi for nylig har anskaffet og brugt til farmakologiske undersøgelser af lægemiddelstoffer, som er rettet mod proteiner i cellemembranerne.

Netop membranbundne proteiner er centrale for sundhed og sygdom, fordi de spiller en stjernerolle i cellernes indbyrdes kommunikation, hvor de udgør forbindelsesledet mellem det ydre miljø i vævene og cellernes indre. De fleste af nutidens lægemidler virker ved at binde sig til membranproteiner.



Princippet i fluorescens. Et molekyle exciteres, når det belyses med én bestemt bølgelængde (λ_{ex}), hvorefter molekylet udsender fluorescerede lys med en anden bølgelængde (λ_{em}).

Receptorer og transportører

Mange membranproteiner er receptorer for naturlige signalstoffer og hormoner. Receptorerne fungerer som omstillingsborde mellem omgivelserne og cellens indre. Når et signalstof bindes til receptoren, udløser det et meget specifikt respons inde i cellen.

En vigtig gruppe receptorer er G-protein-koblede receptorer. Når de aktiveres af et signalstof, stimuleres forskellige intracellulære enzymer, hvilket kan føre til frigivelse af positivt ladede calciumioner fra cellens interne depoter.

En anden vigtig receptortype indeholder ionkanaler. Når de aktiveres, løber en strøm af ioner gennem receptoren. Strømmen påvirker cellens membranpotentiale, dvs. spændingsforskellen

over membranen. I en hvilende celle er ydersiden og indersiden af membranen henholdsvis positivt og negativt ladet. En indadrettet strøm af positivt ladede ioner reducerer cellens membranpotentiale, hvorimod indstrømning af negativt ladede ioner øger membranpotentialet.

Tilstedeværelsen af signalstoffer mellem cellerne skaber en vedvarende stimulation af receptorerne, som med tiden ville overbelaste cellens indre maskineri, hvis ikke overbelastningen blev forebygget af cellens skraldemænd. Det er transportørerne, en gruppe membranproteiner, som fragter signalstoffer ind gennem membranen til cellens indre, hvor de ikke længere kan aktivere receptorerne.

Lægemiddelstoffer, der binder sig til receptorer, kan enten efterligne effekten af et naturligt signalstof og aktivere receptoren, eller de kan virke som en prop i receptoren og blokere effekten af signalstoffet. På samme måde kan stoffer, som binder sig til transportører, enten blive sendt ind i cellen eller blokere for transport af signalstoffet til cellens indre.

Fokus på glutaminsyre

Vi har sat fokus på samspillet mellem glutaminsyre og receptorer og transportører. Glutaminsyre er det vigtigste stimulerende

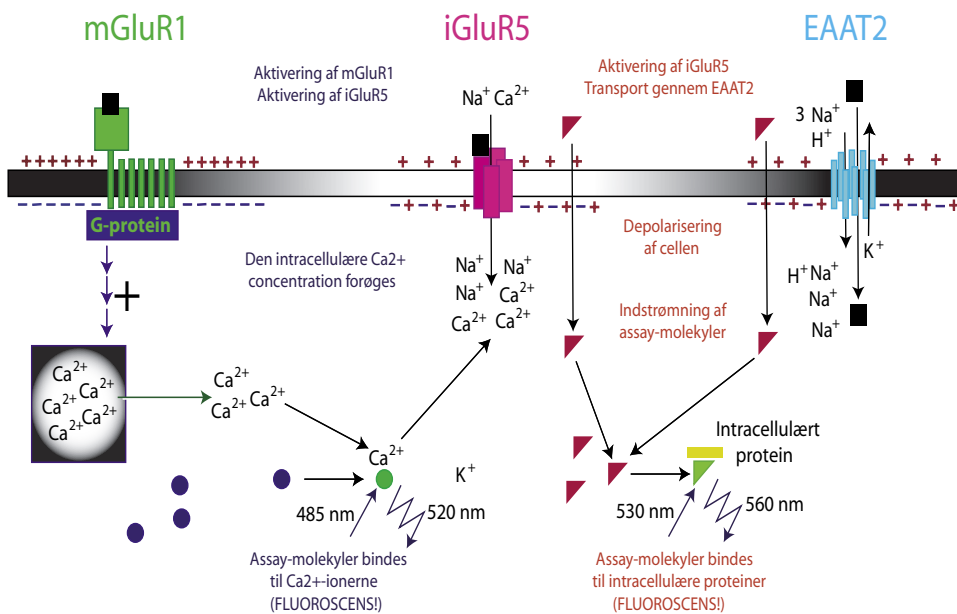


Det nye NOVostar™ apparat, som anvendes til studierne på Institut for Medicinalkemi.

signalstof i centralnervesystemet. Men når mængderne af signalstoffet er for store, kan det føre til nervedød. Lægemiddelstoffer, som regulerer niveauet af glutaminsyre i hjernen, er farmakologisk interessante i forbindelse med udvikling af behandlinger mod bl.a. Alzheimers sygdom.

Glutaminsyre udøver sin fysiologiske effekt via såvel G-protein-

TO NYE TESTSYSTEMER



Figuren viser princippet i fluorescensbaserede test af, hvordan signalstoffet glutaminsyre påvirker membranproteiner, der fungerer som receptorer og transportører. Til venstre en G-protein-koblet receptor (mGluR1). I midten en ionkanalreceptor (iGluR5) og til højre en transportør (EAAT2). Systemet kan bruges til at undersøge stimulerende og blokerende virkninger af potentielle lægemiddelstoffer.

Vi har i den seneste tid implementeret to fluorescensbaserede testsystemer. I begge systemer anvendes plader dækket med celler, der udtrykker forskellige receptorer og transportører. Det ene system – calciumtesten – bruges til at måle, hvordan signalstoffer og lægemiddelstoffer påvirker de typer af G-proteinkoblede receptorer, der medfører frigivelse af positive calciumioner fra depoter i cellen. Systemet er baseret på et molekyle, der kan trænge gennem celledemembranen og binde sig til calciumionerne. Ved dannelsen af komplekset bliver molekylet fluorescerende. Ionkanalreceptorer, som tillader indstrømning af positive calciumioner i cellen, kan ligeledes karakteriseres med systemet, fordi det nytilkomne calcium skaber øget fluorescens i cellens indre.

Det andet system – membranpotentialtesten – måler de ændringer i spændingen over celledemembranen, som opstår ved åbning af ionkanaler. Her benyttes et andet molekyle, som fluorescerer, når det binder sig til intracellulære proteiner. Molekylet er negativt ladet, hvorfor dets evne til at trænge ind i cellerne bestemmes af cellens membranpotentiale. Når spændingen over celledemembranen er høj, frastøder membranen molekylet, og indstrømningen begrænses. Når spændingen er lav, øges indstrømningen. Jo større mængder af molekylet, der strømmer ind i cellen og bindes til intracellulære proteiner, jo stærkere bliver fluorescensen.

koblede receptorer som ionkanalreceptorer. Når glutaminsyre har stimuleret receptorerne, fjernes signalstoffet af transportører.

Flere fluer med ét smæk

Vi har brugt de nye testsystemer til at måle glutaminsyres effekt på alle tre typer membranproteiner. I calciumtesten forårsager stigende koncentrationer af glutaminsyre en stigning i den målte fluorescens både i celler, der udtrykker den G-proteinkoblede receptor mGluR1 og ionkanalreceptoren iGluR5. Selvom den øgede mængde af intracellulært calcium opstår via to vidt forskellige cellulære processer, kan de to receptortyper altså karakteriseres farmakologisk i samme testsystem.

Eftersom indstrømningen af positive calciumioner gennem iGluR5 påvirker cellens membranpotentiale, kan denne receptor også testes i membranpotentialtesten, som ligeledes kan karakterisere transportøren EAAT2.

For hvert glutaminsyremolekyle, som transportøren sender ind i cellen, lukker den tre positive natriumioner og en proton ind, mens kun én positiv kaliumion transporteres den modsatte vej. Den totale indvirkning på cellens membranpotentiale ved aktiv transport af glutaminsyre er derfor en reduktion af spændingen over celledemembranen. Transporten af glutaminsyre giver således anledning til en stigende fluorescens i membranpotentialtesten.

Databehandlingen af fluorescenssignalet i de to testsystemer er såre enkel. Det maksimale respons opnået ved forskellige koncentrationer af glutaminsyre og andre stoffer, som stimulerer receptorer og transportører, kan konverteres til koncentrationsre-

sponskurver. På samme måde kan virkningen af blokerende stoffer udledes af deres evne til at hæmme effekten af en bestemt koncentration af glutaminsyre.

Ud fra fluorescenssignaler af varierende intensitet er det derfor nu muligt at vurdere, om et potentielt lægemiddelstof har stimulerende eller blokerende virkninger på en given receptor eller transportør, samt hvor potent stoffet er.

OG NU MED AUTOMATISERING...

Tidligere måtte man bruge et væld af forskellige metoder for at bestemme de farmakologiske egenskaber af nye lægemiddelstoffer.

Men takket være introduktionen af fluorescensbaserede testsystemer i lægemiddelforskningen kan farmakologien af nye stoffer nu bestemmes i ganske få tests - også selvom målproteinerne på molekylært plan fungerer endog meget forskelligt.

Simpliciteten af de nye metoder har endda muliggjort en høj grad af automatisering, hvilket har betydet, at en anseelig mængde stoffer kan afprøves på mange målproteiner inden for en overskuelig tidsramme. Test af store biblioteker af strukturelt vidt forskellige stoffer mod terapeutisk interessante proteiner er nu blevet en essentiel del af moderne lægemiddelforskning.



Mette Strange er specialestuderende ved Institut for Medicinalkemi.



Dr. pharm. Hans Bräuner-Osborne er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Øget vandopløselighed af lægemidler

Tabletter er virkningsløse, hvis lægemiddelstoffet ikke frigøres og opløses i mave-tarmsaften. Vandopløseligheden af lægemiddelstof er derfor af største vigtighed ved udvikling af nye lægemidler. Foreløbige resultater viser, at en kombination af prodrug design og saltdannelse kan øge vandopløseligheden af lægemiddelstoffer.

Af Anders Bach Nielsen og Claus Selch Larsen

Figuren viser de trin, et prodrug skal igennem, før lægemiddelstoffet kan absorberes til blodbanen: Først opløses det vandopløselige prodrug i mave-tarmvæsken (A). Herefter skal lægemiddelstoffet frigives og forblive i opløsning (B), så det kan passere tarmvæggen. Det kan enten ske ved direkte absorption (C), eller ved udfældning til mikropartikler, som går i opløsning (D) og absorberes.

Tabletter er normalt den behageligste måde at indtage medicin, men tabletter stiller store krav til design af lægemidlet. Især er det svært at sikre, at lægemiddelstoffet når frem til det sted i kroppen, hvor det skal virke.

En af de vanskeligste barrierer er at få lægemiddelstoffet transporteret ud i blodet fra mave-tarmkanalen. Transport over i blodbanen forudsætter nemlig, at stoffet opløses i mave-tarmsaften, og mange lovende lægemiddelstoffer må opgives, fordi de opløses for dårligt eller for langsomt.

Det er derfor af største vigtighed at udvikle metoder til at øge vandopløseligheden af nye lægemiddelstoffer. Vi arbejder med to metoder til at øge opløseligheden, og foreløbige resultater tyder på, at en kombination af de to teknikker er lovende.

Prodrug og salt

Den ene metode består i at fremstille prodrugs, hvor et midlerti-

digt transportstof tilkøbes lægemidlet. Et prodrug er virkningsløst i sig selv. Først når lægemiddelstoffet frisættes ved fraspaltning af transportstoffet, kan det udøve sin virkning. I dette projekt skal transportstoffet øge vandopløseligheden af lægemiddelstoffet.

Den anden metode er at danne et salt, som kan opløses i mave-tarmsaften. Her udnytter man, at mange lægemiddelstoffer indeholder basiske eller sure grupper. Det er muligt at protonere de basiske grupper eller deprotonere de sure grupper. Når vi protonerer en basisk gruppe, sker det ved at tilsætte en syre; syren afgiver en proton, og lægemiddelstoffet får herved en positiv ladning. Ved deprotonering af sure grupper i lægemiddelstoffet tilsættes en base, der tager en proton fra den sure gruppe, som herved bliver negativt ladet.

De ladede grupper i lægemiddelstoffet danner par med en ion med modsat ladning – en modion. Pardannelse af to grupper med modsat ladning fører til dannelse af et salt.

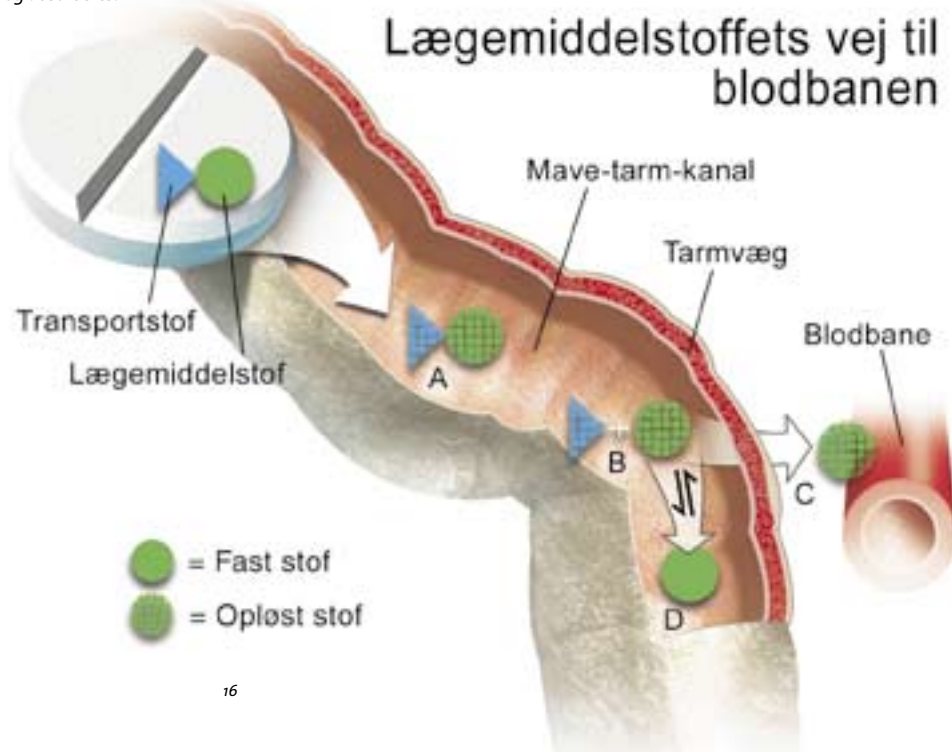
Mange potentielle, men svært opløselige lægemiddelstoffer indeholder en base, som kaldes tertiær amin. Vi arbejder derfor med den type stoffer. Når der laves prodrugs på en tertiær amin, opnås to ting. For det første tilkøbes et transportstof, og for det andet inkorporeres en fast positiv ladning i molekylet. Det vil sige, at der dannes et salt, samtidig med at transportstoffet påsættes. Vi undersøger her, hvilken indflydelse variation af transportstoffet og den saltdannende modion har på opløseligheden, samt hvor hurtigt lægemiddelstoffet frisættes fra et prodrug-salt.

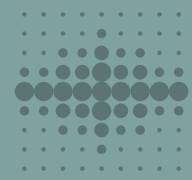
Modionens indflydelse

Første trin har været at undersøge, hvilken indflydelse modionen har på opløseligheden. Her har vi arbejdet med stabile forbindelser, fordi det er betydeligt lettere at udskifte modionerne på en stabil forbindelse end på et prodrug, som er ustabil og derfor vanskeligere at håndtere.

Vi syntetiserede en stabil positivt ladet forbindelse ved at sætte en metylgruppe på den tertiære amin. Derefter valgte vi syv forskellige negative modioner og målte deres indflydelse på saltets evne til at lade sig opløse i vand.

Undersøgelsen viser to ting. For det første havde alle saltene en forbedret opløselighed i forhold til udgangsstoffet – når der laves et salt med de givne modioner, opnås en forøgelse af stoffets opløselighed med en faktor 25-25.000. Desuden er der en forskel på en faktor 1000 i opløselighed, når saltene sammenlignes indbyrdes. Det viser, at det er vigtigt at finde den rigtige modion for at få en tilstrækkelig høj vandopløselighed.





Cand.pharm.
Anders Bach Nielsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Dr.pharm.
Claus Selch Larsen er professor ved Institut for Farmaci.

Modion	Opløselighed (mg/ml)	Førøgelse i opløselighed
Iodid	1-10	25-250
Tosylat	10-100	250-2.500
Glycolat	300-500	7.500-12.500
Mesylat	>1000	>25.000
Acetat	>1000	>25.000
Clorid	>1000	>25.000
Format	Hygroskopisk	
Tertiær amin base	0,04	1

Tabellen viser modionens indflydelse på vandopløseligheden af salte af et stabilt modelstof.

Pro-delen	Opløselighed (mg/ml)	Førøgelse i opløselighed
Propionyl-oxy-methyl	0,4	2.000
Buturyl-oxy-methyl	0,9	4.500
Isobuturyl-oxy-methyl	>2	>10.000
Pivaloyl-oxy-methyl	1,5	7.500
Tertiær amin base	0,0002	1

Tabellen viser, hvilken indflydelse forskellige transportstoffer har på vandopløseligheden af et prodrug-salt.

Transportstoffets indflydelse

Næste trin har været at undersøge prodrugs, som blev syntetiseret ud fra et potentielt lægemiddelstof, som ligeledes indeholder en tertiær amingruppe, og som har en meget lav vandopløselighed. Stoffet er doneret af medicinalfirmaet H. Lundbeck A/S. Her fremstillede vi fire forskellige prodrug-salte, som alle havde klorid som modion.

Prodrug-saltene har en markant forøgelse af vandopløseligheden på en faktor 2000-10000 sammenlignet med udgangsstoffet. Desuden viser undersøgelsen, at der ikke er den store forskel i opløselighed mellem de fire valgte prodrug-salte; kun en faktor 5.

Frisætning af lægemiddelstof

Prodrugs er i sig selv virkningsløse, så frisættelse af lægemiddelstoffet er af vital betydning for, at lægemiddelstoffet kan udøve sin virkning. Da de anvendte prodrugs ikke kan trænge gennem tarmvæggen og komme ud i blodet, skal lægemiddelstoffet frisættes i mave-tarmkanalen, før absorptionen over i blodbanen kan finde sted.

Nedbrydning af et prodrug og frigivelse af lægemiddelstoffet kan ske på to måder. Den ene er hydrolyse, som bestemmes af vandets surhedsgrad, og den anden er spaltning ved hjælp af enzymer. Ved hydrolyse varierer frigivelsens hastighed ofte med pH. I mave-tarmkanalen ligger pH på ca. 1-8 og i det givne interval er halveringstiden mellem 12 timer og 60 dage. Halveringstiden er den tid, hvor halvdelen af det pågældende prodrug er blevet omdannet til lægemiddelstof, så jo kortere halveringstiden er, desto hurtigere nedbrydes et prodrug.

En halveringstid på 12 timer til 60 dage er alt for lang tid, når man sammenligner med de 24 timer, som et prodrug typisk tager om

at passere mave-tarmkanalen, inden det udskilles af kroppen. Hydrolyse er altså ikke alene tilstrækkelig til at frisætte lægemiddelstoffet.

Enzymatisk nedbrydning

Derfor vil vi nu sætte fokus på, om prodrugs kan nedbrydes ved hjælp af enzymer. Der findes et stort antal enzymer i mave-tarmkanalen, og ideen er at undersøge, om enzymerne kan frisætte lægemiddelstoffet, så halveringstiden bliver i størrelsesordenen minutter i stedet for dage.

Vores resultater har vist, at det er muligt at øge vandopløseligheden ved at kombinere prodrug design og saltdannelse. Men før enzymstudierne er færdige, er der ikke tilstrækkelig grundlag for at konkludere, om metoden kan bruges i den fremtidige udvikling af nye lægemidler. De foreløbige undersøgelser peger dog i den rigtige retning.

VANDOPLØSELIGHED – ET NØGLEPUNKT I FREMTIDENS FORSKNING

Hvert år fremstiller medicinalindustrien et stort antal potentielle lægemiddelstoffer. Desværre bliver mange af stofferne aldrig udviklet til lægemidler, fordi vandopløseligheden er så ringe, at de ikke evner at nå frem til virkningsstedet i kroppen. I de senere år har utilstrækkelig vandopløselighed af mulige lægemiddelstoffer udviklet sig til at være et af de største problemer, som medicinalindustrien har, når der skal udvikles nye lægemidler. Netop derfor er det et nøglepunkt i fremtidens forskning.

Kan lægemiddelstoffer smugles ind i organismen?

Når medicin indtages i tabletter, kan det være svært at få det aktive stof gennem tarmvæggen og ud i blodet. Men lægemidlerne kan smugles ind i kroppen, hvis organismen ikke kan skelne mellem lægemiddelstoffer og næringsstoffer.

Af Jon Våbenø, Carsten Uhd Nielsen, Bente Steffansen og Flemming Steen Jørgensen

Patienter foretrækker helt klart at indtage deres medicin gennem munden fremfor via injektion, og derfor er det en stor fordel, hvis lægemidlerne kan formuleres som tabletter. For eksempel bruges der betydelige ressourcer på at udvikle lægemiddelstoffer til behandling af sukkersyge, som kan indtages i tabletter og erstatte injektioner med insulin.

En af de store udfordringer ved anvendelse af tabletter er, at mange lægemiddelstoffer ikke er i stand til at passere tarmvæggen og komme ud i blodet, hvorfra stofferne udøver deres virkning. I nogle tilfælde kan man dog snyde organismen ved at forklæde lægemiddelstoffet som føde og på den måde smugle stoffet gennem tarmvæggen.

Når vi har spist, nedbryder fordøjelsesenzymer i maven og tarmene en stor del af fødens proteiner til små peptider, som består af to eller tre aminosyrer, kaldet di- og tripeptider. Di- og tripeptiderne sendes ud i blodet ved hjælp af transportører i tarmvæggen, og på den måde bliver næringsstofferne udnyttet.

Peptidtransportørerne er transportproteiner lokaliseret i tarmcellernes membraner. Transportørerne er - på endnu ukendt vis - i

stand til at genkende di- og tripeptiderne og derefter transportere dem gennem tarmvæggen til blodet.

Transport af antibiotika

Mange meget udbredte lægemiddelstoffer ligner peptider tilstrækkeligt til, at peptidtransportøren sørger for at transportere stofferne gennem tarmvæggen, så de hurtigt og effektivt smugles ind i blodet. Nogle eksempler er antibiotika som penicilliner og cephalosporiner.

Peptidtransportøren åbner også en kattedør for medicin, som ikke i sig selv er i stand til at passere tarmvæggen. Hvis man kan forklæde et lægemiddelstof, så transportøren tror, at der er tale om di- eller tripeptider, kan lægemiddelstoffer nemt og effektivt smugles ind i organismen. Kravet er, at man ved præcis, hvilke funktionelle grupper lægemiddelstoffet skal indeholde, og hvordan grupperne indbyrdes skal være placeret i forhold til hinanden.

Vi har undersøgt en række antibiotika med henblik på at identificere, hvordan de forskellige dele af molekylerne er anbragt rumligt i forhold til hinanden. Det gøres ved hjælp af avancerede computerprogrammer, som er i stand til at simulere molekylernes form og facon.

Oftentimes kan små forskelle i molekylernes struktur medføre store forskelle i biologisk aktivitet. Antibiotika som cephalexin og cefadroxil har for eksempel en høj biotilgængelighed, dvs. at de let optages af organismen via peptidtransportøren, mens cefamandol og cephalothin ikke transporteres gennem tarmvæggen af transportøren og derfor har lav biotilgængelighed. Forskellen er på sin vis forunderlig, fordi grundstrukturen af de fire antibiotika er meget ens.

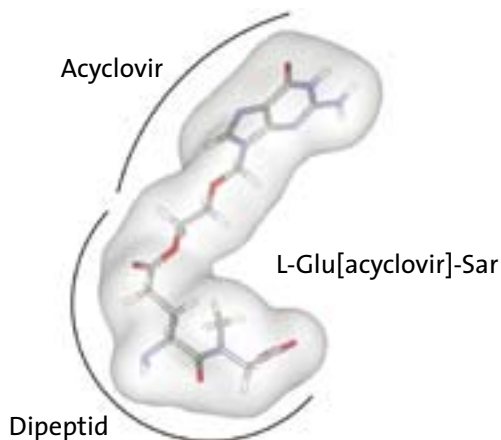
For at gøre mystikken fuldkommen kan man vise, at alle fire stoffer genkendes af transportøren og bindes til den. Men de to antibiotika med høj biotilgængelighed har tilsyneladende nogle strukturelle egenskaber, som gør, at netop de transporteres gennem tarmvæggen. Det er ikke tilfældet for cefamandol og cephalothin, selv om de også bindes til transportøren. De to antibiotika sidder muligvis fast i proteinet og spærrer dermed for transport af andre stoffer.

Små, men vigtige forskelle

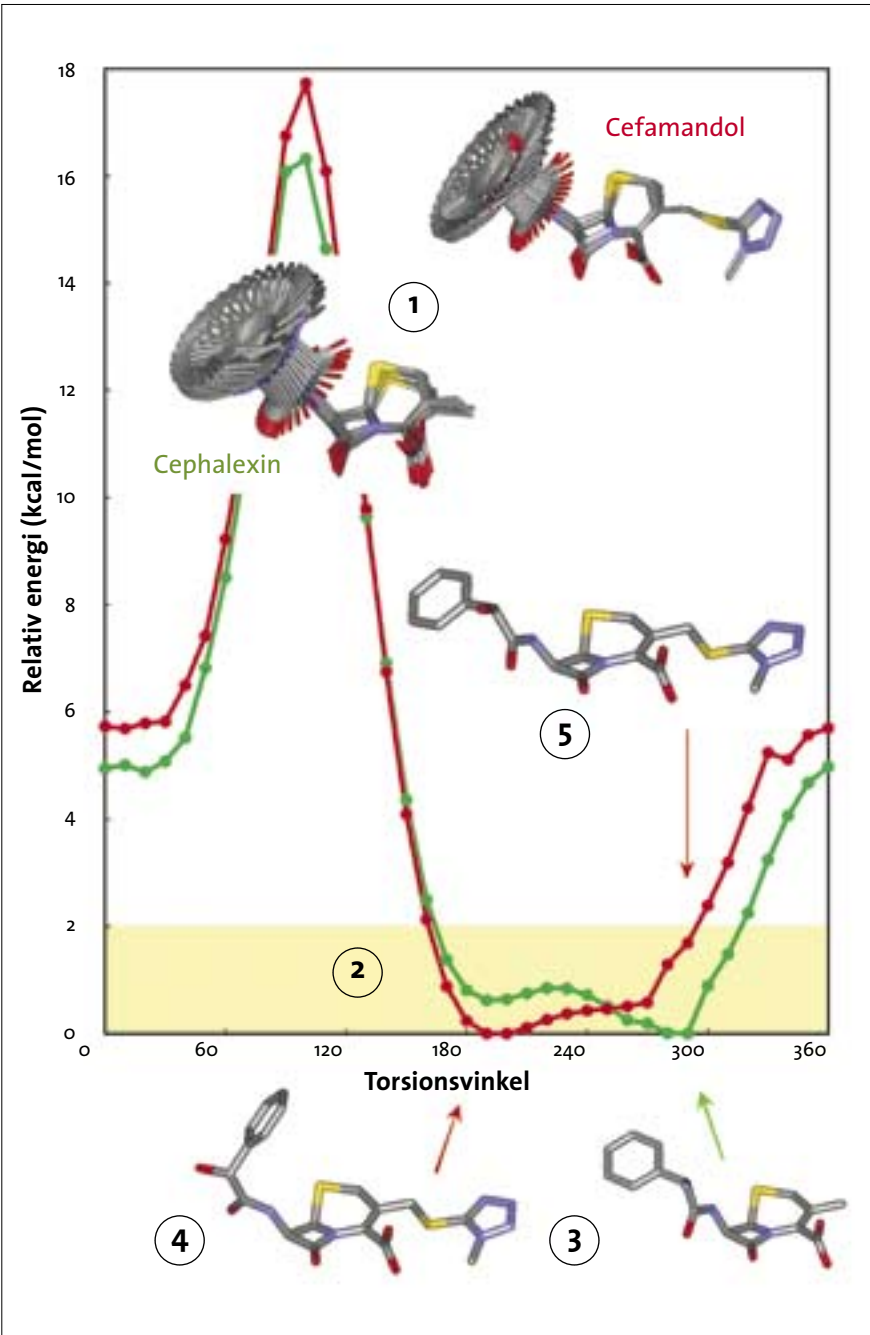
Vi har sammenlignet de fire antibiotika ved hjælp af vore computerprogrammer, og analysen viser, at der kun er små forskelle imellem molekylerne - forskelle, som umiddelbart virker ubetydelige. Men analysen peger også på, at de små forskelle måske netop er årsagen til stoffernes vidt forskellige biotilgængelighed.

Efter at have identificeret forskellene mellem de molekyler, som transporteres, og de som ikke bliver sendt gennem tarmvæggen, kan den opnåede viden udnyttes til at designe nye lægemiddelstoffer, som kan smugles ind i organismen via peptidtransportøren.

Alle de fire molekyler har begrænset fleksibilitet på grund af



3D-figur af molekylet $\text{Glu[acyclovir]-Sar}$, som er en kombination af et peptid med to aminosyrer og lægemiddelstoffet acyclovir, der bruges til behandling af herpes.



For alle de undersøgte antibiotika genereres mange forskellige konformationer; deres relative energi er her vist for cefamandol og cephalixin (1). Kun en lille del af energiprofilen er dog interessant (2). Cephalixin med høj biotilgængelighed foretrækker en udstrakt konformation (3), mens cefamandol med lav biotilgængelighed foretrækker en mere foldet konformation (4). Den konformation af cefamandol (5), som ligner cephalixin, og som formodes at passe til peptidtransportøren, er energetisk ufavorabel og er derfor kun til stede i meget ringe mængde.



Cand. pharm. Jon Våbenø er ph.d.-studerende ved Universitetet i Tromsø i Norge og var via et Marie Curie Fellowship tilknyttet DFU i første halvdel af 2003.



Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er adjunkt ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Bente Steffansen er lektor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Flemming Steen Jørgensen er docent ved Institut for Medicinskemi.

deres kemiske struktur, som er et bicyklisk β -lactam ringsystem med to forbundne ringe. Den stive struktur betyder, at den venstre sidekæde kun kan finde sig i et begrænset antal mulige orienteringer i rummet. Derfor kan molekylet kun antage få konformationer.

Ved en konformationsanalyse kan man bestemme, hvilke orienteringer som er mulige, og hvilke som er de mest favorabile. Ved nærmere eftersyn viser det sig her, at der er nogle principielle forskelle mellem cephalixin og cefadroxil, der transporteres gennem tarmvæggen, og cefamandol og cephalothin, som ikke transporteres.

De to antibiotika med lav biotilgængelighed foretrækker en mere foldet konformation end de to antibiotika med høj biotilgængelighed, som befinder sig bedst i en fuldstændig udstrakt konformation. Hvis cefamandol eller cephalothin skal antage samme udstrakte konformation som cephalixin og cefadroxil, kræver det, at der tilføres energi til molekylet for at tvinge det til at antage en facon, som energimæssigt er mindre fordelagtig for molekylet.

Vi har en hypotese om, at det netop er forskellen i de foretrukne konformationer, som er årsag til stoffernes forskellige transportegenskaber. Cephalixin og cefadroxil forekommer altså i den optimale konformation, og peptidtransportøren genkender umiddelbart de to molekyler og transporterer dem gennem

tarmvæggen. Cefamandol og cephalothin foretrækker en anden konformation, som måske nok genkendes af peptidtransportøren, men som ikke transporteres ud i blodet. Vi arbejder i øjeblikket på at bevise denne hypotese ved også at inddrage andre aspekter i konformationsanalysen.

Design af lægemiddelstoffer

Vi har anvendt ideen med at udnytte organismens peptidtransportører for at øge biotilgængeligheden af lægemiddelstoffet acyclovir, som bruges til behandling af herpes.

Metoden var at koble acyclovir sammen med et dipeptid. Resultatet var stoffet Glu[acyclovir]-Sar, som genkendes af peptidtransportøren. Desværre har senere studier vist, at stoffet ikke transporteres igennem membranen af transportøren, men tværtimod spærrer vejen for andre stoffer.

Hensigten med konformationsanalyserne er således, at man allerede ved design af lægemiddelstoffer til peptidtransportøren kan forudsige egenskaberne. Er det designede stof en inhibitor, som blokerer transportøren? Eller er der tale om et stof, som transportøren forveksler med nedbrudt føde, så den villigt smugler lægemiddelstoffet ud i blodet, hvor medicinen skal virke.

Fra nyrerne til blodet



Nye lægemidler, som udvikles til behandling af kræft eller HIV, er ofte små peptider, som skal cirkulere i en vis tid i blodet for at virke. I nyrerne bliver peptiderne enten udskilt med urinen eller returneret til blodbanen. Nyreceller kan bruges til at undersøge potentielle lægemiddelstoffers skæbne i nyrerne.

Af Silvina A. Bravo, Carsten Uhd Nielsen, Sven Frøkjær og Birger Brodin

Udviklingen af lægemidler til behandling af globale sygdomme som HIV og kræft er i dag i stort omfang baseret på peptider eller peptidlignende molekyler. Peptider er små proteindele, og de er sammensat af aminosyrer, som findes naturligt i kroppen.

Det medicinske potentiale er stort, men i praksis er der mange problemer med at anvende peptider som lægemiddelstoffer; de skal passere mave-tarmkanalen uden at blive nedbrudt, og når peptiderne kommer ud i blodet, skal de cirkulere i blodbanen længe nok til at kunne udøve deres virkning. Derfor er det vigtigt at finde ud af, hvordan peptider omsættes i maven, tarmene og nyrerne.

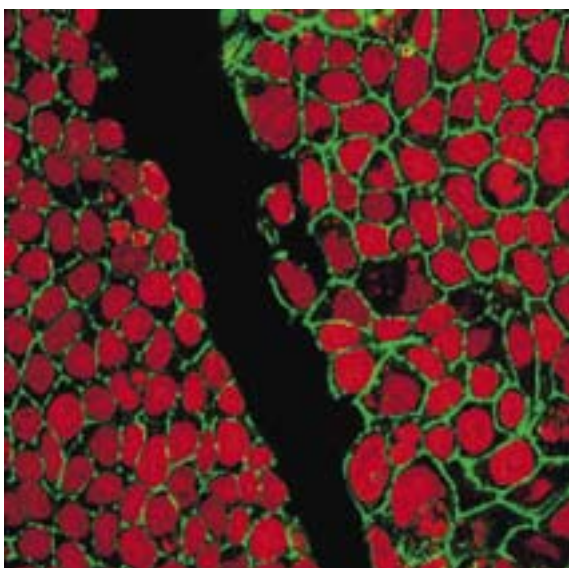
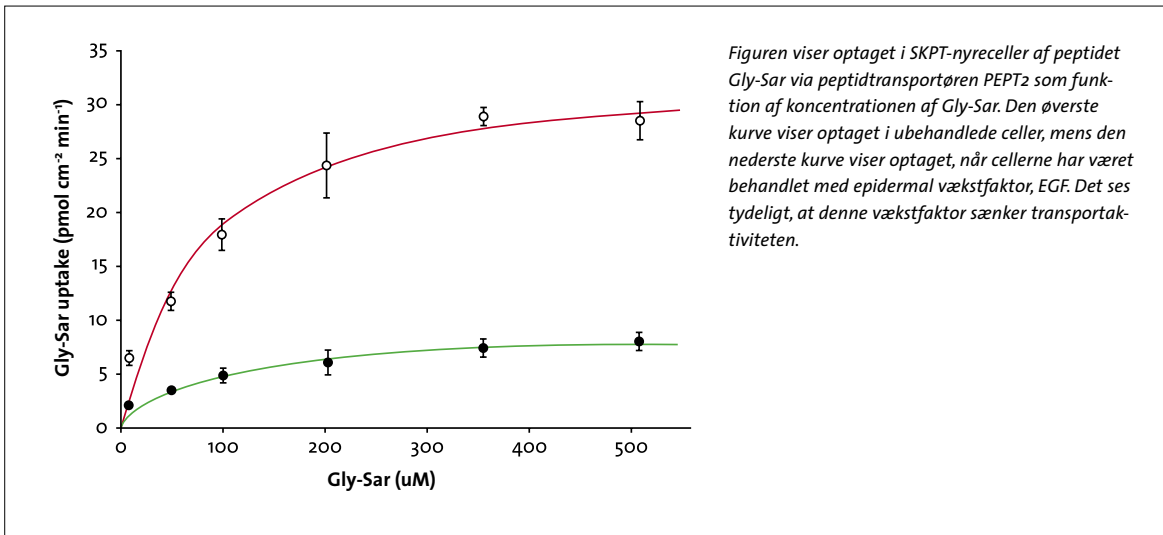
I nyrerne bliver peptider enten udskilt med urinen eller sendt retur til blodet. Om der sker det ene eller det andet, afhænger af lægemiddelstoffernes kemiske struktur.

Nyrerne har et naturligt system til at returnere små peptider til blodet. Det skyldes, at en stor del af proteinerne fra føden passerer tarmvæggen og kommer ud i blodet som di- og tripeptider, der indeholder to eller tre aminosyrer. Når nyrerne ekspederer de små peptider tilbage til blodet, udnyttes aminosyrerne i føden effektivt.

Nyrecellerne løser opgaven ved hjælp af to proteiner, der fungerer som transportører. Proteinerne kaldes h(uman)PEPT1 og hPEPT2. De genkender di- og tripeptider og sikrer, at peptiderne genoptages i kroppen fremfor at blive udskilt med urinen. For en lang række lægemiddelstoffer, der er baseret på peptider af samme størrelse, vil transportørerne have en væsentlig betydning for, hvor lang tid lægemiddelstoffer findes i blodbanen og dermed er i stand til at udøve deres terapeutiske virkning.

Cellelinie fra rottenyrer

Vi bruger en nyrecellelinie til at undersøge, hvordan di- og tripeptider optages i nyrerne for bagefter at blive returneret til blodet. En cellelinie består af celler, der kan vokse i laboratoriet, men som stadig har de egenskaber, som dens »forfædre« i kroppen havde. Vi har valgt en cellelinie, som er udviklet fra en rottenyre. Cellelinien hedder SKPT, og den danner kun én af de to naturlige transportører, proteinet PEPT2. Dermed kan vi undersøge PEPT2, uden at den anden transportør i nyrerne, PEPT1, påvirker vore observationer og resultater.



Et optisk snit af et monolag af SKPT-celler optaget med konfokal mikroskopi. Den grønne farve stammer fra en farvning af cellemembranen. Den røde farve stammer fra cellekernerne, der er mærket med propidiumiodid. Cellerne til venstre er dyrket i vækstmedium uden EGF, mens cellerne til højre er dyrket i vækstmedium tilsat EGF. Det ses, at de behandlede og ubehandlede celler er meget forskellige.

Alligevel er det både nødvendigt og vigtigt, at man tester sin valgte model grundigt. Derfor har vi karakteriseret transportørens kapacitet i cellerne ved at anvende et radioaktivt dipeptid, Gly-Sar, som transportøren genkender.

Hormoner og vækstfaktorer

Nyrecellernes evne til at returnere di- og tripeptider til blodet påvirkes af koncentrationerne af hormoner og vækstfaktorer i nyrerne, som kan variere i forhold til alder og køn samt i forbindelse med sygdom. Derfor ønsker vi at opklare, hvordan hormoner og vækstfaktorer påvirker transportørernes evne til at sikre en effektiv genoptagelse i blodet af di- og tripeptider. Epidermal vækstfaktor (EGF) er specielt interessant i denne sammenhæng, fordi nyresygdomme ofte medfører store svingninger i nyrens EGF-niveau. Cellelinien har traditionelt været dyrket med store mængder af EGF i dyrkningsmediet.

I bestræbelserne på at undersøge hvordan dyrkningsmediets indhold af vækstfaktorer påvirker transportkapaciteten af PEPT2, har vi målt, hvilken effekt EGF har på transportøren. Målingerne viste, at nyrecellerne optager væsentligt mere af det radioaktivt

mærkede peptid, når der ikke er EGF tilstede i dyrkningsmediet. Det betyder, at EGF nedregulerer transporten af di- og tripeptider til blodet i den levende nyre.

Ved at fjerne denne vækstfaktor fra dyrkningsmediet får man altså en cellelinie med en høj transportkapacitet, hvilket gør cellelinien langt mere brugbar til studier af peptidtransport. Det kan f.eks. være undersøgelser af, hvilke typer peptider og lægemiddelstoffer transportøren er i stand til at optage og returnere til blodbanen.

EGF påvirker cellerne

Forskellige koncentrationer af EGF i vækstmediet bevirker, at transportkapaciteten via PEPT2 varierer. Jo højere niveauer, jo mindre bliver nyrecellernes evne til at optage di- og tripeptider. Desuden ændrer tilstedeværelsen af vækstfaktoren nyrecellernes udseende. Uden EGF i vækstmediet er cellernes struktur ensartet, hvorimod celler behandlet med EGF varierer i størrelse og form. Vi har tidligere vist, at en tilsvarende relation gælder for reguleringen af den anden transportør i nyrerne, PEPT1. Det er således klart, at EGF har indflydelse på, hvor effektivt di- og tripeptider og peptidlignende lægemiddelstoffer genoptages i nyrerne og returneres til blodet. Derfor vil koncentrationerne af EGF i nyrerne sandsynligvis kunne påvirke den terapeutiske effekt af di- og tripeptider og lignende lægemiddelstoffer.

Model for nyrerne

SKPT cellerne er sandsynligvis en brugbar model for, hvordan hormoner og vækstfaktorer påvirker PEPT2's evne til at sikre en effektiv genoptagelse i blodet af di- og tripeptider. Men det er stadig uafklaret, hvordan EGF sænker cellernes evne til at genoptage di- og tripeptider, og spørgsmålet er i øjeblikket genstand for videre undersøgelser i vort laboratorium. De resultater, man opnår med cellelinier, skal altid tolkes med forsigtighed, og derfor må resultaterne senere evalueres i naturligt væv.

Desuden er det uklart, i hvilke sygdomssituationer koncentrationen af EGF i nyrerne ændrer sig. Man har foreslået, at det sker, når nyrenes naturlige barriere er beskadiget. EGF kan i så fald stimulere gendannelsen af barriereegenskaberne.

Da niveauet af hormoner og vækstfaktorer kan variere i forhold til alder og køn samt i forbindelse med sygdom, skal man kunne koble ændringerne til specifikke sygdomstilstande. Vi vil i fremtiden undersøge, hvordan en række sygdomme påvirker nyrenes evne til at returnere peptidbaserede lægemiddelstoffer til blodbanen.

Vores studie er det første af sin art, der rent faktisk viser en fysiologisk/pathologisk regulering af PEPT2. Samtidig har resultaterne åbnet op for, at vi og andre forskere nu har en langt mere anvendelig cellelinie til rådighed til transportstudier – simpelt hen ved at udelade tilsætning af vækstfaktorer til dyrkningsmediene.



Cand. pharm. Silvina A. Bravo er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er adjunkt ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.



Lic.scient. Birger Brodin er lektor ved Institut for Farmaci.

Effektiv analyse af binding mellem proteiner og lægemiddelstoffer

En simpel analytisk metode er velegnet at undersøge lægemiddelstoffers binding til proteiner i blodet – en binding, som spiller en central rolle for mange lægemidlers omsætning i kroppen. Kapillarelektroforese muliggør studier af bindingsfænomener, som det tidligere har været vanskeligt at undersøge.

Af Jesper Østergaard, Claus Selch Larsen, Christian Schou og Niels H. H. Heegaard

Medicinalindustrien syntetiserer i dag et meget stort antal potentielle lægemiddelstoffer, og det stiller krav om udvikling af hurtige og automatiserede analysemetoder til at karakterisere stoffernes farmakologiske egenskaber.

Et af de centrale spørgsmål, når man skal vurdere nye lægemiddelkandidater, er stoffernes skæbne i kroppen – en skæbne, som i høj grad afhænger af proteinbindingen i blodet: Binds lægemiddelstoffet til proteinerne? Frigives det igen? Og hvor hurtigt sker frigørelsen?

Generelt er det kun den frie andel af et lægemiddelstof i blodet, som kan passere cellemembraner, udøve farmakologisk effekt og blive udskilt gennem nyrerne. Derfor er kendskab til proteinbinding i blodet på et tidligt trin i lægemiddeludviklingen en stor fordel, når man søger at identificere de stoffer, som har de største chancer for at blive til færdige lægemidler.

Analysen med kapillarelektroforese har et stort potentiale i forbindelse med bindingsstudier. Her beskriver vi principperne bag analysemetoden, som har vist sig særdeles anvendelig til at studere lægemiddelstoffers binding til proteiner i blodet.

Bindingsstudier

Under visse omstændigheder kan kapillarelektroforese anvendes til at studere, hvordan to stoffer interagerer med hinanden. Her er det et krav, at mindst et af de vekselvirkende molekyler bærer

en elektrisk ladning, samt at interaktionen medfører et skift i den hastighed, som et af molekylerne bevæger sig med i det elektriske felt.

Når betingelserne er opfyldt, er det muligt at anvende kapillarelektroforese til at analysere lægemiddelstoffers binding til de proteiner, som findes i blodet. Vi har brugt metoden til at studere reversibel binding mellem lægemiddelstoffer og proteinet albumin, som er et naturligt forekommende bæremolekyle i humant blod.

Forsøgene bygger på følgende procedure: Først fremstilles en prøve, som indeholder albumin og det lægemiddelstof, hvis binding vi ønsker at studere. Så indføres 50-200 nanoliter af prøven i kvartsrøret. Herefter påføres der spænding over kapillaret, og adskillelsen af frit lægemiddelstof fra frit albumin og komplekser af albumin og lægemiddelstoffet begynder.

Et typisk eksperiment tager mellem 5 og 25 minutter afhængig af lægemiddelstoffets vandringshastighed i røret. Metoden er en hurtig og enkel måde at studere lægemidlers binding til plasmaproteiner på. Man kan sammenligne med en traditionel ligevægtsdialyse, hvor forsøgene varer mellem 6 og 20 timer. Samtidig kræver dialyseforsøg et langt større prøvevolumen.

Desuden er bindingsstudier ved kapillarelektroforese mindre arbejdstunge. Separation af frit lægemiddelstof fra protein og kompleks samt bestemmelse af koncentrationen af frit lægemiddelstof sker i ét integreret trin. Den største ulempe ved metoden er en lav følsomhed, som skyldes begrænsninger i detektion med ultraviolet lys. Anvendelse af mere følsomme detektionsmetoder kan afhjælpe denne begrænsning for flere typer af stoffer.

Fokus på gigt

Kapillarelektroforese er indtil nu især blevet anvendt til at bestemme binding mellem lægemiddelstoffer og plasmaproteiner, og der har overvejende været tale om studier af velkendte stoffers bin-

KAPILLARELEKTROFORESE

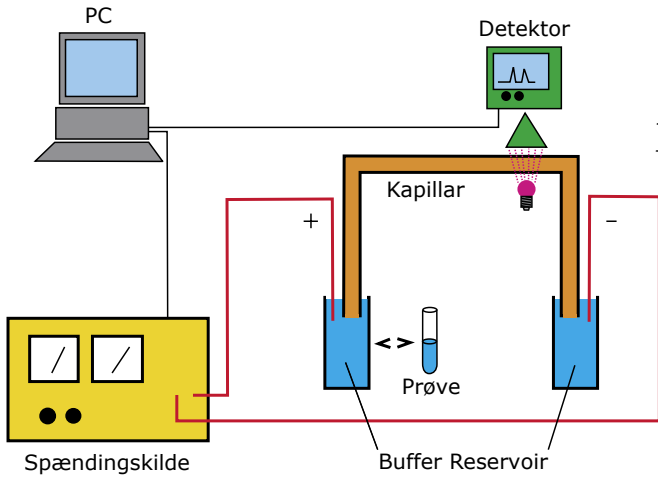
Elektroforese adskiller elektrisk ladede molekyler i en blanding. Metoden bygger på bevægelse af ioner i et elektrisk felt. Når en spændingsforskel påføres over to elektroder, vil ionerne bevæge sig i retning mod den modsat ladede elektrode. Deres hastighed afhænger af molekylernes ladning og størrelse, og derved kan forskellige ioner separeres. Små molekyler med høj elektrisk ladning bevæger sig hurtigere i det elektriske felt end store molekyler med lav elektrisk ladning.

Kapillarelektroforese er en effektiv udgave af metoden, som anvendes til adskillelse af komplekse stofblandinger. I modsætning til traditionel elektroforese, hvor ionerne bevæger sig gennem en gel, foregår separationen i en væske. Det gør, at systemet er meget velegnet til at simulere bindinger mellem molekyler i blodet. Separationen finder sted i tynde bufferfyldte kvartsrør, kapillærer,

som typisk er 25-75 cm lange og har en indre diameter på 25-75 µm. Rørets dimensioner gør, at en meget højt elektrisk feltstyrke kan anvendes, og samtidig skaber kvartsoverfladen en væskestrøm gennem røret, som fører alle stofferne i prøven hen mod den negative elektrode, hvor de detekteres.

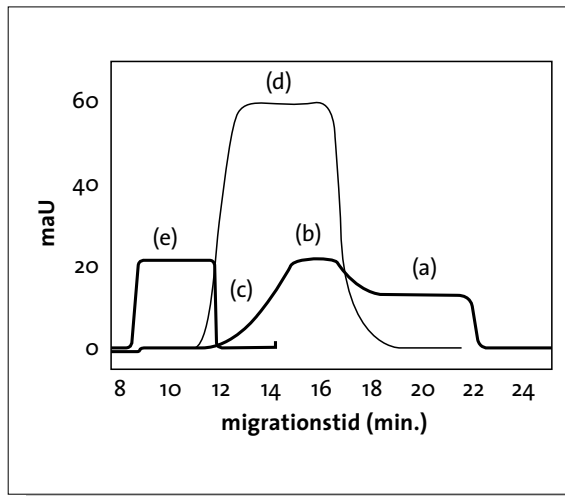
Positivt ladede ioner bevæger sig hurtigt hen til den negative elektrode, mens negativt ladede ioner stritter imod og når senere hen til elektroden. Ionernes størrelse og ladning afgør, hvor hurtigt de kommer hen til detektoren.

Detektionen sker normalt ved hjælp af ultraviolet lys, som sendes ind i røret gennem et vindue. Når et stof, som absorberer lys ved den anvendte bølgelængde, passerer vinduet, opstår der et absorptionsignal, som er proportionalt med koncentrationen af stoffet.



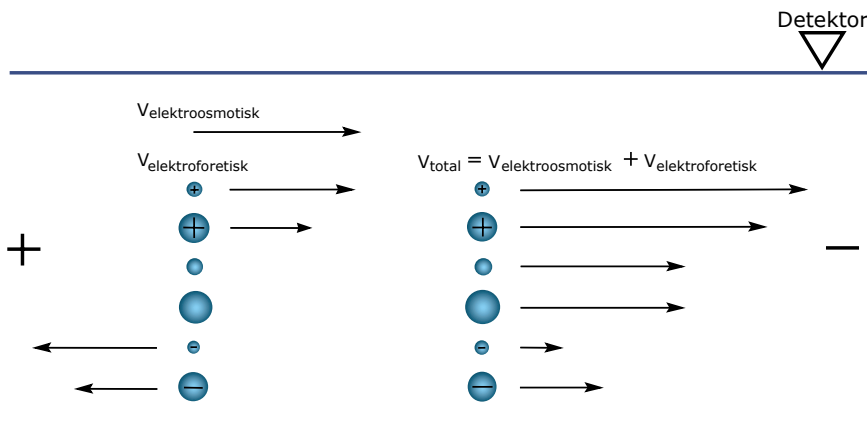
Forsøgsopstillingen til kapillarelektroforese: Kvartskapillaret har en indre diameter på 50 µm og en ydre diameter på 365 µm. Detektion med ultraviolet lys foregår gennem et vindue i kapillaret.

ding til plasmaproteiner, som har bekræftet eksisterende viden og dermed vist metodens egnethed. Men med de fordelagtige egenskaber såsom hurtighed, automatiserbarhed og meget små prøvemængder må det forventes, at kapillarelektroforese fremover vil blive et vigtigt værktøj til at studere binding mellem lægemiddelstoffer og receptorer. Metoden er især velegnet til undersøgelser af stoffer, som er ustabile i opløsning, eller som kun kan fremskaffes i små mængder. På Danmarks Farmaceutiske Universitet er et forskningsprojekt i gang, hvor kapillarelektroforese anvendes til at frembringe viden om lægemiddelstoffers vekselvirkninger med de proteiner, som findes i knæled. Målet er at forbedre behandlingen af forskellige giftformer.



Binding af lægemiddelstoffet warfarin til plasmaproteinet albumin studeret ved kapillarelektroforese. UV-signalet for warfarin er afbildet med en tyk linje, signalet fra albumin er afbildet med en tynd linje (d). Albumin er et meget større molekyle end warfarin; det bevirker, at binding af warfarin til albumin ikke påvirker den hastighed, hvormed albumin bevæger sig i kapillaret. Bundet warfarin vandrer med samme hastighed som albumin, frit warfarin er længere tid om at nå detektoren.

Der observeres to plateauer for warfarin (a og b). Højden af plateauet inden i albuminsignalet (b) er et udtryk for den totale warfarin koncentration i den analyserede prøve, i dette plateau er bindingslignevægten mellem warfarin og albumin opretholdt. Plateauet udenfor albuminsignalet (a) skyldes frit warfarin, højden er proportional med den fri warfarin koncentration i prøven. Forholdet mellem UV-signalets størrelse ved de to plateauer giver den fri andel af warfarin (ca 60%) i prøven og beskriver dermed bindingen mellem de to molekyler. Plateauhøjden (b) kan som oftest ikke bestemmes direkte og bestemmelse af den frie fraktion sker ved hjælp af en warfarinopløsning uden albumin med samme koncentration som prøven (e). Den faldende warfarin koncentration i området (c) skyldes, at bindingslignevægten ikke kan opretholdes på grund af tilførsel manglende warfarin.



Separationsprincippet i kapillarelektroforese. Hastigheden af molekyllernes bevægelse i kapillarrøret bestemmes af to bidrag: Strømmen af væske gennem kapillaret, plus bidraget for ladede molekyler på grund af deres vandring i et elektrisk felt. Længden af pilen indikerer den hastighed, molekylerne bevæger sig med. Retningen af pilen viser bevægelsens retning. Væskestrømmen, det elektroosmotiske flow er større end hastigheden af den elektroforetiske vandring, hvilket sikrer, at alle molekylerne bevæger sig hen mod detektoren.



Ph.d. Jesper Østergaard er adjunkt ved Institut for Analytisk Kemi.



Dr.pharm. Claus Selch Larsen er professor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Christian Schou er gruppeleder ved Afdeling for Autoimmunologi og Immunologisk udvikling, Statens Serum Institut.



Dr.med. Niels H. H. Heegaard er overlæge ved Afdeling for Autoimmunologi og Immunologisk udvikling, Statens Serum Institut samt adjungeret professor i analytisk kemi ved Karlstad Universitet, Sverige.

På opdagelse i grænsefladen

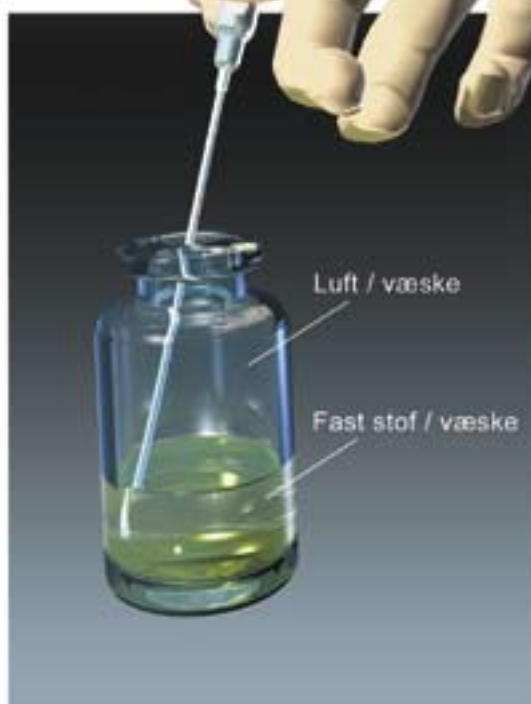
Proteiner i lægemidler sætter sig ofte på emballage med risiko for, at patienten får en utilstrækkelig dosis. Bedre materialekendskab samt tilsætning af hjælpestoffer til lægemidler kan eliminere eller formindske problemet.

*Af Susanne Møllmann, Ulla Elofsson, Marco van de Weert,
Jens Thostrup Bukrinsky og Sven Frøkjær*

Proteiner og peptider udgør i dag de aktive stoffer i en anseelig andel af alle lægemidler. Ofte er der tale om hormoner som insulin og væksthormon, som kroppen selv danner, og lægemidlerne har derfor en meget specifik virkning selv ved lave koncentrationer. Netop fordi man anvender lave koncentrationer, er det vigtigt, at patienten får den tilsigtede mængde lægemiddelstof, samt at proteinet er biologisk aktivt. Derfor tager man ved formulering og emballering af lægemidlet hensyn til processer, som kan føre til mængdetab eller biologisk inaktivering.

Proteiner gives normalt som injektionspræparater,

Tilgængelige grænseflader i et injektionspræparat.



og her har proteiner tendens til at sætte sig på infusionsposer, hætteglas og ampuller med det resultat, at mængden af aktivt lægemiddelstof formindskes. For nogle proteiner inaktiveres helt op til 80 procent af indholdet i emballagen, hvilket naturligvis er uacceptabelt.

Der forskes derfor løbende i nye materialer og hjælpestoffer, som kan forhindre uønskede reaktioner mellem proteiner og de typer af emballage og medicinsk udstyr, som lægemidlet kommer i kontakt med.

Proteiner og grænseflader

Proteiner består af både hydrofile (vandelskende) og hydrofobe (vandskyende) aminosyrer, og det gør dem grænseflade-aktive af natur. En grænseflade opstår, når en opløsning kommer i kontakt med et fast stof, en gas eller en væske, som ikke er blandbar med opløsningen.

Proteiner i opløsninger søger normalt mod grænsefladerne, hvor de akkumuleres, hvilket kaldes for adsorption. De hydrofile aminosyrer i proteinet vil helst befinde sig i vandet, mens de hydrofobe aminosyrer søger at undgå vandet, f.eks. ved at søge mod grænsefladen mellem vand og fast stof.

Vekselvirkninger mellem hydrofobe aminosyrer og grænseflader er den vigtigste årsag til, at proteinerne adsorberes til grænseflader, men også tiltrækning mellem modsat rettede ladninger på protein og grænseflade har betydning. Interaktionen mellem protein og grænseflade er normalt stærkest ved meget hydrofobe grænseflader som luft, silikone eller Teflon, der virker som magneter på de hydrofobe aminosyrer i proteinet. Hydrofile grænseflader har egenskaber, der minder om vands egenskaber, og skal derfor konkurrere med den vandige opløsning om at tiltrække proteinerne.

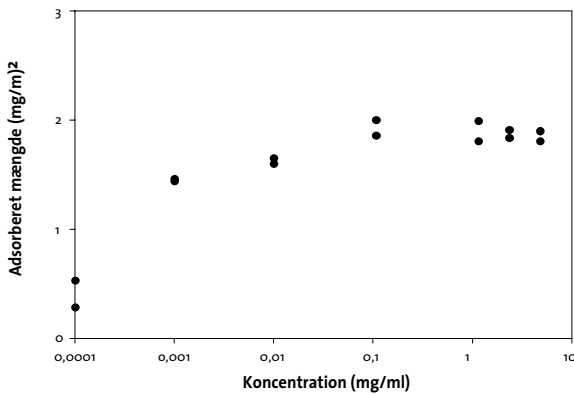
Proteiner består af en kæde af aminosyrer, som er foldet sammen i en kompliceret tredimensionel struktur, som er nødvendig for at få den ønskede virkning i kroppen. Når proteiner kommer i kontakt med hydrofobe grænseflader, sker det ofte, at deres rummelige struktur ændres for at øge antallet af hydrofobe aminosyrer på overfladen og derved forbedre interaktionen med grænsefladen.

I værste fald kan udfoldning af nogle få proteiner på en grænseflade have en autokatalytisk virkning på resten af proteinerne i opløsningen, fordi udfoldningen øger størrelsen af det tilgængelige hydrofobe areal, hvorefter flere molekyler søger mod området med de allerede udfoldede proteiner.

Dét kan i sidste ende føre til dannelse af større aggregater af biologisk inaktive proteiner. Aggregater er uønskede i lægemidler, ikke blot fordi de ofte er biologisk inaktive, men også fordi aggregaterne kan føre til tilstopning af nåle og katedre. Desuden kan man forestille sig, at kroppens immunforsvar aktiveres som reaktion på den ukendte form af proteinet.

For injektionspræparater er der flere problematiske grænseflader i det færdige produkt; mellem væske og emballage samt mellem

Adsorptionsisoterm for human insulin



Figuren viser en adsorptionsisoterm for adsorption af insulin til overfladen ved forskellige koncentrationer af insulin

væske og luft. Akkumulation ved grænsefladerne kan forhindres eller formindskes ved at udvælge hjælpestoffer og emballage til lægemidlet med omhu.

Adsorption til overflader

Projektets formål er at studere adsorptionsprocessen nærmere samt at undersøge effekten af forskellige hjælpestoffer til at forhindre adsorption af proteiner. I forsøgene blev insulin anvendt som modelprotein og bl.a. Teflon til at skabe grænsefladen.

Insulin i opløsning befinder sig i en ligevægt mellem forskellige former bestående af individuelle molekyler (monomere) og komplekser af to molekyler (dimer), samt seks molekyler (hexamer). Monomeren er den mest hydrofobe form, fordi de hydrofobe aminosyrer eksponeres på overfladen. Hexameren er den mest hydrofile form, da de hydrofobe aminosyrer gemmes i kompleksets indre. Derfor er det sandsynligt, at det primært er monomerformen af insulin, som adsorberes til grænseflader.

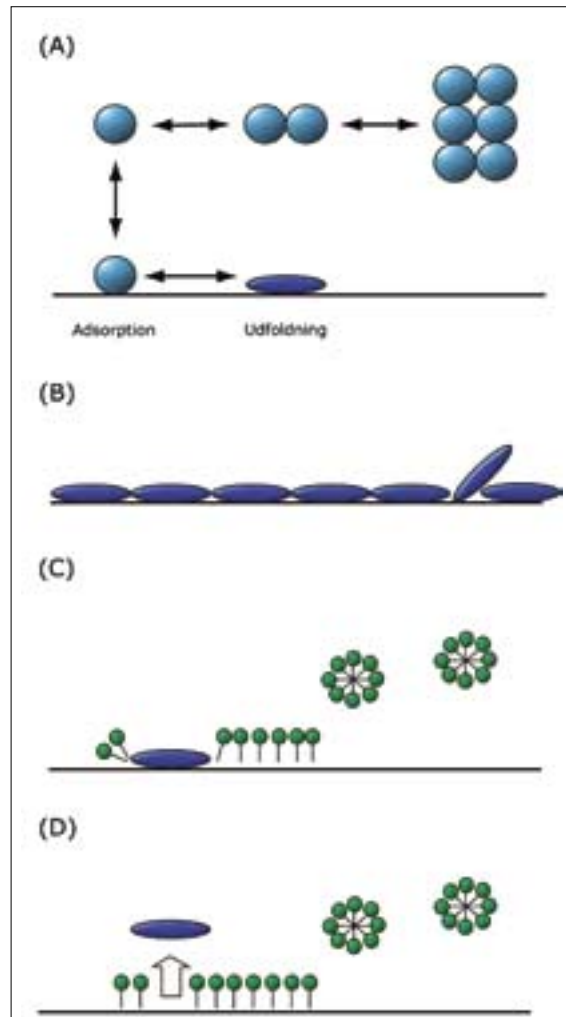
De foreløbige undersøgelser viser, at insulin adsorberes hurtigt og i stor mængde til Teflon. Efter en tid når mængden af adsorberet insulin et plateau, hvorefter ingen yderligere adsorption sker, selv om koncentrationen øges. Det tyder på, at hele overfladen er dækket med insulin, så der ikke er flere tilgængelige hydrofobe områder. Procentuelt adsorberes der mere insulin fra en opløsning med en lav koncentration end fra en opløsning med en højere koncentration.

Insulin og Teflon

Undersøgelserne viser, at insulin og Teflon ikke er den optimale cocktail inden for lægemiddelfremstilling. Der findes sandsynligvis andre materialer, hvis forlidelighed med insulin er bedre, som kan anvendes i stedet.

En anden mulighed er at udvælge hjælpestoffer, som kan forhindre adsorptionen. Hjælpestoffernes funktion kunne for eksempel være at stabilisere hexamerformen af insulin i opløsningen, som jo ikke adsorberes til Teflon.

Overfladeaktive hjælpestoffer vil også kunne anvendes, fordi de kan konkurrere med insulin om at adsorbere til Teflon-overfladen og i visse tilfælde ligefrem fortrænge insulin-molekylerne.



Samspil mellem insulin og en overflade af Teflon:

- A: Insulin i en opløsning er i ligevægt mellem individuelle molekyler samt komplekser med to og seks molekyler. Det er sandsynligvis de individuelle insulinmolekyler, som adsorberes til grænseflader og efterfølgende udfoldes.
- B: Udfoldede insulinmolekyler dækker hele overfladen. Jo lavere koncentrationen i opløsningen er, des større procentdel af den samlede mængde insulin adsorberes til overfladen.
- C: Overfladeaktive hjælpestoffer kan dække overfladen og hindre adsorption af insulin.
- D: Overfladeaktive stoffer kan endda fjerne insulin, som allerede er adsorberet til overfladen.



Cand.pharm. Susanne Møllmann er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Ulla Elofsson er bitr. sektionschef for Läkemedels- och Livsmedelssektionen ved Ytkemiska Institutet AB i Stockholm.



Ph.d. Marco van de Weert er post.doc. ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Jens Thostrup Bukrinsky er ansat ved Novo Nordisk A/S.



Ph.d. Sven Frøkjær er Professor ved Institut for Farmaci.

OPTISKE METODER

Til studierne af interaktionen mellem insulin og Teflon anvendes forskellige optiske metoder, blandt andet ellipsometri. Et ellipsometer måler polariseringen af lys, som reflekteres fra en overflade. Da Teflon ikke er reflekterende i sig selv, er der udviklet en speciel Teflonlignende overflade, som reflekterer lys. Når insulin adsorberes til overfladen, ændres polariseringen af det reflekterede lys.

Skal alle børn med leukæmi have samme dosis medicin?

Prognosen for børn med den almindeligste form for leukæmi er blevet væsentligt forbedret i de sidste to årtier. Mere end 80 procent af børnene helbredes i dag. Billedet er fra Pædiatrisk Klinik II på Rigshospitalet.

I 50 år er lægemidlet prednisolon blevet brugt til at behandle leukæmi hos børn. En ny undersøgelse viser, at lægemidlet omsættes så ensartet hos patienterne, at det er tilstrækkeligt at fastsætte dosis efter barnets størrelse.

Af Kamilla Buchberg Petersen, Mette Rasmussen og Kjeld Schmiegelow

Traditionelt giver man enten samme dosis af et lægemiddel til alle patienter eller baserer doseringen på patienternes vægt eller overfladeareal.

For nogle lægemidler, der bruges i behandlingen af leukæmi hos børn, varierer omsætningen af stofferne i kroppen imidlertid fra barn til barn. Forskellen kan have betydning for risikoen for sygdomstilbagefald, og derfor har man individualiseret doseringen af disse lægemidler.

Men for en række af de vigtigste lægemidler, som anvendes i kemoterapien, er variationer i omsætningen aldrig blevet kortlagt. Derfor har vi udført en klinisk undersøgelse i samarbejde med Rigshospitalet, hvor vi har målt omsætningen af lægemidlet prednisolon hos børn med leukæmi.

Formålet var at vurdere, hvor stor forskel der er fra barn til barn, og om en eventuel forskel kan have betydning for, hvor godt behandlingen virker.

De fleste helbredes

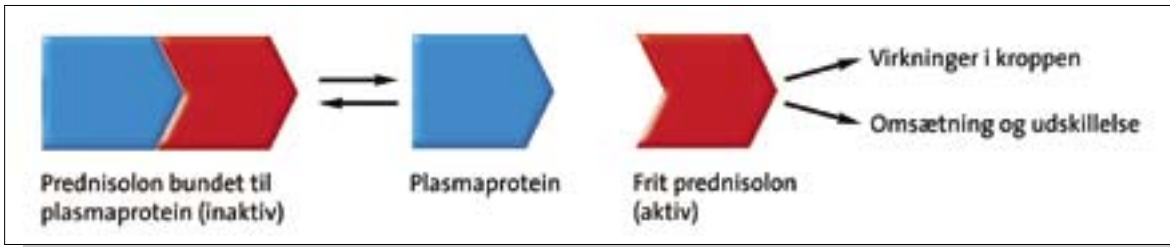
Børnene havde akut lymfoblastær leukæmi (ALL), som med 35 nye tilfælde om året i Danmark er den mest almindelige form for kræft hos børn. Behandlingen består primært af cellegiftige lægemidler, der gives i 2-3 år fra det tidspunkt, hvor diagnosen stilles.

Prognosen er forbedret væsentligt gennem de sidste 20 år, og i dag helbredes fire ud af fem børn. Den øgede overlevelse skyldes især, at den kemoterapeutiske behandling er blevet intensiveret. Desuden bruges kombinationsterapi, hvor flere lægemidler med forskellige virkningsmekanismer indgives samtidig for at sikre en maksimal effekt på kræftcellerne.

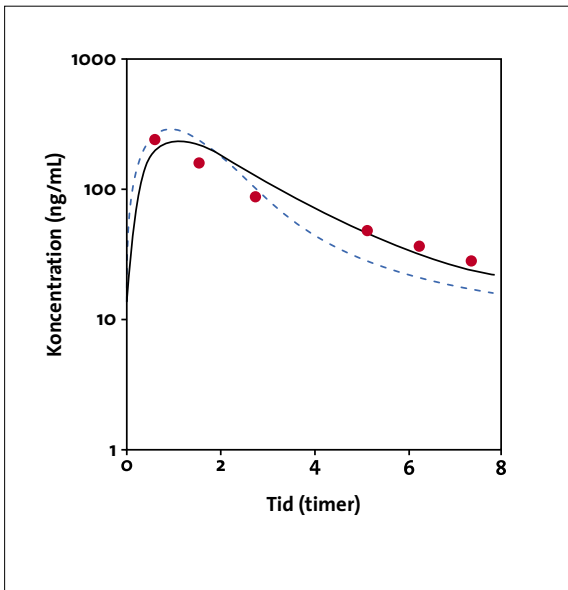
Prednisolon har været anvendt som led i behandlingen i 50

LÆGEMIDLET PREDNISOLON

Kroppens binyrebark producerer en type hormoner, der kaldes glukokortikoider, som har betydning for immunforsvaret og stofskiftet. Prednisolon er et syntetisk fremstillet glukokortikoid der, hvis det indgives i større mængder end kroppen normalt selv producerer, kan benyttes til behandling af sygdomme, hvor immunforsvaret er involveret. Det kan være ved visse former for gigt og leukæmi. Desuden gives lægemidlet efter en organtransplantation for at forhindre afstødning af det nye organ.



Kun frit prednisolon i plasma, der ikke er bundet til plasmaproteiner, er aktivt som lægemiddel.



Plasmakonzentrationen af frit prednisolon som en funktion af tiden hos en 11-årig pige med leukæmi. ••: målte plasmakonzentrationer i blodprøver fra patienten, —: beregnet plasmakonzentration for patienten, ----: beregnet plasmakonzentration for hele den undersøgte population af ALL-patienter.

fordeling og udskillelse hos børnene. De computermodeller, der benyttes til beregningerne, gør det muligt at bestemme omsætningen af prednisolon hos det enkelte barn samt at sammenholde resultaterne med hele populationen af ALL-patienter.

Herved er det muligt at vurdere, om specifikke faktorer hos børnene som alder, køn eller sygdommens sværhedsgrad har betydning for omsætningen af prednisolon. Desuden kan vi foretage simulationer, hvor computermodellen forudsiger plasmakonzentrationerne efter en ændring af dosis eller hos patienter, der f.eks. har nedsat nyrefunktion og dermed en langsommere udskillelse af lægemidler.

Dosis efter legemsoverflade

Undersøgelsen viste, at omsætningen af prednisolon varierede mindre end en faktor to og dermed for praktiske formål var stort set ens hos de 23 børn. Omsætningen var generelt noget lavere i sammenligning med tidligere udenlandske undersøgelser af børn, der behandles med prednisolon.

Den lille forskel i omsætning fra barn til barn betyder, at den nuværende dosering baseret på barnets legemsoverflade er tilstrækkelig til at opnå en ens eksponering for prednisolon hos alle børn. Individuel dosisjustering baseret på det enkelte barns omsætning synes derfor ikke at være aktuell for prednisolons vedkommende.

Det er imidlertid vist, at der er stor forskel på hvor følsomme de forskellige børns leukæmiceller er over for prednisolon, så der kan i fremtiden vise sig andre grunde til at en dosisjustering kan blive nødvendig.

På www.lk-online.dk kan der læses mere om prednisolon og andre lægemidler.

år, men trods den udbredte brug er vor viden om lægemidlets omsætning i kroppen hos børn begrænset. Man ved ikke, om nogle børn omsætter stoffet langsommere end andre, og heller ikke om det har betydning for, hvordan behandlingen virker.

Omsætning i kroppen

For at bestemme omsætningen af prednisolon i kroppen tog vi blodprøver hos 23 børn med leukæmi i alderen 2-15 år. Prøverne blev taget efter en dosis prednisolon, som svarer til den dosis, der normalt benyttes under de første fem ugers behandling. Til databehandlingen brugte vi særligt udviklede computermodeller, som gør det er muligt at nøjes med få blodprøver pr. barn.

I blodplasmaet findes prednisolon i en inaktiv form, hvor lægemidlet er bundet til plasmaproteiner, og i en aktiv form, hvor lægemiddelstoffet er frit. Stoffets binding til proteinerne afhænger af koncentrationen af prednisolon i plasmaet, og derfor varierer den procentdel af prednisolon, der er bundet til plasmaproteiner.

Det er derfor nødvendigt at bestemme koncentrationen af frit prednisolon i plasma for at kunne beregne stoffets optagelse,

LEUKÆMI ER BLODKRÆFT

Leukæmi skyldes, at knoglemarven producerer defekte hvide blodlegemer. De defekte blodlegemer deler sig uhæmmet og fortrænger de raske blodlegemer, hvorved knoglemarvens normale funktion undertrykkes. Der findes flere forskellige slags hvide blodlegemer og dermed også flere forskellige typer af leukæmi. Akut lymfoblastær leukæmi (ALL) er den hyppigste form for leukæmi hos børn og skyldes en defekt i de hvide blodlegemer, der kaldes lymfocytter.

FARMAKOKINETIK – LÆGEMIDLERS OMSÆTNING

Farmakokinetik beskriver lægemidlers skæbne i organismen; deres optagelse fra mave-tarm-kanalen til blodet, deres fordeling i kroppens væv samt deres omsætning og udskillelse i urin og afføring. Ved at måle koncentrationen af lægemiddel i blodprøver taget til forskellige tider kan man ved hjælp af matematiske modeller beregne lægemidlets optagelse, fordeling og udskillelse.

Hvis der er store forskelle fra patient til patient, kan det være en fordel at benytte individuel dosering. Det er typisk tilfældet, hvis effekten af lægemidlet er mindre hos de patienter, der udskiller det hurtigt, eller hvis lægemidlet kan give bivirkninger hos de patienter, der udskiller det langsomt.



Ph.d. Kamilla Buchberg Petersen har afsluttet sit ph.d.-studium ved Institut for Farmaci i 2003



Ph.d. Mette Rasmussen er professor ved Institut for Farmaci.



Dr.med. Kjeld Schmiegelow er overlæge ved Pædiatrisk Klinik II på Rigshospitalet.

Når kroppen overreagerer ved kronisk hjertesvigt

Ved hjertesvigt ændres blodcirkulationen, og kroppens små pulsårer overreagerer på en måde, der kan ende med at slå patienterne ihjel. En opklaring af mekanismerne kan føre til bedre medicinsk behandling af patienter med hjertesvigt.

Af Simon Trautner og Majid Sheykhzade

Hjertesvigt optræder med stigende hyppighed i befolkningen. Mellem 50.000 og 100.000 danskere skønnes at lide af sygdommen, som medfører øget sygelighed, nedsat livskvalitet og en betydelig overdødelighed. Risikoen for at dø af kronisk hjertesvigt inden for fem år svarer til risikoen ved mange almindelige kræftformer.

Hjertesvigt opstår oftest efter en blodprop i hjertet, der skyldes forkalkning af hjertets kranspulsårer. I det ramte område af hjertet går muskelvævet til grunde og erstattes af bindevæv, som ikke bidrager til hjertets sammentrækning. Hvis skaden er tilstrækkelig stor, kan hjertet ikke længere opretholde sin pumpefunktion. Resultatet er, at den udpumpede mængde blod mindskes, så blodtrykket falder.

Kroppen forsøger at kompensere for den mindskede blodforsyning til vævene ved at aktivere flere neurohormonale systemer inklusive det sympatiske nervesystem, som reagerer i nødsituationer. Det sikrer blodforsyningen til de vitale organer som hjernen, hjertet og nyrene.

Aktiveringen af stresssystemerne har to effekter. For det første øges mængden af blod, så hjertet fyldes bedre, og pumpefunktion-

nen forstærkes. For det andet sammensnøres de små pulsårer i de organer, som ikke er livsnødvendige, så blodgennemstrømningen mindskes. På den måde holdes blodtrykket oppe, og der bliver mere blod til at holde de vitale organer i gang.

En høj pris

Sammensnøringen af de små arterier, foregår ved sammentrækning af glatte muskelceller, der ligger som et tyndt cirkulært lag i arterievæggen. Når de glatte muskelceller udsættes for noradrenalin fra det sympatiske nervesystem, stiger koncentrationen af calciumioner i cellerne. Calciumionerne får proteiner i muskelcellerne til at trække sig sammen, hvorved cellerne forkortes, og arterien snøres sammen.

Desværre er sammensnøringen af kroppens arterier langt kraftigere end nødvendigt for at holde blodtrykket oppe. Resultatet er, at det svigtende hjerte skal arbejde hårdere for at pumpe blodet ud i kroppen, og hjertet øger derfor muskelmassen i de ikke-beskadigede dele. Det har en høj pris: Hjertet er jo selv en muskel, der har brug for mere blod, jo mere det skal arbejde. Blodet har i forvejen svært ved at komme gennem de forsnævrede kranspulsårer, og når muskelvæggen oven i købet fortykkes, bliver forsyningsvejen endnu trangere. Derfor kommer der mindre blod til hjertemusklen, og med tiden beskadiges den raske del af hjertemusklen, så hjertet bliver slapt og oppustet.

Samtidig ændres de elektriske impulser, som løber gennem hjertet, og det øger risikoen for at dø af en ondartet forstyrrelse af hjerterytmen.

Det meste af den medicin, der bruges til behandling af patienter med hjertesvigt, formindsker sammensnøringen af arterierne, så hjertets arbejde lettes. Medicinen helbreder ikke patienterne, men sygdommens udvikling forsinkes, så patienterne lever længere.

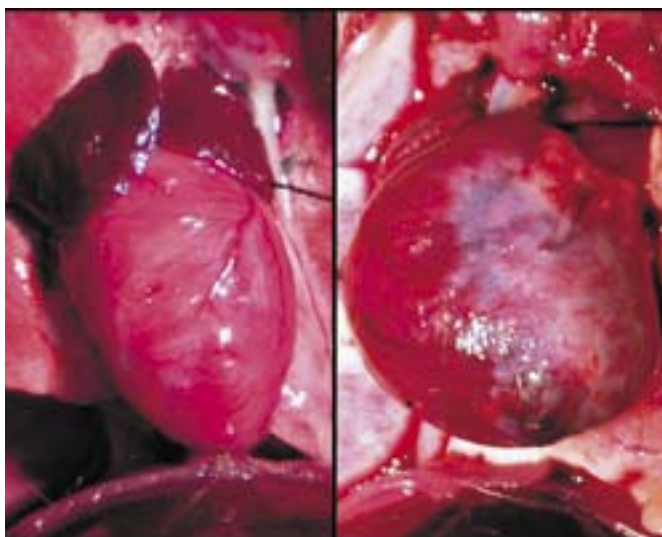
Fokus på mekanismen

Ny forskning tyder på, at hjertesvigt gør arterierne overfølsomme overfor noradrenalin, så de snører sig kraftigere sammen end normalt ved stimulation med stresshormonet. I den sammenhæng spiller arterierne i skeletmusklerne en central rolle, fordi en stor del af blodforsyningen til kroppen går til musklerne.

Derfor har vi sat fokus på samspillet mellem hjertesvigt, noradrenalin og arterierne i musklerne. Vi eksperimenterer ikke med arterier fra mennesker, fordi det kræver udtagning af store muskelprøver. I stedet bruger vi en meget anvendt rottemodel for hjertesvigt og blodpropper i hjertet.

Rotter med hjertesvigt

Inden forsøgene skal rotterne gennem en operation, der fremkalder symptomer, der svarer til hjertesvigt. Først bedøves dyrene, og et tyndt plasticrør føres ned i luftrøret. Plasticrøret kobles til en respirator, og den venstre kranspulsåre lukkes gennem et indsnit i venstre side af brystkassen. Brysthulen tømmeres for luft, og indsnittet sys sammen. Efter operationen får rotterne smertestil-



Til venstre ses et normalt rottehjerte. Til højre ses et rottehjerte, der er ramt af en stor blodprop for to måneder siden. Det ramte muskelvæv er erstattet med gråt bindevæv, og hjertet er stort og slapt.

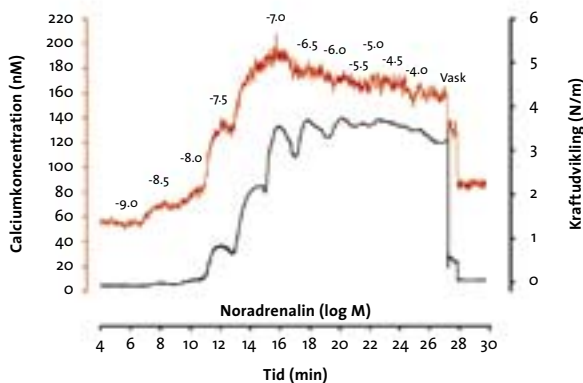


Læge Simon Trautner er ph.d.-studerende på Hjerteafdelingen på Rigshospitalet.



Ph.d. Majid Sheykhzade er adjunkt ved Institut for Farmakologi.

MÅLINGER I LABORATORIET



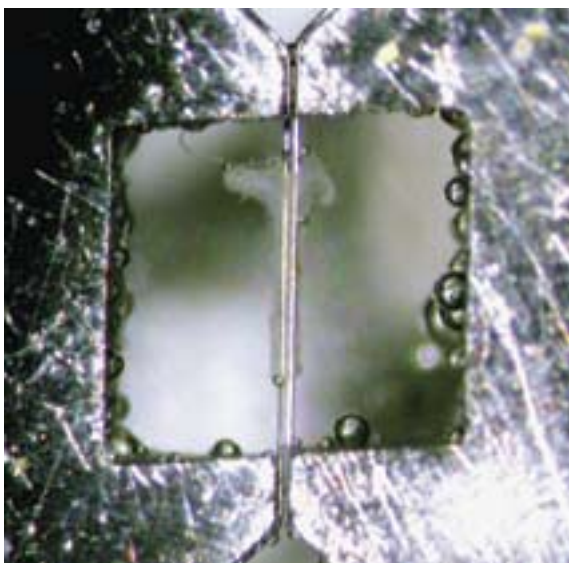
Samtidig måling af koncentrationen af frie calciumioner i de glatte muskelceller i en arterie (rød kurve) og kraftudviklingen (sort kurve) under tilsætning af stigende koncentrationer af noradrenalin. De to kurver følges nøje ad.

Når vi undersøger, hvordan noradrenalin påvirker arterier fra rotter med hjertesvigt, måler vi to ting samtidigt. Kraftudviklingen i de glatte muskelceller under sammentrækningen måles i myografen, mens ændringer i calciumkoncentrationen i cellerne bestemmes med lys. I den lysmålingerne inkuberes arterien med et fluorescerende farvestof, der bindes til frie calciumioner. Når farvestoffet har bundet calcium, absorberer det fortrinsvis lys med en kortere bølglængde end ubundet farvestof. Mængden af bundet farvestof måles med lys fra en xenonlampe, som sendes gennem filtre, der kun tillader lys med bølglængder på 340 og 380 nanometer at passere. Når arterien belyses, udsender den selv lys med en tredje bølglængde. Jo mere lys, den har absorberet, jo mere udsender den.

Arterien belyses skiftevis med de to bølglængder, og forholdet mellem styrken af det lys, som udsendes fra arterien ved den lange og den korte bølglængde, viser calciumkoncentrationen i de glatte muskelceller.

lende medicin, og efter et døgn er deres adfærd igen normal. Dødeligheden ved operationen er ca. 50 procent.

Efter otte uger bedøves rotterne igen. Gennem et indsnit på halsen føres et tyndt kateter ned i venstre hjertekammer, og hjertets pumpefunktion måles. Kun dyr med svær hjertesvigt inkluderes i studiet. Samtidig implanteres et væskefyldt kateter i halspulsåren. Kateteret føres ud gennem nakkeskindet, så det senere kan bruges til at udtage blodprøver til måling af hormonkoncentrationer, når rotten er vågen og ustresset.



En lille arterie er monteret i en myograf, som måler kraften under arteriens sammentrækning ved stimulation med hormoner.

Rotterne har de samme kliniske symptomer, de samme ændringer i hjertets pumpefunktion og de samme ændringer i hormonspejlet i blodet som patienter med hjertesvigt. Efter yderligere en uge aflives dyrene, og der udtages arterier fra musklerne i bagbenene. Arterierne er ca. 0,15 mm tykke og 2 mm lange. Arterierne spændes op på to 0,04 mm tykke metaltråde, som anbringes i et væskebad. Instrumentet kaldes en myograf.

Øget følsomhed

Nu kan vi måle kraftudviklingen i arterien under tilsætning af noradrenalin eller andre biologisk aktive stoffer til badet samtidigt med, at vi måler ændringer i koncentrationen af calciumioner i cellerne.

På baggrund af forsøgene har vi udviklet en hypotese om sygdomsmekanismen ved hjertesvigt. Hypotesen går ud på, at noradrenalin giver en for kraftig sammensnøring af arterierne, fordi følsomheden over for calciumioner i de glatte muskelceller i arterievæggen er øget.

Det er nemlig ikke kun koncentrationen af calcium i de glatte muskelceller, der bestemmer kraftudviklingen; flere enzym-systemer og signalsystemer i cellerne kan modificere samspillet mellem de proteiner, der får arterierne til at trække sig sammen. De sekundære systemer kan således ændre kraftudviklingen ved en given calciumkoncentration i cellerne. Hvis hypotesen er sand, vil der være tale om en hidtil ukendt mekanisme for den abnorme sammensnøring af arterierne ved hjertesvigt.

I givet fald vil det blive muligt at udvikle en helt ny gruppe lægemidler, der modificerer funktionen af de sekundære signalsystemer på en sådan måde, så følsomheden over for calcium normaliseres i de glatte muskelceller. Herved vil den alt for kraftige sammensnøring af arterierne ved kronisk hjertesvigt kunne afhjælpes, og det vil forbedre behandlingen til gavn for patienterne.

Kommunikation og stress

Kroppen ser stress som et faresignal, og hjertekredsløbet, immunforsvaret, fordøjelsessystemet, sanseapparatet og hjernen gør sig klar til at møde faren. Kommunikationen mellem nervesystemet og immunforsvaret er en af nøglerne til at forstå kroppens reaktion.

Af Tine Holst Kjeldsen, Erik Wind Hansen, Jens Dencker Christensen og Lise Moesby

Stress er en fysisk eller psykisk belastning, der fremkaldes af negative stimuli. Årsagerne kan være fysiske, mentale eller følelsesmæssige.

Fysisk stress kan opstå ved smerte, kulde, varme, sult, infektion, inflammation eller hård fysisk udfoldelse. Psykisk stress kan skyldes bekymringer, ensomhed, dårlige arbejdsforhold eller et dårligt parforhold. Stress gennem længere tid slider på organismen. Tit kommer advarselssignalerne i form af smerter og træthed. Hvis man ignorerer signalerne, risikerer man at blive rigtig syg.

Stress forstyrrer kroppens funktion, hvilket kroppen naturligt nok ønsker at undgå. Derfor flygter signalerne gennem organismen i en intens kommunikation, der gør alle kroppens systemer – hjertekredsløbet, immunforsvaret, fordøjelsessystemet, sanseapparatet

og hjernen – parat til at møde faren. Kroppens systemer kommunikerer med hinanden ved hjælp af neurotransmittere, hormoner, cytokiner og andre signalmolekyler.

Vi er interesserede i kommunikationen under den form for fysisk stress, der optræder i forbindelse med inflammation, en slags betændelsestilstand, som f.eks. kan opstå, når man får en infektion. En detaljeret forståelse af samspillet mellem nervesystemet og immunforsvaret kan forbedre mulighederne for at behandle inflammation.

Nerver og immunforsvar

Ved undersøgelserne kigger vi på et bestemt område i kroppen. Lige under hjernen ligger hypofysen, en lille hormonproducerende kirtel, som består af tre lapper, hvoraf den bagerste kaldes baglappen. Hypofysebaglappen kan anvendes som model for kommunikationen mellem det neuroendokrine system og immunforsvaret. Det neuroendokrine system består af nerveceller, som frigiver hormoner til blodet. Immunforsvaret er komplekst og består af mange typer celler lokaliseret forskellige steder i kroppen. Disse celler styres af signalmolekyler og bekæmper udefra kommende mikroorganismer som bakterier og virus.

Hypofysen er forbundet med hjernedelen hypothalamus via hypofysestilk. Lange nervetråde fra nervecellerne i hypothalamus munder ud i nerveterminaler i hypofysebaglappen. Den består bl.a. af gliaceller, der fungerer som støtteceller for nervecellerne.

I hypofysebaglappen frigives de to hormoner vasopressin og oxytocin. Hormonerne dannes i hypothalamus og transporteres via nervetråde til baglappen, hvor de udskilles fra nerveterminalerne og sendes ud i blodet. Vasopressin får nyrerne til at genoptage vand og holde på vandet i kroppen. Oxytocin er især kendt for at stimulere veerne under fødslen og bevirke, at mælken løber til brystet under amning.

Udskillelsen af vasopressin og oxytocin kan reguleres både i hypothalamus og i hypofysebaglappen. For tiden undersøger vi, om støttecellerne i baglappen er involveret i reguleringen af de to hormoner.

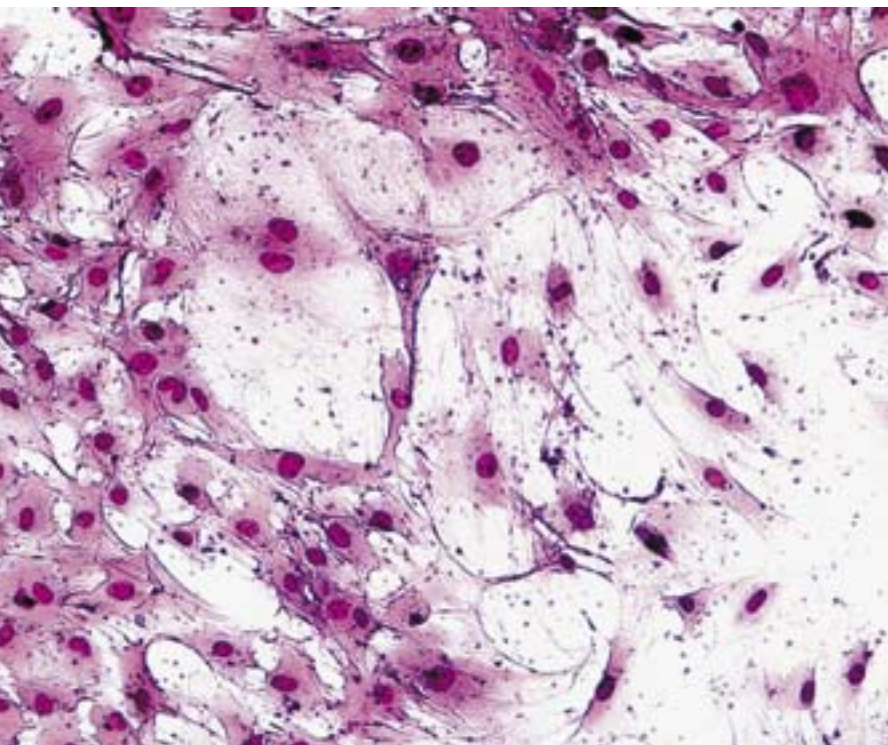
Når gliaceller stresses

Hypofysebaglappens støtteceller kaldes pituicytter, og de er den største population af celler i hypofysebaglappen. Cellerne omslutter de nerveterminaler, som udskiller vasopressin og oxytocin, og det menes derfor, at ændringer i deres funktion kan være med til at regulere frigivelsen af de to hormoner.

Pituicytterne kan isoleres, så man kan lave forsøg udelukkende med dem. Her er det muligt at stresser cellerne ved at påvirke dem med et stof, der efterligner en infektion og forårsager inflammation. Stoffet er et lipopolysaccharid, som indgår i en bestemt type bakteriers cellevæg, og som aktiverer immunforsvaret. I kroppen kan stoffet i store mængder medføre shock og alvorlig diarre, og i små mængder giver det feber.

Vi har sat fokus på, hvordan støttecellerne i hypofysen reagerer

Ved at tilsætte farvestoffer til pituicytter fra hypofysen kan man bedre observere dem. Cellerne er lyserøde, og cellekernerne kan ses inde i hver enkelt celle som en rød kugle.



FORSØG MED CELLEKULTURER



Vi bruger cellekulturer af pituicytter fra hypofysebaglappen til at simulere fysisk stress i form af inflammation, en slags betændelse, som bl.a. kan opstå i forbindelse med en infektion. Efter at have vokset og delt sig i 14 dage, blev cellerne stimuleret med et lipopolysaccharid, der fremkalder inflammation. Efter 24 timer blev dyrkningsmediet opsamlet, og vi målte den dannede mængde nitrogenoxid i dyrkningsmediet. På den måde fandt vi ud af, at pituicytterne kan danne gassen nitrogenoxid, når de stimuleres med lipopolysaccharid. Nitrogenoxid fungerer som et signalmolekyle i samspillet mellem nervesystemet og immunforsvaret.

Pituicytter dyrkes i brønde. Cellerne sidder fast på bunden, og brønden er fyldt op med dyrkningsmedie (rødt). Lipopolysaccharid kan tilsættes dyrkningsmediet og få cellerne til at frigive signalmolekyler, bl.a. nitrogenoxid.



Ph.d. Tine Holst Kjeldsen er amanuensis på Institut for Farmakologi.



Ph.d. Erik Wind Hansen er lektor på Institut for Farmakologi.



Ph.d. Jens Dencker Christensen er lektor på Institut for Farmakologi.



Ph.d. Lise Moesby er lektor på Institut for Farmakologi.



Hypofysen er en lille hormonproducerende kirtel, som består af tre lapper og ligger lige under den del af hjernen, der kaldes hypothalamus. Hypofysebaglappen kan anvendes som model for kommunikationen mellem det neuroendokrine system, der frigiver hormoner til blodet, og immunforsvaret.

på den type stress. Ved at bestemme cellernes funktion kan man opnå indsigt i de reaktioner, kroppen sætter i værk, når den stresses af en infektion.

Når immunforsvaret aktiveres af lipopolysaccharid, dannes og frigives gassen nitrogenoxid sammen med immunforsvarets signalmolekyler. Nitrogenoxid er ofte til stede under inflammation, hvor gassen og andre signalmolekyler modulerer udskillelsen af vasopressin og oxytocin.

Derfor undersøgte vi, om pituicytter ved hjælp af lipopolysaccharid kunne stimuleres til at frigive nitrogenoxid - og det kunne de. Dette muliggør, at pituicytter under inflammation kan modulere udskillelsen af de to hormoner vasopressin og oxytocin fra hypofysebaglappen, og dermed bidrage til kommunikationen mellem det neuroendokrine system og immunforsvaret.

Det vides, at lipopolysaccharid i den intakte organisme øger udskillelsen af vasopressin og oxytocin markant. En stigning i udskillelsen af vasopressin betyder bl.a., at kroppen sparer på vandet, hvilket er meget hensigtsmæssigt under en infektion. Derimod er en stigning i udskillelsen af oxytocin uhensigtsmæssig i den sidste del af graviditeten, da det øger risikoen for abort.

Selve mekanismen bag den øgede udskillelse af de to hormoner i forbindelse med lipopolysaccharid er stort set ukendt. Vi håber at kunne være med til at forklare dele af denne mekanisme ved hjælp af vores forskning. Når mekanismen er klarlagt, kan det danne grundlag for udvikling af nye lægemidler.

Struktur på allergiens signalveje



Et birketræ er et smukt syn, men det er ingen spøg at være allergisk overfor birkepollen.

Proteiner spiller hovedrollen i de mest udbredte allergiske reaktioner. En forståelse af, hvordan proteinerne udveksler signaler i cellerne, kan forbedre behandlingen af allergi, som rammer en femtedel af befolkningen.

Af Bente Vestergård, Osman Mirza, Jette Sandholm Kastrup og Michael Gajhede

Allergi er en folkesygdom. I den vestlige verden lider op mod en femtedel af befolkningen af luftbåren allergi, f.eks. over for birkepollen, græspollen eller støvmider. Allergiske sygdomme er i stadig vækst, så behovet for behandling er stigende.

Nogle allergikere kan helbredes ved hjælp af immunoterapi, hvor allergikeren udsættes for kontrollerede mængder af allergifremkaldende stoffer gennem en længere periode. Behandlingen virker dog ikke for alle og kan have alvorlige bivirkninger.

Derfor er det nødvendigt at forbedre den eksisterende behandling og udvikle nye behandlingsformer, hvilket kræver en detaljeret forståelse af baggrunden for allergiske sygdomme. Netop her står vi over for en stor udfordring. Selvom vi har en omfattende viden om allergi, forstår vi stadig ikke det centrale spørgsmål: Hvorfor bliver nogle mennesker allergiske over for visse allergifremkaldende stoffer?

Proteiner i nøglerolle

En ting er dog sikkert, nemlig at proteiner spiller en nøglerolle i de allergiske reaktioner. Det er proteiner, som genkender det allergifremkaldende stof – allergenet – og det er også proteiner, som medvirker til, at der opstår en allergisk reaktion.

Den strukturelle viden kan danne basis for design og udvikling af nye eller forbedrede lægemidler. En sådan strukturbaseret lægemiddelforskning er udpeget som et fokusområde på Danmarks Farmaceutiske Universitet.

Vi har gennem de seneste år arbejdet på at skabe forbedrede udgaver af allergener til brug i immunoterapi i nært samarbejde med ALK-Abello A/S. På basis af kendskab til tredimensionelle strukturer af allergener har vi designet varianter af allergenerne til sikker immunoterapi med et minimum af bivirkninger.

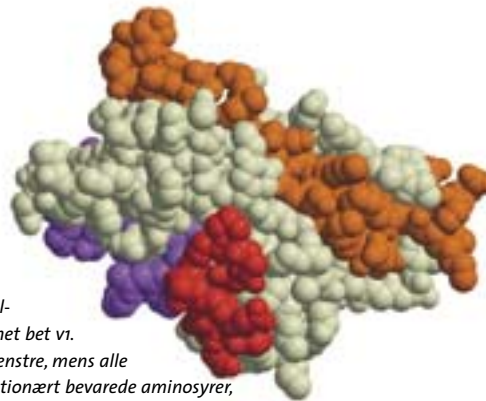
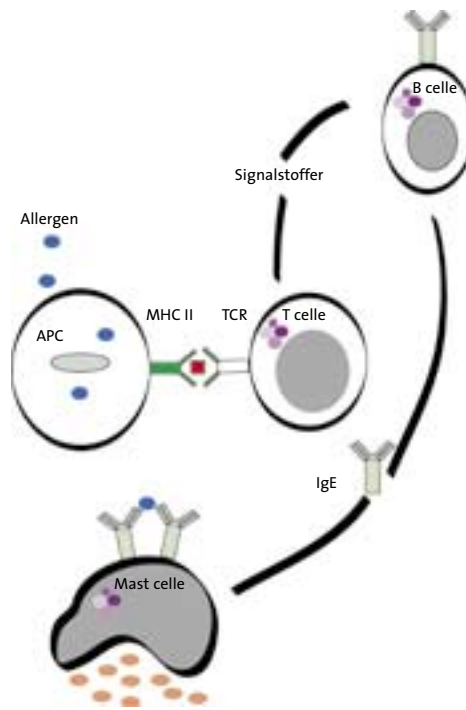
Mål for lægemidler

For at komme videre har vi nu kastet os ud i at undersøge de signalveje, der fører til en allergisk reaktion. Metoden er at bestemme strukturerne af de involverede proteiner og undersøge vekselvirkningerne i mellem dem.

I de seneste år har det vist sig, at bestemte proteiner, adaptormolekyler, spiller en central rolle i signalkaskaderne inde i cellen. Det sker i samspil med enzymer; en særlig gruppe proteiner, som sætter fart i biokemiske reaktioner. Enzymerne står for den egentlige signalering, mens adaptormolekylernes rolle er at placere enzymerne korrekt i forhold til hinanden ved at samle dem i store aggregater. De involverede enzymer kaldes kinaser.

KROPPENS IMMUNFORSVAR OG ALLERGI

Normalt beskytter kroppens immunforsvar os mod sygdomme og farlige stoffer. Men hos en allergisk person overreager immunforsvaret på stoffer, som normalt er ufarlige. Man bliver typisk allergisk over for små proteiner, som kaldes allergener. Allergenerne stammer fra dyr som for eksempel støvmider og katte eller fra planter pollen fra birk og græs. Allergi involverer forskellige signalveje i den enkelte celle i immunforsvaret. Allergener (blå ovaler) opfanges og fordøjes først i de celler, der kaldes antigenpræsenterende celler. APC-cellerne sørger for, at stumper af allergenet (rød firkant) bliver præsenteret for immunforsvarets T-celler, der er specialiseret i at genkende fremmede molekyler. T-cellerne sender nu besked til en anden type af celler, B-celler, om tilstedeværelsen af fremmede stoffer. Hos en rask person fremstiller B-cellerne primært antistoffet IgG, hvilket i sidste ende medfører, at det fremmede stof opfanges. Men når en allergiker udsættes for et allergen, danner B-cellerne for meget af en anden type antistoffer, IgE. IgE bindes på overfladen af mast-celler, og når mast-cellerne møder allergenet, krydsbinder allergenet IgE. Det starter en signalkaskade (lilla ovaler) inde i mast-cellerne, der medfører frigivelse af en række stoffer, f.eks. histamin (brune ovaler). Den onde cirkel er nu sat i gang, og allergikeren bliver syg.



Figurene viser den tredimensionelle struktur af det allergifremkaldende stof fra birkepollen, proteinet bet v1. Proteinkæden er vist som et bånd til venstre, mens alle

proteinet atoms ses som kugler til højre. De områder af proteinet, som består af evolutionært bevarede aminosyrer, er farvet rødt, lilla og orange. Netop disse områder antages for at være potentielt vigtige for den allergiske reaktion.

Der foreligger næsten ingen strukturel viden om adaptormolekyler og slet intet om de komplekser, der dannes mellem enzymerne og adapterne i signaleringsprocessen. Faktisk kender man i dag kun den tredimensionelle struktur af et eneste adaptormolekyle. Hvis det lykkes at opklare strukturen af de involverede proteiner, enzymer og komplekser, vil det uden tvivl afsløre nye vigtige mål for lægemidler til behandling af allergi. Den første opgave er at fremstille alle proteinerne i så store mængder, at man kan studere deres indbyrdes vekselvirkninger. Her kan man i dag skaffe de humane gener, som koder for proteinerne, ved at henvende sig til det humane genomprojekt. Derefter kan man så bruge bakterier til at producere proteinerne i store mængder. Vi har allerede fremstillet et antal af de proteiner, som er involveret i allergirelateret signalering i en bestemt type af immunceller. Den næste opgave er så at bestemme de tredimensionelle strukturer af de enkelte proteiner og af de komplekser, der dannes.

Krystaller er nødvendige

Proteiners struktur kan opklares ved hjælp af røntgenkrystallografi, men metoden kræver, at man kan fremstille krystaller af de pågældende proteiner, hvilket ofte kan være en vanskelig opgave. Når en kraftig røntgenstråle sendes gennem proteinkrystallen, vil proteinets elektroner sprede strålen i et bestemt mønster. Spredningsmønstret er unikt for det pågældende protein. Det er lykkedes os at fremstille krystaller af et af de interessante proteiner i de allergiske signalveje. Proteinets kaldes phospholipase

C- γ 2, og det er opbygget af 1265 aminosyrer. Når vi får opklaret strukturen ved hjælp af røntgenkrystallografi, vil vi vide præcist, hvordan hver aminosyre er placeret rumligt i forhold til alle de andre. Ja, vi ved faktisk endnu mere – også hvordan mere end 100.000 atomer er rumligt placeret. Denne struktur vil være det første vigtige skridt mod strukturbaseret lægemiddeldesign mod allergiske sygdomme.

STRUKTUREL BIOLOGI I RIVENDE UDVIKLING

Udgangspunktet for strukturel biologi er at bestemme den tredimensionelle struktur af biomolekyler. Derefter bruges kendskabet til strukturen til at opklare molekylets biologiske funktion på molekylært niveau. Der anvendes mange eksperimentelle teknikker, som spænder fra kloning af gener over fremstilling af proteiner og andre makromolekyler i bakterier til strukturelle undersøgelser med røntgenstråling og NMR-spektroskopi. Feltet er i rivende udvikling, og der arbejdes for eksempel med at opbygge forskningscentre, som kan undersøge alle komponenterne i komplicerede systemer som en bakterie. På internationalt plan udvikles der også avancerede robotsystemer, som kan varetage de simple arbejdsopgaver i de store forskningsprojekter.



Ph.d. Bente Vestergård er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Osman Mirza er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi. Han arbejder for tiden ved Imperial College, London.



Erhvervsforsker cand.pharm. Jette Sandholm Kastrup er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Michael Gajhede er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Lægemedlers usynlige spor

Iskæmi og Alzheimers sygdom kan måske behandles med stoffer, som blokerer for bestemte receptorer i hjernen. Men det er svært at måle effekten af blokerende stoffer, fordi de ikke fremkalder elektriske signaler i nervecellerne. Alligevel er det muligt at afdække de usynlige spor.

Af Henrik Tang Vestergaard og Uffe Kristiansen

Organismens nerveceller kommunikerer med hinanden ved at frigive og modtage kemiske signalstoffer. Stofferne virker ved at binde sig til specifikke receptorer, der sidder i modtagercellens ydre membran.

Receptorerne er typisk store proteiner, og de er angrebepunkt for det meste af nutidens medicin. Derfor er det vigtigt at forstå samspillet mellem receptorer og lægemiddelstoffer, når vi udvikler nye lægemidler.

For at et signalstof kan påvirke en receptor, skal det først binde sig til den. Efter bindingen stimulerer signalstoffet receptoren, og det skaber en reaktion i cellen. Nogle lægemiddelstoffer kan stimulere receptoren på nøjagtigt samme måde.

Andre lægemiddelstoffer bindes til receptoren uden at stimulere den. Deres virkning består i at blokere adgangen for stimulerende signalstoffer, og på den måde hindrer de aktivering af receptoren

og dermed af cellen. Da de blokerende lægemiddelstoffer ikke stimulerer receptoren og således ikke giver sig til kende, må deres virkning studeres på indirekte vis – nemlig ved at måle deres evne til at blokere virkningen af stimulerende stoffer.

Vi er især interesseret i effekten af blokerende lægemiddelstoffer, fordi de er aktuelle i behandling af neurologiske sygdomme som iskæmi og Alzheimers sygdom. Sygdommene er kendetegnet ved, at visse receptorsystemer i hjernen bliver overstimuleret som følge af en øget frigivelse af hjernens egne signalstoffer. Behandling med blokerende lægemiddelstoffer vil kunne hindre signalstofferne i at få adgang til receptorerne og dermed standse eller dæmpe overstimuleringen af nervecellerne.

Stof og receptor

Når et stimulerende lægemiddelstof har bundet sig til en receptor, aktiveres receptoren ved, at den ændrer sin rumlige struktur, hvilket påvirker funktionerne i resten af cellen.

De strukturelle ændringer efter binding af et stimulerende lægemiddelstof studeres lettest på receptorer, der indeholder en ionkanal. Ioner er ladede molekyler, som forekommer i forskellig koncentration i cellens indre og ydre miljø.

En ionkanal i hvile er lukket, men når receptoren aktiveres, åbner kanalen sig, så ioner kan passere gennem åbningen. Bevægelsen af de ladede ioner skaber en elektrisk strøm, som kan måles med elektrofysiologiske teknikker.

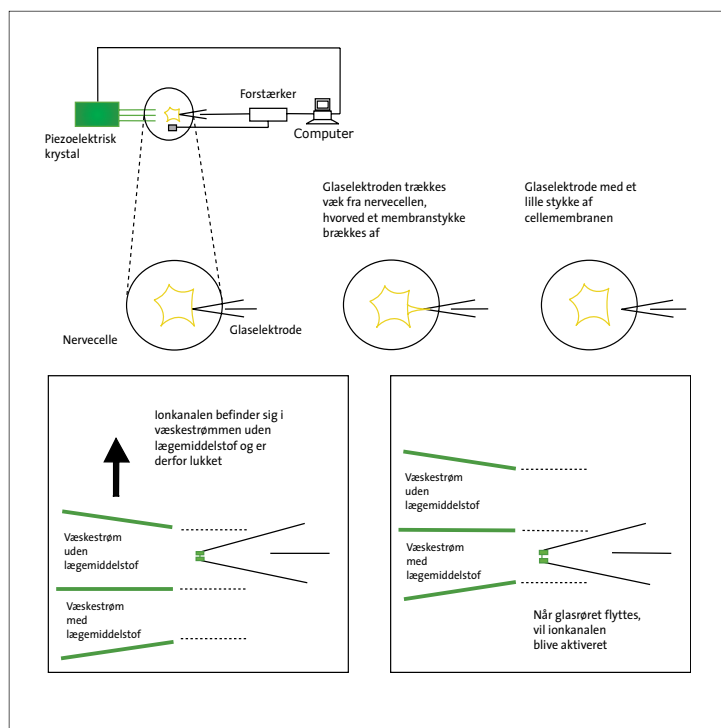
Elektrofysiologiske målinger

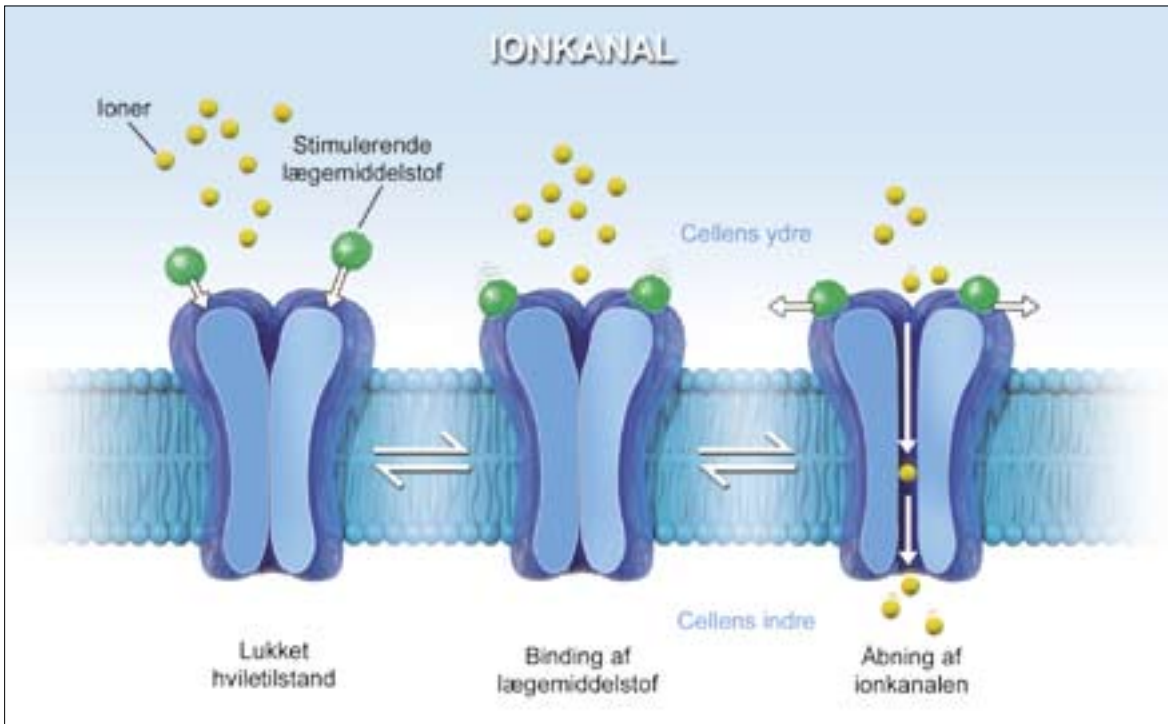
Målingerne foretages med et specielt måleudstyr, som består af en meget lille glaselektrode, der er forbundet til en fintfølede forstærker og en computer. Ved at skabe kontakt mellem glaselektroden og nervecelle, er det muligt at måle strømændringer som følge af lukninger eller åbninger af ionkanaler i cellen.

Man kan også måle på strømmen gennem et mindre stykke af nervecellens membran ved hjælp af en endnu mere raffineret teknik. Efter at have skabt kontakt mellem glaselektroden og cellemembranen, kan man langsomt trække et meget lille stykke membran ud af cellen svarende til en diameter på en tusindedel millimeter.

De små membranstykker kan indeholde fra en enkelt til flere tusinde ionkanaler, hvilket gør det muligt at studere detaljerede egenskaber af en enkelt isoleret ionkanal eller de overordnede egenskaber af adskillige ionkanaler under samme eksperimentelle forhold. En yderligere fordel ved metoden er, at man kan undersøge hurtige vekselvirkninger mellem lægemiddelstoffer og receptorer.

Figuren viser, hvordan den elektrofysiologiske opstilling bruges til at måle effekten af et stimulerende lægemiddelstof på receptorer med ionkanaler. Opstillingen kan også anvendes til at måle, hvor effektivt et blokerende lægemiddelstof hæmmer virkningen af det stimulerende stof. Ved den type forsøg opløses de to stoffer i hver sin væskestrøm.





Cand.pharm. Henrik Tang Vestergaard er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Uffe Kristiansen er lektor ved Institut for Farmakologi.

Lynhurtige væskeskift

Når nerveceller i den levende organisme frigør deres signalstoffer, er stofferne kun til stede ved receptorerne i få tusindedele af et sekund, inden de fjernes igen.

Receptorerne opfanger signalet uden problemer, fordi ionkanalerne åbner og lukker sig inden for en tusindedel af et sekund. For at kunne efterligne de naturlige processer eksperimentelt, er det nødvendigt at kunne tilføre og fjerne signalstoffer og lægemiddelstoffer lige så hurtigt, som det sker i organismen.

I eksperimenterne tilføres eller fjernes et lægemiddelstof ved at udskifte væsken omkring cellens membran, hvor receptorerne sidder. Ved at begrænse den elektriske måling til et lille stykke celledmembran frem for en hel celle, reduceres den overflade, hvor væsken skal udskiftes, og så kan man lettere opnå et hurtigt væskeskifte fra én opløsning til en anden.

De lynhurtige væskeskift frembringes ved at anvende et lille glasrør, der er forbundet til en piezoelektrisk krystal. Røret er opdelt i to kanaler ved hjælp af en meget smal glasvæg. Den ene kanal indeholder en opløsning bestående af et blokerende lægemiddelstof opløst i næringsvæske, mens den anden kanal indeholder en opløsning af et stimulerende lægemiddelstof opløst i den samme næringsvæske. Begge opløsninger flyder ud af røret som to adskilte og parallelle væskestrømme.

Elektroden med det lille stykke celledmembran placeres først i væskestrømmen fra den ene kanal. Herefter udskiftes væsken omkring det lille stykke celledmembran ved hurtigt at flytte glasrøret, så elektroden med celledmembranen rammes af væskestrømmen fra den anden kanal.

Glasrøret bevæges ved hjælp af den piezoelektriske krystal, som udfører små og meget hurtige bevægelser, når den tilføres en elektrisk spænding. Krystallens præcise bevægelser gør det muligt at skifte hurtigt og effektivt mellem to forskellige opløsninger.

Når væskeskiftet bevirker en åbning eller lukning af de membranbundne ionkanaler, kan ændringen i den elektriske strøm måles direkte i glaselektroden.

At se det usynlige

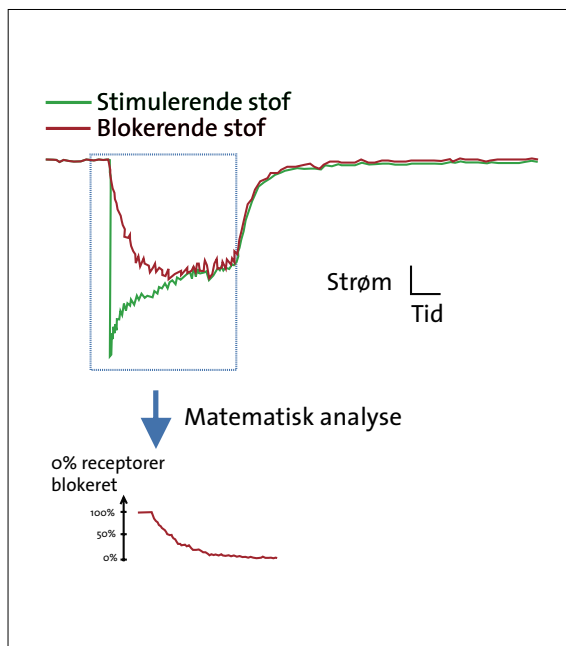
Den beskrevne eksperimentelle opstilling kan umiddelbart bruges til at studere vekselvirkninger mellem stimulerende lægemiddelstoffer og receptorer. Det er dog mere omstændeligt at måle effekten af blokerende lægemiddelstoffer, som er interessante i forbindelse med behandling af iskæmi og Alzheimers sygdom.

De blokerende stoffer stiller særlige krav, fordi de ikke stimulerer receptorerne og ikke frembringer strøm gennem ionkanalerne.

Derfor er det nødvendigt at studere stoffernes egenskaber indirekte ved hjælp af deres hæmning af et stimulerende stofs aktivering af receptoren.

Efter målingerne gennemføres en matematisk sammenligning af det stimulerende stofs effekt, når det er alene, og når det er under påvirkning af et blokerende stof. På den måde kan man beregne, hvordan og i hvor høj grad det blokerende stof påvirker receptoren.

Det er altså muligt at afdække den skjulte vekselvirkning mellem receptorer og blokerende lægemiddelstoffer. Studier af de usynlige spor kan hjælpe med til at forstå mekanismerne bag blokerende lægemiddelstoffers effekt, hvilket gør det muligt at designe stoffer med den ønskede virkning på de specifikke receptorer, som er involveret i neurologiske sygdomme.



Strømspor af et stimulerende stof; samspillet mellem et stimulerende og et blokerende stof; plus målinger af, hvor hurtigt det blokerende stof fjernes fra receptorerne.

Liberaliseringen, der blev væk

Supermarkeder sælger håndkøbsmedicin, men liberaliseringen af apotekervæsenet er ikke nået længere end det. Staten og apotekerne dominerer den politiske dagsorden på trods af tidens stærke ideologiske pres mod monopoler og for markedsorienterede reformer.

Af Jakob Bjerg Larsen og Janine M. Traulsen

Fra 1. oktober 2001 har supermarkeder, kiosker og benzinstationer landet over kunnet sælge en række håndkøbslægemidler. Det er resultatet af langvarig og til tider ophedet debat om at liberalisere apotekervæsenet i Danmark.

Processen startede med krav om en fuldstændig liberalisering – fri nedsættelsesret for farmaceuter samt fri prisdannelse på lægemidler – men endte med en mindre justering af de bestående forhold. Hvorfor gik det sådan?

Vi har analyseret den politiske proces forud for lovændringen, og konklusionen er, at resultatet er forment af to modsatrettede kræfter. På den ene side har den politiske debat i de seneste år været præget af et generelt ideologisk pres imod monopoler og for markedsorienterede reformer, hvilket bl.a. har ført til liberalisering af elsektoren. På den anden side har apotekervæsenets 450

år gamle strukturer og normer virket stabiliserende og bremsset større ændringer på området.

Beslutningen om at frigive salget af en række håndkøbslægemidler kan derfor ses som et led i en kontinuerlig udvikling af apotekerne. Den beskudte liberalisering har ikke ændret ved, at langt den meste medicin fortsat kun må sælges af apoteker, at staten kontrollerer antallet af apoteker, at et apotek kun kan ejes af en farmaceut, og at der er stram offentlig styring med hensyn til placering af apoteker og priserne på lægemidler.

Lægemiddelpolitik

Lægemidler er tæt reguleret. Overallt er der love, bekendtgørelser og guidelines, der i mindste detalje bestemmer, hvad der er lægemidler, hvordan de må laves, hvem der skal udføre arbejdet, og hvordan lægemidlerne skal distribueres og håndteres.

Hvis rammerne ændres, forandres farmaceuternes rolle både på apoteket og i medicinalindustrien, hvor farmaceuter arbejder med udvikling, produktion og markedsføring. Hvis vi ønsker at forstå udviklingen af lægemiddelområdet og i særlig grad farmaceuternes placering i hele spillet, må vi undersøge de politiske processer, der fører til fastsættelse af nye regler.

På den måde kan vi øge indsigten i et meget komplekst område, som er præget af mange aktører, mange modsatrettede interesser og mange forsøg fra politisk side på at lave ændringer.

Fokus på apotekerne

I ph.d.-projektet, som danner baggrund for denne artikel, har vi sat fokus på den del af lægemiddelpolitikken, der beskæftiger sig med, hvordan vi indretter distributionen af lægemidler til forbrugerne. Målet er at analysere distributionens udvikling i Danmark – fra den første apotekerbevilling, der blev givet af Kong Christian III i 1546, til ophævelsen af apotekforbeholdet for en række håndkøbslægemidler i 2001.

Vi inddeler analysen i en historisk og en nutidig del. Ved hjælp af farmacihistoriske oversigtsværker, udskrifter af Rigsdags- og Folketingsdebatter samt artikler i fagtidsskrifter laves en overordnet fremstilling af de strukturer og normer, der har udviklet sig og præget de politiske beslutningsprocesser i perioden fra 1546 til 1994.

For perioden fra 1994 til 2001 udføres en mere detaljeret analyse af liberaliseringsdebatten: Hvilke aktører deltog? Hvad gjorde de? Og hvordan opfattede de forløbet? Denne analyse bygger ikke alene på skriftlig dokumentation som betænkninger, rapporter og høringsvar,



men inkluderer også interviews med ministre, sundhedspolitiske ordførere og repræsentanter for de involverede interesseorganisationer.

Pres for monopolbrud

Efter en kort politisk debat i sommeren 1999 nedsatte daværende sundhedsminister Carsten Koch (S) et udvalg, der skulle vurdere reguleringen af salget af medicin. Målet var lavere patientpriser på lægemidler og lavere offentlige udgifter, samtidig med at sundhedspolitiske hensyn fortsat skulle tilgodeses.

Men allerede inden udvalget nåede at offentliggøre sit arbejde, indgik regulering af apotekervæsenet i finanslovsaftalen for år 2000. Om apotekervæsenet stod der bl.a.: ”Regeringen fremlægger inden 1. juli 2000 et samlet beslutningsgrundlag for gennemførelsen af en liberalisering af apotekervæsenet i overensstemmelse med medicinudvalgets forslag ...”

Hvordan en liberalisering i praksis skulle gribes an, var endnu usikkert. Kun ét var sikkert: monopoler var utidssvarende, og markedskræfterne burde aktiveres noget mere. Der skulle liberaliseres!

Presset var ikke en politisk døgnflue. Krav om markedsorienterede reformer prægede og præger stadig den politiske dagsorden generelt. Inden for andre sektorer var gamle monopoler allerede liberaliseret. Et eksempel er elforsyningen. Her blev det danske elmarked liberaliseret i 1999 i kølvandet på liberaliseringer i Norge, Sverige, Finland og Tyskland.

Samtidig blev der gennemført flere apoteksreformer i Norden. I Island blev apotekslovgivningen liberaliseret allerede i 1996. På grund af den historiske tilknytning til Danmark var der inden reformen den samme regulering af distributionen af lægemidler som her i landet, og det gjorde erfaringerne fra Island særligt interessante for danske politikere.

Liberaliseringen i Island medførte store ændringer; der blev åbnet for priskonkurrence på lægemidler, etableringen af nye apoteker blev givet fri, og ejerskabet af apotekerne var ikke længere forbeholdt farmaceuter. I Norge blev apotekervæsenet liberaliseret i 2001, og det skete med stærk inspiration fra Island.

Hvis man udelukkende ser på begivenhederne i slutningen af 1990'erne i Danmark, står det klart, at der på det tidspunkt var et massivt pres for at ændre distributionen af lægemidler radikalt. Men det skete ikke.

Stabiliserende faktorer

Der var nemlig et endnu større pres for at bibeholde apotekervæsenet, som det var. De strukturer og normer, der i tidens løb har udviklet sig omkring reguleringen af apotekervæsenet, virkede stabiliserende.

Grundlaget for stabiliteten skal findes i de tætte forbindelser mellem den danske stat og apotekerne – forbindelser, som udviklede sig i perioden fra 1546 til 1672. Lige siden dengang er alle revisioner af apotekerloven formet ud fra den eksisterende grundstruktur.

Det tætte forhold mellem staten og apotekerne blev bygget op

omkring en vægtning af interesser: Staten gav apotekerne monopol på salg (og i sin tid fremstilling) af lægemidler samt indflydelse på udformningen af apotekerloven. Til gengæld efterlevede apotekerne villigt alle krav og påbud fra staten. Apotekerne fik tryk, og staten fik en sektor, der var nem at styre!

Denne korporative organisering har bevirket, at staten og de apoteksfaglige organisationer har domineret den politiske dagsorden fra 1672 og til i dag. De har defineret apotekervæsenets problemer og sammen vurderet, hvilke løsninger der var brugbare. Andre aktører – som den øvrige detailhandel – har haft meget svært ved at gøre deres synspunkter gældende i dette forum.

Et andet resultat af det mangeårige samarbejde mellem staten og de apoteksfaglige organisationer er, at reguleringen er meget kompleks. Apotekerne varetager mange opgaver, som er tæt forbundet med det offentlige sundhedsvæsen. For eksempel er apotekerne centrale i administrationen af sygesikringen, og de varetager uddannelsen af farmakonomer. Samtidig sikrer en udligningsordning mellem det faste antal af apoteker, at det kan lade sig gøre at opretholde apoteker i yderområderne, hvor der ikke er forretningsmæssig basis for driften.

Hvis den nuværende regulering ændres radikalt ved, at man tillader fri etablering af apoteker, kan staten få sværere ved at styre sektoren. Staten har i dag god kontrol med de ca. 280 private apoteker, men vil det være lige så nemt at få danske og udenlandske kapitalkæder til at varetage apoteksdrift i landets yderområder? Eller til at håndtere sygesikringstilskuddet til lægemidler? Hvis strukturen i apotekervæsenet ændres radikalt, har det mange praktiske konsekvenser.

Sidst, men ikke mindst, har Danmark et velfungerende og effektivt apotekervæsen. Avancen i apoteksleddet er blandt de laveste i Europa, og der er ikke folkelige krav for at ændre apotekerlovgivningen. Så hvorfor skulle politikerne kaste sig ud i et projekt, hvor der er lidt at vinde – men meget at tabe?



Cand.pharm. Jakob Bjerg Larsen er ph.d.-studerende ved Institut for Samfundsfarmaci.



Fil.dr. Janine M. Traulsen er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.



Nye kemiske analysemetoder finder østrogener i ng/l niveau

Ved hjælp af nyudviklede kemiske analysemetoder kan man måle, hvor effektive danske rensningsanlæg er til at fjerne østrogener fra spildevandet. En ny undersøgelse giver et bud på forureningens omfang.

Af Flemming Ingerslev, Henrik R. Andersen, Anne-Marie Jacobsen, Kristine Andersen Krogh, Tue Søeborg, Martin Hansen og Bent Halling-Sørensen

Mennesker udskiller østrogener med urinen, både de naturlige kønshormoner østron og 17β -østradiol samt 17α -ethinyløstradiol, der stammer fra p-piller. Via spildevandet når hormonerne frem til åer og søer, og flere undersøgelser, især i udlandet, har vist, at udledningerne er den vigtigste årsag til feminisering af hanfisk i forurenede vandløb.

Der er endnu ikke fuldt overblik over problemets omfang i Danmark, men en ny undersøgelse af spildevand fra 19 rensningsanlæg i hele landet tyder på, at spildevandets indhold af østrogener bidrager væsentligt til de hormonrelaterede skader, man ser på hanfisk og andre organismer i vandmiljøet. Valget af anlæg har sikret, at alle amter og anlægstyper er repræsenteret.

Biologisk nedbrydning

Østrogener er fedtopløselige stoffer, som umiddelbart burde bindes til spildevandsslam og derfor ikke være i stand til at passere rensningsanlægget. Imidlertid omdannes østrogenerne inden udskillelsen fra kroppen, hvilket sker ved, at de får koblet et glucuronsyremolekyle på. Omdannelsen gør hormonerne ca. 50 gange mere vandopløselige, hvilket gør, at de nemt udskilles med menneskets urin.

I kloakken eller i rensningsanlægget fraspaltes glucuronidet af mikroorganismene, hvorved østrogenerne reaktiveres. Hvis fraspaltningen sker tidligt i kloaksystemet, nedbrydes østrogenerne i rensningsanlægget. Men hvis fraspaltningen sker sent, f.eks. i rensningsanlæggets denitrifikationstank, så kan østrogenerne ikke nå at blive nedbrudt eller bundet til slam i rensningsanlægget, og derved vil hormonerne være til stede i det behandlede spildevand.

Spildevandsprøver

I oktober og november 2002 indsamlede vi en vandprøve fra hvert af de 19 anlæg. På grund af det begrænsede antal prøver må undersøgelsens resultater betragtes som foreløbige.

Prøverne blev indsamlet gennem et helt døgn, idet man udtager en delprøve hver gang en fastsat mængde spildevand – f.eks. 200 liter – har passeret udløbet. Bagefter blandes alle delprøverne sammen og udgør således et gennemsnit for det pågældende døgn. Efter indsamling blev to liter fra hver prøve hældt på flasker, som blev transporteret til laboratoriet hurtigst muligt, hvilket for de sjællandske og fynske prøver var mindre end 12 timer, mens de jyske prøver kunne være op til fem døgn undervejs. Prøverne var nedkølet til 4°C .

I laboratoriet blev prøverne inden 24 timer inddelt i prøver af en liter, som hver blev tilsat 100 nanogram 17β -østradiolacetat, der fungerer som kontrolstandard for den efterfølgende ekstraktion og analyse. Som blindprøve brugte vi postevand.

Kemi og skader

Det er først i de senere år blevet muligt at lave kemiske analyser af østrogener i spildevand. Den store udfordring ligger i at opkon-

Østrogeners vej fra mennesket til vandmiljøet via spildevandssystemet.



centrere hormoner fra flere liter vand, så de samles i en prøve på mindre end en milliliter. Metoden er fastfase-ekstraktion, hvor hormonerne bindes til en fast overflade.

I den videre procedure har vi anvendt gaskromatografi til at adskille de forskellige østrogener og massespektrometri til at identificere dem. For den nævnte metode ligger detektionsgrænsen i området 0,1 til 1 nanogram pr. liter.

Tidligere undersøgelser har vist, at der observeres feminisering af hanfisk ved koncentrationer af østron, 17 β -østradiol og 17 α -ethinyløstradiol på henholdsvis 8, 0,5 og 0,03 ng/l. De skadelige niveauer ligger altså tæt på detektionsgrænsen. Derfor er påvisning af østrogener i en vandprøve alene nok til at sige, at der sandsynligvis forekommer hormonskader på fisk ved udløb med ringe fortynding af spildevandet.

Mest i Storkøbenhavn

Ved analyserne kunne 17 β -østradiol og 17 α -ethinyløstradiol detekteres i koncentrationer ned til 0,1 ng/l, mens østron kunne påvises i koncentrationer fra 2 ng/l. For at kvantificere mængden af hormonerne var det nødvendigt med højere koncentrationer på henholdsvis 1 ng/l og 2 ng/l.

Under denne kvantifikationsgrænse kan højden af den kromatografiske top ikke bestemmes med tilfredsstillende statistisk sikkerhed. I prøverne er der altså fundet østrogener, men i så lave koncentrationer, at usikkerheden er stor.

Som tidligere nævnt er der kun analyseret 19 prøver. Det er måske grunden til, at der ikke er fundet sammenhænge mellem de forskellige anlægs størrelse, beliggenhed og tekniske opbygning. Dog ses der umiddelbart to tendenser i datamaterialet.

For det første forekommer østrogener med en højere frekvens og ved lidt højere koncentrationer i Storkøbenhavn end i de andre regioner, og for det andet tyder resultaterne på, at problemet ikke

er så udbredt i Jylland.

At der især er østrogener i spildevand fra Storkøbenhavn kan skyldes den høje befolkningstæthed.

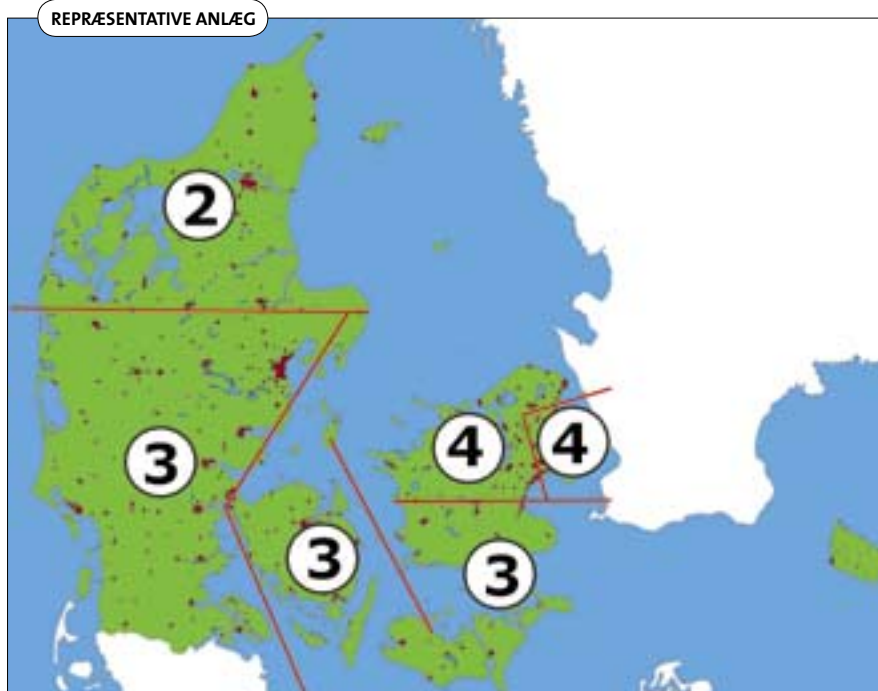
Transporten til laboratoriet af prøver fra jyske anlæg var af nogle dages varighed og i et enkelt tilfælde fem dage. Det er sandsynligt, at transporttiden har været for lang, så nedbrydningsprocesser har betydet, at stofferne ikke blev fundet i prøverne. En anden mulig forklaring kan være, at der tilledes mere industrispildevand uden østrogener til de jyske anlæg.

Landsdækkende problem

Alt i alt er der fundet østrogener i 15 ud af de 19 rensningsanlæg. I 8 ud af 19 prøver blev der fundet kvantificerbare mængder. Østron er fundet i færrest prøver, men til gengæld i de højeste koncentrationer. Det hyppigst forekommende stof var 17 β -østradiol, men fundene var oftest under grænsen for egentlig kvantificering.

Undersøgelserne viser som de første i Danmark, at udledningen af østrogener fra danske spildevandsanlæg er et landsdækkende problem, som ikke kun kan kobles til særlige regioner eller anlægstyper. Forureningen svarer derfor til situationen i udlandet, selv om de danske rensningsanlæg er blandt de mest avancerede i Europa.

De fundne koncentrationer er i stand til at forårsage feminisering af hanfisk. Miljøstyrelsens anbefalede værdier for fortynding af spildevandet reducerer ikke koncentrationen af steroidøstrogener til et niveau, der ligger flere størrelsesordener under effektivniveauet. Resultaterne støtter derfor den konklusion, udenlandske undersøgelser også har vist, at spildevandets østrogenindhold bidrager væsentligt til de hormonrelaterede skader, man ser på hanfisk og andre vandlevende organismer.



Kortet viser en oversigt over de regioner i Danmark, der indgik i undersøgelsen, samt antallet af prøver fra hver region.

De enkelte rensningsanlæg var udvalgt med henblik på at få størst mulig variation med hensyn til by og land, recipienttype og anlægsstørrelse. Anlæggenes størrelser er angivet som det antal personækvivalenter, de er designede til at kunne håndtere. Det skal bemærkes, at flere anlæg har en overkapacitet i forhold til den reelle belastning.



Ph.d. Flemming Ingerslev er lektor ved Institut for Analytisk Kemi.



Cand.scient. Henrik R. Andersen er amanuensis ved Institut for Analytisk Kemi.



Cand.scient. Anne-Marie Jacobsen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk Kemi.



Ph.d. Kristine Andersen Krogh er adjunkt ved Institut for Analytisk Kemi.



Cand.pharm Tue Søeborg er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk Kemi.



Stud.scient., Martin Hansen er specialestuderende ved Institut for Analytisk Kemi.



Ph.d. Bent Halling-Sørensen er professor ved Institut for Analytisk Kemi.

THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES



Lægemiddelforskning

udgives af Danmarks Farmaceutiske Universitet

Redaktion

Mette Rasmussen (ansvarshavende), Jesper Munck, Rolf Haugaard og Annette Houman

Grafik/illustrationer

Henning Dalhoff (16, 24, 31, 35, 38), Martin Weile (23, 25, 34, 35, 39), Jesper Munck (27) og Rumfang (5)

Fotos

Jesper Munck (6, 20, 26, 31), Jerzy Jaroszewski (8), Eran Gilad (11), Scanpix (36, 37), og Hans Bräuner-Osborne (14)

Grafisk design og produktion

ProGrafica as

ISSN 0905-0051

Danmarks Farmaceutiske Universitet

Universitetsparken 2
2100 København Ø
Tlf · 35 30 60 00
Fax · 35 30 60 01
E-mail · dfuni@dfuni.dk
Internet · www.dfuni.dk

