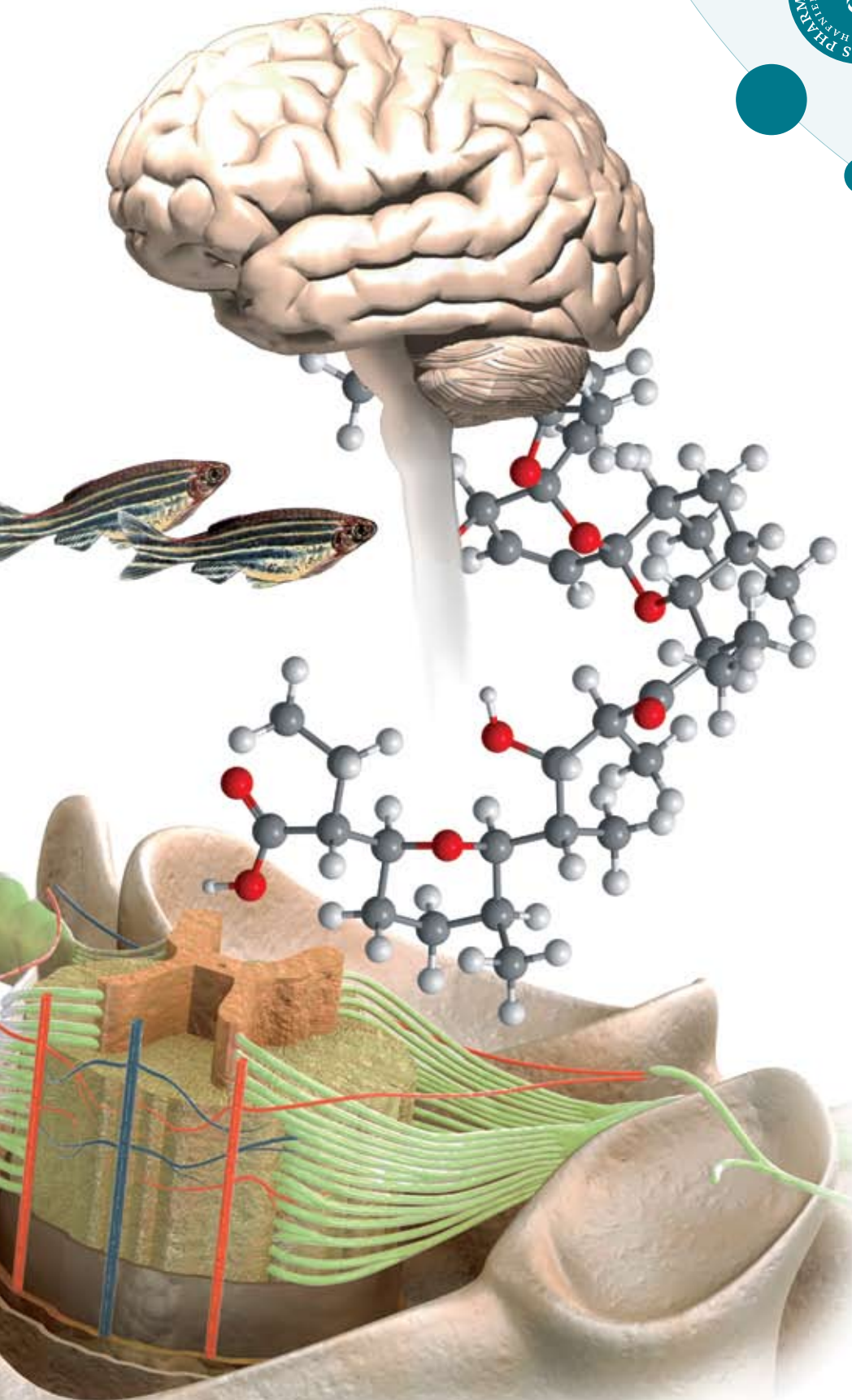


Lægemiddelforskning 2007



DET FARMACEUTISKE FAKULTET
KØBENHAVNS UNIVERSITET

Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet, har som den eneste universitetsinstitution i Danmark lægemidlet i fokus for forskning og uddannelse. Sammen med Det Naturvidenskabelige Fakultet, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet og Det Biovidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet udgør Det Farmaceutiske Fakultet (FARMA) en af Europas største og stærkeste akademiske institutioner inden for Health and Life Science. Da forskning inden for lægemiddelområdet af natur er interdisciplinær, giver Det Farmaceutiske Fakultets placering i det ny Københavns Universitet optimale muligheder for at udvikle de farmaceutiske videnskaber til gavn for studerende, ansatte og den samlede sundhedssektor.

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



Sven Frøkjær, dekan

Gymnasieklassebesøg

Formålet med besøgsordningen er at give eleverne mulighed for at se, hvordan kemi og biologi i gymnasiet anvendes i lægemiddelforskningen på Det Farmaceutiske Fakultet. Det sker i et møde med både studerende, forskere og undervisere på FARMA, og derved håber vi at kunne give inspiration til den daglige undervisning. Et besøg består to faglige foredrag, en rundvisning og et studenteroplæg om farmaceutuddannelsen og universitetslivet. I øjeblikket er vi i gang med at udbygge gymnasiebesøgsordningen med tilbud om laboratorie- og regneøvelser. Læs mere på www.farma.ku.dk/gymnasier

På www.farma.ku.dk/lmf kan man hente inspiration i de tidligere årgange af Lægemiddelforskning. Her kan du også finde en emnefortegnelse og foretage fuldtekstsøgning i årgangene 1999-2007.

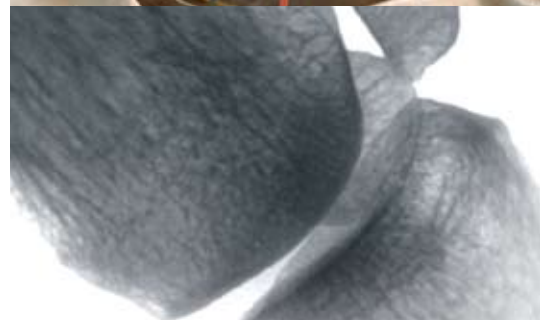
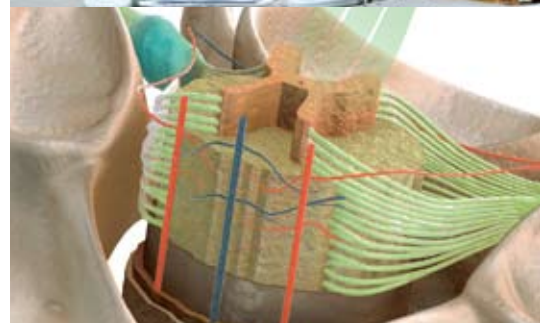
På www.farma.ku.dk optræder – i forbindelse med FARMA's tre institutter – en gennemgang af Fakultetets forskningsområder.

På www.farma.ku.dk/farmaceut er der information om farmaceutuddannelsen og dens mange erhvervsmuligheder.

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

Indhold

- 1 Anti-diabetisk te fra nigeriansk folkemedicin** 4-5
Af Joan Campbell-Tofte og Per Mølgaard
- 2 Hvilke lægemidler tager du egentlig? Og er medicinen god for dig?** 6-7
Af Søren Ilsøe-Kristensen, Steffen Thirstrup og Mette Rasmussen
- 3 Gram-positive bakteriers pyrogener er meget varmostabile** 8-9
Af Lise Moesby, Erik Wind Hansen, Jens D. Christensen, Michael Timm, Stine Bartelt
- 4 Gennembrud i forståelsen af insulinfibrillering** 10-11
Af Minna Grønning Jensen, Bente Vestergaard, Sven Frøkjær, Michael Gajhede, James M. Flink, Marco van de Weert, Jette S. Kastrup, Dmitri I. Svergun.
- 5 Farvel til sprøjten: Udvikling af vaccineplaster med nanopartikler** 12-13
Af Henriette Baun Madsen, Peter Ifversen, Flemming Madsen, Søren Manniche og Hanne Mørck Nielsen
- 6 Liposomer i lægemiddelforskningen** 14-15
Af Ulrik Franzen, Lene Jørgensen, Claus Larsen, Henrik Jensen og Jesper Østergaard
- 7 Molekylær biofarmaci – når medicin skyder genveje!** 16-17
Af Luise Kvisgaard Gram, Diana Højmark Omkvist, Mie Larsen, Carsten Uhd Nielsen, Birger Brodin og Bente Steffansen
- 8 Transportpeptider – nøglen til forbedret optagelse af lægemiddelstoffer** 18-19
Af Karina Thorn, Carsten Uhd Nielsen og Mikael Begtrup
- 9 Dynamisk model for fordøjelse af lipidbaserede lægemidler i tarmen** 20-21
Af Dimitri Fatouros, Anne Larsen, Betty Lomstein Pedersen, Jette Jacobsen og Anette Müllertz
- 10 Få kræftcellen til at begå selvmord – en strukturel vinkel på kræft** 22-23
Af Birthe Ross, Morten Borchorst, Michael Gajhede og Ole Kristensen
- 11 Når kræft gør ondt i knoglerne** 24-25
Af Andreas Hald, Rikke Rie Hansen og Anne-Marie Heegaard
- 12 Smerteforskning, chili con carne og fluorescerende stoffer** 26-27
Af Christian Kamp Nielsen, Majid Sheykhzade, Anne-Marie Heegaard og Ole Jannik Bjerrum
- 13 Hjerneødem ved leversvigt – nyt lys på sygdomsmekanismen** 28-29
Af Hans Rudolf Pedersen, Fin Stolze Larsen og Helmer Ring-Larsen
- 14 En genetisk variation i en serotonin-receptor – et muligt link til depression?** 30-31
Af Karen Krzywkowski, Paul A. Davies, Paula L. Feinberg-Zadek, Anders A. Jensen og Hans Bräuner-Osborne
- 15 Jagten på et signalstof til hjernens delta2-receptor** 32-33
Af Peter Naur, Lars Olsen, Michael Gajhede og Jette Sandholm Kastrup
- 16 Selektive lægemiddelstoffer designet ud fra krystalstrukturer** 34-35
Af Ewa Szymanska og Tommy N. Johansen
- 17 Lægemidler til slagtekyllinger – og miljøet?** 36-37
Af Martin Hansen, Kristine A. Krogh, Bent Halling-Sørensen og Asbjørn Brandt
- 18 Unge kvinder bruger smertestillende lægemidler for at klare skolen** 38-39
Af Dana Lee Hansen, Ebba Holme Hansen og Bjørn E. Holstein



Anti-diabetisk te fra nigeriansk folkemedicin



Mangel på motion og alt for rigelig indtagelse af mad har fået antallet af mennesker med type II-diabetes til at eksplodere på verdensplan. Et lovende ekstrakt af en nigeriansk te, som bruges lokalt til at behandle sygdommen, skal nu testes i kliniske forsøg.

Af Joan Campbell-Tofte og Per Mølgaard

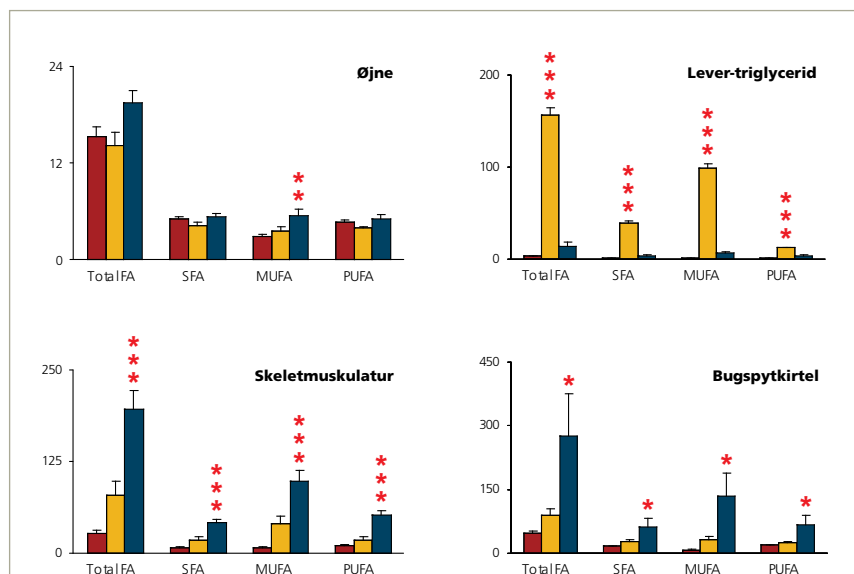
Type II-diabetes – også kendt som gammelmandssukkersyge – er den mest udbredte form for diabetes. Sukkersyge er karakteriseret ved et forhøjet sukkerindhold i blodet, fordi reguleringen via insulin svigter. I type I-diabetes danner patienterne for lidt insulin, mens type II-diabetes normalt skyldes, at kroppens følsomhed over for insulin er nedsat. I såvel Vesteuropa som i USA stiger forekomsten af type II-diabetes stærkt på grund af nedsat fysisk aktivitet og for høj energiindtagelse. Desuden ser man nu en lignende tendens i Asien og i den arabisk talende del af verden. På globalt plan ventes udbredelsen af diabetes at stige fra 118 millioner tilfælde i 1995 til 220 millioner i 2010. Selvom forskellige typer medicin bruges til regulering af blodglukose, er det svært at behandle sygdommen effektivt, og efter nogen tids sygdom opstår der ofte komplikationer i form af blodpropper i hjerte og hjerne, nedsat nyrefunktion, forringet sårheling og diabetisk øjensygdom. Derfor er der et stort behov for nye præparater, som kan optimere reguleringen af blodsukkeret og standse udviklingen af følgesygdommene.

Manipulation af fedtsyrestofskiftet

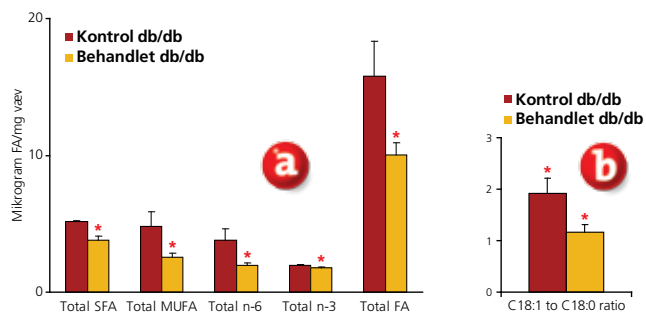
Udviklingen af type II-diabetes sker over lang tid, så allerede ved diagnosen forekommer der ofte flere komplikationer. Desuden kan den nuværende behandling med oral medicin forværre udviklingen af følgesygdommene ved at inducere vægtstigning og ødemer; dvs. væskeophobning i kroppen. Mange studier har vist, at tidlig diagnose kombineret med aggressiv blodglukosekontrol kan formindske komplikationerne. Men da man ikke kan screene alle mennesker, er der brug for udvikling af metoder til tidlig diagnose af personer i risiko samt for bedre behandlingsformer.

På verdensplan – såvel som i vores forskning på FARMA – har man konstateret, at udvikling af type II-diabetes samt forekomsten af følgesygdommene er tæt knyttet til kroppens fedtmængde og fedttyper. Vore indledende studier af type II-diabetes har vist en markant akkumulation af fedtsyrer i muskler og øjne hos genetisk diabetiske (BKS-db) mus sammenlignet med tilsvarende væv hos genetisk fede og hos normale mus. Undersøgelserne peger på, at risikoen for udvikling af komplikationer associeret med lang tids sygdom såsom åreforkalkning, forhøjet blodtryk og nedsat sårheling i modelmusene kan korreleres med mængden og typen af fedt, der er akkumuleret i vævene.

I et andet arbejde med genetisk diabetiske mus (BKS-db) har vi vist, at behandling med en te fremstillet af *Rauvolfia vomitoria*-blade og *Citrus aurantium*-frugter kombineret med mager kost medførte en reduktion af fedtindholdet i musenes øjne. Denne te bruges som traditionel behandling i Nigeria til at "kurere" type II-diabetes, og erfaringerne fra folkemedicinen er vort inspirationsgrundlag for arbejdet med diabetes og fedtsyrerelationer. Der er ikke rapporteret om bivirkninger i forbindelse med den traditionelle brug af teen, og en toksicitetsbestemmelse på mus viste ingen bivirkninger, hverken på overlevelse eller i form af organforandringer.



Sammenligning af fedtindhold (mikrogram FA/mg væv) i fire forskellige væv hos normale, genetisk fede (ob/ob) og genetisk diabetiske (BKS/db) mus, vist med henholdsvis røde, gule og blå søjler. FA: Den totale mængde fedtsyrer. SFA: Mættede fedtsyrer. MUFA: Monoumættede fedtsyrer. PUFA: Polyumættede fedtsyrer. Det er interessant – og nyt – at diabetiske mus bruger perifer – ikke-fedtakkumulerende – væv til ophobning af fedt, mens de fede mus bruger leveren som fedtdepot.



Efter seks ugers behandling med *Rauvolfia*-Citrus-ekstraktet og en kaloriefattig diæt var der signifikant reduktion af fedtindholdet i BKS-db-musenes øjne. **a** viser fedtsyrekonzentrationen for henholdsvis den totale mængde fedtsyrer (FA), mættede fedtsyrer (SFA), monoumættede fedtsyrer (MUFA) og polyumættede fedtsyrer (PUFA). **b** viser den beregnede aktivitet af enzymet desaturase ved omdannelse fra mættede til monoumættede fedtsyrer.



RAUVOLFIA-CITRUS-EKSTRAKTET

Citrus aurantium L. (Rutaceae) og *Rauvolfia vomitoria* Afzel (Apocynaceae) er begge kendt som kilder for traditionelle lægemidler, men det er første gang, de forekommer i samme præparat. *Citrus aurantium*-ekstrakter har en vægtreducerende effekt, når de bruges i kombination med en mager og sparsom diæt. Effekten skyldes frigørelse af β -agonister, som kan stimulere frisætning af fedt fra kroppens triglyceriddepoter og styrke hvilemetabolismen.

Forsøg med rotter med oral administrering af 2,5 – 20 mg/kg *C. aurantium*-frugt-ekstrakt standardiseret for indhold af det aktive stof synephrin (4 og 6%), viste en signifikant reduktion af dyrenes fødeindtagelse og kropsvægt. Desværre var der højere mortalitet i forsøgsgruppen end i kontrolgruppen, hvilket kunne tyde på en toksisk effekt ved høje doser af synephrin. Vi har derfor undersøgt synephrinindholdet i vort ekstrakt og set, at det er lavere end i appelsinjuice. Konklusionen er således, at der er mindre sandsynlighed for en skadelig effekt af RC-teen end af appelsinjuice.

Ekstrakter lavet af *Rauvolfia vomitoria* kan indeholde alkaloidet reserpin, som er blevet brugt i Vesten til behandling af forhøjet blodtryk. Brugen af reserpin er i dag begrænset, fordi stoffet kan medføre depression hos patienterne. Reserpin er uopløseligt i vand, og vore analyser har vist, at det vandige *Rauvolfia-Citrus*-ekstrakt er reserpinfrit. Et reserpinfrit ekstrakt givet til rotter viste ingen gastrointestinale bivirkninger eller kronisk toksicitet efter administration i tre måneder. Derfor mener vi, at RC-teen er sikker at bruge, og vore fortsatte undersøgelser af virkningen er godkendt af Det Videnskabetiske Komitéssystem.



Ph.d. Joan Campbell-Tofte er post doc ved Institut for Medicinskemi.



Ph.d. Per Mølgaard er lektor ved Institut for Medicinskemi.

Derimod resulterede en kombination af kalorierestriktion og seks ugers daglig behandling af de genetisk, diabetiske mus i vægttab og i beskyttelse af dyrenes skrøbelige bugspytkirtel, samt en reduktion i mængden af monumættet og C-18 polyumættet fedt i øjnene hos de diabetiske mus. Det er nyt at sætte behandling af type II-diabetes i relation til fedtsyrestofskiftet.

I et dansk humant casestudie observerede vi, at behandling med *Rauvolfia-Citrus*-ekstrakt medførte vægttab hos patienten, før en reduktion i blodsukkerindholdet kunne måles. Fire måneders daglig indtag af teen førte til normalisering af blodtrykket i løbet af den første måned, mens mængden af blodglukose faldt efter tre måneder. Patienten tabte 11 kilo og endte med ikke at have dagligt behov for anti-diabetisk medicin eller anti-hypertensiv medicin i et år. Der er nu gået seks år efter denne *Rauvolfia-Citrus*-behandling. Patienten har stadig normalt blodtryk, men har haft tilbagefald af type II-diabetes.

FOKUS PÅ DEN MOLEKYLÆRE MEKANISME

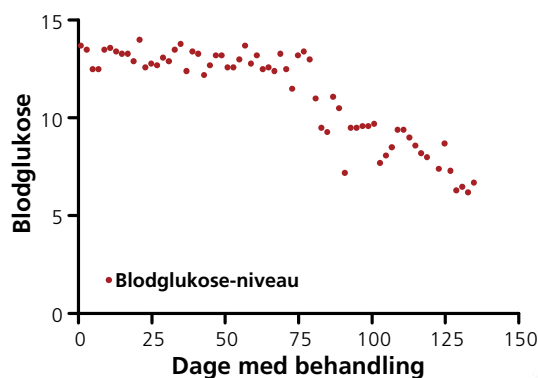
I et fremtidigt projekt vil vi studere den molekulære mekanisme bag fedtsyreakkumuleringen hos BKS-db mus for at identificere mulige markører, som ændres tidligt i sygdommens forløb, og som derfor kan bruges til en tidlig diagnose. Ved fødslen ligner genetisk fede, diabetiske og normale mus hinanden, en forskel ses først efter 4-6 uger. Derfor ønsker vi at undersøge den molekulære basis for ophobning af fedt i væv ved alvorlig type II-diabetes, som det ses hos BKS-db mus. Studierne foretages ved at følge ekspresionen og aktiviteten af de væsentligste lipogene enzymer og cofaktorer i fedtophobningen i forskellige væv taget fra normale, genetisk fede og diabetiske mus. Målet er at identificere markører, som forandres tidligt i processen, og som i efterfølgende forsøg kan undersøges i mennesker for deres potentiale for tidlig diagnosticering af alvorlig type II-diabetes.

Endvidere vil vi undersøge om *Rauvolfia-Citrus* ekstrakt har en fedtreducerende effekt, da en reduktion i vævets fedtindhold kan nedsætte risikoen for udvikling af komplikationer.

Kliniske forsøg

På den baggrund har vi designet et dobbeltblindt, placebo-kontrolleret pilotforsøg for at teste den antidiabetiske virkning af RC-teen på 24 diabetiske patienter. Endvidere vil vi undersøge, om teen har en fedtreducerende effekt på mennesker, da reduktion i vævets fedtindhold kunne nedsætte risikoen for udvikling af type II-diabeteskomplikationer. Deltagerne skal have været diagnosticeret for diabetes i mindst tre år og være i behandling for både type II-diabetes og forhøjet blodtryk. De primære effektparametre i undersøgelsen er forandringer i synsevne, bevægelse, træthed og almindeligt velbefindende, såvel som forandringer i vægt, blodtryk og blodglukoseniveau. Sekundære effektvariable er forandringer i markører for type II-diabetes såsom HgA1C, C-reaktivt protein (CRP), tumor-nekrose-faktor (TNF), serumkolesterol, triglycerider, glukagon, C-peptid og insulin-koncentration samt fedtindhold i muskelvæv.

Deltagerne deles i to grupper ved lodtrækning. Den ene udsættes for aktiv behandling, og den anden får placebo. Håbet er, at studiet i forening med vore øvrige undersøgelser kan bane vej for bedre behandling og tidligere diagnostik af type II-diabetes.



Et dansk casestudie med en enkelt patient har vist, at behandling med *Rauvolfia-Citrus*-ekstrakt over 3½ måned medførte såvel vægttab som normalisering af blodtryk og blodglukose. Figuren viser forløbet for niveauet af blodglukose.





Hvilke lægemidler tager du egentlig?

Og er medicinen god for dig?

Hvert år indlægges tusindvis af danskere på hospitalerne på grund af lægemiddelrelaterede problemer, som i værste fald kan ende med, at patienten dør. Mellem 42.000 og 97.000 af disse indlæggelser kan forbygges med den rigtige indsats.

Af Søren Ilsøe-Kristensen, Steffen Thirstrup og Mette Rasmussen

Der er omkring en million indlæggelser om året på hospitalerne i Danmark. Undersøgelser viser, at mellem 69.000 og 162.000 indlæggelser skyldes lægemiddelrelaterede problemer, hvoraf mellem 2.100 og 4.900 ender med, at patienten dør. Imidlertid skønnes det, at mellem 42.000 og 97.000 af de lægemiddelrelaterede indlæggelser kan forbygges med den rigtige indsats.

Forkert eller manglende information omkring, hvilke lægemidler en patient bruger, er et lægemiddelrelateret problem, som kan være en medvirkende årsag til en indlæggelse.

Dårlig kommunikation mellem hospitaler og praktiserende læger menes således at være årsag til, at mange patienter får problemer med deres medicinske behandling.

For den behandlende læge betyder manglende kommunikation, at det bliver sværere at tage stilling til, om den nuværende behandling er hensigtsmæssig for patienten, eller om der skal foretages ændringer. Pludseligt opståede symptomer kan således være bivirkninger til medicin, som lægen ikke har kendskab til, frem for en forværring af eksisterende sygdomme. Valg af eventuel ny medicin bliver også vanskeliggjort, fordi lægemidler kan have interaktioner mellem hinanden, så et lægemiddel enten forøger eller nedsætter et andet lægemiddels effekt. Uden et samlet overblik over patientens medicinering kan lægen i værste fald udskrive medicin, der gør patientens behandling dårligere og i sidste ende går ud over helbredet.

Problemet med manglende kommunikation kompliceres af, at stadig flere personer i sundhedssektoren får indflydelse på patienternes medicinforbrug; fx speciallæger som psykiatere, hudlæger og øjenlæger samt social- og sundhedshjælpere og hjemmehjælpere. Med det stigende antal aktører øges sandsynligheden for, at det kan gå galt.

Hvor er informationerne?

De fleste hospitaler og praktiserende læger anvender i dag elektroniske patientjournaler. Problemet er, at der ikke fra starten blev sat en standard for, hvilket program, der skulle bruges til at håndtere patientdata. Hvert hospital har typisk sit eget system, og de praktiserende læger har mindst 18 systemer at vælge i mellem. Ofte kan systemerne ikke direkte udveksle data, og kommunikation er derfor besværlig. Ved udskrivelse fra hospitalet sender hospitalet normalt et udskrivningsbrev til den praktiserende læge bl.a. med op-

lysninger om, hvilke ændringer der er foretaget i patientens medicin. Disse breve bliver imidlertid ofte ikke sendt, er forsinkede, eller oplysningerne er så mangelfulde, at de reelt set ikke kan bruges af den praktiserende læge.

For at lette overblikket over patientens medicinforbrug har Lægemiddelstyrelsen lanceret Medicinprofilen, som er en elektronisk oversigt over den medicin, som hver enkelt dansker køber på recept på apoteket. Oversigten findes på internettet, og den er tilgængelig for både borgere og læger.

MEDICINPROFILEN

– EN HJÆLP TIL PATIENTER OG LÆGER

Medicinprofilen er tilgængelig via hjemmesiden www.sundhed.dk. Her kan den enkelte borger se sin egen liste over lægemidler købt på apoteket, mens læger kan få adgang til receptmedicin for de patienter, som de har i behandling. Informationerne i oversigten bliver indberettet via apotekerne.

Lægerne har således fået et nyt hjælpemiddel til bedre at starte en dialog med patienten om dennes medicinforbrug, fordi oversigten også viser medicin udskrevet af hospitalslæger og speciallæger. Muligheden for at se medicin udskrevet fra hospitaler bliver dog først klar i 2008.

Adgang til oversigten kræver en digital signatur.

Hvor stort er problemet?

På FARMA arbejder vi med at besvare spørgsmålet om, hvor stort omfanget er af manglende information mellem hospitaler og praktiserende læger. Udgangspunktet er patienter med hjertesvigt, fordi de typisk har et stort medicinforbrug og samtidig er tilknyttet både hospital og praktiserende læge.

476 patienter fra Frederiksberg, Esbjerg og Fredericia indgår i undersøgelsen. Lægemiddeldata indsamles fra journaler på hospitalet, den praktiserende læge og Medicinprofilen samt via udskrivningsbreve. Ved at sammenligne de respektive data vil det være muligt at få et overblik over, i hvor høj grad medicinoplysningerne stemmer overens. Desuden kan vi analysere, om den udskrevne medicin er hensigtsmæssig valgt i forhold til patientens samlede forbrug af lægemidler. Dette vil give et overblik over kommunikationsproblemerne omfang og mulige konsekvenser for patienterne.

Vi mener, at medicineringen af bl.a. hjertepatienter efter alt at dømmen kan forbedres til gavn for både patienterne, hospitalerne og samfundsøkonomien, og vort håb er, at der vil komme en stadig mere koordineret indsats for at forbedre kommunikationen i sundhedsvæsenet. Forskningen på FARMA skal være med til at identificere konkrete indsatsområder.

EN VIRKELIG HISTORIE OM EN 88-ÅRIG PATIENT

En 88-årig kvinde henvises i 2005 af sin praktiserende læge til specialister på hospitalet på grund af problemer med hjertet samt kronisk obstruktiv lungesygdom (KOL). På hospitalet konstaterer lægerne, at kvinden har hjertesvigt og skal følges regelmæssigt gennem længere tid. Udsigten for denne type af patienter er dårlig. Trods flere behandlingsmuligheder dør halvdelen af patienterne inden for fem år efter, at sygdommen er konstateret.

Ifølge hospitalets journaler bruger patienten 14 lægemidler i kombination. Den praktiserende læges journal viser også, at patienten anvender 14 lægemidler, men kun 8 af dem er samtidigt registreret på hospitalet. Endelig viser apotekets salgsregistreringer, at patienten har købt 18 forskellige lægemidler på recept, hvoraf ét hverken er registreret på hospitalet eller hos den praktiserende læge.

Den 88-årige patient tilknyttes en hjertesvigtssklinik på hospitalet, hvor hun regelmæssigt får tjekket sit hjerte og effekten af sin medicin. Hun får en specifik kombinationsbehandling mod sin hjertesygdom med brug af flere forskellige lægemidler, fordi dette giver den mest optimale behandling.

Forkerte kombinationer

Samtidigt med tilknytningen til klinikken går patienten til sin praktiserende læge, når hun har symptomer, der ikke har noget med hjertet at gøre. Som tabellen viser, er det vanskeligt at få et samlet overblik over patientens medicinforbrug, og ofte har lægen ikke den fornødne tid på trods af, at al patientens medicin bør vurderes som en helhed for at give den optimale behandling. Dette kan resultere i uhenigtsmæssige lægemiddeludskrivelser eller uoverensstemmelser i medicinlisterne.

En gennemgang af medicineringen viser bl.a. følgende:

- Patienten får samtidigt lægemidlerne carvedilol og terbutalin/formoterol. Disse stoffer virker på de samme receptorer i kroppen, men med modsat effekt. Carvedilol er en β -blokker, som hæmmer β -receptorer i hjertet, hvorved hjertets rytme nedsættes, blodtrykket sænkes og risikoen for hjertekramper formindskes. Terbutalin/formoterol er β -agonister, som aktiverer β -receptorer i lungerne, så musklerne afslappes, og der bliver bedre plads til luftpassagen. Ved at indtage β -blokkere og β -agonister samtidigt risikerer kvinden, at behandlingen ikke har nogen effekt, og at både hendes hjertesygdom og lungesygdom bliver værre.
- Lægemidlet furosemid virker vanddrivende og anvendes mod forhøjet blodtryk forårsaget af væskeophobning. Hospitalet har registreret dobbelt så høje doser som den praktiserende læge og i forhold til, hvad der står på recepten. Dette vil ikke umiddelbart give problemer, fordi alle doser er inden for det acceptable niveau. Imidlertid vides det ikke, hvilken dosis patienten rent faktisk tager. Tager hun den høje dosis, kan der opstå problemer, hvis dosis øges yderligere af den praktiserende læge. Dertil kommer, at kun hospitalet har registreret, at patienten også har købt spironolacton, som ligeledes er vanddrivende. Herved er der stor risiko for overbehandling, hvilket i sidste ende kan føre til forstoppelse, svimmelhed og desorientering; symptomer som ældre mennesker ofte indlægges for.

Eksemplet med den 88-årige kvinde understreger vigtigheden af god kommunikation mellem hospitalet og den praktiserende læge.



Cand.pharm. Søren Ilse-Kristensen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi



Ph.d. Mette Rasmussen er professor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

Ph.d. Steffen Thirstrup er overlæge i Lægemiddelstyrelsen

HOSPITALSJOURNALER			PRAKSISLÆGEJOURNALER			APOTEKETS REGISTRERINGER		
Lægemiddel	Dagsdosis	Enhed	Lægemiddel	Dagsdosis	Enhed	Lægemiddel	Dagsdosis	Enhed
Furosemid	160	mg	Furosemid	80	mg	Furosemid	80	mg
Perindopril	4	mg	Perindopril	4	mg	Perindopril	4	mg
Loratadin	10	mg	Loratadin	10	mg	Loratadin	10	mg
Budesonid	1600	mkg	Budesonid	1600	mkg	Budesonid	1600	mkg
Acetylsalicylsyre	75	mg	Acetylsalicylsyre	75	mg	Acetylsalicylsyre	75	mg
Glycerylnitrat	0,5	mg	Glycerylnitrat	0,5	mg	Glycerylnitrat	0,5	mg
Metoprolol	50	mg	Metoprolol	25	mg	Metoprolol	25	mg
Carvedilol	3,125	mg	Carvedilol	3,125	mg	Carvedilol	3,125	mg
			Formoterol	4,5	mkg	Formoterol	18	mkg
Terbutalin	5	mkg				Terbutalin	25	mkg
Estriol	1	mg				Estriol	1	mg
Spironolacton	25	mg				Spironolacton	25	mg
Prednisolon	5	mg				Prednison	5	mg
Isosorbidmononitrat	60	mg	Glycerylnitrat (plaster)	10	mg	Isosorbidmononitrat	120	mg
Kaliumklorid	750	mg				Kaliumklorid	1500	mg
			Diltiazem	120	mg			
			Acetylcystein	400	mg			
			Nitrazepam	5	mg	Nitrazepam	5	mg
			Glucosamin	1200	mg	Glucosamin	1200	mg
						Tiotropiumbromid	18	mkg
14 lægemidler i alt			14 lægemidler i alt			18 lægemidler i alt		

Tabellen viser den medicin, som henholdsvis hospitalet og den praktiserende læge har registreret i deres journaler, samt hvilken medicin patienten har købt på apoteket. Listerne er opgjort for en periode på et år. De orange felter illustrerer steder, hvor der potentielt kan være problemer med patientens medicin. Der er primært tale om forskellige doser, eller at det pågældende lægemiddel ikke er registreret i henholdsvis hospitalets journaler, den praktiserende læges journaler eller på apoteket.

Gram-positive bakteriers pyrogener er meget varmestabile

Varmebehandling ødelægger ikke feberfremkaldende stoffer fra Gram-positive bakterier. Derfor bør det undersøges, om disse pyrogener er et reelt problem i sterile lægemidler. En ny laboratorietest kan påvise pyrogenerne, så man ikke behøver at bruge kaniner.

Af Lise Moesby, Erik Wind Hansen, Jens D. Christensen, Michael Timm, Stine Bartelt



Vor viden om Gram-positive bakterier og deres feberfremkaldende egenskaber er meget begrænset. Det skyldes, at man har manglet en egnet målemetode til at vurdere bakteriernes evne til at fremkalde feber. Vi har nu udviklet en laboratorietest, som kan måle Gram-positive bakteriers feberfremkaldende egenskaber og brugt den nye test til at undersøge, om Gram-positive bakteriers feberfremkaldende stoffer er resistente over for varmesterilisation.

Til studiet valgte vi den Gram-positive bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Stafylokokker er almindelige hudbakterier, som normalt er harmløse, men i visse tilfælde kan de være sygdomsfremkaldende, især ved infektion af syge og svækkede mennesker. Bakterierne danner en række toksiner, som medfører, at de kan forårsage feber, fødevarerforgiftning og toksisk shock-syndrom.

Ny laboratorietest kan spare forsøgsdyr

Feberfremkaldende stoffer kaldes for pyrogener, og de forårsager feber ved injektion i blodbanen på mennesker og højerestående dyr. Hvis pyrogener ind-

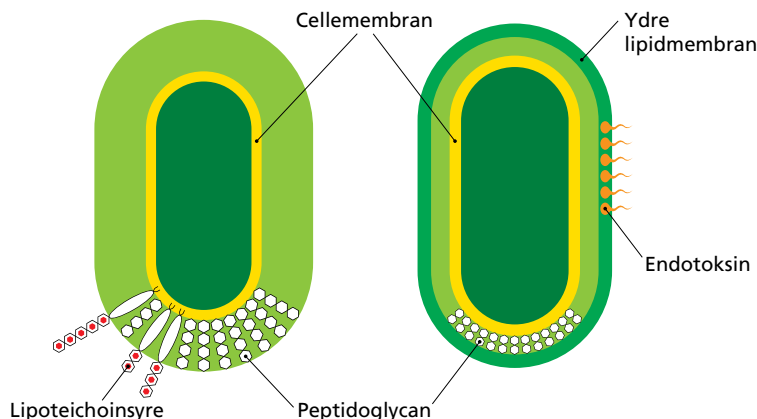
sprøjtes i blodbanen, kan de ud over feber medføre alvorlige konsekvenser som anafylaktisk shock. Det er derfor vigtigt at have metoder til at undersøge, om lægemidler til injektion er forurenede med pyrogener.

Til sikring af et lavt indhold af pyrogener i lægemidler anvendes i dag to analyser: En kanin-pyrogen test og en endotoksintest. Endotoksintesten kan kun måle endotoksiner fra Gram-negative bakterier. Kaninpyrogen-testen kan påvise alle slags pyrogener. Kaniner anvendes til test for pyrogener, fordi deres følsomhed over for feberfremkaldende stoffer ligner menneskets. Princippet i metoden er, at stoffet, der ønskes undersøgt, indsprøjtes i kaninens blodbane, hvorefter man registrerer, om injektionen medfører en temperaturstigning. Men da det både er tidskrævende, dyrt og etisk problematisk at anvende forsøgsdyr, har vi udviklet en laboratorietest til måling af pyrogener.

Når et menneske får pyrogener i blodet, påvirkes nogle af de hvide blodlegemer, monocytterne, til at udskille signalstoffer, som kaldes cytokiner. Cytokinernes opgave er at regulere immunforsvaret ved infektion, sårheling og feber. Man kan isolere monocytter fra frisk humant blod og bruge dem til at teste stoffers pyrogene aktivitet. Isolerede monocytter vil, ligesom i blodbanen, udskille cytokiner, hvis der er pyrogener til stede. Det er dog problematisk at bruge blod fra mennesker til forsøg, bl.a. på grund af smittefare. Derfor har vi udviklet en laboratorietest, som er baseret på en standardiseret cellelinie af monocytter, som kaldes Mono Mac 6. Mono Mac 6-cellerne udskiller cytokinet interleukin-6, når de udsættes for pyrogener. Når et stofs pyrogene egenskaber skal testes, dyrkes Mono Mac 6-celler i nærvær af stoffet, og jo større mængde pyrogener stoffet indeholder, jo større er udskillelsen af interleukin-6.

GRAM-POSITIV BAKTERIE

GRAM-NEGATIV BAKTERIE

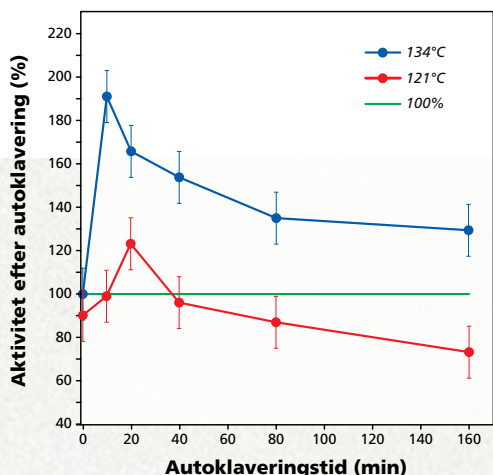


GRAM-POSITIV OG GRAM-NEGATIV BAKTERIER

Bakterier kan inddeles i to grupper: Gram-positive og Gram-negative bakterier. Opdelingen er baseret på opbygningen af bakteriernes cellevæg.

Gram-negative bakteriers cellemembran er omgivet af et tyndt lag peptidoglycan, og uden på dette lag har de endnu en lipidmembran. De Gram-negative bakteriers opbygning gør dem modstandsdygtige over for kemiske påvirkninger, mens de er mere følsomme over for fysiske påvirkninger end Gram-positive bakterier. Gram-negative bakterier har i deres ydre lipidmembran nogle særdeles potente feberfremkaldende stoffer, som kaldes endotoksiner. Endotoksiner er meget modstandsdygtige over for fysiske og kemiske påvirkninger, hvilket bl.a. betyder, at de ikke inaktiveres ved varmebehandling.

Gram-positive bakteriers cellemembran er omgivet af et tykt lag af peptidoglycan, som gør dem meget modstandsdygtige over for fysiske påvirkninger. Lipoteichoinsyre er forankret i cellemembranen og stritter ud gennem peptidoglycanlaget. Både lipoteichoinsyre og peptidoglycan er feberfremkaldende.



Pyrogen aktivitet af *Staphylococcus aureus* efter autoklaving: Bakterierne blev autoklaveret ved 121° C eller 134° C, og derpå blev deres pyrogene aktivitet undersøgt i Mono Mac 6-celler. Aktiviteten udregnet i procent af aktiviteten af ubehandlede bakterier, idet ubehandlede bakterier har 100 procent aktivitet.



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



Ph.d. Erik Wind Hansen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



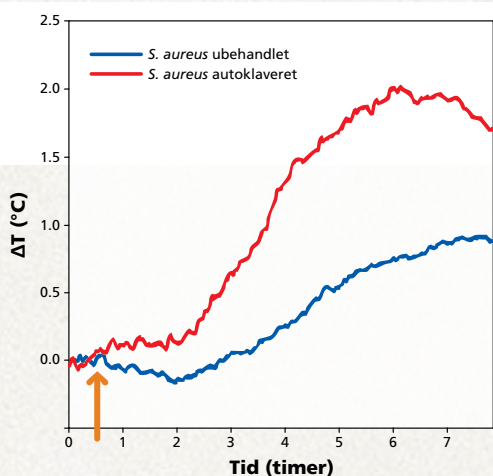
Ph.d. Jens D. Christensen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



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



Cand.scient. Stine Bartelt er amanuensis ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Pyrogen aktivitet af *Staphylococcus aureus* i kaniner. *S. aureus* blev autoklaveret ved 121° C i 15 minutter, hvorpå bakteriesuspensionen blev indsprøjet i kaninen og dens kropstemperatur målt. Ændringen i kropstemperatur er afbildet som funktion af tiden. Pilen angiver injektionstidspunktet. Den røde kurve repræsenterer autoklaverede *S. aureus*, og den blå kurve viser resultaterne med ubehandlede, dræbte bakterier.

Staphylococcus aureus pyrogener tåler varmebehandling

Mono Mac 6-cellerne er meget anvendelige til måling af Gram-positive bakteriers pyrogener, hvilket giver mulighed for at undersøge disse pyrogeners aktivitet efter autoklaving. Det er interessant, fordi autoklaving anvendes ved fremstilling af sterile lægemidler.

Autoklaving er en varmebehandling, som foretages i en slags trykkoger i mættet vanddamp ved 121° C i 15 minutter. Varmebehandlingen dræber bakterier og andre mikroorganismer, men de fjernes ikke fra lægemidlet. Vi har undersøgt effekten af autoklaving på den Gram-positive bakterie *S. aureus*. Ved forsøgene autoklaverede vi bakterierne og inkuberede dem derefter med Mono Mac 6-celler. Derpå målte vi mængden af pyrogener via cellernes udskillelse af interleukin-6 og sammenlignede med den aktivitet, som ubehandlede bakterier forårsager.

Resultaterne af forsøgene var meget overraskende! For den pyrogene aktivitet stiger faktisk efter varmebehandling af bakterierne i 15 minutter. Hvis behandlingstiden øges, falder aktiviteten igen og lander på omkring 80 procent af den aktivitet, som forårsages af ubehandlede bakterier. Forsøgene viste også, at man intet vinder ved at øge temperaturen til 134° C. Tværtimod synes aktiviteten at blive større end uden varmebehandling. Autoklaving ødelægger altså ikke den pyrogene aktivitet af *S. aureus*.

Vi havde på ingen måde regnet med, at den pyrogene aktivitet kunne blive større efter autoklaving. For at få resultaterne bekræftet, valgte vi derfor at undersøge den feberfremkaldende aktivitet af autoklaverede *S. aureus* i kaniner,

og til sammenligning målte vi også den pyrogene effekt af ubehandlede *S. aureus* i kaniner. For ikke at påføre kaninerne en infektion blev bakterierne dræbt med ultraviolet lys inden forsøget.

De målte feberkurver viser, at både ubehandlede og autoklaverede *S. aureus* giver feber efter injektion, og at de autoklaverede *S. aureus* medfører den største temperaturstigning i kaninerne. Resultatet bekræfter, at autoklaverede *S. aureus* er mere potente end ubehandlede bakterier, samt at de pyrogene egenskaber er meget varmem stabile og kan øges ved autoklaving.

På sporet af en forklaring

Hvordan kan dette uventede fænomen forklares? De stoffer, som kan fremkalde feber, er lipoteichoinsyre og peptidoglycan, som sidder i bakteriernes cellevæg. Måske beskadiges cellevæggen ved autoklavingen, så de pyrogene stoffer bedre kan reagere med fx monocytter og dermed udøve deres aktivitet.

Derfor har vi anskaffet prøver af de feberfremkaldende stoffer lipoteichoinsyre og peptidoglycan fra *S. aureus* for at undersøge, om de i sig selv har de samme egenskaber som hele bakterier. Vore foreløbige resultater peger på, at både lipoteichoinsyre og peptidoglycan er meget varmem stabile, men at deres aktivitet kan nedsættes ved autoklaving. På baggrund af vore overraskende resultater bør det undersøges, om Gram-positive pyrogener er et reelt problem i sterile lægemidler.

Gennembrud i forståelsen af insulinfibrillering

Proteinlægemidler som insulin kan under produktion og opbevaring danne trådlignende fibriller, og når det sker, må lægemidlerne kasseres. Fibrillering er desuden et centralt element i sygdomsprocessen ved alvorlige sygdomme som Alzheimers syge og Type II-diabetes. En ny opdagelse kan måske løse gåden om, hvordan fibriller dannes.

Af Minna Grønning Jensen, Bente Vestergaard, Sven Frøkjær, Michael Gajhede, James M. Flink, Marco van de Weert, Jette S. Kastrup, Dmitri I. Svergun

Insulin er et lille proteinhormon, som spiller hovedrollen i reguleringen af glukoseniveauet i blodet. I insulinkrævende sukkersyge, Type I-diabetes, er de insulinproducerende celler blevet ødelagt, og patienterne behandles med gentagne injektioner af insulin eller insulinlignende proteiner. Insulin var det første protein, der blev anvendt terapeutisk allerede i 1920'erne, men meget er sket siden dengang, og nu har hver tredje nye lægemiddelansøgning et protein som det aktive stof.

Formulering af stabile proteinlægemidler er imidlertid ikke uden problemer, og en stor udfordring er at undgå, at proteinerne danner trådlignende strukturer, som kaldes fibriller. Proteinens begrænsede stabilitet og risikoen for fibrillering medfører, at der ofte er besværlige og omkostningstunge krav til fremstilling af proteinlægemidler og ligeledes til deres opbevaring; fx skal de ofte opbevares på køl. Ud fra et terapeutisk synspunkt er tilstedeværelsen af fibriller et stort

HVAD ER EN AMYLOID FIBRIL?

Navnet amyloid blev først introduceret af Virchow i 1854 til at beskrive et aggregeret stof fundet i hjernen på en syg patient. Et proteinaggregat er ofte defineret som en ansamling af ikke-kovalent bundet protein. Amyloid betyder stivelseslignende og stammer fra den oprindelige, men fejlagtige identifikation af stoffet som stivelse (amylum på latin). På trods af misforståelsen bliver termen stadig brugt, og de trådagtige proteinaggregater kaldes amyloide fibriller.

Opbygning af insulin fibriller

En amyloid fibril er ofte opbygget af protofibriller, der snor sig om hinanden. I insulin består hver protofibril af to mindre protofilamenter, som også snor sig om hinanden. Der findes flere morfologier af insulinfibriller, og 2, 4 og 6 protofilamenter pr. fibril er blevet observeret.

problem, fordi fibrillerede proteiner er biologisk inaktive og kan forårsage et immunologisk respons ved injektionsstedet.

For at kunne designe stabile formuleringer af proteinlægemidler på et rationelt grundlag er en forbedret forståelse af fibrilleringsprocessen vigtig for at vurdere, hvordan processen kan forhindres eller hæmmes. Insulin og glukagon er konkrete eksempler på proteinlægemidler, hvor fibrillering udgør et problem.

Fibrillering og sygdomme

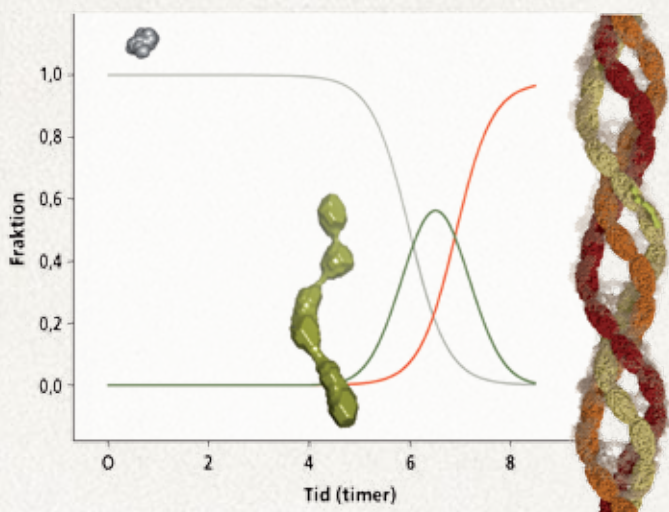
Dannelse af amyloide fibriller er observeret i forbindelse med mere end 20 ofte alvorlige sygdomme inklusive Alzheimers syge, Creutzfeldt-Jakobs syge, og Type II-diabetes, hvor et eller flere sygdomsspecifikke proteiner ændrer deres tredimensionelle foldning. Herefter begynder proteinerne at fibrillere og er ikke længere funktionelle.

I nogle af sygdommene forårsager aflejring af enorme fibriller de kliniske symptomer, men i andre tilfælde er det stadig uvist, om fibrillerne er årsag til sygdommen eller blot er et symptom. Der er grund til at tro, at mindre aggregater end de store fibriller kan forårsage symptomerne i nogle af sygdommene. Mange studier har nemlig vist, at aggregater af få molekyler – oligomerer – som dannes under fibrilleringsprocessen, er mere giftige for cellerne end de meget større fibriller. På trods af dette spiller fibrillerne sandsynligvis alligevel en vigtig rolle, fx som reservoir for den toksiske oligomer.

Uanset om den færdige fibril eller mindre aggregater er den aktive skadevolder i sygdomsprocessen er det af afgørende betydning for rationelt design af lægemidler mod disse sygdomme, at forståelsen af fibrilleringsprocessen øges.

Nyopdaget byggeblok

Når proteiner fibrillerer, danner de trådlignende strukturer af flere tusinde proteinmolekyler. Hvorfor og hvordan dette sker, og hvordan man kan forhindre processen, er endnu



Under insulinfibrillering er der tre specier til stede. Udviklingen af deres tilstedeværelse er illustreret som deres relative volumenfraktioner som funktion af tid. I løbet af de første fire timer er der kun insulinmonomerer (grå) i opløsningen. Derefter ses et fald i monomerfraktionen fulgt af en stigning i mængden af oligomerer (grøn). Efter endnu en time er de første fibriller (orange) detekteret og efter yderligere tre timer er der kun fibriller til stede. Oligomerens struktur (grøn) er vist på relativ skala i forhold til monomeren. Fibrillen består af tre protofibriller, der snor sig om hinanden, og de er visualiseret i gul, orange og rød. En oligomer er også visualiseret på den store fibril.



Den nye forlængelsesmodel af protofilamentstrukturen med oligomeren som byggeblok: Fra venstre mod højre er det vist, hvordan protofilamentet vokser. Der er illustreret tre stadier, hvor henholdsvis 2 (venstre), 5 (midten) og 18 (højre) oligomere er gået sammen. Strukturen af protofilamentet er kompakt, og der er en central kanal, hvilket ses på protofilamentet set fra toppen.

kun forstået i ringe grad. For at opklare mekanismen bag fibrildannelsen er det vigtigt at vide hvilke strukturelle komponenter, der indgår i processen, og hvordan mængden af disse komponenter ændrer sig under forløbet. Vi har anvendt en røntgenteknik kaldet SAXS og har som de første kunnet lave en strukturel beskrivelse af de komponenter, der er til stede under en fibrillering. SAXS-teknikken er helt unikt velegnet til strukturel karakterisering af fibrillering-processen.

Ud fra spredningsmønstret kan man beregne den tredimensionelle struktur af opløste proteiner. Der kan opnås information om proteinets størrelse og overordnede form, men SAXS giver ikke information om strukturen på atomart niveau.

Vore analyser gjorde det muligt at kvantificere mængden af de molekyllære strukturer, der var til stede under fibrillering af insulin, og samtidig lykkedes det at lave en tredimensionel strukturel beskrivelse af dem. Fx påviste vi en tredimensionel struktur af fibrillen, hvor tre tråde kaldet protofibriller snor sig om hinanden. Desuden viste vi, at der ud over enkelte insulinmolekyler og store fibriller var en tredje specie på spil.

Denne specie blev karakteriseret som en snoet oligomer bestående af omkring seks insulinmonomere. En detaljeret beskrivelse af oligomeren er ikke tidligere opnået, og den er ekstremt vigtig for forståelsen af fibrillering-processen. Vi observerede, at væksthastigheden af fibrillerne er proportional med mængden af oligomer, så jo mere oligomer der er til stede, jo hurtigere vokser fibrillerne. Denne vigtige sammenhæng mellem oligomer og fibrilvæksthastighed er aldrig tidligere blevet vist for amyloid fibrillering, og observationerne antyder, at oligomererne forlænger den voksende fibril. Heller ikke dette er tidligere blevet påvist. På den baggrund har vi foreslået en ny forlængelsesmodel for væksten af fibrilstrukturen.

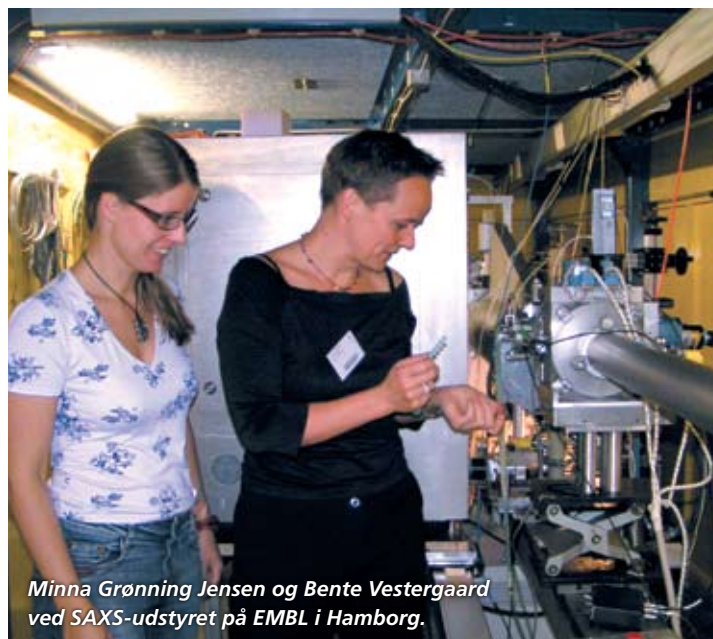
HVAD ER SAXS?

SAXS er en forkortelse for Small Angle X-ray Scattering eller røntgenbaseret småvinkelspredning på dansk. Metodens store fordel er, at processer som fibrillering kan undersøges direkte i opløsning.

SAXS er baseret på, at opløsningsmidlet og de forskellige opløste stoffer giver anledning til forskellig spredning af en fokuseret røntgenstråle, når den passerer gennem en opløsning. De opløste stoffer kan kvantificeres individuelt og karakteriseres strukturelt ved at separere deres respektive spredningsbidrag.

Ny forlængelsesmodel

Fibrillering har været genstand for intense studier i årtier, og mange modeller forsøger at beskrive mekanismen. Imidlertid kan ingen af de hidtil foreslåede mekanismer for fibrillering-processen beskrive vores observerede data til fulde. Faktisk er der i de mest benyttede mekanismer end ikke mulighed for ophobning af en oligomer. I stedet beskrives fibrillering som en kimdannelsesproces, hvor et nydannet kim vokser hurtigt ved addition af monomere. Derfor har opdagelsen og karakteriseringen af den snoede oligomer bidraget med væsentlig ny indsigt i fibrillering-processen. Desuden åbner opdagelsen op for nye muligheder med hensyn til at hindre fibrillering, fordi et nyt stabilt angrebepunkt er blevet identificeret. Man har ikke påvist, at insulinaggregater er giftige for celler, men det er muligt, at den snoede insulinoligomer tredimensionelt ligner de cytotoxiske oligomere, som er identificeret ved flere af de sygdomme, som er associeret med amyloid fibrillering. Før vi kan opstille en ny model for fibrillering-mekanismen er det nødvendigt med yderligere undersøgelser af insulin-fibrillering. Desuden vil vi bruge SAXS-teknikken på andre sygdomsspecifikke proteiner, fx relateret til Alzheimers syge, med henblik på at bestemme om en tilsvarende oligomer er på spil i disse fibrillering-processer, og om den er cytotoxisk.



Minna Grønning Jensen og Bente Vestergaard ved SAXS-udstyret på EMBL i Hamborg.



Ph.d. Minna Grønning Jensen er postdoc ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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



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

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

Ph.d. James M. Flink er specialkemiker ved Novo Nordisk A/S.

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

Erhvervsforsker Jette S. Kastrup er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Dmitri I. Svergun er gruppeleder ved European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Tyskland.

Farvel til sprøjten: Udvikling af vaccineplaster med nanopartikler



Vaccination er ofte forbundet med smerte og ubehag for patienten, fordi vaccinen skal injiceres. Hvis vaccinen i stedet kan indgives via et plaster på huden, vil smerten kunne undgås, og patienten kan selv foretage vaccinationen.

Af Henriette Baun Madsen, Peter Ifversen, Flemming Madsen, Søren Manniche og Hanne Mørck Nielsen

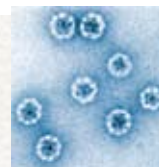
Vacciner anvendes i stort omfang til at inducere immunitet og på denne måde forebygge infektionssygdomme. Ved udvikling af vacciner satser man ofte på at benytte udvalgte komponenter, antigener, fra den sygdomsfremkaldende mikroorganisme. I nogle tilfælde er det dog nødvendigt at vaccinere med hele mikroorganismer.

Antigener er typisk peptider og proteiner, og de har den store fordel frem for inaktiverede eller svækkede mikroorganismer, at de ikke udgør nogen risiko for individer med et nedsat immunforsvar, fordi antigenerne kan fremstilles med en meget høj renhedsgrad. Men der er også en ulempe. Den høje renhedsgrad resulterer nemlig ofte i, at antigenerne i sig selv ikke evner at fremkalde et effektivt immunrespons. Derfor er det nødvendigt at tilsætte reagenser, som forstærker immunsystemets reaktion på det indgivne antigen. Reagenserne kaldes adjuvanter. Traditionelle adjuvanter er baseret på aluminium, men nyere og mere effektive adjuvanter er under udvikling.

Den mest benyttede måde at vaccinere på i dag er at injicere vaccinen enten under huden eller i musklerne. I begge tilfælde gennemhuller huden, hvilket medfører smerte og ubehag for patienten, og derfor er der i de senere år kom-

IMMUNSTIMULERENDE NANOPARTIKLER

De nanopartikler, som anvendes i vaccineplasterne, er principielt set modificerede immunstimulerende komplekser (ISCOMs), som er nogle af de mest interessante adjuvanter i moderne vaccineteknologi. ISCOMs er små selvorganiserende lipid nanopartikler med en kugleformet netværkslignende struktur. Nanopartiklerne har en diameter på ca. 40 nanometer og består af phospholipider, kolesterol-derivater samt saponiner, der medvirker til at aktivere immunsystemet.



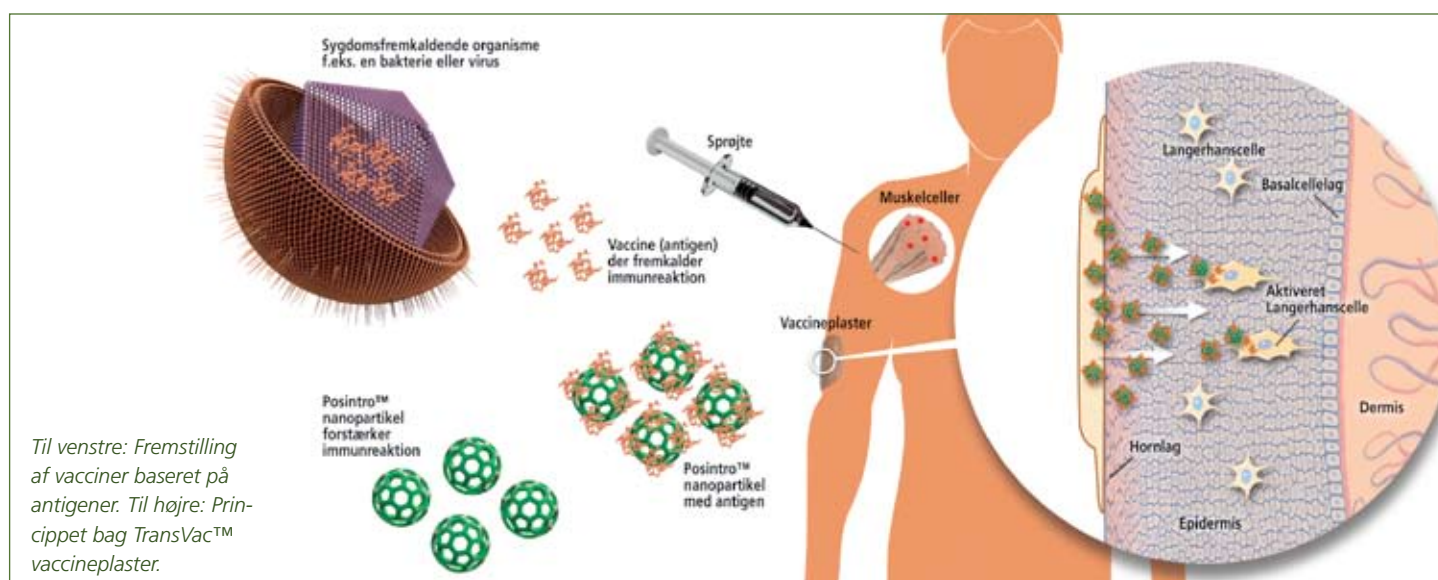
met fokus på alternative og smertefrie administrationsveje til vaccination. Dette kan opnås via lungerne, via næsen eller via huden.

Stivkrampe og leverbetændelse

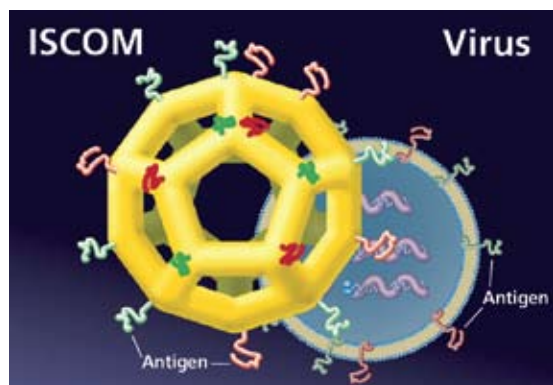
I et forskningsprojekt, som støttes af Højteknologifonden, udvikler FARMA sammen med Coloplast A/S og Nordic Vaccine A/S et nyt medicinsk vaccineplaster kaldet TransVac™, som vil gøre det muligt at vaccinere uden brug af sprøjter og kanyler.

Når plastret sættes på huden, skal det aktivere immunsystemet og resultere i vaccination mod en given sygdom. De første generationer af vaccineplasterne udvikles med antigenet mod henholdsvis stivkrampe og smitsom leverbetændelse. Antigenet indbygges i Posintro™-nanopartikler, som medvirker til at stimulere immunsystemet.

Nanopartiklerne har i dyreforsøg vist sig i stand til at fremkalde et effektivt immunrespons mod flere forskellige antigener.



Til venstre: Fremstilling af vacciner baseret på antigener. Til højre: Princippet bag TransVac™ vaccineplaster.



Binding af antigener til nanopartikler.

Nanopartiklerne fungerer som adjuvanter. Vaccineplastret består desuden af en gel, som fugter huden og fungerer som reservoir for vaccinen. Nanopartiklerne hjælper med til, at antigenet trænger et stykke ind i huden og når frem til målcellerne, de Langerhanske celler. Dette nye drug delivery-system kan potentielt bruges til vaccination gennem huden med mange eksisterende antigener.

Hvorfor vaccinere gennem huden?

Den primære fordel ved at indføre vacciner via huden er, at de immunkompetente Langerhanske celler findes i epidermis, som ligger lige under det yderste hudlag, hornlaget. Cellerne er i stand til at genkende fremmede stoffer som fx antigener og optage dem. Derpå vandrer cellerne til lymfeknuderne, hvor de præsenterer antigenerne for T-celler, som sætter det ønskede immunrespons i gang. Når man vaccinerer gennem huden, skal antigenet altså ikke sendes ud på store omveje, men kan målrettes direkte mod de Langerhanske celler. En anden fordel ved at vaccinere gennem huden er, at risikoen for infektion af kontaminerende patogener nedsættes, hvilket er specielt vigtigt ved vaccinationsprogrammer i udviklingslandene.

Selv om antigenet ikke behøver at kunne trænge hele vejen gennem huden, er opgaven langt fra trivial. En af hudens vigtigste funktioner er nemlig at beskytte kroppen mod udefra kommende fremmede organismer, så vi undgår sygdom. Derfor besidder huden betydelige barriereegenskaber, og det er ikke umiddelbart muligt for store makromolekyler som peptider og proteiner at trænge gennem hornlaget. Af den grund er der brug for nye drug delivery-systemer, som kan øge optagelsen af antigenet ind i huden, og som samtidig er i stand til at aktivere immunforsvaret.

Vaccineplastret virker

Trods hudens barriereegenskaber har forsøg med vaccineplastrene i kaniner og mus vist gode effekter. Det er dog stadig uvist, *hvordan* vaccineplastre med immunstimulerende nanopartikler virker. For at opnå en optimal udnyttelse af plastrenes muligheder er det af stor vigtighed at øge forståelsen af virkningsmekanismen. FARMA fokuserer derfor på at undersøge mekanismen for optagelse af antigenet i huden samt mekanismen for aktiveringen af immuncellerne i huden og det efterfølgende immunrespons.

De første Safety-Tox-studier for TransVac™-konceptet er allerede foretaget, og flere vil blive udført i løbet af 2007. Kliniske fase I-studier bliver i øjeblikket planlagt og vaccineplastret forventes udviklet til et niveau, der medfører, at de første kliniske afprøvninger kan udføres i løbet af 2008.

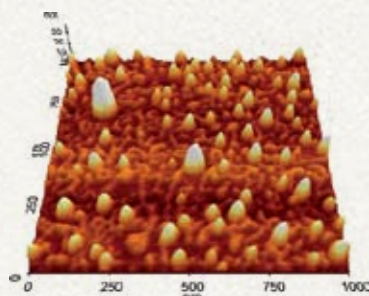
VIRKNINGSMEKANISMEN UNDERSØGES

Systematiske studier af virkningsmekanismen i vaccineplastret vil kunne give et samlet billede af, hvordan plastret er i stand til at øge indtrængningen af antigen ind i huden, så vaccinen når frem til de Langerhanske celler og aktiverer immunsystemet.

Forud for eksperimenterne er det nødvendigt med en grundig karakterisering af de anvendte nanopartikler for at afklare, hvordan deres egenskaber påvirker vaccineplastrets effekt. Nanopartiklerne karakteriseres med hensyn til deres struktur, udseende, størrelse og overfladeladning, hvilket kan have indflydelse på deres evne til at trænge ind i huden.

Kontakt med huden

Når vaccinen appliceres, kommer den først i kontakt med huden, og derfor er det relevant at undersøge, hvad der sker med nanopartiklerne i berøringsfladen. Kontakten mellem nanopartiklerne og en modeloverflade visualiseres med Atomic Force Microscopy (AFM). Visualiseringen viser, at nanopartiklerne flader delvist ud på overfladen, samt at enkelte delkomponenter lægger sig som et tæppe over hele overfladen. Det kan skyldes, at nanopartiklerne ændrer struktur eller går delvist i opløsning ved kontakt med en overflade, der kan sammenlignes med huden.



AFM billede af nanopartikler på en modeloverflade. Udarbejdet i samarbejde med Forskningscenter Risø.

Indtrængning i huden

Efter kontakten med hudoverfladen skal antigenet trænge ind i huden og nå frem til de Langerhanske celler under hornlaget. I øjeblikket opstilles forsøg, hvor diffusionsceller benyttes til kvantitativt at bestemme hvor meget antigen, der når frem til de Langerhanske celler.

Forsøgene udføres på menneskehud, som er blevet tilovers fra kirurgiske og kosmetiske operationer. Først adskilles de yderste lag, hornlaget og epidermis, fra den underliggende hud. Derpå bruges disse tynde hudstykker til forsøg, hvor antigenet appliceres på hudstykket, som er spændt ud i en diffusionscelle. I forsøgene måler vi, hvor meget antigen, der kommer over på den anden side i løbet af en given tid.

Visualisering af processen

For visuelt at kunne vurdere indtrængningen af antigen samt nanopartikler i huden benytter vi avancerede mikroskopiteknikker. Indledende forsøg har vist, at antigenet i sig selv ikke trænger ind i huden, men stadig ligger på overfladen efter 24 timer. Fremtidige forsøg vil vise, om binding af antigenet til nanopartiklerne reelt kan forårsage indtrængning i huden.



Cand.pharm. Henriette Baun Madsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Hanne Mørck Nielsen er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Ph.d. Peter Ifversen er Head of Cell Biology hos Coloplast AIS

Ph.d. Flemming Madsen er Head of Vaccines hos Coloplast AIS

Cand.pharm. Søren Manniche er Scientist hos Nordic Vaccine AIS



Liposomer i lægemiddel- forskningen

Liposomer er små vesikler, som består af et dobbeltlag af fosfolipider, der omslutter en vandig opløsning. I forskningen anvendes liposomer som model for biologiske membraner, og inden for medicinsk behandling bruges de til at transportere lægemiddelstoffer ud i kroppen.

Af Ulrik Franzen, Lene Jørgensen, Claus Larsen, Henrik Jensen og Jesper Østergaard

Liposomer har i årevis været genstand for stor interesse i de farmaceutiske og biologiske videnskaber. Det skyldes især liposomernes lighed med cellemembraner og deres stigende anvendelse i drug delivery-systemer, hvor målrettede liposomer kan transportere lægemiddelstoffer hen til det ønskede virkningssted i kroppen.

Navnet liposom oprinder af betegnelsen "fedt legeme", men der er snarere tale om en hul struktur opbygget af fosfolipider. Disse fedtstoffer har både en hydrofil og en lipofil del, og på grund af fosfolipidernes særlige struktur har de tendens til at danne dobbeltlag i vandige opløsninger. Her vender fosfolipidernes hydrofile dele udad mod vandet, mens de lipofile dele samles i dobbeltlagets midte. Liposomer kan bestå af et eller flere lipiddobbeltag adskilt af vandfyldte hulrum. Kæderne i fosfolipiderne er typisk 14 til 18 kulstofatomer lange, og diameteren på unilamellære liposomer med kun ét dobbeltlag varierer fra 25 nanometer til 10 mikrometer. Afhængigt af den valgte lipidsammen-

HVAD ER FORDELINGSKOEFFICIENTER?

Når et lægemiddelstof tilsættes et system bestående af to ikke-blandbare faser – fx en lipidfase som i en liposomopløsning samt en vandig fase eller to ikke-blandbare væsker som oktanol og vand – vil stoffet, når ligevægt er opnået, fordele sig mellem de to faser i et givent koncentrationsforhold.

Forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne i de to faser i fortyndede opløsninger er uafhængig af mængden af lægemiddelstof tilsat ved en fastholdt temperatur. Forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne C_{lipid} og C_{buffer} er en ligevægts-

konstant også kendt som fordelings- eller distributionskoefficienten: $K_d = \frac{C_{lipid}}{C_{buffer}}$

K_d er således et mål for den relative affinitet af et lægemiddelstof for en vandig henholdsvis en lipid-fase. Fordelingskoefficienter har fundet bred anvendelse til at forudsige lægemiddelstoffers biologiske aktivitet, fx transport over membraner og receptorbinding.

sætning kan man således fremstille liposomer med meget forskellige størrelser, ladninger og membranpermeabilitet. Lægemiddelstoffer kan indkapsles i liposomernes vandige hulrum, indbygges i lipidmembranen eller adsorberes til liposomets overflade. Lægemiddelstoffets placering vil primært afhænge af dets fysisk-kemiske egenskaber; fx dets lipofilitet, ladning, størrelse og grænsefladeaktivitet. Når lægemiddelstoffer er indkapslet i hulrummet, frigives de typisk ved, at liposomet nedbrydes på virkningsstedet i kroppen,

desuden kan forbindelser, som er omsluttet af liposomets membran, undslippe ved diffusion over lipiddobbeltaget. Hastigheden af frigivelsen er afhængig af lægemiddelstoffets egenskaber og i særdeleshed af membranens rigiditet, som igen afhænger af de anvendte fosfolipider. Liposomernes evne til at indpakke og transportere lægemiddelstoffer gør dem til et interessant udgangspunkt for lægemiddelformuleringer, som kan indgives intravenøst, intramuskulært eller oralt med henblik på at reducere et lægemiddelstoffs toksicitet, øge dets optagelse i kroppen eller forlænge virkningen via en langsom og kontrolleret frigivelse af det aktive stof fra liposomet.

Behandling af kræft

Der findes i dag flere markedsførte lægemidler baseret på liposomteknologi; især kemoterapeutiske cellegifte til behandling af kræft. I forbindelse med behandlingen af visse former for kræft anvendes liposomer til at optimere fordelingen af lægemiddelstoffet i kroppen. Brugen af liposomer reducerer bivirkningerne af de ofte meget celletoksiske anticancerstoffer ved at forhindre lægemiddelstofferne i at trænge ud i normalt væv og ved at øge den fraktion af dosis, som havner i kræftsvulsten.

Dette kan opnås, fordi liposomindkapslet lægemiddelstof kun i ringe grad kan trænge ud i raskt væv, og fordi visse tumorers fysiologi og liposomernes størrelse medfører en opkoncentrering af lægemiddelstoffet i det syge væv. Nogle af de anvendte liposomer er såkaldte stealth-liposomer; navngivet efter de amerikanske stealth-jagerfly, som ikke ses på radarer. Stealth-liposomer er kemisk modificerede, så de bliver usynlige for leveren og milten, som er kroppens primære renseanlæg for fjernelse og nedbrydning af konventionelle liposomer.

Model for membraner

Liposomers lighed med biologiske membraner som fx cellemembraner har gjort dem til meget anvendte modelsystemer i naturvidenskabelig og farmaceutisk forskning. Lægemiddelstoffers evne til at trænge over et liposoms lipidmembran og deres fordeling i en liposomholdig opløsning mellem lipidfasen og den vandige fase ved ligevægt kan også bruges til at forudsige lægemiddelstoffers mulighed for at trænge gennem huden og tarmvæggen samt deres tendens til at blive indlejret i fedtvæv. Relativt simple forsøg med liposomer kan således hjælpe med til at evaluere nye potentielle lægemiddelstoffers chance for at blive til et færdigt lægemiddel. Hvis et lægemiddelstof har meget ringe evne til at passere liposomernes lipidmembraner – og dermed cellemembraner og barrierer i organismen – vil stoffets mulighed for at komme ind i kroppen og efterfølgende nå sit virkningssted være meget ringe.



Cand.pharm. Ulrik Franzen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Lene Jørgensen er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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



Ph.d. Henrik Jensen er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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

Øverst til venstre ses en skematisk repræsentation af to fosfolipider (DPPA og POPC), og nederst til venstre ses et unilamellært liposom. Fosfolipiderne, vist øverst til højre, består af et hydrofilt hoved og to lipofile alkylkæder. I et vandigt miljø danner fosfolipiderne et dobbeltlag, således at liposomernes hoveder giver membranen en hydrofil yderside og inderside, mens de lipofile kæder er placeret midt i membranen. Inderst i liposomet er der et vandigt reservoir. Lægemiddelstoffer kan anbringes i liposomernes vandige hulrum, indbygges i lipid dobbeltlaget eller adsorberes til liposomernes overflade. Nederst til højre ses et stealth-liposom, som har indbygget ugiftige polymerkæder i overfladen, der gør liposomet usynligt for leveren, milten og immunforsvaret.

POPC/DPPA liposom **Stealth-liposom**

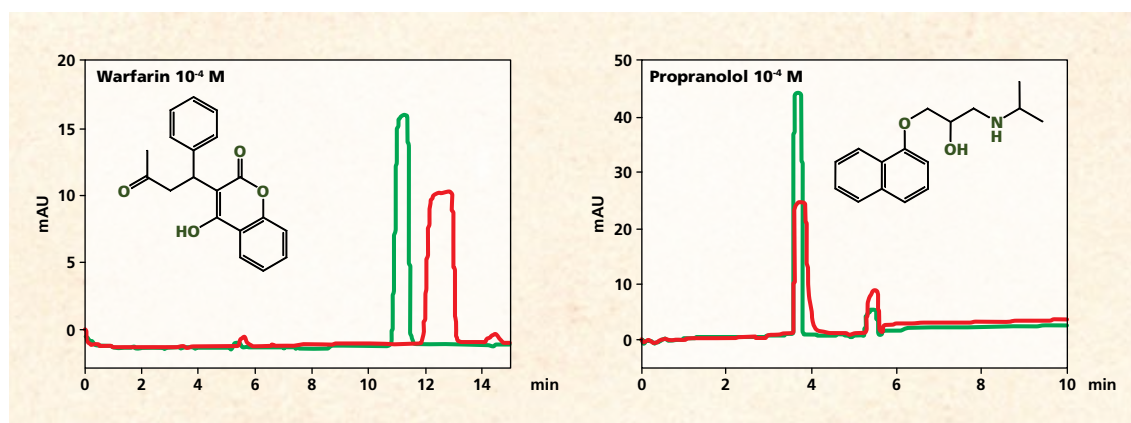
Hud og tarmvæg

Fordelingskoefficienter er en hyppigt anvendt parameter i forbindelse med forudsigelse af et lægemiddelstofs optagelse over fx tarmvæg og hud samt efterfølgende distribution i kroppen. Fordelingskoefficienter bestemmes normalt via lægemiddelstoffets fordeling mellem oktanol og vand, hvilket i dag er alment accepteret som et referencesystem og en skala for lægemiddelstoffers lipofilitet. Imidlertid er der klare indikationer på, at bedre korrelationer opnås i liposomsystemer.

Derfor arbejder vi med at etablere hurtige metoder baseret på kapillarelektroforese til bestemmelse af lægemidlers fordeling i liposomsystemer. Kapillarelektroforese er en analytisk-kemisk metode, som bruges til at separere komplekse blandinger baseret på indholdsstoffernes ladning og størrelse, og metoden er relativt hurtig og kræver meget små prøvemængder.

Vi har brugt teknikken i liposomfordelingsforsøg med to lægemiddelstoffer. Det ene er propranolol, som bruges til at behandle for højt blodtryk, og det andet er warfarin, der anvendes som forebyggende behandling til at minimere risikoen for blodpropper. Med udgangspunkt i elektroferogrammerne kan fordelingskoefficienter beregnes ud fra kendskab til forholdet mellem volumen af henholdsvis liposomerne og den vandige fase.

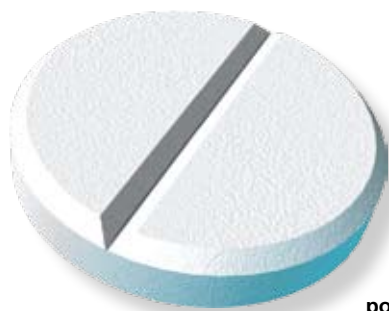
Muligheden for at håndtere meget små volumenmængder af et lægemiddelstof i liposomsystemer ved anvendelse af kapillarelektroforese forventes ud over bestemmelse af fordelingskoefficienter at kunne benyttes i studier af peptiders og proteins adsorption til lipidmembraner, undersøgelser af membranpermeabilitet samt karakterisering af liposombaserede lægemiddelformuleringer. Det sidste er af stor interesse, fordi der typisk kun fremstilles få milliliter af en eksperimentel formulering.



Fordeling af lægemiddelstoffer i liposomopløsninger bestående af POPC/DPPA liposomer i 10 mM HEPES-buffer tilsat 50 mM KCl ved pH 7.40 og 25° C studeret ved kapillarelektroforese. Ved elektroforese separeres lægemiddelstoffet fra liposomet i kapillaret og føres forbi en detektor, som måler gennemstråling af ultraviolet lys. Højden af de detekterede UV-signaler er proportional med koncentrationen af lægemiddelstoffet i den vandige fase. Det vil sige, at jo større reduktionen af UV-signalet er for lægemiddelstoffet ved tilstedeværelse af liposomer (rødt UV-signal i forhold til grønt signal) desto større affinitet har stoffet for liposomfasen.

Molekylær biofarmaci

– når medicin skyder genvej!



Lægemedelstoffer, som indtages gennem munden, skal kunne passere tarmvæggen. Her findes der membrantransportører, som fragter næringsstoffer fra tarmen til blodet, mens andre transportører pumper giftstoffer den modsatte vej. Molekylære interaktioner mellem lægemiddelstoffer og membrantransportørerne er afgørende for lægemiddelstoffernes biotilgængelighed.

Af Luise Kvistgaard Gram, Diana Højmark Omkvist, Mie Larsen, Carsten Uhd Nielsen, Birger Brodin og Bente Steffansen

Langt de fleste lægemidler kommer ned i tarmen efter indtagelse gennem munden (se nedenfor). Før lægemidlet kan virke, må det aktive lægemiddelstof først passere tarmvæggen og dernæst blive ført med blodet hen til det ønskede sted i kroppen. Den hastighed, hvormed stoffet når frem, og den andel af dosis, som kommer helt hen til virkningsstedet, angiver et lægemiddelstofs biotilgængelighed. Ved udvikling af nye lægemidler er målet at opnå en høj biotilgængelighed; altså at få mest muligt lægemiddelstof frem til virkningsstedet tilstrækkeligt hurtigt.

Et lægemiddelstofs fysiske-kemiske egenskaber medfører ofte, at det har svært ved at passere tarmvæggen, som er en beskyttelsesbarriere mod uønskede stoffer. Men tarmvæggen har også en anden funktion; nemlig at sende næringsstoffer til blodet. Næringsstoffer bliver optaget fra tarmvæsken via membrantransportører, som sidder i tarmvæggen. Hvis man kan få lægemiddelstoffer til at ligne næringsstoffer, kan transportørerne udnyttes som en smutvej gennem tarmen og dermed bruges til at forøge lægemiddelstoffers biotilgængelighed. I molekylær biofarmaci karakteriseres interaktioner mellem membrantransportører og lægemiddelstoffer med udgangspunkt i basal

kemisk, biokemisk og molekylærbiologisk viden, og på den baggrund kan der udvikles lægemiddelstoffer med høj biotilgængelighed.

Smutvej via aminosyretransportøren

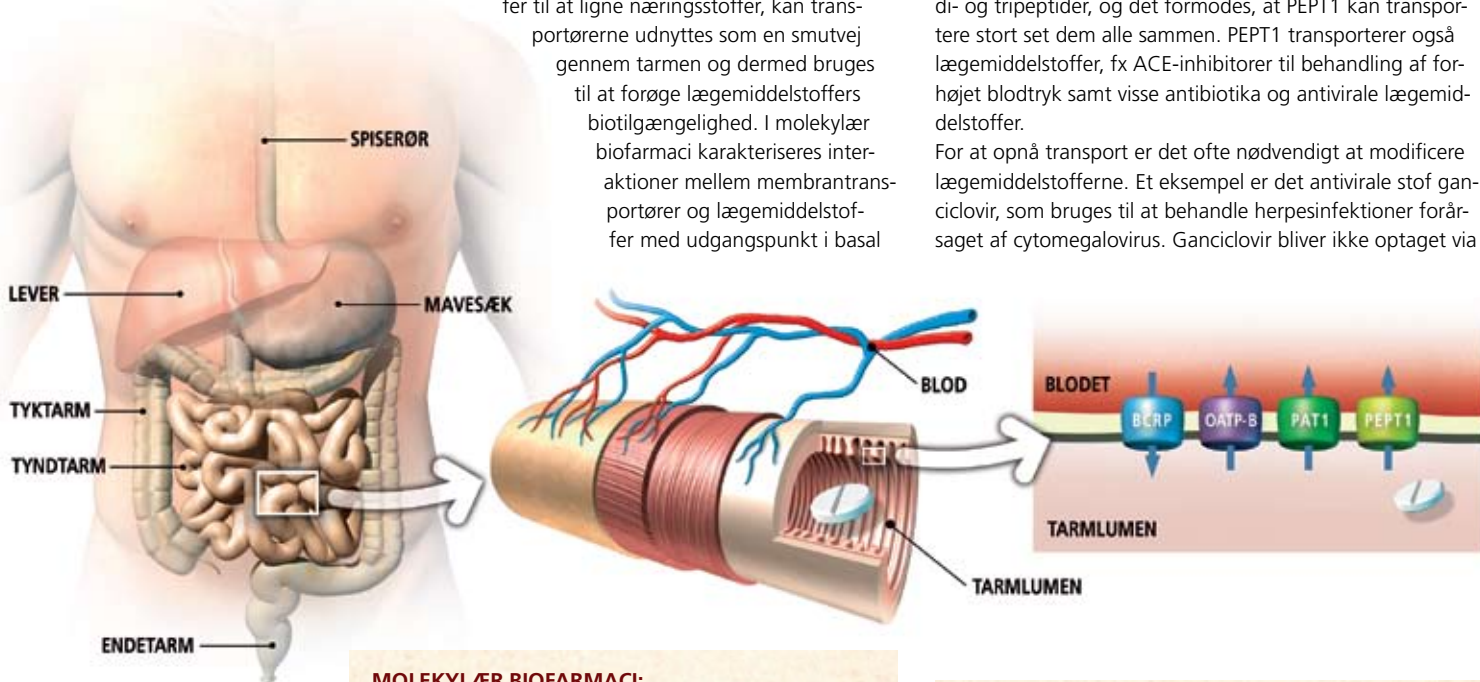
PAT1 står for proton-og-aminosyre transportør 1. Transportøren er et protein bestående af 476 aminosyrer, og den findes bl.a. i tarmvæggen. Proteinet danner en slags lomme, hvori frie aminosyrer fra føden kan bindes. I bindingslommen er der kun plads til en enkelt aminosyre, og denne aminosyre skal være neutralt ladet og have en bestemt struktur. Derfor er det kun aminosyrer som glycin, prolin, alanin og tryptofan, som kan glide ind i lommen.

Når fx glycin bevæger sig ind i lommen og bindes, ændrer PAT1 facon, og via strukturændringen fragtes glycin gennem tarmbarrieren og ind i kroppens blodbane. Nogle signalstoffer og lægemiddelstoffer ligner glycin, alanin og prolin så meget, at de kan bindes i lommen og dermed benytte transportøren. På denne måde optages neurotransmitteren GABA, antibiotika som D-cycloserin samt en gruppe lægemiddelstoffer til behandling af kræft. Ved hjælp af PAT1 kan disse stoffer passere tarmvæggen, så de bliver sendt rundt med blodet til det sted i kroppen, hvor der er brug for dem.

Designerdrugs til peptidtransportøren

Op mod halvdelen af den mængde protein, vi indtager gennem føden, optages som di- eller tripeptider, som er små kæder med to eller tre aminosyrer. Hovedparten af optaget sker gennem den proton-afhængige peptidtransportør, PEPT1. Der findes 8400 forskellige kombinationer af di- og tripeptider, og det formodes, at PEPT1 kan transportere stort set dem alle sammen. PEPT1 transporterer også lægemiddelstoffer, fx ACE-inhibitorer til behandling af forhøjet blodtryk samt visse antibiotika og antivirale lægemiddelstoffer.

For at opnå transport er det ofte nødvendigt at modificere lægemiddelstofferne. Et eksempel er det antivirale stof ganciclovir, som bruges til at behandle herpesinfektioner forårsaget af cytomegalovirus. Ganciclovir bliver ikke optaget via

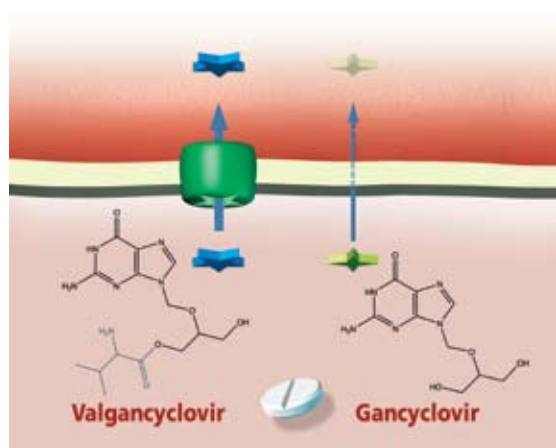


MOLEKYLÆR BIOFARMACI:

I molekylær biofarmaci karakteriseres vekselvirkninger mellem membrantransportører og lægemiddelstoffer med udgangspunkt i basal kemisk, biokemisk og molekylærbiologisk viden.

BIOTILGÆNGELIGHED:

Biotilgængelighed er et mål for hastigheden og den andel af det indtagne lægemiddelstof, der faktisk kommer frem til virkningsstedet



en transportør, og det har en lav biotilgængelighed på kun 6 procent; resten af lægemiddelet går til spilde. Valganciclovir er en kemisk modifikation af ganciclovir, hvor der er sat en aminosyre på molekylet. Denne lille ændring af strukturen medfører, at lægemiddelet nu bliver optaget gennem PEPT1, og det medfører, at biotilgængeligheden tidobles til 60 procent (se ovenfor).

At peptidtransportøren er i stand til at transportere mange stoffer, herunder kendte lægemidler, gør den meget interessant i forhold til udvikling af nye lægemidler. På FARMA arbejder vi på at designe lægemidler, som accepteres af transportøren, for på den måde at øge stoffernes biotilgængelighed (se artiklen side 18-19).

Konkurrence og bivirkninger

I tarmen findes også membrantransportøren BCRP, som er en af kroppens beskyttelsesmekanismer mod skadelige stoffer. BCRP er en udsmidningstransportør, fordi den ekspederer specifikke stoffer tilbage til tarmen fra blodet. Fx forhindrer transportøren, at visse kræftfremkaldende stoffer bliver optaget i kroppen. Det gælder bl.a. for PhIP; et kræftfremkaldende stof, som dannes, når kød grilles eller steges kraftigt. BCRP fjerner ikke kun skadelige stoffer fra blodet, men forhindrer også nogle lægemidler i at blive optaget i kroppen. Absorptionen af lægemiddelet glibenclamid bliver eksempelvis modvirket af BCRP. Glibenclamid bruges af patienter med sukkersyge for at sænke blodsukkeret. Heldigvis er der i tarmen en optagstransportør, OATP-B, som fragter hormonstoffer ind i blodet, og OATP-B kan også transportere glibenclamid. Derfor er biotilgængeligheden af glibenclamid alligevel så stor, at lægemiddelet kan anvendes til behandling af sukkersyge (se figuren til højre). En transportør kan kun flytte et vist antal molekyler ad gangen, og det forhold kan ændre biotilgængeligheden af et lægemiddel, hvis der er konkurrence om transportøren. Når BCRP-transportøren for eksempel er optaget af PhIP, kan den ikke samtidigt smide glibenclamid ud fra blodbanen (se figuren til højre). Derved optages mere glibenclamid, og sukkersygepatienten vil få en højere dosis af glibenclamid end ellers, hvilket resulterer i, at blodsukkeret

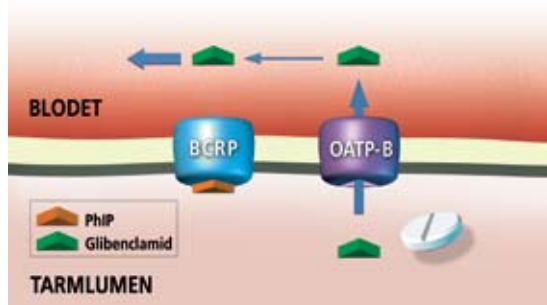
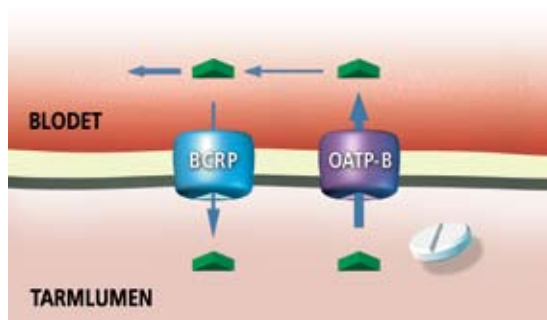
MEMBRANTRANSPORTØRER:

I tarmvæggen findes membrantransportører, der kan transportere næringsstoffer og visse lægemidler fra tarmen og over i blodbanen og visa versa.

bliver for lavt. Det er således vigtigt at vide, om lægemidler er substrater for transportører, da dette kan have stor indflydelse på stoffernes biotilgængelighed samt for mulige bivirkninger forårsaget af vekselvirkninger med levnedsmidler eller andre lægemidler.

Lægemiddelets skæbne i kroppen

Som de ovenstående eksempler viser, kan membrantransportører i tarmen have stor indflydelse på absorptionen og biotilgængeligheden af lægemidler. Lægemiddelets skæbne i kroppen opdeles ofte i fire faser (ADME), der beskriver kroppens måde at håndtere lægemidler på. Absorption af lægemiddelet er den første fase, og her optages lægemiddelet i blodet. Efter absorptionen fordeles lægemiddelet via blodet til kroppens organer og væv, hvilket kaldes distribution. Distribution kan fx være til hjerte, hjerne, muskler eller fedtvæv. I den tredje fase kan lægemiddelet blive metaboliseret i kroppen, dvs. nedbrudt eller kemisk modificeret via enzymer, hvilket ofte foregår i leveren. Eliminationen er den sidste fase, hvor lægemiddelet og dets metabolitter udskilles fra kroppen. Transportører kan være involveret i alle ADME-faser og kan have stor indflydelse på et lægemiddelets skæbne. Forskning inden for membrantransportører er derfor vigtig for at kunne beskrive lægemiddelets ADME-egenskaber og dermed for at udvikle nye lægemidler med høj biotilgængelighed. Samlet set kan kendskabet til membrantransportører være med til at sikre en for patienten optimal og sikker anvendelse af medicin.



ADME beskriver lægemiddelets skæbne i kroppen:

Absorption: Optag af lægemiddelet fra applikationsstedet til blodet. **Distribution:** Fordeling af lægemiddelet til forskellige væv. **Metabolisme:** Omdannelse og nedbrydning af lægemiddelet. **Elimination:** Udskillelse af lægemiddelet og nedbrydningsprodukter.



Cand.pharm. Luise Kvisgaard Gram er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Cand.pharm. Diana Højmark Omkvist er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Cand.pharm. Mie Larsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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



Ph.d. Birger Brodin er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



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

Transportpeptider

- nøglen til forbedret optagelse af lægemiddelstoffer



Mange lægemiddelstoffer kan ikke trænge gennem tarmvæggen, hvis de indtages som tabletter, og derfor kan de ikke komme ud i blodet og nå frem til virkningsstedet i kroppen. Problemet kan løses ved at koble lægemiddelstoffet til et transportpeptid, som trækker det gennem tarmvæggen.

Af Karina Thorn, Carsten Uhd Nielsen og Mikael Begtrup

For at et lægemiddel kan udøve sin farmakologiske effekt, skal det af blodet transporteres hen til virkningsstedet i kroppen. For patienten er det mest bekvemt at indtage medicinen i tabletform, men hvordan kommer lægemiddelstoffet gennem tarmvæggen og ud i blodet?

Mange lægemiddelstoffer er desværre ikke i stand til at passere tarmvæggen og må derfor injiceres, og det kan være meget ubekvemt for patienten. For at muliggøre at lægemiddelstoffer, der optages dårligt gennem tarmen, alligevel kan indtages i tabletform, har vi forsøgt at udnytte kroppens mekanismer for optag af næringsstoffer. Når vi har spist, nedbrydes føden under fordøjelsen til mindre molekyler; fx nedbrydes proteiner i kosten til små peptider, som kun består af to eller tre aminosyrer. De små peptider fragtes nu gennem tarmvæggen af en speciel transportør, som sender dem ud i blodet. Di- og tripeptidtransportøren kaldes hPEPT1, og den afviser uønskede stoffer, mens næringsstofferne genkendes og hjælpes gennem tarmvæggen.

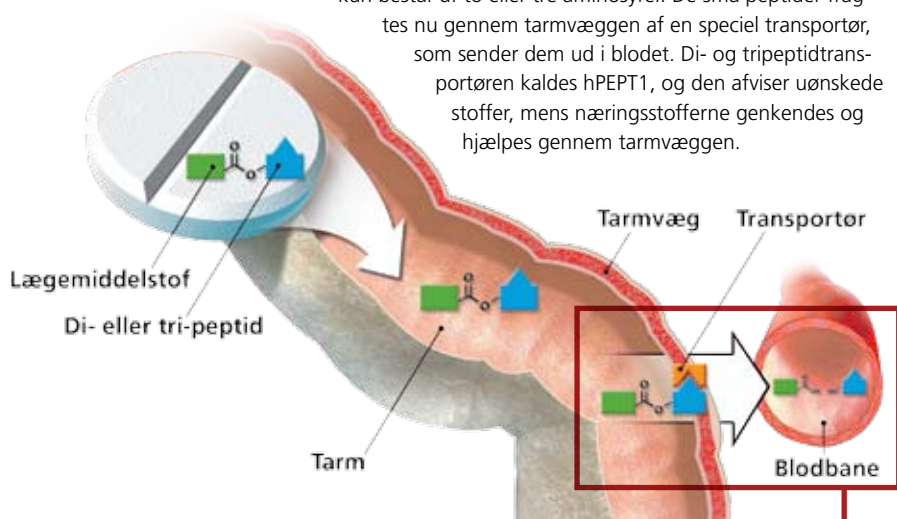
Ideen bag vores projekt er at koble et lægemiddelstof til et egnet di- eller tripeptid med en kemisk binding i forventning om, at koblingsproduktets peptid accepteres af transportøren og derpå fragtes gennem tarmvæggen med lægemiddelstoffet på slæb. Efter passagen gennem tarmvæggen til blodbanen skal koblingsproduktet spaltes til transportpeptid og lægemiddelstof. Denne pro-drug strategi rummer imidlertid store udfordringer. Koblingen mellem lægemiddelstof og transportpeptid må ikke ændre lægemiddelstoffets struktur og dermed dets virkning. Desuden skal koblingen være stabil over for mavesyre og fordøjelsesenzymerne i tarmen, mens den skal kunne brydes i blodbanen, så lægemiddelstoffet frigives til blodet. Disse krav kan kun opfyldes ved at vælge den rigtige kemiske bindingstype ved koblingen. Vi har valgt en esterbinding, fordi den spaltes hurtigere ved højere pH. Vi kan så udnytte, at pH-værdien er 7.4 i blodbanen, men kun ca. 6.6 i tarmen.

Epilepsi og nervesmerter

Som lægemiddelstof valgte vi gabapentin, som siden 1993 er blevet brugt til behandling af epilepsi og visse typer kroniske smerter. Når gabapentin indtages i tabletform, optages 40-60 procent af lægemiddelstoffet i kroppen ved lave doser, og ved høje doser er optaget endnu mindre. Hvis optaget kan øges, vil det aktive lægemiddelstof blive udnyttet bedre, og man kan nøjes med mindre doser. Derfor er det oplagt at formulere gabapentin som et pro-drug, som genkendes af hPEPT1-transportøren i tarmvæggen. Vi har i den forbindelse udviklet et tripeptid, som accepteres af transportøren. Tripeptidet indeholder en hydroxygruppe, som kan udnyttes til at forankre gabapentins syregruppe til transportpeptidet via dannelse af en esterbinding.

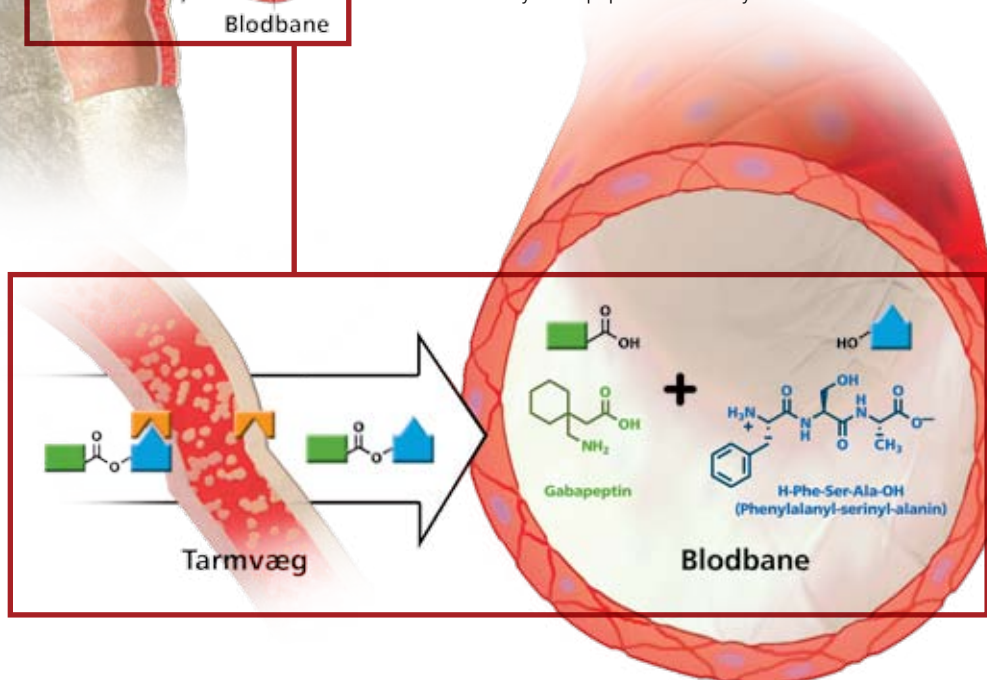
Optimering og test af transportpeptider

Transportpeptidets struktur blev først optimeret ved at fremstille en række tripeptider med varierende sammensætning af de tre aminosyrer. Tripeptiderne blev syntetiseret ved at



KONCEPTET: HPEPT1-MEDIERET TRANSPORT AF ET PRO-DRUG FRA TARMVÆSKEN TIL BLODBANEN

Vore pro-drug er sammensat af et aktivt lægemiddelstof samt et di- eller tripeptid, som bliver genkendt og transporteret af hPEPT1-transportøren. I tyndtarmen bliver dipeptider, tripeptider, peptidefterligninger og pro-drugs sammen med protoner transporteret over den apikale tarmmembran og ind i tarmcellen. Når vores pro-drug er kommet ind i tarmcellen, bliver det transporteret enten i intakt eller i spaltet form over den basolaterale membran og ud i blodbanen. Esterbindingen mellem lægemiddelstoffet og transportpeptidet spaltes ved den højere pH i tarmcellen eller i blodbanen. Illustrationen viser fremstilling af et pro-drug med lægemiddelstoffet gabapentin.





Ph.d. Karina Thorn er forskningsassistent ved Institut for Medicinalkemi.

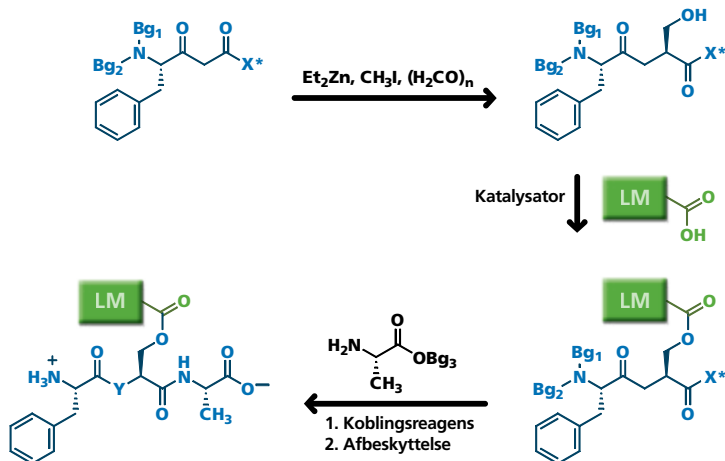


Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor ved Institut for Farmaceutisk og Analytisk Kemi.



Ph.d. Mikael Begtrup er professor ved Institut for Medicinalkemi.

STEREOSELEKTIV SYNTese AF KETOMETHYLEN PRO-DRUGS



En stereoselektiv syntese er en kontrolleret fremstilling af kun den ene stereoisomer af et tredimensionelt chiralt molekyle. Et chiralt molekyle er et, der er forskelligt fra sit spejlbillede. Første trin i syntesen er en stereoselektiv kædeforlængelsesreaktion, hvor ketomethylenheden dannes. Stereokemien styres af den påsatte skabelon X*. I andet trin forbindes lægemiddelstoffet LM til dipeptidet med en esterbinding under brug af en katalysator. Derpå påkobles den tredje aminosyre ved hjælp af aktiverende koblingsreagenser. Til sidst fjernes de beskyttelsesgrupper BG, som er anvendt under synteseforløbet for at undgå, at de forkerte grupper i molekylerne deltager i reaktionerne.

fæstne den første aminosyre med en kemisk binding til små plastkugler. Derefter påkoblede de øvrige aminosyrer, beskyttet på passende måde, én efter én, idet amidbindingerne etableredes ved hjælp af aktiverende koblingsreagenser. Næste trin var at vurdere tripeptidernes egenskaber ud fra, hvor godt de blev genkendt af hPEPT1-transportøren. Her bestemte vi, hvor effektive de forskellige tripeptider var til at fortrænge et radioaktivt standardstof, som binder sig til hPEPT1-transportøren på tarmceller. Til forsøgene brugte vi en cellelinie af rendyrkede Caco-2-celler. Peptidernes affinitet for transportøren blev bestemt ved at måle bindingskonstanten mellem stof og transportør.

De peptider, som blev accepteret i særlig høj grad, blev derpå testet for deres transportevne. Transporten over membranen måles i HeLa- eller MDCK-celler, som udtrykker hPEPT1, ved at bestemme ændringen i cellemembranens potentiale. Potentialet bygges op af protoner, fordi hvert peptidmolekyle under transporten ledsages af en proton. Måleresultatet opgives i procent i forhold til et standardstof. Tripeptidet H-Phe-Ser-Ala-OH klarede sig bedst i målingerne og blev udvalgt til videre undersøgelser.

Gabapentin blev nu koblet til dette tripeptid ved etablering af en esterbinding. Det resulterende pro-drug blev testet for genkendelse og transport via hPEPT1-transportøren. Vort pro-drug blev accepteret af transportøren, om end i lidt ringere grad end selve transportpeptidet. Til gengæld syntes vores pro-drug at blive transporteret lige så godt gennem tarmvæggen som transportpeptiderne selv. Det fremstillede pro-drug opfyldte således en række kriterier for forøget optagelse gennem tarmen. Et tilbageværende problem var den relativt hurtige nedbrydning af selve transportpeptidet i mave-tarm systemet.

Stabilitet under fordøjelsen

Peptider består af aminosyrer, som er forbundet med amidbindinger. Under fordøjelsen spaltes amidbindingerne ved hydrolyse, der ofte katalyseres af enzymer som peptidaser

og proteaser. Di- og tripeptider, som skal hjælpe lægemiddelstoffer gennem tarmvæggen, kan også undergå hydrolytisk nedbrydning i fordøjelsessystemet, før de når frem til hPEPT1-transportøren i tyndtarmen. Der skal altså konstrueres et transportstof, der ligner det optimerede tripeptid så meget, at det genkendes og accepteres af hPEPT1-transportøren, og som tåler de barske forhold i fordøjelsessystemet. En løsning er at erstatte amidbindingen med en efterligning, som ikke spaltes i fordøjelsessystemet. Ved erstatningen er det afgørende for genkendelse af hPEPT1-transportøren, at det oprindelige transportpeptids tredimensionelle struktur bevares. Fremstillingen af tripeptidefterligningen skal derfor være stereoselektiv og kun give en af de otte mulige stereoisomere.

Efterligningen blev fremstillet ved at erstatte amidgruppen i det optimerede tripeptid med en ketomethylen-gruppe. Denne gruppe kan ikke nedbrydes ved hydrolyse. Ved syntesen anvendte vi højreaktive udgangsstoffer, som skulle håndteres med største forsigtighed, fordi de anvendte zinkforbindelser bryder i brand blot ved kontakt med atmosfærens oxygen. Reaktionen blev derfor udført i nitrogenatmosfære.

Den nødvendige entydige tredimensionelle struktur sikres ved at bruge phenylalanin som skabelon. Phenylalanin findes i naturen kun på én spejlbilledform. Den tredimensionelle skabelon præger stereokemien ved de efterfølgende reaktioner, der fører til ketomethylendelen, som derfor kun opstår på én spejlbilledform. Ved afsluttende påkoblinger af aminosyrer dannes tripeptidanalogen, som ifølge vores foreløbige målinger er stabil under fordøjelsesbetingelser, og som heldigvis har bevaret det oprindelige tripeptids gode genkendelses- og transportegenskaber.

Således synes alle fundamentale problemer ved pro-drug-strategien at være løst. Det næste skridt bliver at afprøve, om det koblede pro-drug med lægemiddelstof og transportpeptid virker. Hvis svaret er ja, må princippet afprøves på andre lægemidler.

Dynamisk laboratoriemodel for lipolysen under fedtfordøjelsen i tarmene: Modellen omfatter et termostatstyret reaktionskammer, en computerkontrolleret pH-stat med en automatiseret burette for tilsætning af NaOH samt en pumpe for kontinuert, kontrolleret tilsætning af CaCl₂. Alle forsøg udføres under omrøring.



Dynamisk model for fordøjelse af lipidbaserede lægemidler i tarmen

Lægemiddelstoffer skal opløses i tarmvæsken, før de kan transporteres over tarmvæggen og komme ud i blodet, men mange lægemiddelstoffer er tungtopløselige i vand. En mulig løsning er lipidbaserede formuleringer. En ny model efterligner fordøjelsen af lipidbaserede lægemidler i mave-tarmkanalen.

Af Dimitri Fatouros, Anne Larsen, Betty Lomstein Pedersen, Jette Jacobsen og Anette Müllertz

At indtage medicin via munden i form af tabletter eller kapsler er velkendt og bekvemt. Mange nyopdagede lægemiddelstoffer er imidlertid tungtopløselige i vand, så her er traditionelle tabletter problematiske. Et stof skal nemlig være i opløsning, før det kan blive transporteret over tarmvæggen og komme ud i blodet.

Forskellige avancerede formuleringssystemer kan øge opløseligheden af lægemiddelstoffer i tarmvæsken og derved forbedre absorptionen af stofferne til blodet. Et princip, der nyder stigende popularitet, er lipidbaserede formuleringer af typen selvemulgerende drug delivery-systemer (SEDDS). Disse formuleringer holder lægemiddelstoffet opløst i mavetarmsaftene, hvorved man undgår opløsningstrinnet, som ofte er det hastighedsbegrænsende trin i optagelsen.

SEDDS formuleres som et prækoncentrat bestående af en olie, et overfladeaktivt stof og et co-solvent. Prækoncentratet, som indeholder lægemiddelstoffet, kan doseres i en kapsel. Når der tilsættes væske til prækoncentratet, vil der ved let omrøring spontant dannes en emulsion. Hvis der dannes en mikroemulsion, vil væsken være klar og let grålig eller blålig, og hvis der dannes større emulsionsdråber, vil væsken blive mælket. I en mikroemulsion er emulsionsdråberne ofte i nanostørrelse, hvorfor betegnelsen nanoemulsion egentlig er mere korrekt.

Når man skal udvikle en ny oral formulering for et givent lægemiddelstof, er det en fordel at have en testmetode i laboratoriet, som kan efterligne forholdene i menneskets tarm. Ved udvikling af tabletter anvender man typisk en udløsningstest, der måler, hvor hurtigt et lægemiddelstof frigives fra en formulering og går i opløsning. Denne test kan

ikke anvendes for lipidbaserede formuleringer, fordi lægemiddelstoffet allerede er i opløsning fra starten.

Derfor har vi udviklet en lipolysemodel, der efterligner fedtfordøjelsen i tarmsystemet og dermed simulerer fordøjelsen af SEDDS i tarmen. Under fedtfordøjelsen dannes der forskellige faser; en lipid fase, en fast fase og en vandig fase. Vandfasen indeholder kolloide strukturer som vesikler og miceller. Det er interessant at undersøge, hvilke faser lægemiddelstoffet fordeles til under lipolysen. Til det formål kan man anvende biofysiske karakteriseringsmetoder for at få et overblik over, hvilke egenskaber de dannede faser fra forskellige formuleringer har.

Model for fedtfordøjelsen

Fedtfordøjelsen i mave-tarm-kanalen er en dynamisk proces. Fedtstoffer fordøjes af lipaseenzymer, hvilket medfører, at der dannes multilaminare flydende krystallinske faser – bestående af lipolyseprodukter som fedtsyrer og monoglycerider – på overfladen af fedtdråberne. Under tilstedeværelsen af overfladeaktive galdesalte afsnøres faserne derpå til multilamellære vesikler og derefter til miceller.

For at undersøge, hvilken skæbne nanoemulsioner med lægemiddelstoffer får i mave-tarm-kanalen, har vi udviklet en lipolysemodel til at bruge i forbindelse med udvikling af lipidbaserede lægemiddelformuleringer. Lipolysemodellen er en pH-stat-model, hvor pH under lipolysen holdes konstant på 6.5 svarende til forholdene i øvre del af tarmkanalen. I reaktionskammeret blandes buffer, galdesalte, fosfolipider samt en lipidbaseret formulering, hvorpå pH justeres til det ønskede niveau.

Lipolysen startes ved tilsætning af et enzymekstrakt, som indeholder lipase fra bugspytkirtlen. Samtidigt startes pH-stat'en, som holder pH-konstant på 6.5 ved tilsætning af natriumhydroxid (NaOH). Lipasen spalter triglyceriderne i den lipidbaserede formulering til frie fedtsyrer og monoglycerider. De frie fedtsyrer sænker pH og udløser derved en proportional mængde af NaOH fra titratoren.

For yderligere at kontrollere lipolysen tilsættes calciumklorid (CaCl₂) kontinuert under hele forløbet. Calcium er en nødvendighed for aktiviteten af lipasen, og desuden binder cal-

cium frie fedtsyrer, der ellers kan forhindre lipasen i at binde sig til fedtdråberne. Hastigheden af lipolysen kan styres ved at ændre calciumtilsætningen. Der kan løbende tages prøver ud fra modellen. Prøverne tilsættes lipaseinhibitor for at stoppe lipolysen og kan oprensnes ved hjælp af ultracentrifugering.

Ultracentrifugeringen medfører adskillelse i tre fraktioner: Bundfald, der primært består af calciumsæber af fedtsyrer og udfældet lægemiddelstof; en midterfraktion, der består af miceller og vesikler, og en øvre fraktion, der består af ikke-hydrolyserede fedtstoffer. Den generelle opfattelse er, at jo højere koncentration af lægemiddelstof man kan opnå i midterfraktionen med miceller og vesikler, jo mere lægemiddelstof vil der være tilgængeligt for optagelse i tarmen.

Fordøjelse af lipidbaserede formuleringer

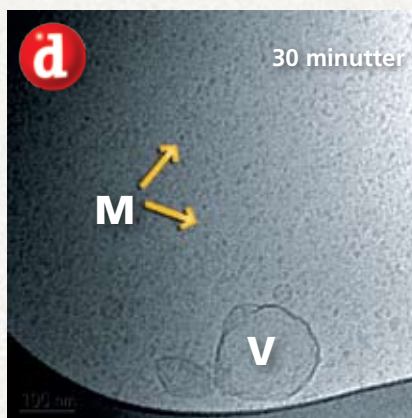
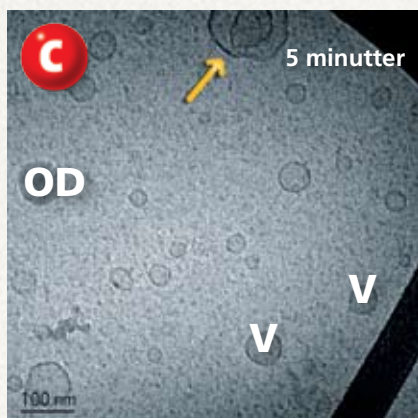
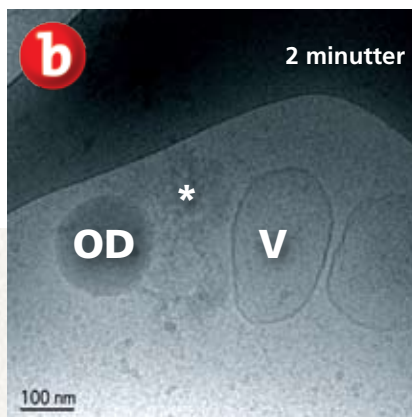
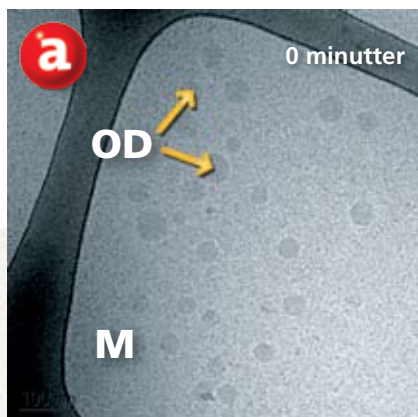
Indtil videre findes der ikke særlig mange publicerede forsøg, der undersøger lipolysen af lipidbaserede formuleringer og anvender den som en udviklingsparameter, hvilket primært skyldes, at modellen endnu ikke er særligt udbredt. Det er imidlertid vist, at modellen er effektiv i undersøgelser af, hvordan lægemiddelstoffer opløses, og hvilke kolloide faser der dannes.

For nylig har vi publiceret undersøgelser af morfologiske og strukturelle ændringer, der sker under fordøjelse af SEDDS som danner nanoemulsioner under forhold, som efterligner tarmsystemet under faste. Ved forsøgene blev prøver udtat

get på forskellige tidspunkter under lipolysen og nedfrosset til meget lave temperaturer. Derpå anvendtes Cryogen Transmissions-Elektron-Mikroskopi (Cryo-TEM), der gør det muligt at se meget små strukturer i væsker – helt ned til 20 nanometer.

Forsøgene viste, at der er miceller tilstede under hele lipolyseprocessen. Oliedråber fra formuleringen omformes til runde eller aflange unilamellare vesikler, efterhånden som lipolysen skrider frem. Et lille antal bilamellare vesikler kan også ses. Efter 50 procent lipolyse ses et fald i antallet af vesikler og oliedråber, og der er primært miceller tilstede. Dette studie viser, hvilke strukturer der dannes ved lipolyse af et selvemulgerende drug delivery-system. Dannelsen af de forskellige strukturer vil have betydning for, hvor meget lægemiddelstof der kan opløses og være tilgængeligt for absorption. Denne slags studier er vigtige for at opnå en større forståelse for, hvordan optimale lipidbaserede formuleringer kan fremstilles, blandt andet hvordan sammensætningen af formuleringen kan have indflydelse på, hvilke strukturer der dannes ved lipolysen

Med det stigende antal tungtopløselige lægemiddelstoffer, som udvikles i den farmaceutiske industri, stiger anvendelsespotentialer for lipidbaserede formuleringer. Derfor øges behovet for udvikling af laboriemodeller, som kan efterligne forholdene i mave-tarm-kanalen, og som derved kan anvendes som et værktøj i forbindelse med en strategisk udvikling af lipidbaserede lægemidler.



Cryo-TEM mikroskopibilleder: Simuleret fedtfordøjelse under faste af et selvemulgerende drug delivery system – en nanoemulsion indeholdende lægemiddelstof. **a** Oliedråber (OD) i forskellige størrelser (se pile) og miceller (M) før starten af forsøget. **b** Lipolyseprodukter 2 minutter efter tilsætning af lipase. Her ses store, aflange unilamellare vesikler (V) og oliedråber. **c** Lipolyseprodukter 5 minutter efter tilsætning af lipase. De dominerende produkter er unilamellare, kuglerunde vesikler samt en bilamellar vesikel (se pil). **d** Lipolyseprodukter 30 minutter efter tilsætning af lipase. Der er kun få unilamellare vesikler tilbage i mediet; de fleste er blevet omdannet til miceller (se pile).



Ph.d. Dimitrios Fatouros er tidligere postdoc ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi. Han er nu senior lecturer ved University of Portsmouth, England.



Cand.pharm. Anne Larsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Betty Lomstein Pedersen er adjunkt ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Jette Jacobsen er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.



Ph.d. Anette Müllertz er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Få kræftcellen til at begå selvmord

– en strukturel vinkel på kræft



Proteinet RasGAP er involveret i programmeret celledød, som skal aflive kræftceller, før de breder sig uhæmmet i kroppen. Derfor er RasGAP et lovende mål for lægemidler. Vejen imod en bedre medicinsk behandling banes via strukturbaserede studier af RasGAPs vekselvirkninger med andre proteiner.

Af Birthe Ross, Morten Borchorst, Michael Gajhede og Ole Kristensen

Netop nu lever omkring 230.000 danskere med en kræftdiagnose, og en danskers risiko for at få kræft inden 75 års-alderen er 34 procent. Tallene er skræmmende, men heldigvis sker der til stadighed fremskridt inden for kræftforskningen.

Kræft opstår, når nogle af kroppens celler vokser og formerer sig ud over de normale rammer. Årsagen er næsten altid, at der er genetiske fejl i cellerne, specielt i de gener, som styrer cellevækst, udvikling og deling. Genfejlene kan enten være nedarvede eller opstået over tid, fx på grund af tobaksrygning, og de giver anledning til, at en normal celle omdannes til en kræftcelle, der kan formere sig uhæmmet.

Proteiner og cellevækst

Der forskes meget i hvilke gener og dermed hvilke proteiner, som kan medvirke til udviklingen af kræft. Et vigtigt protein i den sammenhæng er proteinet Ras, hvis gen har fejl i op mod 30 procent af alle kræftformer. Ras spiller en central rolle for cellernes vækst og udvikling, og aktiviteten af Ras er strengt styret. Flere proteiner deltager i styringen og sørger for at aktivere og inaktivere Ras på de rigtige tidspunkter. Et af dem er proteinet RasGAP, som er ansvarlig for at inaktivere Ras.

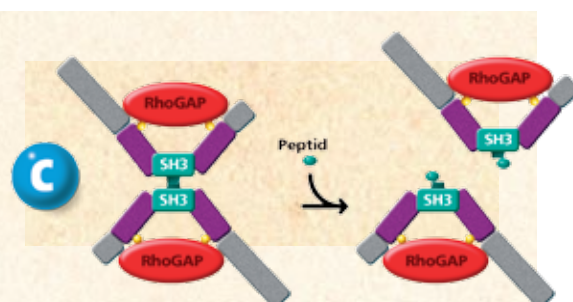
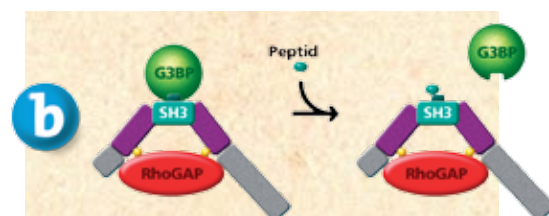
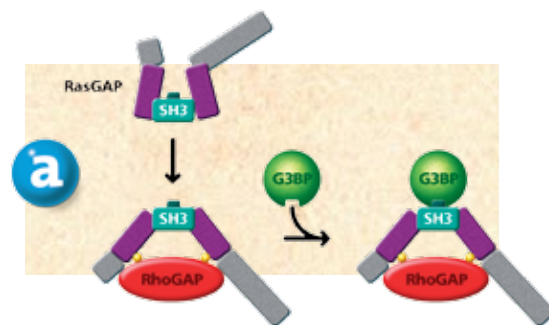
I nogen kræftformer har Ras en fejl, som bevirker, at proteinet bliver resistent over for inaktivering via RasGAP. Når der ikke kan slukkes for Ras, fastholdes proteinet i sin aktive form, som giver signal til, at cellen skal gro. Derfor kan fejl i Ras være årsag til, at cellen vokser uhæmmet og omdannes til en kræftcelle.

Ud over at være vigtig som hæmmer af Ras har RasGAP selv stor betydning for udvikling af kræft. Proteinets rolle er involveret i apoptose – programmeret celledød – og det er selv strengt styret via vekselvirkninger med andre proteiner. RasGAP er derfor et nyt og lovende mål for lægemidler, men for at kunne udnytte mulighederne optimalt er det nødvendigt at forstå RasGAPs vekselvirkninger med andre proteiner.

Aktiv i proteinkomplekser

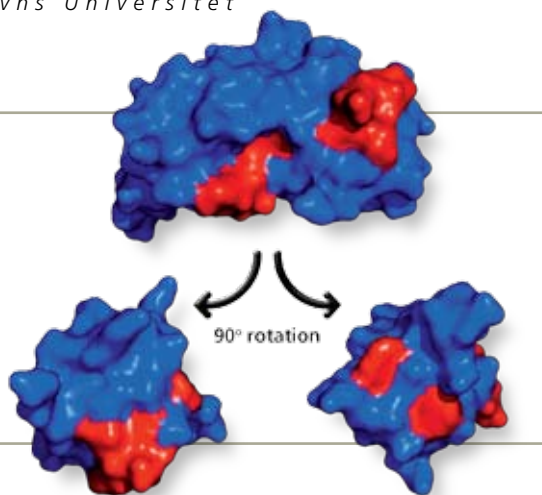
Mange proteiner virker kun, når de sidder sammen i store proteinkomplekser, og det gælder også for RasGAP. Når proteiner på den måde bindes sammen i et kompleks, samles mange forskellige opgaver på et sted. Inde i cellen findes RasGAP næsten altid sammen med et andet protein, RhoGAP. RhoGAP hjælper RasGAP til at binde til endnu et vigtigt protein, G3BP, som er stærkt opreguleret i nogle kræftformer, fx brystkræft.

Proteinkompleksers funktion kan reguleres ved, at proteiner rekrutteres til eller fjernes fra komplekset. En meget almindelig måde, hvorpå et protein bindes til et andet protein er, at det ene protein fosforyleres, og det andet protein



RasGAP som mål ved kræftbehandling: **a** RasGAP kan binde sig til proteinet RhoGAP, når dette fosforyleres på to positioner, som derpå binder sig til to domæner fra RasGAP. Derved eksponeres den del af RasGAP, der kan binde sig til andre proteiner, fx G3BP eller RasGAP selv. Et lille fragment af RasGAP, et peptid, kan forstærke cellegiftens evne til at slå kræftceller ihjel. Peptidet bindes på overfladen af proteinet i det område, hvor RasGAP enten vekselvirker med andre proteiner eller dimeriserer med et andet RasGAP-molekyle. Peptidet kan derfor enten bryde RasGAPs interaktion med andre proteiner **b** eller forhindre dimeriseringen **c**. Ved at undersøge proteinets struktur er det muligt at designe andre peptider, der kan virke endnu mere effektivt.

Den tredimensionelle struktur af RasGAP SH3-domænet er blevet bestemt. Strukturen viste, at SH3-domænerne danner en dimer. Figuren viser overfladen af RasGAP SH3-dimeren samt regionerne, hvor de to proteiner sidder sammen. Det lille peptid fra RasGAP, som kan bruges i kræftbehandling, er farvet rødt. Peptidet er placeret i det område af proteinet, der binder dimeren sammen, og på dimerens overflade. Det er derfor muligt, at peptidets funktion både kan være at forhindre RasGAPs interaktion med sig selv samt at ødelægge RasGAPs binding til den vigtige partner G3BP.



Ph.d. Birthe Ross er postdoc ved Institut for Medicinskemi.

så bindes dertil. Når der sker en fosforylering, bliver et lille område på proteinet meget negativt ladet, og dermed kan området genkendes af et andet protein, som har et område med positiv ladning.

Denne interaktion er reguleret af de proteiner, der forestår fosforyleringen. RasGAP binder til RhoGAP, når RhoGAP er blevet fosforyleret to steder. Før fosforyleringen af RhoGAP afskærmer det område på RasGAP, hvor RasGAP binder til andre proteiner. Disse to domæner binder til fosforyleret RhoGAP, og derved ændrer RasGAP sin konformation. Når konformationsændringen er sket, eksponeres det sted, hvor andre proteiner kan binde til RasGAP. På den måde reguleres RasGAPs binding til andre proteiner indirekte af RhoGAPs fosforylering.

Fra struktur til kræftbehandling

Kløvningen af RasGAP kan være et signal til, at en celle skal dø eller overleve, og denne viden kan bruges, når man skal slå kræftceller ihjel med medicin. Når RasGAP kløves to gange, dannes fragment N2, som er et signal til, at cellen skal undergå programmeret celledød. Et lille stykke af fragment N2, et peptid på kun ti aminosyrer, er blevet identificeret som virksomt mod kræftceller. Kræftceller bliver mere modtagelige over for cellegifte, når de sammen med cellegiften får det lille peptid.

For at kende peptidets funktion er det vigtigt at opklare det strukturelle grundlag for peptidets vekselvirkninger med an-

dre proteiner. Første skridt på vejen er netop taget ved, at den tredimensionelle struktur af RasGAP SH3-domænet er blevet bestemt ved hjælp røntgenkrystallografi. SH3-domænet indeholder det vigtige peptid, som kan være med til at dræbe kræftceller.

Det er sandsynligt, at peptidet virker ved at blokere RasGAP's binding til andre proteiner, fx G3BP. Til vor overraskelse opdagede vi, at proteinet dimeriserer, dvs. sidder sammen to og to. Ved at kigge på strukturen viste det sig, at stykker af peptidet sidder på dimerens overflade og derfor kan blokere bindingen til andre proteiner. Hvis dimeren splittes i to, ses det yderligere, at det lille stykke peptid er lokaliseret i det område, hvor de to SH3-domæner i RasGAP-dimeren sidder sammen. Det betyder, at peptidets funktion også kan medvirke til at ødelægge interaktionen mellem to RasGAP SH3-domæner. Bestemmelse af RasGAP SH3-domænets tredimensionelle struktur har således skabt helt nye muligheder for rationelt design af nye potentielle lægemidler mod kræft.

Proteinernes interaktioner og vekselvirkninger med hinanden er utroligt komplicerede, og hvert lille proteins funktion er vigtigt for at få et samlet billede af, hvad der foregår inde i cellerne. Næste skridt bliver at undersøge samspillet mellem RasGAP og andre proteiner. Derved bliver det måske muligt at designe andre molekyler, som kan ødelægge interaktioner mellem proteinerne og derved være mere effektive til at dræbe kræftceller.



Morten Borchorst er specialestuderende ved Institut for Medicinskemi.



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



Ph.d. Ole Kristensen er lektor ved Institut for Medicinskemi.

RASGAP MEDVIRKER TIL PROGRAMMERET CELLEDØD

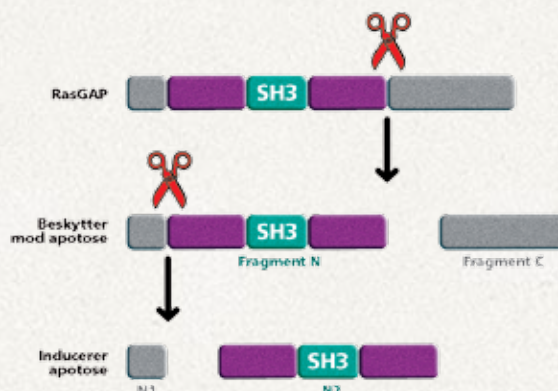
Som et forsvar mod udvikling af kræft har kroppen en række mekanismer, der kan detektere, om en celle har genetiske fejl, som er så alvorlige, at de ikke kan repareres. Når det er tilfældet, vil cellen blive udslettet ved en proces, som kaldes programmeret celledød eller apoptose.

Genetiske fejl i en celle kan medføre, at cellen pludselig vokser uhæmmet og bliver til en kræftcelle. I de fleste tilfælde detekteres sådanne fejl i tide, og cellen modtager signaler om, at den skal undergå programmeret celledød.

Protein RasGAP er involveret i de signalmekanismer, som bestemmer, hvorvidt cellen skal overleve eller undergå apoptose. For cellens normale funktion er det vigtigt, at tingen for celledød er meget velafbalanceret.

Når en celle er udsat for stress, enten ved at noget inde i cellen ikke fungerer eller på grund af ydre påvirkninger, kløves RasGAP. Ved milde former for stress kløves RasGAP én gang til fragment N og fragment C. Fragment N beskytter cellen mod apoptose. Under kraftigere former for stress kløves RasGAP endnu en gang, så fragment N spaltes i frag-

ment N1 og fragment N2, hvilket er et signal til at cellen skal undergå programmeret celledød. Den del af fragment N2, der er ansvarlig for celledødssignalet, er identificeret som et peptid på kun ti aminosyrer. Disse ti aminosyrer kan være med til at dræbe kræftceller.



Når kræft gør ondt i knoglerne

Mange kræftpatienter oplever kroniske smerter, som nedsætter deres livskvalitet. Nye behandlingsmetoder medfører, at patienterne lever længere, og det er derfor vigtigt med effektiv smertelindring, så den sidste tid bliver så god mulig. Vi fokuserer på, hvorfor kræft gør ondt, og hvordan smerten bedst behandles.

Af Andreas Hald, Rikke Rie Hansen og Anne-Marie Heegaard

Risikoen for at udvikle kræft, inden man fylder 75 år, er 34 procent for både mænd og kvinder i Danmark, og 230.000 danskere lever med en kræftdiagnose. Kræft er den næsthøjest dødsårsag forårsaget af sygdom, kun overgået af hjerte-kar-sygdomme.

Kræft udspringer af ondartet cellevækst, og kræftsygdommene medfører en række komplikationer, især stærke og kroniske smerter, som i høj grad forringer livskvaliteten for patienterne. Kræftsmarter bliver traditionelt behandlet med panodil eller aspirin, som suppleres med opioider, fx morfin. Brug af opioider er desværre forbundet med en række bivirkninger, bl.a. forstoppelse og træthed.

En veltiretelt smertebehandling menes at hjælpe op mod 90 procent af patienterne, mens resten ikke kan opnå smertelindring med de nuværende metoder. Det svarer til, at omkring 12.000 kræftpatienter her i landet får en utilstrækkelig smertebehandling. Da nye og effektive behand-

lingsmuligheder medfører, at den enkelte patient lever længere med sin kræftsygdom, er det ekstra vigtigt at udvikle en effektiv smertelindring, så den sidste levetid bliver så god som mulig. Derfor har vi målrettet vores forskning mod at undersøge, hvorfor kræft gør ondt, og hvordan smerten bedst kan behandles. Behandlingsresistente smerter skyldes ofte, at en tumor forekommer i nærheden af nerver eller i knogler, og desværre har nogle typer kræft en stærk tendens til netop at metastasere sig til knoglevæv, hvilket kan give intense smerter hos patienterne.

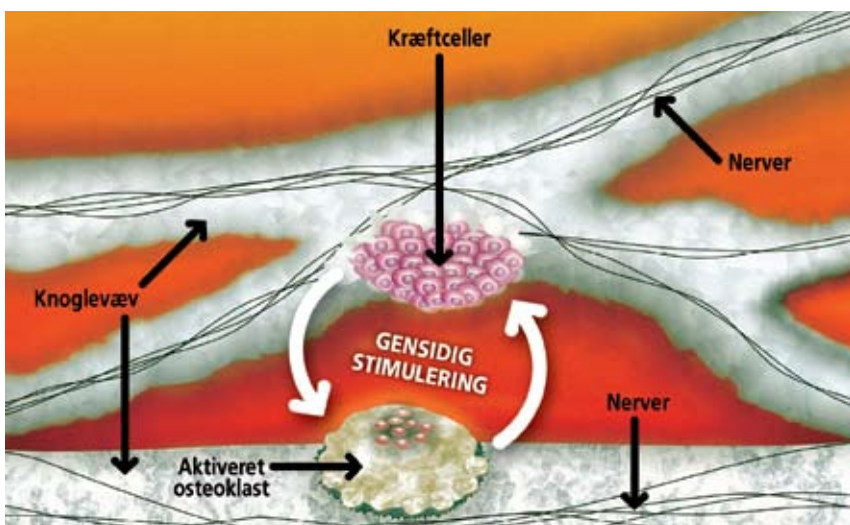
Årsagen til knoglekræftsmarter skal sandsynligvis findes i knoglernes normale tilpasning til, hvordan de bliver brugt. Skelettet bliver ofte fejlagtigt anset for at være et uodynamisk og dødt stativ, der kun tjener til at støtte lemmerne og beskytte de væsentlige organer såsom lunger, hjerte og hjerne. Men skelettet har også andre livsnødvendige funktioner. Fx fungerer det kalkholdige skelet som hele kroppens depot for calcium og er med til at regulere kropsvæskernes calciumindhold, som er af fundamental betydning for alle kroppens celler.

Knogler bliver konstant nedbrudt og genopbygget for at kunne yde maksimal styrke i forhold til ydre belastninger. Nedbrydning og opbygning af knoglevæv foretages af to forskellige celletyper, som kun findes i knoglerne: Osteoklaster nedbryder knoglevæv, hvor det er nødvendigt, og efterfølgende genopbygger osteoblaster vævet på ny. Skelettet gennemløbes af nerver, som er ansvarlige for den smerte, der kan føles fra knogler, eksempelvis ved kræft, benbrud eller knogleskørhed.

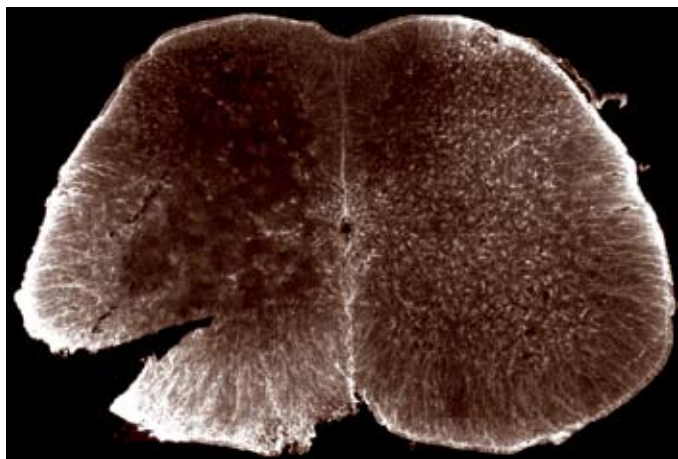
Metastaser i knoglevæv

Kræftceller, der metastaserer til knoglevævet, deler sig og danner svulster. Umiddelbart kunne man tro, at det hårde knoglevæv ville forhindre tumorens vækst, men kræftceller udskiller forskellige hormoner og lokker på den måde osteoklaster til at nedbryde knoglerne. Osteoklasterne arbejder altså til svulstens fordel, så tumoren kan fortsætte sin vækst. Knoglevævet indeholder desuden en lang række forskellige stoffer, der frigives ved nedbrydningen af knogler. Nogle af disse stoffer kan øge kræftcellernes vækst, og på den måde opstår der en ondartet spiral, hvor tumorvækst og knoglenedbrydelse forstærker hinanden.

Både svulster, osteoklaster og stoffer frigivet fra knoglevævet menes at bidrage til udviklingen af de intense smerter fra knoglemetastaser. En voksende tumor udskiller fx nogle af de samme stoffer, som ses i forbindelse med betændelse som følge af infektioner og insektbid, som jo er forbundet med smerte og ømhed. Desuden ætser osteoklaster sig vej gennem knoglerne ved at udskille saltsyre, og når nerver derved blottes, kan dette måske forvolde intense smerter.



I knoglekræft udskiller kræftcellerne hormoner, som får en type celler kaldet osteoklaster til at nedbryde knoglerne. Nedbrydningen af knoglevævet sætter tumoren i stand til at vokse. Knoglevævet frigiver samtidig stoffer, som øger kræftcellernes vækst, og på den måde opstår der en ondartet spiral, hvor tumorvækst og knoglenedbrydelse forstærker hinanden.



En øget forekomst af astrocytter ses i midten af højre side af rygmarven, som svarer til den side, hvor musen har knoglekræftssmerter. Astrocytterne er farvet med et stof, som binder sig til et protein, der findes inde i cellerne. Ved hjælp af et mikroskop og et fintfølede kamera er astrocytterne her visualiseret som hvide prikker.



Cand.scient. Andreas Hald er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Cand.pharm. Rikke Rie Hansen er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Ph.d. Anne-Marie Heegaard er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Endelig mener man, at stoffer frigivet fra knoglevævet øger nervers følsomhed over for andre stimuli og derved forværrer smerterne. De enkelte detaljer i mekanismerne, som fører til udvikling af knoglesmerter, er endnu ikke klarlagt til bunds, og det er derfor vigtigt med forskning på området, som kan føre til udvikling af mere effektive lægemidler.

Musemodel for knoglesmerter

For at udvikle nye og bedre behandlingsmuligheder for patienter med knoglekræftssmerter er det nødvendigt med en dyremodel, der afspejler sygdomsforløbet; herunder den ondartede spiral, hvor tumorvækst og knoglenedbrydelse forstærker hinanden.

I den sammenhæng bruger vi en musemodel, hvor vi på fuldt bedøvede mus specifikt inducerer en tumor i den ene lårbensknogle ved at bore et meget lille hul i ind til marvkanalen og indsprøjte kræftceller. Kræftcellerne begynder nu at dele sig, og der dannes en tumor, knoglen bliver nedbrudt, og der udvikles smerte. Denne model bruger vi til at undersøge, hvilke ændringer der sker i samspillet mellem tumor og knogle, og om forandringerne har indflydelse på udviklingen af smerter. Desuden undersøger vi, hvilken effekt smerten har på de celler i centralnervesystemet, der forbindes med udvikling af kroniske smerter.

Mus kan ikke mundtligt give udtryk for deres smerteoplevelse, og derfor benytter vi indirekte testmetoder til bestemmelse af deres smerteniveau. Bl.a. vurderes det, i hvor høj grad musen halter på det tumorbærende ben, og vi måler, hvor meget vægt musen placerer på benet. Halten og ned-

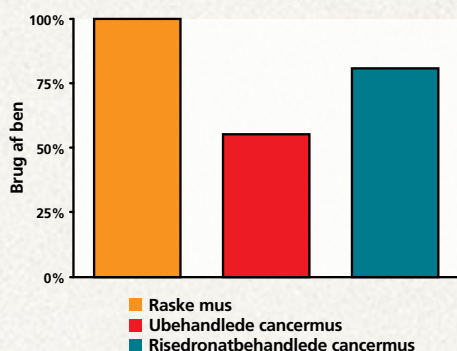
sat belastning af benet tages som et udtryk for smerte. Derudover undersøges det, om musen har øget følsomhed over for berøringer på poten, hvilket bruges som en indikation på en nedsat smertegrænse.

Mus kan ikke sige stop, hvis den smerte, der påføres dem under et eksperiment, bliver for stor. Derfor følger vi musene meget tæt gennem hele forsøgsperioden, og ved ethvert tegn på intense smerter, ubehag eller nedsat almenvel afbrydes forsøget.

Test af lægemiddelstoffer

Musemodellen benyttes til afprøvning af lægemiddelstoffer og til at belyse den grundlæggende mekanisme bag smertedannelsen. For nylig har vi testet lægemiddelstoffet risedronat, der ophobes i knoglevæv, hvor stoffet forhindrer osteoklaster i at nedbryde knoglevæv og dermed også muligheden for tumorvækst. Risedronat viste sig at forhindre knoglenedbrydelse og forsinke udviklingen af smerter. Vi efterforsker også et andet interessant aspekt, nemlig påvirkningen af de celler i rygmarven, som smertesignalerne passerer igennem for at nå hjernen. I den forbindelse lader det til, at en gruppe af neuronernes støtteceller, astrocytterne, aktiveres af smerter og optager mere og mere plads i rygmarven – betydning af dette fænomen er endnu uafklaret. Vort håb er, at forskningen vil føre til ny og bedre behandling af knoglesmerter, som kan øge livskvaliteten for det store antal kræftpatienter, der ikke kan få lindring for deres intense smerter, som forværrer en i forvejen meget svær situation.

EFFEKT AF RISEDRONAT PÅ HALTEN



Lægemiddelstoffet risedronat lindrer knoglesmerter hos forsøgsmus med kræft i lårbensknoglen. Grafen viser stoffets effekt på musenes halten, som er en indikation på niveauet af deres smerter.

FAKTA OM KRÆFT

Kræft er kendetegnet ved sygelig og ukontrollabel vækst af celler i et specifikt væv, fx i lungerne, brysterne eller prostata. Kræftceller kan invadere det omkringliggende sunde væv, og de kan desuden sprede sig til fjerntliggende væv og organer via dattersvulster, som kaldes for metastaser.

Kræftsygdomme blev første gang beskrevet omkring 1600 f.kr., og termen cancer tilskrives den græske læge Hippocrates, som levede 460-370 f.kr. Der er gennem tiderne brugt store summer i kampen for at finde helbredende lægemidler, men på trods af de store investeringer og udviklingen af bedre behandlingsformer er kræft stadig en sygdom, der ofte er forbundet med et langstrakt sygdomsforløb og en høj dødelighed.

Smerteforskning, chili con carne og fluorescerende stoffer

Kroniske nervesmerter kan i dag ikke afhjælpes i tilstrækkelig grad. Ved hjælp af fluorescerende markører forsøger vi at kortlægge og farmakologisk karakterisere de cellulære mekanismer bag neuropatiske smerter. Målet er udvikling af nye lægemidler, som kan forbedre behandlingen.

Af Christian Kamp Nielsen, Majid Sheykhzade, Anne-Marie Heegaard og Ole Jannik Bjerrum

Hvis du stikker dig på en nål eller får en let forbrænding ved at røre ved et varmt strygejern, vil du øjeblikkeligt føle smerte. Formålet med smertereaktionen er, at du fjerner hånden fra strygejernet, så du reducerer skadens omfang, og samtidig lærer, at varme strygejern kan være farlige, og derfor ikke placerer hånden dér igen. Den slags akutte smerter forsvinder, når skaden er helet, og vil blot efterlade dig en erfaring rigere.

Når smerter varer over seks måneder, betegnes de som kro-

niske, og når smerterne skyldes en direkte skade på nervevævet, kaldes de neuropatiske smerter. Skader på nervevævet kan opstå i forbindelse med kræft, diabetes og kronisk betændelse samt ved ulykker eller operationer; fx efter amputationer. Kroniske neuropatiske smerter varer livet ud og synes ikke at tjene noget formål.

Ingen effektiv behandling

I dag behandles kroniske neuropatiske smerter med gabapentin, med opioider som morfin, eller med stoffer, der hæmmer betændelse såsom ibuprofen eller carprofen. Lægemidlerne kan give varierende bivirkninger afhængig af den indtagne dosis, som ofte er høj hos kroniske smertepatienter. Dosis øges, så længe den smertedæmpende effekt overskygger ubehaget ved de opståede bivirkninger. Ingen af nutidens behandlinger dæmper nervesmerter tilstrækkeligt effektivt, og derfor tvinges mange patienter til at leve med en større eller mindre grad af konstante smerter med alt, hvad det indebærer: Dårlig nattesøvn, depression, reduceret evne til at deltage i sociale aktiviteter og nedsat evne til at passe et almindeligt job – alt i alt en stærkt forringet livskvalitet.

Manglen på effektiv behandling af kroniske neuropatiske smerter belaster også samfundet, fordi smertepatienterne ikke er til rådighed for arbejdsmarkedet. Der er således mange gode grunde til at bedrive smerteforskning.

Cellulært puslespil

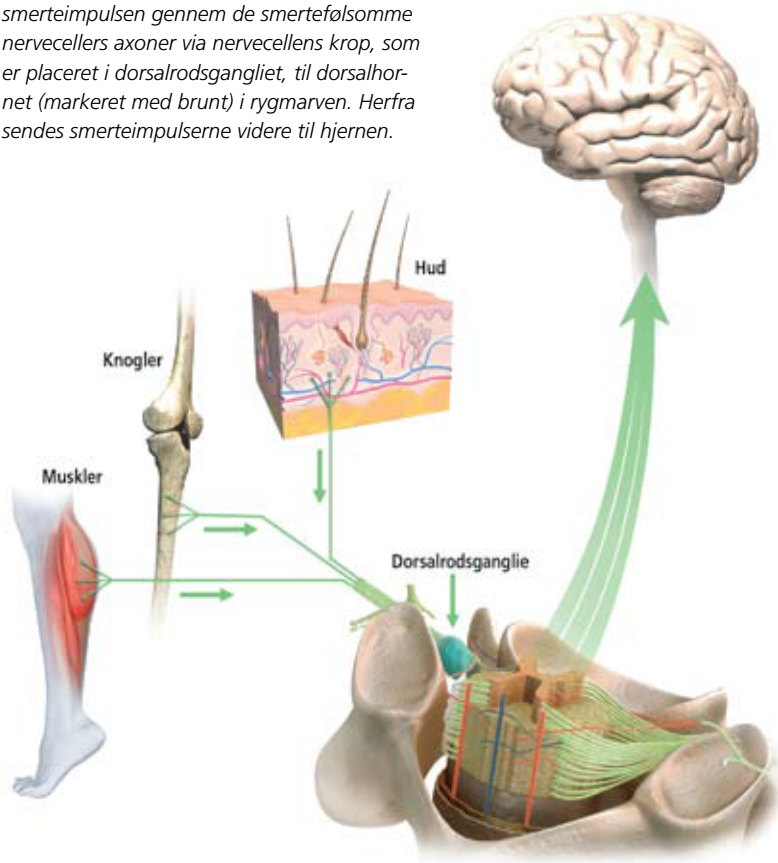
På trods af en stor forskningsindsats kender vi langt fra alle de cellulære mekanismer bag smerterens opståen og udvikling, og derfor er det svært at udvikle nye smertelindrende lægemidler.

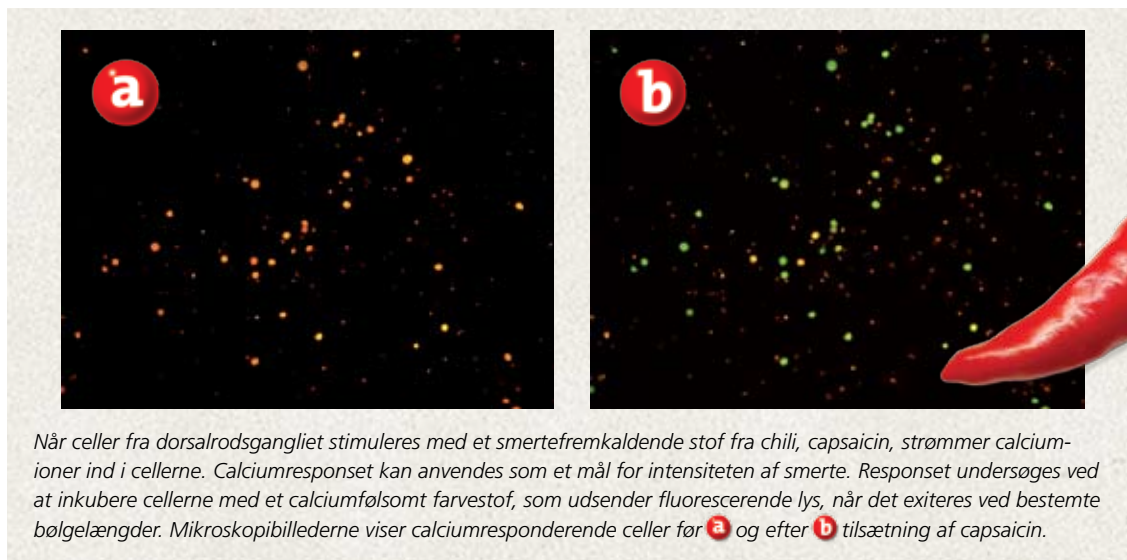
Forskningen i neuropatiske smerter er som at lægge et uhyre kompliceret puslespil med mange brikker af ukendt form og antal. Som én brik i dette store puslespil forsøger vi i de cellulære mekanismer, som finder sted i dorsalrodsgangliet ved rygmarven ved neuropatiske smerter. Når en patient har smerter i fx benet, løber smerteimpulsen gennem de smertefølsomme nervecellers axoner via nervecellens krop, som er placeret i dorsalrodsgangliet, til dorsalhornet i rygmarven. Dorsalhornet er en ophobning af mørkere nerveceller, som kan ses på et tværsnit af rygmarven. Fra dorsalhornet sendes smerteimpulserne videre til hjernen, hvorved smerten registreres.

Stærk chili

Et centralt problem ved smerteforskning er, at smerter ikke kan ses, og her kommer chili con carne ind i billedet. Alle, som har smagt chili con carne eller en anden ret tilberedt med chili, vil genkende dette krydderis effekt i form af varme, der kan give svedperlerne på panden og en brændende fornemmelse i munden.

Når en patient har smerter i fx benet, løber smerteimpulsen gennem de smertefølsomme nervecellers axoner via nervecellens krop, som er placeret i dorsalrodsgangliet, til dorsalhornet (markeret med brunt) i rygmarven. Herfra sendes smerteimpulserne videre til hjernen.





Når celler fra dorsalrodgangliet stimuleres med et smertefremkaldende stof fra chili, capsaicin, strømmer calciumioner ind i cellerne. Calciumresponset kan anvendes som et mål for intensiteten af smerte. Responset undersøges ved at inkubere cellerne med et calciumfølsomt farvestof, som udsender fluorescerende lys, når det exciteres ved bestemte bølgelængder. Mikroskopibillederne viser calciumresponderende celler før **a** og efter **b** tilsætning af capsaicin.

Et af de aktive stoffer i chili hedder capsaicin, og hvis man tilsætter capsaicin i ren form til en portion chili con carne, vil den lækre ret ændre sig fra at være lifligt kryddret til at fremkalde intense smerter. Vi opfatter altså effekten af capsaicin som meget varm og ved tilstrækkeligt høje koncentrationer som meget smertefuld. Det er fordi, effekten af capsaicin formidles via samme receptor som ved forbrænding. Smerte signaleres gennem nervesystemet via elektriske impulser, og en central parameter for udbredelsen af elektriske impulser til hjernen er cellernes calciumkoncentration. Når vi stimulerer celler med capsaicin, fremkaldes et calciumrespons, hvor calciumioner strømmer ind i cellerne, som derefter regulerer calciumniveauet tilbage til hvilekoncentrationen.

Calciumresponset kan undersøges i cellekulturer ved at inkubere cellerne med et calciumfølsomt farvestof, som kan trænge ind i cellerne, og som udsender et fluorescerende lys, når stoffet exciteres med lys ved bestemte bølgelængder. Vi kan så celler fra dorsalrodganglier ud på et dækglas, inkubere dem med vores calciumfølsomme farvestof og derefter stimulere dem med capsaicin.

Effekten af capsaicin kan følges under et mikroskop, fordi celler, som reagerer på det smertefremkaldende stof, lyser op på grund af calciumindstrømningen. Vi kan således direkte registrere intensiteten af en smertefuld stimulering ved at iagttage effekten af forskellige koncentrationer af capsaicin på cellernes calciumkoncentration. På den baggrund kan vi udarbejde en dosis-respons kurve.

Smerternes udbredelse

Dorsalrodganglierne indeholder foruden neuronerne også en række andre celletyper såsom stjerneformede astrocytter, mikroglia-celler og schwanske celler, hvoraf de sidstnævnte er involveret i dannelsen af de myelinsker, som omslutter de hurtigst ledende nerveceller.

For nærmere at kunne undersøge udbredelsen af smerter er vi interesseret i at fastslå, hvilke celletyper i dorsalrodgangliet som reagerer på stimuleringen med capsaicin. Til dette formål benytter vi os af antistoffer.

Antistoffer dannes ved, at en specifik del af det protein som antistofferne skal binde sig til, sprøjtes ind i eksempelvis en kanin. Kaninens immunforsvar vil opfatte proteinfragmentet som fremmed på linie med protein fra forkølelsesvirus og danne antistoffer imod det. Antistofferne kan derpå opnå fra kaninens blod og anvendes i forskningen.

Receptorerne for capsaicin – varmereceptorerne – er blevet identificeret, og der er blevet produceret antistoffer imod dem. Til forsøgene anvender vi antistoffer, som er koblet til

et fluorescerende molekyle, og som enten specifikt binder sig til capsaicinreceptorerne, eller genkender proteiner, som kun udtrykkes i eksempelvis neuroner. Med disse antistoffer kan vi mærke celler isoleret fra dorsalrodganglierne, observere dem under mikroskop og identificere de typer af celler, som reagerer på capsaicin.

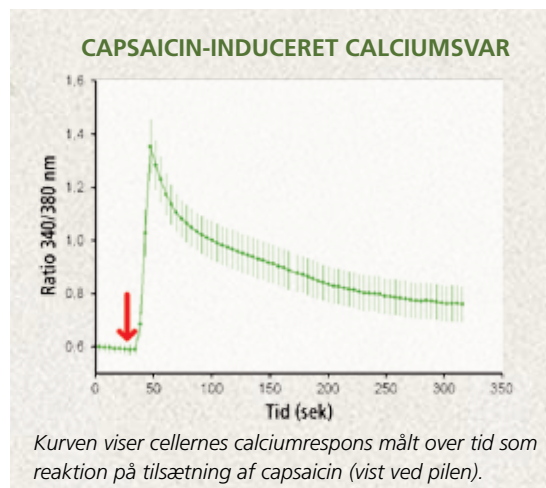
Når vi kombinerer brugen af det calciumfølsomme farvestof med fluorescerende antistoffer, kan vi både måle intensiteten af smerten og detektere de enkelte celler, som er involveret i udbredelsen af den.

Dyremodeller

Da en lang række smertemediatorer inducerer et calciumrespons på linie med capsaicin, kan vi anvende de beskrevne metoder til at undersøge smerter forårsaget af andet end capsaicin.

Forskningen i neuropatiske smerter er i høj grad baseret på dyremodeller, primært rotter og mus, hvori neuropatiske smerter induceres ved operation eller ved farmakologisk behandling af dyret. Ligeledes undersøger vi, om genmodificerede dyr, hvori et specifikt protein er fjernet, har en ændret smerteoplevelse end tilsvarende almindelige dyr. De smerter, som dyrene oplever, bliver undersøgt ved observation af deres adfærd og via en række tests, som kan belyse deres følsomhed over for forskellige fysiske stimuli.

Ved at anvende fluorescensbaserede metoder i kombination med dyremodeller vil vi være i stand til at føje flere brikker til smerteforskningens komplicerede puslespil. I sidste ende vil forskningen føre til fremstilling af nye lægemidler og udvikling af bedre behandlingstilbud til patienter med kroniske neuropatiske smerter.



Ph.d. Christian Kamp Nielsen er postdoc ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ph.d. Majid Sheykhzade er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ph.d. Anne-Marie Heegaard er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Dr.med. Ole Jannik Bjerrum er professor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Hjerneødem ved leversvigt

- nyt lys på sygdomsmekanismen

Væskeophobning i hjernen - hjerneødem - er en hyppig dødsårsag ved akut leversvigt. Forhøjede niveauer af ammoniak i blodkredsløbet og tilstedende infektioner synes at være afgørende for sygdomsprocessen. Vi har undersøgt den kombinerede effekt af disse to faktorer i dyreforsøg.

Af Hans Rudolf Pedersen, Fin Stolze Larsen og Helmer Ring-Larsen

Leveren opretholder kroppens stofskifte gennem produktion af livsvigtige molekyler samt via omdannelse og nedbrydning af affaldsstoffer, som derpå udskilles via nyrerne eller galden. Dette er baggrunden for, at akut leversvigt fører til udvikling af hjerneødem og leverkoma, hvilket i svære tilfælde kan medføre døden.

I Danmark behandles patienter med akut leversvigt på Rigshospitalets Hepatologiske Intensive Klinik. Behandlingen er igennem de seneste år blevet intensiveret med levererstatningsbehandling eller levertransplantation. Imidlertid hindres nye epokegørende behandlingstiltag af, at vi mangler viden om de patofysiologiske mekanismer, der fører til udvikling af hjerneødem.

To faktorer synes imidlertid at være af afgørende betydning for udviklingen af hjerneødem og forhøjet intrakranielt

tryk ved akut leversvigt. For det første sker der en ændring i osmolariteten af hjernens støtteceller, hvilket fører til en ophobning af vand i astrocytterne. For det andet udvides hjernens blodkar, og gennemblødningshastigheden i hjernen stiger.

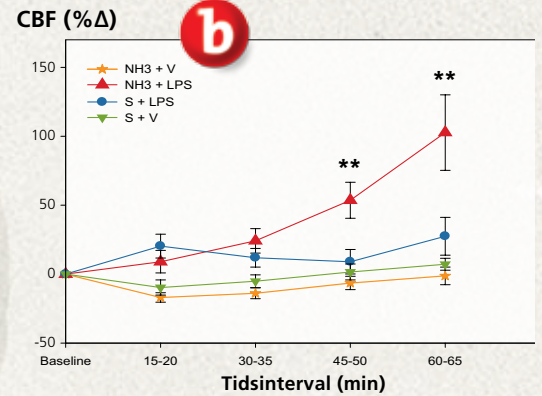
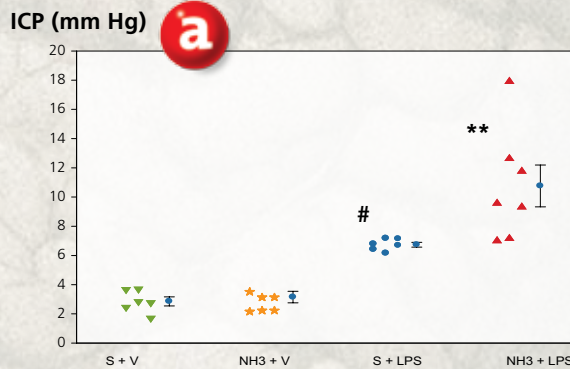
Når leveren svigter

En normalt fungerende lever sørger for, at ammoniak, som er et nedbrydningsprodukt fra kroppens stofskifte, omdannes til urinstof og udskilles gennem nyrerne. Når leveren svigter, nedsættes denne funktion kraftigt, og det fører til hyperammonæmi. Talrige eksperimentelle studier har vist, at hyperammonæmi som følge af leversvigt er en central del af sygdomsprocessen bag hjerneødem, og kliniske studier har vist, at forhøjede koncentrationer af ammoniak i arterierne korrelerer med graden af svigtende bevidsthed og leverkoma.

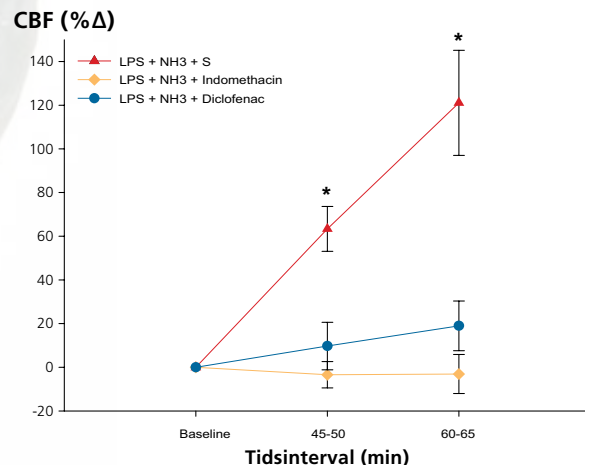
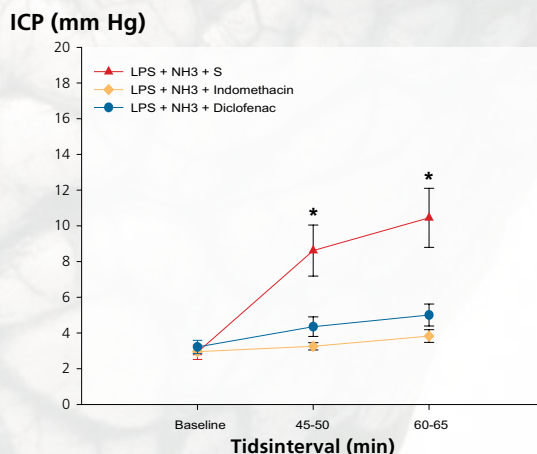
I centralnervesystemet varetager enzymet glutaminsyntetase metaboliseringen af ammonium via omdannelse af glutamat til glutamin. Processen finder sted i astrocytter, og netop en for kraftig ophobning af glutamin i astrocytterne menes at være af afgørende betydning for udvikling af hjerneødem. Det skyldes glutamins osmotiske effekt, som medfører, at vand suges ind i astrocytterne.

Patienter med akut leversvigt har nedsat immunforsvar og

a Figuren viser det intrakranielle tryk 60 minutter efter infusion af ammoniak (NH3) og lipopolysaccharid (LPS) i rotter (6-7 dyr i hver gruppe). # $P < 0.01$ vs. saltvand (S)+vehicle (V) og NH3+V; ** $P < 0.01$ vs. S+V, NH3+V og S+LPS. **b** Her vises ændringen i hjerne-gennemblødningshastighed CBF (% Δ) i forskellige tidsintervaller. ** $P < 0.01$ vs. S+V, NH3+V og S+LPS.



Graferne viser effekten af indomethacin og diclofenac på udviklingen i forhøjet intrakranielt tryk (ICP) og ændring i hjerne-gennemblødningshastighed CBF (% Δ) i rotter, der har modtaget lipopolysaccharid (LPS) og ammoniak (NH3). * $P < 0.05$ vs. LPS + NH3 + Indomethacin og LPS + NH3 + Diclofenac



udvikler ofte livstruende infektioner, hvilket forringer chancen for overlevelse betydeligt. Den medfølgende systemiske inflammation har en vis effekt på udviklingen af hjerneødem og forhøjet intrakranielt tryk. Årsagen er formentlig, at infektioner kan modulere hjernens blodkar.

Hul gennem blod-hjernebarrieren

I modsætning til de endothelceller, der danner karvæggen i det systemiske kredsløb, er hjernens endothelceller nærmest limet sammen. Limen består af membranproteiner, som binder sig til hinanden, hvorved afstanden imellem endothelcellerne minimeres. Disse tætte forbindelser danner blod-hjernebarrieren, som beskytter hjernen mod toksiner fra blodkredsløbet.

Blod-hjernebarrierens endothelceller er udstyret med receptorer, som aktiveres af signalmolekyler, cytokiner, som frigives af et aktiveret immunsystem. Når cytokinerne binder sig til receptorerne, sker der en opregulering af signalstoffer inde i endothelcellerne. Det påvirker funktionen af de tætte forbindelser mellem cellerne, hvorved blod-hjernebarrieren bliver utæt.

Den kliniske tilstand er kendetegnet ved høje koncentrationer af toksiner i blodet samt af cytokiner, der kan ændre funktionen af blod-hjernebarrieren og påvirke hjernefunktionen. Ændringerne i blod-hjernebarrieren menes således at være en del i udviklingen af hjerneødem og leverkoma ved akut leversvigt.

Hjernens modstandskar, de små arterier, er forsynet med glatte muskelceller, som er placeret uden på endothelcellerne. Muskelcellernes funktion er at kontrollere hjernens gennemblødningshastighed. Når de glatte muskelceller trækkes sammen, formindskes volumen i de små arterier, og en mindre mængde blod kan løbe igennem pr. tidsenhed. De glatte muskler påvirkes af inflammatoriske signalstoffer, så de er mindre tilbøjelige til at trække sig sammen.

Hyperammonæmi og inflammation

Vi har undersøgt den isolerede effekt af hyperammonæmi og systemisk inflammation på udviklingen af forhøjet intrakranielt tryk og forøget gennemblødningshastighed i en dyremodel. Til forsøgene brugte vi rotter, som blev inddelt i grupper med seks dyr i hver gruppe.

Under fuld bedøvelse blev der lagt katetre i vener og arterier i lysken for at måle blodtryk og injicere stoffer intravenøst. Et termometer tilsluttet en termostat blev placeret i bughulen, så rotternes temperatur kunne holdes konstant ved hjælp af en varmepude. Hyperammonæmi blev opnået ved at give rotterne en kontinuerlig infusion af en opløsning af ammoniumacetat. Systemisk inflammation blev induceret ved at give rotterne et stof fra Gram-negative bakteriers cellevæg. Dette lipopolysaccharid er en af de mest potente stimulatorer af immunsystemet.

For at monitorere det intrakranielle tryk blev der via et lille borehul i kraniet lagt et kateter ned i cisterne magna, som er et af hjernens væskefyldte hulrum. Herved kunne trykket i cerebrospinalvæsken måles og overtryk i hjernen påvises. Ændring i hjernens gennemblødningshastighed blev målt ved hjælp af laser-Doppler flowmetry. Ved denne teknik registreres ændringer i gennemstrømningen af røde blodlegemer. Selve målingen blev foretaget i hjernebarken, hvor målesonden blev placeret, igen via et lille borehul i kraniet. Før indgiften af ammonium og lipopolysaccharid målte vi basisværdier for det intrakranielle tryk og hjernegennemblødningshastigheden samt blodværdier for de centrale



Forsøgsopstillingen på Afdeling for Eksperimentel Medicin på Rigshospitalet



Cand.pharm. Hans Rudolf Pedersen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Dr.med. Helmer Ring-Larsen er professor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Dr.med. Fin Stolze Larsen er overlæge ved Hepatologisk Klinik Rigshospitalet

blodgasser CO₂, O₂ og H⁺. Når disse værdier var stabile, blev forsøget startet ved først at injicere en høj enkelt dosis af lipopolysaccharid (2 mg/kg). Derpå blev den kontinuerlige infusion af ammoniumacetat sat i gang. Målingerne blev foretaget over en periode på 70 minutter, hvorefter forsøget blev stoppet og de sidste blodprøver taget. Efter aflivning af rotterne blev hjernerne nedfrosset i flydende kvælstof og gemt til videre analyse af hjernemetabolitter.

Bedre behandling af inflammation

Forsøgene viste, at infusion med ammonium i sig selv ikke ændrer det intrakranielle tryk eller gennemblødningshastigheden i hjernen. Derimod kan lipopolysaccharid alene inducere en mindre stigning i begge parametre. Kombinerer man ammonium med lipopolysaccharid medfører det en betydelig stigning i det intrakranielle tryk samt i hjernegennemblødningshastigheden.

For at undersøge mekanismen bag denne effekt fik nogle af forsøgsdyrgrupperne anti-inflammatoriske stoffer, som hæmmer specifikke enzymer i den inflammatoriske proces. Vi fokuserede især på enzymet cyclooxygenase (COX), der varetager dannelse af prostaglandiner, som både kan modulere blod-hjernebarrieren og gennemblødningshastigheden i hjernen.

Målinger på blod, som blev udtaget fra dyrene ved forsøgets afslutning, viste høje koncentrationer af prostaglandiner i de grupper, der havde modtaget lipopolysaccharid. For at hæmme COX-enzymene benyttede vi to anti-inflammatoriske stoffer, indomethacin og diclofenac. Begge stoffer modvirkede dannelse af prostaglandiner i blodet, og de reducerede samtidig stigningen i det intrakranielle tryk og gennemblødningshastigheden i de dyr, som både fik ammoniak og lipopolysaccharid.

Vore forsøg viser, at kombinationen af hyperammonæmi og systemisk inflammation har en synergistisk virkning på udviklingen af forhøjet intrakranielt tryk og forøget hjernegennemblødningshastighed i rotter. Eksperimenterne peger på, at prostaglandiner er direkte involveret i patofysiologien ved hjerneødem som følge af akut leversvigt, fordi hæmning af COX-enzymene med indomethacin og diclofenac modvirkede denne effekt.

Indomethacin er blevet brugt på forsøgsbasis til behandling af forhøjet intrakranielt tryk hos patienter med akut leversvigt. Indomethacin har dog uhensigtsmæssige bivirkninger, bl.a. nedsat nyrefunktion, hvilket ofte gør det vanskeligt at benytte stoffet. En nærmere kortlægning af, hvilke under typer af COX-enzymet, der er involveret, kan eventuelt åbne op for nye behandlingsstrategier, hvor man anvender mere specifikke COX-hæmmere.

En genetisk variation i en serotonin-receptor

– et muligt link til depression?



En naturligt forekommende variant af en receptor for signalstoffet serotonin beskytter muligvis mod alvorlige depressioner. Ny viden om funktionen af den almindelige receptortype og varianten kan hjælpe med til udvikling af nye antidepressive lægemidler.

Af Karen Krzykowski, Paul A. Davies, Paula L. Feinberg-Zadek, Anders A. Jensen og Hans Bräuner-Osborne

Neurotransmitteren serotonin er af stor betydning for en lang række fysiologiske funktioner i såvel centralnervesystemet som i det perifere nervesystem; fx søvn, stemningsleje, hukommelse og libido. Serotonin medierer sine effekter igennem mange forskellige receptorer, heriblandt den såkaldte 5-HT_{3AB}-receptor. De fysiologiske funktioner, som receptoren varetager, kendes endnu kun delvist. Receptoren vides at være involveret i udviklingen af kvalme i forbindelse med kemoterapi og strålebehandling af kræft, og den spiller muligvis også en rolle i psykiatriske lidelser som angst og depression.

5-HT_{3AB}-receptoren er en ionkanal, som er placeret i nervecellers cellemembran, og den er opbygget som et proteinkompleks bestående af fem byggeklodser, de såkaldte 5-HT_{3A}- og 5-HT_{3B}-underenheder. Receptoren aktiveres ved binding af serotonin. Herved sker der en ændring i receptorens struktur, så der åbnes en kanal centralt i komplekset, der tillader passage af små, positivt ladede ioner ind i cellen.

Indstrømningen af ioner ændrer potentiale-forskellen hen over cellemembranen, hvilket sender signalet fra serotonin ind i cellen, hvor en række processer sættes i gang. Et karakteristisk forhold ved signaleringen er, at responset igennem receptoren ophører igen efter et stykke tid. Processen kaldes inaktivering og skyldes, at ionkanalen i 5-HT_{3AB}-receptoren automatisk lukker igen.

Blot en aminosyre til forskel

Der er identificeret en række naturligt forekommende genetiske variationer i de to underenheder, 5-HT_{3A} og 5-HT_{3B}, som danner den humane 5-HT_{3AB}-receptor. Især én variation er interessant, og den forekommer i underenheden 5-HT_{3B}, hvor aminosyren tyrosin (Y) i position 129 er erstattet af aminosyren serin (S). Varianten, som kaldes 5-HT_{3B}(Y129S), er blevet detekteret i høje frekvenser i flere befolkningspopulationer med forskellig etnisk herkomst.

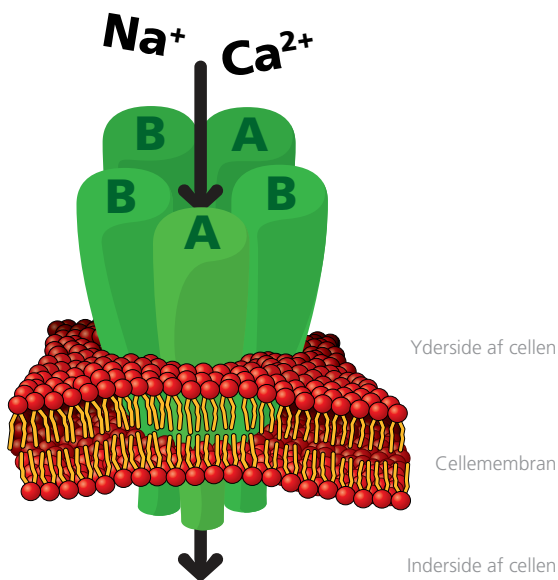
Mennesket har to kopier af hvert gen, og de individer, der bærer to forskellige kopier af et givent gen, betegnes som heterozygote, mens individer med to ens kopier kaldes homozygote. I fem undersøgte befolkningsgrupper varierer antallet af homozygote individer med 5-HT_{3B}(Y129S)-mutationen i genet med mellem 2 og 23 procent, mens antallet af heterozygoter udgør 30-47 procent. Da så mange mennesker bærer mindst én kopi af genet for 5-HT_{3B}(Y129S), er det meget interessant at undersøge mulige forskelle i signaleringen via 5-HT_{3AB}-receptoren set i forhold til den almindelige udgave af receptoren. En forskel i signaleringen via receptoren kan forklare en eventuel disponering for udvikling af sygdomme hos bærere af en af kopierne af genet, og forskellen vil samtidig give inspiration til en målrettet udvikling af lægemidler.

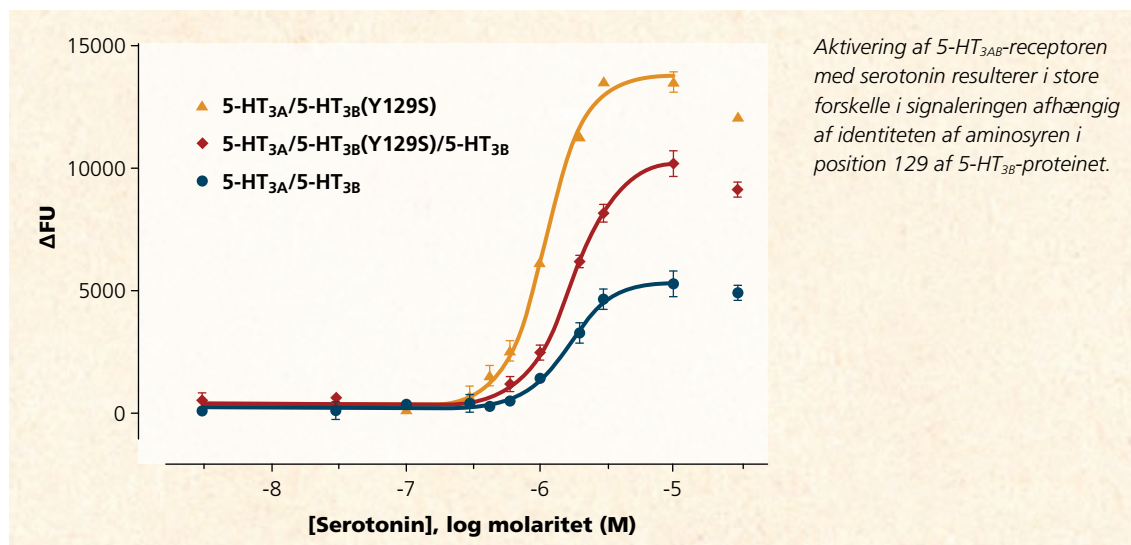
Sammenhængen mellem depression og serotonin har længe været kendt, men 5-HT_{3AB}-receptorens rolle i depression er endnu ikke veldokumenteret. Det er derfor meget spændende, at det for nyligt er rapporteret, at tilstedeværelsen af variationen 5-HT_{3B}(Y129S) i japanske kvinder lader til beskytte disse bærere mod udvikling af alvorlig depression. Såvel Y129S-homozygote kvinder som Y129S-heterozygote kvinder udviste en mindre tendens til at udvikle depression end kvinder, der besad to almindelige kopier af genet for underenhed 5-HT_{3B} med tyrosin i position 129.

Effekt på molekylært plan

For at undersøge den molekylære årsag til denne forskel studerede vi signaleringen gennem den almindelige udgave af receptoren og varianten udtrykt i cellelinier. I en laboratorietest, som måler ændringen i cellernes membranpotentiale

Skematisk opbygning af 5-HT_{3AB}-receptoren, som findes i nervecellers cellemembran. Fem underenheder af typerne 5-HT_{3A} og 5-HT_{3B} går sammen og danner receptorkomplekset, som er centreret omkring en ionkanal. Ved binding af signalstoffet serotonin aktiveres receptoren, hvorved kanalen åbnes og tillader gennemstrømning af ioner ind i cellen.





Cand. polyt. Karen Krzywkowski er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Anders A. Jensen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

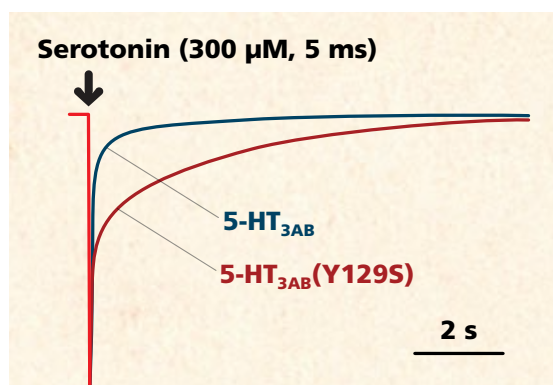


Dr. pharm. Hans Bräuner-Osborne er professor ved Institut for Medicinalkemi.

ved tilsætning af serotonin, observerede vi, at homozygote 5-HT_{3AB}(Y129S)-receptorer signalerede meget kraftigere ved tilsætningen af serotonin end de almindelige 5-HT_{3AB}-receptorer. Desuden undersøgte vi responset fra receptorer, der repræsenterer 5-HT_{3AB}-receptorerne i heterozygote individer, og som derfor indeholdt en blanding af 5-HT_{3B} og 5-HT_{3B}(Y129S). Her så vi et respons, som lå midt imellem responset fra de homozygote 5-HT_{3AB}(Y129S)-receptorer og de almindelige 5-HT_{3AB}-receptorer.

Vi studerede dernæst ionstrømmene gennem receptorerne i en sofistikeret elektrofysiologisk forsøgsopstilling. Her observerede vi, at den øgede signalering gennem 5-HT_{3AB}(Y129S)-receptorerne skyldes en langsommere inaktivering af receptoren sammenlignet med almindelige 5-HT_{3AB}-receptorer.

Vores resultater kan potentielt forklare, hvordan variationen 5-HT_{3B}(Y129S) kan virke beskyttende mod udvikling af depression via en længerevarende indstrømning af ioner gennem den aktiverede receptor. Hvis yderligere forsøg bekræfter, at denne øgede indstrømning er gavnlige, kan udvikling af antidepressiv medicin rettes mod at finde stoffer, der sænker inaktiveringshastigheden af 5-HT_{3AB}-receptoren.



Inaktivering af 5-HT_{3AB}-receptoren foregår meget langsomme i den variant af receptoren, der indeholder aminosyren serin (S) i position 129 sammenlignet med den almindelige 5-HT_{3AB}-receptor, hvor aminosyren tyrosin (Y) findes i denne position. Den langsomme inaktivering af varianten har muligvis en beskyttende virkning mod udvikling af depression.

VARIATIONER I DET MENNESKELIGE GENOM

Som så mange andre proteiner og proteinkomplekser findes 5-HT_{3A}- og 5-HT_{3B}-underenhederne, der sammen danner 5-HT_{3AB}-receptoren, i flere varianter, som er opstået via genetiske mutationer i befolkningen. Sekventeringen af menneskets genom har nemlig afsløret en stor forekomst af naturligt forekommende variationer i arvemassen.

Nogle af de genetiske variationer resulterer i ændringer i aminosyresammensætningen i de proteiner, som generne koder for, og flere af disse ændringer har vist sig at have dramatiske konsekvenser for funktionen af de pågældende proteiner. Spontant opståede variationer i arvemassen kan derfor have stor betydning for sygdomsudvikling og ligeledes for medicinsk behandling af sygdomme. Ændringer i proteinerne kan fx influere på lægemidlers effekt og deres bivirkninger.

Udskiftning af enkelte nukleotider

Den hyppigst forekommende genetiske variation omfatter udskiftning af et enkelt nukleotid i DNA-sekvensen, hvilket kaldes for en SNP. Det står for Single Nucleotide Polymorphism, og forkortelsen udtales som "snip". Den genetiske kode består af de fire nukleotider A (adenin), C (cytosin), T (thymin) og G (guanin). En SNP kan fx være en ændring i sekvensen ATCGGA til ATTGGA, altså en udskiftning af et C til et T. I gennemsnit findes der i den menneskelige arvemasse en SNP for hver 100 til 300 nukleotider. Nogle af disse SNP'er vil være meget sjældne og kun forekomme i meget få individer, mens andre forekommer i op mod halvdelen af den menneskelige befolkning. Ret beset gælder SNP-betegnelsen kun for variationer, der findes i mere end 1 procent af befolkningen, mens de mere lavfrekvente mutationer omtales som sjældne genetiske varianter.

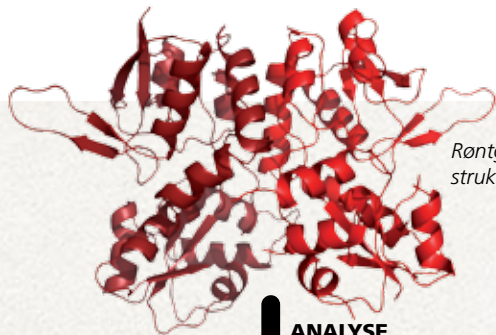
Kun en lille del – mellem 3 og 5 procent – af et menneskes arvemasse koder for proteiner, og de fleste SNP'er findes derfor uden for de kodende sekvenser. Forskerne er særligt opmærksomme på de SNP'er, der ligger nær ved eller inden for de kodende sekvenser, fordi de forventes at have den største biologiske effekt; eksempelvis ved at påvirke udtryksniveauet af et protein eller ved at ændre proteinets funktion.

Paul A. Davies er assistant professor ved Harvard Medical School, Boston, USA.

Paula L. Feinberg-Zadek er postdoc ved Harvard Medical School, Boston, USA.

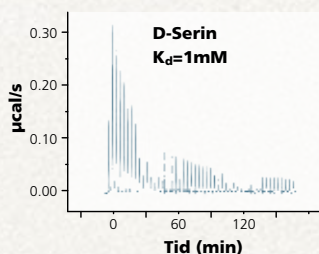
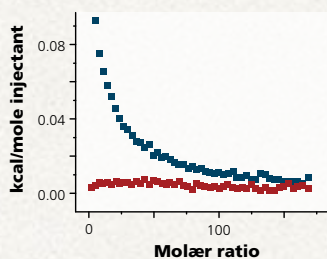


Jagten på et signalstof til hjernens delta2-receptor



Røntgenkrystallografi-
struktur uden stof bundet

ANALYSE



Isotermisk
titrerings-
kalorimetri.
Binding
af D-serin



Røntgenkrystallografi-struktur med D-serin

MUTATIONS-
STUDIER

FARMAKOLOGI/
ELEKTROFYSIOLOGI

ISOTERMISK
TITRERINGS-
KALORIMETRI

RØNTGEN-
KRISTALLOGRAFI

VEJEN TIL OPKLARING AF RECEPTORENS SIGNALSTOF OG FUNKTION

Røntgenkrystallografi er en vigtig metode til at bestemme den tredimensionelle struktur af molekyler – store som små. Først dyrkede vi en krystal af delta2-receptoren, og derefter belyste vi proteinkrystallen med intens røntgenstråling. Elektronskyerne omkring atomerne i proteinmolekylet spredte røntgenstrålen, hvorved der dannes et spredningsmønster. Ud fra mønstret er det muligt at beregne, hvilke atomer proteinet består af, og hvordan samtlige atomer er placeret i forhold til hinanden. På den måde opklarede vi den tredimensionelle struktur af delta 2-receptoren.

Ved hjælp af isotermisk titreringskalorimetri viste vi nu, at D-serin binder til delta2-receptoren. Så brugte vi igen røntgenkrystallografi til at bestemme strukturen af delta2 med bundet signalstof.

Hermed er vejen åbnet for en lang række af eksperimenter med henblik på yderligere at karakterisere receptoren. Fx vil vi prøve på at identificere andre stoffer, som binder til receptoren ved hjælp af isotermisk titreringskalorimetri og elektrofysiologiske metoder. Man kan derefter forsøge at krystallisere receptoren med disse stoffer for at karakterisere bindingen på atomart niveau. En øget forståelse af delta2-receptorens betydning og funktion kan også opnås ved at udføre mutationsstudier, hvorved én aminosyre i delta2-receptoren udbyttes med en anden aminosyre.

Delta2-receptoren har stor betydning for hjernens udvikling, og mus, som mangler receptoren, udvikler sig unormalt. Men det har længe været et mysterium, hvilket signalstof der binder til receptoren. Det besluttede vi os for at gøre noget ved!

Af Peter Naur, Lars Olsen, Michael Gajhede og Jette Sandholm Kastrup

Kommunikation mellem nervecellerne i menneskets hjerne er en kompleks sag, som involverer en lang række receptorer og signalstoffer. I dag er langt fra alle komponenterne kendte. Et centralt mål med forskningen i den Biostrukturelle Forskningsgruppe på FARMA er at samle nogle af brikkerne i dette komplicerede puslespil.

En af de receptorer, som man ved har stor betydning for hjernens udvikling, er den såkaldte delta2-receptor. Forskellige studier har vist, at mus, der mangler receptoren, ikke udvikler sig normalt, og de har bl.a. problemer med at koordinere deres bevægelser. Det har længe været et mysterium, hvilket signalstof der binder til receptoren, og derfor har det endnu ikke været muligt at studere receptoren i detaljer. Derfor gik vi på jagt efter delta2-receptorens signalstof.

Første mål – hvordan ser receptoren ud?

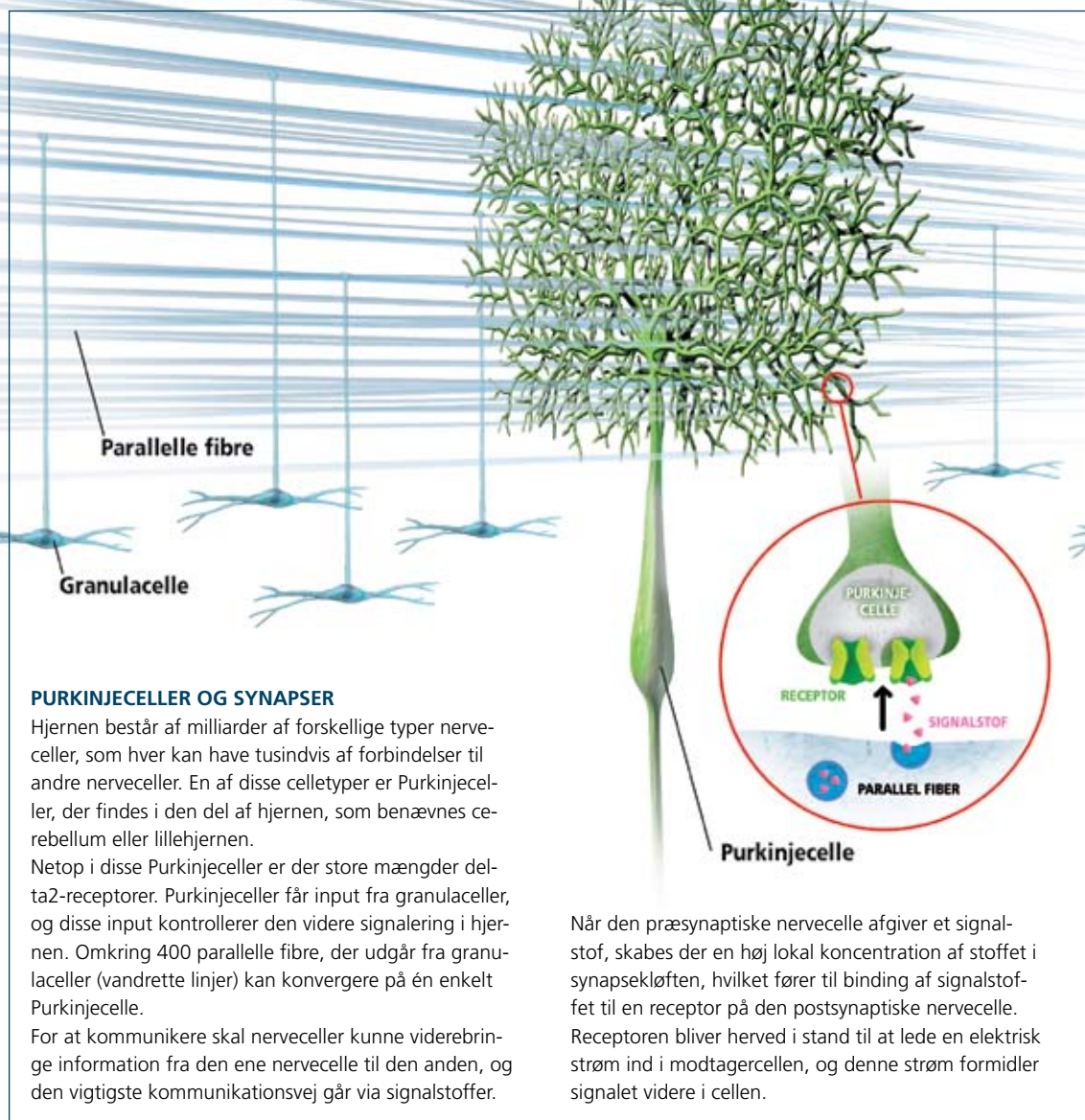
Receptorer er proteiner, og i gruppen arbejder vi med at bestemme proteiners tredimensionelle strukturer på atomart niveau ved hjælp af en teknik, der kaldes røntgenkrystallografi. Med denne metode kan man se, hvordan de enkelte atomer i et proteinmolekyle er placeret i forhold til hinanden. Ved at anvende røntgenkrystallografi på delta2-receptoren fik vi et billede af, hvordan receptoren ser ud, når der ikke er noget signalstof bundet.

Binding af et signalstof til en receptor kan sammenlignes med at stikke en nøgle i en lås. Receptoren er låsen, og signalstoffet er nøglen, der kan åbne receptoren og aktivere den. Ved at opklare den tredimensionelle struktur af delta2-receptoren havde vi altså fundet ud af, hvordan låsen ser ud. Nu manglede vi bare at finde ud af hvilken nøgle, der passede i nøglehullet.

Andet mål – hvilket stof binder til delta2?

Vi havde allerede en ide om, hvor vi skulle begynde at kigge. Delta2-receptoren minder om en klasse af receptorer i hjernen, der binder aminosyren glutaminsyre. På grund af ligheden mellem receptorerne var der grund til at formode, at delta2-receptorens signalstof også ville være en aminosyre. En nærmere undersøgelse af den rumlige struktur af delta2-receptoren gav ikke noget entydigt svar, men vi fik nogle ideer til, hvilket signalstof der kunne være tale om. Ikke mindst kunne strukturen bruges til at udelukke en række stoffer.

Tilbage var en relativ kort liste af aminosyrer, som vi testede for binding til delta2-receptoren ved hjælp af en metode, der kaldes isotermisk titreringskalorimetri. Med denne tek-



PURKINJECELLER OG SYNAPSER

Hjernen består af milliarder af forskellige typer nerveceller, som hver kan have tusindvis af forbindelser til andre nerveceller. En af disse celletyper er Purkinjeceller, der findes i den del af hjernen, som benævnes cerebellum eller lillehjernen.

Netop i disse Purkinjeceller er der store mængder delta2-receptorer. Purkinjeceller får input fra granulaceller, og disse input kontrollerer den videre signalering i hjernen. Omkring 400 parallelle fibre, der udgår fra granulaceller (vandrette linjer) kan konvergere på én enkelt Purkinjecelle.

For at kommunikere skal nerveceller kunne viderebringe information fra den ene nervecelle til den anden, og den vigtigste kommunikationsvej går via signalstoffer.

Når den præsynaptiske nervecelle afgiver et signalstof, skabes der en høj lokal koncentration af stoffet i synapsekløften, hvilket fører til binding af signalstoffet til en receptor på den postsynaptiske nervecelle. Receptoren bliver herved i stand til at lede en elektrisk strøm ind i modtagercellen, og denne strøm formidler signalet videre i cellen.

nik måler man den meget lille varme, der udvikles eller forbruges, når et stof binder til et protein. På den måde fandt vi ud af, at et af de stoffer, som vi mistænkte for at kunne binde til delta2-receptoren, rent faktisk bandt til receptoren. Der var tale om aminosyren D-serin. Derudover så vi, at andre stoffer, fx aminosyren glycin, kunne binde til receptoren dog med lavere affinitet end D-serin.

For at undersøge på atomart niveau, hvordan D-serin binder til delta2-receptoren, bestemte vi strukturen af receptoren sammen med dette stof. Strukturen viste, at D-serin binder i en lomme i receptoren, og at lommen er perfekt formet til D-serin.

En stor oplevelse!

Oplevelsen mindede om det øjeblik, hvor man i et puslespil får to brikker til at passe sammen og som dernæst får en masse andre brikker til at falde på plads. D-serin er nemlig et kendt signalstof i hjernen, og man har allerede kendskab til andre receptorer i hjernen, der binder D-serin. Her havde vi altså pludselig fået parret en kendt receptor, som man ved er vigtig for hjernens udvikling, med et kendt – og vigtigt – signalstof. For eksempel har D-serin været i klinisk afprøvning som lægemiddel mod skizofreni. Samtidig

viser det sig, at der er et bemærkelsesværdigt sammenfald mellem, hvor receptoren og signalstoffet findes i hjernen. Sammenfaldet er en kraftig indikation på, at binding af D-serin til delta2-receptoren ikke kun er noget, der kan forekomme i et reagensglas, men også er relevant i den levende hjerne.

Nu kunne man jo indvende, at bare fordi D-serin binder til delta2-receptoren, betyder det det jo ikke nødvendigvis, at receptoren kan aktiveres af dette signalstof. Derfor allierede vi os med elektrofysiologer fra Institut for Farmakologi og Farmakoterapi, Lundbeck A/S og Emory University School of Medicine i USA. Med elektrofysiologi undersøger man, hvor stor en strøm, der går gennem en receptor ved binding af et signalstof. Med disse samarbejdspartneres hjælp fik vi vist, at D-serin rent faktisk er i stand til at modulere delta2-receptorens aktivitet.

Selv om vi med opdagelsen af, at D-serin binder til delta2-receptoren, nu har fået lagt nogle ekstra brikker i hjernens komplekse puslespil, er der stadig mange udfordringer forude. Vores næste skridt vil være at finde nye kemiske stoffer, der kan binde til delta2-receptoren og herved give os en yderligere forståelse af den vigtige receptors funktion.



Ph.d. Peter Naur er postdoc. ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Lars Olsen er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



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



Erhvervsforsker Jette Sandholm Kastrup er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Selektive lægemiddelstoffer designet ud fra krystalstrukturer

AMPA-receptorer er potentielle angrebepunkter for lægemidler til behandling af neurologiske sygdomme som demens og epilepsi. Receptorerne findes i mange varianter, og blokerende forbindelser, som kun påvirker én bestemt receptorvariant, er vigtige for at afdække de forskellige undertypers funktioner under normale og sygdomsrelaterede tilstande, og den opnåede viden kan udnyttes til at designe selektive lægemiddelstoffer med et minimum af bivirkninger.

Af Ewa Szymanska og Tommy N. Johansen

Mange lægemidler virker ved at påvirke bestemte receptorer. Oftest findes der ikke blot én type af en human receptor, men derimod flere genetisk forskellige varianter, som kan have forskellige funktioner og være udtrykt i forskellige organer. Forsøg med modelstoffer, som kun påvirker én bestemt receptorvariant, er vigtige for at afdække de forskellige undertypers funktioner under normale og sygdomsrelaterede tilstande, og den opnåede viden kan udnyttes til at designe selektive lægemiddelstoffer med et minimum af bivirkninger. β_1 -receptorer er et velkendt eksempel på en receptortype med to varianter, som har vidt forskellige funktioner. β_1 -receptorerne findes især i hjertet og kontrollerer hjerteslaget, mens β_2 -receptorerne primært er udtrykt i lungerne og styrer passagen gennem luftvejene. Modelstoffer, som selektivt påvirker enten β_1 - eller β_2 -receptorerne, har været uhyre nyttige ved udviklingen af mange vigtige lægemidler. Et eksempel er β -blokkere, som selektivt blokerer β_1 -receptorer og bruges til behandling af forhøjet blodtryk og forstyrrelser i hjerterytmen, og et andet eksempel er lægemidler til behandling af astma, som selektivt stimulerer β_2 -receptorerne.

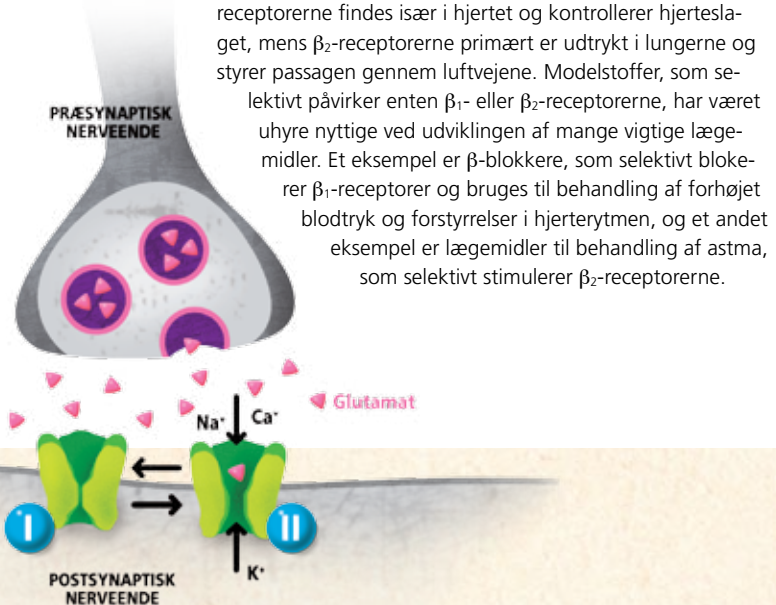
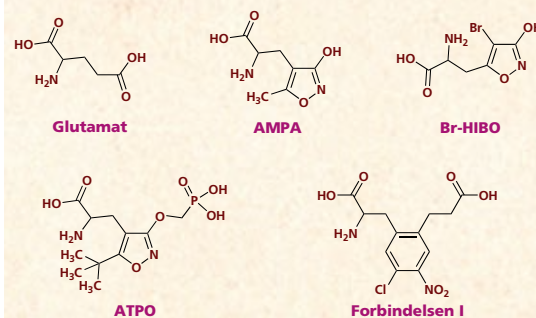


Illustration af signaltransmission mellem nerveceller med AMPA-receptorer. Uden bundet signalstof er receptoren i sin hviletilstand (I). Ved binding af signalstoffet glutamat ændres receptorens konformation, så en ionkanal åbnes (II), og herved overføres nerveimpulsen til modtagercellen. AMPA-receptorer er opbygget af 4 forskellige underenheder, GluR1 – GluR4, som alle er proteiner. Underenhederne kan sammensættes i forskellige kombinationer og på den måde danne de forskellige varianter af AMPA-receptorer. I receptorens bindingslomme er der meget stor lighed mellem de 4 underenheder. Alle aminosyreresterne i bindingslommen er identiske bortset fra Tyrosin-702. I GluR1 og GluR2 sidder der en tyrosinrest i position 702, mens en nærtbeslægtet aminosyrerest, phenylalanin, er placeret i den tilsvarende position i GluR3 og GluR4.



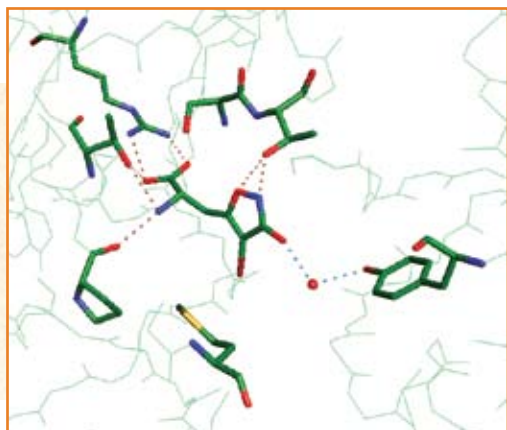
Øverst ses strukturerne af tre forbindelser, som stimulerer glutamatreceptorer med stigende selektivitet: Det naturlige signalstof glutamat påvirker alle glutamatreceptorer; AMPA påvirker kun AMPA-familien af receptorerne; Br-HIBO påvirker selektivt underenhederne GluR1 og GluR2 i AMPA-receptorerne. Nederst er vist to blokerende forbindelser. Til venstre ATPO, som har dannet grundlag for designet af mål-molekylet, forbindelsen I.

Selektive stimulerende forbindelser

På Institut for Medicinalkemi arbejder vi ikke med β -receptorer, men med glutamatreceptorer, som findes i centralnervesystemet, hvor de spiller en vigtig rolle for bl.a. indlæring og hukommelse.

Signalstoffet glutamat er en agonist, som har en stimulerende effekt på receptorerne, og det menes, at overaktivitet i glutamatsystemet har stor betydning i neurologiske sygdomme som Alzheimers syge og epilepsi. I hjernen findes der flere varianter af glutamatreceptorer. På Institut for Medicinalkemi har vi været pionerer i forhold til at designe og syntetisere forbindelser, som kun stimulerer nogle af disse receptorer.

Således stimulerer modelstoffet AMPA selektivt én gruppe af glutamatreceptorer, som derfor kaldes AMPA-receptorer. Receptorerne er ionkanaler, og de er opbygget af fire underenheder, GluR1 – GluR4, som er sammensat på forskellig vis i de forskellige varianter. AMPA bindes lige godt til underenhederne GluR1 – GluR4 og skelner således ikke mellem dem. Men det er der andre modelstoffer, som gør. Med udgangspunkt i AMPA har den neuromedicinalkemi-gruppe udviklet en beslægtet forbindelse, Br-HIBO, som bindes stærkt til GluR1 og GluR2 og mere end hundrede gange svagere til GluR3 og GluR4. En del af forklaringen på denne markante selektivitet kan hentes i strukturkemi-analyser, som viser, at Br-HIBO er i stand til at danne et stærkere brintbindingsnetværk, når forbindelsen bindes til GluR1 eller GluR2 sammenlignet med binding til GluR3 eller GluR4. Særlig vigtig i denne sammenhæng er vekselvirkningen med aminosyreresten Tyrosin-702, som er placeret dybt nede i bindingslommen. Der eksisterer således en del viden om, hvilke strukturelle forhold, der har betydning for stimu-



Illustrationen viser, hvordan den GluR1/2-stimulerende forbindelse Br-HIBO bindes til bindingslommen på GluR2. Farvekode på de involverede atomer: C: grøn; N: blå; O: rød; S: gul; Br: brun. Brintatomerne er ikke vist. Direkte vekselvirkninger mellem Br-HIBO og receptorproteinet er fremhævet med røde stiplede linier, mens brintbindinger mellem Br-HIBO, et vandmolekyle og aminosyreresten Tyrosin-702 er fremhævet med en blå stiplet linie. Det er bl.a. disse brintbindinger, som spiller en vigtig rolle for forbindelsens interessante receptorselektivitet.



Ph.d. Ewa Szymanska er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi.

lerende forbindelsers skelnen mellem forskellige underenheder. Vi er nu ved at undersøge, om denne viden kan overføres til modelstoffer, der blokerer receptorerne; såkaldte antagonist.

Selektive blokerende stoffer

Forbindelser, der blokerer AMPA-receptorer, er potentielle lægemiddelstoffer, fx til behandling af epilepsi. Blandt de mange udviklede AMPA-receptorantagonister findes der imidlertid ingen stoffer, som udviser selektivitet mellem de fire underenheder i AMPA-receptorerne.

Strukturkemiske analyser viser, at de kendte antagonist placerer sig på en måde i bindingslommen, der bevirker, at de ikke kommer i tæt kontakt med Tyrosin-702, når de bindes til AMPA-receptorerne. Spørgsmålet er derfor, om det er muligt at designe antagonist, som gennem vekselvirkninger med Tyrosin-702 vil foretrække én variant af receptorerne frem for en anden.

Grundlaget for dette design hentes fra en krystalstruktur, som giver et billede bindingen af antagonist ATPO til GluR2. ATPO blokerer alle fire underenheder i AMPA-receptorerne uden at skelne mellem dem. Målet var derfor at ændre strukturen af ATPO, så der placeres en passende substituent i nærheden af Tyrosin-702.

For at komme tæt på Tyrosin-702 valgte vi at erstatte den 5-leddede isoxazolring i ATPO med en lidt større 6-leddet

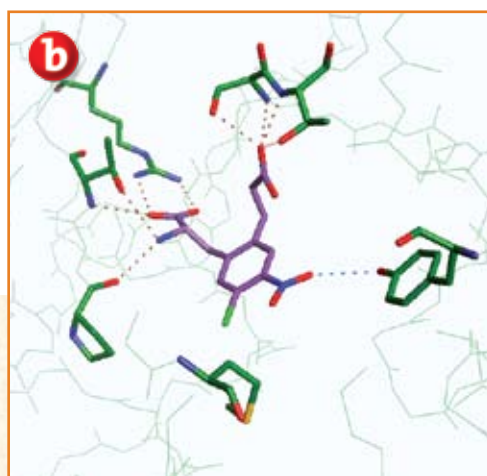
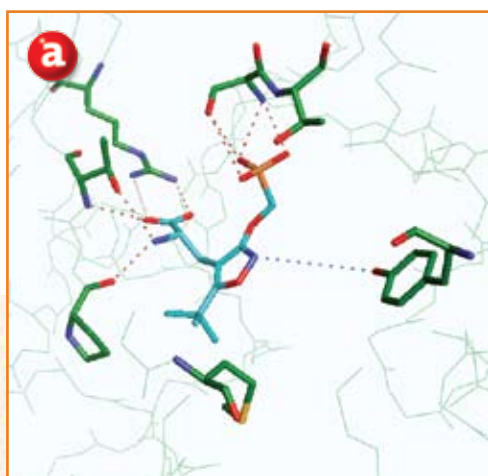
phenylring, hvor der er flere muligheder for at indføre substituer. Hvis man placerer en nitrogruppe i en passende position, så gruppen kan modtage brintbindinger fra Tyrosin-702, tyder computerkemiske beregninger på, at der både kan forventes en god binding til receptoren og dannelse af en bro til den vigtige aminosyrerest enten direkte eller gennem et vandmolekyle, som det er set med den stimulerende forbindelse Br-HIBO.

Forbindelsen I blev fremstillet med udgangspunkt i modelberegningerne, og farmakologiske studier har nu bekræftet, at forbindelsen er en antagonist, der binder sig væsentligt bedre til AMPA-receptorerne end ATPO; men desværre uden at vise tegn på selektivitet i forhold til de fire underenheder i receptorerne. Imidlertid bekræfter de strukturkemiske undersøgelser, at den introducerede nitrogruppe rent faktisk vekselvirker som ønsket med Tyrosin-702 i GluR2 gennem et vandmolekyle.

Yderligere studier er nu nødvendige for at undersøge, om en sådan vekselvirkning med Tyrosin-702 alene kan udnyttes ved design af agonister, som er selektive over for underenhederne i AMPA-receptorerne, men ikke ved design af antagonist med tilsvarende selektivitet. Alternativt kan det tænkes, at der er andre parametre end vekselvirkning med Tyrosin-702, som har større betydning for antagonisters selektivitet. En ting er givet: Virkningsmekanismen er mere kompleks end først antaget.



Ph.d. Tommy N. Johansen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



- a** Binding af ATPO i GluR2-bindingslommen baseret på en røntgenkrystallografisk analyse af en proteinkrystal.
b Computerkemisk analyse af den forventede bindingsmåde af forbindelsen I. Atomerne er farvekodet som i figuren øverst på siden, bortset fra C-atomerne i ATPO (turkis) og i forbindelsen I (lilla). Direkte vekselvirkninger mellem ATPO og receptorproteinet er vist med rødt, og afstanden til Tyrosin-702 er fremhævet med blå.



Lægemedler til slagtekyllinger – og miljøet?

Rester af veterinære lægemidler og deres omdannelsesprodukter kan findes i miljøet og forårsage effekter. Til produktion af en saftig kylling bruges ca. 100 mg antibiotika svarende til et samlet årligt forbrug i Danmark på 13.000 kg aktivt lægemiddel.

Af Martin Hansen, Kristine A. Krogh, Bent Halling-Sørensen og Asbjørn Brandt

Der opdrættes ca. 100-130 millioner slagtekyllinger om året i Danmark, primært i store indendørsbesætninger, som kan huse op mod 50.000 kyllinger. Kyllingerne lever i ca. 35 dage, eller til de vejer 1-1,5 kg, hvorpå de slagtes. Uheldigvis trives sygdomsfremkaldende coccidia-parasitter af arten *Eimeria* spp. godt i besætningsmiljøet, hvor de let spredes via strøelse, støv, foder og drikkevand. En infektion af parasitten kan lede til sygdommen coccidiose, som medfører diarré og vægttab og i nogle tilfælde kyllingens død. Parasitten kan holdes nede på et acceptabelt niveau ved at give forebyggende antibiotiske lægemidler – kaldet coccidiostatika – som fodertilsætningsstoffer i stort set hele kyllingens levetid.

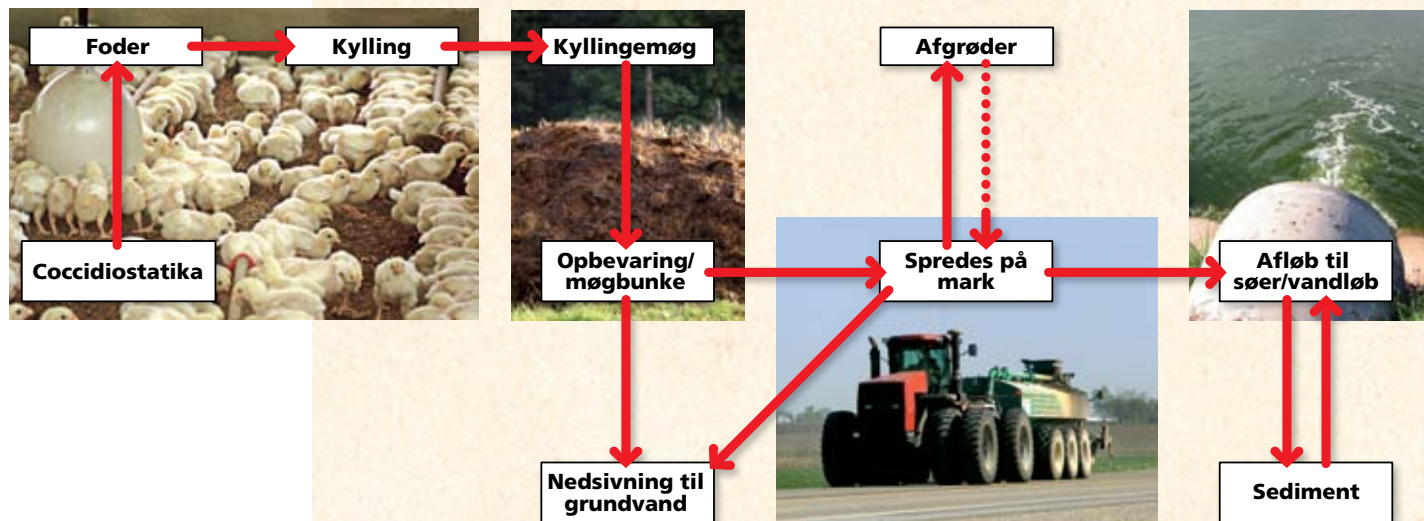
Analytisk-kemiske målinger har vist, at der er medicinrester i kyllingemøget, som i langt de fleste tilfælde udbringes på landbrugsarealer som næringsstoffer til afgrøder. Resterne af coccidiostatika kan derfor spredes til marken og det omgivende miljø. Men vi ved ikke, hvor coccidiostatika og deres nedbrydningsprodukter ender i miljøet, og heller ikke om denne gruppe af antibiotika forårsager økotoksikologi-

ske effekter. Derfor er der brug for studier, der kan belyse de miljømæssige og økologiske konsekvenser af udspre-ning af medicinresterne via kyllingemøget.

Hvorfor undersøge coccidiostatika?

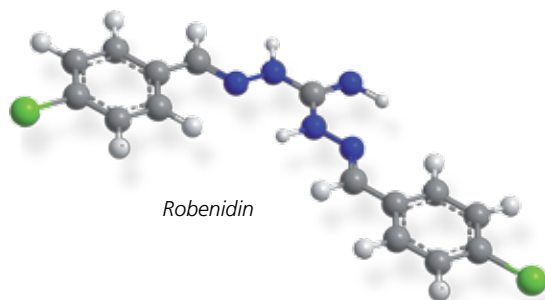
I øjeblikket er 11 coccidiostatika godkendte som fodertilsætningsstoffer i EU, hvoraf de otte bruges i Danmark. Stofferne godkendes af Den Europæiske Fødevarerikkerhedsautoritet (EFSA) på baggrund af producentens indleverede data og risikovurdering af disse. Godkendelsens varighed er op til 10 år. Forbruget i Danmark monitoreres af Veterinærinstituttet under Danmarks Tekniske Universitet, og på landsplan var der tale om over 13 tons aktivt stof i 2004, hvilket svarer til, at der i gennemsnit bruges ca. 100 mg aktivt stof pr. produceret slagtekylling. Det samlede forbrug på EU-plan er ikke kendt. Det er ikke tilladt at bruge coccidiostatika i økologisk fjerkræproduktion; som udgør under 1 procent af den totale producerede mængde danske kyllinger.

Coccidiostatika er som sagt lægemidler med antibiotisk effekt og dermed stoffer med høj mikrobiologisk potens. Derfor er det vigtigt at undersøge om stofferne og deres omdannelsesprodukter udviser højere, lavere eller samme grad af potens i miljøet. Hvis stofferne fx udvaskes til åer og vandløb, vil de så have effekt på fisk og krebsdyr? Eller ender stofferne et helt andet sted i miljøet, fx i grundvandet? Eller bindes de så stærkt til jordbunden, at der sker en op-hobning af lægemidler i vores afgrøders jord – og vil dette have en effekt på miljøet?

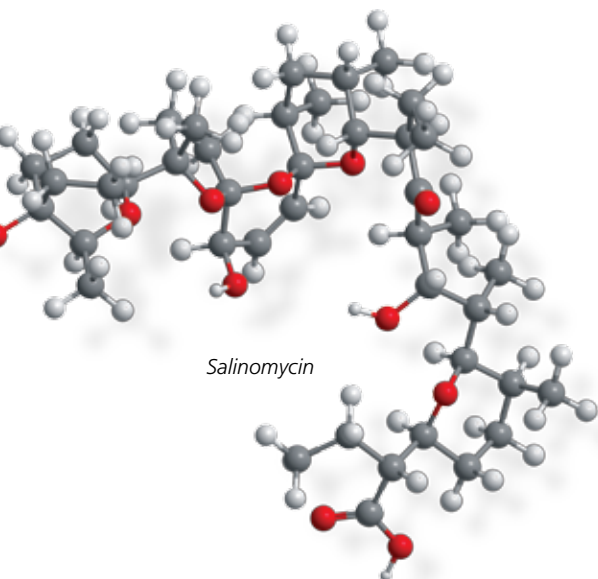


FREMMEDESTOFFERS SKÆBNE I MILJØET

Miljøkemien forsøger at finde svar på, hvor fremmedstoffer og deres omdannelsesprodukter ender i miljøet, og om stofferne udviser økotoksikologisk effekt på dyr og planter. Kyllingemøg opbevares typisk nogle måneder, hvorefter det spredes på markerne. Lægemedler eller dannede nedbrydningsprodukter, som er indeholdt i møget, kan herefter afgives og transporteres rundt i miljøet alt efter stoffernes karakteristika.



Robenidin



Salinomycin

Laboratorieundersøgelser

For at svare på spørgsmålene simplificerer vi problemstillingen i laboratoriestudier ved at udføre analytisk-kemiske målinger på omdannelsesprocesserne i kombination med økotoksikologiske tests. Herved identificeres omdannelsesprodukterne, og vi kan afklare, om de beholder lægemidlets økotoksikologiske virkning. Derefter er det muligt at vurdere om lægemidlet og dets omdannelsesprodukter udgør en risiko – en såkaldt miljøsikovurdering.

I analyserne opdeler vi omdannelsesprodukterne i tre kategorier; dannet via kyllingernes metabolisme; dannet ved abiotiske processer; og dannet ved biotiske processer. Metabolitter af lægemiddelstoffet, svarende til kyllingernes stofskifteprodukter, genereres i laboratoriet i et testsystem baseret på isolerede kyllingelever-mikrosomer og hepatocytter, hvorpå deres økotoksikologiske egenskaber analyseres.

I miljøet dannes abiotiske omdannelsesprodukter via naturlige processer – fx forårsaget af variationer i pH, temperatur, oxidationsforhold og lys – disse processer simuleres ligeledes i laboratoriet. Lyspåvirkning kan resultere i fotolyse, hvilket er en særlig vigtig omdannelsesproces i søer og vandløb.

Typisk vil fotolyse forårsage en fraspaltning af et atom eller mindre del fra lægemiddelstoffet og ofte resultere i en højere vandopløselighed og deraf højere mobilitet i vandmiljøet. Biotiske omdannelsesprocesser efterlignes i laboratoriet ved hjælp af bakterier, der kan anvende lægemiddelstoffet eller dets metabolitter som energikilde, hvorved de omdanner stoffet. De primære organismer, som omsætter miljøfremmede stoffer i jord, er bakterier, og derfor har vi valgt at udføre vores biotiske omdannelsesstudier med en blanding af aerobe jordbakterier. Herudover anses biotisk omdannelse under kyllingemøgets overbevaring for at være en vigtig nedbrydningsproces af fremmedstoffer. I den forbindelse ekstraheres lægemidlerne og deres omdannelsesprodukter fra opbevaringstanke til identificering.

Økotoksikologisk effekt

I vores studier har vi sat fokus på et meget anvendt coccidiostatikum, robenidin. Forsøgene viste, at stoffet undergår fotolyse, og at omdannelsesprodukterne udviser økotoksi-

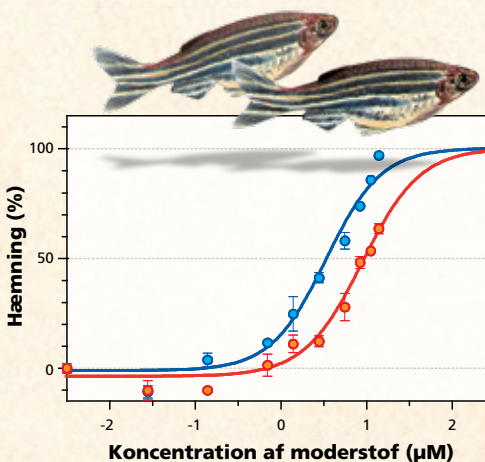
OMDANNELSESPRODUKTER ER DA IKKE GIFTIGE?

Antimikrobiale omdannelsesprodukter kan have en højere, lavere eller samme bakterielle potens som lægemiddelstoffet. Langt de fleste lægemiddelstoffer bliver metaboliseret i kroppen til mindre potente produkter, men i nogle tilfælde kan omdannelsesprodukterne have samme potens eller endda være mere potente end selve lægemiddelstoffet.

Figuren viser et økotoksikologisk testresultat ved dosis-respons kurver. I testen blev jordbakterier udsat for et coccidiostatikum, robenidin (blå), samt fotolyseprodukter af robenidin (rød).

Testen viste, at lægemiddelstoffet hæmmer bakteriers vækst tre gange mere effektivt end omdannelsesprodukterne, men det er værd at bemærke, at omdannelsesprodukterne bevarer robenidins antimikrobielle potens. Analysen indikerer, at robenidin vil blive omdannet i overfladen af søer, og at omdannelsesprodukterne muligvis bliver mere mobile, hvilket kan medføre effekter på vandlevende organismer.

Andre studier viser, at robenidin har en dødelig toksisk effekt på halvdelen af en zebrafisk population ved en koncentration på 0,10 µM.



kologisk effekt i miljømæssige relevante koncentrationer; især hvis robenidin udvaskes til det akvatiske miljø. Videre har vi påvist, at robenidin og et andet coccidiostatikum, salinomycin, omsættes biotisk af jordbakterier, og at der dannes omdannelsesprodukter. Disse omdannelsesprodukter testes i øjeblikket i den økotoksikologiske jordbakterietest. Andre forskningsgrupper er desuden i gang med forskningsprojekter omkring mulighederne for at reducere forbruget af coccidiostatika ved alternative behandlingsmetoder og vacciner i slagtekyllingeproduktionen. Og der er flere åbne spørgsmål omkring disse antibiotika, som bør besvares gennem forskning. Fx er der trods intensive bestræbelser i nyere tid kun opnået en begrænset viden omkring resistensmekanismerne for coccidiostatika.



Cand.scient. Martin Hansen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Ph.d. Kristine A. Krogh er adjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



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

Ph.d. Asbjørn Brandt er dyrlæge og sektionsleder for Veterinær Medicinsk Sektion i Lægemiddelstyrelsen.



Unge kvinder bruger smertestillende lægemidler for at klare skolen

Skolelivet spiller en afgørende rolle for unge kvinders brug af lægemidler i hverdagen. De tager smertestillende midler for at kunne klare timerne og lektierne i en stresset hverdag, og de er bevidste om normerne for brug af medicin blandt deres klassekammerater.

Af Dana Lee Hansen, Ebba Holme Hansen og Bjørn E. Holstein

Brugen af lægemidler mod hverdagssymptomer er stigende blandt unge, især for pigernes vedkommende. Piger udvikler et større forbrug af smertestillende midler end drenge gennem teenageårene, og kønsforskellen skyldes ikke, at pigerne oftere oplever symptomer. Især er anvendelsen af medicin mod hovedpine udbredt blandt piger og unge kvinder. De unge mangler viden om de lægemidler, de indtager, og det giver anledning til bekymring, fordi et større forbrug af selv de mest almindelige håndkøbspræparater kan medføre alvorlige bivirkninger som maveblødninger og skader på leveren eller nyrerne. Desuden skabes grundlaget for voksne menneskers sundhedsadfærd i ungdommen.

Alligevel er unges brug af medicin er relativt forsømt forskningsområde, og der er et klart behov for yderligere forskning, især med fokus på piger og unge kvinder. Indtil videre er der kun få studier, som har kastet lys på, hvad der ligger bag pigernes stigende brug af lægemidler i hverdagen. Derfor har vi undersøgt unge kvinders eget perspektiv på, hvorfor de tager medicin mod hverdagssymptomer.

For at opnå en bedre forståelse af hverdagssammenhængen omkring unge kvinders anvendelse af lægemidler indsamlede vi data via dybdegående kvalitative interviews. Interviewene blev udført med 20 unge kvinder i alderen 16 til 20 år, som blev rekrutteret gennem et gymnasium i København og en HF-skole på Frederiksberg. Interviewguiden fokuserede på

informanternes motiver for at tage – eller undgå at tage – lægemidler samt på den sociale kontekst omkring deres lægemiddelrelaterede handlinger og de situationer, som typisk udløser brug af medicin.

Gennem interviewene blev det klart, at forhold i hverdagen var afgørende for de unges brug af lægemidler, og især skolen er en central del af denne hverdagssammenhæng. Vores tematiske analyse af interviewmaterialet afdækkede, hvordan skolelivet og lægemiddelanvendelsen hang sammen i informanternes hverdag.

Stress, lektier og hovedpine

For det meste fortalte de unge kvinder om brug af smertestillende midler, primært paracetamol (fx Panodil) mod hovedpine, men der var stor variation med hensyn til pigernes erfaringer og vaner med brugen af disse præparater. Et par af informanterne tog dem fast hver dag, hvorimod andre forsøgte sig med alternative strategier og meget sjældent indtog lægemidler.

Til trods for de forskellige forbrugsmønstre var der et gennemgående tema om brugen af smertestillende midler og skolelivet: De unge kvinder brugte især smertestillende medicin mod skolerelateret hovedpine og for at kunne klare lektiepresset.

Skolelivet influerede på de unges brug af smertestillende midler på en række måder. For det første mente mange informanter, at deres hovedpiner skyldtes stress i hverdagen, som de ofte forbandt med skolelivet. For nogle vedkommende drejede det sig om bekymringer i forbindelse med skoleskift og de sociale og akademiske udfordringer, som pigerne mødte i den sammenhæng. En del følte sig presset til at klare sig godt i skolen, hvilket ofte hang sammen med fremtidsdrømme om at læse videre. Andre skolerelaterede faktorer blev også opfattet som medvirkende til



de unge kvinders hovedpiner; fx dårlig udluftning eller en lang dag med for meget stillesiddende arbejde kombineret med for lidt motion.

For det andet viste lektier sig at være en afgørende bevæggrund for brugen af smertestillende midler. Flere informanter tog paracetamol netop for at kunne koncentrere sig om aftenens lektier. Derimod var de mindre tilbøjelige til at snuppe en Panodil, hvis de havde planlagt en afslappende og lektiefri aften. Skolelivet blev således opfattet som en årsag til hovedpine og en motiverende grund til at bruge smertestillende lægemidler i situationer, hvor hovedpine forstyrrede de unge kvinders evne til at tage sig af deres lektier.

Normer i klassen

Skolekonteksten præger de unge kvinders brug af smertestillende lægemidler på to måder; gennem opfattelsen af normer for medicinanvendelse blandt klassekammeraterne, og via tilgængeligheden af tabletterne i skolen.

Analysen viste, at normerne for anvendelse af paracetamol blandt klassekammeraterne har stor betydning for alle informanterne. Det var tydeligt, at informanterne havde klare opfattelser af, hvad den forventede, accepterede og udbredte adfærd var med hensyn til brug af lægemidler. Anvendelsen af smertestillende medicin til at behandle hovedpine blev opfattet som normen blandt deres jævnaldrende. Der blev lagt mærke til de elever, der skilte sig ud ved at fravælge lægemidler, når de havde hovedpine. Der var en åbenhed omkring brugen af disse lægemidler i klassen forstået på den måde, at informanterne ofte oplevede, at nogen spurgte andre om en Panodil. Når en elev klagede over hovedpine, anbefalede klassekammeraterne dem typisk at gå hen til skolekontoret, hvor de kunne få en smertestillende tablet.

De unge kvinder var opmærksomme på, hvordan deres venner og klassekammerater brugte medicin, og de positionerede deres egen anvendelse i relation til normen hos klas-

sekammeraterne. Dette skete til trods for, at informanterne følte, at lægemidler var et emne, man kun sjældent tager op i gruppen.

Nogle informanter fulgte normen og brugte lægemidler på samme måde, som de mente, at deres venner gjorde. Andre afveg fra det, de opfattede som normen, ved at vælge alternative behandlingsstrategier såsom frisk luft eller motion. Normerne for anvendelse af lægemidler var en vigtig referenceramme for informanternes eget brug, uanset om de valgte at følge normen eller at afvige fra den. Tilgængeligheden af smertestillende medicin i skolen syntes også at influere på de unge kvinders brug af disse lægemidler, der blev opfattet som værende lettilgængelige. Flere fortalte, at der ingen grund var til at have smertestillende midler med sig i skolen, fordi de nemt kunne hentes på skolekontoret.

Undervisning om korrekt brug

Interviewene har skabt en bedre forståelse af, hvordan hverdagskonteksten influerer på unge kvinders lægemiddelanvendelse, og analysen viste, at skolelivet spillede en afgørende rolle. Dette fund har stor relevans for unge kvinder, deres forældre og undervisere. Sundhedsprofessionelle kan også have nytte af en mere nuanceret forståelse af unge kvinders brug af lægemidler. Det gælder både praktiserende læger og de farmaceuter, de unge møder i skranken på apoteket. Netop fordi skolelivet er centralt for de unge pigers oplevelser af stress og hovedpine og for deres brug af smertestillende midler, kan man med stor fordel sætte øget fokus på disse emner i skolen gennem undervisning om korrekt brug af lægemidler, risici ved anvendelsen, alternative strategier for forebyggelse og behandling af hovedpine og stress. Sådanne initiativer vil give spændende muligheder for farmaceuter, som er godt rustede til at støtte lærerne eller selv varetage undervisningen



Cand.pharm. Dana Lee Hansen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Mag.scient.soc Bjørn E. Holstein er professor ved Institut for Folkesundhedsvidenskab, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet.

UNGE KVINDERS UDTALELSER OM DERES BRUG AF SMERTESTILLENDENDE LÆGEMIDLER

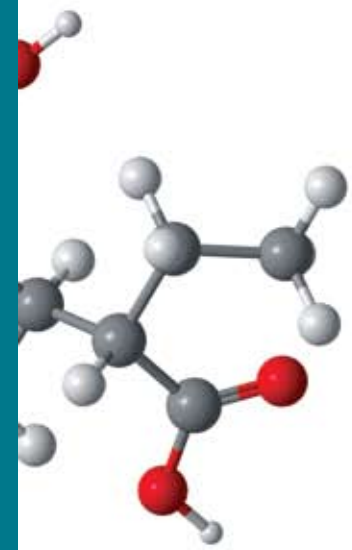
Jeg er meget god til [at tage medicin], når jeg har det dårligt, fordi jeg har det så stresset hver dag og så er det to Panodiler eller smertestillende eller et eller andet, som ryger hurtigt ned, fordi at jeg har travlt. (informant 5, 18 år)

Jeg har ikke taget medicin hele mit liv. Jeg tror det er to år siden, [starten af gymnasiet] eller sådan noget, hvor man virkelig begyndte – altså hvis jeg, for eksempel, havde ondt i hovedet, så kunne jeg ikke koncentrere mig til at lave lektier. Og da det spiller en stor rolle for, at jeg kan følge med i skolen, så bliver man nærmest nødt til det. (informant 6, 18 år)

Altså, jeg har tit oplevet i klassen, hvis der er, der er nogen, der enten har menstruationssmerter eller de bare har hovedpine, så spørger de tit, om der ikke er nogen, der

har en Panodil.... Jeg tror det er meget normalt. Altså, de fleste har det altid på sig.... Så, altså, jeg tror det er meget normalt at have det og tage det, uh, sådan, hvis der nu kommer en nødsituation eller et eller andet, man har brug for det, tror jeg. (informant 1, 18 år)

Og [mine klassekammeraters] mening var – de blev lidt overraskede og sådan "Tager du ikke nogle Panodiler?" og sådan noget "Tager du nogensinde" sådan, de mindste ting. "Nej, jeg prøver at holde mig væk fra det." Og de blev, sådan, meget overraskede over det, fordi det er åbenbart noget, de gør, som er normalt. Og fordi det er normalt, så snakker vi ikke om det. Det er noget, man forventer alle gør, sådan, nogle gange. Øhmm. Men så er der sådan nogle som mig, som ikke gør det så tit. (informant 11, 16 år)



Lægemiddelforskning

udgives af Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Redaktion

Jesper Munck, Rolf Haugaard og Mette Rasmussen (ansvarshavende)

Billedredaktion

Jesper Munck og Jens Raadal

Fotos

Jesper Munck (6, 14, 20, 29)

Stock.xchng (4, 5, 8, 18, 22, 26, 27, 30, 36) BananaStock (38)

Forfatterfotos: Anne Mette Bugge og Jesper Munck

Grafik/illustrationer

Jens Raadal (8, 9, 15, 21, 22, 23, 30, 34, 36),

Henning Dalhoff (12, 16, 17, 18, 26, 33)

G Pabst: Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen
Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte (1887-1898) (5)

Joannes Burmannus: Plantarum Americanarum (1755) farvelagt af Henning Dalhoff (5)

Kirsten Metz (24) Henning Dalhoff/MedicalRF.com (26)

Grafisk design og produktion

Jens Raadal

Tryk

Eks-skolens Trykkeri

ISSN 0905-0051

Det Farmaceutiske Fakultet

Københavns universitet

Universitetsparken 2

2100 København Ø

Tlf · 35 33 60 00

Fax · 35 33 60 01

E-mail · farma@farma.ku.dk

Internet · www.farma.ku.dk

