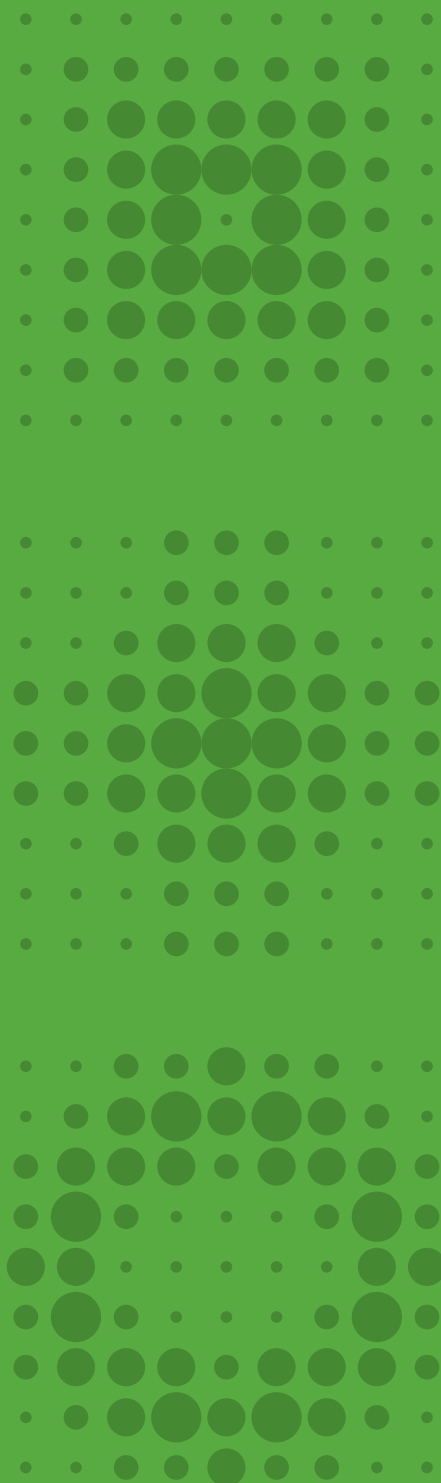
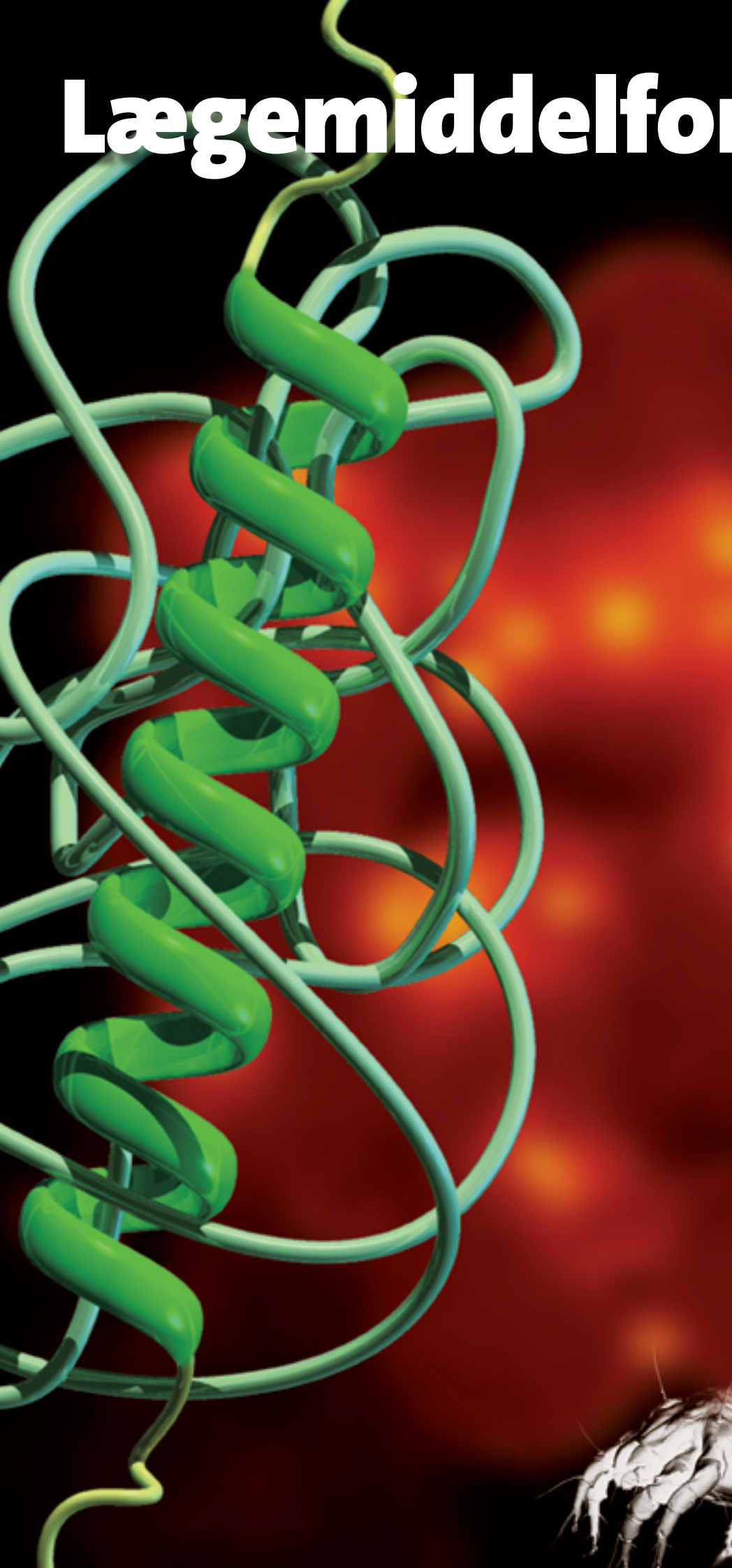


Lægemedelforskning

2005



THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES





Forskning ved DFU

Danmarks Farmaceutiske Universitet har som det eneste universitet i Danmark lægemidlet i centrum for forskning og uddannelse. Da forskningen inden for lægemiddelområdet af natur er interdisciplinær, er det nødvendigt at kombinere flere fagdiscipliner for at få en dybtgående forståelse for nyskabelser inden for lægemiddelområdet. DFU's forskning og uddannelse omfatter således en integration af de natur-, sundheds-, samfunds- og teknisk videnskabelige områder.

Det er vores håb, at nærværende udgave af Lægemiddelforskning illustrerer flerfagligheden og samtidig giver en bredere kreds af læsere et indblik i en række af de spændende og udfordrende forskningsprojekter, der udspringer fra DFU.



Sven Frøkjær, rektor

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

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

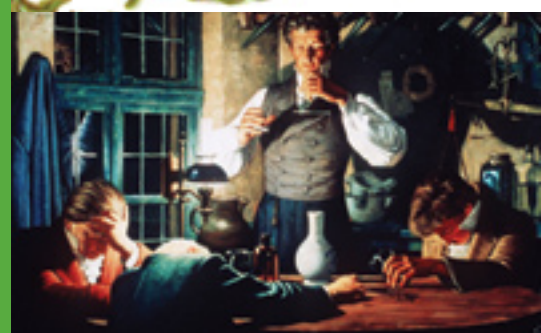
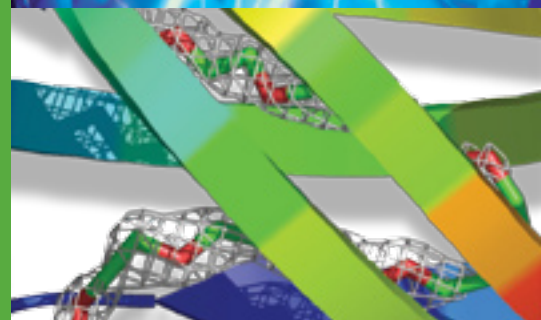
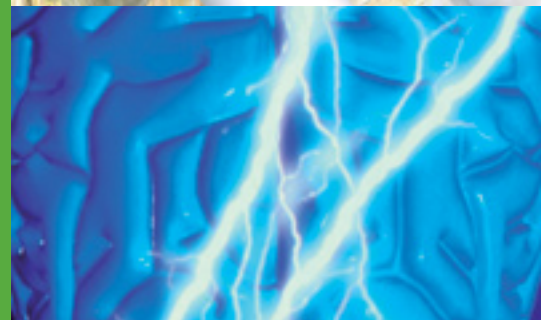
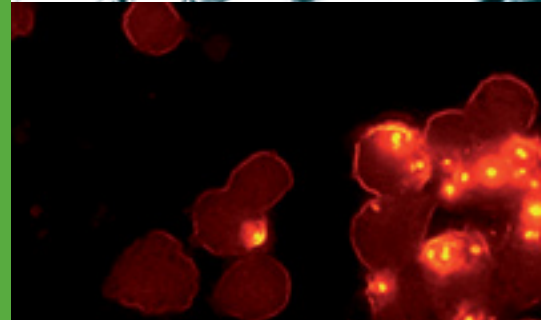
På www.dfuni.dk/farmaceut er der information om farmaceutuddannelsen og dens mange erhvervs muligheder.

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

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

Indhold

- 1. Metabonomet viser organismens tilstand.** 4-5
Af Michael Lauridsen, Jerzy W. Jaroszewski, Steen Honoré Hansen og Claus Cornett.
- 2. Positiv holdning til gentests og individuel medicinering.** 6-7
Af Louise Fuks Nielsen og Claus Møldrup.
- 3. Kroppens egne cannabinoider påvirker immunsystemet.** 8-9
Af Matilda Degn, Gitte Petersen, Harald S. Hansen, og Trine Meldgaard Lund.
- 4. Behandling af slidgigt med depotlægemidler.** 10-11
Af Brian T. Pedersen, Susan Weng Larsen, Jesper Østergaard og Claus Selch Larsen.
- 5. Modificerede allergener til allergivaccine.** 12-13
Af Birthe Ross Johannessen, Lars K. Skov, Jette Sandholm Kastrup og Michael Gajhede.
- 6. Tanker koster energi, men hvad lever hjerneceller af?** 14-15
Af Helle S. Waagepetersen, Helle M. Sickmann, Lasse K. Bak og Arne Schousboe.
- 7. Hvordan virker fantasy i hjernen?** 16-17
Af Signe Høg, Petrine Wellendorph, Jeremy R. Greenwood og Rasmus Prætorius Clausen.
- 8. Nye mål for lægemidlers antiepileptiske effekt.** 18-19
Af Suzanne L. Hansen, Uffe Kristiansen og Henrik Tang Vestergaard.
- 9. Behov for test af lægemidlers bivirkninger hos børn.** 20-21
Af Naja Wessel Jacobsen, Franziska Kramer Birkved, Anne Munch Christensen, Tue Søborg, Flemming Ingerslev og Bent Halling Sørensen.
- 10. Proteinlægemidler med en beskyttende kappe.** 22-23
Af Pernille Stignæs, Eva Horn Møller, Simon Bjerregaard, Marco van de Weert og Sven Frøkjær.
- 11. Forudsigelser med hjælp fra det virtuelle rum.** 24-25
Af Rikke Andersen, Bente Steffansen, Flemming Steen Jørgensen og Carsten Uhd Nielsen.
- 12. Farmaceutiske læsesmede på arbejde.** 26-27
Af Peter Naur, Bente Vestergaard, Lars K. Skov, Jan Egebjerg, Michael Gajhede og Jette Sandholm Kastrup.
- 13. Kemikere overgår naturen.** 28-29
Af Søren Brøgger Christensen, Helmer Sphoel og Tommy Liljefors.
- 14. Morfin – nye aspekter ved 200 år gammelt lægemiddelstof.** 30-31
Af Hanne Villesen, Niels-Henrik Jensen, Steen Honoré Hansen og Lona Chrstrup.
- 15. Analyse af blodprøver kan afsløre en løs hofteprotese.** 32-33
Af Bente Gammelgaard, Lars Bendahl, Stefan Stürup og Arne Borgwart.
- 16. Hurtigere kemiske analyser – til gavn for alle.** 34-35
Af Steen Honoré Hansen.
- 17. Kan humane celler erstatte forsøgsdyr i lægemiddelkontrol?** 36-37
Af Michael Timm, Erik Wind Hansen, Lise Moesby og Jens Dencker Christensen.
- 18. Den aktive, engagerede og usikre lægemiddelforbruger.** 38-39
Af Mikkel Nørreslet, Janine M. Traulsen og Gregor B.E. Jemec.



Metabonomet viser organismens tilstand

I *Star Trek* diagnosticeres universets mest gådefulde sygdomme på få sekunder. Besætningen på stjerneskibet U.S.S. Enterprise ser til med undren og fascination, når Dr. McCoy "Bones" betjener et lille håndholdt apparat, som aflæser organismens tilstand ved kontakt med huden. Filmens diagnostik er måske ikke længere helt så futuristisk, som man kunne tro.

Af Michael Lauridsen, Jerzy W. Jaroszewski, Steen Honoré Hansen og Claus Cornett

I den vestlige verden er fokus i medicinsk forskning især rettet mod hjerte-karsygdomme, gigt og kræft – med god grund. Fx blev der i 2003 indlagt 85.000 patienter i Danmark med hjerte-karsygdomme, 50.000 med kræft og 19.000 med gigtsygdomme. Tallene sætter en tyk streg under vigtigheden af en øget indsats inden for disse sygdoms-områder.

For at opnå en mere effektiv behandling af de meget forskelligartede patienter er det absolut nødvendigt at kunne stille en hurtigere og mere sikker diagnose, blive bedre til at vurdere behandlingens effekt og være i stand til at forudsige eventuelle tilbagefald.

Efter opklaringen af det humane genom håbede man, at ovenstående ville blive muligt i langt større grad, end det hidtil har vist sig at være tilfældet. Vanskelighederne skyldes primært, at det er svært at forbinde genomet med de forskellige sygdomme. Derfor satser man nu kraftigt på forskning, der kan koble genomet sammen med sygdomme.

Et af de mest lovende forskningsområder er metabonomstudier. Feltet har helt unikke fordele, såsom mulighed for at forudsige, hvorvidt en individuel patient vil reagere positivt på en given behandling. Samtidig kan diagnosticering af mange forskellige sygdomstilstande foregå noninvasivt ud fra en enkelt urinprøve eller ud fra en blodprøve, og det kan billiggøre screening af store befolkningsgrupper.

Sidst, men ikke mindst, kan metabonomstudier give et øjebliksbillede af organismens tilstand. Billedet er i mange tilfælde mere korrekt end det billede, der kan opnås ved

en proteinundersøgelse af organismen. Baggrunden for et mere korrekt billede skal findes i, at proteiner kan hæmmes og dermed sættes ud af funktion. Proteinerne vil i givet fald stadig være tilstede i organismen, men ikke længere være funktionelle. Et øjebliksbillede af proteomet på et sådant tidspunkt ville give anledning til et fejlagtigt billede af organismens tilstand. Sygdommen (organismens tilstand) kan i stedet erkendes ved måling af proteinet produkt, de mange små metabolitter, der enten mangler eller er til stede i for stor mængde. De mange små metabolitter måles netop i metabonomstudier.

Tarm- og gigtsygdomme

Danmarks Farmaceutiske Universitet samarbejder med hospitaler i hovedstadsområdet om at karakterisere metabonomets dynamik under behandlingsforløbet af patienter med gigt og kroniske tarmbetændelsessygdomme. Allerede nu er der indsamlet prøver af urin, plasma og serum fra et antal patienter. Målet er at udvikle et værktøj, der kan anvendes til at vurdere behandlingen af disse patienter, bedømme risikoen for følgesygdomme samt diagnosticere nye patienter.

Undersøgelsen af patienternes metabonomer udføres i dette studie ved hjælp af høj-felts NMR-analyse (kernemagnetisk resonans). NMR-analyse af en prøve giver information om samtlige molekyler, som prøven indeholder i koncentrationer over detektionsgrænsen. På grund af den store variation i prøverne, især i plasma og serum, er det nødvendigt at designe forsøgene, så kun de molekyler, der er under en vis størrelse, detekteres. På den måde fanger man de små metabolitter og spilder ikke kræfter på store makromolekyler som proteiner.

Analysen kan gennemføres ved hjælp af forskellige målemetoder, som selektivt måler på brintatomer i molekyler indenfor et bestemt størrelsesområde. Man kunne måle på andre typer atomer, men på grund af følsomhed og erfaring vælges ofte brint, der er til stede i stort set alle organismers molekyler i større eller mindre grad. Ved hjælp af et enkelt eksperiment, som varer omkring 15 minutter, kan flere hundrede molekyler detekteres samtidig. Et ¹H-NMR-spektrum af urin fra en patient giver således et fingeraftryk af organismens biokemiske tilstand.

Mønstergenkendelse

En af de store udfordringer i denne type analyse er at hente de ønskede informationer ud af den enorme datamængde, der genereres. Derfor er det nødvendigt med kraftige computere og avancerede statistiske værktøjer. De anvendte statistiske metoder karakteriseres som multivariable i modsætning til de gængse univariable metoder, som kun udnytter én variabel pr. prøve. Multivariable metoder betegnes også som mønstergenkendelsesteknikker, fordi det er hele mønsteret, der bærer informationen, i højere grad end nogle få variable.

Vi har opstillet og anvendt avancerede teknikker, som ekstraherer den relevante information fra de meget komplekse data. Rådata komprimeres ved at inddelle spektret i på

GENOMET, PROTEOMET OG METABONOMET

Traditionelt har man studeret funktionen af enkelte gener, proteiner og metabolitter. I de senere år er det blevet muligt at få overblik over helheder:

Genomet er samtlige gener i en organismes arvmasse. Genomer er bl.a. kortlagt i menneske, chimpansé og mus samt i planter som ris og i et stort antal mikroorganismer.

Proteomet er alle de proteiner, som en organisme indeholder på et givet tidspunkt. Et internationalt konsortium kortlægger det humane proteom.

Metabonomet omfatter alle stofskifteprodukter, der dannes i en organisme. Metabonomforskning defineres som studier af ændringer af den samlede mængde små metabolitter i hele kroppen som følge af genetiske stimuli eller sygdomsprocesser. Potentialet og perspektiverne er enorme inden for diagnostik, karakterisering og prognostisering.



Betjening af NMR-spektrometret på Danmarks Farmaceutiske Universitet



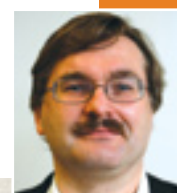
Cand. pharm. Michael Lauridsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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



Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Claus Cornett er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

forhånd definerede regioner, som derefter integreres og indsættes i en datamatrice. Derpå analyseres det samlede datasæt.

Et eksempel er en analyse af tre forskellige vævskulturer, to syge og en rask. Man kan tydeligt skelne mellem de tre kulturer, fordi cellekulturerne har brugt af vækstmediet og tilført mediet forskellige affaldsstoffer, dvs. metabolitter. Så ligesom i vor almindelige verden kan man altså skelne mellem forskellige typer væv – syge som raske – på deres forbrugsmønster. Analysen viser tydeligt, hvilke signaler i NMR-spektrene, der i højeste grad er ansvarlige for differentieringen. Man kan direkte aflæse de respektive værdier for kemiske ændringer i vævskulturerne og derved opnå information om de ansvarlige metabolitter.

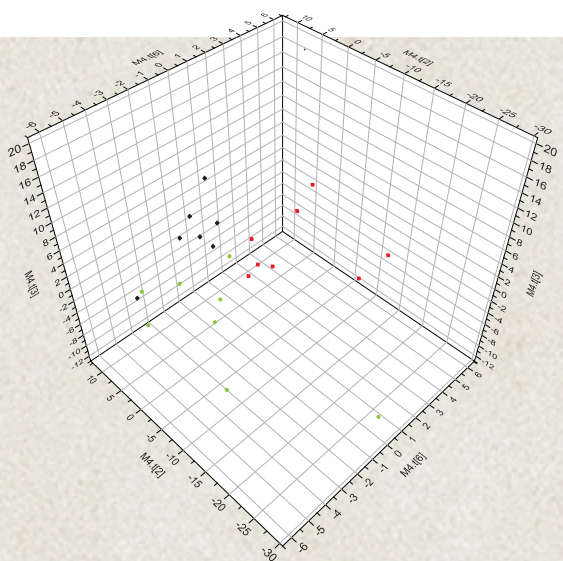
På nuværende tidspunkt har vi, for første gang inden for feltet, gennemført basale studier vedrørende prøvetilberedning og stabilitet, som har resulteret i elimination af utilsigtet variation blandt NMR-spektrene. NMR-analyse er en analyseteknik, som er forbundet med en relativ høj detektionsgrænse. Derfor planlægger vi at udføre analyser med massespektrometri, som kan komplementere NMR-analysen og afstedkomme et endnu mere sikkert resultat.

Helhedsanalyse

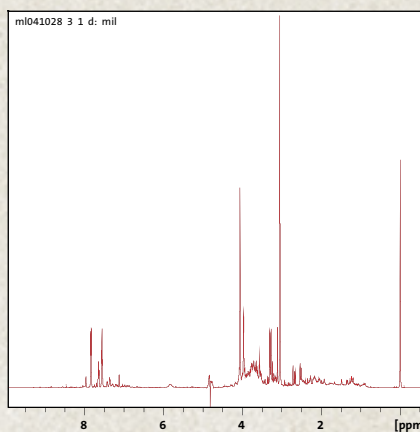
Perspektiverne inden for metabonomforskning er både positive og overvældende. Men det bliver bedre endnu. For i kombination med proteomanalyser og genomstudier åbnes der mulighed for, at man i fremtiden kan forudsige forekomsten af mange sygdomme. Det vil sætte lægerne i stand til at iværksætte behandling på et langt tidligere og mere hensigtsmæssigt tidspunkt.

Behandlingen kan ydermere designes specifikt til den enkelte patient ud fra den pågældendes evne til at metabolisere forskellige lægemidler. Der tages således højde for uheldige bivirkninger, som vi for nylig så med det smertestillende lægemiddel Vioxx, som producenten, Merck & Co., måtte trække tilbage fra markedet, fordi medicinen medførte alvorlige bivirkninger hos nogle patienter, mens den virkede effektivt på andre.

Når det gælder om at diagnosticere nye patienter, monitorere og vurdere et behandlingsforløb eller forudsige, hvordan et givet lægemiddel vil virke på en individuel patient, er det helt centralt at understrege vigtigheden af at kombinere genomstudier, proteomforskning og metabonomstudier, fordi det er den synergistiske effekt af de tre metoder, som til slut kommer patienterne til gode.



3D-scoreplot, der illustrerer separation af tre forskellige vævskulturer; to syge (rød og grøn) og en rask (sort).



¹H NMR-spektrum af brint i små molekyler – metabolitter – fra en urinprøve. Bemærk de mange velopløste signaler, der relaterer sig til det store antal forskellige metabolitter, som er til stede i urinen.

Positiv holdning til gentests og individuel medicinering

Et lægemiddel kan virke fint på nogle patienter og mindre godt på andre. Nogle får bivirkninger, selv om andre tåler medicinen. Gentests kan gøre det muligt at skræddersy lægemiddelbehandlingen til den enkelte patient. De fleste danskere er positive overfor den nye teknologi.

Af Louise Fuks Nielsen og Claus Møldrup

Folk er som bekendt forskellige, og effekten af de fleste medicinske behandlinger varierer stærkt blandt individer, både med hensyn til effektivitet og toksicitet. Derfor får mange patienter ikke præcis den medicin, som de har brug for, og konsekvenserne er ofte alvorlige.

I følge et amerikansk studie dør over 100.000 patienter om året i USA på grund af medicinske bivirkninger, som anses for at være den fjerde- til sjette største dødsårsag, og samtidig skades 2,2 millioner patienter i varierende grad.

Bivirkningerne skaber ikke blot menneskelige tragedier, men medfører også en stor samfundsøkonomisk belastning. I Danmark er problemer med brug af lægemidler årsag til 8-15 procent af alle hospitalsindlæggelser, og bivirkninger koster hvert år det danske samfund omkring otte milliarder kroner. Den videnskabelige og teknologiske udvikling har medført, at fremtidens lægemidler og medicinske behandlinger i højere grad vil blive individualiseret og udviklet ud fra et detalje-

ret genetisk kendskab til både sygdommen og den enkelte patient. Allerede nu anvendes farmakogenetik – læren om genvariationers betydning for lægemiddelrespons – ved udvikling af lægemidler og på nogle få hospitaler. Om nogle år vil vi se den nye teknologi anvendt bredt i den kliniske praksis. Ved brug af farmakogenetiske tests vil patienten få en medicinering, som tager udgangspunkt i den enkeltes unikke genprofil.

Individuelle genetiske faktorer har indflydelse på enzym-systemerne i kroppen og dermed på omsætningen af et lægemiddel. Det er årsagen til, at ét præparat kan have god effekt hos nogle patienter og ringe effekt hos andre, mens nogle oplever bivirkninger ved et lægemiddel, som andre tåler. Ud fra et kendskab til patientens genprofil kan man derfor optimere behandlingen til det pågældende individ. Resultatet af denne skræddersyede behandling vil være, at patienten får en bedre effekt af lægemidlet og oplever færre bivirkninger.

Holdninger er vigtige

Den offentlige mening påvirker i stigende grad vilkårene for videnskabelig forskning, især inden for den medicinske verden, og derfor er det vigtigt at tage offentlighedens synspunkter i betragtning. Samtidig har massemedierne og den offentlige debat i større grad end tidligere indflydelse på, hvordan befolkningen vurderer og anvender nye lægemidler og behandlingsmetoder. En succesfuld implementering af farmakogenetik vil således afhænge af en samfundsmæssig accept af gentests. Derfor er det interessant at undersøge danskernes holdning til og opfattelse af farmakogenetik.

På den baggrund har vi udført et kvantitativt studie med udgangspunkt i en spørgeskemaundersøgelse. Spørgeskemaet blev via Internettet sendt til 5102 repræsentativt udvalgte danskere i alderen 18-70 år. 3000 personer valgte at deltage, hvilket giver en svarprocent på 59 procent. Skemaet var ledsaget af en kort neutral præsentation af farmakogenetikens muligheder og begrænsninger. Inden denne introduktion kendte kun 14 procent af deltagerne til farmakogenetik. Dataindsamlingen blev gennemført i marts 2005.

Opbakning til farmakogenetik

48 procent af deltagerne synes godt om, at farmakogenetik bruges i den medicinske behandling, og 36 procent synes meget godt om det. To procent bryder sig ikke om anven-

DNA-chips kan opdage en række sygdomme og påvise genetiske variationer hos forskellige patienter med samme sygdom. Gentests er forudsætningen for at individualisere den medicinske behandling, så lægemidlerne skræddersys til den enkelte patient.

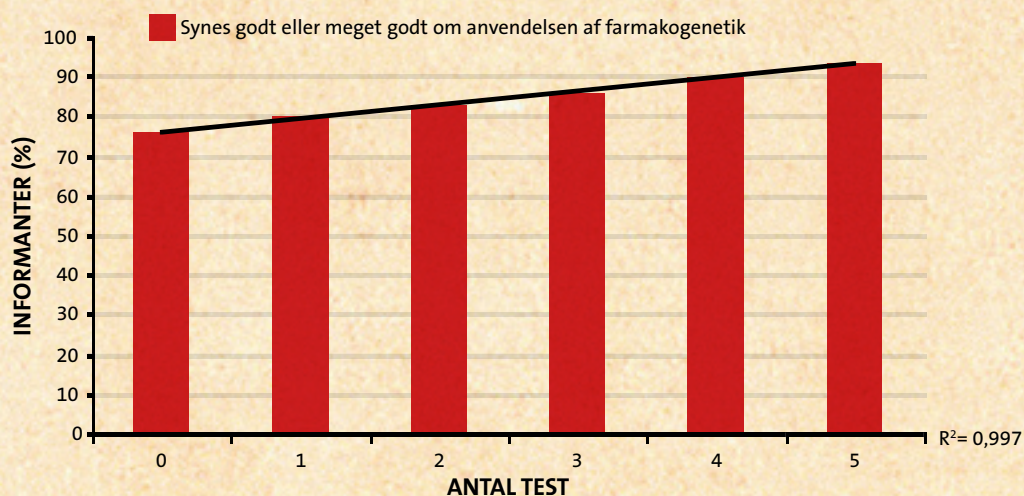




Cand. pharm.
Louise Fuks Nielsen



Ph.d. Claus Møldrup er
lektor ved Institut for
Farmakologi og Farma-
koterapi.



Jo flere sundhedsrelaterede tests deltagerne i undersøgelsen selv havde prøvet, jo mere positive var de overfor farmakogenetisk behandling, som de anser for at være bedre end traditionel behandling.

delsen af farmakogenetik, mens 9 procent er i tvivl. De aspekter ved farmakogenetikken, som umiddelbart bedømmes som fordelagtige, er især, at anvendelsen kan medføre færre indlæggelser, færre bivirkninger og bedre effekt af lægemidler. At en gentest er påkrævet forud for en farmakoterapeutisk behandling opleves af 14 procent som værende en ulempe, mens resten overvejende opfatter gentests som positive eller uden betydning.

Omkring halvdelen af deltagerne i undersøgelsen ser det som en fordel, at personer med samme sygdom får forskellig behandling, og 94 procent mener, at det er et gode, at medicinen passer til patientens genprofil. At samfundet kan opnå økonomiske besparelser vurderes som en fordel af 88 procent. Overordnet viser undersøgelsen, at danskerne har en positiv opfattelse af farmakogenetik, og 78 procent finder anvendelse af farmakogenetik i den medicinske behandling bedre end de nuværende behandlingstilbud. Selv om det store flertal er positive overfor den nye teknologi, påpeger mange også negative sider. Farmakogenetik kan medføre øgede medicinpriser på grund af behovet for gentest og skræddersyet medicinering, og det ses som en ulempe af 66 procent. Desuden opfatter 62 procent det som en ulempe, at der måske ikke vil være medicinsk behandling af alle patienter på baggrund af den farmakogenetiske test.

Den overordnede opfattelse af farmakogenetikken påvirkes ikke af deltagernes helbredstilstand, og uanset sygdomsstatus synes flertallet godt eller meget godt om, at farmakogenetik bruges i medicinsk behandling. Undersøgelsen viser dog en sammenhæng mellem sygdomsstatus og variationer i opfattelsen af forskellige forhold. Deltagere med langvarig sygdom ser det i højere grad som en fordel, at man skal have foretaget en gentest forud for en farmakoterapeutisk behandling. At der måske ikke vil være medicinsk behandling til alle patienter, opfattes som en ulempe af 67 procent af de langtidssyge, mens kun 62 procent af de øvrige deltagere deler dette synspunkt.

Holdningen til selv at benytte en gentest forud for en medicinsk behandling er også afhængig af sygdomsstatus. 86

procent af dem, som har et dagligt medicinbrug, vil foretrække farmakogenetisk bestemt behandling frem for nuværende behandling, mens andelen er helt oppe på 92 procent blandt de deltagere, der ikke bruger medicin til daglig, men som har anvendt medicin indenfor 1-14 dage forud for undersøgelsen.

Resultaterne viser også, at erfaring med sundhedsrelaterede tests påvirker holdningen til farmakogenetik. Personlig erfaring medfører overordnet en mere positiv holdning til anvendelsen af farmakogenetik i den medicinske behandling, og den mindst positive holdning findes blandt personer, der aldrig er blevet testet. 81 procent af de deltagere, som selv er blevet testet, opfatter den farmakogenetisk bestemte behandling som bedre end nuværende, mens andelen blot er 68 procent blandt de øvrige deltagere.

Viden fremmer accept

Størstedelen af deltagerne i undersøgelsen vurderer, at en farmakogenetisk bestemt behandling er bedre end den nuværende behandling, og det er tydeligvis en vigtig grund til deres generelt meget positive holdning til anvendelsen af farmakogenetik.

Et interessant aspekt er, at deltagere, som dagligt tager medicin, er mere forbeholdne end andre over for personligt at anvende farmakogenetik i den medicinske behandling. Det kan skyldes, at mennesker med et stort medicinbrug vil blive mest berørt af indførelsen af farmakogenetik, hvorfor de i højere grad må ændre deres hverdag og livssyn. Derfor kan disse personer have brug for et højere niveau af tryk for at acceptere den nye behandlingsform.

For at skabe tryk over for farmakogenetik er det nødvendigt, at befolkningen får bedre kendskab til udviklingen på området. Udbredelse af viden er således væsentligt for at opnå en positiv holdning til gentests og anvendelsen i den farmakoterapeutiske behandling. Vore resultater er i overensstemmelse med tidligere undersøgelser, som har vist, at når bevidstheden om både fordele og ulemper ved gentests øges, så stiger graden af accept tilsvarende.

Kroppens egne cannabinoider påvirker immunsystemet

Cannabis Sativa.
Forbudt rusmiddel
– fremtidens medicin?

Hash er et af de mest brugte illegale rusmidler i verden, men bag den ulovlige facade er der ved at åbne sig et hav af muligheder for at udnytte hash medicinsk. Hamp indeholder stoffer med gavnlige effekter til behandling af en række sygdomme; fra cancer til Alzheimers syge.

Af Matilda Degn, Gitte Petersen, Harald S. Hansen, og Trine Meldgaard Lund

Hash har været kendt i årtusinder og er beskrevet i tidlige medicinske skrifter på hindi og kinesisk. I Europa fik man øje på hashen på Napoleons tid i forbindelse med hans ekspeditioner til Ægypten. Dengang blev hash brugt som sove-middel og som krampestillende og smertelindrende medicin. Efterhånden som den euforiserende effekt blev kendt i den vestlige verden, blev hashen i stigende grad brugt og misbrugt som rusmiddel, og import har siden 1920'erne og 1930'erne været forbudt i de fleste lande. Mange ved sikkert, enten fra personlig erfaring eller fra mediernes omtale, at hash påvirker hjernen og virker euforiserende, sløvende og appetitstimulerende. Desuden er hash i stand til at mindske kvalme. Alle disse effekter skyldes det aktive stof i hamplanten; Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Når THC binder sig til G-protein-koblede cannabinoid receptorer på nervecellerne påvirkes signalprocesserne i hjernen. Mindre kendt er det, at THC også dæmper immunsystemet.

Receptorer og signalstoffer

De to vigtigste og mest velkarakteriserede receptorer for THC er cannabinoid receptor 1 (CB1), der hovedsagelig fin-

des i nerveceller, og cannabinoid receptor 2 (CB2), som udelukkende udtrykkes af immunceller.

Set ud fra en farmaceutisk synsvinkel er den vævsspecifikke forekomst af de to typer receptorer en fordel, fordi det er muligt at udvikle stoffer, der specifikt aktiverer eller blokerer CB2. På den måde kan man påvirke immunsystemet uden at påvirke nervesystemet, og med sådanne stoffer vil det være muligt at undgå euforiserende bivirkninger, som udelukkende medieres af CB1.

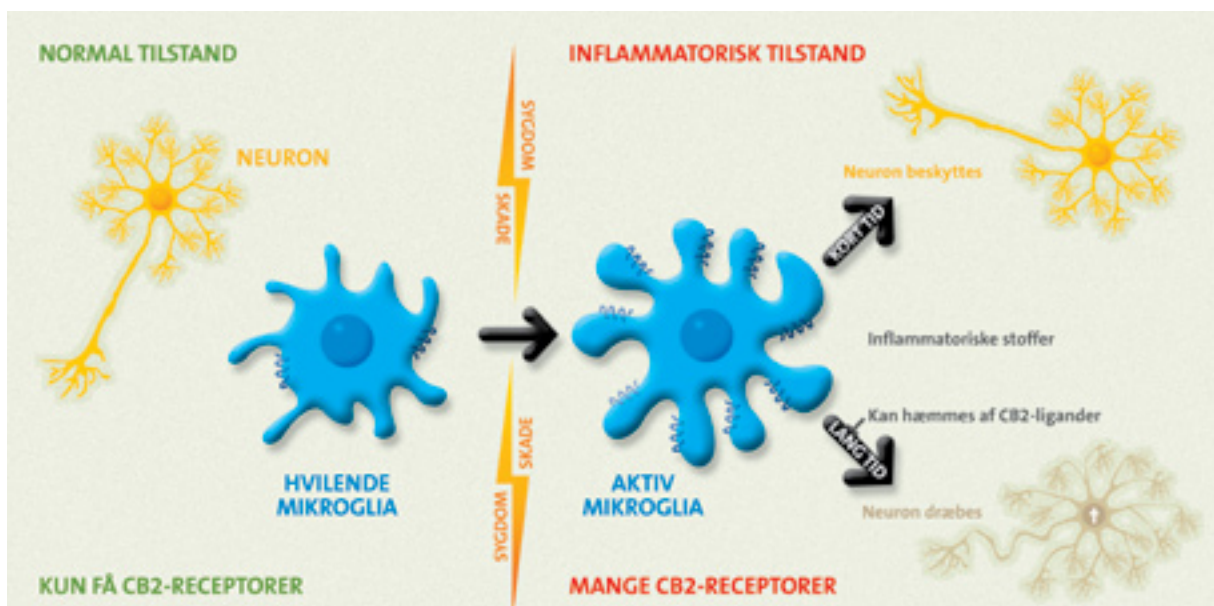
De cannabinoid receptorer kan ikke blot aktiveres af THC. Kroppen danner sine egne hashlignende stoffer, endocannabinoider, og i dag kender man to af dem: Anandamid (AEA) og 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Begge stoffer syntetiseres ud fra fedtstofferne i cellemembranen ved hjælp af enzymatisk regulerede processer.

I hjernen dannes endocannabinoider både af nerveceller, gliaceller og immunceller. Hvis hjernen bliver udsat for et kraftigt slag eller andre traumer, f.eks. en blodprop, akkumuleres endocannabinoiderne. Det vides endnu ikke med sikkerhed, om denne stigning i mængden af endocannabinoider spiller en rolle for sygdomsudviklingen, men det formodes, at stofferne er med til at regulere immunresponset. Nøje regulering af immunresponset er essentielt for at forhindre, at aktiverede immunceller påfører hjernen yderligere skade efter traumer og for at sikre, at de aktiverede immunceller vender tilbage til hvilestadiet, når deres arbejde er gjort.

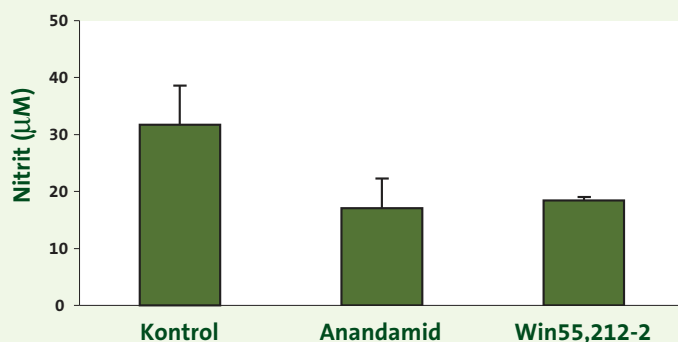
Hjernens immunforsvar

Hjernen har sine egne immunceller, mikroglia-cellerne, der minder meget om makrofager; immunceller, som opspo-

Til venstre: Mikroglia-celler er hjernens immunceller. I den raske hjerne er cellerne i dvale. Til højre: Ved sygdom eller akutte traumer aktiveres mikroglia-cellerne og frigiver inflammatoriske stoffer, som på kort sigt beskytter nervecellerne. Ved fortsat aktivitet skades neuro-nerne imidlertid. Disse skadevirkninger kan sandsynligvis dæmpes via det endocannabinoid system.



Måling af nitrogenoxid-metabolitten nitrit i mikroglia-celler



Nitrogenoxid er markør for inflammation i nervesystemet. Grafen viser hæmning i frigivelsen af nitrogenoxid – målt som metabolitten nitrit – i aktiverede mikroglia-celler behandlet et døgn med enten endocannabinoidet anandamid eller med det syntetiske cannabinoid Win 55,212-2.



Cand. scient. Matilda Degn er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Ph.d. Gitte Petersen er adjunkt ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Dr. scient. Harald S. Hansen er docent ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Ph.d. Trine Meldgaard Lund er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

rer og nedbryder fremmede stoffer og mikroorganismer i kroppen.

Mikroglia-cellerne ligger normalt i dvale i hjernen, men efter stimulering begynder de at dele sig og påtage sig nye funktioner. Cellerne bevæger sig hen til det skadede område i hjernen, og her frigiver de forskellige inflammatoriske signalstoffer som cytokiner og nitrogenoxid. Dette er med til at udrydde invaderende mikroorganismer og fjerne døde celler fra vævet.

Når mikroglia-cellerne har udfyldt deres rolle i immunforsvarets respons, deaktiveres de eller går i apoptose, som er en form for programmeret celledød. At det sker, er uhyre vigtigt, fordi en vedvarende aktivering af mikroglia-cellerne kan være med til at skade de raske nerveceller og på den måde forværre sygdommen.

Som regel aftager inflammationen automatisk og forsvinder helt igen, men i nogle sygdomme, f.eks. hos patienter med Alzheimers syge og multipel sklerose, har man observeret en konstant tilstedeværelse af aktiverede mikroglia-celler i de sygdomsramte områder. De specifikke mekanismer kendes endnu ikke, men man håber på, at en hæmning af den inflammatoriske reaktion kan være med til at sætte sygdomsprocesserne i bero.

THC dæmper immunsystemet

I midten af 1980'erne observerede man for første gang, at det cannabinoide system kan hæmme immunforsvaret.

Det skete i forsøg med mus, der blev brugt som en model for sepsis; en dødsensfarlig tilstand, der bl.a. kan opstå ved bakteriel blodforgiftning. Forsøgene viste, at THC nedsatte koncentrationen af interferon, der udskilles af immunforsvarets celler. Det blev startskuddet til forskning i THC's påvirkning af immunsystemet.

I vores gruppe har vi arbejdet med et modelsystem for bakteriel inflammation i hjernen. I systemet aktiveres cellekulturer af makrofager og mikroglia-celler med lipopolysaccharid, et stof der kommer fra bakteriers cellevæg. Efter aktiveringen af immuncellerne i kulturen behandles de med fysiologisk relevante koncentrationer af endocannabi-

noider. I denne model finder vi, at mængden af interleukinet IL-6 og det neurotoksiske signalstof nitrogenoxid falder markant efter et døgn. Begge stoffer er markører for inflammation i nervesystemet, og vores eksperimenter tyder derfor på, at endocannabinoider kan hæmme immuncellernes aktivering.

Efterhånden har en del studier givet tilsvarende resultater både i cellekulturer og i dyreforsøg, og det er derfor ret vel-dokumenteret, at stimulering af CB2-receptoren med endocannabinoider eller syntetiske analoger dæmper det celledierede immunrespons.

Nervedød og inflammation

Et oplagt mål for terapeutisk behandling via det cannabinoide system er de kronisk neurodegenerative sygdomme som Alzheimers, Parkinsons og Huntingtons syge, der skyldes, at nervecellerne henfalder og dør.

I en rottemodel for Alzheimers syge er det vist, at rotter, der fik cannabinoid, ikke havde aktiverede mikroglia-celler, og at dyrenes mentale funktion blev forbedret. Resultatet indikerer, at cannabinoider kan udvikles til at blive et lægemiddel, som kan bremse nervedøden hos patienter med Alzheimers syge.

På tilsvarende vis er der opnået meget lovende resultater i modeller for multipel sklerose, hjerneblødninger og forskellige former for iskæmi. Potentielt kan cannabinoide stoffer også være virksomme over for andre inflammatoriske lidelser i og uden for hjernen ved at hæmme dannelsen af cytokiner og andre inflammatoriske stoffer.

Flere store farmaceutiske virksomheder arbejder derfor på højtryk for at udvikle cannabinoide stoffer, der virker specifikt på CB2-receptoren. En anden, farmakologisk meget interessant mulighed er at hæmme de enzymer, der nedbryder endocannabinoiderne, hvilket vil øge koncentrationen af de endocannabinoider, der naturligt dannes ved inflammation i hjernen. Det er muligt, at sådanne stoffer vil have færre bivirkninger end syntetiske cannabinoider, fordi man her benytter sig af kroppens naturlige forsvarsystem.

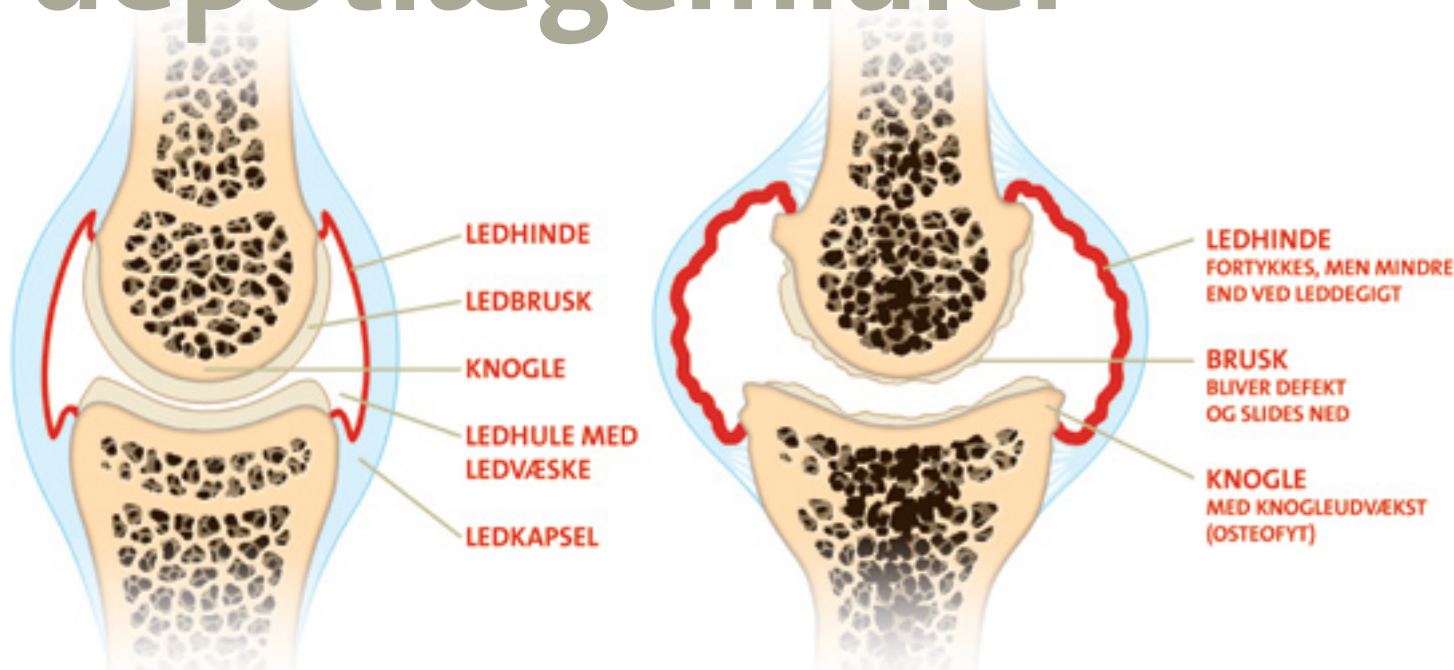
THC SOM MEDICIN

I begyndelsen af 1980'erne blev det klart, at hashrygning kan lindre voldsom kvalme hos kræftpatienter i kemoterapi og øge appetitten hos stærkt svækkede AIDS-patienter. I 1985 blev hashpillen Marinol godkendt som lægemiddel i USA og senere i Canada. I Danmark kan afkræftede patienter med kræft og AIDS få tabletter på dispensation, og fra 2003 har dispensationen omfattet sklerosepatienter med smerter og spasmer, som ikke kan behandles på anden vis. Der går imidlertid mindst en time, før effekten af

Marinol mærkes, og det har patienter med akutte smerter eller kvalme ikke altid tid til at vente på. Derfor foretrækker nogle at opnå lindring med en illegal joint, der virker indenfor ti minutter.

Dilemmaet er nu historie i Canada. I foråret 2005 godkendte Canada som det første land i verden et nyt hashlægemiddel til behandling af sklerosepatienter med kroniske smerter. Sativex, der indeholder ren THC, indtages som en spray under tungen, hvor medicinen trænger gennem slimhinden og hurtigt kommer ud i blodet.

Behandling af slidgigt med depotlægemidler



Til venstre et normalt knæled, til højre et et knæled med slidgigt. I raske led sikrer den elastiske ledbrusk god bevægelighed og lav gnidningsmodstand. Led med slidgigt er bl.a. karakteriseret ved et defekt og nedslidt brusklag.

I dag består behandlingen af slidgigt primært af smertelindring, og der er et stort behov for medicin, som kan modvirke selve sygdomsprocessen. Innovative depotlægemidler, som injiceres i ledkapslen, er en lovende mulighed.

Af Brian Thoning Pedersen, Susan Weng Larsen, Jesper Østergaard og Claus Selch Larsen

Medicin gives ofte i form af tabletter eller kapsler, som indtages gennem munden. Bagefter optages det aktive lægemiddelstof fra mave-tarmkanalen og transporteres med blodet hen til det sted i kroppen, hvor medicinen skal virke. Behandling af fx depressioner kræver således, at lægemiddelstoffet når frem til hjernen, mens et lægemiddelstof til

behandling af slidgigt skal ende i ledkapslerne.

Generelt forsyner blodet alle organismens organer og væv med næringsstoffer og ilt og fjerner samtidig affaldsstoffer. Lægemiddelstoffer, som indgives i form af tabletter fordeles således i hele kroppen via blodet. Derfor er det en forudsætning for oral indgift, at lægemiddelstoffet kun eller i altovervejende grad udøver sin effekt på det tiltænkte virkningssted i organismen.

Imidlertid er det karakteristisk for mange stærkt virkende lægemiddelstoffer, fx celledræbende stoffer til kemoterapi, at deres virkning er uspecifik. I sådanne tilfælde kan oral indgift føre til så alvorlige bivirkninger eller toksiske reaktioner, at det udelukker indgift i tabletform. Maksimal terapeutisk udnyttelse af disse ellers værdifulde stoffer kræver, at de indgives i eller tæt ved målområdet, hvilket i nogle situationer kun kan lade sig gøre via et kirurgisk indgreb. En lokaliseret effekt i kroppens større led som knæled og hoftelid kan opnås efter direkte indsprøjtning i ledhulen. Her udnytter man, at ledvæsken er adskilt fra blodet af ledhinden (synovialmembranen). Ved behandling af gigtssygdomme indgives medicinen i mildere tilfælde oralt, mens depotlægemidler med længerevarende effekt injiceres direkte i ledhulen i hårdt angrebne led.

I depotpræparaterne er fine partikler af det tungtopløselige lægemiddelstof opløst i en vandig væske. Partiklerne kan ikke selv forlade ledhulen og fjernes kun i forbindelse med, at stoffet går i opløsning i den vandige ledvæske, hvilket er en langsom proces, der kan vare adskillige uger

SLIDGIGT – EN FOLKESYGDOM

Slidgigt, som kan være stærkt invaliderende, er den hyppigst forekommende ledsygdom i Danmark og regnes i dag for en folkesygdom. Med alderen rammes stort set alle af slidgigt i et eller flere af kroppens led.

På røntgenbilleder ses forandringer hos 85 procent af alle mellem 55-64 år. Hos mindst en femtedel af alle over 40 år medfører slidgigt symptomer, bl.a. i form af smerter. Der findes i dag ingen behandling, som kan kurere sygdommen. Hos knap seks procent af den danske befolkning som helhed udgør leddegigt og slidgigt den hyppigste årsag til kroniske smerter, som skyldes, at ledfunktionen er forstyrret.

Behandlingen består i dag primært af smertelindring. Derfor er der et stort behov for kurative terapeutiske alternativer til forbedring af slidgigtpatienters livskvalitet.



Cand.pharm. Brian Thoning Pedersen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Susan W. Larsen er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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



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

afhængigt af stoffets vandopløselighed. De faste partikler udgør således et immobiliseret depot, fordi det kun er det opløste stof, som kan udøve en terapeutisk effekt.

Innovativt depotprincip

Ægte led som knæ, hofter og albuer har ledbrusk, ledhinde og ledvæske. Knogleenderne er belagt med elastisk ledbrusk, der sikrer en god bevægelighed og lav gnidningsmodstand. Led med slidgigt er bl.a. karakteriseret ved et defekt og nedslidt brusklag.

Bruskdannelsen er styret af en speciel celletype, chondrocytterne, hvis evne til at regulere bruskdannelsen er nedsat ved slidgigt. Inden for de senere år har man imidlertid observeret, at visse af kroppens egne vækstfaktorer er i stand til at stimulere chondrocytterne til at fremme dannelsen af brusk, og vækstfaktorerne har derfor et potentiale i behandlingen af slidgigt.

Vækstfaktorer er stærkt virkende peptider, som har forskellige virkninger mange steder i kroppen. Derfor er terapeutisk anvendelse formentlig betinget af, at peptiderne indgives direkte i ledkapslen for at minimere dosis og dermed risikoen for alvorlige bivirkninger. Peptiderne kan injiceres i et depotpræparat, hvorfra det aktive stof langsomt frigives til ledvæsken.

Vi har startet et projekt til belysning af muligheden for at designe depotpræparater indeholdende peptider, som stimulerer chondrocytterne til at danne brusk. Som et innovativt depotprincip har vi valgt at fokusere på præparater, hvor lægemiddelstoffet er opløst i en blanding af planteolier og specielle opløselighedsfremmende midler, kaldet cosolventer. Ved kontakt med den vandige ledvæske sker der en faseadskillelse, så cosolventet diffunderer ud i ledvæsken, mens peptidet udfældes som fast stof i olien. Herfra frigives det immobiliserede peptid langsomt i ledhulen.

Model og dyreforsøg

Vi har etableret en afgiftsmodel i laboratoriet, som muliggør simulering af et depots skæbne efter indgift i et led. Det næste mål er at opklare, hvordan peptidstrukturen og præparatets sammensætning påvirker stofafgiften fra depotet til ledvæsken og den videre diffusion af det frigjorte peptid fra ledhulen over i blodet.

Vi håber, at det er muligt matematisk at beskrive, hvor hurtig



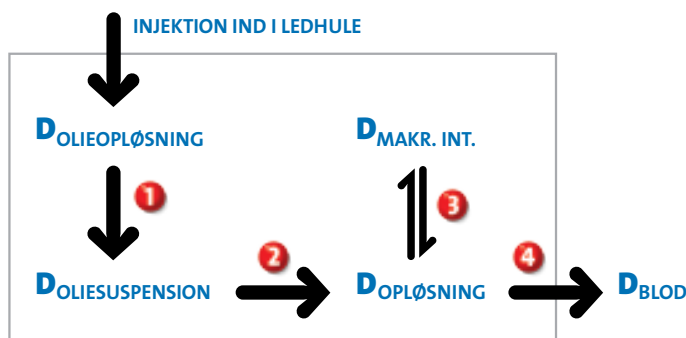
Inden injektionen er lægemiddelstoffet, et peptid, opløst i en olie-cosolvent-blanding (øverst). Blandingen indeholder specielle opløselighedsfremmende cosolventer, som er blandbare med både olie og vand, men som foretrækker vand frem for olie. Når præparatet kommer i kontakt med den vandige ledvæske, vil cosolventet derfor forlade olieblandingen og diffundere over i ledvæsken (midten). Peptidlægemidlet udfældes derved i oliefasen, hvorfra det langsomt frigives til det gigtramte led (nederst).

tigt det aktive stof forsvinder fra ledhulen baseret på en kortlægning af de involverede processers indbyrdes tidsafhængighed. På den måde vil vi få et mål for, hvor længe depotlægemidlet vil blive ved med at virke.

Hastigheden for stoftransporten ud af leddet er til enhver tid proportional med koncentration af frit lægemiddelstof i ledvæsken, og koncentrationen kan fx påvirkes af peptidets mulige binding til makromolekyler i ledvæsken. Desuden er det nødvendigt at kortlægge på systematisk vis, hvilke fysisk-kemiske karakteristika for såvel peptidet som olie-cosolventblandingen, der bestemmer omfanget af og hastigheden for peptidets udfældning. Endelig er det vigtigt at studere, på hvilken form stoffet udfældes, når udfældningen sker under betingelser, der simulerer de biologiske forhold i ledvæsken. Alle disse parametre forventes at påvirke stofafgiften fra de dannede oliesuspensioner markant.

Nu er det jo sådan, at en laboratoriemodel sjældent på optimal vis er i stand til at efterligne de komplekse forhold, der gør sig gældende i den levende organisme. Eksperimenterne i laboratoriet skal derfor sammenlignes med data fra dyreforsøg for at bekræfte, om vi er på rette vej med principper for depotlægemidler til helbredende behandling af slidgigt.

En simplificeret oversigt over processer, der kan influere på peptiders opholdstid i et knæled efter injektion af en opløsning af lægemiddelstoffet i en olie-cosolventblanding. Ved kontakt med den vandige ledvæske fælder peptidet ud i olien (1). Fra det immobile depot afgives peptidet til ledvæsken (2). Det er den frie koncentration af peptidet, der bestemmer hastigheden for stoftransporten ud af knæleddet (4). Mængden af frit lægemiddelstof påvirkes af peptidets evne til at interagere (reversibelt) med makromolekyler i ledvæsken og synovialmembranen (3).



Husstøvmider indeholder flere forskellige allergener, bl.a. allergenet Der f 2.

Modificerede allergener til allergivacciner

Allergi er blevet en folkesygdom. Undersøgelser af de allergifremkaldende stoffers struktur og vekselvirkning med immunforsvarets antistoffer er et vigtigt skridt til forbedring af behandlingen af allergi.

Af Birthe Ross Johannessen, Lars K. Skov, Jette Sandholm Kastrup og Michael Gajhede

Det er en dejlig sommerdag, vejret er skønt og solen skinner. De fleste er ude og nyde det gode vejr, men det er ikke en selvfølge for alle. For pollenallergikere er det meget ubehageligt at gå en tur på en sommerdag, fordi det giver løbende næse og røde, irriterede øjne. Over en million danskere lider af en eller anden form for allergi og generes i større eller mindre grad af det. Antallet er stadig stigende. Det er fortsat et mysterium, hvorfor vi bliver allergiske, men det står helt klart, at lidelsen er relateret til fejlfunktioner i vores immunforsvar. Immunsystemets opgave er at forsvare os, når der kommer fremmede stoffer eller organismer ind i kroppen, for eksempel parasitter, bakterier og vira eller normalt uskadelige stoffer fra birkepollen eller husstøvmider. Når et stof er identificeret som fremmed, binder kroppens antistoffer sig til det fremmede stof og sørger for, at stoffet bliver optaget af celletyper, som kan nedbryde det.

Imidlertid kan der ske fejl i immunsystemet, så stoffer fra for eksempel birkepollen forårsager, at der dannes større mængder af andre antistoffer end de mest almindelige. Im-

munsystemets celler i kroppen vil nu reagere over for det fremmede stof ved at udsende histaminer, som skaber ubehag i form af kløe, nysen og rindende øjne.

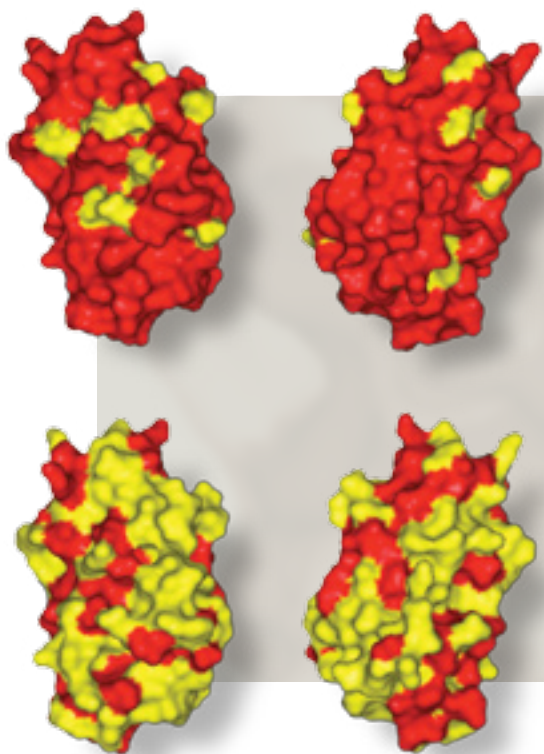
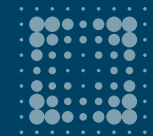
Allergener, allergi og vaccination

Allergener er stoffer, som fremkalder en allergisk reaktion. De kan for eksempel komme fra græspollen og birkepollen, husstøvmider eller døde hudceller fra hunde og katte.

Forskellige slags molekyler med vidt forskellige funktioner kan være allergener. Nogle allergener virker for eksempel som enzymer, men mange allergeners funktion er ukendt, og præcis, hvad der gør et stof til et allergen, er endnu uopklaret. Det er heller ikke entydigt fastlagt, hvorfor nogle mennesker udvikler allergier og andre slet ikke. Endnu et ubesvaret spørgsmål er, hvorfor nogle individer er allergiske over for stoffer fra birkepollen og andre over for stoffer fra kattepel.

Mange lægemidler kan dæmpe symptomerne på allergi, men vaccination er den eneste behandling, der kan helbrede sygdommen. Vaccinationen behandler både symptomerne og selve årsagen til allergien. Når en allergiker vaccineres med relativt store mængder af allergenet over en længere periode, vil de allergiske symptomer mindskes, og ofte bliver man helt helbredt for sin allergi. Allergivaccinen forebygger også udvikling af astma, som ofte opstår hos allergikere.

Der kan dog være bivirkninger ved vaccinen. Ved indsprøjtninger af allergenet kan der i sjældne tilfælde ske det sam-



Øverst sammenlignes overfladerne af allergenerne Der f 2 og Der p 2, som stammer fra nært beslægtede husstøvmider. Figuren til højre er drejet 180 grader. Ens områder i de to allergener er farvet røde, og forskellige områder er farvet gule. Det ses, at overfladen på de to allergener er næsten ens, og det indikerer, at allergenerne krydsreagerer, fordi de vil se ens ud for et antistof. Nederst sammenlignes overfladen af Der f 2 med overfladen af allergenet Lep d 2, der stammer fra en fjernt beslægtet husstøvmide. Farverne viser, at de to allergener er meget forskellige. Derfor er der ikke så stor sandsynlighed for, at allergikere vil opleve krydsreaktivitet mellem de to midearter.



Cand.scient. Birthe Ross Johannessen er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d., cand.scient. Lars K. Skov er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.

me som ved inhalation af stoffet, og der kan komme en akut, allergisk reaktion, som fører til blodtryksfald, opkastning og åndedrætsbesvær. Bivirkningerne kan i allerværste tilfælde være dødelige.

Proteinoverflader og krydsreaktivitet

En måde at prøve at undgå disse bivirkninger er at forsøge at ændre styrken af vekselvirkningerne mellem allergenerne i vaccinen og immunsystemets molekyler, så immunforsvaret reagerer hensigtsmæssigt på vaccinationen. For at kunne modificere vekselvirkningen er det vigtigt at kende allergenernes overflade og dermed deres tredimensionelle struktur. Overfladen på allergenet er bestemmende for, hvordan kroppen vil reagere, fordi det er på overfladen, at immunsystemets antistoffer bindes. Selv små ændringer på allergenets overflade kan ændre antistoffernes binding og dermed forandre immunsystemets måde at reagere på. Allergener er næsten altid proteiner, og et allergens reaktion med immunsystemets molekyler kan forandres markant

ved en minimal ændring af proteinets overflade, for eksempel udskiftning af en aminosyre. Små ændringer på allergenets overflade kan derfor også medføre, at de ubehagelige bivirkninger ved allergivaccinen undgås.

Med kendskab til allergenernes overflade kan man også bedre forudsige hvilke andre allergener, der kan forårsage, at en allergiker oplever krydsreaktivitet mellem forskellige allergikilder. Allergikere oplever ofte krydsreaktivitet, for eksempel er det almindeligt at være allergisk over for både birkepollen og visse æbler. Det skyldes, at æbler og birkepollen indeholder allergener med overflader, som er meget lig hinanden.

I samarbejde med firmaet ALK-Abelló, som producerer allergivacciner, har vi bestemt den tredimensionelle struktur og analyseret krydsreaktivitet for en række allergener, bl.a. allergenet Der f 2, som udskilles af husstøvmider. Kendskabet til disse strukturer af allergener er et skridt på vejen mod sikrere allergivacciner.



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



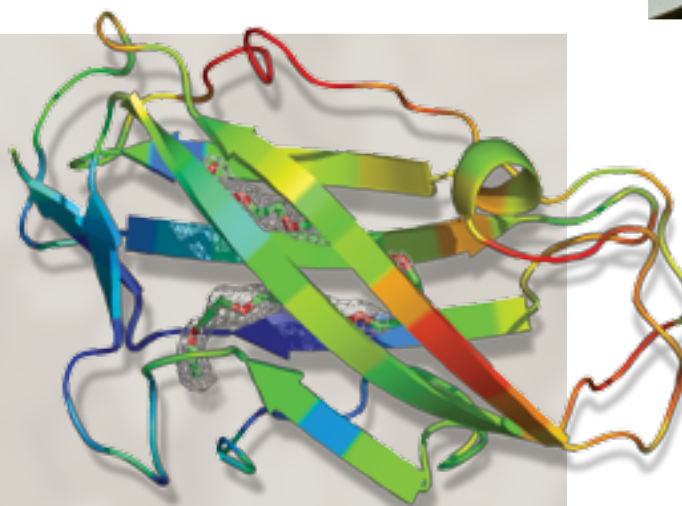
Ph.d., cand.scient. Michael Gajhede er professor ved Institut for Medicinalkemi.

ALLERGENER ER OFTEST PROTEINER

Allergener er normalt proteiner. Proteiner er opbygget af en lang kæde af byggesten, som kaldes aminosyrer. Der findes 20 forskellige naturligt forekommende aminosyrer.

Kæden af aminosyrer folder sig sammen på en bestemt måde og danner således proteinets tredimensionelle struktur, som bestemmer dets funktion. Når strukturen er kendt, kan man analysere sammenhængen mellem proteinets struktur og dets funktion og undersøge, hvordan proteinet vekselvirker med andre proteiner på atomart niveau.

Allergenet Der f 2 fra husstøvmider er et protein, som er opbygget af 129 aminosyrer. Proteinets struktur danner nærmest en sandwich med et indvendigt hulrum, hvor der er fanget et andet molekyle. Den biologiske funktion af Der f 2 kendes endnu ikke.



Tredimensionel struktur af allergenet Der f 2

Tanker koster energi, men hvad lever hjerneceller af?

Hjernen foretrækker energi i form af glukose, men ny forskning viser, at hjernens sukkerlager, glykogen, muligvis spiller en rolle i det interne energiregnskab. Måske medvirker glykogen også til, at personer med langvarig insulinkrævende diabetes kan blive ude af stand til at mærke, når deres blodsukker falder.

Af Helle S. Waagepetersen, Helle M. Sickmann, Lasse K. Bak og Arne Schousboe

Menneskets hjerne udgør kun to procent af den totale kropsvægt, men står for en femtedel af menneskets samlede energiforbrug. Som helhed foretrækker hjernen at dække sit behov med sukker i form af glukose, men tingene er mere komplicerede end som så. Hjernen består nemlig af forskellige celletyper, som har forskellige fordøjelsesmuligheder, og som ikke har lige adgang til køleskabet, nemlig blodbanen. Hjernens sukkerlager af glykogen er part i spillet, men dets rolle er i store træk uafklaret, både under normale og sygdomsrelaterede tilstande.

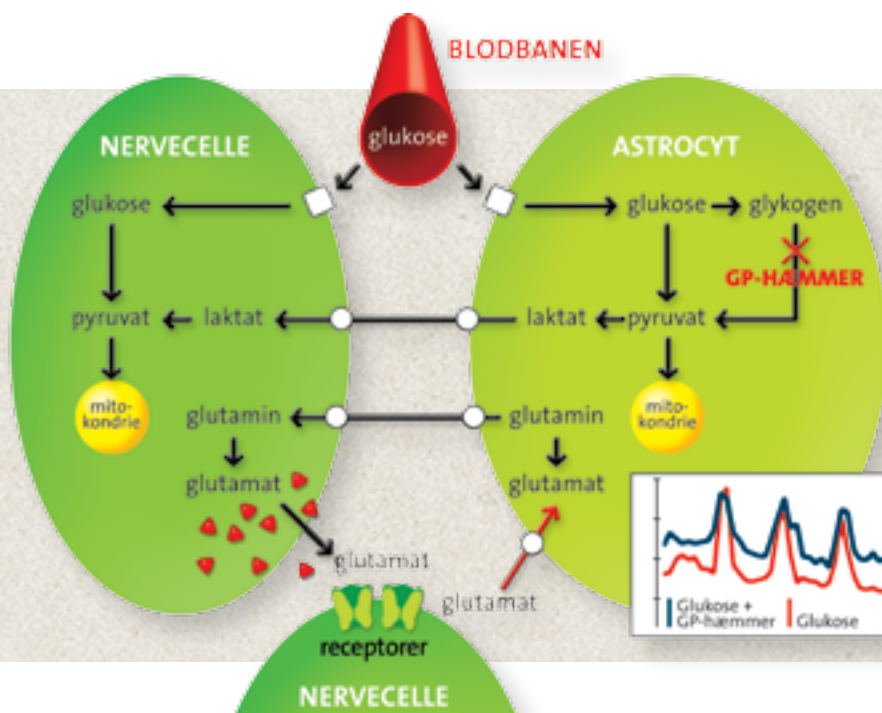
Hjernens energiforbrug

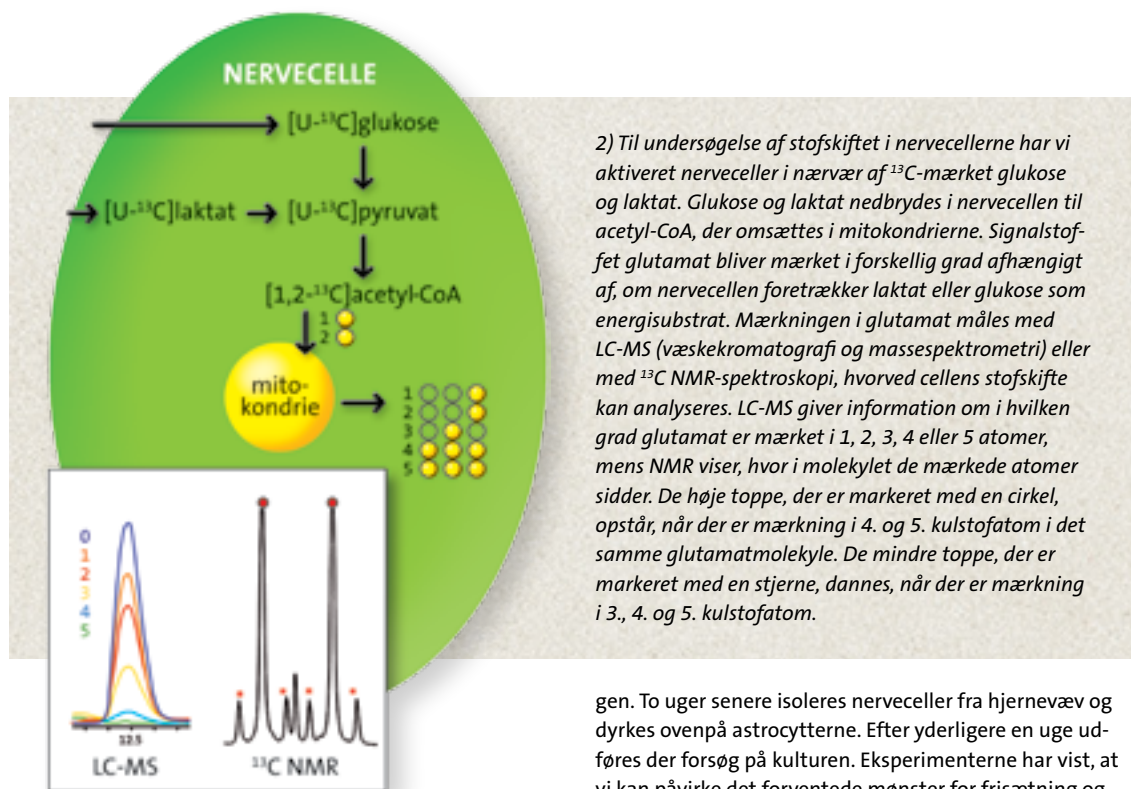
Størstedelen af hjernens energiforbrug går til at videre-

bringe elektriske signaler igennem den enkelte nervecelle og sende kemiske signaler mellem nervecellerne. Desuden anvender hjernens støtceller, astrocytterne, energi på at hjælpe nervecellerne med at opretholde den kemiske nerve-transmission. Nervecellerne er tæt omgivet af astrocytter, og specielt i menneskets hjerne er antallet af astrocytter flere gange højere end antallet af nerveceller.

Nervetransmissionen, som sker i en spalte mellem to nerveender, synapsekløften, kan enten være hæmmende eller stimulerende på den modtagende nervecelle. Glutamat er det mest udbredte stimulerende signalstof i hjernen. Nerveceller, som udsender glutamat, pakker signalstoffet i små vesikler for at opkoncentrere det i nerveenden, og pakningen er en af de processer, der koster energi. Efter at glutamat har aktiveret den modtagende nervecelle via receptorer i cellemembranen, skal signalstoffet fjernes fra synapsekløften. Det sker i stor udstrækning ved optagelse i astrocytter, hvilket også er en energikrævende proces. Astrocytten bruger desuden energi på at omdanne en del af glutamaten til glutamin, et forstadium til glutamat, der kan blive transporteret tilbage til nervecellen for at dække tabet af glutamat ved nervetransmissionen.

1) Astrocytter og nerveceller optager energi i form af glukose fra blodbanen. Astrocytterne kan lagre energien i glykogen eller producere pyruvat. Pyruvat bliver enten omsat til CO₂ i mitokondrierne, cellens kraftværker, eller reduceret til laktat. Laktat, der frisættes fra astrocytter, kan optages af nerveceller, omdannes til pyruvat og omsættes i mitokondrierne. Glutamat er et stimulerende signalstof, der efter aktivering af den modtagende nervecelle, optages af astrocytten, hvilket forbruger energi. Astrocytten bruger også energi på at omdanne glutamat til glutamin, der frisættes og optages af nervecellen. Glutamin er derefter forstadium til glutamat. Enzymet glykogen phosphorylase (GP) nedbryder glykogen til pyruvat, når der er brug for hurtig energi.





2) Til undersøgelse af stofskiftet i nervecellerne har vi aktiveret nerveceller i nærvær af ¹³C-mærket glukose og laktat. Glukose og laktat nedbrydes i nervecellen til acetyl-CoA, der omsættes i mitokondrierne. Signalstoffet glutamat bliver mærket i forskellig grad afhængigt af, om nervecellen foretrækker laktat eller glukose som energisubstrat. Mærkningen i glutamat måles med LC-MS (væskekromatografi og massespektrometri) eller med ¹³C NMR-spektroskopi, hvorved cellens stofskifte kan analyseres. LC-MS giver information om i hvilken grad glutamat er mærket i 1, 2, 3, 4 eller 5 atomer, mens NMR viser, hvor i molekylet de mærkede atomer sidder. De høje toppe, der er markeret med en cirkel, opstår, når der er mærkning i 4. og 5. kulstofatom i det samme glutamatmolekyle. De mindre toppe, der er markeret med en stjerne, dannes, når der er mærkning i 3., 4. og 5. kulstofatom.

Glukose eller laktat?

Hjernen foretrækker glukose som energisubstrat og skal have en konstant tilførsel af såvel ilt som glukose for at fungere optimalt. Glukose bliver transporteret ind fra blodbanen, og på de fine blodkar i hjernen, kapillærerne, sidder astrocytternes udløbere klar til at optage glukosemolekylerne.

I astrocytterne kan glukose blive nedbrudt til pyruvat, der enten kan reduceres til laktat eller omsættes oxidativt til CO₂ i cellens kraftværker, mitokondrierne. Alternativt kan astrocytterne lagre glukosen i form af glykogen.

Glukose bliver også optaget af nerveceller, men de fleste nerveceller har ikke på samme vis direkte kontakt til kapillærerne. Det har fostret en ide om, at hovedparten af glukosen bliver optaget af astrocytter, hvorpå astrocytterne nedbryder glukosen til laktat, som transporteres videre til oxidativ omsætning i omkringliggende nerveceller.

I hvor stor udstrækning det er glukose eller laktat, som er det foretrukne energisubstrat for nerveceller, og om dette er afhængigt af nervecellernes aktivitet er to spørgsmål, som har været genstand for heftig debat. Vi har udført forsøg på nerveceller i kultur, der viser, at nerveceller har det fint med at omsætte laktat, men hvis de bliver aktiveret, forøger de deres forbrug og omsætning af glukose og ned sætter samtidigt omsætningen af laktat.

Hjernens sukkerlager – glykogen

Hjernens sukkerlager, glykogen, er et specielt forgrenet molekyle, der indeholder omkring 53.000 glukosemolekyler. Glykogen findes kun i astrocytter. Den forgrenede karakter gør, at enzymet, der nedbryder glykogen, glykogen phosphorylase, har mange angrebepunkter, og glykogen kan derfor nedbrydes hurtigt ved behov. Hvorvidt glykogen er af betydning for hjernens funktion under normale omstændigheder er endnu uklart, men det er et af de spørgsmål vi deltager i opklaringen af.

Vi anvender to forskellige modeller. På DFU arbejder vi med en cellekultur af astrocytter og nerveceller. Hjernevæv fra mus udtages, hvorefter astrocytterne isoleres ved dyrknin-

gen. To uger senere isoleres nerveceller fra hjernevæv og dyrkes ovenpå astrocytterne. Efter yderligere en uge udføres der forsøg på kulturen. Eksperimenterne har vist, at vi kan påvirke det forventede mønster for frisætning og optagelse af glutamat ved at hæmme nedbrydningen af glykogen, selv i nærvær af en fysiologisk koncentration af glukose.

I samarbejde med en amerikansk forskningsgruppe i Seattle har vi udført forsøg på musens synsnerve, der er en del af hjernen. Vi udsatte den isolerede nerve for intens elektrisk stimulation og fandt, at den var afhængig af de omkringliggende astrocytters glykogenlager for at fungere optimalt. I den sammenhæng er det logisk at stille spørgsmålet: Hvordan kan glykogen overhovedet være vigtig i nærvær af en fysiologisk koncentration af glukose? Flere faktorer kan gøre sig gældende. Astrocytter har lange og tynde udløbere, der i enderne er så tynde, at der ikke er plads til mitokondrier. Det vil sige, astrocytter i disse områder ikke har mulighed for oxidativt at omsætte pyruvat og producere store mængder energi ad den vej. Det er samtidigt områder, hvor der kan være behov for hurtig energi til at få glutamat fjernet fra synapsekløften. Et behov som glukose fra blodbanen ikke nødvendigvis kan honorere, men derimod er lagret glukose i form af glykogen måske klar på rette tid og sted.

Er glykogen årsag til manglende føling?

Diabetespatienter, der har været insulinkrævende i flere år, kan udvikle en manglende føling af lavt blodglukose, dvs. blive ude af stand til at mærke et fald i blodsukkeret. Tilstanden kan være livstruende, fordi patienten ikke har mulighed for at reagere på tilstanden og indtage sukker. Omkring en fjerdedel af patienterne med type 1 diabetes udvikler manglende føling, og tilstanden kan opstå, hvis patienten for ofte er udsat for lavt blodglukose. Hjernens glykogenlager er under mistanke for at være en bagvedliggende årsag til den manglende føling. Hvis man udsætter en rotte for lavt blodglukose, vil rotten reagere med et forhøjet glykogenindhold i hjernens astrocytter. Et sådant lager vil senere kunne bruges som energikilde til omkringliggende nerveceller via laktat. De nerveceller i hjernen, der skal føle den lave blodglukose får dermed dækket deres energibehov og vil ikke opfatte truslen om, at kroppen lider af mangel på sukker.



Ph.d. Helle Waagepetersen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Cand.pharm. Helle M. Sickmann er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Cand.pharm. Lasse K. Bak er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Dr.scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Hvordan virker fantasy i hjernen?

GHB – også kendt som fantasy – findes naturligt i hjernen, og forskere på DFU forsøger nu at opklare stoffets funktion. Målet er at udvikle nye stoffer, som er mere aktive end GHB, og som har potentielle medicinske anvendelsesmuligheder.

Af Signe Høg, Petrine Wellendorph, Jeremy R. Greenwood og Rasmus Prætorius Clausen

γ -Hydroxysmørsyre (GHB) findes naturligt i hjernen, og stoffet har siden 1970'erne været anvendt medicinsk som bedøvelsesmiddel, til behandling af søvnløshed og til smertelindring ved fødsler. I de senere årtier er GHB blevet misbrugt som et muskelopbyggende stof af bodybuildere, og mange har eksperimenteret med GHB som et afslappende og seksuelt stimulerende rusmiddel. Alligevel ved vi ikke

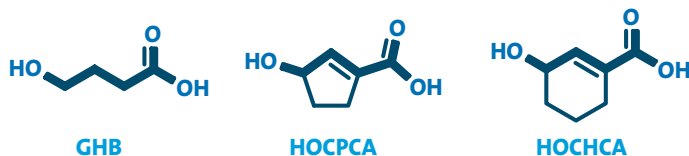
præcist, hvordan stoffet virker, og vi ved heller ikke, hvilken funktion den naturlige forekomst af GHB har i hjernen.

GHB er en kemisk forbindelse i centralnervesystemet, og stoffet dannes hovedsageligt ud fra hjernens vigtigste hæmmende signalstof γ -aminosmørsyre (GABA). GHB genkendes både af specifikke GHB-bindingslommer i hjernen og af en gruppe GABA-receptorer, der kaldes GABA_B-receptorer. GABA_B-receptorernes funktion i hjernen er kendt, men det er uklart, hvilken betydning de specifikke GHB-bindingslommer har for GHB's virkning.

I knock-out mus, dvs. mus uden GABA_B-receptorer, genkendes GHB af GHB-bindingslommerne i hjernen, men mange af de kendte fysiologiske effekter kan ikke påvises i muse. Det tyder på, at GABA_B-receptorerne medierer størstedelen af de virkninger, der optræder ved indtagelse af GHB. GHB kan dog sagtens have nogle effekter på bindingslommerne, der ikke er opdaget endnu, og der kan også være virkninger i mennesker, som ikke optræder i mus. Da disse effekter kan have stor betydning for terapeutisk anvendelse af GHB og beslægtede stoffer, er der interesse i at opklare betydningen af de specifikke GHB-bindingslommer.

Påvirker kun GHB-bindingslommer

Ved at fremstille stoffer, der ligner GHB og dermed genkendes af GHB-bindingslommerne, men ikke af GABA_B-receptorerne, kan man undersøge de fysiologiske effekter, der alene skyldes GHB-bindingslommerne. Vi har derfor desig-



Ringstrukturen i de to analoger af GHB nedsætter molekylernes fleksibilitet, hvilket gør det nemmere at forudsige stoffernes rumlige facon i GHB-bindingslommerne.

FANTASY – THE DATE RAPE DRUG

GHB virker i moderate mængder beroligende, seksuelt stimulerende og søvnfremkaldende. I større doser kan GHB fremkalde koma. Virkningen afhænger meget af dosis, men varierer også fra person til person. Forskellen på den dosis, der giver en rus og den, der giver en alvorlig forgiftning, er lille, og derfor er risikoen for forgiftning stor ved brug af GHB. Kombinationen af alkohol og GHB er særlig farlig, da alkohol øger den sløvende virkning af GHB og dermed risikoen for koma. Der er indtil videre kun rapporteret ét dødsfald i Danmark som følge af GHB.

I 1980'erne startede bodybuildere med at misbruge GHB, som stimulerer dannelsen af væksthormon og

derfor har anabolsk effekt. I de følgende år steg udbredelsen af GHB som rusmiddel. GHB blev forbudt i USA i 1990 på grund af flere tilfælde af forgiftning, og Danmark fulgte trop i 1999. Alligevel er misbruget steget kraftigt i USA og England, og den samme tendens forventes i Danmark.

GHB bliver solgt under navne som Fantasy, Natural Power, ProG og Flydende Ecstasy. Det sidste navn er helt misvisende, fordi rigtig ecstasy i modsætning til GHB er et stærkt opkvikkende stof. GHB er også kendt som The Date Rape Drug, fordi stoffet er blevet brugt som bedøvelsesmiddel ved voldtægter, hvor GHB kommes i offerets drink, uden at det opdages.

net og fremstillet stofferne HOCPA og HOCHCA, som kun bliver genkendt af GHB-bindingslommerne. Stofferne vil derfor kunne afsløre effekter af GHB, der ikke er relateret til GABA.

Den rumlige struktur af GHB-bindingslommerne er ukendt, men ud fra de stoffer, som binder sig til dem, kan man få information om bindingslommernes størrelse og facon. Ved hjælp af computerberegninger analyserede vi nogle stoffer, der genkendes af GHB-bindingslommerne, og på den måde fik vi nogle ideer til, hvilken facon og form sådanne stoffer skal have. Dette førte til design og fremstilling af HOCPA og HOCHCA, der indeholder en ringstruktur i modsætning til GHB's lineære struktur. Ringen begrænser de to stoffers strukturelle fleksibilitet, hvilket gør det nemmere at forudsige stoffernes facon i bindingslommerne.

Derefter undersøgte vi HOCPA og HOCHCA's evne til at blive genkendt af GHB-bindingslommerne i rottehjerner. Både HOCPA og HOCHCA viste sig at binde henholdsvis 27 og 9 gange stærkere end GHB selv til GHB-bindingslommerne.

Udvikling af nye GHB stoffer

HOCPA og HOCHCA findes begge i spejlbilledformer, der er kemisk ens, men rumligt forskellige som højre og venstre hånd. Når et stof genkendes af en bindingslomme, skal det passe rumligt ind i lommen som en hånd, der glider ind i en handske. Derfor genkender bindingslommen normalt den ene spejlbilledform af et stof bedre end den anden form. Det er også tilfældet for HOCHCA og HOCPA; (R)-spejlbilledformerne binder 10-70 gange stærkere end (S)-former-

ne. (R)-HOCPA binder 39 gange bedre end GHB og er således et af de mest kraftigt bindende GHB-stoffer, der findes. Det kan dog godt tænkes, at man med udgangspunkt i HOCPA og HOCHCA kan udvikle nye stoffer, der er endnu mere aktive. Derfor er næste skridt at fremstille stoffer, der ligner HOCPA og HOCHCA, men med små ændringer, og undersøge, hvad ændringerne betyder for aktiviteten af stofferne. Når vi har udviklet et stof med høj aktivitet på GHB-bindingslommerne, vil vi mærke det radioaktivt og anvende det til at skabe ny forståelse for GHB-bindingslommernes funktion. Hvis det lykkes at opklare funktionen, åbnes der nye muligheder for at vurdere potentialet af lægemidler, som specifikt påvirker GHB-bindingslommen.

GHB SOM LÆGEMIDDEL

I 2001 blev GHB godkendt i USA som lægemiddel mod sygdommen narkolepsi under navnet Xyrem®. Narkolepsi er en sjælden sygdom, hvor folk pludselig kan falde i søvn, også selvom de er i gang med at spise eller snakke med andre. Patienter med narkolepsi oplever ofte anfald af muskelslaphed, hvor de taber ting ud af hånden, og i værre tilfælde kan patienten pludselig falde helt sammen. Medicinering med GHB har vist sig at nedsætte antallet af anfald, bl.a. fordi patienterne får en bedre nattesøvn. Nye potente analoger af GHB har et klinisk potentiale som medicin mod søvnforstyrrelser samt til afvæning af eksempelvis alkoholmisbrug.



Cand. pharm. Signe Høg er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



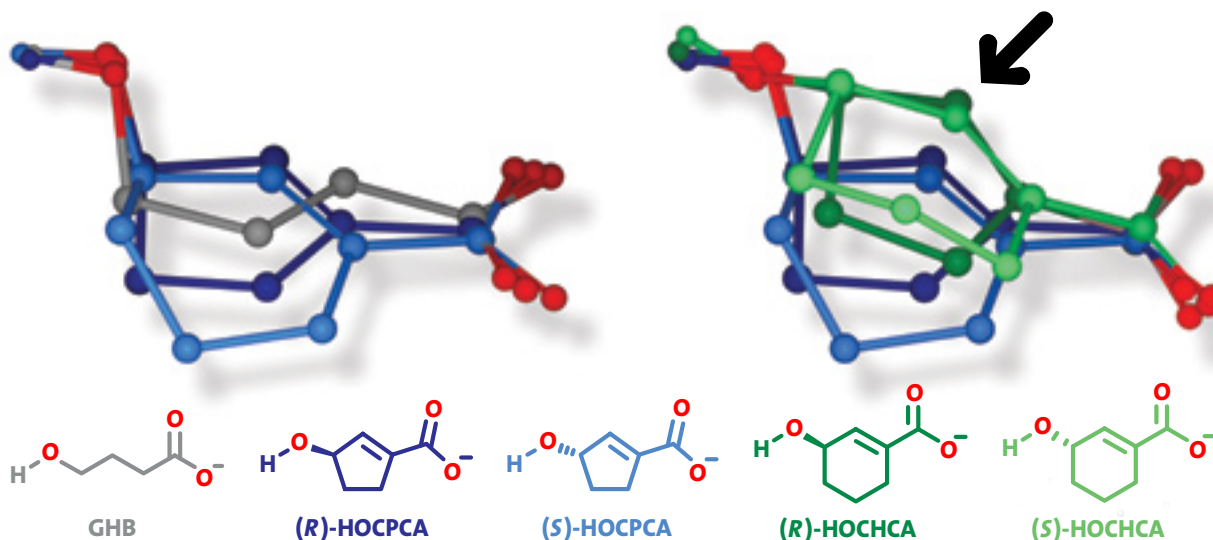
Cand. pharm. Petrine Wellendorph er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Jeremy R. Greenwood er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Rasmus Prætorius Clausen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ved hjælp af computerberegninger har vi sammenlignet HOCPA og HOCHCA med andre GHB-stoffer og opbygget en model over den facon, stofferne antager, når de genkendes af GHB-bindingslommerne. Via modellen opnår vi viden om lommernes størrelse, facon og andre molekylære egenskaber. Til venstre er GHB (grå) samt (R)-spejlbilledformerne af HOCPA (mørkeblå) og HOCHCA (lyseblå) vist, som de ser ud ved genkendelsen. Til højre ses (S)-spejlbilledformerne af HOCPA (mørkegrøn) og HOCHCA (lysegrøn) sammen med (R)-spejlbilled-

billedformerne af HOCPA (mørkeblå) og HOCHCA (lyseblå). (S)-spejlbilledformerne af HOCHCA og HOCPA binder 10-70 gange svagere end (R)-spejlbilledformerne og må derfor passe dårligere i GHB-bindingslommerne. (S)-spejlbilledformerne (grønne) rammer ind et område vist med pilen, som (R)-spejlbilledformerne (blå) ikke fylder ud. Pladsen kan være trang i dette område, og det kan være årsag til, at (S)-spejlbilledformerne passer dårligere i GHB-bindingslommerne og derfor binder svagere end (R)-spejlbilledformerne.

Nye mål for lægemidlers antiepileptiske effekt

De nuværende lægemidler mod epilepsi er ikke i stand til at forhindre eller reducere antallet af anfald hos alle patienter. For at udvikle antiepileptika med nye virkningsmekanismer er der behov for nye eller forbedrede dyremodeller for sygdommen.

Af Suzanne L. Hansen, Uffe Kristiansen og Henrik Tang Vestergaard

Omkring en procent af befolkningen lider af epilepsi, som er karakteriseret ved, at patienten oplever gentagne spontane bevidsthedsændringer og/eller motoriske forstyrrelser på grund af en synkroniseret overaktivitet af hjernens nerveceller.

Selv om der findes flere forskellige lægemidler på markedet til behandling af epilepsi, er det ikke altid muligt at opnå

en tilstrækkelig og tilfredsstillende behandling. En del patienter opnår ikke en reduktion i anfaldenes antal endelige anfaldsfrihed – på trods af, at patienterne behandles med flere forskellige typer antiepileptika. Denne gruppe af patienter betegnes som terapiresistente.

Samtidig oplever mange patienter en række bivirkninger ved den medicinske behandling, bl.a. sløvhed, depression og andre psykiske problemer samt vægtændringer. Desuden er der risiko for fosterskader i forbindelse med behandling under graviditet.

Den insufficiante behandling skyldes bl.a. en utilstrækkelig viden om, hvorfor og hvordan den synkroniserede overaktivitet opstår i hjernen. Derfor er der et stort behov for en øget forståelse af de cellulære forandringer, som ligger til grund for epilepsi. En sådan forståelse kan danne grundlag for udvikling af nye typer af antiepileptika med en forbedret terapeutisk profil.

Potentielle antiepileptika er traditionelt blevet fundet, og bliver det til dels stadig, ved screening i dyremodeller for epilepsi. Ved screeningen benyttes typisk den samme håndfuld dyremodeller, og det er sandsynligvis en medvirkende årsag til, at de eksisterende antiepileptika har et begrænset repertoire af virkningsmekanismer.

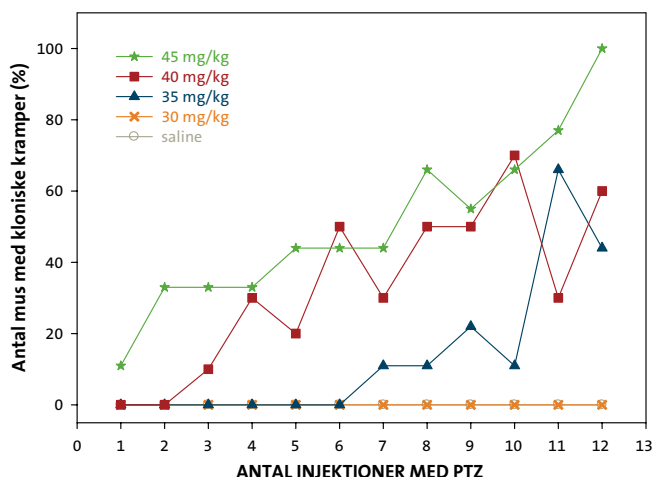
På den baggrund må man formode, at udvikling af nye dyremodeller for epilepsi eller forbedring af de eksisterende modeller vil fremme udviklingen af antiepileptika med nye virkningsmekanismer. I forbindelse med forbedring af eksisterende metoder bør det dyreetiske perspektiv ligeledes fremhæves.

En traditionel dyremodel

En af de problemstillinger, som vi beskæftiger os med i gruppen, er at udvikle nye dyremodeller og forbedre eksisterende metoder til at undersøge potentielle antiepileptikas virkning.

Vi har opsat og valideret en meget anvendt musemodel, hvor man bruger stoffet pentylentetrazol (PTZ) til at udløse epileptiske anfald, den såkaldte PTZ-kindlingmodel. Modellen menes bl.a. at kunne forudsige virkningen af antiepilep-

INCIDENS AF KLONISKE KRAMPER



En traditionel epilepsimodel: Jo flere stimuli, jo flere mus får kloniske kramper som følge af injektion med det krampefremkaldende stof pentylentetrazol (PTZ). Forekomsten af kramper er dosisafhængig.

55.000 DANSKERE HAR EPILEPSI

Ca. 55.000 danskere har epilepsi. De fleste får det enten som børn eller som ældre. Epileptiske anfald kommer som lyn fra en klar himmel, men der findes nogle generelle faktorer, som hos nogle øger risikoen for anfald, fx træthed, stress, alkohol og hormonelle forandringer. Epileptiske anfald opdeles i to hovedgrupper – generaliserede og partielle anfald. Ved generaliserede anfald begynder anfaldene centralt inde fra hjernen og spreder sig hurtigt til hele hjernen. Personen er ikke ved bevidsthed. Generaliserede anfald kan desuden vise sig som:

- Absencer
- Kramper i arme og ben, blå læber, skum om munden
- En pludselig slaphed af kroppens muskler, der medfører, at patienten falder om.

Partielle anfald involverer en begrænset del af hjernen. Hvis personen er helt vågen og klar, taler man om simple partielle anfald. Er personens bevidsthed derimod påvirket under anfaldet, er det et komplekst partielt

anfald. Partielle anfald kan fx vise sig som:

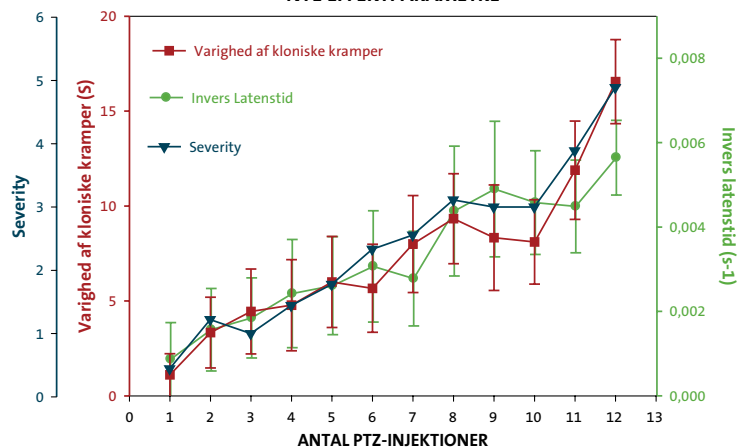
- Oplevelser af en særlig smag, lugt, lys eller lyd.
- Pludselig udbrud af kvalme og sved på panden.
- Trækninger i ansigt, arme og ben.

At leve med epilepsi

Epilepsi har stor betydning for livskvaliteten, fordi patienten hele tiden må tage hensyn til risikoen for pludselige anfald, som kan give anledning til frygt for ikke at slå til på arbejdspladsen eller negative reaktioner i omgangskredsen. Epilepsi kan også give problemer i forhold til parforhold og seksualitet og medføre manglende tro på fremtiden.

Samtidig kan epileptikere ikke have job som f.eks. pilot, lokomotivfører, erhvervschauffør, sømand og soldat. Derudover kan problemer med bivirkninger og hukommelsesvanskeligheder sætte nogle grænser. En europæisk undersøgelse af epilepsipatienters livskvalitet konkluderer, at færre anfald og færre bivirkninger er de to vigtigste måder at forbedre livskvaliteten hos patienterne.

NYE EFFEKTPARAMETRE



Den forbedrede model: De tre kurver viser, hvordan man kan anvende andre parametre end de traditionelle til at evaluere et krampeforløb hos musene. Det giver mulighed for at påvise nye virkningsprofiler af potentielle lægemiddelseffekter.

tika til behandling af kompleks partiel epilepsi, en type af epilepsi, hvor op imod 30 procent af patienterne er terapiresistente.

Oprikelig er modellen udviklet til at måle forekomsten af kloniske kramper, hvor musklerne trækkes sammen og afslappes flere gange, og hvor man observerer antallet af mus, som får kramper. Karakteristisk for denne type model er, at en stimulus, her injektion med det krampefremkaldende stof PTZ, i begyndelsen ikke giver anledning til kramper. Først efter gentagne stimuli er følsomheden øget så meget, at den samme stimulus udløser kramper. Dette forløb er dosisafhængigt, således at lave doser på 30 mg/kg slet ikke eller først sent i forløbet inducerer kramper hos relativt få dyr, mens ca. 90 procent af de dyr, som har fået større doser på 45 mg/kg, får kramper i slutningen af forløbet. Den gradvist øgede forekomst af kramper formodes at afspejle det progressive forløb i sygdommen epilepsi. Forekomsten af kloniske kramper og teststoffers evne til at hæmme kramperne er den traditionelle effektparameter, som benyttes i modellen.

Modellen forbedres

Vi har forbedret modellen ved at inkludere en række nye parametre, som vil give en mere detaljeret viden om et teststofs virkning. Disse parametre beskriver nærmere kramperne; hvor alvorlige kramperne er, hvor lang tid der går inden krampernes start (latenstid), og hvor lang tid de varer.

Til bedømmelse af, hvor alvorlige kramperne er (seizure severity), benytter vi en kvalitativ skala fra 1-5, hvor 1 er en meget mild krampe mens 5 er en svær krampe. Da musene gradvist udvikler kramper, vil benyttelse af latenstiden til den kloniske krampe betyde, at mus, som ikke får kloniske

kramper, ikke kan inddrages. I stedet benytter vi den inverse latenstid, og denne parameter kan dermed anvendes som et mål for den gradvise stigning i følsomheden over for PTZ, svarende til et fald i krampetærsklen.

Alle parametrene afspejler det karakteristiske kindlingsforløb, fordi både anfaldenes sværhedsgrad, følsomheden for PTZ og varigheden af de kloniske kramper stiger som funktion af antallet af stimulationer.

For at afprøve, om den opsatte sygdomsmodel kan bruges til at forudsige virkningen af potentielle lægemiddellandidater, undersøgte vi, om det meget anvendte anti-epileptikum valproat kunne hæmme udviklingen af kramper i modellen.

Testen viste, at valproat dosisafhængigt hæmmer udviklingen af kramper på alle målte effektparametre. Dette tolkes som en bekræftelse på, at de nye parametre afspejler udviklingen af en epilepsilignende tilstand. Da sådanne parametre repræsenterer forskellige aspekter af tilstanden, vil inddragelsen af flere effektparametre give en bedre beskrivelse af, hvordan et potentielt lægemiddelstof virker.

Nye virkningsmekanismer

Valproat ser ud til at virke lige så godt på alle fire effektparametre, men nye antiepileptiske teststoffer med anderledes virkningsmekanismer kunne tænkes at have forskellig effekt på de enkelte parametre. I så fald kan virkningsprofilen benyttes som en slags fingeraftryk for et antiepileptisk teststofs virkningsmekanisme.

Efterhånden som vi får undersøgt flere teststoffer i modellen, forventer vi derfor, at disse farmakologiske fingeraftryk vil give en bedre karakterisering af virkningsmekanismen for nye potentielle antiepileptika samt bidrage til at afdække nye muligheder for terapeutisk intervention.



Ph.d. Suzanne L. Hansen er adjunkt ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



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

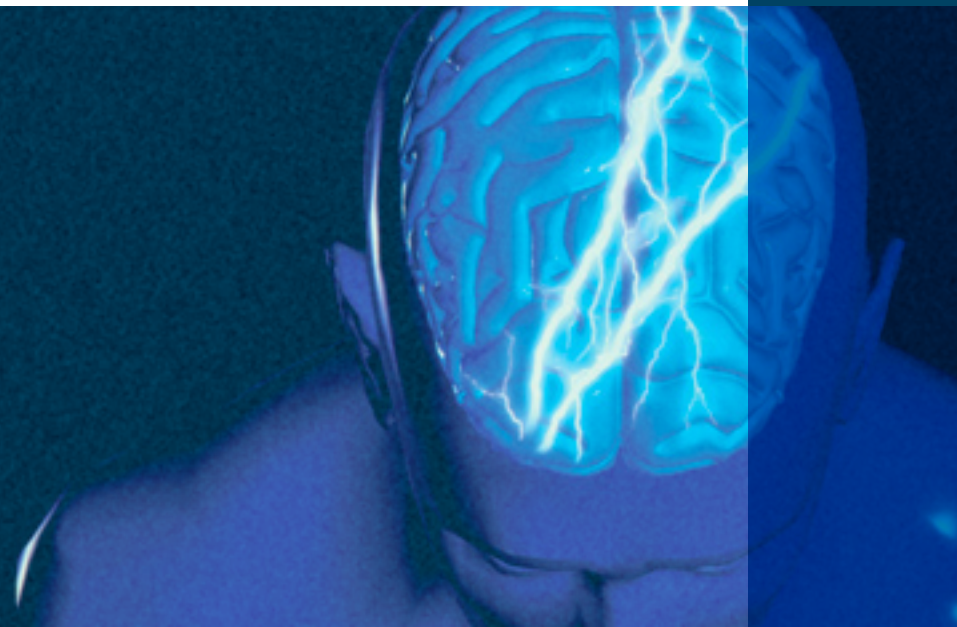


Ph.d. Henrik Tang Vestergaard er adjunkt ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

NUVÆRENDE ANTIPILEPTIKA – VIRKNINGSMEKANISMER

Der findes flere forskellige antiepileptika på markedet, som alle virker ved at dæmpe nerveaktiviteten i hjernen. De fleste af lægemidlerne betjener sig af én eller flere af nedenstående virkningsmekanismer:

- Benzodiazepiner, fenobarbital, valproat, vigabatrin og tiagabin øger aktiviteten i GABA-systemet. GABA er hjernens vigtigste dæmpende signalstof.
- Fenytoin, ethosuximid og lamotrigin hæmmer aktiviteten af de spændingsafhængige ionkanaler i nervecellernes membraner, primært Na⁺ og Ca²⁺ kanaler.
- Topiramet og fenobarbital hæmmer nervecellernes receptorer for glutamat, som er hjernens vigtigste stimulerende signalstof.



Behov for test af lægemidlers bivirkninger hos børn

Et batteri af cellebaserede og enzymbaserede toksikologiske tests kan muligvis anvendes til at forudsige lægemidlers bivirkninger hos børn og unge, som ofte adskiller sig fra bivirkningerne hos voksne.

Af Naja Wessel Jacobsen, Franziska Kramer Birkved, Anne Munch Christensen, Tue Søborg, Flemming Ingerslev og Bent Halling Sørensen

Børn og unge, især med kroniske sygdomme, kommer mere og mere i fokus som brugere af lægemidler, og den gode gamle regel om at dosere lægemidler til børn med udgangspunkt i voksendosis er ikke længere acceptabel. Nyere forskning har nemlig vist, at lægemidler kan have andre bivirkninger på børn end på voksne. Årsagen er, at bl.a. hjernen og knoglerne udvikler sig hos børn og unge, og det giver mulighed for en anden bivirkningsprofil.

Den ny forståelse øger vigtigheden af at udføre kliniske studier på børn, og EU har netop vedtaget at forlænge patienter på lægemiddelstoffer i op til seks måneder, hvis der specifikt er lavet undersøgelser på børn. Derfor er der fuld fart på klinisk forskning rettet mod børn. Dog viser amerikanske studier, at kun 15-20 procent af alle lægemiddelstoffer på verdensmarkedet er testet specielt med henblik på børn. Det skyldes sandsynligvis, at forsøg med børn og unge rejser mange etiske spørgsmål.

En metode til at vurdere, om et lægemiddelstof medfører særlige bivirkninger hos børn, er at afprøve stoffet på unge dyr. Juvenile dyremodeller anvendes da også rutinemæssigt som del af de undersøgelser, der bruges til at bestemme et lægemidlets toksikologiske profil på børn og unge, og en række guidelines er udviklet. Men dyreforsøgene er

ofte meget kostbare at udføre, og resultaterne kan være svære at fortolke.

Derfor er det vigtigt at kunne udvælge og anvende de "rigtige" dyremodeller, som kan forudsige særlige bivirkninger på børn og unges udvikling. Her er der specielt behov for modeller, som kan forudse bivirkninger på centralnervesystemet, reproduktionsevnen hos begge køn, lunger, skelet, hjerte og fordøjelse. Modellerne skal give et vidgrundlag, som gør det muligt at udføre de "rigtige" kliniske studier på børn og unge og gennemføre undersøgelserne så skånsomt som overhovedet muligt.

Laboratorietests som supplement

Da resultater fra juvenile dyremodeller som sagt kan være svære at fortolke, bør man overveje at supplere dyreforsøgene med et batteri af cellebaserede og enzymbaserede laboratorietests.

Hvert enkelt testsystem skal have et klart defineret målepunkt, som kan relateres til børn og unges udvikling. Det er vigtigt at understrege, at det formentligt ikke er muligt at overføre resultaterne direkte til børn, men man kunne forestille sig, at de individuelle testsystemer hver især kan bruges til at rangordne lægemiddelstoffer med samme farmakologiske effekt for én mulig bivirkning.

Hvis man så har forskellige tests rettet mod flere relevante bivirkninger, kan man måske blive i stand til at opstille et bivirkningsmønster for de undersøgte lægemiddelstoffer, som kan supplere de langt mere kostbare toksikologiske undersøgelser i juvenile dyremodeller.

Børn og unge med epilepsi

Et eksempel, vi har taget op, er anvendelse af anti-epileptika til børn og unge. Her kan det være et problem at finde en effektiv dosering, fordi der optræder mange forskellige typer bivirkninger.

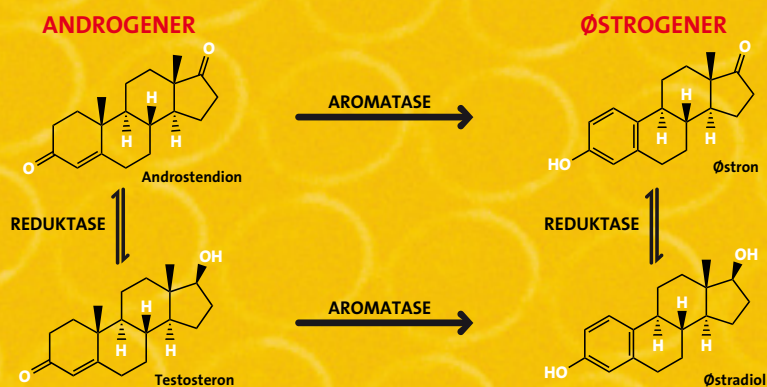
I Danmark anvendes et dusin lægemidler til behandling af epilepsi og andre former for kramper hos børn og unge. De to mest anvendte er valproat og lamotrigin, som begge virker mod et bredt udvalg af epileptiske anfald og har flere virkningsmekanismer. Derudover anvendes oxcarbazepin som førstevalg ved partielle anfald, der udløses af unormal elektrisk aktivitet i et afgrænset område af hjernen.

De fleste dokumenterede bivirkninger hos børn og unge er i overvejende grad forbundet med lægemiddelstoffet valproat og med en gruppe lægemidler, som påvirker cytokrom P450-enzymet i kroppen: Carbamazepin, phenobarbital, phenytoin, primidon og oxcarbazepin. Dog er bivirkningerne af flere nyere anti-epileptika til børn ikke undersøgt i særlig høj grad, og det kan derfor ikke udelukkes, at flere aldersspecifikke bivirkninger senere vil vise sig.

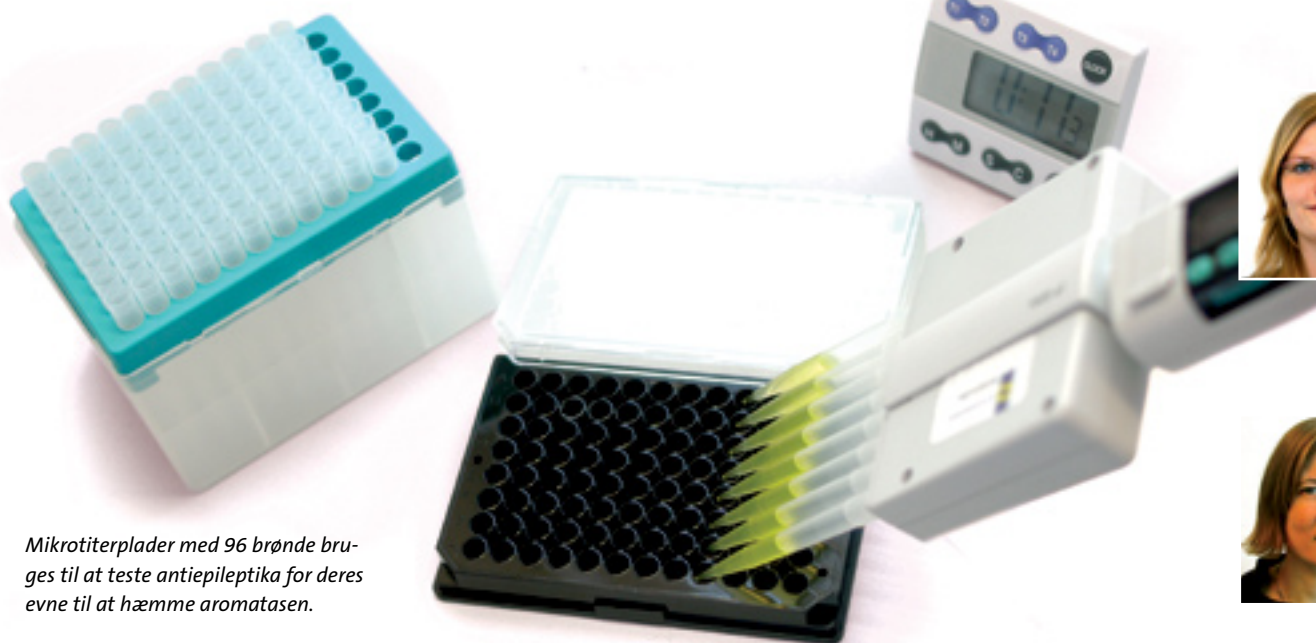
Aromatasehæmning

En af bivirkningerne ved anti-epileptiske midler er hæmning af enzymet aromatase. Aromatase er det enzym, som katalyserer omdannelsen af mandlige kønshormoner, androgener, til kvindelige kønshormoner, østrogener.

Denne bivirkning kan være uheldig, specielt for piger i puberteten, fordi hæmmede aromatase kan medvirke til et forhøjet niveau af mandlige kønshormoner, menstruationsforstyrrelser og øget hårvækst. Derfor testede vi hæmning af aromatase forårsaget af 12 forskellige anti-epileptiske midler, der alle anvendes til danske børn i større eller mindre målestok. På den måde kunne vi rangordne lægemiddelstofferne for denne bivirkning.



Enzymet aromatase er ansvarlig for omdannelse af mandlige kønshormoner, androgener, til kvindelige kønshormoner, østrogener. Nogle anti-epileptika hæmmer enzymet, hvilket specielt er uheldigt hos unge piger.



Mikrotiterplader med 96 brønde bruges til at teste antiepileptika for deres evne til at hæmme aromatasen.

Det anvendte testsystem er mikrotiterplade med 96 brønde, hvor teststofferne afsættes i en passende række af forskellige koncentrationer. For at kontrollere forsøgsbetingelserne inkluderes udover de ønskede stoffer anastrozol, som er en velkendt og effektiv aromatasehæmmer, og som derfor virker som positiv kontrol på alle plader. Herudover indeholder hver plade to andre kontrolserier. Den første anvendes til at fastlægge 0 procents hæmning. Her tilsættes der ikke aromatasehæmmer, hvorfor der opnås maksimal omdannelse af substratet. Den anden kontrolserie anvendes til at fastlægge 100 procents hæmning. Da dette svarer til ingen aromataseaktivitet, udføres denne serie med inaktiveret enzym.

Selve forsøget forløber ved at tilsætte et coenzym, som er nødvendigt for aktivering af aromatase, til brøndene med teststoffet og lade pladen inkubere i ti minutter. Herefter startes reaktionen ved at tilsætte en substrat-enzymblanding. Reaktionen forløber i en halv time, hvorefter der tilsættes natriumhydroxyd for at inaktivere enzymet. Efter endnu to timers inkubation måles fluorescensen af omdannet substrat i de enkelte brønde. Hele forsøget foregår ved 37°C. Alle fluorescensdata normaliseres over for kontrolserierne for henholdsvis 0 og 100 procents hæm-

ning og afbildes som dosis-responskurver. I alle tilfælde er stofferne testet i koncentrationer op til deres opløselighedsgrænse.

Syv stoffer hæmmer aromatasen

Vi fandt at syv ud af de tolv af mest anvendte anti-epileptiske midler hæmmer aromatasen. Ethosuximid var den mest potente aromatasehæmmer, og en høj grad af hæmning blev også målt for det meget brugte lægemiddelstof valproat, som er kendt for at kunne fremkalde bivirkninger hos børn og unge. Gabapentin, lamotrigin, primidon, topiramet og vigabatrin kunne ikke påvises at hæmme aromatasen.

Disse resultater kan selvfølgelig ikke direkte benyttes til ekstrapolation til børn, men de kan muligvis anvendes til at rangordne lægemiddelstofferne for denne bivirkning. På samme måde kunne vi ved hjælp af andre testsystemer rangordne stofferne mod andre målepunkter, der kan forbindes med andre bivirkninger hos børn og unge. Samlet kan vor metode måske anvendes til bedre at designe juvenile toksikologiske dyremodeller, eller i bedste fald til at udelukke et lægemiddelstof som egnet til børn og unge, allerede i en tidlig udviklingsfase.



Cand.pharm. Naja Wessel Jacobsen er amanuensis ved Institut Farmaci og for Analytisk Kemi.



Ph.d. Franziska Kramer Birkved er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Cand.polyt. Anne Munch Christensen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



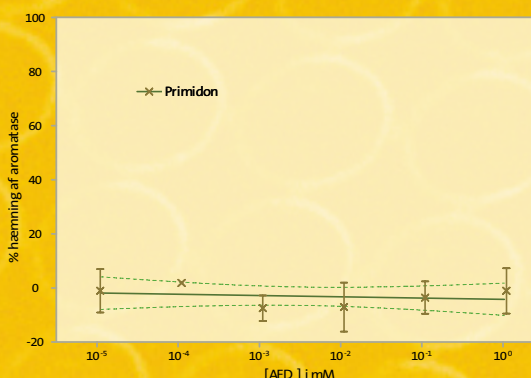
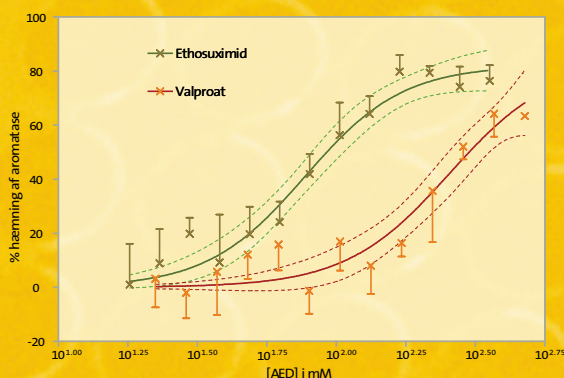
Cand.pharm. Tue Søeborg er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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



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



Dosis-respons-sammenhæng for ethosuximid, valproat og primidon. De to førstnævnte stoffer hæmmer aromatasen kraftigt i store doser, mens primidon ikke hæmmer enzymet.

Proteinlægemidler med en beskyttende kappe



En tredjedel af alle nye lægemidler i kliniske forsøg er baseret på proteiner. De terapeutiske perspektiver er store, men desværre er proteiner ustabile og har dårlig holdbarhed. Problemerne kan afhjælpes ved at indsvøbe proteinet i en kappe af polymerer.

Af Pernille Stignæs, Eva Horn Møller, Simon Bjerregaard, Marco van de Weert og Sven Frøkjær

I proteinlægemidler er det aktive stof et stort biomolekyle – et protein. I dag findes der ikke ret mange proteinlægemidler på hylderne i de danske apoteker, men det vil ændre sig dramatisk inden for en kort årrække.

Lægemidler baseret på proteiner er i rivende udvikling, og omkring en tredjedel af alle nye lægemidler i kliniske forsøg er proteiner eller peptider. Anvendelsesområderne er mange forskellige former for alvorlige og kroniske sygdomme som kræft, diabetes og leverbetændelse.

En stor fordel ved proteiner er, at de kan have en meget selektiv virkning i organismen i stil med kroppens egne hormoner eller enzymer. Men i praksis er det svært at lave lægemidler med proteiner, fordi proteiner ofte er ustabile og har dårlig holdbarhed.

Et protein består af en lang kæde af aminosyrer, som folder sig sammen til en specifik tredimensionel struktur, og både aminosyresekvensen og foldningen skal være korrekt for at opnå den optimale virkning i kroppen. Hvis proteinet folder forkert, er der ikke kun risiko for at det bliver uvirksomt; immunsystemet kan også reagere overfor lægemidlet, hvilket kan medføre alvorlige bivirkninger for patienterne.

Hvis foldningen af proteinet forstyrres eller ødelægges, kan proteinerne i et lægemiddel klumpe sig sammen og danne fibriller. Dette kan fx ske ved produktionen af lægemidlet eller under opbevaring. Fibrildannelse er en irreversibel proces, og fibriller er højst uønskelige, fordi proteinet inaktiveres. Fibrildannelse af kroppens egne proteiner er i øvrigt relateret til uhelbredelige sygdomme som Alzheimers syge, Parkinsons syge og Creutzfeldt-Jakobs syge, den menneske-

PEGyleret glukagon, hvor polymerkæden danner en kappe rundt omkring proteinet. Glukagon anvendes til akut behandling af insulinchok hos diabetespatienter.

lige parallel til kogalskab.

Proteiners lave stabilitet betyder også, at proteinlægemidler generelt har en dårlig holdbarhed ved opbevaring. Et vigtigt mål er derfor at udvikle mere stabile præparater. Man vil helst fremstille lægemidler, som allerede er opløst og klar til injektion, men for at bevare proteinets virksomme struktur kan det være nødvendigt at formulere lægemidlet som et frysetørret pulver, der opløses lige før brug.

Polymerer stabiliserer

På grund af de store terapeutiske perspektiver forskes der meget i at optimere proteinlægemidlers egenskaber. En lovende teknik er PEGylering, som har vundet stor udbredelse. Her kobles den ugiftige polymer polyethylen glycol (PEG) direkte på proteinerne ved hjælp af kovalente kemiske bindinger. Polymerer er lange kæder, som formentlig omslynger proteinerne og danner en beskyttende kappe. PEGyleringen ændrer proteinets egenskaber, og derved kan der opnås fordele som længere virkningstid i kroppen og bedre holdbarhed. Ved at variere størrelsen af polymeren samt påhæftningsstedet på proteinet, kan virkningen og stabiliteten af det PEGylerede protein ændres og optimeres efter ønske.

Fordele er dog ikke altid gratis, for proteinet kan blive så grundigt pakket ind, at der opstår risiko for, at PEGyleringen ændrer eller helt slukker for proteinets biologiske aktivitet. Derfor skal reaktionen mellem protein og polymer styres med omhu. Anvendelse af en større polymer eller påhæftning af flere polymerer vil typisk medføre bedre holdbarhed og forlænget cirkulationstid i kroppen, men øger også risikoen for tab af farmakologisk virkning. Derfor er det nødvendigt at optimere PEGyleringen for hver enkelt sammensætning af polymer og protein.

PEGylering af glukagon

Vi har opnået gode resultater med PEGylering af proteinlægemidlet glukagon, der anvendes til akut behandling af insulinchok, som kan ramme diabetespatienter, når deres blodsukker er for lavt. På grund af begrænset holdbarhed fremstilles glukagon som et pulver, som skal opløses før in-

MANGE FORDELE VED PEGYLERING

PEGylering giver åbenbare fordele, men rejser også forskningsmæssige udfordringer:

Længere virkningstid: Proteinet beskyttes mod fysisk og kemisk nedbrydning i kroppen, og desuden udskilles det PEGylerede protein langsommere gennem nyrerne, fordi molekylet er større. Med en længere virkningstid kan det proteinbaserede lægemiddel indgives med større mellemrum. Der findes allerede enkelte lægemidler på markedet, som indeholder PEGylerede proteiner. Et eksempel er PegIntron® mod leverbetændelse. PegIntron® skal kun injiceres én gang om ugen, hvor man tidligere var nødt til at injicere tilsvarende midler tre gange om ugen.

Svagere effekt: Polymeren lægger sig om proteinet som en beskyttende kappe, og derfor vil effekten i kroppen være lavere. Det skyldes, at proteinet også skærmes mod selve virkningsstedet på cellerne. Dette kan både reducere effekten og formindske risikoen for bivirkninger. Kunsten er at finde den rette balance.

Lavere immunologisk respons: Selv om humane proteiner kan produceres med rekombinant DNA-teknologi, kan der være små strukturelle forskelle mellem proteiner, som er dannet i kroppen, og proteinlægemidler, som produceres i bioreaktorer. Strukturforskelle kan føre til, at immunforsvaret går til angreb på proteinet, specielt ved længere tids gentagen brug. Ved PEGylering kan proteinlægemidlet beskyttes mod genkendelse af immunsystemet. Derved kan immunologiske bivirkninger formindskes eller undgås.

Bedre holdbarhed: Proteinlægemidler kræver ofte særlig opbevaring, fx i køleskab, eller alternativt skal lægemidlerne opløses i væske lige inden brugen på grund af proteinernes lave holdbarhed. Ved PEGylering beskyttes proteinerne bl.a. mod fibrillering og dermed nedsættes risikoen for inaktivering af lægemidlet.



Cand. pharm. Pernille Stigsnaes er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Eva Horn Møller er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

jektion. Den lave stabilitet af glukagon medfører, at proteinet let klumper sig sammen i fibriller, hvilket fører til dannelse af en gelagtig struktur.

For at undersøge den fysiske stabilitet har vi udsat glukagon og PEGyleret glukagon for farmaceutiske processer såsom frysetørring. Frysetørring kan medføre ændringer af glukagons rumlige struktur og fibrillering. Fibrillering kan måles ved at tilsætte et fluorescerende stof, Thioflavin T, til en proteinopløsning. Stoffet udsender en karakteristisk fluorescens ved tilstedeværelse af fibriller. Ved testen rystes proteinopløsningerne, og der måles fluorescens som udtryk for dannelse af fibriller over tid.

I forsøgene var PEGyleret glukagon langt mere stabilt end det nøgne protein. Normalt danner glukagon fibriller efter ca. 1 døgn, hvor der ses en drastisk stigning i fluorescenssignalet. Men PEGyleret glukagon fibrillerer ikke, selv efter 4-5 døgn.

Resultaterne viser, at stabiliteten af glukagon kan forbedres ved PEGylering, og det åbner en potentiel mulighed for, at PEGylering kan benyttes til udvikling af et flydende glukagonpræparat i stedet for det nuværende frysetørrede. Et flydende præparat vil lette patienters anvendelse af glukagon. Videre studier vil vise, om det er muligt at designe PEGyleret glukagon på en måde, så den biologiske aktivitet bibeholdes.



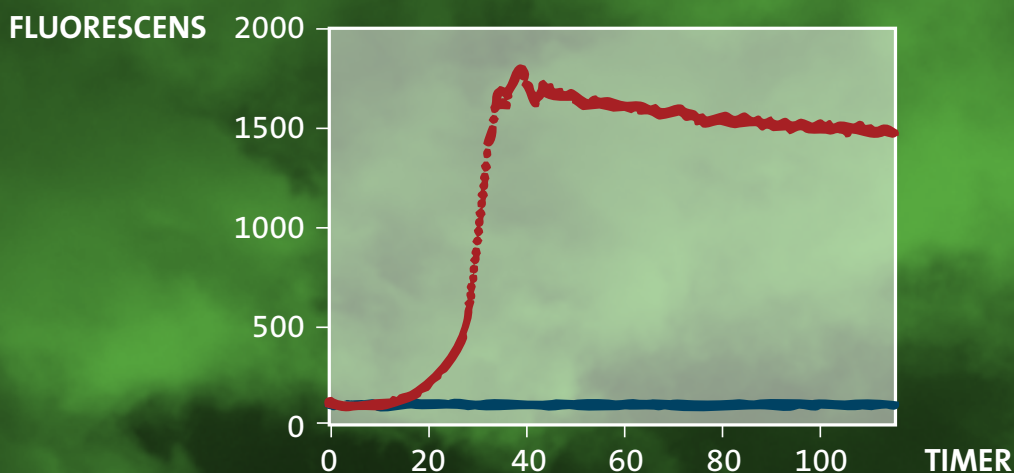
Ph.d. Simon Bjerregaard er forskningskemiker ved Preformulation and Delivery, Novo Nordisk A/S.



Ph.d. Marco van de Weert er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Hvis proteinerne klumper sig sammen i fibriller, fx under opbevaring, kan proteinlægemidlet miste sin effekt. Fibrillering måles ved at tilsætte Thioflavin T til en opløsning med proteinet; stoffet udsender en karakteristisk fluorescens, når der dannes fibriller. Den røde kurve viser test af glukagon, mens den blå kurve viser test af PEGyleret glukagon. Målingen er foretaget ved 1 mg/ml protein og pH 2.5. Glukagon fibrillerer efter 25 timers rystning, hvorimod PEGyleret glukagon ikke fibrillerede under forsøget.

Forudsigelser med hjælp fra det virtuelle rum

Små peptidlægemiddelstoffer kan smugles fra tarmene til blodet via en type transportører, der normalt fragter føde gennem tarmvæggen. En ny computermodel gør det muligt at beregne, hvilken struktur et farmakologisk aktivt peptid skal have for at blive transporteret ud i blodet.

*Af Rikke Andersen, Bente Steffansen,
Flemming Steen Jørgensen og Carsten Uhd Nielsen*

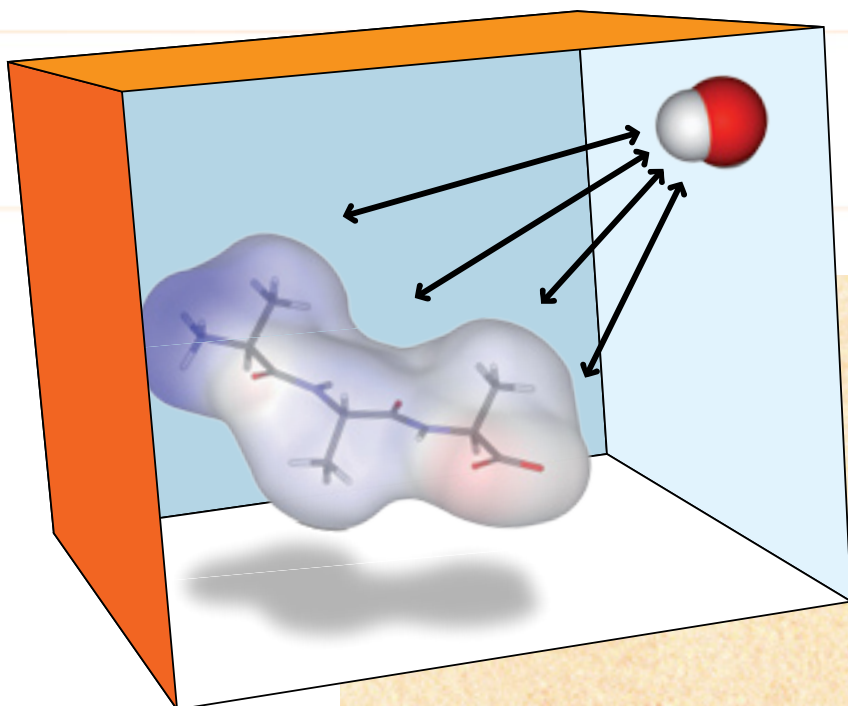
Der ligger ofte mange års synteser, farmakologiske undersøgelser og farmaceutiske afprøvninger bag et godt lægemiddelstof, som udviser en ønsket effekt uden væsentlige bivirkninger. Derfor kræver det store ressourcer at udvikle et nyt lægemiddel. Omkostningerne, arbejdsindsatsen og tidsforbruget kan imidlertid reduceres ved at opstille modeller, der – inden man bruger kræfter på at syntetisere og teste potentielle lægemiddelstofkandidater – kan forudsige, hvordan stoffet vil blive optaget og virke i kroppen. Hvis medicinen skal indtages gennem munden, hvilket ofte er mest hensigtsmæssigt og bekvemt for patienten, er det nødvendigt, at lægemiddelstoffet er i stand til at træn-

ge gennem tarmvæggen og komme over i blodet, hvorfra det føres hen til virkningsstedet i kroppen. Ved at udforske strukturelle egenskaber ved lægemiddelstoffer eller lignende molekyler har man mulighed for at opstille modeller, som kan forudsige, hvordan og i hvilken grad et ukendt lægemiddelstof vil blive transporteret gennem tarmvæggen.

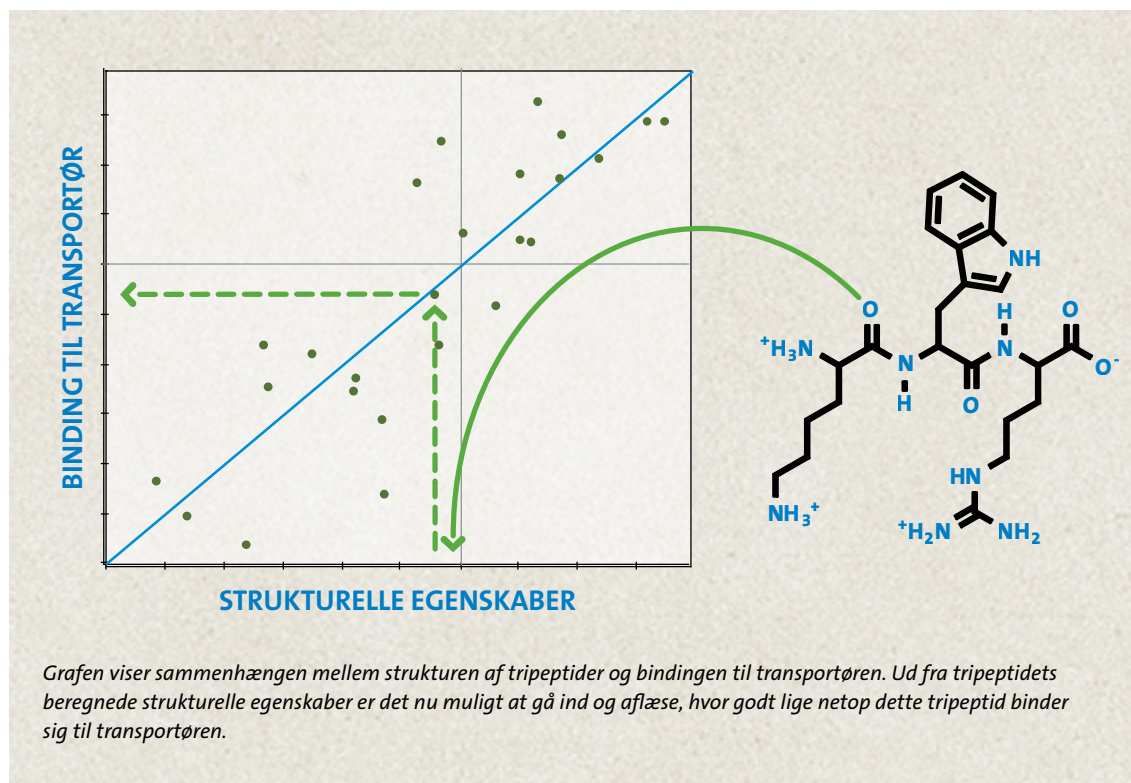
Tripeptider smugles ind i kroppen

En af vejene fra tarmvæsken til blodet går via transportører i tarmvæggen. Transportørernes opgave er at fragte næringsstoffer fra føden, som kroppen har behov for, gennem tarmvæggen. Kroppen bruger fx mindre dele af proteiner, peptider, til at opbygge muskler. Derfor klipper enzymer i mave-tarmkanalen proteiner fra føden over i mindre enheder; fx til dipeptider, som består af to aminosyrer, og tripeptider, hvor tre aminosyrer er bundet sammen. Disse di- og tripeptider fragtes over i blodet via en næringsstoftransportør, som er lokaliseret i tyndtarmen. Her griber transportøren fat i peptiderne og ruller dem gennem tarmmembranen.

Det spændende ved denne transportør er, at den udover dipeptider og tripeptider også er i stand til at transportere peptidlignende lægemiddelstoffer, fx antibiotika som penicilliner og cephalosporiner. Det skyldes, at transportøren opfatter lægemiddelstofferne som værdifulde næringsstoffer. Man kan sige, at transportøren ubevidst smugler visse lægemiddelstoffer ind i kroppen, og på den måde kan peptidlignende lægemiddelstoffer blive optaget fra tarmen til



Et tripeptid er her placeret i et virtuelt rum sammen med et lille molekyle, der repræsenterer én bestemt egenskab ved den transportør, som fragter tripeptider gennem tarmvæggen. Den gensidige påvirkning mellem tripeptidet og det lille molekyle kan omsættes til et tal, som svarer til én bestemt strukturel egenskab ved tripeptidet. Ved at gennemføre simulationen med mange forskellige små molekyler, som hver især repræsenterer forskellige egenskaber ved transportøren, er det lykkedes at lave en model for, hvilke strukturelle krav et tripeptid skal opfylde for at binde sig til transportøren.



Cand. pharm. Rikke Andersen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Bente Steffansen er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Flemming Steen Jørgensen er docent ved Institut for Medicinal-kemi.



Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

blodet, som fører dem til virkningsstedet. Mange potentielle lægemiddelstoffer er peptider eller har en peptidliggende struktur.

Modellen – hvorfor og hvordan

Hvis man kan finde ud af, hvilke strukturelle egenskaber ved tripeptider der giver anledning til en god binding til transportøren, kan man forudsige et givet tripeptids evne til at binde sig til transportøren. Dermed vil man altså have en god idé om, hvorvidt det ønskede tripeptid kan komme over i blodet fra tarmen. Men det virkelig smarte er, at man vil vide besked, inden man overhovedet går i gang med at syntetisere og afprøve stoffet! På den måde kan man slippe for mange unødige og dyre undersøgelser, og udviklingen af lægemiddelstoffet vil skride hurtigere frem. For at kunne forudsige hvor godt et tripeptid binder sig til transportøren har vi undersøgt en lang række tripeptider. Hvis man kan finde en overordnet sammenhæng mellem tripeptiders struktur og deres evne til at binde sig til transportøren, vil det være muligt at forudsige, hvorvidt det enkelte tripeptid kan optages fra tarmen.

For at kunne gøre dette har vi brug for at beskrive tripeptidernes strukturelle egenskaber. En måde at beskrive de mange fysisk-kemiske egenskaber ved tripeptiderne på er at lave komplicerede modeller med en computer. Computerprogrammet, som bruges til dette, giver os mulighed for at skabe et virtuelt rum, hvori tripeptiderne kan placeres. Inde i rummet kan man så flytte et andet molekyle rundt om tripeptidet og beregne, hvordan molekylet og tripeptidet påvirker hinanden. Molekylet, der bevæges rundt om tripeptidet, vælges således, at det repræsenterer én egenskab i transportøren. Det betyder, at størrelsen af den påvirkning, som kan beregnes mellem tripeptidet og molekylet, er et udtryk for en bestemt egenskab, som kan have

indflydelse på tripeptidets evne til at binde til transportøren. Ved at gennemføre forløbet med et stort antal molekyler, som hver især repræsenterer forskellige egenskaber i transportøren, kan man få et overblik over, hvilke egenskaber der har betydning for, om tripeptidet kan fragtes gennem tarmvæggen.

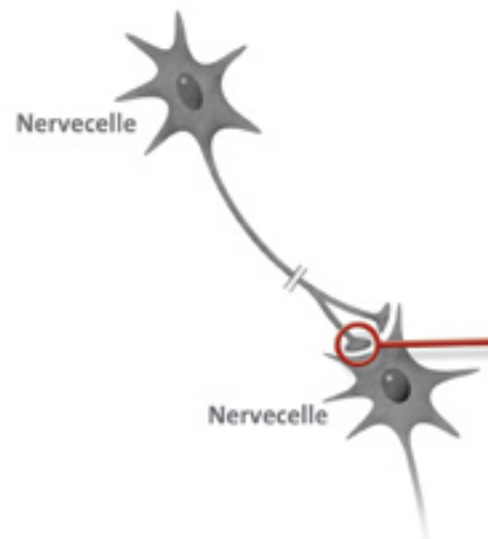
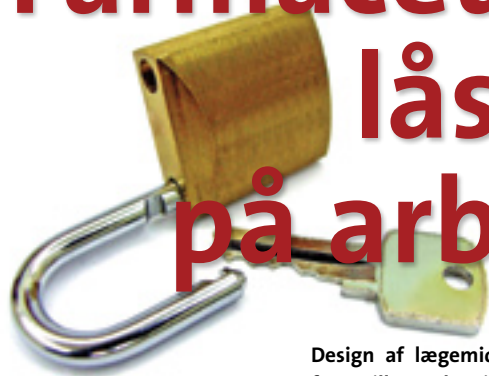
I alt blev 25 meget forskellige tripeptider undersøgt for, hvor godt de bandt til transportøren. Alle tripeptiderne blev placeret i det virtuelle rum og op mod 80 forskellige strukturelle egenskaber blev beregnet. Jagten på en sammenhæng mellem alle de forskellige egenskaber kunne nu starte.

Metoden gik ud på at sammenholde alle egenskaberne med evnen til at binde sig til transportøren. At gøre dette, på én og samme tid, kræver en del matematiske krum-spring. Efter mange beregninger lykkedes det os at finde en sammenhæng, og vi fik dermed information om, hvilke specielle egenskaber hos tripeptider, der er vigtige for deres evne til at binde sig til transportøren.

Sådan forudsiger man

Med denne information er det nu muligt at gøre det, vi ønskede at gøre fra starten. Ud fra den fundne sammenhæng kan et tripeptid eller tripeptid-lignende stofs evne til at binde sig til transportøren forudsiges. Som udgangspunkt ved vi ikke, hvor godt et tilfældigt tripeptid binder til transportøren. Men vi kan beregne tripeptidets strukturelle egenskaber med computerprogrammet og forudsige – ud fra vores model – hvor godt lige netop dette tripeptid vil binde sig til transportøren. Med andre ord giver modelberegningerne os en god idé om, hvorvidt det er muligt at få netop dette lægemiddelstof optaget over tarmvæggen via vores transportør. Og det inden vi overhovedet har lavet én eneste syntese eller eksperiment!

Farmaceutiske låsesmede på arbejde



Design af lægemiddelstoffer kan sammenlignes med at fremstille nøgler til låse. Gruppen for Biostrukturel Forskning på DFU arbejder med at opklare, hvordan låsen ser ud, og hvordan nøgler passer i nøglehullet.

Af Peter Naur, Bente Vestergaard, Lars K. Skov, Jan Egebjerg, Michael Gajhede og Jette Sandholm Kastrup

Næsten alle lægemiddelstoffer er rettet mod proteiner, som er kæmpemæssige molekyler med et væld af forskellige funktioner. Proteiner kan være enzymer, der katalyserer biokemiske reaktioner, receptorer, som reagerer på hormoner og signalstoffer, eller transportere, der fragter molekyler gennem biologiske membraner.

At proteiner er et naturligt mål for lægemidler skyldes netop, at de er involveret i hovedparten af de biologiske processer, som holder livet i gang. Så når noget går galt – ved sygdom – er proteinerne naturligvis også i spil. Derfor kan man behandle sygdommens symptomer og i visse tilfælde helbrede patienten helt ved hjælp af lægemiddelstoffer, som kan ændre proteinernes aktivitet. Det lyder nemt nok – men i praksis er opgaven uhyre svær.

Et godt udgangspunkt for fremstilling af nye lægemiddelstoffer er at opklare mål molekylets tredimensionelle struktur. Man kan sammenligne lægemiddelstoffet med en nøgle og mål molekylet med et nøglehul. Nøglenes opgave er at låse op eller i for proteinets funktion. For at kunne finde præcis den nøgle, der passer i nøglehullet, er det vigtigt at vide, hvordan nøglehullet er udformet, og hvilke byggesten det består af. Processen kaldes strukturbaseret lægemiddelforskning.

Nervocellers kommunikation

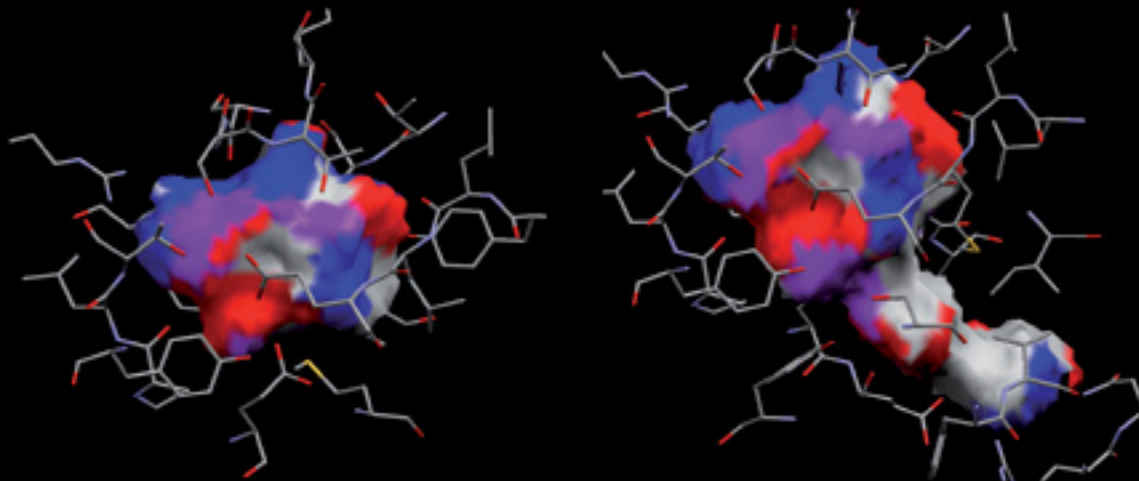
Gruppen for Biostrukturel Forskning på Danmarks Farmaceutiske Universitet har i næsten ti år arbejdet med en type proteiner, som kaldes ionotrope glutamatreceptorer.

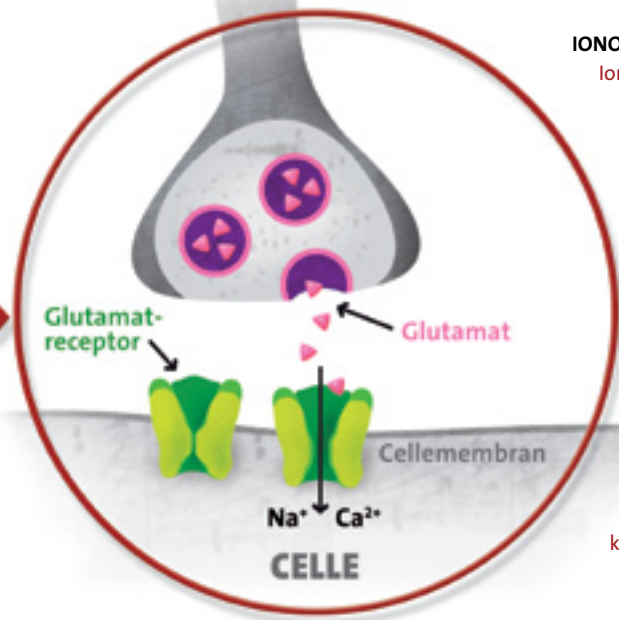
Glutamat er hjernens vigtigste stimulerende signalstof, og de ionotrope glutamatreceptorer findes overalt i hjernen, hvor de medvirker til hurtig udveksling af information mellem nervecellerne. Denne udveksling af information er helt afgørende for, at hjernen kan fungere korrekt. Når det system, som receptorerne indgår i, bryder sammen, har det fatale konsekvenser. Nogle eksempler er alvorlige neurologiske sygdomme som Alzheimers og Parkinsons sygdom samt epilepsi.

Netop fordi glutamat er hjernens vigtigste stimulerende signalstof, er det ikke nødvendigvis hensigtsmæssigt med lægemiddelstoffer, der aktiverer alle typer glutamatreceptorer, da konsekvensen kan blive overophedning af nervecellerne og i sidste ende nervedød. På tilsvarende vis er det heller ikke nødvendigvis fornuftigt at blokere eller hæmme alle typer glutamatreceptorer med lægemiddelstoffer, fordi det kan forrykke den hårdfine balance mellem stimulerende og hæmmende signaler i hjernen.

Derfor er der stor interesse for at udvikle lægemiddelstoffer rettet mod udvalgte glutamatreceptorer. Det giver mulighed for specifikt at påvirke sygdomsprocesser, som den pågældende receptortype er involveret i, og på den måde genoprette den normale kommunikation mellem nervecellerne. En stor hjælp i denne proces er kendskab til strukturen af receptoren, så man kan designe nøgler, der passer i den rigtige lås – og kun i den.

Figuren viser omridset af bindingslommen på glutamatreceptorerne GluR2 (t.v.) og GluR5 (t.h.). Lommen har forskellig størrelse på de to receptorer, og dette kan udnyttes til design af lægemiddelstoffer med selektiv virkning på den af receptorerne, man ønsker at påvirke. Rødt viser områder i bindingslommen, der kan fungere som acceptorer for brintbindinger, mens blå markerer områder med brintdonerende egenskaber.





IONOTROPE GLUTAMATRECEPTORER

Ionotrope glutamatreceptorer medvirker til overførsel af information mellem nerveceller.

Hver nervecelle har tusinder af forbindelser til andre nerveceller. Cellerne mødes i synapser, hvor de to cellers membraner ligger tæt op af hinanden. Kommunikationen sker ved, at den ene nervecelle udsender sit signalstof, som opfanges af receptorer i membranen på den anden celle. På den måde sendes information fra den ene nervecelle til den anden. I dette tilfælde frigiver afsenderen signalstoffet glutamat, som diffunderer hen til en ionotrop glutamatreceptor på modtagercellen. Signalstoffet bindes til receptoren, og det bevirker, at en kanal åbnes i receptoren, så der nu kan trænge ioner ind i cellen. Efter kort tid frigives signalstoffet, og kanalen lukkes igen.

Vores indfaldsvinkel til forskningsarbejdet er at bestemme tredimensionelle strukturer af forskellige typer af ionotrope glutamatreceptorer ved hjælp af en metode, som kaldes røntgenkystallografi.

I dag har vi kendskab til 18 forskellige ionotrope glutamatreceptorer. Vi har i en del år koncentreret os om den type af receptorerne, som kaldes GluR2. For at kunne forstå hvorfor nogle stoffer primært virker på en bestemt type af receptorer, har vi nu udvidet projektet til også at omfatte andre typer, bl.a. receptoren GluR5.

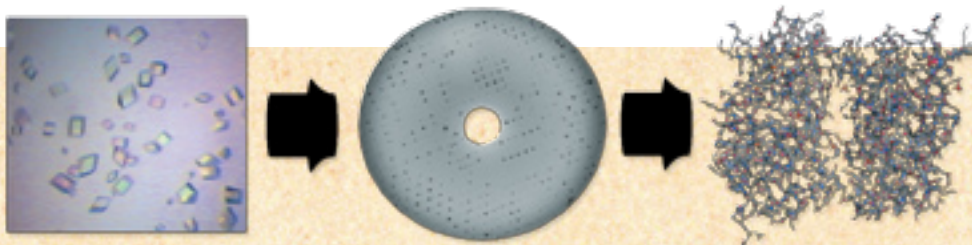
Benhård konkurrence

I efteråret 2004 lykkedes det os at få etableret en metode til at fremstille de nødvendige mængder protein til krystallisation af den del af GluR5-receptoren, som binder signalstoffet og lægemiddelstoffer. Men så begyndte rygterne i den videnskabelige verden at svirre – en amerikansk forskergruppe var ved at publicere den selv samme struktur. Nu skulle det gå stærkt. Og når engagementet og viljen er tilstede, kan man komme utroligt langt på kort tid. I løbet af en meget hektisk måned med arbejdsuger på op til 80-100 timer blev der samlet og analyseret data, og en artikel blev skrevet og sendt af sted. Heldigvis var det hele sliddet værd. Vores struktur kom ud til offentligheden først – tre dage før konkurrentens!

Nøglehul på atomart niveau

Hvad har strukturen af GluR5 så lært os? Først og fremmest har vi opnået vigtig viden om det område i receptoren, hvortil det naturlige signalstof glutamat bindes. Denne viden kan udnyttes til at designe potentielle lægemiddelstoffer, der er selektive for denne type receptorer. Da de forskellige typer af ionotrope glutamatreceptorer minder meget om hinanden, er det en stor hjælp at kende de små forskelle helt ned på atomart niveau. Skal man file en nøgle til, er det godt at kende nøglehullet først og dermed kunne regne ud, hvordan nøglen kan forbedres.

Et af de store spørgsmål er, hvordan binding af signalstoffet fører til åbning af ionkanalen, og hvordan den herefter lukker igen. Når man sammenligner strukturen af den del af GluR5, som binder glutamat, med strukturer af GluR2, kan man se de bevægelser, der sker i proteinet efter binding af signalstoffet. For at blive i billedet med nøgle og lås kan man altså sige, at vi har set, at låsen også tilpasses af nøglen. Så vi har nu en arbejdsmodel for, hvordan ionkanalen åbnes og lukkes. Denne viden er en vigtig lille brik i forståelsen af, hvordan information overføres fra den ene nervecelle til den næste. Helt nede på atomart niveau er vi altså nu i stand til at studere, hvordan de enkelte tandhjul bevæger sig i det utroligt komplekse maskineri, som menneskets hjerne og nervesystem er.



RØNTGENKRISTALLOGRAFI OPKLARER STRUKTUREN

Røntgenkystallografi er en vigtig metode til at bestemme den tredimensionelle struktur af store og små molekyler. En afgørende forudsætning er krystaller af molekylet. At opnå dette med store makromolekyler som proteiner er en vanskelig kunst, og fremstilling af store mængder rent protein til krystallisation er ofte den største forhindring på vejen til at opklare strukturen af et protein. Perfekte krystaller er opbygget af en grundbyggesten – bestående af et eller flere molekyler – der gentages igen og

igen hele vejen gennem krystallen. Denne regelmæssighed udnytter man ved at beskyde krystallen med intens røntgenstråling. Røntgenstrålen bliver spredt af krystallen i et mønster, der afspejler, hvordan atomerne i det enkelte molekyle er placeret i forhold til hinanden.

Når man har målt dette spredningsmønster, kan man regne sig frem til atomernes art og position i krystallen og dermed bestemme molekylets tredimensionelle opbygning. Disse beregninger er krævede, når det gælder proteiner, som normalt består af flere tusinde atomer.



Cand.scient. Peter Naur er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Bente Vestergaard er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Lars K. Skov er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Jan Egebjerg er lektor ved Århus Universitet og funktionschef på Lundbeck A/S.

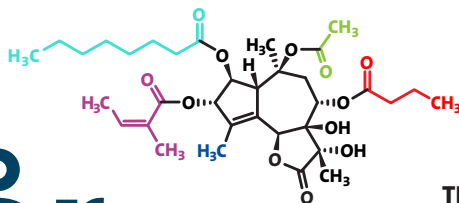


Ph.d. Michael Gajhede er professor ved Institut for Medicinalkemi.

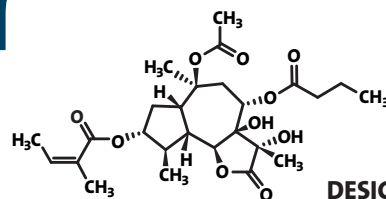


Cand.pharm., erhvervsforsker, Jette Sandholm Kastrup er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Kemikere overgår naturen



THAPSIGARGIN



DESIGNET ANALOG

Kemisk struktur af naturstoffet thapsigargin og den nye analog.

Dyreforsøg har vist, at plantestoffet thapsigargin kan anvendes til udvikling af medicin mod prostatakræft. Nu er det lykkedes at syntetisere et stof, som slår kræftceller ihjel ti gange mere effektivt end naturstoffet.

Af Søren Brøgger Christensen,
Helmer Søhoel og Tommy Liljefors

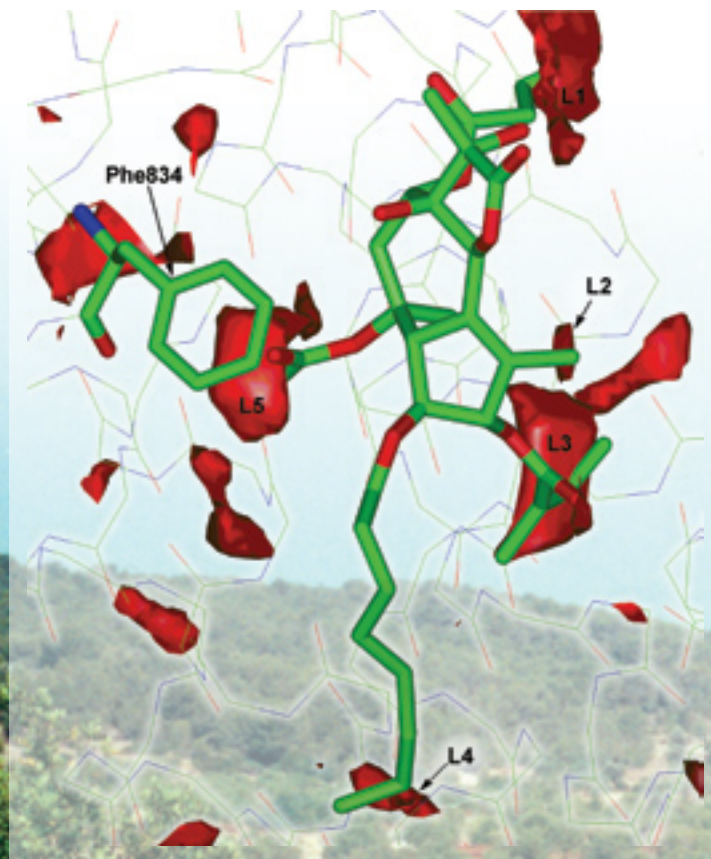
Derpå sagde Gud: "Jorden lade fremspire grønne urter, der bærer frø, og frugttræer, der bærer frugt med kerne, på jorden!" (1. Mosebog v. 11.) En vidtgående tolkning af skabelsesberetningen er, at Gud også skabte planterne for, at menneskene skulle kunne finde lindring og helbredelse for deres sygdomme. Det fremføres, at Gud har skabt lægemidler mod alle sygdomme, og det er blot menneskenes opgave at finde dem. Da Gud har skabt lægemidlerne, kan de umuligt forbedres – i følge dette dogme. Men moderne kemi kan faktisk overgå naturen.

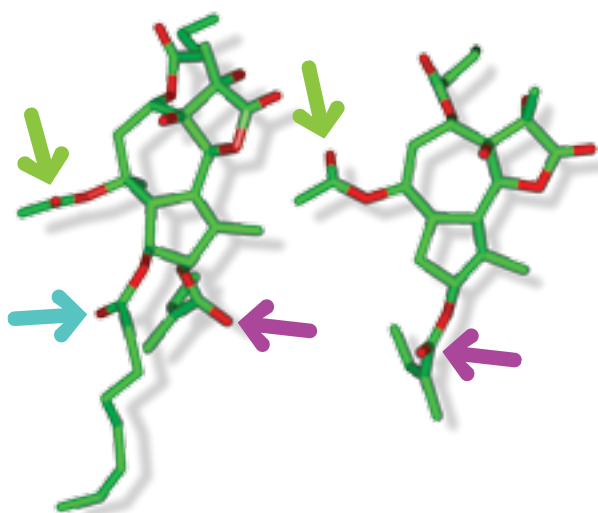
Udgangspunktet for vor kemiske bedrift er naturstoffet thapsigargin, som er en meget kraftig hæmmer af en intracellulær calciumpumpe (SERCA). Når pumpen hæmmes, kan cellen ikke opretholde calciumbalancen og må dø. Ved anvendelse af moderne teoretiske og eksperimentelle metoder har det været muligt at designe og syntetisere et molekyle, der bindes ti gange kraftigere til calciumpumpen end thapsigargin. Opdagelsen kan få betydning ved udvikling af kemoterapeutisk medicin, fordi indledende forsøg har vist, at thapsigargin synes at kunne danne basis for et lægemiddel mod prostatakræft.

Thapsigargin udvindes af middelhavsplanten *Thapsia garganica* L., som ikke har noget officielt dansk navn, men som ved en oversættelse fra engelsk kan kaldes giftig gulerod. Planten har gennem årtusinder været anvendt i folkemedicin. Frem til Anden Verdenskrig fremstillede man plastre, som blev sat på huden. Plantens indhold af hudirriterende forbindelser, primært thapsigargin, medfører en lokal irrita-

Bindingsstedet for thapsigargin i calciumpumpen: De svage linier markerer bindinger i proteinet, de kraftigt optrukne linier viser thapsigargin samt fragmentet af phenylalanin 834 i bindingsstedet. De grønne knæk markerer et kulstofatom, de røde knæk et iltatom og de blå knæk et kvælstofatom. De røde områder er dele af pumpen, der har affinitet for lipofile molekyelfragmenter. Analysen af bindingsstedet gennemføres uafhængigt af thapsigargin, men efterfølgende er thapsigargin lagt ind på figuren for at illustrere, hvor vekselvirkningen mellem thapsigargin og pumpen finder sted. L1 vekselvirker med smørsyrefragmentet (rød på formel-illustrationen øverst på denne side), L2 med en af methylgrupperne i thapsigargin-skelettet (blå), L3 med methylbutensyrefragmentet (lilla), og L5 med eddikesyrefragmentet (grøn). Den lille udstrækning af L4 markerer, at dette område kun udviser svag interaktion med octansyrefragmentet (turkis).

Nedenfor ses landskab fra Ibiza, hvor planten giftig gulerod gror.





Til venstre ses thapsigargin. De tre carbonylgrupper sidder så tæt, at carbonylgrupperne på fragmenterne af methylbutensyre (lilla pil) og eddikesyre (grøn pil) tvinges til at pege op over papirets plan, hvorimod carbonylgruppen i octansyrefragmentet (turkis pil) peger ned i papirets plan. Til højre ses den designede analog. Den større fleksibilitet tillader eddikesyrecarbonylgruppen (grøn pil) at ligge nogenlunde i papirets plan, hvorved en ufavorabel vekselvirkning med phenylalanin 834 i calciumpumpen undgås.



Ph.d. Søren Brøgger Christensen er docent ved Institut for Medicinalkemi.



Cand. scient. Helmer Søhoel er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Fil.dr. Tommy Liljefors er professor ved Institut for Medicinalkemi.

tion, der udover at fremkalde kløe også lindrer gigtsmerter. Virkningen beror på, at det virksomme stof trænger ind gennem huden og ind i cellerne, f.eks. mastceller og andre celler, der kan udskille signalstoffer. Inde i cellerne blokerer thapsigargin calciumpumpen SERCA, der er afgørende for, at cellen kan opretholde sin calciumbalance. Kort tids ubalance får cellerne til at udskille signalstoffer, og det forårsager hudirritationen. Længere tids ubalance medfører celledød.

Da thapsigargin kun kan isoleres fra den vilde plante giftig gulerod, er det næppe muligt at fremskaffe nok af stoffet til en bæredygtig lægemiddelproduktion, med mindre man udvikler metoder til at dyrke planten i agerbrug. Derfor arbejder vi på at finde egnede alternativer til stoffet.

Analyse af bindingen mellem stof og pumpe

For at udvikle analoger af thapsigargin er det nødvendigt at forstå de kræfter, der får thapsigargin til at binde sig til calciumpumpen og blokere den. Her har det været afgørende, at det er lykkedes for en japansk forskergruppe at udkrystallisere pumpen sammen med thapsigargin. Ved en efterfølgende røntgenkrystallografisk analyse lykkedes det at kortlægge placeringen af alle de tunge atomer i komplekset, dvs. alle atomerne på nær brint.

Efter opklaringen af kompleksets tredimensionelle atomare struktur blev pumpens bindingssted for thapsigargin analyseret for at finde ud af, hvilke områder der binder sig til fedtopløselige dele af molekyler (lipofile områder), og hvilke områder der binder sig til vandopløselige dele af molekyler (hydrofile områder).

Et overraskende resultat er, at alle de hydrofile iltatomer i thapsigargin kun har beskedne betydning for bindingen til pumpen, og at molekylets tricykliske kerne primært bidrager ved at placere fragmenter af smørsyre, methylbutensyre og eddikesyre i korrekte rumlige positioner, så de kan vekselvirke med de lipofile områder i pumpen.

En dybtgående analyse af thapsigarginmolekylet viser, at de tre carbonylgrupper i fragmenterne af henholdsvis eddikesyre, octansyre og methylbutensyre rumligt sidder så tæt, at de tre carbonylgrupper tvinges til at være orienteret

i forhold til hinanden. Ved indlejring af thapsigargin i bindingsstedet medfører den begrænsede fleksibilitet, at det elektronrige iltatom i thapsigargin eddikesyrecarbonylgruppe placeres i umiddelbar nærhed af den elektronrige aromatiske ring i aminosyren phenylalanin, der indgår som byggesten i calciumpumpen. Herved skabes en elektrostatisk frastødning, der svækker vekselvirkningen mellem proteinet og thapsigargin.

Såfremt analysen er korrekt, skulle en designet analog uden octanoylfragmentet binde sig kraftigere til bindingsstedet, fordi det nu er muligt for eddikesyrecarbonylgruppen at orientere sig således, at den ikke peger ind imod phenylringen i phenylalanin.

Design ud fra et billigt naturstof

I designet af stoffet indgik tillige overvejelser om, at stoffet ville kunne fremstilles ud fra et andet naturstof end thapsigargin, nemlig (S)-carvon. I modsætning til thapsigargin kan (S)-carvon billigt og let tilgængeligt; stoffet kan udvindes af kommen.

Alle stoffer findes i to spejlbilledformer, der er kemisk ens, men rumligt forskellige som højre og venstre hånd. Effekten af de to spejlbilledformer af et lægemiddelstof er ofte forskellige, fordi kun den ene spejlbilledform passer ind i den ønskede receptor. Ved at bruge den højredrejede spejlbilledform (S)-carvon som udgangspunkt for syntesen er det muligt kun at fremstille den ønskede spejlbilledform af det nye molekyle. Stoffet blev syntetiseret gennem sekvens på 34 trin, og en efterfølgende farmakologisk afprøvning viste, at stoffet bandt sig ti gange kraftigere til calciumpumpen end thapsigargin.

Ved anvendelse af avancerede beregningsmetoder til forudsigelse af organiske stoffers egenskaber, ved brug af røntgenkrystallografi til kortlægning af atomernes placering i biologiske makromolekyler bundet til lægemiddelstoffer og endelig ved anvendelse af moderne syntesemetoder har det altså været muligt at fremstille et stof, der binder sig ti gange bedre til et biologisk makromolekyle end naturstoffet. Kemikere kan overgå naturen.



Morfin

– nye aspekter ved 200 år gammel lægemiddelstof



I kroppen nedbrydes morfin bl.a. til stoffet M6G, som ved injektion lindrer smerter med færre bivirkninger end moderstoffet morfin. Et nyt mål er at gøre M6G egnet til indtagelse i tabletter eller mikstur.

Af Hanne Villesen, Niels-Henrik Jensen, Steen Honoré Hansen og Lona Christrup

Morfin er den gyldne standard blandt stærke smertestillende lægemidler, men på trods af, at morfin har været kendt og anvendt i snart 200 år, mangler der stadig viden om virkningen af stoffet og dets metabolitter.

Det var den tyske farmaceut Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, der først isolerede og senere renfremstillede morfin fra råopium. Sertürner blev født i 1783 og døde i 1841. Hans arbejde med råopium udviklede sig over mange år, hvilket har resulteret i forvirring omkring tidspunkterne for isolering og renfremstilling af morfin. Det er imidlertid nu bred enighed om, at den første publikation, hvori isoleringen af morfin er beskrevet, udkom i 1806. Her beskrives et stof isoleret fra opium, som blev navngivet "morphium" efter den græske drømmegud Morpheus. Sertürner gav lidt under et gram af stoffet til fire hunde, som alle fik kramper og blev trætte og bedøvede, men ikke faldt i søvn, så med vore dages viden om morfins virkning er det helt klart, at stoffet må have været meget urent.

I 1817 offentliggjorde Sertürner en metode til oprensning

af den urene morfin. Isolering og oprensning fandt sted ved at ekstrahere råopium med varmt vand og herefter udfælde rene morfinkrystaller med salmiakspiritus. For at bevise, at krystallerne havde de samme farmakologiske virkninger som råopium, gav han 60 mg af stoffet til tre af sine studenter. Dette er det dobbelte af den mængde, man i dag giver til patienter, der får morfin for første gang. Studenterne overlevede, men oplevede opkastning, forstoppelse, en voldsom træthedsforøvelse samt hovedpine, som først forsvandt efter flere dage. Alle er eksempler på symptomer, der nu kendes som morfins bivirkninger.

Metabolitter med forskellig virkning

Først mere end hundrede år senere, i 1927, blev man klar over morfins kemiske struktur. I 1954 blev morfins hovedmetabolit morfin-3-glucuronid (M3G) identificeret, og senere, i 1970, lykkedes det at identificere endnu en metabolit, morfin-6-glucuronid (M6G).

Forsøg i mus og rotter viste, at M3G ikke selv havde nogen smertestillende virkning, mens M6G besad en smertestillende effekt, større og længevarende end morfins. Dyreforsøgene tydede desuden på, at indgift af M6G ikke gav anledning til bivirkninger i samme grad som indgift af morfin. Disse resultater betød, at hvis det var muligt at renfremstille M6G til brug i mennesker, ville man have et effektivt smertestillende lægemiddelstof, som ikke gav anledning til de bivirkninger i form af kvalme, opkastning, træthed

Råopium udvindes af opiumvalmuens frø kapsel.



Friedrich Wilhelm Adam Sertürner isolerede morfin fra råopium i 1806 og testede det nye stof på hunde – og senere på studerende. (Maleri af Robert Thom).

NEDBRYDNING AF LÆGEMIDLER I KROPPEN

Metabolitter er betegnelsen for omdannelsesprodukter af lægemiddelstoffer. Metabolitter dannes primært i leveren med det formål at lette udskillelsen fra organismen. Metabolitter er oftest meget mere vandopløselige end deres moderstof, hvilket betyder, at de fordeler sig på en anden måde i kroppen og lettere udskilles med urinen.

Nogle metabolitter er uden egen farmakologisk effekt, mens andre selv besidder en farmakologisk virkning, som enten kan bidrage til de ønskede effekter, der ses efter indgift af et lægemiddel, eller til uønskede bivirkninger.



og forstoppelse, som normalt plager patienter i langvarig smertebehandling med morfin. Og da varigheden af M6G's virkning også er længere end morfins, ville man samtidigt kunne reducere antallet af daglige doser.

Smertelindring med få bivirkninger

I 1988 kom den første rapport om indgift af M6G til mennesker og i de følgende år fulgte flere undersøgelser af såvel den smertestillende effekt som bivirkninger. Resultaterne af de første undersøgelser var ikke entydige med hensyn til potensen af M6G sammenlignet med morfin. Bivirkninger som kvalme og opkastning forekom dog ikke efter indgift af M6G.

Senere undersøgelser har vist, at efter en enkelt intravenøs eller subkutan indgift af M6G, er potensforholdet til morfin ca. 1:3-4, dvs. morfin er 3-4 gange stærkere end M6G. Givet i dette forhold er forekomsten af bivirkninger efter indgift af M6G lavere end efter indgift af morfin. En injektionsvæske med M6G beregnet til behandling af smerter efter operation er nu på vej til at blive markedsført på baggrund af disse undersøgelser.

For at kunne gavne patienter med vedvarende stærke smerter, fx smerter forårsaget af kræft, er det imidlertid vigtigt også at råde over et præparat, som patienterne selv kan administrere, fx i form af tabletter eller mikstur.

Når man giver M6G via munden som en opløsning, optages kun ca. 15 procent af den indgivne mængde fra maven og tarmen. Optagelsen foregår langsomt og gennem hele tarmsystemet; mavesæk, tyndtarm og tyktarm. Til sammenligning optages morfin 100 procent og meget hurtigt allerede i den første del af tyndtarmen.

Umiddelbart har den anderledes og langsommere optagelse af M6G den fordel, at antallet af daglige doseringer kan nedsættes. Desværre betyder det også, at 85 procent af det indgivne M6G går til spilde.

Det har desuden vist sig, at en del af den mængde af M6G, der når tyktarmen, omdannes til morfin af mikroorganismer, der findes her. Morfinen optages fra tyktarmen og kan således give anledning til bivirkninger. Når blodet passerer leveren, omdannes det optagne morfin til metabolitterne M3G og M6G. Denne cyklus kan således forlænge virkningen af M6G.



OPIOIDER OG SMERTELINDRING

Opioider er smertestillende stoffer, prototypen er morfin som udvindes af opiumvalmuens frøkapsel. De mest kendte opioider er morfin, kodein, heroin og metadon.

Opioiderne virker ved at binde sig til specifikke opioide receptorer på nervecellerne, og man har i dag kendskab til tre undertyper. Den vigtigste og hyppigst forekommende opioide receptor i centralnervesystemet, er μ -receptoren.

Kroppen danner selv en type opioider, endorfiner, som også binder sig til de opioide receptorer, men endorfinerne er meget ustabile i kroppens vandfaser, så derfor er de svære at udnytte som lægemidler.

Tabletter eller mikstur

Hvis M6G med fordel skal kunne gives som tabletter, er det derfor nødvendigt at finde en måde at øge optagelsen af M6G i tyndtarmen, således stoffet optages, inden det når tyktarmen, hvor det omdannes til morfin.

Forsøg i isoleret rottetarm har vist, at man kan øge optagelsen af M6G ved at tilsætte optagelsesforøgende stoffer. Virkningen fremkommer ved, at tarmen midlertidigt bliver lettere gennemtrængelig. Risikoen ved brug af optagelsesforøgende stoffer er imidlertid, at også andre stoffer end det ønskede lægemiddelstof vil blive optaget hurtigere, og hvis disse andre stoffer tilsættes i for store mængder, er der risiko for en permanent ødelæggelse af tarmen.

Indledende forsøg i frivillige raske forsøgspersoner, hvor M6G er givet samtidig med et optagelsesforøgende stof, TWEEN 20, har desværre vist, at det ikke er muligt at øge optagelsen af M6G på den måde.

I øjeblikket gennemfører vi undersøgelser, der skal kortlægge præcis, hvor i tarmen og hvor hurtigt M6G optages efter oral indgift med henblik på at finde et egnet optagelsesforøgende stof og dermed at udvikle en tablet eller en mikstur indeholdende M6G.



Cand.pharm. Hanne Villesen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Niels-Henrik Jensen er overlæge ved Tværfagligt Smertecenter, Amtssygehuset i Herlev.

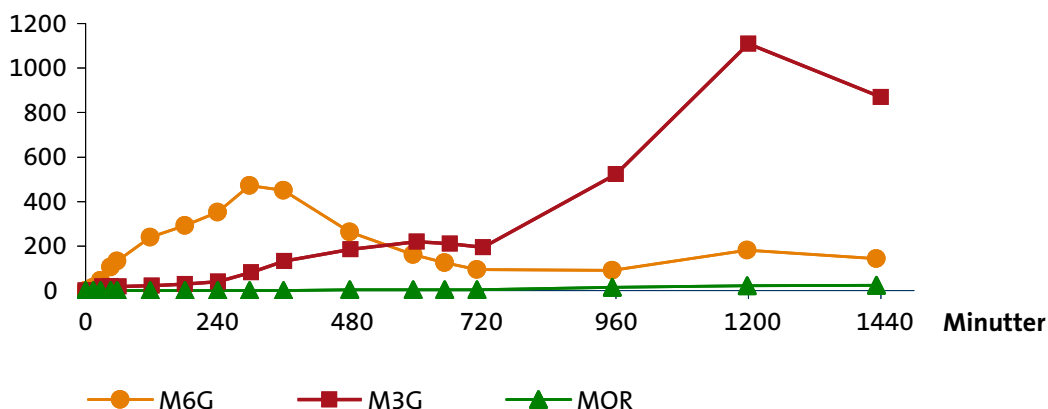


Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Lona Christrup er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Konc nmol/L



Koncentrationerne af M6G, morfin og M3G i 24 timer efter indgift af M6G til mennesker.

Analyse af blodprøver kan afsløre en løs hofteprotese

Det gør ondt, når en hofteprotese begynder at løsne sig, men desværre kan røntgenfotos først vise løsrivelsen sent i forløbet. En blodprøves indhold af metaller kan måske afsløre problemet tidligt, så patienten kan få en ny protese og blive sparet for mange smerter.

Af Bente Gammelgaard, Lars Bendahl, Stefan Stürup og Arne Borgwardt

I Danmark indsættes omkring 6000 hofteproteser om året. Proteserne er oftest fremstillet af en kombination af metallegeringer, keramisk materiale og plast. Alle typer proteser kan afgive metaller til blodet, og det sker især ved mekanisk slid. Ved at måle metalkoncentrationerne i patienternes blod med jævne mellemrum – fx hvert år – kan man kontrollere, om protesen begynder at afgive metaller som følge af det slid, der typisk opstår, når protesen ikke er indsat korrekt, eller hvis den er ved at løsne sig.

Regelmæssig kontrol vil være en stor fordel for patienterne, fordi man tidligt kan opdage, om protesen løsner sig, og i givet fald kan lægerne operere med det samme. I dag kan en proteseløsning først afsløres sent i forløbet ved hjælp af røntgenfotos. Hvis en tidlig påvisning bliver mulig, vil patienten blive sparet for mange smerter.

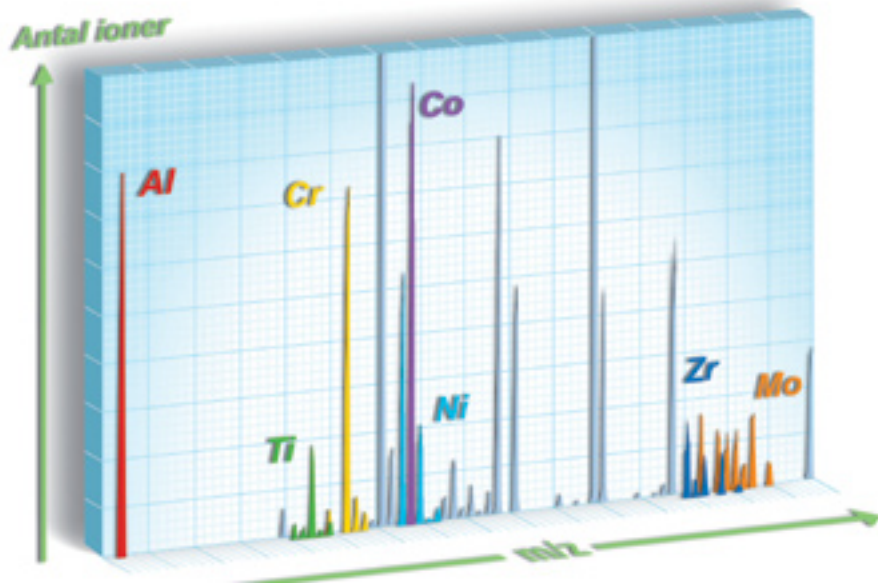
Normalt findes metaller i blodplasma i meget lave koncentrationer, og den stigning, der skal kunne måles efter indsættelse af en protese, er relativt beskedent. Derfor er det nødvendigt med højfølsomme og selektive analysemetoder for at kunne påvise, om en protese er ved at løsne sig. Den lille forskel i blodets metalindhold kan måles præcist ved hjælp af en avanceret form for massespektrometri, ICP-MS, som er til rådighed på DFU.



Kunstige hofteled

Et kunstigt hofteled består af en kugle – protesehovedet – som er fastgjort på et metalskaft, der sættes ind i lårbenknoglen. Skaftet er ofte af titan, aluminium og lidt vanadium, mens protesehovedet kan være fremstillet af en kobolt-krom-molybdænlegering eller af et keramisk materiale, som indeholder aluminium eller zirkonium.

Proteseheadet er indlejret i en skål, som fungerer som hofteled. Skålen er ofte fremstillet af hærdet plast, men i de seneste år er man i stigende grad begyndt at anvende slidflader, som består af metal mod metal. Det er især det yderst begrænsede slid i lejet, der har givet metalslidflader en ny æra. Dagens lasertechnologi tillader nemlig en uhyre præcis tilvirkning af lejekomponenterne, så der kan dannes en væskefilm mellem metalfladerne, hvilket minimerer slidet. I protesehoveder af kobolt-krom-molybdæn-



Dette ICP-MS-spektrum viser isotopmønstret af en række metaller. Antallet af isotoper varierer fra én for aluminium og kobolt til syv for molybdæn. Det indbyrdes forhold mellem et metals isotoper i spektrummet svarer til den naturlige fordeling som angivet i det periodiske system. De navngivne blågrå toppe er interferensioner, der er dannet under analysen, fx af de to største toppe argonoxid og en argondimer, som begge er dannet i argonplasmaet.



Illustrationen viser, hvordan en kunstig hofte af titan med et keramisk leje er blevet indsat i lårbenet og hofteknogle.

legeringer er skålen foret med den samme legering. Når knoglerne bevæges, kan partikler fra det kunstige led frigives til blodbanen. Frigivelsen sker ved mekanisk slid på de flader, som glider mod hinanden, og ved galvanisk korrosion fra hele ledprotesens metaloverflade. Det mekaniske slid er størst under indkøringsfasen i det første år efter indsættelsen af protesen. Desuden stiger frigivelsen af metaller, hvis ledprotesen løsner sig, fordi en forkert stilling øger det mekaniske slid.

Hofteprojektet på Frederiksberg

Ortopædkirurgisk Klinik på Frederiksberg Hospital startede i 1998 et stort videnskabeligt projekt med 300 patienter, som alle fik indsat en kunstig hofte. Patienterne blev inddelt i fire grupper ved lodtrækning, og slidfladerne i deres kunstige hofter var forskellige fra gruppe til gruppe. Siden er patienterne blevet fulgt nøje hvert år med røntgenundersøgelser, spørgeskemaer, interviews og kliniske undersøgelser af hofteens funktion.

Det tredje år blev undersøgelsen udvidet med en blodprøve. Formålet var at måle koncentrationerne af en række metaller, som er relevante for de enkelte typer hofteproteser. På den måde opnår man viden om sammenhængen mellem metalkoncentrationer i blodet og slid på protesen.

Analyse af metaller

Blodprøvernes indhold af aluminium, kobolt, chrom, molybdæn, nikkel, titan og zirkonium blev målt ved hjælp af ICP-MS. Målemetoden er enestående ved at kunne bestemme ekstremt lave koncentrationer af mange metaller samtidig, og stort set alle metaller kan måles på én gang i samme analyse.

Resultatet af den første måleserie var, at der ses forhøjede værdier af kobolt, krom og molybdæn i blodprøver fra de patienter, der havde fået indopereret protesehoved og hofteknål af kobolt-krom-molybdæn legeringen. En tilsvarende forhøjelse blev ikke fundet i de tre øvrige grupper. Dette er et tegn på, at målemetoden virker og med sikkerhed kan bestemme de nævnte metaller, hvilket bestyrkes af, at patienterne blev fordelt i den pågældende gruppe ved lodtrækning. Der blev ikke observeret øget frigivelse af aluminium, nik-

SÅDAN VIRKER ICP-MS

Koncentrationerne af metaller i en blodprøve kan analyseres ved hjælp af ICP-MS, som står for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Blodprøven forstøves og indføres i et argonplasma, som har en temperatur på ca. 8000° C. Her afbrændes alt organisk materiale, og prøven atomiseres og ioniseres. Derefter indføres ioner af alle tilstedeværende grundstoffer i massespektrometret, hvor ionerne adskilles efter deres masse-ladningsforhold og føres ind i detektoren, som påviser blodets indhold af de relevante metaller.

Koncentrationsmålinger i rene vandige opløsninger er principielt mulige helt ned i området parts pr. trillion – svarende til en dråbe blæk i et svømmebassin med olympiske mål. Der er dog begrænsninger, fordi der ved måling af nogle metaller optræder interferens; dvs. at andre stoffer forstyrrer målingen af det pågældende metal. Fænomenet er særligt udtalt i biologiske prøver som plasma, som indeholder en lang række interfererende stoffer.

kel eller zirkonium i nogen af grupperne, men nogle patienter havde stærkt forhøjede værdier af titan i blodprøven. Metalskiftet, der indsættes i lårbenet, er hos alle patienterne fremstillet af titan. Det er ikke endeligt klarlagt, om der er en sammenhæng til proteaseløsning hos denne patientgruppe, men patienterne følges nøje.

En enkelt patient, som på tidspunktet for blodprøvetagningen klagede over stærke smerter i hoften, havde mere end 10 gange forhøjede titanværdier sammenlignet med normalværdierne hos personer uden en indsat protese. Patientens røntgenbilleder gav ikke entydigt svar på proteaseløsning, men på grund af patientens stærke smerter blev hofteleddet opereret. Metalskiftet lod sig umiddelbart fjerne med hånden, hvilket er et klart bevis på, at protesen havde løsnet sig helt. Blodprøver udtaget en uge efter fjernelsen af den dårligt fungerende protese viste nu normale koncentrationer af titan i serum, og patienten blev smertefri efter operationen.

Hvis måling af metalindholdet i en blodprøve indikerer, at protesen er ved at løsne sig, kan patienten opereres tidligere i forløbet og skånes for mange smerter. Der kræves dog forsigtigt en række undersøgelser og målinger, før en rutineprøve til metalbestemmelse kan indføres på danske hospitaler til dette formål.

FLERE YNGRE PATIENTER FÅR NYE LED

Afgivelse af metaller fra en slidt ledprotese medfører en stigning i koncentrationerne i blodet af især krom, kobolt og titan. Forhøjede niveauer af disse metaller over længere tid kan medføre toksiske virkninger og bør derfor begrænses.

Hidtil er langt de fleste ledproteser blevet indopereret i en sen alder, hvorfor man ikke har fokuseret så meget på eventuelle skadelige langtidsvirkninger af frigivne metaller. Men efterhånden får flere yngre mennesker erstattet hofteled med proteser, hvor lejematerialet består af metal mod metal.

Disse patienter skal leve med deres proteser i meget længere tid, og deres fysiske aktivitet er også betydeligt højere, fordi proteserne fungerer så godt, at de ikke hæmmer bevægelsesfriheden. Der er således risiko for en markant højere afgift af metaller gennem en længere årrække.



Ph.d. Bente Gammelgaard er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Lars Bendahl er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Stefan Stürup er lektor Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Overlæge Arne Borgwardt er klinikchef på Ortopædkirurgisk Klinik, Frederiksberg Hospital.

Hurtigere kemiske analyser – til gavn for alle

Hurtigere kemiske analyser fremmer forskning i og udvikling af nye lægemidler til gavn for patienterne. Samtidig formindskes medicinalindustriens tidsforbrug og omkostninger. Men analyserne skal ikke blot være hurtige – de skal også være pålidelige.

Af Steen Honoré Hansen

I en årrække har forskning og udvikling af nye lægemidler været præget af et voksende behov for kunne gennemføre projekter hurtigere og reducere tiden fra ide til produkt. For medicinalindustrien er øget hastighed med til at optimere cost-benefit for det enkelte udviklingsprojekt, og set fra patienternes synspunkt er det en stor fordel, at nye og bedre lægemidler kommer hurtigere på markedet.

”High throughput screening”, som vel bedst kan oversættes med undersøgelser af tusindvis af potentielle lægemiddelstoffer eller biologiske prøver på ultrakort tid, er blevet nøgleordet inden for mange discipliner i lægemiddeludviklingen, og det gælder naturligvis også for analytisk kemi. Det er dog ikke blot hurtigere svar, men også mere pålidelige

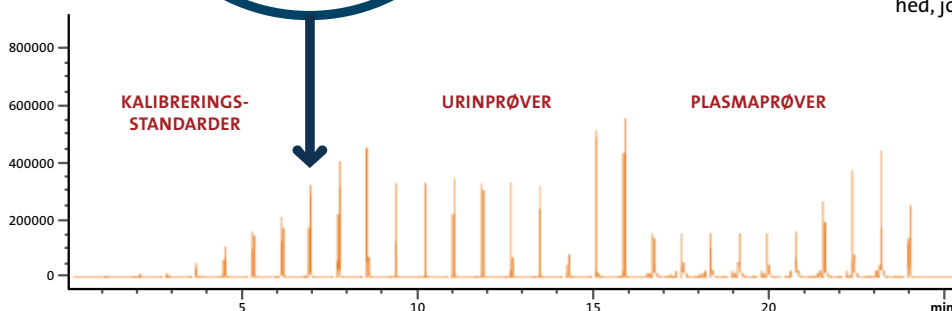
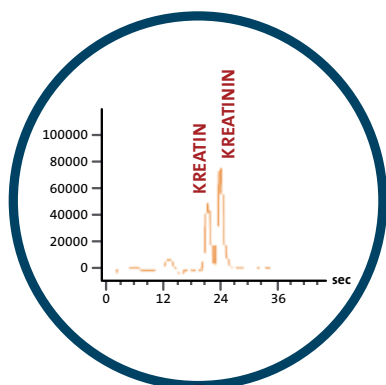
analyser, som ønskes af alle. At opnå dette kræver udvikling og implementering af robuste analysemetoder, som arbejder ved høj hastighed.

Højtryksvæskekromatografi

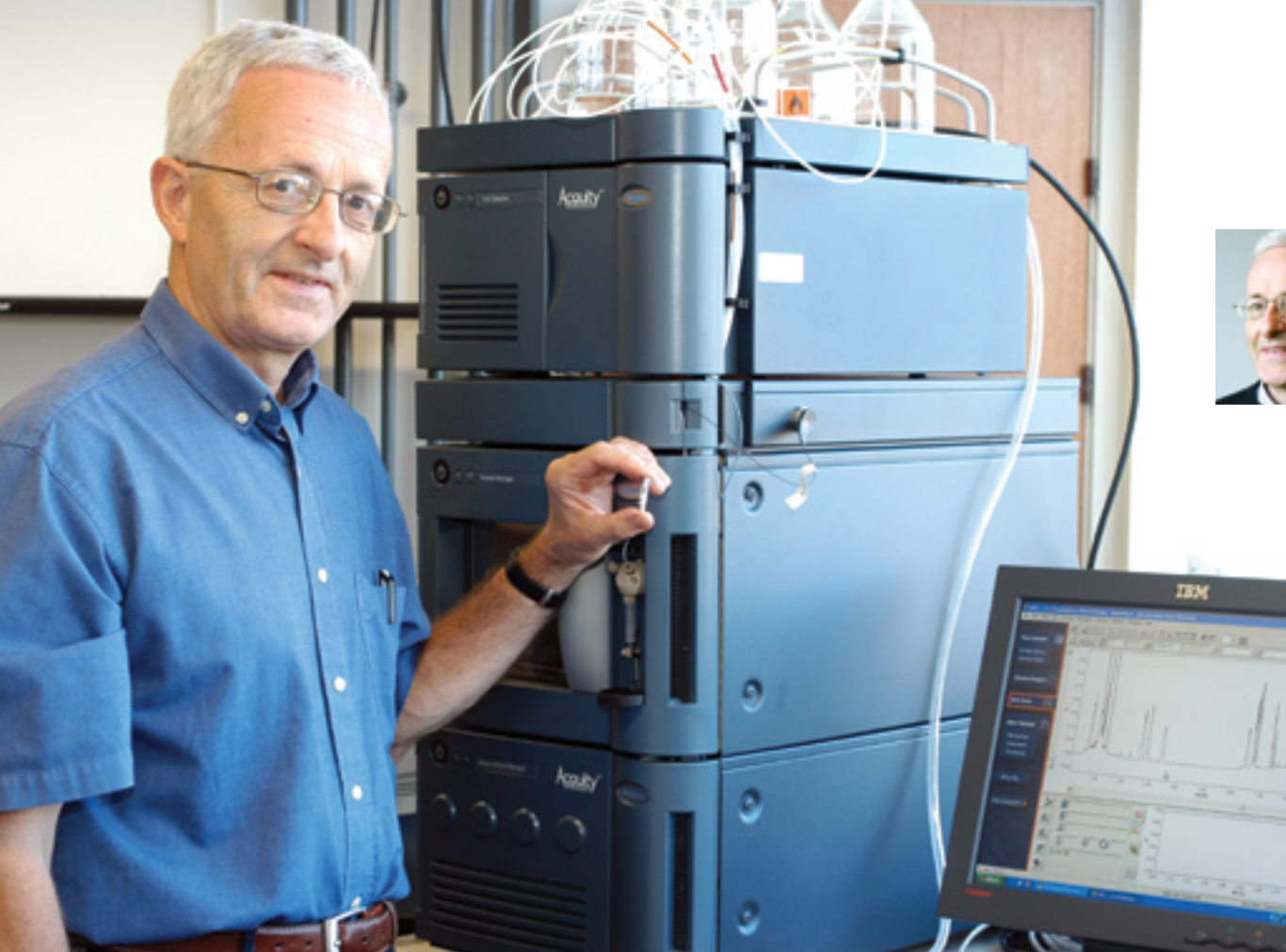
Højtryksvæskekromatografi (HPLC) er et af de vigtigste værktøjer i analytisk kemi. Metoden bruges både til analyse af lægemiddelråvarer og færdige produkter som tabletter og injektionsmedicin og til analyse af lægemiddelstoffer og deres metabolitter i biologisk materiale som urin og blod. Ved analysen pumpes en væske gennem en kolonne, og prøven indføres i væsken i den ene ende af røret. Kolonnens inderside er beklædt med et materiale, der binder forskellige stoffer med forskellig effektivitet, og på den måde kan stofferne i en blanding adskilles, hvis de har forskellig affinitet for kolonnematerialet. Ved udgangen af kolonnen måles de enkelte stoffer ved hjælp af forskellige detektorer, fx massespektrometre.

I et sådant system kan man kun analysere én prøve ad gangen. Når den første prøve er kommet igennem kolonnen, kan den næste prøve indføres i systemet. Typiske analyseløbetider ligger fra nogle minutter til op imod en halv time. Så lange analyseløbetider er imidlertid uacceptable, når der skal analyseres tusindvis af prøver.

Selve separationens effektivitet er primært afhængig af størrelsen af de partikler, som kolonnematerialet består af, samt af kolonnens længde. Jo mindre partikler, jo mere effektiv separation. Den hastighed, hvormed analysen kan udføres, er afhængig af kolonnens længde og flowhastigheden i væsken. Jo kortere kolonne og højere flowhastighed, jo kortere analyseløbetid.



Væskekromatografisk analyse af kreatin og kreatinin med massespektrometrisk detektion. Øverst ses et kromatogram af separationen af en enkelt prøve, nederst en serie på 26 kromatogrammer. Analysen af de 26 injektioner tager ca. 25 minutter. Kromatograferingstiden for en enkelt prøve varer kun ca. 25 sekunder, men dertil tager det ca. 18 sekunder at udføre selve injektionsproceduren. Den samlede analyseløbetid for et kromatogram kommer således til at ligge på under et minut.



Dr. pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Moderne kolonne: Kortere kolonner betyder kortere analysetid – et vigtigt parameter, når der skal analyseres tusindvis af prøver.

Ultra – ti gange hurtigere

Historisk set har analysemetoden eksisteret i 35 år. Især i de senere år er den teknologiske udvikling løbet stærkt, og fra at bruge partikler af størrelsen 30-50 mikrometer pakket i lange kolonner på 30-100 centimeter, anvender man nu typisk partikler af størrelsen 3-5 mikrometer pakket i kortere kolonner på 3-150 millimeter. For yderligere at kunne reducere analysetiden og samtidig bevare en effektiv separation er man nu begyndt at anvende partikler af størrelsen 1,7-1,8 mikrometer. De meget små partikler betyder, at der kræves ekstra ydeevne af pumpen, som skal pumpe væske igennem kolonnen, specielt ved længere kolonnelængder.

I 2004 er en ny platform for HPLC blevet udviklet, hvor pumpen kan arbejde ved op til 1000 atmosfæres tryk mod tidligere kun 400. Den ny teknik kaldes ultra-højtryksvæskerkromatografi (UPLC), og metoden gør det muligt at anvende kolonner på 10 centimeters længde pakket med 1,7 mikrometer partikler. I praksis betyder dette, at analyseti-

den alt andet lige kan reduceres med omkring en faktor 10 i forhold til det nuværende niveau.

Kreatinin-analyse

Et eksempel på en nyudviklet analysemetode med kort analysetid er en metode til samtidig og specifik bestemmelse af forholdet mellem kreatin og kreatinin i urin og blodplasma. Specielt analyse af kreatinin anvendes i stort omfang som et klinisk-kemisk parameter for den menneskelige organismes funktionsstatus ved en lang række sygdomstilstande.

Der udføres hvert år flere hundredetusinder kreatininanalyser på de klinisk biokemiske laboratorier på danske hospitaler, og den anvendte metode er en uspecifik farvareaktion, hvor andre stoffer kan blive medbestemt ved analysen. Ultra-højtryksvæskerkromatografi er tidsmæssigt konkurrencedygtig og samtidig langt mere specifik og dermed mere nøjagtig.

KREATININ VISER NYREFUNKTIONEN

Kreatin er et organisk stof, som findes i muskler, hvor det danner den energirige forbindelse kreatinfosfat, som indgår i musklernes energiomsætning. Musklernes indhold af kreatinfosfat spiller en vigtig rolle for kortvarigt, intensivt arbejde; hos et gennemsnitsmenneske rækker en muskels depot til 6-12 sekunders hårdt arbejde. Under processen omdannes kreatinfosfat til kreatinin, som udskilles fra blodet til urinen via nyrerne. Da dannelsen af kreatinin sker i et jævnt tempo, kan koncentrationen af kreatinin i blodet anvendes som et mål for nyrernes funktion, fordi stoffet ophobes ved nedsat nyrefunktion. I nyrefysiologien anvendes kreatininudskillelse som et generelt mål for nyrernes evne til at filtrere blodet for affaldsstoffer. Kreatinin er en af de mange klinisk-kemiske parametre, man tager i anvendelse, når sygdomme som fx nyreinsufficiens, hjerte-kar sygdomme og diabetes skal diagnostiseres.

Kan humane celler erstatte forsøgsdyr i lægemiddelkontrol?

Hvert år anvendes et stort antal kaniner til kontrol af lægemidlers renhed. Kaniner bruges, fordi deres immunrespons på feberfremkaldende stoffer minder om menneskers. En ny test baseret på humane celler er under udvikling. Målet er at overflødig gøre brugen af forsøgsdyr til rutinekontrol af lægemidler.

Af Michael Timm, Erik Wind Hansen,
Lise Moesby og Jens Dencker Christensen

Lægemidler til injektion testes rutinemæssigt for tilstedeværelse af stoffer, der kan frembringe feber i mennesker. Sådanne stoffer kaldes pyrogener og kan være mikroorganismer eller toksiner, der oprindeligt stammer fra bakterier, svampe eller vira.

Hvis et lægemiddel er forurenede, vil pyrogenene hurtigt kunne spredes i kroppen. De fysiologiske effekter af pyrogener er mangfoldige og kan bl.a. udløse forhøjede koncentrationer af inflammatoriske signalstoffer, hvilket kan medføre feber, muskelømhed og hovedpine. Indgift af forurenede lægemidler kan i yderste konsekvens være dødelig, og det er derfor af største vigtighed, at lægemidler til injektion kontrolleres for tilstedeværelse af pyrogener.

Der findes i dag to godkendte kontrolmetoder. Den ene er kaninpyrogentesten, hvor kaniner injiceres med en dosis af lægemidlet. Kaniners følsomhed overfor pyrogener kan sammenlignes med menneskers, og testen kan detektere et bredt spektrum af pyrogener. Den anden metode, Limulus Amebocyte Lysate-testen (LAL), er baseret på blod tappet fra dolkhaler. Testen anvendes især, fordi den er meget følsom overfor et enkelt pyrogen, men den kan ikke påvise andre feberfremkaldende stoffer eller mikroorganismer. Ud over de to godkendte metoder udvikles der nu en test, der anvender en cellelinie af humane makrofager. Alle tre metoder har dog ulemper, og ingen af dem er særligt følsom-

me overfor gær og svampe. Med inspiration fra det menneskelige immunsystem arbejder vi derfor på at udvikle en ny bredspektret pyrogentest.

Kroppens reaktion på mikrobielle stoffer

Mikroorganismer, der trænger gennem huden, bekæmpes af immunforsvaret. En lokal infektion kan fx opstå, hvis man får en splint i fingeren, og bakterier trænger ned i det underliggende væv. I kroppen indledes nedkæmpelsen af bakterierne via aktivering af de hvide blodceller. Specielt to typer hvide blodceller er vigtige i det hurtige respons på fremmede stoffer: Makrofager og polymorfonukleære leukocytter (PMN). Disse celler befinder sig dels i blodbanen og dels i vævet.

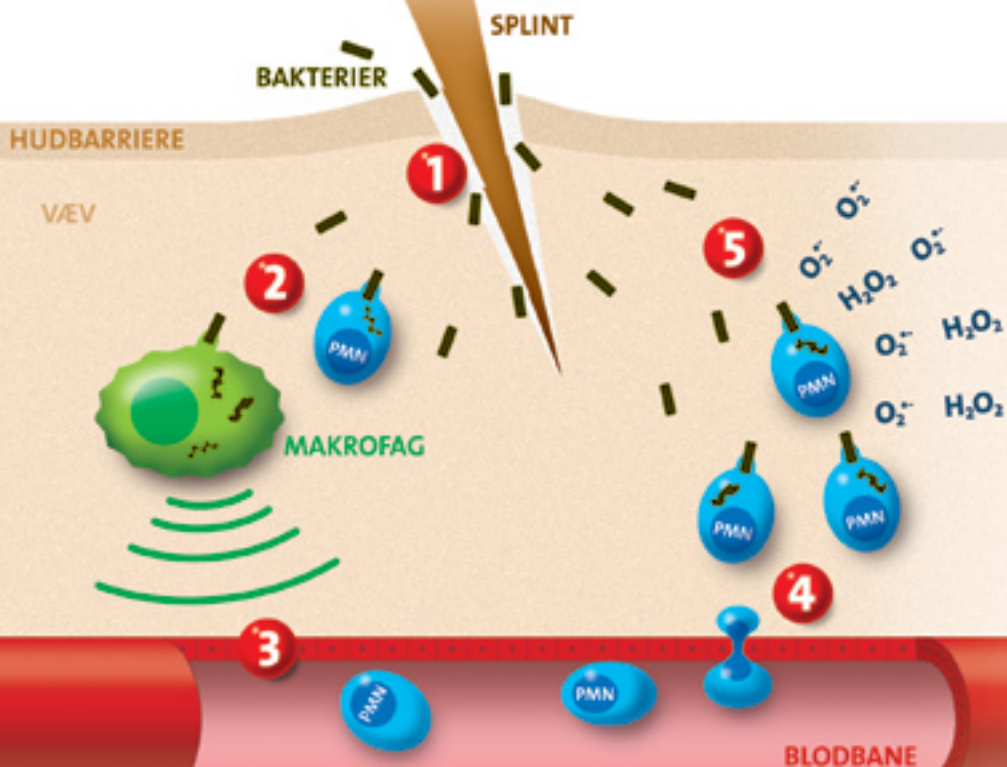
Det er makrofagerne i vævet, som først genkender og optager udefra kommende fremmedlegemer som fx bakterier, og når det sker, alarmerer makrofagerne andre celletyper om, at en infektion er under udvikling. De celler, der hurtigst rekrutteres til bekæmpelsen, er PMN-celler, som bevæger sig mod infektionsstedet fra vævet og blodbanen. PMN-celler er fagocytterende, hvilket vil sige, at de optager og nedbryder invaderende mikroorganismer og mikrobielle toksiner. Til det formål danner og frigiver cellerne bakterie- nedbrydende stoffer; fx reaktive iltforbindelser som superoxid, hydrogenperoxid og hydroxylradikaler. De reaktive iltforbindelser dannes og frigives meget hurtigt ved kontakt med mikroorganismer eller mikrobielle stoffer.

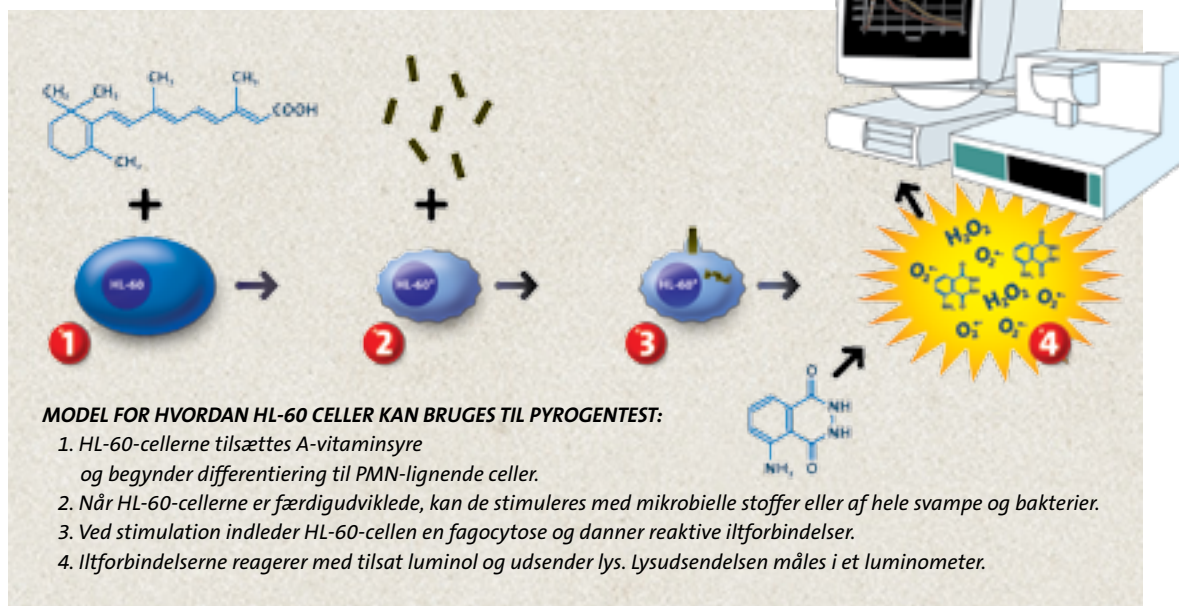
Hvis en ny pyrogentest skal kunne påvise pyrogener, som mennesker vil reagere på, er det derfor nærliggende at bruge immunsystemets PMN-celler som testsystem. Detektion af reaktive iltforbindelser i systemet vil indikere, at et lægemiddel er forurenede med pyrogener.

Reaktive iltforbindelser reagerer med stoffet luminol under dannelse af et exciteret molekyle, og når molekylet vender

KROPPENS BEREDSKAB MOD INFEKTIONER:

1. Hudbarrieren brydes, hvilket giver bakterier adgang til det underliggende væv.
2. Bakterierne genkendes af makrofager og PMN-celler, som med det samme begynder at optage og nedbryde de invaderende bakterier via en proces, som kaldes fagocytose.
3. Makrofagerne sender signaler til andre celletyper i blodbanen om, at en infektion er startet.
4. PMN-celler i blodet reagerer hurtigt på signallerne og trækker ud i vævet, hvor de bevæger sig mod det inficerede sted.
5. PMN-cellerne starter fagocytosen af bakterierne og frigiver samtidig antimikrobielle stoffer, bl.a. reaktive iltforbindelser.





Cand.pharm. Michael Timm er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Lic.pharm. Erik Wind Hansen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Ph.d. Lise Moesby er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Lic.pharm. Jens Dencker Christesen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

tilbage til sin grundtilstand, udsendes der lys. Fænomenet kaldes luminescens. Med et luminometer, der registrerer lys, kan man måle intensiteten fra en sådan reaktion og dermed kvantificere mængden af dannede reaktive iltforbindelser.

Når PMN-celler genkender mikroorganismer eller mikrobielle stoffer, danner de reaktive iltforbindelser, som kan påvises via luminescens. På den måde kan man bruge celler fra det humane immunforsvar til at kontrollere lægemidler for tilstedeværelse af feberfremkaldende stoffer. PMN-celler har dog den ulempe, at de kun kan overleve i få timer, efter at de er blevet isoleret fra blodet. Anvendelse af cellerne til pyrogentest er derfor problematisk på grund af deres korte levetid.

Human cellelinie som testsystem

Et alternativ til isolerede PMN-celler er cellelinier. Det er celler, som er isoleret fra mennesker eller dyr, og som vokser ud over det antal celledelinger, der normalt er muligt. Cellelinier er derfor nærmest udødelige, og oftest stammer de fra kræftceller. På grund af udødeligheden er det praktisk at anvende cellelinier til kontrol af lægemidler. Den humane cellelinie HL-60 kan bringes til at udvikle sig til PMN-lignende celler, når A-vitaminsyre tilsættes til kulturen. HL-60-celler besidder herefter, ligesom PMN-celler, evnen til at udskille reaktive iltforbindelser, hvis de kommer i kontakt med mikrobielle stoffer. Vi kan således udvikle HL-60-cellelinien til en celletype, der funktionelt ligner PMN-cellerne fra det menneskelige immunsystem.

Med det udgangspunkt har vi lavet en test, der er i stand til at detektere pyrogener. Når HL-60-cellerne stimuleres med mikrobielle stoffer, opfører de sig som PMN-celler og nedbryder mikroorganismen under dannelse af reaktive iltforbindelser. Iltforbindelserne reagerer med tilsat luminol og udsender lys, der detekteres i et luminometer.

Vi har nu undersøgt cellernes evne til at detektere nogle mikroorganismer og mikrobielle stoffer. Resultaterne af de første forsøg med det nye system viser, at HL-60-cellerne kan genkende mange forskellige bakterier og mikrobielle stoffer, og nogle stoffer kan endda påvises i lavere koncentrationer end i kanintesten.

Det mest interessante er dog, at den nye metode kan detektere gær og svampe i lavere koncentrationer end de eksisterende pyrogentests. Dette er specielt vigtigt i forbindelse med udvikling og kontrol af lægemidler, der produceres i bioreaktorer ved hjælp af gensplejede mikroorganismer, fx human insulin, fordi sådanne rekombinante lægemidler kan indeholde rester af fx gærceller.

HL-60-celler har desuden den fordel, at udskillelsen af de reaktive iltforbindelser sker meget hurtigt efter kontakt med mikrobielle stoffer, og det er derfor muligt at gennemføre hele testen inden for et par timer. Anvendelse af HL-60-celler i en luminescenstest kan derfor sandsynligvis danne grundlag for en ny hurtig metode til detektion af pyrogener. Det er endda muligt, at en kombination af to eller flere pyrogentests med forskellige cellelinier helt kan overflødiggøre brugen af forsøgsdyr til rutinekontrol af lægemidler til injektion.

Mikroskopibillede af HL-60 celler efter fagocytose af bakterier, der er mærket med et fluorescerende stof. Omridset af HL-60-cellerne ses i en orangerød farve, og de fluorescerende bakterier ses som gule pletter inde i HL-60-cellerne.



Atopisk eksem er en yderst generende sygdom, der kan have store konsekvenser for den syge og omgivelserne. I denne undersøgelse viste sygdommen sig velegnet til at udforske, hvordan lægemiddelforbrugerne forholder sig til forskellige aspekter omkring deres lægemiddelforbrug.



Den aktive, engagerede og usikre lægemiddelforbruger

Opfattelsen af den moderne lægemiddelforbruger som aktiv og engageret bør også rumme elementer af usikkerhed, bekymring og magtesløshed. Det viser interviews med personer, som håndterer behandlingen af deres egen eller deres barns atopiske eksem.

Af Mikkel Nørreslet, Janine M. Traulsen og Gregor B. E. Jemec

Brugernes forhold til sundhedsvæsenet er under forandring. Det forlyder fra flere sider, at de traditionelle patienter, der følger lægens, sundhedsplejerskens og apotekspersonalets anvisninger uden større indvendinger, bliver færre og færre, og at de i stigende grad erstattes af kritiske, utålmodige og til tider "bedrevidende" forbrugere.

Hvis man definerer lægemidler som en del af de ydelser, sundhedssystemet tilbyder dets brugere, gælder den beskrevne tendens sandsynligvis også forbrugere af lægemidler. Meget tyder på det, men få har udforsket problemstillingen set fra brugernes perspektiv. Ved at kende brugernes forhold til lægemidler vil det være nemmere at imødekomme deres ønsker og behov.

For at udforske brugernes forhold til lægemidler blev 12 voksne med atopisk eksem og 12 forældre til børn med atopisk eksem interviewet. Rekrutteringen af disse personer skete i samarbejde med Dermatologisk Ambulatorium ved Roskilde Amts Sygehus, der på det tidspunkt var i gang med at etablere en eksemskole.

De fleste interviews fandt sted i deltagerens eget hjem, og alle interviews blev udført af farmaceut og ph.d.-studerende Mikkel Nørreslet.

Atopisk eksem – et godt udgangspunkt

Der er flere grunde til, at vi tog udgangspunkt i personer, der håndterer behandling af deres egen eller deres barns atopiske eksem. Der er nemlig en række forhold i spil, som vi før undersøgelsen antog, ville fremme "forbrugerhandling". De vigtigste forhold er:

- Atopisk eksem er en kronisk, men ikke dødelig sygdom, der dog er yderst generende.
- Atopisk eksem er nem at overvåge selv, fordi sygdommen er en hudlidelse.
- Behandlingen består af en blanding af almindeligt tilgængelige cremer og lægemidler, hvoraf nye lægemidler var kommet på markedet umiddelbart inden undersøgelsens start.

Under interviewene stod det klart, at deltagerens udtalelser i høj grad var bundet til deres egen livssituation – de var med andre ord komplekse. Den efterfølgende tematiske analyse reducerede denne kompleksitet og afslørede grundlæggende mønstre i deltagerens udtalelser. Mønstre, der viste, hvordan brugerne forholder sig til lægemidler.

Risici ved brug af lægemidler

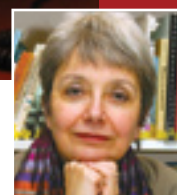
Et centralt og gennemgående træk i deltagerens beskrivelser var bekymring for at anvende lægemidler i længere perioder. Primært når det drejede sig om receptpligtige lægemidler. Det var især bekymringer omkring lægemidlenes bivirkninger, der blev nævnt. Enkelte deltagere frygtede dog også, at lægemidlerne havde en degenererende frem-



Internettet er en af de mange kilder, der anvendes til at søge oplysninger om medicin og sygdom.



Cand. pharm.
Mikkel Nørreslet er
ph.d.-studerende ved
Institut for Farmakologi
og Farmakoterapi.



Fil.dr. Janine M. Traulsen
er lektor ved Institut for
Farmakologi og Farmako-
terapi.



Dr. med. Gregor B.E.
Jemec er overlæge ved
Dermatologisk Ambula-
torium på Roskilde Amts
Sygehus.

TYPISKE UDTALELSER OMKRING LÆGEMIDLER

"...så snart at man sætter et eller andet på recept, så har vi andre mere respekt for det. Ingen tvivl om det. Der er sådan ligesom et faresignal om, at her skal man passe lidt på." (Mor, 38 år/datter 8 år)

"... jeg har det indtryk, at det [red: risiko forbundet med brug af steroid creme] er retlinet afhængig af den mængde, du smører på huden. Jeg bruger det i det omfang, jeg kan klare det, minimumsforbrug." (Mand, 40 år)

"Da jeg havde brugt det i tre dage, så var det [red: eksemen] væk, og så stoppede jeg igen, for jeg bryder mig ikke rigtig om det der hormoncreme. Det er fordi, der har været nogle ting oppe og vende i medierne om, at de der hormoncremer, man ved ikke rigtig, hvad langtidsvirkningerne egentlig er..." (Mor, 34 år/datter 1 år)

"...min hud i ansigtet kan ikke tåle steroider mere, men på den anden side så kan jeg ikke undvære at behandle det med et eller andet." (Kvinde, 49 år)

for en regenererende virkning på kroppen. I denne sammenhæng markerede hormonpræparaterne sig stærkt. Under interviewene kom det også frem, at deltagerne personligt forsøgte at vurdere de risici, der kan være forbundet med anvendelsen af lægemidler. I den forbindelse brugte de mange forskellige informationskilder fx internettet, indlægssedler, familie og venners erfaringer samt samtaler med læger og personale på apotekerne. I forlængelse heraf fremstod den personlige erfaring med et lægemiddel som et yderst centralt aspekt for flere af deltagerne – især for de, der selv havde atopisk eksem. På baggrund af interviewene var det tydeligt, at deltagerne ofte handlede ud fra disse personlige vurderinger, ved f.eks. at undgå bestemte lægemidler, efterspørge specifikke lægemidler eller ved at være forsigtige i deres brug.

Medicin – et nødvendigt onde

De fleste deltagere anerkendte dog også lægemidlers nytte og relevans. Koblet med deltagerens bekymringer stod det således klart, at lægemidler blev betragtet som et "nødvendigt onde". Et onde, som flere havde forsøgt at frigøre sig fra ved f.eks. at ændre kostvaner, undgå bestemte beklædningsgenstande eller besøge alternative behandlere. Så godt som alle disse forsøg havde dog været utilstrækkelige, og de fleste af deltagerne kunne ikke klare sig uden

medicin. Slet ikke i en travl hverdag, hvor familie og arbejde også kræver tid og overskud.

Deltagerne var med andre ord afhængige af lægemidlers virkning. Den udbredte bekymring blev dog brudt af tre af deltagerne. En mand på 80 år og to kvinder (med sundhedsmæssig uddannelse) gav udtryk for en mere pragmatisk og mindre bekymret holdning til lægemidler/lægemedelforbrug. Disse tre mente ikke, at der var reelle risici forbundet med deres eget eller deres barns lægemiddelforbrug – et forbrug de selv anså for at være begrænset.

Den usikre lægemiddelforbruger

Hvad peger resultaterne så på? Jo, de peger på, at aspekter vedrørende usikkerhed, bekymring og magtesløshed er med til at karakterisere den såkaldte "lægemiddelforbruger". Samme tendens er tidligere set i internationale undersøgelser, der viser, at disse aspekter er vigtige elementer i brugernes forhold til lægemidler – også i relation til ikke-dermatologiske sygdomme. Det at være selvstændig, kritisk og utålmodig, ja endda "bedrevidende" (hvilket kan diskuteres) indebærer således ikke at være fri for bekymringer. Tværtimod, så tyder meget på, at selvstændighed og bekymringer går hånd i hånd hos lægemiddelforbrugeren. En erkendelse heraf er nødvendig, hvis lægemiddelforbrugers ønsker og behov skal imødekommes.

THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES



Lægemiddelforskning

udgives af Danmarks Farmaceutiske Universitet

Redaktion

Mette Rasmussen (ansvarshavende), Jesper Munck og Rolf Haugaard

Billedredaktion

Jesper Munck og Jens Raadal

Fotos

DEA (2, 16) Jesper Munck (5, 21, 35, 39), Affymetrix (6), Stock.xchng (8, 9, 14, 26, 31),
ALK-Abelló (12), FOCI (19), Søren Brøgger Christensen (28-29), Kim Itenov (30),
LEO Pharma A/S (38)

Grafik/illustrationer

Jens Raadal (4, 8, 11, 14, 15, 24, 27, 36,37), Henning Dalhoff (10, 22, 32, 33)

Grafisk design og produktion

Jens Raadal

Tryk

Eks-skolens Trykkeri

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

