



Lægemeddelforskning

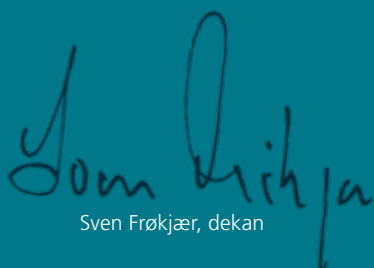
2010



Til gavn for alle

Den offentlige og private forskning inden for lægemiddelområdet er et område, hvor danske forskere og virksomheder klarer sig rigtig godt – også efter en international målestok. Universiteternes grundforskning inden for naturvidenskab, teknisk videnskab og sundhedsvidenskab komplementerer i mange tilfælde industriens mere målrettede forskning med udvikling af nye lægemidler. I et tæt samarbejde med andre universiteter, den farmaceutiske og bioteknologiske industri, apotekervæsenet, hospitalsvæsenet og den øvrige offentlige sundhedssektor arbejder vi på Det Farmaceutiske Fakultet konstant på at udvikle de farmaceutiske videnskaber til gavn for studerende, ansatte og den samlede sundhedssektor.

Det er mit håb, at nærværende udgave af Lægemedelforskning illustrerer nogle af vigtige udfordringer, der ligger inden for lægemiddelområdet og giver et indblik i nogle af de spændende forskningsprojekter, der udspringer fra Det Farmaceutiske Fakultet.



Sven Frøkjær, dekan

Gymnasieklassebesøg

Det Farmaceutiske Fakultet - FARMA - tilbyder en besøgsordning, der giver gymnasieelever mulighed for at se, hvordan kemi og biologi i gymnasiet anvendes i lægemiddelforskningen. Det sker i et møde med både studerende, forskere og undervisere, og derved håber vi at kunne give inspiration til den daglige undervisning. Et besøg kan bestå af foredrag eller øvelser. Seneste skud på stammen er øvelser i farmaci, hvor eleverne får et hands on-indtryk af lægemiddelfremstilling, når stoffet ibuprofen fremstilles i laboratoriet. Det er muligt at vælge mellem forløb, som primært er rettet enten mod kemi- eller biologiundervisningen. Se de mange muligheder på www.farma.ku.dk/gymnasier

Studieretningsprojekt

Gymnasieelever har mulighed for at besøge FARMA og udføre laboratorieøvelser i forbindelse med deres studieretningsprojekt. Der udbydes 6 forskellige øvelsesprojekter, som afvikles over 2 dage fra kl. 9-17. Læs mere på www.farma.ku.dk/studieretningsprojekt

Studiepraktik

Det Farmaceutiske Fakultet deltager i den landsdækkende ordning for studiepraktik for gymnasieelever, som finder sted i løbet af efteråret. I løbet af praktikopholdet, der strækker sig over tre dage, vil eleverne opleve 'livet' som farmaceutstuderende. Eleverne vil blive præsenteret for flere faglige områder og derigennem erfare bredden i farmaceutuddannelsen. De vil komme med til forelæsninger, klassetimer og laboratorieøvelser sammen med fakultetets studerende og deltage i timer skræddersyet til praktikanterne. Der skulle således være optimale muligheder for både at få et indtryk af livet som universitetsstuderende – og få fagligt indhold med hjem i bagagen. Nærmere oplysninger om studiepraktik og tilmelding fås på www.farma.ku.dk/studiepraktik og på studiepraktik.nu

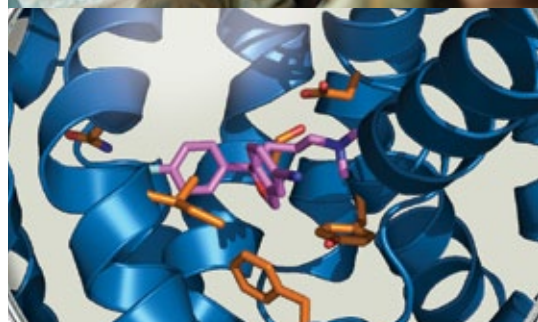
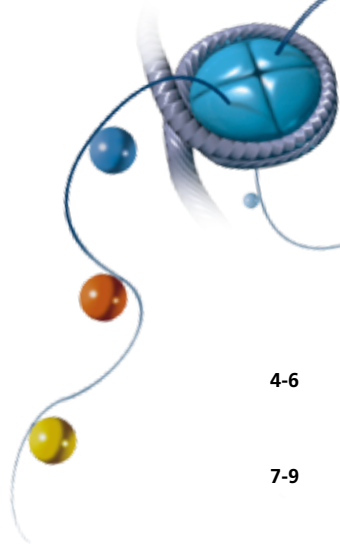
På www.farma.ku.dk/lmf kan man hente inspiration i de tidligere årgange af Lægemedelforskning. Her kan du også finde en emnefortegnelse og foretage fuldttekstsøgning på tværs af tidligere årgange af Lægemedelforskning.

Ønskes yderligere trykte eksemplarer af Lægemedelforskning?

Send din bestilling til bestil@farma.ku.dk

Indhold

- | | |
|--|-------|
| 1 Nu kan forfalskede lægemidler afsløres
<i>Af Julie Kesting, Anne Adersen og Lene Gudiksen</i> | 4-6 |
| 2 Histonhaler – et nyt mål inden for kræftbehandling
<i>Af Jesper L. Kristensen, Brian Lohse og Rasmus P. Clausen</i> | 7-9 |
| 3 Kan nanopartikler bruges i behandlingen af hudsygdomme?
<i>Af Louise Bastholm Jensen, Nina Østergaard Knudsen, Camilla Foged og Hanne Mørck Nielsen</i> | 10-12 |
| 4 Strukturer af membranproteiner: Nøglen til rationelt lægemiddeldesign
<i>Af Helle Hald og Osman Mirza</i> | 13-15 |
| 5 Ny viden om antimon – ny indsigt i glemt tropesygdom
<i>Af Claus Hansen, Bente Gammelgaard, Stefan Stürup og Helle Rüzsz Hansen</i> | 16-18 |
| 6 Planternes slægtskab som skattekort til nye lægemidler
<i>Af Nina Rønsted, Birger Brodin, Søren B. Christensen, André Huss Eriksson og Anna K. Jäger</i> | 19-21 |
| 7 Hjernens forsvarsmur kortlagt og kopieret
<i>Af Hans Christian Helms, Helle Sønderby Waagepetersen, Carsten Uhd Nielsen og Birger Brodin</i> | 22-24 |
| 8 Antidepressive lægemidler – nu i 3D
<i>Af Jacob Andersen, Lena Sørensen, Kristian Strømgaard og Anders S. Kristensen</i> | 25-27 |
| 9 Kemogenomik: Receptoren set fra ligandens synspunkt
<i>Af David E. Gloriam, Petrine Wellendorph, Lars D. Johansen, Daniel Sejer Pedersen og Hans Bräuner-Osborne</i> | 28-30 |
| 10 GABA-syntese – en vigtig brik for kontrol af epilepsi
<i>Af Anne B. Walls, Arne Schousboe og Helle S. Waagepetersen</i> | 31-33 |
| 11 Genetik kan forudsige følsomhed for smerte
<i>Af Arafat Nasser, Ole J. Bjerrum, Anne Marie Heegaard og Lisbeth Birk Møller</i> | 34-36 |
| 12 Stress kan fordoble risikoen for at bruge smertestillende medicin
<i>Af Vibeke Koushede og Ebba Holme Hansen</i> | 37-39 |
| 13 Stressfremkaldende hjerneaktivitet kan nu undersøges i realtid
<i>Af Morten Kristensen</i> | 40-42 |
| 14 Proteiner i lægemidler – de sætter sig alle de forkerte steder
<i>Af Stefania Baldursdottir, Signe Hougaard Nielsen, Maria Fullerton og Lene Jørgensen</i> | 43-45 |
| 15 UV-imaging visualiserer frigivelse af lægemiddelstoffer
<i>Af Fengbin Ye, Emil Meng-Lund, Anan Yaghmur, Susan Weng Larsen, Claus Larsen, Henrik Jensen og Jesper Østergaard</i> | 46-48 |
| 16 Forkert medicinering og unødige indlæggelser
<i>Af Søren Ilsoe-Kristensen, Steffen Thirstrup og Mette Rasmussen</i> | 49-51 |
| 17 Veterinære lægemidler i natur og miljø: Er miljørisikovurderingen god nok?
<i>Af Kristine A. Krogh, Gitte G. Anskjær og Bent Halling-Sørensen</i> | 52-54 |



Nu kan forfalskede lægemidler afsløres



I takt med den voksende internethandel er der sket en stigning i antallet af forfalskede lægemidler, naturlægemidler og kosttilskud, som i værste fald kan medføre alvorlige bivirkninger. En sammenkobling af avancerede analysemetoder kan afsløre forfalskningerne til gavn for både forbrugerne og myndighederne.

Af Julie Kesting, Anne Adsersen og Lene Gudiksen

Med den voksende internethandel og øgede rejseaktivitet er køb af forfalskede lægemidler, naturlægemidler og kosttilskud blevet et stort problem, som giver sundhedsmyndighederne alvorlige bekymringer. Forfalskede lægemidler er i nogle tilfælde uvirksomme, men i værste fald kan de være farlige og medføre alvorlige og uoprettelige bivirkninger, som det er svært at opdage årsagen til, fordi folk ikke ved, hvad de har indtaget.

Et forfalsket lægemiddel defineres af WHO som et lægemiddel, der har en forsættelig og ulovlig mærkning med hensyn til indhold og oprindelse med det formål at narre køberen. Det kan fx være medicin, som indeholder et korrekt angivet ak-

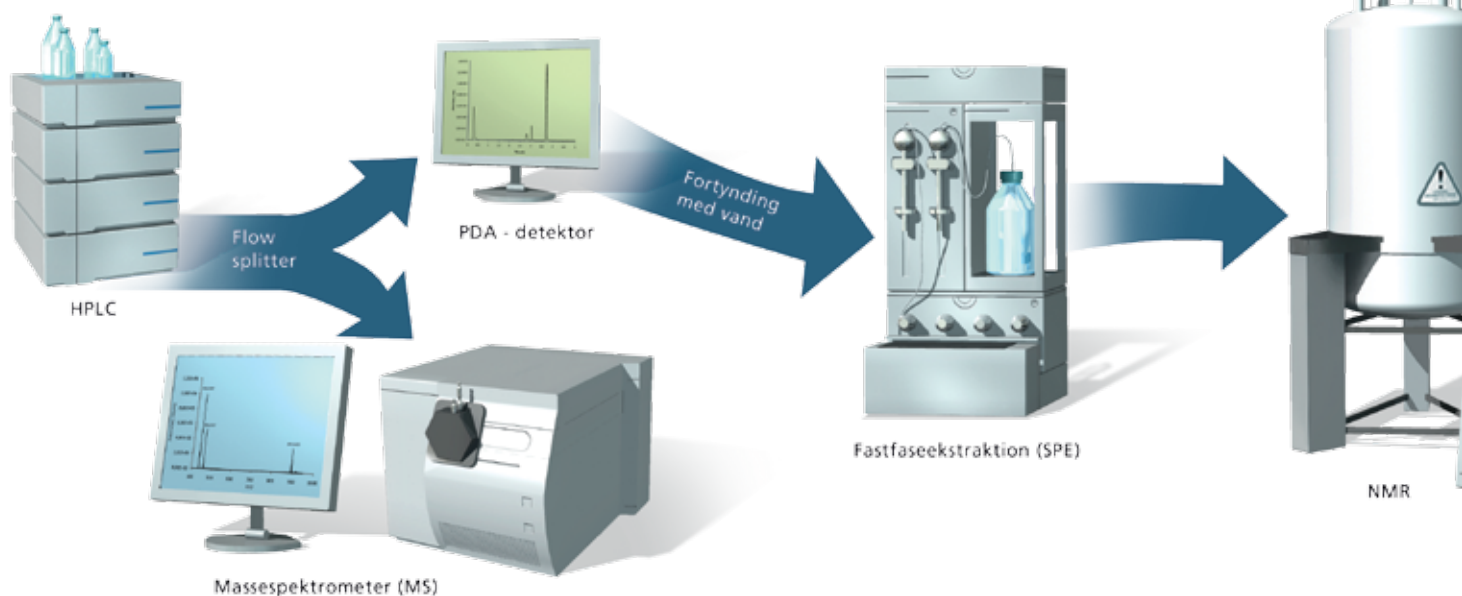
tivt stof, men i for høj eller for lav dosis. Der kan også være tale om lægemidler uden aktive indholdsstoffer, medicin, som indeholder andre aktive stoffer end de angivne, eller lægemidler, som er tilsat ikke-deklarerede indholdsstoffer. Mange typer medicin forfalskes, men de lægemidler, der oftest snydes med, er slankemidler og potensmidler. Det er baggrunden for Lægemiddelstyrelsens kampagner: *Pas på dig selv – køb godkendte slankemidler og Jagten på et bedre sexliv kan skade dit helbred.*

Naturmedicin, lægemidler og kosttilskud

Naturlægemidler og kosttilskud markedsføres ofte som sunde, naturlige alternativer til de almindelige syntetiske præparater. Naturprodukter fra Mellempøsten og Asien har imidlertid ofte vist sig langt fra at leve op til europæisk kvalitet og i mange tilfælde at være direkte forfalskede.

Der er afsløret præparater med et meget højt indhold af tungmetaller, og man har fundet adskillige "naturlige" potenspræparater, der udover – eller i stedet for – det deklarerede plantemateriale indeholder store doser af de samme virksomme stoffer, som indgår i de receptpligtige lægemidler

Skematisk oversigt over HPLC-MS-PDA-SPE-NMR. Kromatogrammerne og spektrene stammer fra studiet af det kinesiske naturpræparat.



Falsk deklaration: Disse kapsler indeholder angiveligt et kinesisk naturpræparat til behandling af forhøjet blodtryk. Præparatet virker, men kun fordi det indeholder tre kendte, syntetiske blodtrykssænkende lægemiddelstoffer. Der er ingen aktive naturstoffer i præparatet.



– eller virksomme stoffer, som anvendes til behandling af helt andre lidelser. Det samme gør sig gældende for slankepræparater, gigtpreparater, præparater mod forhøjet kolesterolindhold i blodet og præparater mod forhøjet blodtryk. Ifølge den danske Lægemiddelstyrelse har tolden i et andet EU-land sågar fundet et forfalsket lægemiddel mod hjertekar-sygdomme, som indeholdt støv fra mursten overtrukket med gul maling og møbellak!

En undersøgelse foretaget af Lægemiddelstyrelsen har vist, at mindre end halvdelen af de personer, som har købt medicin over internettet, kender reglerne for køb af medicin på nettet, og at mindre end halvdelen har overvejet, om der kunne være bivirkninger ved det købte. Lidt over en fjerdedel af køberne angiver, at medicinen ikke virkede som forventet.

En cocktail af stoffer

Et naturlægemiddel er ofte et ekstrakt af plantedele og indeholder derfor i modsætning til de fleste syntetiske lægemidler ikke ét enkelt aktivt indholdsstof, men adskillige stoffer – ligesom en kop te, som også er et planteekstrakt. For at afgøre, om et naturlægemiddel indeholder andet end det

deklarerede, er det nødvendigt, at alle indholdsstofferne adskilles og identificeres.

Adskillelsen foregår som oftest ved hjælp af væskechromatografi, baseret på stoffernes elektriske ladning og polaritet. En detektionsmetode, der hyppigt anvendes til kontrol af naturlægemidler og andre lægemidler, er massespektrometri, hvor indholdsstofferne identificeres ud fra deres eksakte masse via en sammenligning med databaser, som indeholder referencedata for kendte indholdsstoffer. Hvis et naturlægemiddel indeholder et kendt stof, vil stoffet således blive genkendt, når der er adgang til referencedata. Imidlertid er der desværre observeret en stigende tendens til, at producenter af forfalskede lægemidler ændrer på den kemiske struktur af de indholdsstoffer, de tilsætter, så en sammenligning med kendte stoffer i en database ikke giver nogen hits. Dette er en meget alvorlig situation, fordi det normalt er umuligt at forudsige, hvilken effekt en ændring af et molekyles sammensætning har på virkning og bivirkninger.

En moderne sammenkobling af flere analysemetoder kan imidlertid afsløre forfalskede lægemidler ved at vise, hvilke stoffer de indeholder. Her anvendes chromatografi til

MODERNE ANALYSEMETODER – HURTIG OG SIKKER IDENTIFIKATION AF INDHOLDSTOFFER

Vores metode til at afsløre forfalskede lægemidlers indholdsstoffer kaldes HPLC-MS-PDA-SPE-NMR. Først adskilles indholdsstofferne i lægemidlet ved hjælp af væskechromatografi (HPLC). Efter separationen ledes en lille del af hvert af indholdsstofferne ind i et massespektrometer (MS), som har en meget høj følsomhed, hvorved det er muligt at opnå gode data baseret på en lille mængde stof. MS måler molekylvægten af stoffet, hvilket gør det muligt at bestemme bruttoformlen. Derudover kan molekylet fragmenteres i massespektrometret, og ud fra fragmenteringsmønstret opnår man information om strukturen af stoffet.

Den øvrige del af indholdsstofferne ledes videre til en enhed for fastfaseekstraktion (SPE). I denne enhed sidder der en række små kolonner, som fastholder stoffer på samme måde som en HPLC-kolonne. Når en chromatografisk top kommer til SPE-enheden, fortyndes den med vand og ledes igennem en af disse kolonner, hvor indholdsstoffet bindes, mens væsken skylles bort. På denne måde kan et vilkårligt antal kromato-

grafiske toppe tilbageholdes på hver sin kolonne. Det er endvidere muligt at gentage den chromatografiske separation så mange gange som ønskeligt for derved at øge mængden af stof på hver kolonne. Til sidst tørres kolonnerne med nitrogen-gas for at fjerne HPLC-opløsningsmidlet.

Herefter er det muligt med en lille mængde opløsningsmiddel at skylle det opsamlede stof fra en kolonne ud i et rør, som er beregnet til optagelse af NMR-spektre. Følsomheden ved NMR er langt mindre end ved MS, men spektrene giver til gengæld information om alle hydrogenatomer og carbonatomer i det analyserede stof samt om deres indbyrdes placering i molekylet, hvilket gør det muligt at identificere stoffet. Desuden giver NMR information om den tredimensionelle struktur af det undersøgte molekyle.

Ved kombinationen af de anvendte metoder er det således muligt hurtigt at afklare, hvorvidt et naturlægemiddel eller almindeligt lægemiddel er forfalsket, uanset hvilke stoffer producenten har tilsat uden deklaration.



HVAD ER ALMINDELIGE LÆGEMIDLER?

- Lægemedler er produkter, som anvendes til behandling eller forebyggelse af sygdomme.
- De aktive stoffer er syntetiske stoffer, semisyntetiske stoffer eller isolerede rene naturstoffer.
- Lægemedler er godkendt af Lægemeddelstyrelsen, som stiller krav til fremstilling, kvalitet, virkning og sikkerhed af produkterne.

HVAD ER FORFALSKEDE LÆGEMIDLER?

- Et forfalsket lægemiddel defineres af WHO som et lægemiddel, som har en forsættelig og ulovlig mærkning med hensyn til indhold og oprindelse med det formål at narre køberen.
- Det kan fx være medicin, som indeholder et korrekt angivet aktivt stof, men i for høj eller for lav dosis.
- Der kan også være lægemidler uden aktive indholdsstoffer, medicin som indeholder andre aktive stoffer end de angivne eller lægemidler, som er tilsat ikke deklarerede indholdsstoffer.

HVAD ER NATURLÆGEMIDLER?

- Naturlægemedler er produkter, som er beregnet til at behandle lettere sygdomme, dvs. sygdomme, hvortil det ikke er almindeligt at søge læge.
- De aktive stoffer er pulveriserede plantedele eller planteekstrakter.
- Naturlægemedler er godkendt af Lægemeddelstyrelsen.
- Lægemeddelstyrelsen stiller krav til fremstilling, kvalitet, virkning og sikkerhed af produkterne.

HVAD ER KOSTTILSKUD?

- Kosttilskud er produkter, der supplerer den normale kost, og som påvirker kroppen ernæringsmæssigt og/eller fysiologisk.
- De aktive stoffer kan fx være vitaminer, mineraler, pulveriserede planter eller planteekstrakter.
- Kosttilskud skal anmeldes til fødevarermyndighederne, hvilket ikke er ensbetydende med at produktet er godkendt.
- Kosttilskud markedsføres i dosisform, fx kapsler eller tabletter.
- Kosttilskud er ikke lægemidler og må ikke markedsføres som egnede til behandling eller forebyggelse af sygdomme.

HVILKE REGLER GÆLDER FOR INDKØB AF LÆGEMIDLER OVER INTERNETTET?

- Lægemedlerne skal være købt eller afsendt fra et land inden for EU eller EØS.
- De skal være godkendt af myndighederne.
- Medicinen skal være til eget brug.
- Lægemedlerne må ikke være doping eller indeholde euforiserende stoffer.

Reglerne findes på www.laegemeddelstyrelsen.dk "Før du handler på nettet"

adskillelse, mens identifikationen af indholdsstofferne opnås ved at kombinere massespektrometri, fastfaseekstraktion og magnetisk resonans spektroskopi.

Naturlægemedel med syntetiske stoffer

Vi anvender denne sammenkobling af metoder til hurtigt at identificere kendte såvel som ukendte stoffer i planteekstrakter og svampeekstrakter, men teknikken er også oplagt til kvalitetskontrol af både naturlægemedler og almindelige lægemidler.

I samarbejde med forskere på Merck Frosst Ltd. har vi undersøgt et kinesisk naturpræparat til behandling af forhøjet blodtryk. Præparatet, som ifølge deklARATIONEN indeholder forskellige dele fra dyr og planter, viste sig at være særdeles effektivt til behandling af forhøjet blodtryk. Derfor undersøgte vi præparatet i håb om at finde et ukendt naturstof, som måske kunne danne grundlag for udvikling af et nyt lægemiddel. Det viste sig dog hurtigt, at kapslerne ikke indeholdt, hvad der var deklareret. En kromatografisk undersøgelse afslørede nemlig, at der kun var tre indholdsstoffer og ikke den mangfoldighed af naturstoffer, der kunne forventes ud fra deklARATIONEN.

Under anvendelse af HPLC-MS-SPE-NMR blev det hurtigt tydeligt, at de tre stoffer i kapslerne var amlodipin, indapamid og valsartan, som alle er registrerede aktive lægemiddelstoffer til behandling af forhøjet blodtryk. For at eliminere enhver tvivl om at virkningen af præparatet kun skyldtes disse tre stoffer, blev indholdet i kapslerne kvantificeret. Herefter blev der foretaget et dyreforsøg, hvor rotter med forhøjet blodtryk fik doseret enten kapsler eller en blanding af de tre stoffer svarende til indholdet i kapslerne. Forsøget viste, at den observerede effekt af kapslerne svarede fuldstændig til effekten af blandingen af de tre stoffer. Det kunne derfor konkluderes, at der ikke var noget naturstof, som bidrog til effekten af kapslerne.

Undersøgelsen viser, hvordan den anvendte kombination af moderne analysemetoder vil kunne afsløre forfalskede lægemidler til gavn for både forbrugerne og myndighederne.

*Cand.pharm. Julie Kesting er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi
Cand.pharm. Anne Adersen er lektor på Institut for Medicinalkemi
Cand.pharm. Lene Gudiksen er lektor på Institut for Medicinalkemi*





Histonhaler

– et nyt mål inden for kræftbehandling

Et nyopdaget enzym kan bane vej for en helt ny type kræftmedicin, som er mere skånsom over for raske celler end almindelig kemoterapi. Enzymet er med til at regulere, om kroppens gener tændes eller slukkes, og enzymets aktivitet er markant højere i kræftceller. Stoffer, som specifikt hæmmer enzymet, kan blive til lægemidler, som hindrer kræftcellerne i at vokse uhæmmet.

Af Jesper L. Kristensen, Brian Lohse og Rasmus P. Clausen

Kræftsygdomme kendetegnes ved, at kroppen mister kontrollen over sine egne celler. Den normale regulering af cellernes vækst sættes ud af spil, og kræftcellerne deler sig uhæmmet. Med tiden fører den ukontrollerede vækst til, at det omgivende væv nedbrydes, hvilket i sidste ende kan medføre døden.

En af de store udfordringer ved udviklingen af lægemidler til behandling af kræft er, at det er kroppens egne celler, man skal angribe. Kunsten er derfor at sikre sig, at det kun er kræftcellerne, som rammes af cellegiftene, og ikke de raske celler. Nutidens lægemidler er desværre ikke specifikke, og nogle gange er bivirkningerne så alvorlige, at lægerne må benytte meget små doser, som ikke er tilstrækkelige til at slå kræftcellerne ihjel. En forbedret kræftbehandling er derfor et spørgsmål om at finde egenskaber, der adskiller kræftceller fra raske celler, så man kan nedkæmpe kræftcellerne uden at ramme det sunde væv i kroppen.

Kræftcellernes ukontrollerede vækst skyldes, at den normale regulering af, hvilke gener, der skal aktiveres i cellerne, ikke længere fungerer. Vores forskning fokuserer derfor på at forhindre kræftcellerne i at undslippe de mekanismer, som normalt regulerer og bremser væksten i raske celler.

Cellerne bruger ikke alle gener

Menneskekroppen er sammensat af mere end 200 forskellige typer celler. Fælles for dem er, at de alle indeholder hele det humane genom i form af DNA. Det er med andre ord den samme universelle kagebog med opskriften på alle cellulære byggesten, der findes i vidt forskellige cellyper som fx nerveceller eller muskelceller. Den enkelte celle får sin egenart ved at udvælge, hvilke gener – dvs. opskrifter på protei-

ner – som er relevante for, at cellen kan opretholde præcis de funktioner, den skal udføre. De forskellige typer celler bruger derfor kun en brøkdel af alle de opskrifter, der findes i genomet.

Hvis man kunne tage en DNA-streng ud fra cellekernen i en celle og folde strengen ud, ville den være to meter lang, men det er selvfølgelig umuligt at rulle strengen ud inde i cellen, når bestemte gener skal aflæses. Derfor er genomet pakket sammen på en meget struktureret og velordnet måde, hvor DNA-dobbeltspiralen er viklet to gange rundt om en slags garnnøgler, man kalder for histoner.

Fra histonerne udgår der lange kæder af aminosyrer, og disse peptider kaldes for histonhaler. Halerne kan være kemisk modificeret på flere forskellige måder, og præcis hvordan, er med til at afgøre, hvorvidt et gen på den pågældende del

GENER, PROTEINER OG ENZYMER

Det humane genom rummer omkring 23.000 gener. Et gen er en DNA-sekvens, som indeholder opskriften på et protein, og når cellen har brug for proteinet, åbnes DNA-dobbeltspiralen, og cellen fremstiller en RNA-kopi af genet. Kopien aflæses nu i cellernes proteinfabrikker, som fremstiller det ønskede protein.

Proteiner er kroppens byggesten og arbejdsheste. Nogle proteiner har strukturelle funktioner og opbygger fx cellens skelet. Andre spiller en central rolle i cellernes kommunikation og fungerer bl.a. som receptorer for hormoner og signalstoffer.

En meget vigtig gruppe af proteiner er enzymerne. De er kroppens maskiner og sørger for, at alle de processer, som konstant kører i kroppen, fungerer efter hensigten. Enzymerne katalyserer biokemiske reaktioner, og de er drivkraften bag så forskellige ting som vore sanser, fordøjelsen af føden, musklernes bevægelser og lagring af hukommelsesindtryk i hjernen. Enzymer er også med til at tænde eller slukke for forskellige gener i forskellige typer celler.

Sådan tændes og slukkes gener i cellekernen:

Den humane arvemasse udgør en to meter lang DNA-dobbeltspiral, som er pakket sammen i cellekerner med en udstrækning på blot ti mikrometer.

DNA-dobbeltspiralen er viklet rundt om spoler på samme måde, som en snor er viklet rundt om en yoyo. Spolerne er dannet af proteiner, der kaldes histoner, og de omviklede spoler sidder på række som perler på en snor. Perlekæden snor sig til en tyk fiber, som vindes rundt omkring kromosomernes proteinskelet.

DNA midt inde i garnøglet er utilgængelig for de enzymer, som aktiverer vore gener, men histonerne har haler af aminosyrer, som stikker ud. Når der sættes acetylgrupper på en histonhale, folder en del af DNA-strengen sig ud, så enzymerne kan aktivere det pågældende gen.

Når histonhalen får påsat methylgrupper, forhindres adgangen for enzymerne, og genet inaktiveres.



EPIGENETIK REGULERER GENERNES AKTIVITET

Alle menneskers arvemasse er meget ens. Forskellene imellem os skyldes i høj grad epigenetik, som er reversible kemiske modifikationer af DNA, der bestemmer, hvilke gener der aktiveres og danner proteiner i kroppens celler.

Selve genomet ændres ikke livet i gennem, men epigenomet forandres voldsomt under fosterudviklingen i takt med, at de oprindelige stamceller, der kan udvikle sig til alle typer væv, specialiserer sig og danner mangfoldigheden af forskellige celler i kroppen – en proces, som i øvrigt hænger sammen med kemiske modifikationer af histonerne.

Enhver specialiseret celletype har sit eget epigenetiske mønster. Mønstret ændrer sig nogle gange i takt med, at mennesket bliver ældre – og måske også som følge af miljøpåvirkninger og livsstil. Det er endda muligt, at epigenetiske tilpasninger i én generation kan nedarves til den næste.

Sygdomme som kræft skyldes, at uhensigtsmæssige epigenetiske ændringer gør cellerne syge. Derfor kan øget viden om epigenetik bane vej for nye behandlingsformer, som griber ind i reguleringen af generne i de syge celler.

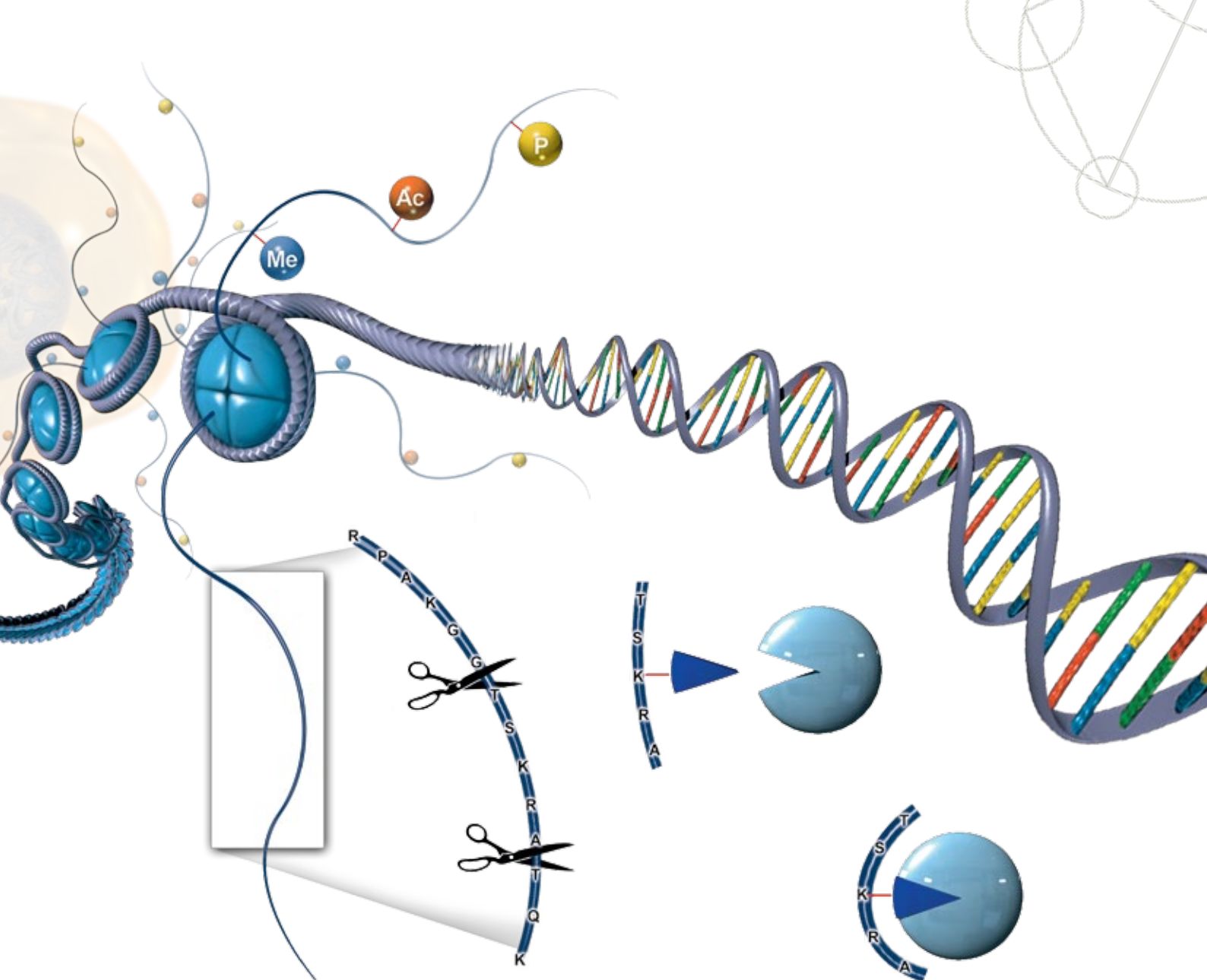
I 2010 blev der på internationalt plan dannet International Human Epigenome Consortium (IHEC), hvis mål er at kortlægge tusinde humane epigenomer i løbet af et årti.

af DNA-strengen bliver udtrykt eller ej. Modifikationerne af histonhalerne udgør på den måde et nyt kodelag ovenpå den genetiske DNA-kode. Man kalder den ekstra kode for den *epigenetiske* kode. Hvis man kan ændre på de epigenetiske modifikationer, vil det i teorien være muligt at gå ind og tænde og slukke for forskellige gener efter ønske.

Kræftbehandling via genregulering

Man kender i dag flere enzymer, som kan modificere histonhaler og påvirke, hvilke gener, der aktiveres i en celle. Men ved udvikling af en fremtidig kræftbehandling er det vigtigt kun at påvirke udvalgte enzymer, som er specifikke for kræftceller. På den måde kan man undgå, at lægemiddelstoffet modificerer histonhalerne i alle typer celler og dermed medfører bivirkninger.

På Biotech Research and Innovation Centre (BRIC) ved Københavns Universitet har en gruppe forskere for nylig opdaget et enzym, GASC 1, som er i stand til at fjerne en af de kemiske modifikationer af histonhalerne. Enzymet blev fundet ved at studere, hvilke forskelle der er på de biokemiske processer i kræftceller sammenlignet med raske celler.



Aktiviteten viste sig at være markant højere i kræftceller, og derfor er enzymet formodentlig involveret i nogle af de processer, der adskiller kræftceller fra almindelige celler. Et stof, som specifikt hæmmer enzymet, kan derfor potentielt udvikles til et nyt lægemiddel mod kræft – det er det, vi arbejder hen imod.

Enzymet kan fjerne methylgrupper fra en bestemt aminosyre, lysin, på en af histonhalerne. Man ved, at placeringen af disse methylgrupper på histonet samt antallet af dem er direkte relateret til, hvilke gener der bliver udtrykt og derfor i sidste ende, hvordan cellerne udvikler sig.

Forsøg med kunstige histonhaler

På Det Farmaceutiske Fakultet har vi fremstillet en serie af afkortede histonhaler for at undersøge og forstå, hvordan enzymet og histonhalerne vekselvirker med hinanden. I forsøgene præsenteres enzymet for de kunstige histonhaler, og

efterfølgende undersøger vi, om enzymet har fjernet methylgrupper fra halerne. På den måde opnår vi meget detaljeret information om, hvordan enzymet fungerer. Jo mere viden, jo bedre kan vi målrette udviklingen af nye stoffer, som kan forhindre enzymet i at ændre på histonhalerne, og dermed potentielt bremse væksten af kræftceller i kroppen.

Histonhalerne består af omkring 40 aminosyrer. Vi har systematisk forkortet halerne og vist i laboratoriet, at enzymet ikke behøver mere end fem aminosyrer fra histonhalen for at kunne genkende halen og fjerne methylgrupperne. Med udgangspunkt i den information er vi gået i gang med at designe nye inhibitorer, der binder til det samme område på enzymet. Tanken er, at disse stoffer skal gå ind og blokere enzymet, så det forhindres i at fjerne methylgrupperne fra histonhalerne og dermed hindre kræftcellerne i at vokse uhæmmet.

Ph.d. Jesper L. Kristensen er lektor på Institut for Medicinalkemi
 Ph.d. Brian Lohse er postdoc på Institut for Medicinalkemi
 Ph.d. Rasmus P. Clausen er lektor på Institut for Medicinalkemi





Nanopartikler

kan forbedre behandlingen af hudsygdomme

Hudsygdomme som psoriasis og børneeksem er vanskelige at behandle. Ved at indlejre lægemiddelstofferne i nanopartikler kan man opnå, at stofferne forbliver i huden, hvor de skal virke, og ikke spredes til blodet eller til de omgivende væv, hvor medicinen i værste fald kan medføre bivirkninger.

Af Louise Bastholm Jensen, Nina Østergaard Knudsen, Karsten Petersson, Jens Hansen, Camilla Foged og Hanne Mørck Nielsen

Huden er normalt en essentiel barriere mod indtrængning af mikroorganismer, allergifremkaldende stoffer og andre kemiske stoffer, men hudsygdomme forringer ofte den beskyttende barriere og fører til øget fordampning af vand, så huden bliver tør. Fx fremkalder psoriasis og børneeksem ændringer i barrierens egenskaber, hvilket svækker hudens forsvarsmur mod uønskede stoffer og gør huden tør og mindre tæt.

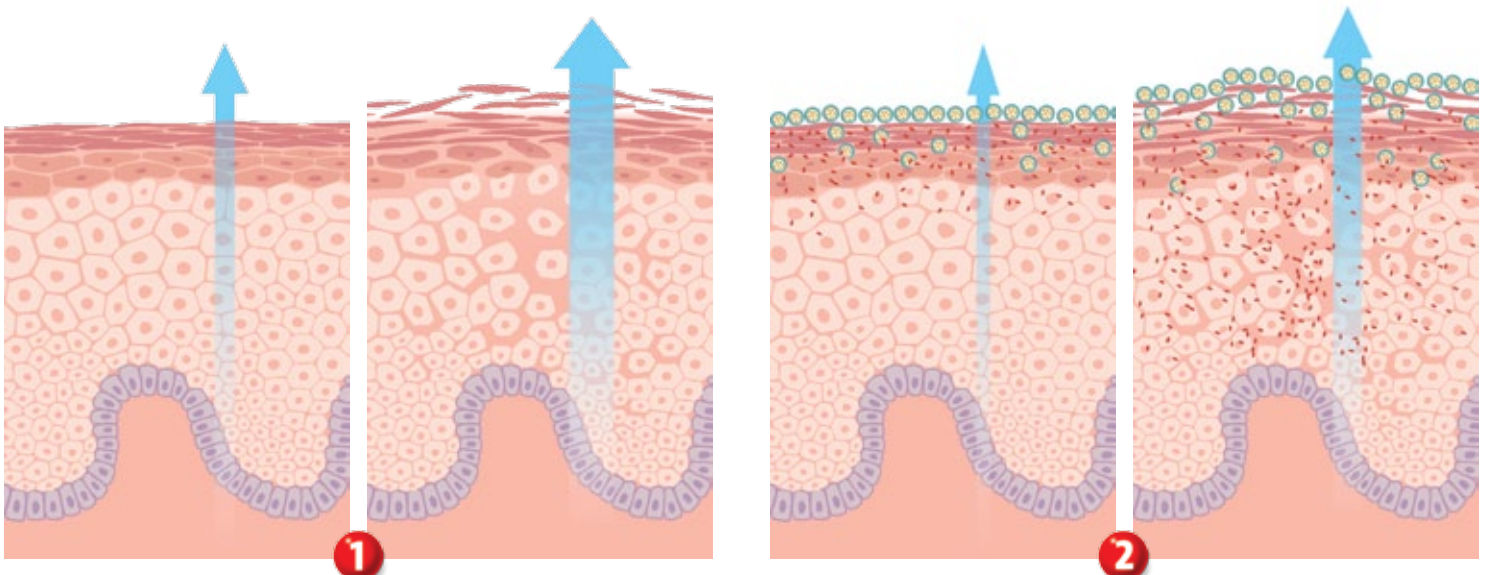
Ved hjælp af nanoteknologi og viden om den syge huds forringede barriereegenskaber kan lægemiddelstoffer nu styres mere præcist hen til målcellerne et stykke nede i huden. Det er således muligt at designe nanopartikler, som sørger for, at lægemiddelstofferne fastholdes i huden og ikke diffunderer ud i de omgivende væv eller til blodbanen, hvor stofferne er

uden effekt og i værste fald kan medføre bivirkninger. Et eksempel er påvirkning af kroppens egen hormonproduktion efter anvendelse af binyrebarkhormon, som typisk bruges til behandling af mange hudsygdomme.

Gennem en målrettet behandling baseret på nanoteknologi kan man reducere mængden af lægemiddelstof, som smøres på huden, hvilket formindsker risikoen for bivirkninger. Desuden kan cremer med nanopartikler bidrage til at forstærke hudens barriere mod vandfordampning og indtrængning af mikroorganismer.

Behandling af beskadiget hud

Huden består af forskellige lag, overhuden (epidermis), læderhuden (dermis) og underhuden (subcutis). Den yderste del af overhuden kaldes hornlaget (stratum corneum), og det består af døde celler. Hornlaget udgør hudens primære beskyttelsesbarriere mod indtrængning af fremmede stoffer og bakterier, og laget holder på hudens fugtighed ved at reducere fordampningen af vand fra de underliggende hudlag. Sygdomme som psoriasis og børneeksem behandles ofte med salver eller cremer, og her skal lægemiddelstofferne passere gennem hornlaget og udøve deres effekt dybere nede i huden – i den levende overhud og læderhud – hvor de syge celler findes. Samtidig skal man undgå, at lægemid-





Til venstre et eksempel på psoriasis, til højre et eksempel på børneeksem.

PSORIASIS OG BØRNEEKSEM

2-3 procent af befolkningen har psoriasis. Det er en kronisk autoimmun hudsygdom, som er karakteriseret ved en øget og unormal vækst af hornceller i overhuden, hvilket viser sig i form af røde, skællede pletter – typisk på albuer og knæ, men også mange andre steder på kroppen, fx. i hovedbunden. Sygdommen er kronisk, selv om der kan være symptomfrie perioder. Psoriasis kan optræde i alle aldersgrupper, men det første udbrud kommer typisk i 20-25 års alderen.

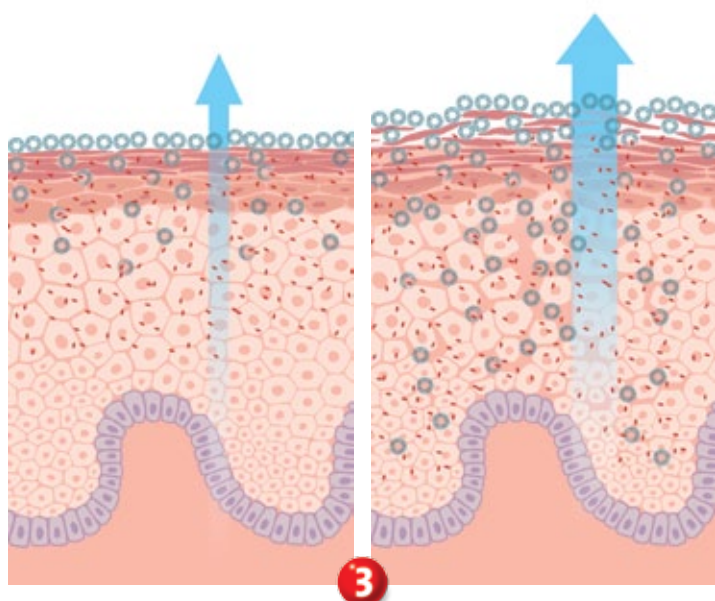
Børneeksem (atopisk dermatitis) er et kløende eksem, hvor patienten har symptomfrie perioder afbrudt af sygdomsudbrud af forskellig sværhedsgrad. Omkring en femtedel af alle danske børn lider af børneeksem, og 30 procent af patienterne har fortsat eksem som voksne. Personer med børneeksem har tendens til tør hud, lav kløetærskel og en øget risiko for at udvikle astma og allergi.

delstoffet trænger hele vejen gennem huden til blodbanen. I to specifikke projekter undersøger vi, hvordan formulering af lægemiddelstoffer i to forskellige typer nanopartikler kan forbedre behandlingen af henholdsvis psoriasis og børneeksem. Der findes i dag flere slags nanopartikler, som er interessante til behandling af hudsygdomme, men nanopartikler baseret på fedtstoffer er mest lovende, fordi de anvendte fedtstoffer er naturligt forekommende i huden og derfor som udgangspunkt sikre at bruge. I et samarbejde mellem Det Farmaceutiske Fakultet og LEO Pharma A/S fokuserer vi på liposomer til behandling af psoriasis samt på faste lipidnanopartikler til behandling af børneeksem.

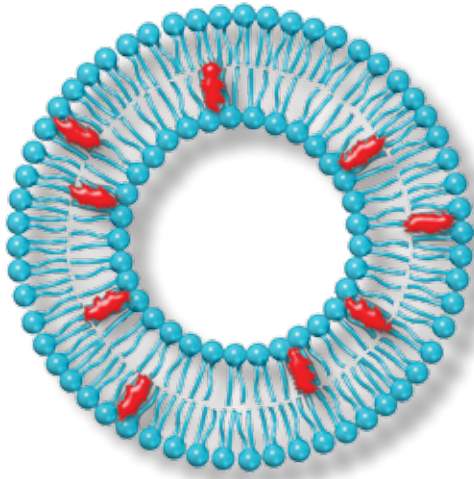
Psoriasisbehandling i overhuden

En række hydrofobe lægemiddelstoffer anvendes i salver til behandling af psoriasis. Ved at indlejre disse fedtopløselige lægemiddelstoffer i liposomers membraner bliver medicinen kontrollerbar via liposomernes fysiske-kemiske egenskaber og mindre afhængig af lægemiddelstoffernes egne egenskaber. Det kan udnyttes til at styre lægemiddelstofferne hen til de syge hudceller.

Laboratorieforsøg med grisehud har vist, at det er muligt at kontrollere, hvor langt liposomerne og lægemiddelstoffet trænger ned i huden ved at justere liposomernes kemiske sammensætning, både for intakt hud og ved en barriere-skade. Optagelsen af liposomer i de sygdomsramte celler kan



- 1 Hudsygdomme forringer ofte den beskyttende barriere øverst i huden og fører til øget fordampning af vand, så huden bliver tør. Både psoriasis og børneeksem fremkalder ændringer i barriereegenskaberne, hvilket svækker hudens forsvarsmur mod uønskede stoffer og gør huden tør og mindre tæt.
- 2 Faste lipidnanopartikler kan fastholde mere lægemiddelstof i huden end en almindelig salve, og en depoteffekt kan opnås, specielt hvis huden er intakt. Nanopartiklerne trænger ikke hele vejen igennem huden, men kan lægge sig som en beskyttende film ovenpå huden, så mindre vand fordamper, og huden bliver mindre tør.
- 3 Liposomer fastholder mere lægemiddelstof i huden end en almindelig salve, og en depoteffekt kan opnås. Liposomerne trænger længere ned i huden end faste lipidnanopartikler, især hvis huden er beskadiget.



LIPOSOMER KAN TRANSPORTERE BÅDE FEDTOPLØSELIGE OG VANDOPLØSELIGE LÆGEMIDDELSTOFFER

Liposomer er små hule kugler af fedtstoffer med en typisk diameter på omkring 100 nm. Fedtstofferne har vandopløselige hoveder og fedtholdige haler, og i vand danner de spontant liposomer. Liposomernes væg består af et dobbeltlag af lipider, hvor fedthalerne er samlet i midten af membranen, mens hovederne vender ud mod vandet og indad mod det centrale hulrum.

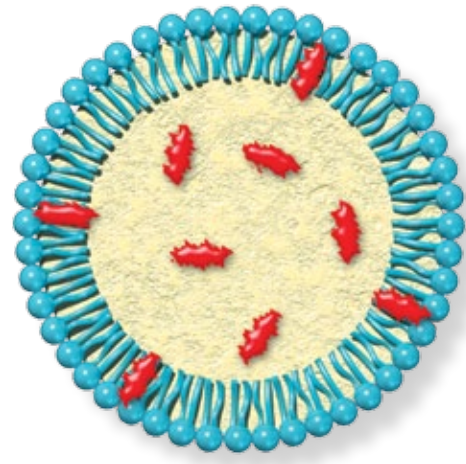
Hydrofile (vandopløselige) lægemiddelstoffer kan indkapsles i den indre vandige kerne eller associeres til overfladen af liposomerne, mens hydrofobe (fedtopløselige) lægemiddelstoffer kan indlejres i selve membranstrukturen.

Liposomernes egenskaber kan nøje kontrolleres via deres kemiske sammensætning, som bestemmer deres smeltepunkt og dermed deres fleksibilitet samt deres fysiske egenskaber såsom størrelse og antallet af dobbeltlag. Liposomer er oftest opbygget af fosfolipider og kolesterol. Ordet liposom kommer af de græske ord "lipo", som betyder fedt, og "some", der betyder krop; dvs. fedtkrop.

øges ved at udstyre liposomernes overflade med et stof, som binder til en receptor på hudcellerne. Ved hjælp af denne metode kan man muligvis fastholde lægemiddelstoffet på det rigtige sted i huden, hvorved man præcist kan ramme de syge celler og hindre stoffet i at nå helt ind til blodbanen. Disse liposomer er under afprøvning i en dyremodel for psoriasis i mus.

Nanopartikler forstærker huden

Forsøg med grisehud har vist, at ca. 25 procent mere af det applicerede lægemiddelstof fastholdes i huden ved brug af faste lipidnanopartikler sammenlignet med en almindelig salve. Det betyder, at det er muligt at reducere den totale mængde påført lægemiddelstof samt at behandle mindre hyppigt. Man kan især opnå en god depoteffekt i huden,



FASTE LIPIDNANOPARTIKLER – ET DEPOT I HUDEN

Faste lipidnanopartikler (Solid Lipid Nanoparticles, SLN) er fremstillet af lipider med et smeltepunkt over kroppens temperatur. Den faste struktur gør nanopartiklerne mere stabile i huden og fastholder en større mængde lægemiddelstof i huden end ved brug af traditionelle cremer eller salver.

Nanopartiklerne har typisk en diameter på 100-500 nm og lægemiddelstoffet inkorporeres i partiklen eller associeres til partiklens overflade. Partiklernes egenskaber kan kontrolleres via sammensætningen af lipiderne.

hvis hudens barriere er intakt eller forbedres under behandlingen.

Der er også lavet forsøg, som viser, at fedtstoffer fra faste lipidnanopartikler findes oven på huden eller i hornlaget, hvilket sandsynliggør, at partiklerne kan virke forstærkende på hudens barriereegenskaber. Yderligere forsøg i en dyremodel for børnekesem i mus skal sammenligne faste lipidnanopartiklers egenskaber med en markedsført formulering til behandling af børneeksem.

Mange hudsygdomme er kroniske og indebærer en livslang medicinerings. Det gør det ekstra vigtigt at minimere eventuelle bivirkninger ved behandlingen. Anvendelse af fedtbaserede nanopartikler har derfor et stort potentiale for udvikling af behandlinger, som er bedre og mere risikofri end de nuværende metoder.

*Cand.pharm. Louise Bastholm Jensen er ErhvervsPh.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi og LEO Pharma AIS
Cand.scient. Nina Østergaard Knudsen er ErhvervsPh.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi og LEO Pharma AIS
Ph.d. Karsten Petersson er Senior Scientist på LEO Pharma AIS
Ph.d. Jens Hansen er Corporate Vice President på LEO Pharma AIS
Ph.d. Camilla Foged er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Hanne Mørck Nielsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi*



Strukturer af membranproteiner: Nøglen til rationelt lægemiddeldesign

De fleste lægemidler virker ved at binde sig til proteiner i cellemembranen. Derfor er kendskab til humane membranproteiner en uvurderlig hjælp, når man designer nye lægemidler, men desværre er det ekstremt svært at bestemme deres strukturer. Små krystaller med tilsvarende membranproteiner fra bakterier kan afsløre strukturen ved brug af intens røntgenstråling.

Af Helle Hald og Osman Mirza

Membranproteiner er cellernes omstillingsbord – forbindelsen mellem omverdenen og cellernes indre – og opklaring af deres strukturer er i den absolutte frontlinie af biokemisk forskning. I dag kan man ved hjælp af røntgenkrystallografi bestemme den tredimensionelle opbygning af de store proteinmolekyler helt ned til en detaljeringsgrad, der afslører de indbyrdes positioner af de enkelte atomer i proteinet. Oplysningerne er nyttige for forståelsen af membranproteiners virkningsmekanismer, og de kan anvendes i praksis ved udvikling af nye lægemidler. Størstedelen af alle lægemiddelforbindelser virker nemlig ved at binde sig til et membranprotein, og derfor er kendskab til membranproteiners strukturer en

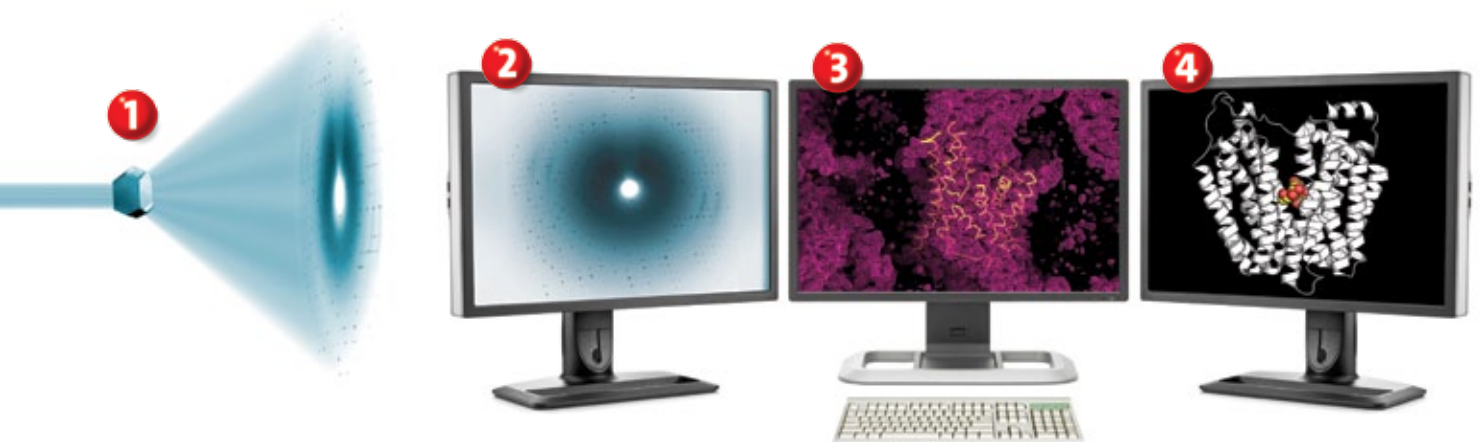
stor hjælp, når man skal designe nye lægemidler. Det er simpelt hen nemmest at fremstille en nøgle til en lås, når man kender låsens form.

Imidlertid er det ekstremt svært at opklare strukturen af humane membranproteiner, og på verdensplan har man endnu kun bestemt den atomare opbygning af 12 af menneskets i alt 7000 membranproteiner. Problemet er, at proteinerne kolliderer og ændrer form, når de fjernes fra deres naturlige miljø i den fedtholdige cellemembran. Derfor skal de pakkes ind i sæbemolekyler, når de tages ud af membranen og dyrkes som krystaller, og ofte lykkes det kun at fremstille krystaller, som er så små, at det er umuligt at bestemme proteinets struktur selv med intens røntgenstråling fra store accelerators.

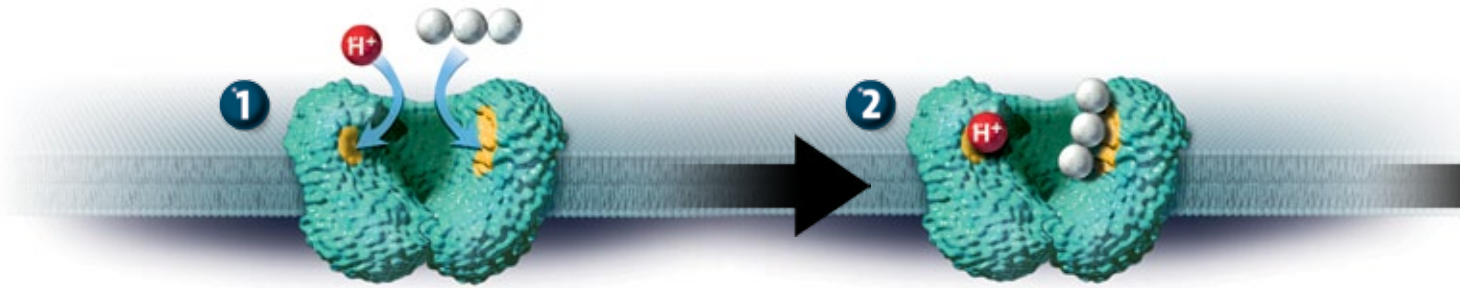
I de seneste par år har området imidlertid været inde i en rivende udvikling, og nye metoder til proteinfremstilling og krystallisation har øget antallet af kendte strukturer af membranproteiner fra et halvt hundrede stykker i 2000 til omkring 250 i dag. De fleste strukturer stammer fra bakterier.

Peptidtransportør i tarmen

Vi fokuserer på et membranprotein i tarmcellerne, som spil-



Opklaring af proteinstrukturer: ❶ En gradvist roterende proteinkrystal bestråles med intens røntgenstråling. ❷ Krystallen spreder røntgenstrålen, og der dannes spredningsmønstre. ❸ Ud fra spredningsmønstrene fremstilles et tredimensionelt kort over elektronernes placering i krystallen. ❹ Kortet bruges til at bygge en model af proteinets struktur, som viser de enkelte atomers art og indbyrdes positioner i proteinmolekylet.

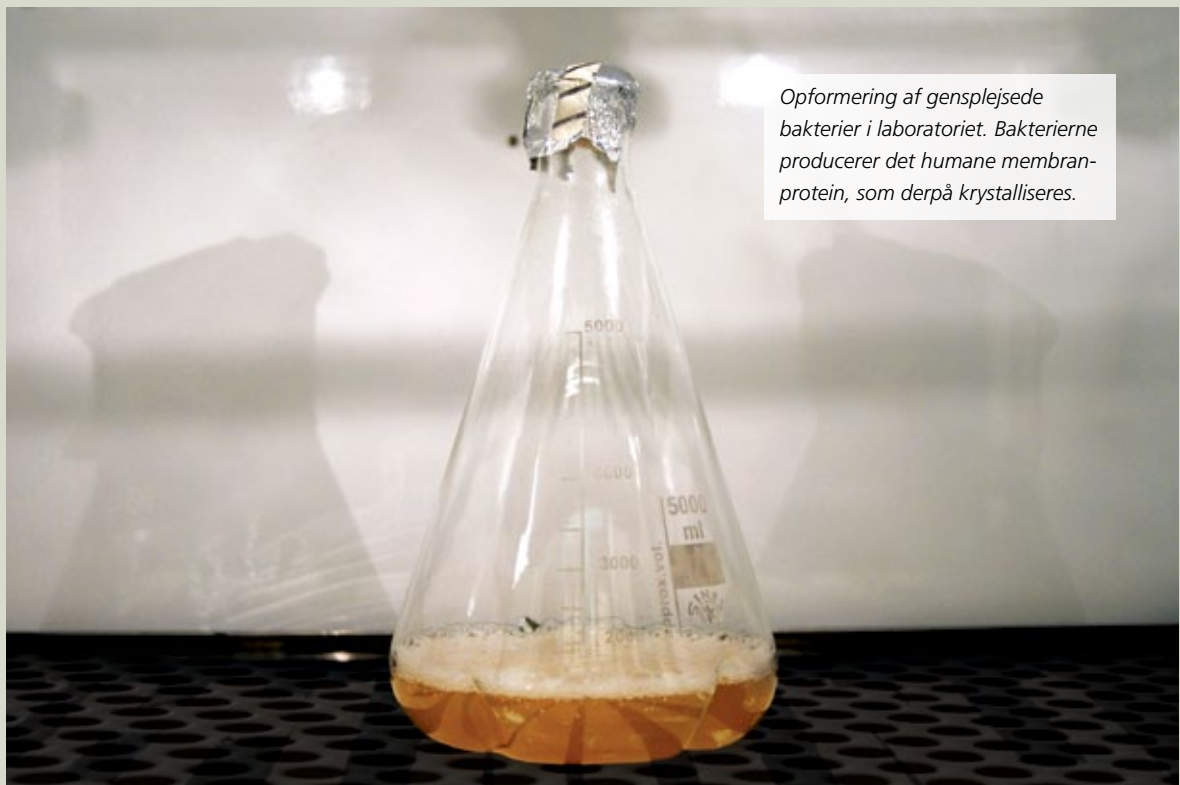


MODEL AF PEPTIDTRANSPORTØREN

Virkningsmekanismen af den humane peptidtransportør er ikke opklaret eksperimentelt, men der er udviklet en teoretisk model, som er baseret på strukturel viden om andre typer transportører:

I hvilepositionen befinder peptidtransportøren sig i en strukturel form, hvor de aktive områder vender udad på

cellens overflade. Områderne, som består af aminosyrer, er bevarede gennem evolutionen og er derfor uændrede mellem bakterielle og humane peptidtransportører. Det er kendskabet til disse aminosyrers tredimensionelle placering, der kan udnyttes til at designe lægemidler, som genkendes af peptidtransportøren.



Opformering af gensplejsede bakterier i laboratoriet. Bakterierne producerer det humane membranprotein, som derpå krystalliseres.

KRYSTALDYRKNINGENS SVÆRE KUNST

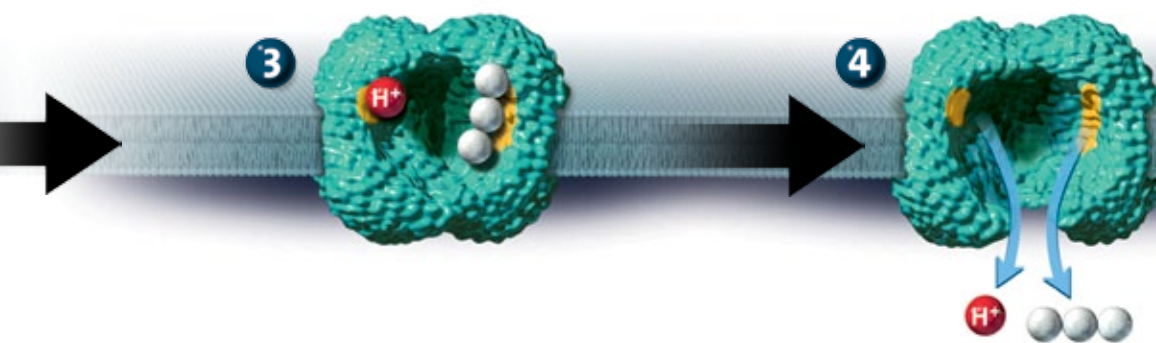
Krystaller er opbygget af millioner af ens molekyler arrangeret i lange rækker af symmetriske formationer. For at lave en krystal af et protein kræves der store mængder af proteinet, som typisk fremstilles i genmodificerede organismer såsom bakterier eller gær. Vi opformerer bakterierne i laboratoriet, hvor de producerer den bakterielle peptidtransportør, inden vi slår dem i stykker og isolerer proteinet fra celleresterne.

Når man arbejder med membranproteiner, er det ofte et problem, at værtsorganismen kan dø, hvis man tvinger den til at producere for store mængder protein.

Den største udfordring er imidlertid fremstillingen af selve proteinkrystallen. Det er meget vanskeligt at krystallisere

membranproteiner, fordi de består af en vandafvisende og en vandelskende del, som henholdsvis befinder sig inde i cellemembranen og udenfor cellen. Proteinets kombinerede hydrofobe og hydrofile egenskaber vanskeliggør den tætte pakning af molekyler, der kræves for at opbygge en krystal, fordi de to dele afviser hinanden på samme måde som ensrettede poler på to magneter.

Løsningen er at tilsætte en mild sæbeopløsning til opløsningen med proteinet. Sæben består af små molekyler med en vandafvisende og en vandelskende del, og når sæbemolekylerne blander sig med proteinmolekylerne, formindskes den indbyrdes frastødning mellem proteinerne.



Når transportørens substrater – en proton samt et peptid – er til stede ❶, vil den gensidige tiltrækningskraft mellem de aktive områder og substraterne føre til dannelsen af et kompleks, hvor protonen og peptidet bindes til transportøren ❷. Som følge af peptidbindingen ændres transportørens

form, så der opstår et mellemstadium. Dernæst dannes et stadium ❸, hvor protonen og peptidet vender indad i cellen. Dette medvirker til, at både protonen og peptidet frigøres fra peptidtransportøren ❹. Denne tomme peptidtransportør ændrer derefter form tilbage til hvilepositionen.

ler en central rolle, når medicin indtages i tabletter, hvilket er tilfældet med langt de fleste lægemidler. Forudsætningen for, at medicinen virker, er, at tablettens først bliver nedbrudt i mave-tarm-systemet. Derefter skal det aktive lægemiddelstof transporteres fra tarmen over i blodet, som fører stoffet hen til det organ, hvor det skal udøve sin effekt.

Transporten fra tarmen til blodbanen finder ofte sted med hjælp fra membranproteiner, som sidder på cellerne i tarmvæggen. De kaldes for transportører og sender små molekyler, som ellers ville være blevet tilbageholdt i tarmen, ind i blodet. Vi forsker i den humane peptidtransportør hPEPT1, som fragter små peptider med to eller tre aminosyrer gennem tarmvæggen. Peptiderne er typisk nedbrydningsprodukter fra føden, men da transportøren er ret uspecifik, kan den også sende peptidlignende lægemiddelstoffer ind i blodet, og det gør membranproteinet yderst interessant i forbindelse med design af lægemidler.

Til trods for peptidtransportørens vigtige funktion kender man ikke strukturen, fordi det er meget vanskeligt at arbejde med menneskelige membranproteiner i laboratoriet. Derfor har vi valgt at undersøge en række peptidtransportører, som evolutionært er relateret til hPEPT1. Et eksempel er et membranprotein fra kolibakterier, som kaldes YjDL, og som er bakteriens version af transportøren. Bakteriers membranproteiner er ofte mere stabile end de tilsvarende humane proteiner, og derfor er de som regel nemmere at arbejde med. Strukturel information om kolibakteriens transportør kan bruges til at designe en model af menneskets peptidtransportør med hjælp fra en computer, fordi den overordnede struktur af de to evolutionært beslægtede proteiner må forventes at være meget ens.

Røntgenkristallografi på accelerator

Vi har udviklet en metode til at producere store mængder

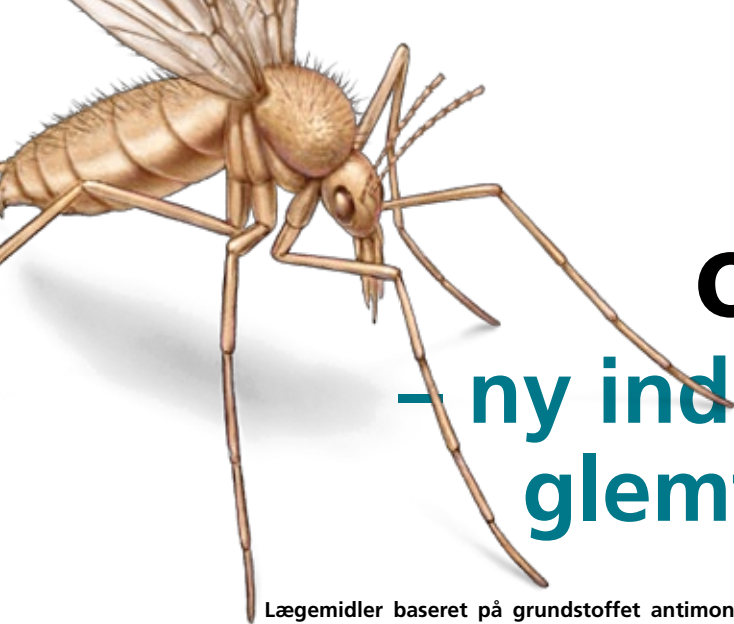
af peptidtransportøren YjDL i genmodificerede bakterier, der fungerer som små proteinfabrikker, og vi har fremstillet små krystaller af membranproteinet, som vi har undersøgt på en stor partikelaccelerator i Schweiz. Swiss Light Source er en ringformet synkrotron, hvori bundter af elektroner cirkulerer ved nær lysets hastighed. Flere steder i ringen passerer elektronerne særlige konfigurationer af magneter, der kaldes undulatorer. De får elektronerne til at løbe slalom, og når elektronernes baner krummes, udsender de meget intens røntgenstråling. Den stærke stråling er fokuseret i en ekstremt tynd stråle, hvilket gør det muligt at bestemme proteinstrukturer ud fra langt mindre krystaller end normalt.

Til bestemmelse af et proteins tredimensionelle struktur bruger vi en metode, som kaldes røntgenkristallografi. Ved eksperimenterne bestråles en gradvist roterende krystal af proteinet med røntgenstråling. Røntgenstrålen spredes af de elektroner, som omgiver atomerne i krystallen, hvilket resulterer i spredningsmønstre, hvis udseende afhænger af proteinmolekylets struktur. Ud fra mønstrene beregner man på en computer et tredimensionelt kort over positionerne af elektronerne i proteinet. Med dette kort som udgangspunkt bygger man så en model over proteinets rumlige facon og atomstruktur, som viser de enkelte atomers art og indbyrdes positioner i proteinet.

Vore undersøgelser af krystallerne med bakteriens peptidtransportør tegner lovende, men resultaterne er endnu ikke gode nok til, at vi kan bestemme strukturen. Derfor arbejder vi med at optimere forskellige trin i processen, og vi håber på snart at få resultater af en kvalitet, som kan føre til strukturbestemmelse af YjDL. På den måde vil vi få nyttige oplysninger om den tilsvarende humane peptidtransportør, som kan udnyttes til design af nye lægemidler til indtagelse gennem munden.

Ph.d. Helle Hald er postdoc på Institut for Medicinalkemi
Ph.d. Osman Mirza er lektor på Institut for Medicinalkemi





Ny viden om antimon

– ny indsigt i glemte tropesygdom

Lægemidler baseret på grundstoffet antimon er gennem 80 år blevet brugt til at behandle tropesygdommen leishmaniasis. Alligevel er virkningsmekanismen ukendt. Nye opdagelser om antimons kemi kan bane vej for bedre lægemidler. Drømmen er tabletter frem for injektioner eller drop. Det vil overflødig gøre indlæggelse og være en stor fordel i udviklingslandene.

Af Claus Hansen, Bente Gammelgaard, Stefan Stürup og Helle Rüzsz Hansen

Tropesygdommen leishmaniasis rammer to millioner mennesker om året, og dog har de færreste i Danmark hørt om den. Det er en parasitsygdom, som kan være dødelig, hvis den ikke behandles.

Leishmania-parasitten overføres ved bid af en sandflue. Når parasitten er kommet ind i kroppen, vil immunforsvarets celler – makrofagerne – opluge den for at uskadeliggøre den. Makrofagerne dræber normalt alle fremmede organismer, som kommer ind i kroppen, men desværre har parasitterne tilpasset sig til dette, så de dør ikke, når makrofagerne æder dem. Tværtimod er det kun ved at blive spist af makrofager-

ne, hvori de lever og deler sig, at parasitterne kan overleve i mennesket. Alvorligheden af sygdommen afhænger af parasiternes art. De milde former giver "kun" læsioner i huden, mens den alvorligste form angriber organer som lever, milt og knoglemarv. Det fører til døden i 95 procent af tilfældene, hvis sygdommen ikke behandles. Af de to millioner årlige sygdomstilfælde er 500.000 med den alvorligste form, og omkring 57.000 mennesker dør hvert år af leishmaniasis.

Antimonlægemidler

Heldigvis findes der lægemidler mod sygdommen, og de mest anvendte er baseret på grundstoffet antimon. Antimonlægemidler har været brugt mod leishmaniasis i over 80 år og anvendes stadig i dag, fx på Rigshospitalet, hvis danskere er blevet smittet under rejser i troperne. De nuværende lægemidler har dog mange ulemper, og deres virkningsmekanisme er stort set ukendt. Forskning på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi har nu bragt os et par skridt nærmere på en forståelse af mekanismen. Analyseproblemer undervejs førte endda til, at vi opdagede helt nye egenskaber ved antimons opførsel i biologiske prøver.

Antimon har det kemiske tegn Sb, og grundstoffet kan ek-



sistere opløst i to forskellige former – Sb(III) og Sb(V). De oprindelige antimonholdige lægemidler var baseret på Sb(III), men for 50 år siden gik man over til Sb(V)-forbindelser, som fortsat bruges i dag. Sb(III) var effektivt i lavere doser, men desværre også temmelig giftigt, så det gav mange bivirkninger. Sb(V) giver færre bivirkninger, men alligevel udvikler patienterne ofte symptomer på forgiftning.

Ved behandlingen skal lægemidlet indgives dagligt i mindst tre uger – og i nogle tilfælde gennem adskillige måneder – enten som indsprøjtninger eller i drop. Det er meget upraktisk i udviklingslandene, hvor der er langt mellem hospitalerne. I løbet af en kur på tre uger kan en patient komme op på at få 17 gram antimon sprøjtet ind i kroppen.

Virkningsmekanismen er ukendt. Man regner dog med, at det faktisk er Sb(III), som er aktivt – så når man giver Sb(V), skal dette først omdannes til Sb(III). Der har længe været delte meninger om, hvor omdannelsen foregår. Nogle mener, at det sker, når Sb(V) kommer ind i parasitten, mens andre mener, at omdannelsen finder sted inde i de makrofager, hvor parasitterne lever og formerer sig. Ingen havde imidlertid målt, om der faktisk foregår en omdannelse i makrofagerne, så derfor besluttede vi at undersøge dette.

Model for makrofager

I samarbejde med Erik Wind Hansen på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi dyrkede vi en cellelinje som en model af kroppens makrofager. Cellelinjen er oprindeligt opformet ud fra en human kræftcelle, men cellerne har egenskaber, som i høj grad ligner normale makrofagers egenskaber. For at være sikker på, at det kemiske miljø i cellerne var som

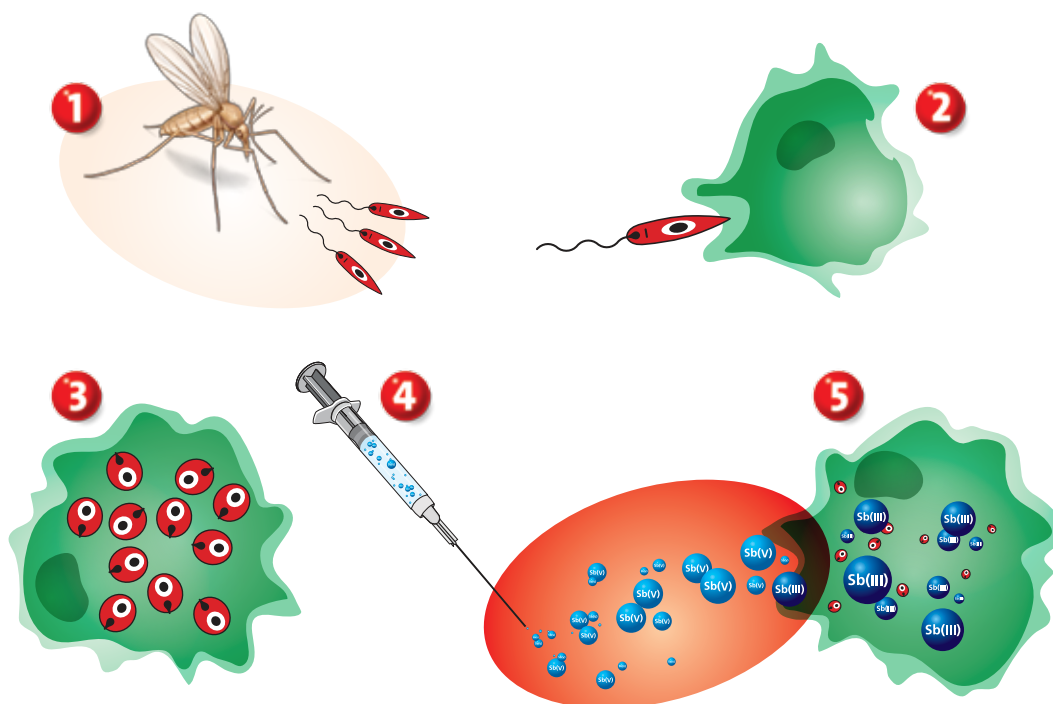
i rigtige makrofager, testede vi først, om cellerne kunne danne reaktive iltforbindelser som brintoverilte. Det gør makrofager nemlig, når de har optaget en fremmed organisme, som skal slås ihjel; og de kemiske processer i forbindelse med brinoverilte-produktionen kan være vigtige for, om Sb(V) omdannes til Sb(III).

Dannelse af brintoverilte måles ved at tilsætte stoffet luminol til cellerne. Når luminol reagerer med brintoverilte, udvikles der lys. Derfor kan man måle, om cellerne begynder at lyse, når de bliver provokeret med fremmede mikrobiologiske stoffer, ganske som når immunforsvarets makrofager stimuleres og går til angreb på en fremmed organisme i kroppen. I forsøgene dyrkede vi cellelinjen sammen med Sb(V)-lægemidlet Pentostam® og stimulerede cellerne med cellevægge fra gær. Derpå lavede vi ekstrakter af makrofager til analyse af, om Sb(V) var blevet omdannet til Sb(III).

Ekstraktion og måling

Ekstrakterne blev analyseret ved hjælp af højtryksvæskekromatografi (HPLC). Her sprøjtes nogle få µl prøve i en væskestrøm, der pumpes igennem en kolonne, som er et rør pakket med porøst materiale. Sb(V) og Sb(III) binder til kolonnen materialet i forskellig grad og bevæger sig derfor gennem kolonnen med hver deres hastighed, så de kommer ud af kolonnen på to forskellige tidspunkter. Derved får man de to former adskilt, så man kan detektere dem hver for sig.

For at bestemme mængderne af henholdsvis Sb(V) og Sb(III) brugte vi induktivt koblet plasmamassespektrometri (ICPMS). Her forstøves væsken fra kolonnen i en dyse og suges ind i en 6000 °C varmt plasma. Den høje temperatur nedbry-



Leishmania-parasittens livscyklus: 1 En blodsugende sandflue overfører parasitten til et menneske. 2 Immunforsvarets makrofager sluger parasitten for at dræbe den. 3 Parasitten overlever og formerer sig inde i makrofagerne. 4 Lægemiddelstoffet antimon indgives i blodet som Sb(V). 5 Sb(V) omdannes til den mere potente form Sb(III) inde i makrofagerne, hvor stoffet slår parasitterne ihjel.



ANTIMON I MILJØET

Den nye metode til analyse af antimon er relevant i mange sammenhænge. Antimon bliver nemlig brugt som brandhæmmende middel, som katalysator i plastproduktion og som smøremiddel i bremsekloster til biler. Den store anvendelse fører til øgede koncentrationer af antimon i naturen, så gode analysemetoder er nødvendige for at følge stoffets omdannelse i miljøet. Opdagelsen af antimons tendens til at blive indbygget i store molekyler – og metoden til at analysere grundstoffet alligevel – er derfor meget nyttig.

der alle molekyler i prøven til ioner med en positiv ladning. Ionerne bliver derpå suget ind i massespektrometret og skilt ad efter vægt i forhold til elektrisk ladning i elektriske felter. Teknikken er meget følsom; man kan uden problemer måle koncentrationer på en milliontedel gram antimon pr. liter. Da vi analyserede ekstrakterne, kunne vi se, at en andel af Sb(V)'et var omdannet til Sb(III). Imidlertid var omkring halvdelen af den samlede mængde antimon i prøverne forsvundet – det kom aldrig ud af kolonnen igen!

Gåden om det forsvundne antimon

Når man læser om andre videnskabsfolks analyser af antimon i biologiske prøver, er der mange, som "mister" en væsentlig del af deres stof på HPLC-kolonner. Når der manglede antimon i vores analyse, skyldes det med andre ord et generelt problem.

Antimon bruges ikke bare i medicin, men også i produktion af plastik, og derfor fik vi den ide, at antimon kan reagere med forskellige biologiske molekyler og danne polymerer – store antimonholdige molekyler – som ikke kan kom-

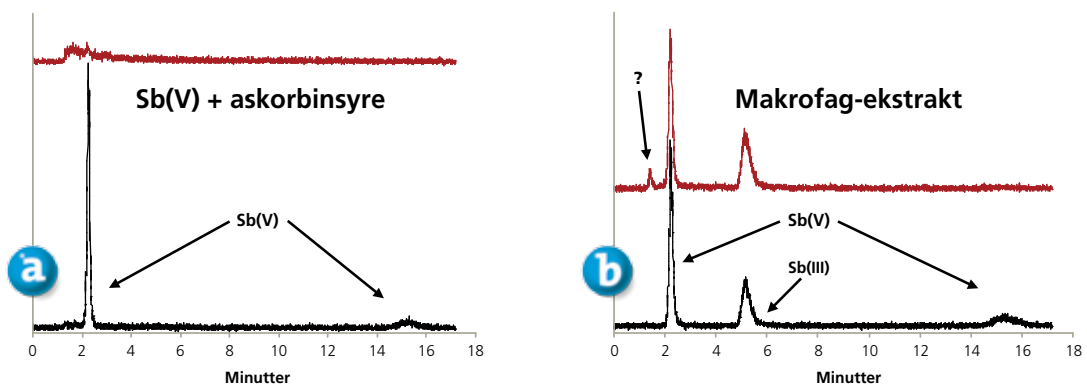
me gennem de fine porer i kolonnerne. For at teste ideen, blev antimon blandet med askorbinsyre, som fungerer som repræsentant for biologiske molekyler. Analysen viste, at en del af antimonet nu kunne filtreres ud af opløsningen på et filter, som tilbageholder store molekyler.

Udfordringen var derpå at få nedbrudt disse store molekyler, så antimon atter blev frit og kunne kvantificeres – selvfølgelig uden at omdanne Sb(III) i prøven til Sb(V) eller omvendt. Det opnåede vi ved at tilsætte saltsyre til prøven et par timer før analysen. Foruden saltsyre tilsatte vi stoffet EDTA, som binder til Sb(III) og derved beskytter det mod at oxidere og blive omdannet til Sb(V). Ligeledes tilsattes citronsyre, som binder både til Sb(III) og Sb(V).

Med den forbedrede analysemetode genfandt vi 97 procent af antimonet i celleekstrakterne mod normalt halvdelen, og derfor kunne vi bevise, at de makrofaglignende celler faktisk omdanner Sb(V) til Sb(III). Op mod 20 procent af Sb(V) et blev omdannet, og det havde vi overhovedet ikke kunnet sige noget om, hvis halvdelen af antimonet forsvandt under analysen.

Bedre lægemidler

Ved at forbedre forståelsen af virkningsmekanismen er vi med til at bane vejen for, at man en dag kan udvikle bedre antimonlægemidler end de nuværende. Hvis man fx kunne udvikle et lægemiddel, som rammer parasitterne mere målrettet, kunne man nøjes med mindre doser, hvilket vil betyde færre bivirkninger. Nye antimonforbindelser vil måske kunne eliminere stammer af parasitten, som er resistente over for den traditionelle medicin. Den store drøm er et lægemiddel på tabletform, så patienten ikke længere behøver at være indlagt for blive behandlet.



Kromatogrammer for antimon: **a** Modelblanding af Sb(V) og askorbinsyre. **b** Ekstrakt af makrofaglignende celler behandlet med Sb(V). De røde kromatogrammer er optaget på ubehandlede prøver; de sorte når prøverne er behandlet med syre, hvilket tydeliggør kromatogrammerne: **a** Kromatogrammet før syrebehandling har ingen regulære toppe, så man kan faktisk ikke se, hvilken form antimon findes i. **b** Før syrebehandling findes der en ukendt antimonforbindelse i kromatogrammet. Syren nedbryder forbindelsen, så vi kan se, om antimonet var Sb(V) eller Sb(III). Sb(V) giver to toppe.

Cand.pharm. Claus Hansen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Bente Gammelgaard er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Stefan Stürup er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Helle Rüz Hansen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi



Planternes slægtskab som skattekort til nye lægemidler

Der er store muligheder for at finde nye potentielle lægemidler i naturen, men det er svært at vide, hvilke planter der gemmer på de mest interessante stoffer. Ny viden om planternes slægtskab baseret på DNA-analyser kan hjælpe med til at opdage nye potente lægemiddelstoffer.

Af Nina Rønsted, Birger Brodin, Søren B. Christensen, André Huss Eriksson og Anna K. Jäger.

Planter er historisk set den vigtigste kilde til lægemidler, og en fjerdedel af alle nye lægemidler, som registreres i dag, stammer fra planter eller andre naturressourcer. Planternes store potentiale skyldes, at de gennem evolutionen har udviklet mange slags avancerede forsvarsstoffer for at undgå at blive spist eller angrebet af sygdomme, og de biologisk aktive forsvarsstoffer kan i nogle tilfælde udnyttes til udvikling af nye lægemidler.

Identifikation, oprensning og test af farmakologisk aktive naturstoffer er både tidskrævende og dyrt, og derfor er kun en lille del af verdens enorme biodiversitet blevet undersøgt. Fx findes der alene over 250.000 arter af dækfrøede planter. Det er således nødvendigt med nye rationelle metoder til at udvælge de mest lovende planter med henblik på at opdage potentielle lægemiddelstoffer.

Effekt på centralnervesystemet

I vores forskningsgruppe arbejder vi på at finde nye lægemiddelstoffer fra Amaryllisfamilien med aktivitet over for lidelser i centralnervesystemet. Familien indeholder omkring 850 arter og findes primært omkring Middelhavet, i det sydlige Afrika og langs med Andesbjergene i Sydamerika. Til familien hører dog også de hjemlige vintergækker og påskeliljer, samt stueplanter som Clivia, der oprindeligt kommer fra Sydafrika, og arter af den sydamerikanske slægt Hippeastrum, som omkring juletid kan købes under navne som "De fire årstider", "Ridderstjerne" eller blot "Amaryllis". Planter fra Amaryllisfamilien indeholder familiespecifikke alkaloider, som udviser aktivitet i centralnervesystemet. Fx er lægemiddelstoffet galanthamin, som oprindeligt er isoleret fra vintergækker, registreret til brug mod Alzheimers sygdom. En række arter fra familien anvendes også mod mentale lidelser i traditionel medicin, bl.a. i Sydafrika. Men

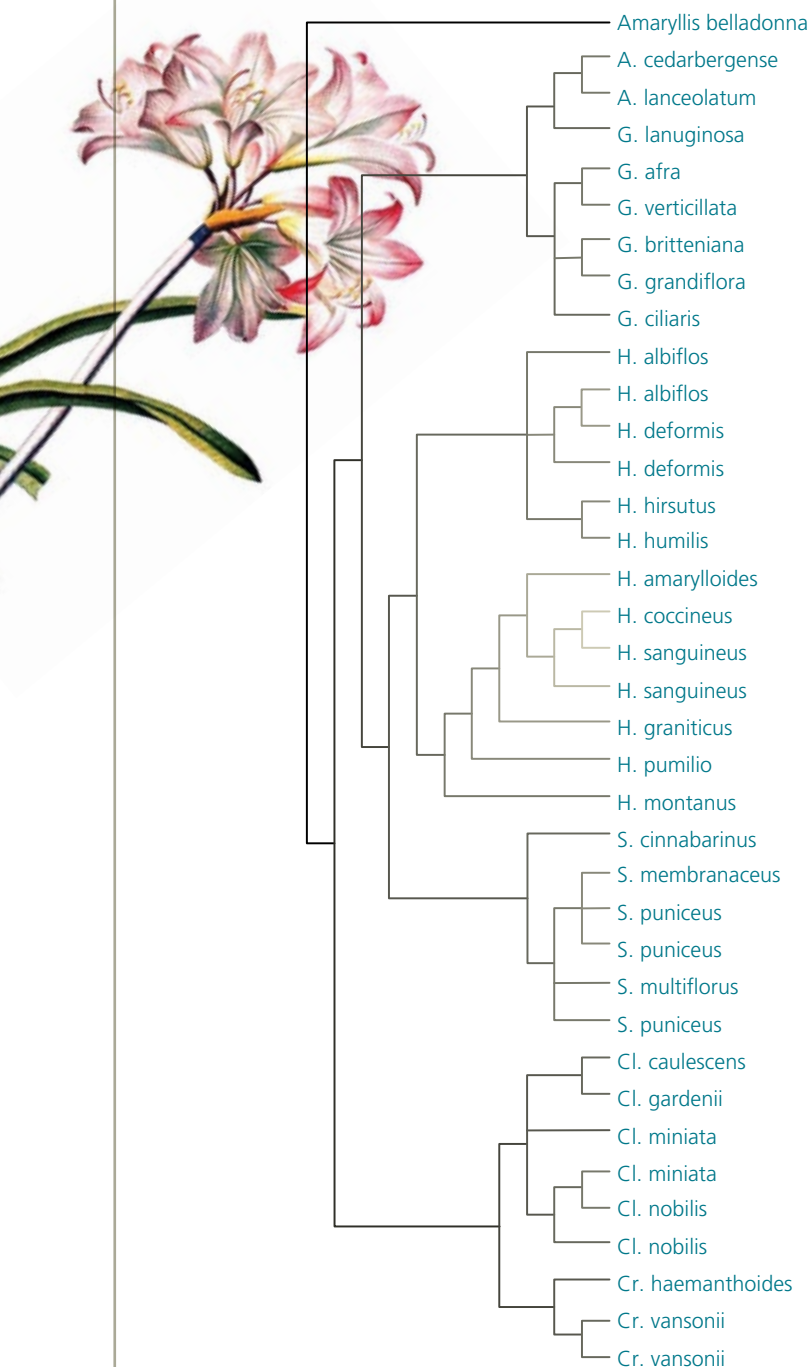
hvilke af de mange hundrede arter indeholder mon de mest lovende potentielle lægemiddelstoffer?

I dag kan genetiske slægtskabsanalyser bruges til at forudsige de forskellige slægters og arters medicinske potentiale og på den måde lede undersøgelserne i den rigtige retning. Fordelen ved at gruppere planterne efter slægtskab er, at det indbyrdes slægtskab kan bruges til at forudsige planternes egenskaber. Hvis en bestemt type naturstoffer er almindelige i en plantefamilie, er der stor sandsynlighed for, at arter fra familien, som endnu ikke er undersøgt, også vil indeholde denne type naturstoffer. Viden om planternes slægtskab kan således være en hjælp til rationel udvælgelse af de mest lovende plantearter til nærmere studier.



Planter fra Amaryllisfamilien indeholder familiespecifikke stoffer, som udviser aktivitet i centralnervesystemet. Vi har vist, at Haemanthus sanguineus og beslægtede arter producerer stofferne coccinin og montanin, som begge er alkaloider med antidepressiv aktivitet. Det mest potente stof, coccinin, har aldrig tidligere været studeret.

DNA-baseret slægtskabstræ for en gruppe sydafrikanske slægter fra Amaryllisfamilien.



**Gethyllis /
Apodolirion**
38 arter

Haemanthus
22 arter

Scadoxus
9 arter

Cryptostephanus
3 arter

Clivia
4 arter

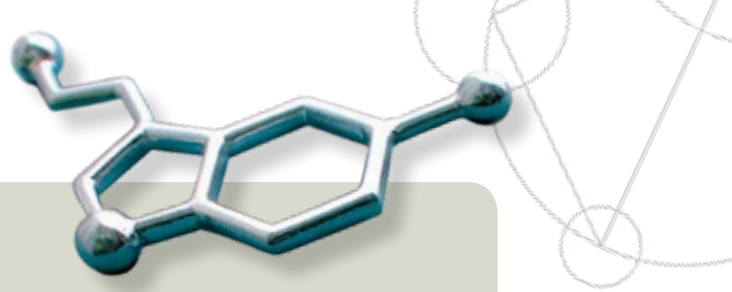
DNA-ANALYSER REVOLUTIONERER BOTANIKKEN

Når man leder efter mulige lægemiddelstoffer i en bestemt plantefamilie, er det rationelt at starte med en indledende screening af et repræsentativt udsnit af familien for biologisk aktivitet og på den måde indsnævre feltet til de mest lovende arter. Men hvad er et repræsentativt udsnit af familien?

I de store klassiske botaniske systemer, som blev udviklet på Linnés tid i midten af 1700-tallet, blev planterne grupperet i familier efter ligheder i udseende som fx antallet af støvdragere eller formen på selve blomsten som fx ærteblomster eller klokkeblomster, men man

vidste ikke noget om planternes genetiske slægtskab.

For 10-15 år siden blev det muligt at sammenligne mindre stykker af planternes DNA-sekvenser og opstille slægtskabstræer for planter og andre levende organismer ved hjælp af sofistikerede computeranalyser. Det viste sig, at over 60 procent af de plantefamilier, man kendte, ikke stemte overens med de nye slægtskabstræer. Botanikerne er stadig i gang med at omklassificere alle planter efter genetisk slægtskab, og det er et kæmpestort arbejde.



FOR LIDT SEROTONIN I HJERNEN VED DEPRESSION

Centralnervesystemet er den del af nervesystemet, som integrerer information til og fra alle dele af kroppen. Systemet fungerer via et komplekst samspil mellem en lang række forskellige signalstoffer, der kan opreguleres eller nedreguleres efter behov.

Ved en række lidelser i centralnervesystemet er der ubalance i sammensætningen af signalstoffer i hjernen. Fx er der en sammenhæng mellem et lavere niveau af stoffet serotonin og depression, selvom mange andre faktorer også spiller ind.

Serotonin-transportøren genoptager normalt serotonin i nervecellerne og reducerer derved mængden af serotonin i synapsen mellem to nerver. Hvis et stof hæmmer transportøren, kan det således øge serotonin-niveauet i hjernen og dermed have en gavnlig virkning på depression. Når vi tester potentielle lægemiddelstoffer som montanin og coccinin i laboratoriet, bruger vi derfor en metode, som måler, om stofferne binder sig til serotonin-transportører isoleret fra rotter

Amaryllisarter mod depression

I samarbejde med forskere fra University of KwaZulu-Natal i Sydafrika har vi produceret et genetisk slægtskabstræ med repræsentanter for alle seks slægter i en sydafrikansk gruppe af Amaryllisplanter, som blandt andet indeholder arter af slægterne Clivia og Haemanthus.

Ekstrakter af planterne blev undersøgt for, om de kunne hæmme et enzym, der har betydning for udviklingen af Alzheimers syge, samt for, om de kunne hæmme genoptagelsen af signalstoffet serotonin i nervecellerne i hjernen. Mangel på serotonin er karakteristisk for depression, og ved at begrænse genoptagelsen øges den mængde af stoffet, som er tilgængelig for nervecellernes indbyrdes kommunikation. Forsøgene viste, at der var stor forskel på de forskellige arters hæmning af genoptagelsen af serotonin. Kun arter fra slægten Haemanthus udviste dosisafhængig aktivitet.

Vi kunne således ved at sammenligne slægtskabstræet med de indledende aktivitetsstudier udvælge Haemanthus som den mest lovende slægt for videre studier. Vi isolerede derpå de aktive stoffer fra tre Haemanthus-arter. Ved hjælp af spektroskopiske teknikker kunne vi opklare strukturerne og identificere stofferne montanin og coccinin, som har næsten samme kemiske struktur.

I en cellekulturmodel i laboratoriet testede vi begge stoffers hæmning af genoptagelsen af serotonin og fandt, at coccinin er dobbelt så aktivt som montanin. Andre forskere har tidligere påvist montanins aktivitet i dyremodeller for depression i rotter, hvilket bekræfter vores resultater. Coccinin har man derimod ikke studeret tidligere.

Over blod-hjerne-barrieren

For at et aktivt stof skal kunne påvirke centralnervesystemet, skal det være i stand til at passere blod-hjerne-barrieren, der består af et næsten uigennemtrængeligt cellelag, som beskytter hjernen mod farlige stoffer. Nogle stoffer kan dog krydse blod-hjerne-barrieren på grund af de rette fysiske kemiske egenskaber, men hvis de er skadelige kan stofferne

blive pumpet tilbage i blodet, inden de når ind til hjernevævet. Det skyldes, at cellerne i blod-hjerne-barrieren har et yderligere forsvarsværk i form af såkaldte transportører, som returnerer uønskede stoffer til blodet.

Hvis et potentielt lægemiddelstof genkendes af disse transportører og ikke får lov at passere blod-hjerne-barrieren, vil man som regel ikke kunne opnå tilstrækkelig høj koncentration af lægemiddelstoffet i hjernen til at give den ønskede effekt. Man regner med at cirka 98 procent af alle lægemidler ikke er i stand til at krydse blod-hjerne-barrieren på grund af ovennævnte forsvarsmekanismer.

Vi undersøgte derfor, om montanin og coccinin genkendes af en vigtig transportør fra blod-hjerne-barrieren, p-glycoprotein-pumpen. I laboratoriet brugte vi en cellemodel, hvor vi måler, om lægemiddelstoffer binder til transportøren. Dette forsøg kan bruges til at forudsige, om stoffer vil blive pumpet ud af hjernen.

Både montanin og coccinin bandt dårligt til transportøren, hvilket betyder, at der er en god chance for at de vil transporteres igennem blod-hjerne-barrieren. Det stemmer også godt overens med, at montanin viser aktivitet i dyreforsøg med rotter.

I laboratiemodellen er coccinin dobbelt så effektiv som montanin til at hæmme nervecellernes genoptagelse af serotonin, og stoffet vil formentlig også kunne passere blod-hjerne-barrieren. Fremtidige forsøg vil vise, om coccinin så er mere aktivt end montanin i dyremodeller og måske har potentiale som udgangspunkt for udvikling af et lægemiddelstof til behandling af depression. Det er tænkeligt, at man yderligere vil kunne forbedre naturstoffernes aktivitet ved at ændre lidt på deres kemiske struktur og undersøge, om resultatet bliver et endnu mere aktivt stof.

Ideen med at tage udgangspunkt i planternes slægtskabstræer baseret på DNA-analyser kan naturligvis også bruges til at lede efter stoffer med potentiale overfor mange andre sygdomme. Der er masser at hente i naturens store skatkammer.

Ph.d. Nina Rønsted er lektor og Steno-stipendiat på Institut for Medicinalkemi

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

Ph.d. Søren Brøgger Christensen er professor på Institut for Medicinalkemi

Ph.d. André Huss Eriksson er videnskabelig medarbejder ved Bioneer:FARMA, Bioneer AIS

Ph.d. Anna K. Jäger er lektor på Institut for Medicinalkemi



Hjernens forsvarsmur kortlagt og kopieret

Blod-hjerne-barrieren er hjernens værn mod giftstoffer, men desværre spærrer den også vejen for næsten alle lægemiddelstoffer til behandling af hjernesygdomme. En kunstig model af hjernens effektive forsvarsmur kan lette udviklingen af ny medicin ved tidligt at vise, om et potentielt lægemiddelstof kan smugles ind i hjernen eller ej.

Af Hans Christian Helms, Helle Sønderby Waagepetersen, Carsten Uhd Nielsen og Birger Brodin

Hjernen er et af menneskets vigtigste og derfor mest beskyttede organer. En række mekanismer i kroppen arbejder på at skabe det optimale miljø for hjernen, så den har en konstant koncentration af salte og næringsstoffer omkring de fintfølende nerveceller. Mængden af salte skal være konstant, fordi saltene deltager i signalprocesserne i hjernen, og koncentrationen af næringsstoffer, især sukkerstoffet glukose, skal være konstant, så hjernen altid har rigeligt med brændstof til de energikrævende signalprocesser.

Derudover skal de sarte nerveceller beskyttes imod giftstoffer, som via kosten er kommet ind i blodet, samt imod blo-

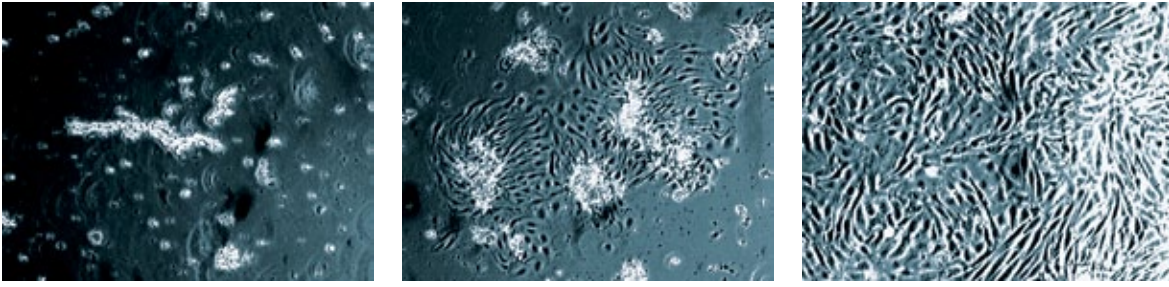
dets egne signalstoffer, der er beregnet til at virke andre steder end i hjernen. Til det formål er hjernen udstyret med en ekstremt effektiv forsvarsmur, blod-hjerne-barrieren, som hindrer indtrængning af uønskede stoffer.

Et kompliceret og effektivt forsvar

Blod-hjerne-barrieren udgøres af de små blodkar, der forsyner hjernen med ilt og næringsstoffer. Blodkarrenes vægge består af endothelceller, som har en vanskelig opgave, fordi de skal tillade hurtig passage af ilt og næringsstoffer til hjernen og samtidig holde salte og andre uønskede stoffer ude. For at kunne udføre arbejdet har endothelcellerne specielle egenskaber. De er bundet ekstremt tæt sammen, og derfor er det stort set umuligt for stoffer at trænge ind i hjernen imellem endothelcellerne. Dette forsvar er dog ikke tilstrækkeligt, fordi mange små fedtopløselige molekyler kan passere direkte gennem cellerne. Derfor er endothelcellerne udstyret med en række transportproteiner, som regulerer passagen af et bredt udsnit af stoffer fra blodet til hjernen. Nogle af disse transportører optager essentielle næringsstoffer og lader dem passere ind i hjernen, mens andre forhindrer adgangen for uønskede stoffer ved konstant at pumpe dem tilbage



Arbejdet med modellen af blod-hjerne-barrieren starter på slagteriet. Kraniet åbnes på en nyslaget kalv **1**, hvorefter hjernen tages ud **2** og fragtes til universitetet. Her skræbes det yderste lag, den grå substans, af hjernen **3**. Den grå substans homogeniseres, og blodkarrene fanges på et filter. Til sidst skylles blodkarrene af filtret, behandles med en enzymcocktail og nedfryses til senere brug i laboratoriet.



De isolerede blodkar udsås på bunden i dyrkningsflasker (tv.), hvor de ses som lysende fragmenter. Efter tre dage i flaskerne ses de første endothelceller som små mørke øer omkring blodkarrene (i midten), og efter fem-syv dage fylder endothelcellerne det meste af flaskens bund (th.). Endothelcellerne kan nu løsnes og bruges til dyrkning af cellekulturer, som udgør en model af blod-hjerne-barrieren.

til blodet. Som et sidste forsvar er endothelcellerne udstyret med en hær af enzymer, der omdanner fedtopløselige stoffer, som ellers ville kunne trænge igennem cellerne, til mere vandopløselige stoffer, som kun kan forsøge at passere imellem cellerne.

Endothelcellerne kan ikke klare alle disse krævende opgaver alene. Derfor er de omgivet af en rand af andre celletyper, især pericytter og astrocytter, som sender signaler til endothelcellerne. Uden denne kommunikation ville endothelcellerne miste deres specielle barriereegenskaber, og blod-hjerne-barrieren ville bryde sammen.

Blod-hjerne-barrieren er således en ekstremt kompleks og effektiv barriere, som vi normalt nyder godt af. Men når det drejer sig om at behandle sygdomme i hjernen med medicin, er blod-hjerne-barrieren en nærmest uovervindelig forhindring. Lige så effektiv som barrieren er til at beskytte hjernen mod giftstoffer, lige så effektiv er den til at holde lægemiddeltoffer ude. Man anslår, at over 95 procent af alle afprøvede kandidatstoffer bremses af blod-hjerne-barrieren, hvorved størstedelen af alle nyudviklede stoffer til behandling af hjernesygdomme fejler i udviklingsforløbet frem mod et færdigt lægemiddel. Derfor er der behov for at udvikle metoder, som på et meget tidligt tidspunkt i udviklingsprocessen kan

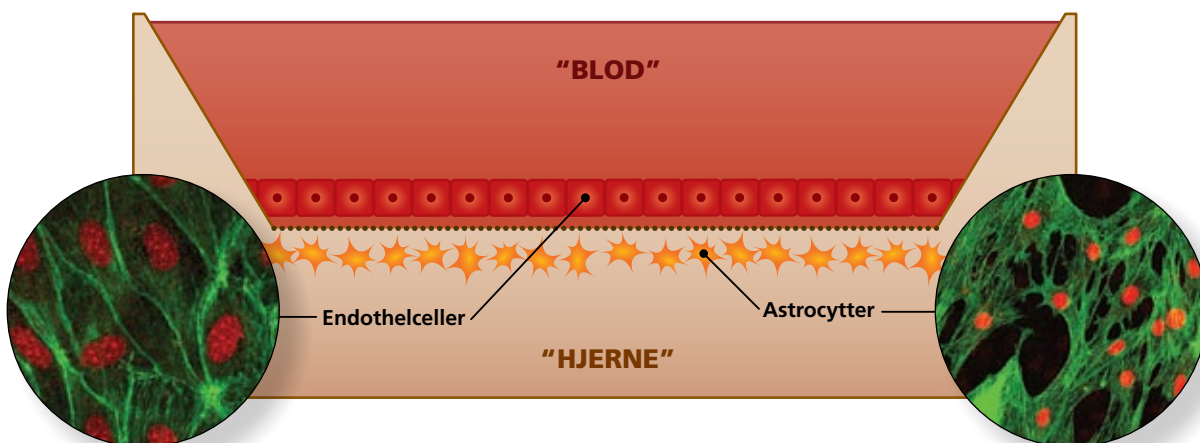
vise, om et lægemiddelstof har evnen til at trænge gennem blod-hjerne-barrieren.

Dyrkning af tætte modelvæv

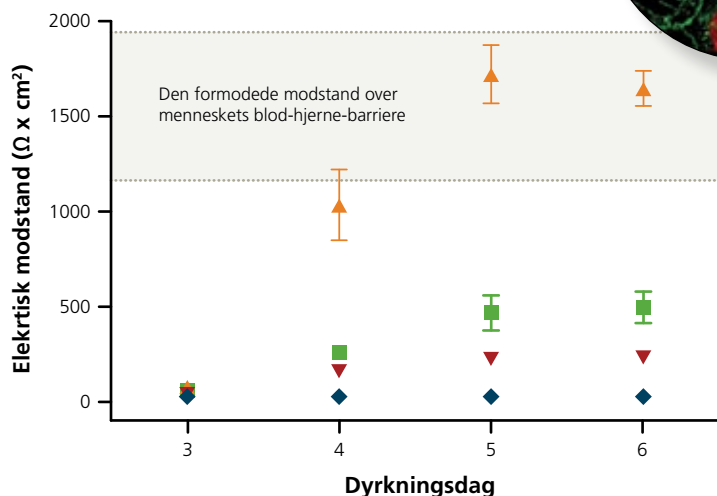
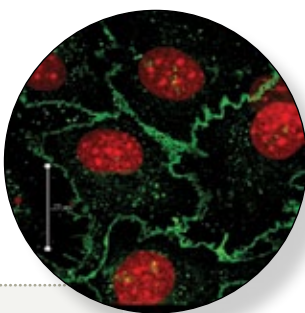
Der eksisterer på nuværende tidspunkt en række modelvæv, som er opdyrket kunstigt i laboratoriet. Modelvævene har nogle af de samme egenskaber som endothelcellerne i hjernen, men endnu har det ikke været muligt at udvikle modeller, som kan benyttes til industriel screening. Det helt store problem er, at det har været vanskeligt at få endothelceller til at danne tætte cellelag i laboratoriet, hvorved blod-hjerne-barrierens essentielle tæthed ikke kan efterlignes.

I forskningsgruppen har vi startet et projekt med at lave bedre cellemodeller af blod-hjerne-barrieren. Som udgangspunkt benytter vi blodkar fra kalvehjerner, som skaffes fra nyslagte kvæg. Blodkarrene placeres i dyrkningsflasker, hvor endothelcellerne får de bedst mulige vækstvilkår og forsynes med et næringsmedium. Når blodkarrene har sat sig fast i flaskerne, begynder endothelcellerne langsomt at vokse ud, og med tiden dækker de hele dyrkningsoverfladen. Ved hjælp af enzymatisk behandling løsnes endothelcellerne, som derefter kan bruges til at lave cellekulturer.

Som tidligere nævnt kan endothelcellerne ikke alene opret-



En skematisk opsætning af modellen af blod-hjerne-barrieren. Endothelceller og astrocytter dyrkes sammen på et filter forsynet med porer. Endothelcellerne dyrkes på oversiden af filtret, hvor de kan danne en tæt barriere, mens astrocytterne dyrkes under filtret, hvorfra de kan sende signaler til endothelcellerne. Det øverste kammer repræsenterer blodbanen, mens det nederste kammer repræsenterer hjernen. Endothelcellerne (tv.) vokser i et ordnet og tæt monolag, mens astrocytterne (th.) ikke udviser samme orden og ikke danner et tæt lag.



Elektrisk modstand målt over blod-hjerne-barrieremodellen som funktion af dyrkningsdage. ◆ = astrocyt monolag, ▼ = endothelcelle monolag, ■ = endothelceller og astrocytter i co-kultur under standardbetingelser, ▲ = endothelceller og astrocytter i co-kultur med optimeret dyrkningsmedium. Området mellem de stiplede linjer indikerer den estimerede modstand over menneskets blod-hjerne-barriere. Det ses, at kun vores optimerede model opnår modstande svarende til dette niveau.

ELEKTRISKE MÅLINGER VISER, AT MODEL-BARRIEREN ER TÆT

Elektriske målinger viser, hvor tæt vores kunstige blod-hjerne-barriere er. Ved målingerne placerer vi en elektrode på hver side af cellelaget og registrerer, hvor stor en modstand vævet yder for bevægelse af salte i opløsningen. Tætheden af vævet udtrykkes som elektrisk modstand – jo tættere, jo større modstand.

Den præcise elektriske modstand over blod-hjerne-barrieren i mennesker kendes ikke, men den anslås at ligge i området 1000–2000 ohm x cm², og målet er derfor at udvikle en cellemodel med samme tæthed. De fleste tidligere forsøg med lignende modeller af blod-hjerne-barrieren har givet modstande i størrelsesordenen 50–300 ohm x cm².

I vores arbejde har vi identificeret en række faktorer, der øger den kunstige blod-hjerne-barrieres tæthed, heriblandt kalvenes alder ved isolering af cellerne og sammensætningen af dyrkningsmedierne. Ved at optimere begge dele er det lykkedes os at opnå modstande på op til 1600 ohm x cm²; altså en barriere med en tæthed, der nærmer sig menneskets blod-hjerne-barriere.

holde blod-hjerne-barrieren. Den næstvigtigste celletype er astrocytterne, som omringer blodkarrene i hjernen og forsyner endothelcellerne med signaler, og vi dyrker derfor endothelcellerne sammen med astrocytter fra rottehjerner. Astrocytterne placeres på undersiden af små porøse filtre, hvor de repræsenterer hjernesiden af barrieren, og endothelcellerne placeres på oversiden af filterne, hvor de repræsenterer blodsiden. Filtret dækkes med specielle vækstmedier, og astrocytterne udsender stoffer, som får endothelcellerne til at udvikle sig og blive tætte. Når endothelcellerne har dannet et sammenhængende lag, kan man undersøge transporten af lægemiddelstoffer gennem cellelaget og benytte resultaterne til at forudsige, hvorvidt potentielle lægemiddelstoffer vil kunne trænge gennem blod-hjerne-barrieren. Vi har opnået særdeles gode resultater med at fremdyrke modelvæv, som – modsat tidligere modeller – nærmer sig blod-hjerne-barrierens tæthed.

Optimeringen af dyrkningsmediet har en særlig stor effekt på barrierens tæthed, hvilket skyldes en opregulering af proteinet Claudin-5 i endothelcellerne. Claudin-5 er et særlig vigtigt protein i blod-hjerne-barrieren, fordi det binder cellerne tæt sammen med en slags molekylær lynlås, der sidder i et bælte

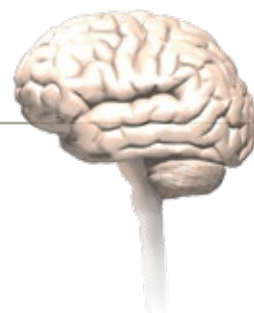
rundt om cellerne og forbinder dem med nabocellerne. Det kan være en særdeles brugbar viden, fordi meget tyder på, at ændringer i dette protein er af stor vigtighed for blod-hjerne-barrierens tæthed og dermed dens effektivitet.

Fokus på transportører og enzymer

Selv om det er lykkedes at opnå en model, der efterligner blod-hjerne-barrierens tæthed, er vi endnu ikke i mål. Modellen skal nemlig også udstyres med alle de rigtige transportproteiner og enzymer, før den er klar til at blive brugt til industriel screening af potentielle lægemiddelstoffer til behandling af hjernesygdomme.

Næste trin i projektet er derfor at bestemme tilstedeværelsen og mængden af disse transportører og enzymer. Dette bliver i øjeblikket undersøgt ved hjælp af molekylærbiologiske metoder i modellen samt studier af, hvordan cellelaget transporterer lægemiddelstoffer. Indtil videre har vi fundet en række af de vigtige transportører, men arbejdet er langt fra slut. Det kræver en lang række undersøgelser med kendte lægemiddelstoffer, både stoffer, der bør passere barrieren, og stoffer som ikke bør, før vi endeligt kan konkludere, at det er lykkedes os at kopiere hjernens effektive forsvarsmur.

Cand.pharm. Hans Christian Helms er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Helle Sønderby Waagepetersen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Birger Brodin er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi



Antidepressive lægemidler – nu i 3D



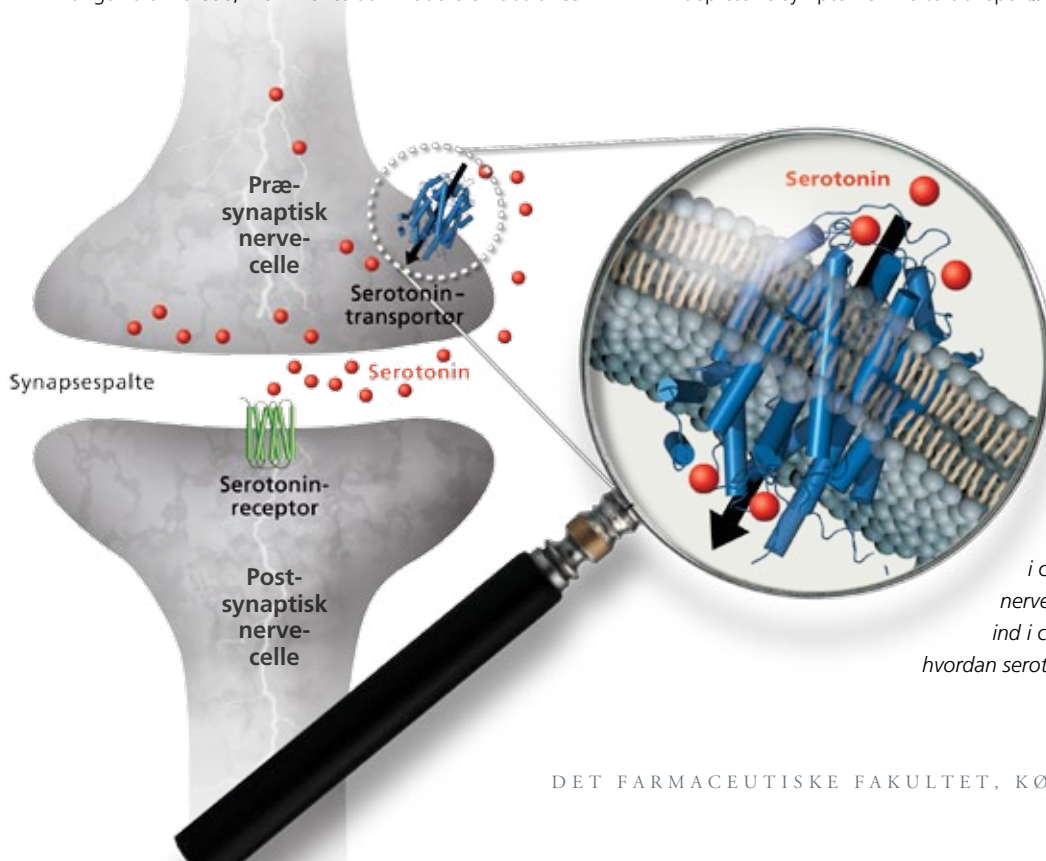
I mere end 40 år har antidepressive lægemidler virket ved at blokere transportører i hjernen, som påvirker vores humør, søvn, sexdrift og appetit. Hidtil har man manglet kendskab til, hvordan medicinen virker på molekylært niveau. Nye tredimensionelle modeller af virningsmekanismen kan bruges til at skræddersy fremtidens lægemidler mod depression.

Af Jacob Andersen, Lena Sørensen, Kristian Strømgaard og Anders S. Kristensen

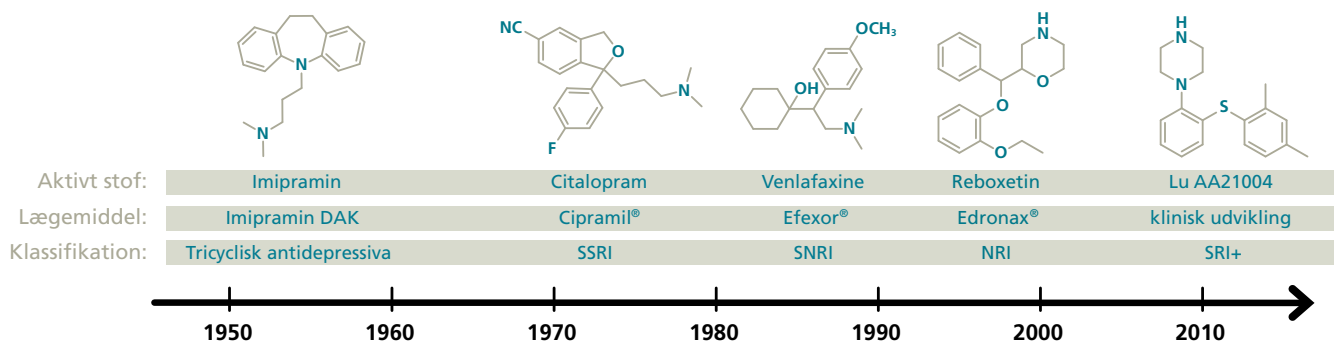
Verdenssundhedsorganisationen WHO rangerer depression som en af de mest invaliderende sindslidelser med store personlige og samfundsøkonomiske omkostninger til følge. Det er også en af de mest almindelige psykiske sygdomme. Hver sjette dansker rammes i løbet af livet af en depression. De biologiske mekanismer bag årsagen til depression er langt fra afklarede, men menes at inkludere en ubalance i

hjernens brug af signalstofferne serotonin og noradrenalin. Hjernens nerveceller kommunikerer med hinanden ved at udsende og modtage et væld af signalstoffer, og kommunikationen foregår i synapser, som er mellemrummet mellem to nabonerveceller. Signalstofferne udsendes i pulser fra den presynaptiske nervecelle, hvorefter de udøver deres effekt ved at aktivere receptorer på den postsynaptiske nervecelle. Hver puls afsluttes ved, at signalstofferne transporteres tilbage ind i den presynaptiske nervecelle via transportører, som sidder i cellemembranen.

Et for lavt niveau af serotonin og noradrenalin i hjernen menes at kunne bidrage til udvikling af depression, og næsten alle antidepressive lægemidler modvirker dette ved at blokere de transportører, som fragter serotonin og noradrenalin tilbage ind i den presynaptiske nervecelle. Når transporten af de to signalstoffer blokeres, øges mængden af dem i synapsespalten, og dette kan medføre en lindring af de depressive symptomer. De to transportører, som er mål for



Til venstre ses en synapse, hvor serotonin fungerer som signalstof. Signalstofferne frigives fra den presynaptiske nervecelle og udøver deres effekt ved at aktivere receptorer på den postsynaptiske celle. Signalstofferne fjernes fra synapsespalten af serotonin-transportøren, som sidder i cellemembranen på den presynaptiske nervecelle, og som pumper signalstofferne ind i cellen igen. Til højre vises en model af, hvordan serotonin-transportørerne menes at se ud.



Historisk tidslinie med antidepressive lægemidler klassificeret efter deres farmakologiske profil. De tricycliske antidepressiver som imipramin var de første lægemidler mod depression. De blokerer transportørerne for serotonin og noradrenalin, men har også effekt på mange andre proteiner i hjernen, hvilket medfører alvorlige bivirkninger. Efterfølgende er antidepressive lægemidler med en skærpet selektivitetsprofil blevet udviklet. Først kom der lægemidler som citalopram, som selektivt blokerer serotonin-transportøren (også kaldet Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors eller SSRI'er). Derefter blev der udviklet stoffer som venlafaxine, som blokerer transportørerne for både serotonin og noradrenalin (også kaldet Serotonin and Noradrenalin Re-uptake Inhibitors eller SNRI'er). Nyere stoffer som reboxetine blokerer selektivt noradrenalin-transportøren (også kaldet Noradrenalin Re-uptake Inhibitors eller NRI'er). Udover at blokere transportører vil fremtidens antidepressive lægemidler sandsynligvis også have effekt på udvalgte receptorer i hjernen. Disse stoffer kaldes ofte Serotonin Re-uptake Inhibitors+ (eller SRI+) og stoffet Lu AA21004, som blokerer serotonin-transportøren og samtidig påvirker serotonin-receptorerne, er et eksempel.

antidepressive lægemidler, er begge proteiner, som er indlejret i nervecellens membran, og de kaldes henholdsvis for serotonin-transportøren og noradrenalin-transportøren.

Lægemidler til behandling af depression

Blokering af de to transportører har været behandlingsprincippet for depression siden begyndelsen af 1950'erne. De første antidepressive lægemiddelstoffer var de tricycliske antidepressiver, som stadig bruges til behandling af svære depressioner, selv om stofferne er forbundet med bivirkninger, fordi de også påvirker en række andre proteiner i hjernen. Derfor har man i de senere årtier fokuseret på stoffer, som i langt højere grad er selektive for de to transportører. I dag er de mest anvendte antidepressive lægemidler baseret på stoffer, som selektivt blokerer serotonin-transportøren; nogle eksempler er Fontex® og danske Cipralax®. Disse lægemidler kendes under den misvisende betegnelse "lykkepiller", selv om de absolut ingen lykkebringende effekt har på raske mennesker, men udelukkende hjælper depressive patienter. Der findes også antidepressive lægemidler, som selektivt blokerer noradrenalin-transportøren eller begge transportører samtidig. Derudover er det danske medicinalfirma H. Lundbeck A/S på vej med et nyt lægemiddel mod depression, som ud over at blokere serotonin-transportøren også påvirker de postsynaptiske nervecellers receptorer for serotonin.

Tredimensionel model af transportørerne

På trods af, at antidepressive lægemidler har været benyttet i årtier ved man forbavsende lidt om, hvordan lægemiddelstofferne vekselvirker med transportørerne for serotonin og noradrenalin på det molekylære niveau. Den tredimensionelle struktur af de to humane transportører kendes ikke, men i 2005 lykkedes det ved hjælp af røntgenstråling at bestemme strukturen af en lignende transportør

fra en bakterie, og derfor kender man denne transportørs præcise tredimensionelle form og atomare opbygning. Da ligheden mellem den bakterielle transportør og de to humane transportører er stor, kan man ved at kombinere aminosyresekvensen af de humane transportører med strukturen af bakteriens transportør få en ide om den overordnede, tredimensionelle opbygning af serotonin-transportøren og noradrenalin-transportøren. Man kan med andre ord lave realistiske modeller af de to menneskelige transportører ud fra kendskabet til den bakterielle transportør.

Bindingsstedet for antidepressive lægemidler

For at få større indsigt i hvor og hvordan antidepressive lægemidler binder i serotonin-transportøren, besluttede vi at studere bindingslommen for lægemiddelstoffet escitalopram i detaljer. Escitalopram er det aktive stof i det antidepressive lægemiddel Cipralax®, som er en videreudvikling af citalopram, som i 1970'erne blev syntetiseret af H. Lundbeck A/S og markedsført som Cipramil®. Escitalopram har bedre antidepressiv virkning, og kom på markedet for ti år siden. Første trin i vores studier var at bygge en model for serotonin-transportøren, der tillod os at studere de atomare detaljer i proteinet. Vores interesse rettede sig først og fremmest mod bindingslommen, som er det område i transportøren, hvor serotoninmolekylet binder sig. Man mener nemlig, at bindingen af escitalopram i denne lomme forhindrer transportøren i at binde og transportere serotonin. Vi testede hypotesen gennem en omfattende mutationsanalyse af området omkring bindingslommen, hvor vi lavede mere end 70 forskellige mutationer i genet for transportøren. Derpå undersøgte vi, hvad de resulterende strukturelle ændringer i proteinet betød for escitaloprams evne til at sætte sig fast i bindingslommen og blokere transportfunktionen. Vi identificerede på den måde seks aminosyrer i transportøren, som er særdeles vigtige for genkendelsen af escitalo-

pram, hvilket ses af, at ændringer i disse seks aminosyrer har en dramatisk effekt på lægemiddelstoffets evne til at binde sig til transportøren. Aminosyrerne er alle placeret centralt i bindingslommen, og resultaterne gav os derfor en entydig indikation på, hvor i transportøren escitalopram bindes.

Escitalopram i bindingslommen

I samarbejde med Biostrukturgruppen på Det Farmaceutiske Fakultet udførte vi herefter avancerede computerberegninger for at undersøge, hvordan escitalopram kan placeres i bindingslommen i serotonin-transportøren, og bestemme, hvilke dele af lægemiddelstoffet der veskelvirker med specifikke aminosyrer i bindingslommen. Escitalopram kunne i følge beregningerne placeres på fire forskellige måder i bindingslommen.

For at opklare, hvilken placering der var den mest sandsynlige, undersøgte vi efterfølgende en række stoffer, som strukturelt er nært beslægtede med lægemiddelstoffet. Vi fandt at nogle af de voldsomme effekter på bindingsevnen, som vi havde fundet ved at indføre mutationer i de seks vigtige aminosyrer, kunne ophæves ved at modificere specifikke dele af escitaloprams strukturskelet. På den baggrund kunne vi sammenkæde, hvilke dele af escitalopram der vekselvirkede med specifikke aminosyrer i bindingslommen. Kun én af de fire foreslåede modeller for, hvordan escitalopram kan placeres i bindingslommen, stemte overens med disse resultater. Derfor kan vi med stor sandsynlighed udpege netop den model, som viser, hvordan escitalopram binder til transportøren.

Hvad kan det bruges til?

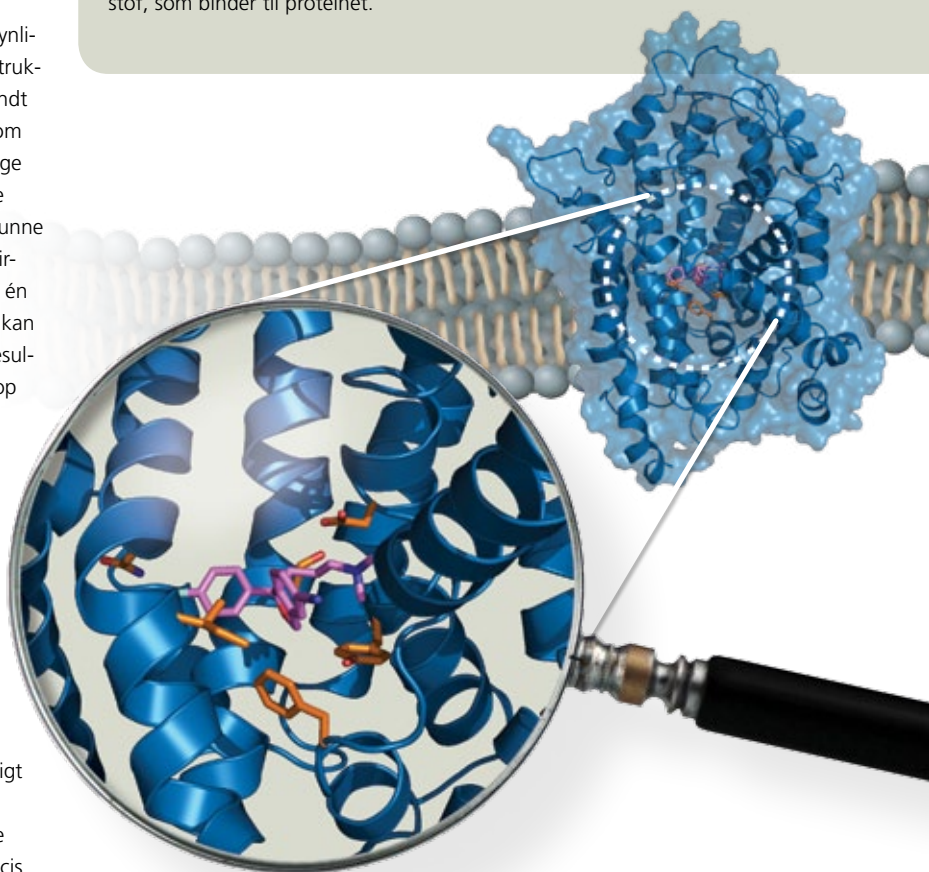
Vores endelige model giver et unikt indblik ind i de molekylære detaljer for, hvordan escitalopram binder sig til serotonin-transportøren. En sådan model er af stor værdi, når man ønsker at designe stoffer, som blokerer transportøren endnu bedre end escitalopram, fordi man præcist forstår, hvilken rolle de enkelte dele af det kendte lægemiddelstof spiller for bindingen til transportøren, og i hvilke positioner det kan være gunstigt at lave ændringer på molekylet.

Desuden kan man sammenligne modellen med lignende modeller af noradrenalin-transportøren og opnå en præcis forståelse af, hvorfor escitalopram blokerer serotonin-transportøren men ikke noradrenalin-transportøren. Denne viden kan udnyttes som et rationelt grundlag til at skræddersy nye stoffer, som enten kun virker på den ene af transportørerne eller på begge samtidig, hvilket kan ende med at blive et nyt – og forbedret – lægemiddel mod depression.

MUTATIONSANALYSE AF PROTEINER

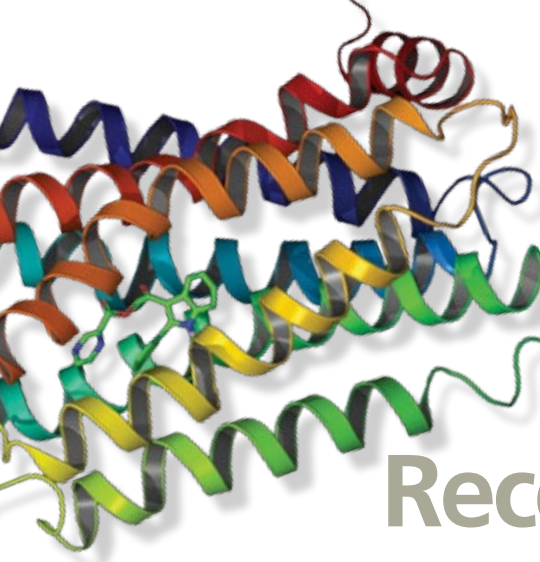
Et protein er bygget op af en lang kæde af aminosyrer, og serotonin-transportøren er eksempelvis 630 aminosyrer lang. Når man studerer strukturen og funktionen af de store og komplekse proteinmolekyler, ønsker man ofte at undersøge betydningen af én specifik aminosyre, som kan have afgørende betydning for hele proteinets funktion. På hver position i aminosyrekæden kan proteiner indeholde 20 forskellige aminosyrer. Hver aminosyre har en unik størrelse og unikke egenskaber og påvirker derigennem proteinets form og funktion.

Rækkefølgen og identiteten af aminosyrerne i et givent protein er bestemt af den genetiske kode. Ved hjælp af genteknologi kan man relativt nemt ændre koden, så man opnår en mutation i proteinet – dvs. at en bestemt aminosyre udskiftes med en af de 19 andre aminosyrer, som er indeholdt i den genetiske kode. På den måde kan man få information om funktionen af den udvalgte aminosyre, fx om aminosyren har betydning for genkendelsen af et stof, som binder til proteinet.



Figuren viser en model af serotonin-transportøren i kompleks med escitalopram. Lægemiddelstoffet er vist i violet, og det binder inde i kernen af det blå transportørprotein. Til venstre zoomes der ind på bindingslommen. De seks aminosyrer, som er meget vigtige for escitaloprams evne til at blokere transportøren er vist som orange stænger.

Ph.d. Jacob Andersen er postdoc på Institut for Medicinskemi
Cand.pharm. Lena Sørensen er ph.d.-studerende på Institut for Medicinskemi
Ph.d. Kristian Strømgaard er professor på Institut for Medicinskemi
Ph.d. Anders S. Kristensen er lektor på Institut for Medicinskemi



Kemo- genomik:

Receptoren set fra lægemiddelstoffets synspunkt

I moderne lægemiddeludvikling screener man typisk store biblioteker med tusindvis af stoffer, og efter flere års søgen finder man et stof, der er egnet til klinisk afprøvning. En ny metode, kemogenomik, opdager hurtigt potentielle kandidater. Her identificerer man kemiske grundstrukturer, som kan passe ind i bindingslommerne på mange forskellige receptorer.

Af David E. Gloriam, Petrine Wellendorph, Lars D. Johansen, Daniel Sejer Pedersen og Hans Bräuner-Osborne.

I jagten på nye lægemiddelstoffer forsøger forskere ofte at forudsige, hvilke kemiske stoffer der binder sig til netop den receptor, som de ønsker at påvirke, fordi receptoren er involveret i en bestemt sygdom og derfor er et potentielt mål for nye lægemidler. Normalt tager forudsigelserne udgangspunkt i kendte lægemiddelstoffer med virkning på beslægtede receptorer, hvilket sker ud fra en formodning om, at beslægtede receptorer binder beslægtede stoffer.

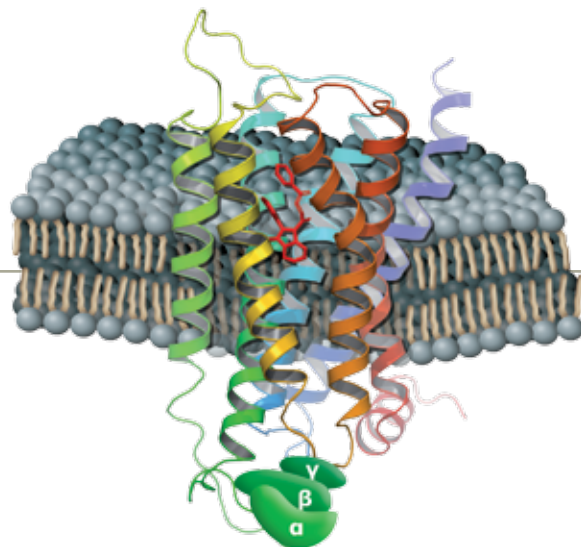
G-PROTEINKOBLEDE RECEPTORER ER CELLERNES OMSTILLINGSBORD

G-proteinkoblede receptorer er placeret i cellemembraner, hvor de udgør omstillingsbordet mellem det ydre miljø i kroppen og cellernes indre.

G-proteiner aktiveres i et væld af situationer: Når øjet reagerer på lys, når smagen breder sig på tungen, når næsens duftceller indsnuser lugte, når tankerne opstår i hjernens nerveceller, når hjertet slår, og når musklerne spændes eller slappes. Samtidig er G-proteiner involveret i mange sygdomme og dermed et centralt mål for lægemidler.

G-proteinkoblede receptorer har alle en fælles tredimensionel opbygning, som består af syv alfahelixkæder, der tilsammen danner en bindingslomme i cellemembranen.

Imidlertid kan slægtskabet mellem receptorer defineres på flere forskellige måder, hvilket kan føre til meget forskellige resultater. Fx vil en farmakolog sige, at receptorer, der binder samme naturlige signalstof, er beslægtede, mens en bioinformatiker vil vurdere slægtskabet mellem receptorer ud fra ligheder mellem receptorenes aminosyresekvenser, som er genetisk bestemte og afstedkommet af den evolutionære udvikling. Desværre er ingen af de to tilgange særligt brugbare inden for medicinsk kemi, fordi man normalt benytter syntetisk fremstillede stoffer frem for naturstoffer. Metoderne er i særdeleshed uegnede, når det gælder stoffer, der binder til andre steder i receptoren end de naturligt forekommende signalstoffer.



Figuren viser den tredimensionelle struktur af en G-proteinkoblet receptor, som sidder i cellemembranen. Receptoren har syv transmembrane kæder, kaldet alfahelixer, som er vist med forskellige farver. Bindingslommen sidder en trediedel nede i receptoren, hvori stoffet 2-fenyl-indol (rød) er indsat. Når et naturligt signalstof binder til lommen, aktiveres et G-protein (grønt) på undersiden af membranen.

En ny metode, kemogenomik, kan med succes bruges på syntetiske stoffer. Her kombinerer man de kemiske strukturer af farmakologisk aktive stoffer med genomiske data; typisk receptorproteiners aminosyresekvenser. Kemogenomik adskiller sig fra bioinformatik ved specifikt at fokusere på den del af receptoren, som binder til stofferne – bindingslommen – frem for hele receptoren.

På den måde ser vi receptoren ud fra lægemiddelstoffets synspunkt, og det giver mere præcise forudsigelser af, hvilke type stoffer som binder til hvilke receptorer. Dette er særlig relevant for genetisk fjernt beslægtede receptorer, fordi kemogenomik er den eneste fremgangsmåde, som kan forklare og forudsige, hvorfor nogle stoffer binder til mange typer receptorer, som ikke umiddelbart er beslægtede.

Kemiske hovednøgler

Moderne lægemiddeludvikling starter ofte med, at forskere tester titusinder af tilfældigt udvalgte kemiske stoffer. Ofte tager det flere år før man finder et stof med reelt potentiale til klinisk afprøvning. Kemogenomiske forudsigelser kan bruges til at speede processen op ved at indsnævre stofbibliotekerne til en størrelse på få hundrede stoffer, som har langt større chance for at være aktive end de tilfældigt udvalgte molekyler i store stofbiblioteker.

Det gælder især for biblioteker baseret på små kemiske molekyler, som er kendt for at binde til mange forskellige receptorer, en slags kemiske hovednøgler. Her anvendes kemogenomik allerede med stor succes. Traditionelt er kemiske hovednøgler blevet testet mere eller mindre tilfældigt på forskellige receptorer, uden at man på forhånd havde en klar formodning om, at de ville kunne binde til den givne målreceptor. Med kemogenomik er vejen banet for at målrette udvælgelsen af kandidatstoffer og på den måde skyde genvej i lægemiddeludviklingen.

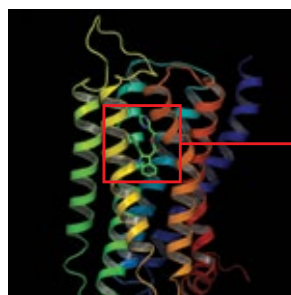
Mønstre i receptors bindingslommer

Kemogenomik er baseret på den hypotese, at receptorer, der binder de samme hovednøgler, har beslægtede bindingslommer med hensyn til kemiske egenskaber som form og ladning. For familier af receptorer, som har den samme overordnede tredimensionelle struktur, er det muligt direkte at sammenligne de aminosyrer, der danner bindingslommen i de forskellige undertyper, som binder de samme kemiske hovednøgler.

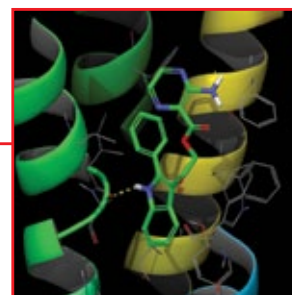
Ud fra denne viden kan forskere identificere aminosyremønstre, som er ansvarlige for binding af de forskellige dele af en kemisk hovednøgle. Et eksempel herpå er G-proteinkoblede receptorer, som tilhører den klasse af proteiner, som oftest udgør målet for lægemiddelstoffer.

Ved at sammenholde layoutet for bindingslommerne for hver af de mange G-proteinkoblede receptorer med hvilke kemiske hovednøgler, der kan binde til hvilke receptorer, opnår man efterhånden et billede af, hvilket layout der fører til binding af hvilke typer stoffer.

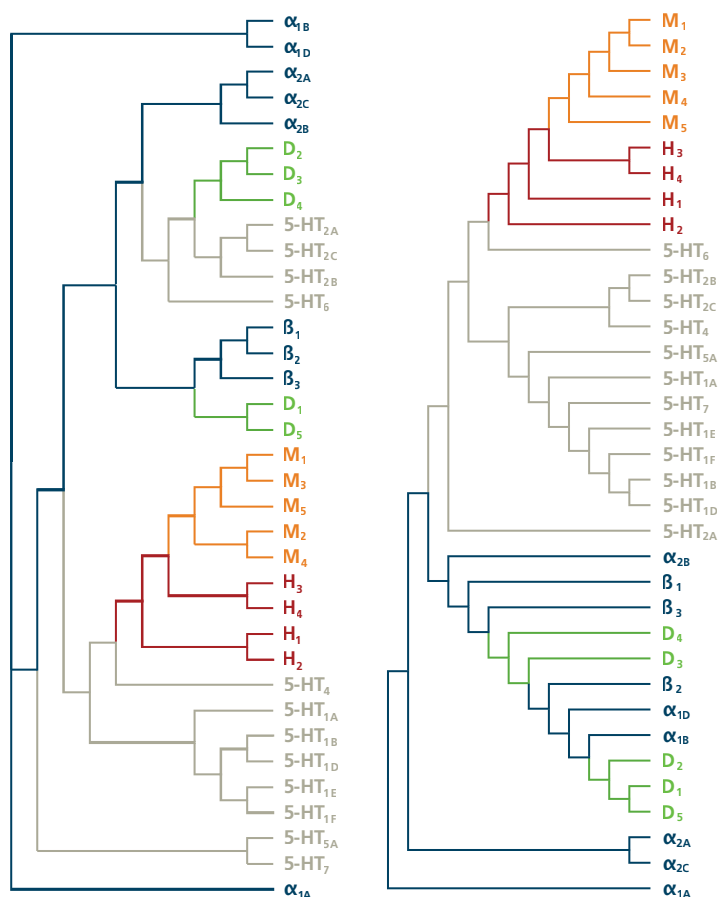
Når forskere står med en ny receptor, kan man nu se på de aminosyrer, som danner bindingslommen, og forudsige



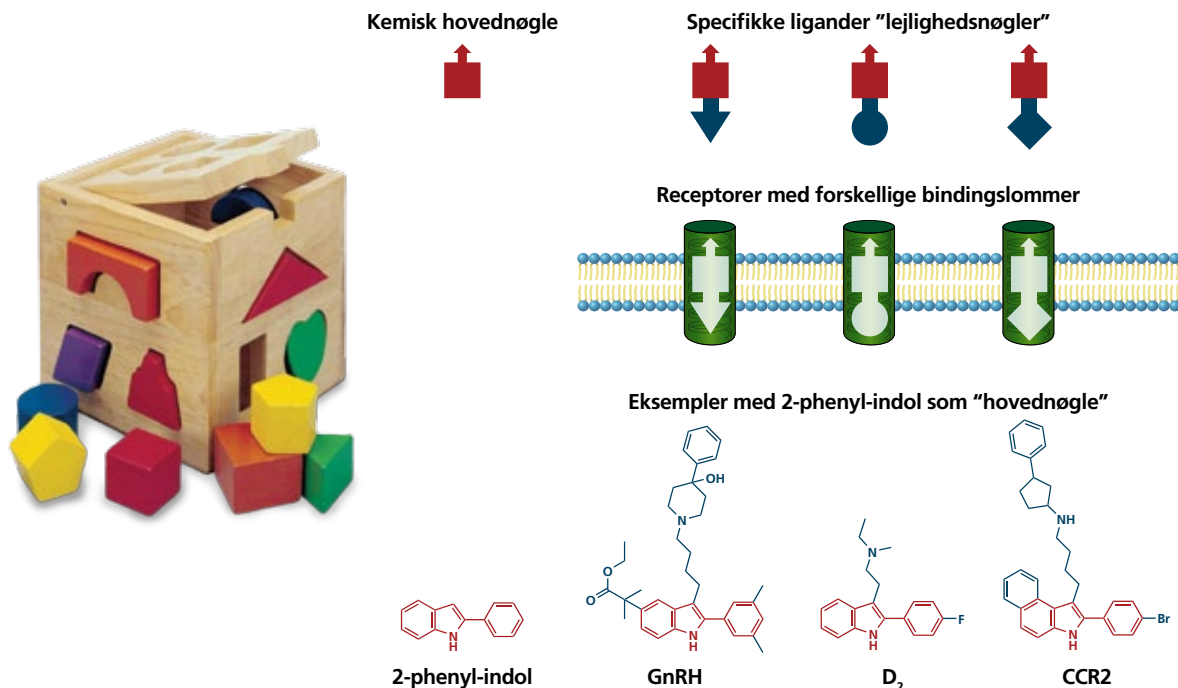
Bioinformatisk evolutionært slægtskab



Kemogenomisk bindingslomme-slægtskab



Slægtskab mellem receptorer kan analyseres bioinformatisk (tv.) og kemogenomisk (th). Ved en bioinformatisk analyse sammenlignes hele aminosyresekvensen i receptorproteinerne, mens man ved kemogenomisk analyse kun sammenligner sekvensen af de aminosyrer, som danner bindingslommen, hvortil et potentielt lægemiddelstof skal binde. Disse analyser fører til forskellige fylogenetiske træer, som ud fra hvert sit udgangspunkt beskriver, hvilke undertyper af en receptorfamilie, der er tættest beslægtet; jo kortere forgreninger, jo tættere slægtskab. I begge træer vises analyser af en række G-proteinkoblede receptorer, der binder signalstofferne adrenalin (blå), dopamin (grøn), serotonin (grå), acetylcholin (orange) og histamin (rød).



En kemisk hovednøgle har en grundstruktur (rød), som går igen i forskellige stoffer, der binder til forskellige receptorer. De kemiske modifikationer (blå) gør stofferne til specifikke lejlighedsnøgler, som hver især kun passer til en bestemt bindingslomme. Nederst er hovednøglen 2-phenyl-indol vist sammen med tre lejlighedsnøgler, som binder specifikt til tre forskellige receptorer: Gonadotropin releasing hormone-receptoren (GnRH), D₂ dopamin-receptoren og chemokin CCR2-receptoren.

hvilken type kemisk hovednøgle, der passer i lommen. De kemiske hovednøgler har en fælles grundstruktur, som genkendes af mange receptorer, men ved at tilføje sidekæder med variabel struktur kan man ofte ændre stofferne til kun at passe i netop den målreceptor, som man vil påvirke med et lægemiddelstof. Ved kemisk modifikation kan man med andre ord lave hovednøglerne om til lejlighedsnøgler, som kun påvirker den ønskede receptor. Sådanne specifikke lægemiddelstoffer er fordelagtige, fordi de som regel medfører færre bivirkninger end uspecifikke stoffer.

Kemogenomik i praksis

For fem år siden identificerede vi en ny G-proteinkoblet receptor, kaldet GPRC6A. Receptorens funktion er stadig ukendt, og for at afkode funktionen er det nødvendigt at udvikle stoffer, der selektivt kan hæmme receptoren. Ved at sammenholde aminosyresekvensmønstrene i bindingslommen for GPRC6A med kendte kemiske hovednøgler, fandt vi en match i form af en kemisk struktur, som kaldes 2-phenyl-indol.

På basis af en kemogenomisk forudsigelse købte vi nu et mindre bibliotek med 32 stoffer med et fælles 2-phenyl-indol-grundskelet, men med forskellige sidekæder. Stoffbiblioteket blev testet på vores receptor GPRC6A, og ligeledes på to andre receptorer, som også binder hovednøglen. På den

måde fandt vi otte stoffer, der alle virker selektivt på vor receptor, men ikke på de beslægtede receptorer på grund af forskelle i sidekæderne. To af stofferne er farmakologisk interessante og er nu genstand for fortsat forskning.

De identificerede stoffer hæmmer GPRC6A-receptorens funktion og er de første stoffer med en specifik effekt på denne receptor. Stofferne er derfor vigtige modelstoffer, som vi nu kan benytte til at undersøge receptorens funktion ved at slukke for den og dermed vurdere dens potentiale som mål for udviklingen af nye lægemidler.

Resultatet er et gennembrud for det kemogenomiske forskningsområde, fordi man ikke tidligere har kunnet finde kemiske hovednøgler, som kan anvendes på den gruppe af receptorer, som GPRC6A tilhører. Dette skyldes, at GPRC6A er meget fjern beslægtet med de receptorer, som 2-phenyl-indol normalt binder til. Hvis vi havde benyttet de klassiske farmakologiske eller bioinformatiske metoder, havde vi aldrig opdaget, at GPRC6A-receptoren kan hæmmes af 2-phenyl-indol-stoffer.

Kemogenomik udmærker sig således ved at være meget tidsbesparende, fordi de nye stoffer blev fundet på kort tid ved blot at teste nogle få dusin stoffer. Dét illustrerer tydeligt, hvor effektivt det kemogenomiske koncept er inden for moderne medicinsk kemi.

Ph.d. David E. Gloriam er postdoc på Institut for Medicinsk kemi
 Ph.d. Petrine Wellendorph er lektor på Institut for Medicinsk kemi
 Ph.d. Lars D. Johansen er forsker på ChemoMetec A/S
 Ph.d. Daniel Sejer Pedersen er postdoc på Institut for Medicinsk kemi
 Dr. pharm. Hans Bräuner-Osborne er professor på Institut for Medicinsk kemi

GABA-syntese

– en vigtig brik for kontrol af epilepsi

Undersøgelser med knockout-mus, som mangler genet for enzymet GAD65, har vist, at denne isoform af enzymet spiller en vigtig rolle for syntese af signalstoffet GABA i hjernen. Underskud af det hæmmende signalstof kan medføre krampe, og enzymets produktion af GABA indgår i en pulje af signalstoffet, som er særlig vigtig for at forhindre krampeaktivitet.

Af Anne B. Walls, Arne Schousboe og Helle S. Waagepetersen

Hjerneaktivitet bygger på overførsel af signaler mellem nervecellerne. Signalerne mellem to naboceller udveksles i kontaktpunktet mellem cellernes nerveender, som kaldes synapsen. Nerveledningen er baseret på et elektrisk signal, som i nerveenden udløser frigørelse af et kemisk signalstof, som virker stimulerende eller hæmmende på modtagercellen. Normalt er både stimulerende og hæmmende signalstoffer i spil på samme tid, og det er det samlede input til en nervecelle, som til enhver tid afgør, om cellen stimuleres eller hæmmes. I hjernen er det mest fremtrædende stimulerende signalstof glutamat, mens det vigtigste hæmmende signalstof er γ -aminobutyrat (GABA).

For at kunne opretholde en normal hjernefunktion er det vigtigt, at der altid er et passende forhold imellem stimulerende og hæmmende signaler i hjernen. Ubalance i dette

forhold er involveret i flere neurologiske sygdomme såsom Alzheimers sygdom, skizofreni og epilepsi. For at kunne forstå årsagen til sygdommene og for målrettet at kunne udvikle lægemidler til en given sygdom, er det nødvendigt at klarlægge, hvorfor en sådan ubalance opstår. I den forbindelse er det vigtigt at undersøge, under hvilke omstændigheder GABA dannes, både med hensyn til udgangsstofferne og med henblik på, hvilket formål signalstoffet syntetiseres til. GABA dannes ud fra glutamat, og processen katalyseres af enzymet glutamat decarboxylase (GAD). Dette enzym findes i to former, GAD65 og GAD67, som er navngivet ud fra deres respektive molekylstørrelser på 65 og 67 kiloDalton. Begge former findes under normale omstændigheder udelukkende i de nerveceller, som benytter GABA som signalstof. GAD67 er jævnt fordelt over hele cellens volumen, mens GAD65 primært findes i nerveenden, hvor GABA benyttes til signalering syntetiseres.



KNOCKOUT-MUS VISER FUNKTIONEN AF ET GEN

En knockout-mus er en mus, der har fået slettet et specifikt gen, og som derfor kan benyttes til at belyse det biologiske formål med det protein, som genet koder for. Ved en sådan undersøgelse sammenlignes knockout-musene med almindelige mus, hvor genet er funktionelt og proteinet dannes.

Menneskelige sygdomme kan studeres ved at slukke for musens analog til et humant gen, der er involveret i en sygdom. I dag findes der over 11.000 forskellige knockout-mus, der tjener som modeller for menneskelige sygdomme

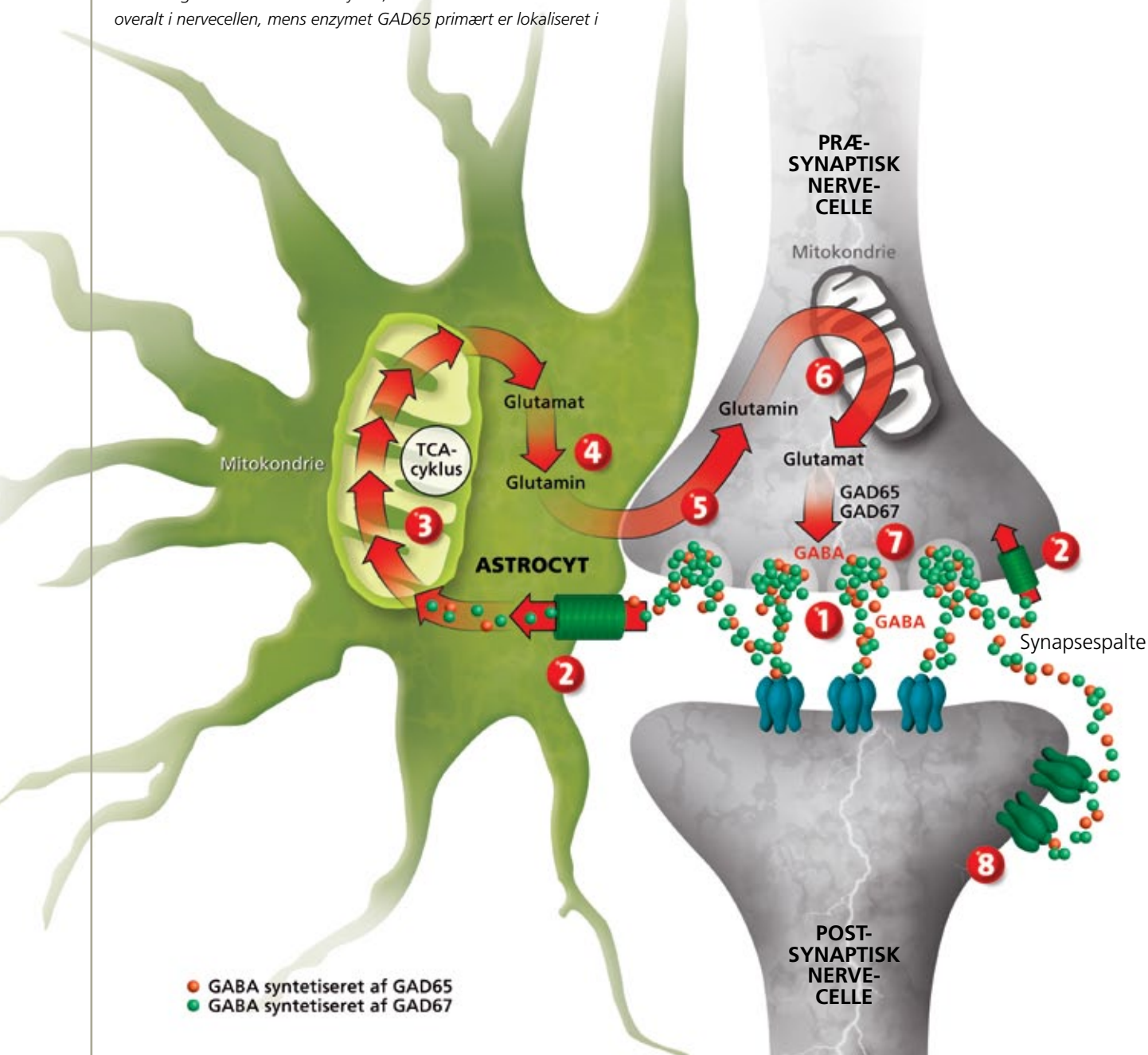
såsom kræft, fedme, hjerte-kar-sygdomme, sukkersyge, gigt og neurologiske sygdomme. Ud over at kaste lys over sygdomsprocesserne kan knockout-mus bruges til afprøvning af nye lægemiddelstoffer til behandling af den givne sygdom.

Vi har benyttet GAD65 knockout-mus til at undersøge, hvilken rolle dette enzym spiller i hjernen. Målet er at øge forståelsen af epilepsi og bane vej for en forbedret medicinsk behandling.

GABA og kramper:

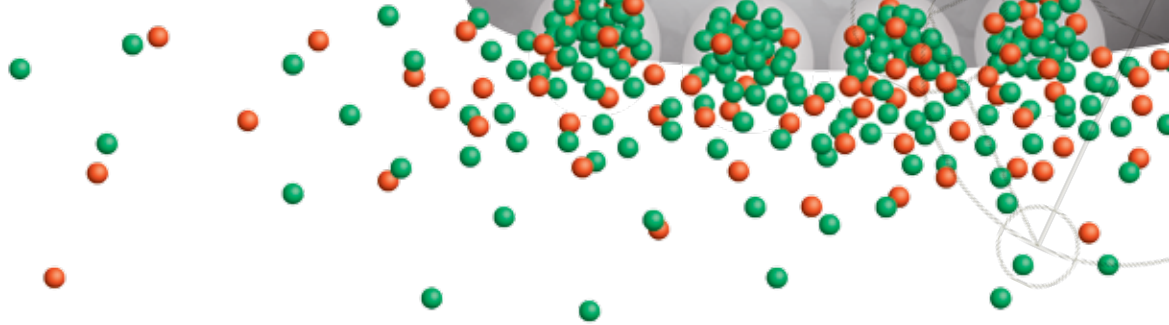
GABA er det vigtigste hæmmende signalstof i hjernen. Syntesen af GABA katalyseres af to former af enzymet glutamat decarboxylase (GAD), som kaldes GAD65 og GAD67. Det meste GABA produceres ved hjælp af GAD67, som er livsnødvendigt: knockoutmus, som mangler denne form af enzymet, overlever ikke. GAD67 findes overalt i nervecellen, mens enzymet GAD65 primært er lokaliseret i

nerveenden ved synapsespalten. Den toniske hæmning er markant nedsat i knockoutmusene, hvilket viser, at GABA produceret via GAD65 spiller en central rolle for tonisk hæmning. Nedsat tonisk hæmning fører sandsynligvis til øget krampeaktivitet og dødelighed i knockoutmusene.



1 Den præsynaptiske nervecelle frisætter GABA til synapsespalten, hvor signalstoffet udøver sin effekt på modtagercellens GABA-receptorer, hvilket dæmper cellens aktivitet via fasisk hæmning.
2 GABA fjernes hurtigt fra synapsespalten af den præsynaptiske nervecelle samt af støtteceller, som kaldes astrocytter. 3 Astrocytter omsætter GABA til glutamat via TCA(tricarboxylsyre)-cyklus i mitokondriet og derpå til glutamin 4. 5 Glutamin overføres til

nervecellen, 6 der i mitokondriet omdanner glutamin til glutamat, som er udgangspunktet for nervecellens syntese af GABA 7. 8 En del af det signalstof, der er frisat i synapsespalten, diffunderer ud af denne, hvorefter det udøver sin effekt på nervecellen via receptorer, der befinder sig uden for synapsen. Dette hæmmer nervecellen via tonisk hæmning, som er vigtig for kontrol af krampeaktivitet.



De to former af enzymet er produkter af forskellige gener, og det fremmer mulighederne for en fleksibel individuel regulering af aktiviteten af de to udgaver. Derudover reguleres aktiviteten af de to former af enzymet ved fosforylering og via binding af co-enzymet pyridoxal-5-fosfat (PLP). Begge disse faktorer varierer mellem de to former. GAD67 optræder primært i den aktiverede udgave, som er bundet til PLP. GAD65 derimod findes primært i den latente form, som kan aktiveres ved binding af PLP, når der opstår et øget behov for syntese af GABA i hjernen. På grund af den forskelligartede fordeling og regulering er det blevet foreslået, at de to former af enzymet katalyserer produktionen af GABA under forskellige omstændigheder og med henblik på forskellige formål.

Kontrol af krampeaktivitet i hjernen

Vi har undersøgt de forskellige roller af enzymets to former ved brug af knockout-mus, hvor genet for GAD65 er slukket. Her sammenlignede vi forskellige faktorer i forbindelse med GABA-stofskiftet og signaleringen i hjernen med normale kontrolmus. På den måde kan man belyse, hvilken rolle GAD65-enzymet spiller.

Desuden kan knockout-musene benyttes til at afklare, hvilket formål GAD67 og GABA syntetiserer af denne form af enzymet har, fordi kun GAD67 er til stede i knockout-musene. Dette er relevant, fordi musene ikke overlever, hvis denne form af enzymet mangler, mens GAD65-knockout-musene er levedygtige, om end deres levetid er forkortet. Man kan med andre ord undersøge funktionen af begge former af enzymet ved blot at slette det gen, som koder for GAD65. Dog skal man være opmærksom på, at GAD67 muligvis kan kompensere for det slettede gen, hvorved der er en risiko for, at man ikke kan afsløre alle funktioner af GAD65 med en knockout-mus.

Mængden af GABA i hjernen på knockout-musene er nedsat med ca. 25 procent i forhold til almindelige mus. Det betyder, at GAD65 under normale omstændigheder bidrager med syntesen af minimum en fjerdedel af den samlede mængde af det hæmmende signalstof i hjernen. Det sker på trods af, at GAD67 er langt mere udbredt i hjernen og aktiveret i højere grad end GAD65. Den lavere mængde af GABA i knockout-musene skaber ubalance i forholdet mellem glutamat og GABA, så der opstår et overskud af det stimulerende signalstof glutamat. Det er sandsynligvis årsagen til den øgede krampeaktivitet, der i sidste ende medfører en

forhøjet dødelighed blandt knockout-musene. Alt i alt kan det konkluderes, at GAD65 syntetiserer GABA, der er vital for hjernens normale funktion, men hvad benyttes dette GABA til, der er så vigtigt?

To slags hæmning

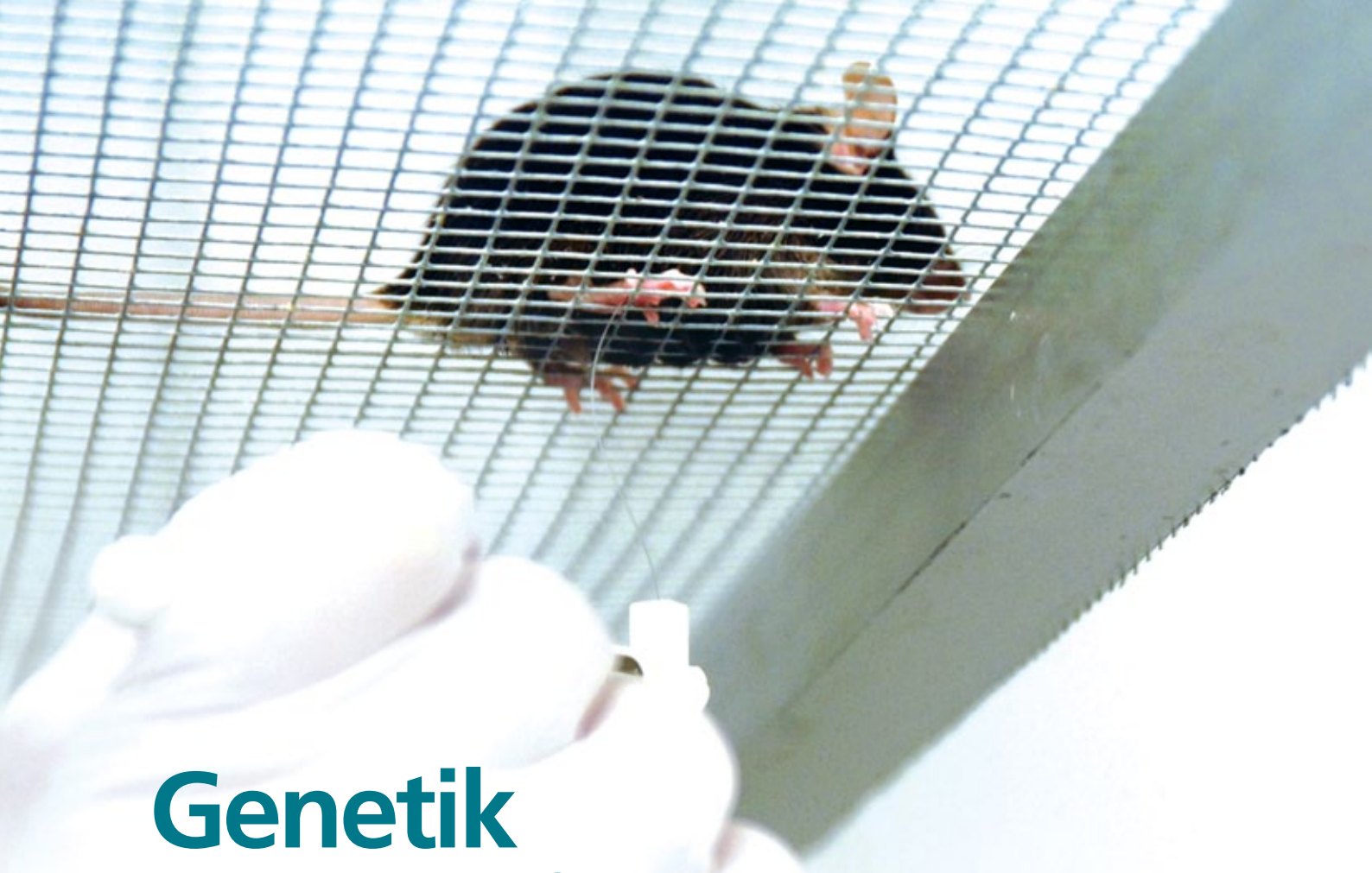
Signaler fra GABA i hjernen kan opdeles i to former for hæmning, som kaldes for tonisk og fasisk hæmning. Den fasiske hæmning opstår i synapsen, når GABA bindes til postsynaptiske receptorer, efter at en relativt høj koncentration af signalstoffet er blevet frigjort fra den præsynaptiske nerveende. Denne form for hæmning er tidsbegrænset til millisekunder og afsluttes, når GABA fjernes fra synapsespalten ved hjælp af specifikke transportører, der returnerer signalstoffet ind i den præsynaptiske nervecelle eller ind i omkringliggende hjælpeceller, som kaldes astrocytter.

Den toniske hæmning opstår, når signalstoffet bindes til extrasynaptiske GABA-receptorer; det vil sige receptorer, som befinder sig uden for synapsen, og denne form for hæmning er ikke tidsbegrænset på samme måde som den fasiske hæmning. Den toniske hæmning er primært forårsaget af, at en lille del af den frisatte GABA, ikke bliver transporteret ind i cellerne, men i stedet diffunderer ud af synapsen. En anden mulig årsag er, at der sker en vending af transportørerne på den præsynaptiske celle, så de leder GABA ud af cellen i stedet for ind i cellen, hvilket bidrager til den toniske hæmning. Dette formodes at være relevant specielt under sygdomstilstande.

Ved brug af GAD65-knockout-mus er det vist, at GABA syntetiseret af denne form af enzymet kun er vigtigt for den fasiske hæmning under langvarig intens stimulation. Under moderat stimulation dækkes behovet for syntese af signalstoffet til fasiske hæmning udelukkende af GAD67. Derimod er den toniske hæmning væsentligt nedsat i knockout-musene, og det demonstrerer, at GABA syntetiseret af GAD65 er overordentlig vigtig for denne type hæmning.

Da den toniske hæmning jo primært er en konsekvens af diffusion af GABA fra synapsen, betyder det, at GAD65 er vigtig for syntese af GABA, der benyttes til signalering, hvilket er i overensstemmelse med placeringen af denne form af enzymet i nerveenden. Endvidere er den toniske hæmning specielt vigtig for kontrol af krampeaktiviteten i hjernen, og dermed bidrager en nedsat tonisk hæmning i knockout-musene sandsynligvis til den øgede krampeaktivitet og forhøjede dødelighed i disse mus.

*Ph.d. Anne B. Walls er videnskabelig assistent på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr. scient. Arne Schousboe er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Helle S. Waagepetersen er professor MSO på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi*



Genetik kan forudsige følsomhed for smerte



Følsomheden over for smerte undersøges i en musemodel. Her prikkes musene under poterne med plastikhår med forskellige diametre og dermed forskellig kraft, når de bøjes mod poten. Dyrrets tilbagetrækning af poten bruges som indikation på tærsklen for, hvornår det begynder at gøre ondt. Testen anvendes til at bestemme mekanisk allodyni, hvilket vil sige smerte forårsaget af stimulus, der normalt ikke er smertefremkaldende.

Genetiske variationer i befolkningen er en vigtig årsag til, at mennesker oplever smerte meget forskelligt. Identifikation af gener, som er involveret i smerte, og opklaring af deres biokemiske betydning kan gøre det muligt at skræddersy personlige smertebehandlinger og opdage nye molekulære mål for smertestillende medicin.

Af Arafat Nasser, Ole J. Bjerrum, Anne Marie Heegaard og Lisbeth Birk Møller

Alle mennesker har oplevet smerte, og evnen til at føle smerte er en alarmklokke, som beskytter os mod farer i vore omgivelser. Smerten sikrer nemlig, at vi straks opdager risikoen for forbrændinger, forfrysninger, ætsninger, knoglebrud eller afskæring af lemmer, og derfor når vi som regel at reagere, inden det er for sent. På den anden side er vedvarende smerte ekstremt ubehagelig og nedsætter livskvaliteten, og kroniske smerter medfører store behandlingsmæssige problemer verden over.



Den individuelle opfattelse af smerte varierer fra menneske til menneske, og risikoen for at udvikle smertefulde tilstande er ligeledes vidt forskellig. Derfor kan den samme skade, fx som følge af en operation, udvikle sig til permanente nervesmerter hos et mindretal af de opererede, mens flertallet slipper med forbigående smerter. Forskere verden over er enige om, at disse individuelle forskelle i smertefølsomhed blandt andet kan forklares ud fra genetiske variationer i befolkningen.

Regulering af smertetærsklen

For ikke at føle unødigt smerte ved små stød eller ubetydelige temperaturforandringer, som vi hele tiden udsættes for, eksisterer der en tærskel for, hvornår vi opfatter et nervesignal som smerte. Smertetærsklen er underlagt en regulering, som afpasser følsomheden efter forholdene. Hvis man får en lille splint i huden, ænses man det knapt nok. Men hvis splinten er forurenset med sygdomsfremkaldende bakterier, og der opstår en infektion, gør det straks meget mere ondt. Smerten medfører, at vi bliver opmærksomme på splinten, så vi kan fjerne den. Under infektionen sænkes smertetærsklen midlertidigt, hvorpå den normaliseres, når splinten er væk. Mekanismen er baseret på kontrol af de nerveimpulser, der sendes fra kroppen til hjernebarken, så vi kan opfatte smerte. Impulserne skabes ved frigivelse af signalstoffer i synapsespalten mellem de nerveceller, som indgår i nervebanerne – synapsespalten er mellemrummet mellem to nabonerveceller, og her foregår den indbyrdes kommunikation. Signalstofferne kan enten aktivere de involverede nerveceller direkte eller øge deres følsomhed over for andre former for stimuli. Mængden af tilgængelige signalstoffer i nervebanerne – og dermed smerteoplevelsen – er afhængig af aktiviteten af enzymer og deres cofaktorer, som så igen er afhængige af genernes funktion. En cofaktor er et stof, som er med til at aktivere et enzym.

Gener for smerte

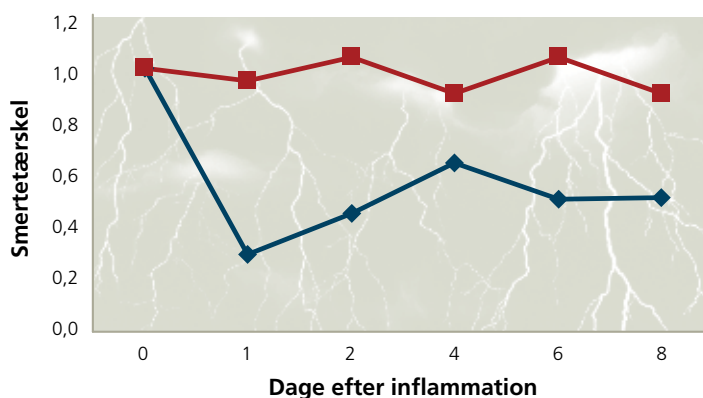
Mange forskningsgrupper arbejder ihærdigt på at afklare genernes betydning for udvikling og vedligeholdelse af smerte, og i dag kendes flere humane gener, der kan nedsætte eller helt forhindre udvikling af smerte. Et eksempel er sygdommen congenital analgesi, som fremkaldes af en mutation i et gen, der koder for en ionkanal, som fortrinsvis findes i cellemembranerne på smertenerverne. Patienterne føler slet ikke smerte, og ofte dør de tidligt i livet af skader, de aldrig mærkede. En sådan person er beskrevet i den svenske forfatter Stig Larssons kriminalroman "Pigen, der legede med ilden".

I samarbejde med Kennedy Centret i Glostrup arbejder vi på at karakterisere et andet gen, som er involveret i både akutte og kroniske smerter. Genet, som kaldes GCH1, kædes sammen med nedsat smertefølsomhed i både mennesker og dyr.

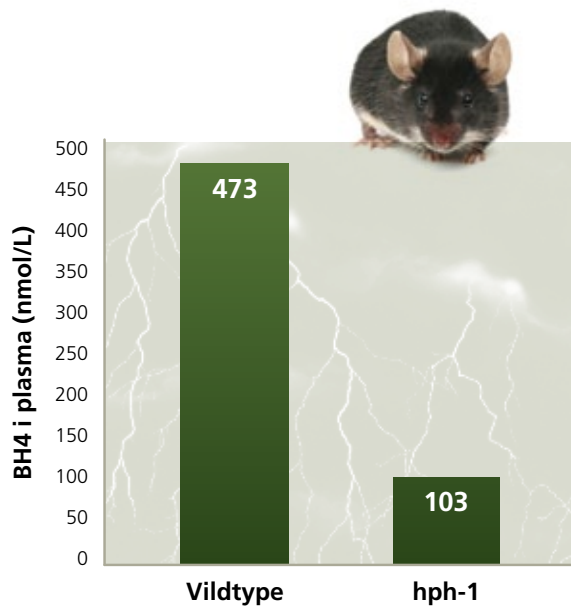
Det koder for enzymet GTP-cyclohydrolase, som regulerer dannelsen af tetrahydrobiopterin; en naturlig cofaktor, der spiller en afgørende rolle for syntesen af signalstofferne noradrenalin, dopamin, serotonin og nitrogenoxid, som alle er involveret i smertetransmissionen. Fra forsøg med rotter ved vi, at syntesen af cofaktoren øges i sensoriske nerveceller efter nerveskader og inflammation. Herudover er det påvist, at når produktionen af stoffet blokeres, reduceres smertefølsomheden i rotter med kroniske smertesymptomer på grund af nerveskader og inflammation, mens injektion af stoffet fremkalder smerter. Dette førte til opdagelsen af en genetisk variation af GCH1-genet i mennesker, som formindsker smerten hos patienter, som er blevet opereret for diskusprolaps. Begge dele viser, at aktiviteten af GCH1-genet og dermed koncentrationen af cofaktoren har central betydning for reguleringen af smertetærsklen gennem regulering af de signalstoffer, som er involveret i smerte.

Smertemodell i mus

Vi har erhvervet en musemodel kaldet hph-1 fra en forskergruppe i Oxford. Musene er karakteriseret ved formindsket aktivitet af enzymet GTP-cyclohydrolase og dermed nedsat dannelse af den vigtige cofaktor. Vi har for første gang undersøgt disse mus i eksperimentelle smertemodeller. Vor hypotese er, at musene som følge af en mutation i GCH1-



Kurverne viser smertetærsklen målt i vildtypemus (blå) samt i hph-1-mus (rød). Disse hph-1-mus har en mutation i GCH1-genet, som kædes sammen med nedsat smertefølsomhed. Smertetærsklen er ens hos de to typer mus, før der fremkaldes inflammation i en af deres poter. Efter inflammation falder smertetærsklen i de almindelige mus sammenlignet med hph-1-musene. Forsøgene viser, at de muterede mus er mindre følsomme over for inflammatorisk smerte end almindelige mus.



Genet *GCH1* koder for enzymet GTP-cyclohydrolase, som regulerer dannelsen af tetrahydrobiopterin (BH4). Dette stof spiller en afgørende rolle for syntesen af signalstofferne noradrenalin, dopamin, serotonin og nitrogenoxid, som alle er involveret i smertetransmission. Søjlediagrammet viser koncentrationen af tetrahydrobiopterin i plasma fra vildtypemus og *hph-1*-mus. Det ses, at mængden er stærkt nedsat i de muterede mus sammenlignet med de almindelige mus. Da tetrahydrobiopterin regulerer smertetærsklen, kan dette forklare, hvorfor *hph-1*-mus har en reduceret smertefølsomhed efter inflammation i poten.

genet vil have en hævet smertetærskel og derfor ikke så let udvikler kroniske smertetilstande.

Smertetærsklen hos mus kan bestemmes ved at teste deres reaktion på en svag stimulus som fx tryk eller varme. Dette kan undersøges på trædepuden på en musepote ved at anvende plastikhår med forskellige diametre og dermed forskellig kraft, når de bøjes mod poten. Dyrrets tilbagetrækning af poten bruges som indikation på tærsklen for, hvornår det begynder at gøre ondt. Testen anvendes til at bestemme mekanisk allodyni, hvilket vil sige smerte forårsaget af stimulus, der normalt ikke er smertefremkaldende.

Vi undersøgte musenes smertetærskel i en betændelsesbetinget smertemodel. Her blev lokal inflammation i poten fremkaldt ved injektion af en suspension med inaktiverede bakterier, hvis toksiner fremkalder betændelse. På udvalgte dage efter inflammationen blev musenes følsomhed over for mekanisk påvirkning undersøgt ved hjælp af de forskellige plastikhår. Vi påviste på den måde, at mus med mutation i *GCH1*-genet har en højere smertetærskel og derfor ikke udvikler mekanisk allodyni i modsætning til vildtype mus uden mutationen.

Når man sammenligner smertetærsklen hos de to typer mus før inflammation, er der ingen forskel mellem *hph-1*-musene og de almindelige mus. Forskellen i smertetærskel kan altså først observeres efter inflammation, hvor mængden af cofaktoren er opreguleret i sansenerverne. Ved hjælp af ana-

lytiske metoder, som er tilgængelige på Kennedy Centret, kunne vi derpå bekræfte, at *hph-1*-musene havde underskud af cofaktoren sammenlignet med de almindelige mus. Da cofaktoren regulerer smertetærsklen, kan den formindskede smertefølsomhed i *hph-1*-mus tilskrives nedsat dannelse af dette stof.

Nye mål for lægemidler

Identifikation af smerterelaterede gener samt kendskab til mekanismerne for, hvordan de regulerer smerte, kan bruges til at individualisere eksisterende smertebehandlinger samt til at identificere nye mål molekyler for smertestillende lægemidler.

Vores studier viser, at variationer i *GCH1*-genet er forbundet med reduceret smertefølsomhed, hvorfor både genet og dets enzym kan tjene som nye potentielle mål til effektivt at bekæmpe smerte. Således vil en medicinsk behandling, der via påvirkning af enzymet reducerer syntesen af cofaktoren – uden at påvirke stoffets normale funktion – kunne føre til formindsket smertefølelse efter en inflammation.

Den endelige mekanisme, hvorved cofaktoren påvirker smertesystemet er endnu ikke klarlagt, men forskning indikerer, at opregulering af stoffet ved vævsskader øger dannelsen af nitrogenoxid i de sensoriske neuroner. Om dette er den egentlige mekanisme, vil vi i vores videre arbejde forsøge at undersøge ved hjælp af musemodellen.

Cand.pharm. Arafat Nasser er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi samt på Medicinsk Genetisk Laboratorium på Kennedy Centret

Dr.med. Ole J. Bjerrum er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

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

Ph.d. Lisbeth Birk Møller er seniorforsker på Medicinsk Genetisk Laboratorium på Kennedy Centret

Stress kan fordoble risikoen for at bruge smerte- stillende medicin



Mere end nok at se til. 25-44 årige er den mest stressede aldersgruppe i Danmark.

Vi bruger ikke kun smertestillende håndkøbsmedicin, når vi har ondt i hovedet eller i maven. Mange indtager lægemidlerne, når de føler sig stressede, selvom medicinen er aldeles uegnet til at behandle stress. Tilbøjeligheden til at ty til medicinen afhænger af ens overordnede evne til at håndtere stress.

Af Vibeke Koushede og Ebba Holme Hansen

De sidste mange år er der sket en markant stigning i brugen af smertestillende håndkøbsmedicin i Danmark. Indenfor det seneste årti er fx antallet af doser med paracetamol steget med over 30 procent, og smertestillende lægemidler er blandt de mest benyttede former for medicin på verdensplan.

Den hyppigste årsag til anvendelsen af disse lægemidler er hovedpine, men ikke al brug kan forklares ved, at man har smerter. Da anvendelse af smertestillende medicin ikke er uden risiko – selv almindelig håndkøbsmedicin mod smerter kan medføre alvorlige bivirkninger som indre blødninger eller øget forekomst af hovedpine – har det været vigtigt at kort-

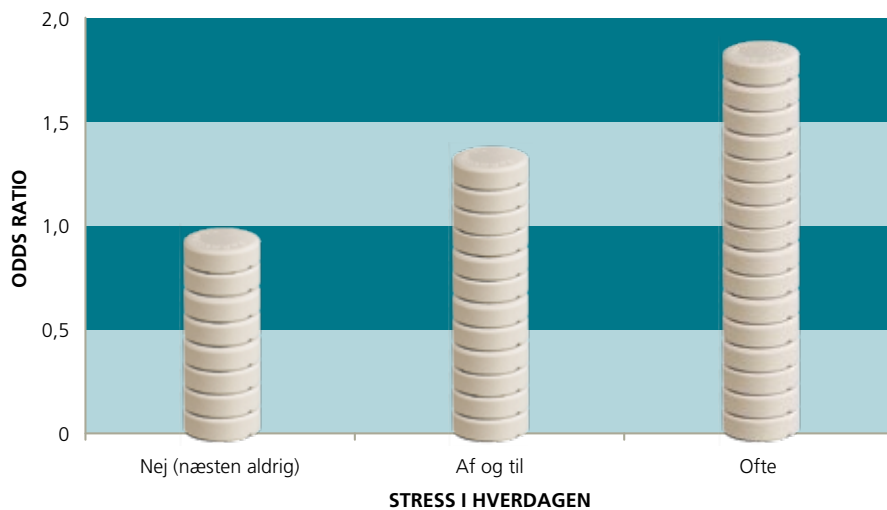
lægge motiverne til at bruge medicinen, så man kan modarbejde fejlagtig anvendelse.

Udover at flere og flere danskere bruger smertestillende medicin, så føler et stigende antal danskere sig ofte stressede. Undersøgelser viser, at stressede mennesker er mere tilbøjelige til at ryge og drikke alkohol og mindre tilbøjelige til at dyrke motion – der er altså en sammenhæng mellem stress og sundhedsadfærd. Vi besluttede derfor at undersøge, om brug af smertestillende håndkøbsmedicin er en stressrelateret adfærd i den almene befolkning.

Nogle mennesker er bedre til at håndtere belastninger og stress i hverdagen end andre, og derfor ville vi også undersøge, om ens personlige evne til at håndtere stress er afgørende for ens tendens til at bruge medicin, når man er stresset.

25-44 årige er mest stressede

Vi fokuserede på gruppen af 25-44 årige danskere, som er den aldersgruppe, der både har det højeste stressniveau og det største forbrug af smertestillende håndkøbsmedicin. Udgangspunktet var selvrapporterede data, som stammer fra to



Figuren viser sammenhængen mellem forskellige niveauer af stress i hverdagen og brug af smertestillende håndkøbsmedicin. De anvendte data stammer fra danskere i alderen 25-44 år, i alt 4.739 personer, som deltog i en national undersøgelse udført af Statens Institut for Folkesundhed i 2005.



ationale spørgeskemaundersøgelser: Sundheds- og sygelighedsundersøgelsen, som blev udført af Statens Institut for Folkesundhed i 2005 samt Det Danske Livsstil og Medicinbrugs Survey, som i 2009 blev gennemført af Afdelingen for Samfundsfarmaci på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi. I Danmark føres der ikke register over den enkelte persons brug af håndkøbsmedicin, så undersøgelserne bygger på svar fra et repræsentativt udsnit af 25-44 årige danskere. Deltagerne er blevet spurgt om deres forbrug af smertestillende håndkøbsmedicin i løbet af de seneste 14 dage, samt om de har haft smerter eller ubehag i perioden; fx hovedpine, ondt i nakken eller forkølelse.

Stress kan måles via analyser af spyt, hvor man bestemmer mængden af cortisol, kendt som "stresshormonet". Det blev dog ikke gjort i forbindelse med undersøgelsen, men spørgeskemaer er også en velegnet metode, fordi næsten alle voksne intuitivt ved, hvad stress er. Derfor kan stress måles med et meget enkelt spørgsmål: Føler du dig stresset?

Stress øger medicinforbruget

Vores undersøgelser viser, at stress i dagligdagen er forbundet med anvendelse af smertestillende håndkøbsmedicin. Vi beregnede den relative risiko (chance) for at bruge medicin ved forskellige niveauer af stress. Resultaterne udtrykkes i Odds Ratio, som skal forstås således, at værdier over 1 indikerer øget brug og værdier under 1 indikerer reduceret brug

af smertestillende håndkøbsmedicin sammenlignet med en referencegruppe af personer, der aldrig føler sig stressede. Risikoen for at ty til smertestillende medicin er 1,38 for personer, der føler sig stressede af og til og 1,91 for personer, som ofte føler sig stressede. Det vil sige, at der er en 91 procent større risiko for brug af smertestillende håndkøbsmedicin blandt personer, som ofte føler sig stressede, sammenlignet med personer, der aldrig føler sig stressede. Vi fandt tilsvarende resultater for både mænd og kvinder, højtuddannede og lavtuddannede, gifte og ugifte, samt voksne med og uden børn.

Et vigtigt spørgsmål er, om resultaterne hænger sammen med, at stressede mennesker har flere smerter end normalt. Vi ved, at stress kan give hovedpine, nakkesmerter og ondt i maven, men vores undersøgelse viser, at kun en tredjedel af de ofte stressede personer bruger håndkøbsmedicin, fordi de har smerter. For to tredjedele vedkommende kan overforbruget ikke forklares ved, at det gør ondt. Det tyder på, at stress – selv uden smerter – udløser øget forbrug af smertestillende håndkøbsmedicin.

Mennesker reagerer forskelligt på stress

Mennesker reagerer forskelligt på belastninger og stress i hverdagen. Den amerikansk-israelske professor i medicinsk sociologi Aaron Antonovsky (1923-1994) har fremsat en mulig forklaring, som går ud på, at nogle mennesker oplever en

BIVIRKNINGER VED SMERTESTILLENDENDE HÅNDKØBSMEDICIN

Smertestillende håndkøbslægemidler giver meget få bivirkninger ved lejlighedsvis og kortvarig brug. Ved længerevarende anvendelse af acetylsalicylsyre, som er det aktive lægemiddelstof i fx Magnyl og Idotyl, er smerter og ubehag i mave-tarm-regionen meget almindelige, og der er stor risiko for blødninger. Ved overdosering af paracetamol, som er det aktive lægemiddelstof i bl.a. Pamol og Panodil, kan der opstå alvor-

lige leverskader, som kan være dødelige. I sjældnere tilfælde ses en række andre alvorlige bivirkninger. I de senere år er man blevet opmærksom på en paradoksal tilstand, som kaldes overforbrugshovedpine. Det vil sige hovedpine, der skyldes hyppig brug af hovedpinemedicin. Det vides endnu ikke, hvor stor andel af den danske befolkning, som lider af dette, men 1-2 procent har været skønnet.

stærkere sammenhæng i livet end andre, og dette gør dem bedre i stand til at håndtere belastninger og stress. Denne oplevelse af sammenhæng i tilværelsen har Antonovsky døbt Sense of coherence (SOC).

Følelsen af sammenhæng i livet består i følge Antonovsky af tre elementer: Mening, forståelighed og håndterbarhed. Personer, der oplever livet som meningsfuldt, forståeligt og håndterbart – altså mennesker der føler en høj grad af sammenhæng i tilværelsen – kan bedre klare belastninger og stress og har en mindre risiko for at blive syge. Det skyldes, at de er bedre til at vælge en passende strategi til at håndtere vanskelige udfordringer end mennesker med lav oplevelse af sammenhæng i livet.

Er mennesker i den lave ende af SOC-skalaen særligt tilbøjelige til at tage smertestillende håndkøbsmedicin, når de er stressede? For at undersøge dette spørgsmål analyserede vi data fra deltagerne i Det Danske Livsstil og Medicinbrugs Survey 2009 i alderen 25-44 år, i alt 900 personer.

Undersøgelsen viser, at mennesker med lav oplevelse af sammenhæng i tilværelsen i langt højere grad tager smertestillende håndkøbsmedicin, når de er stressede, end mennesker med både en middel og en høj oplevelse af sammenhæng. Man ved, at mennesker i den lave ende af skalaen plages af flere smerter end mennesker i den høje ende, men det forhold kan ikke alene forklare det mønster, vi ser. Personer med lav sammenhængsfølelse tyr nemlig i større grad til medicin, når de er stressede – også selvom de ikke har smerter. Baseret på Antonovskys teori kan dette skyldes, at disse personer har særligt svært ved at finde en mere passende måde at håndtere stress på.

Samlet set viser vores undersøgelser, at personer, som er stressede, er langt mere tilbøjelige til at tage smertestillende håndkøbsmedicin for andet end smerter end de, som ikke er stressede. Derudover kan vi se, at der er en gruppe mennesker – med lav følelse af sammenhæng i livet – som har en særlig risiko for denne u hensigtsmæssige adfærd.

Uegnet til at behandle stress

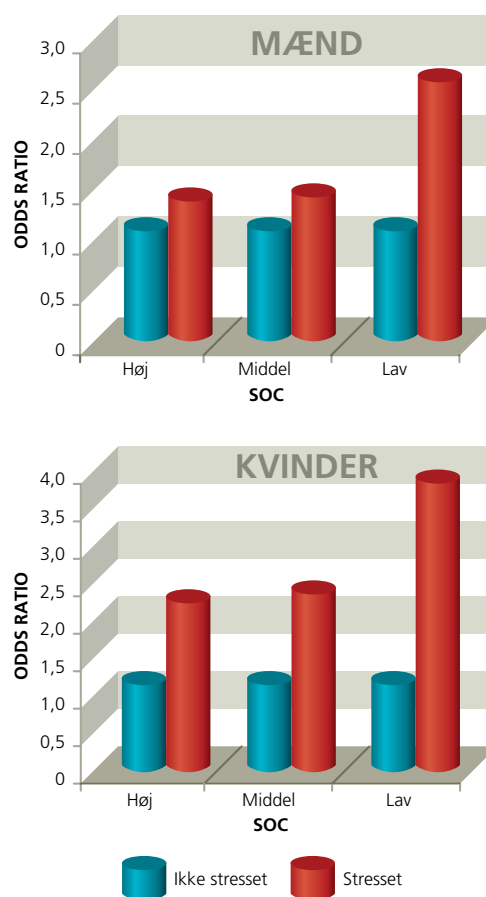
Fejlagtig brug af smertestillende håndkøbsmedicin kan medføre alvorlige bivirkninger. Ligeledes kan stress have alvorlige konsekvenser for helbredet, hvis ikke man tager hånd om de bagvedliggende årsager. Derfor er det vigtigt, at den almene befolkning gøres opmærksom på, at smertestillende håndkøbsmedicin er aldeles uegnet til at behandle stress. Desuden bør politikere samt apoteker, supermarkeder og andre, der sælger håndkøbsmedicin, være opmærksomme på dette potentielt skadelige misbrug af medicin, som kan købes uden recept.

FØLELSEN AF SAMMENHÆNG I LIVET

Oplevelsen af sammenhæng i livet – Sense of coherence (SOC) – måles ved tre spørgsmål:

- Håndterbarhed: Plejer du selv at kunne se en løsning på problemer og vanskeligheder, som umiddelbart virker håbløse?
- Meningsfuldhed: Synes du, at din dagligdag er en kilde til personlig tilfredsstillelse?
- Forståelighed: Synes du, at det, som sker for dig i din dagligdag, er svært at forstå?

Svarkategorierne er: 1) Næsten altid, 2) For det meste, 3) Sjældent, 4) Aldrig. Hvert svar giver et antal point, der lægges sammen. Derefter inddeles de samlede point i tre grupper på en SOC-skala fra lav til høj oplevelse af sammenhæng i livet.



Hvis vi føler sammenhæng i vores tilværelse, er vi bedre til at håndtere stress, end når livet føles uoverskueligt. Diagrammerne viser sammenhængen mellem stress, brug af smertestillende håndkøbsmedicin og følelsen af sammenhæng i tilværelsen (Sense of coherence, SOC). De anvendte data stammer fra Det Danske Livsstil og Medicinbrugs Survey 2009.

MPH Vibeke Koushede er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi



Stressfremkaldende hjerneaktivitet kan nu undersøges i realtid

Kronisk stress kan hæmme indlæringsevnen, svække immunforsvaret, udløse hjerte-kar-sygdomme og fremkalde psykiske lidelser. Trods de potentielt meget alvorlige konsekvenser af stress er de involverede signalbaner i hjernen kun kendt i begrænset omfang. Dyremodeller gør det nu muligt at undersøge mekanismerne i detaljer.

Af Morten Pilgaard Kristensen

Stress er en essentiel fysiologisk reaktion, som tjener til at mobilisere kroppens ressourcer for at imødegå en potentielt skadelig påvirkning. Akut stress sætter os i stand til bedre at klare uventede udfordringer, og stressresponsen kan fremkalde frigørelse af glukose i kroppen, stimulere immunreaktioner og fremme vor øjeblikkelige indlæringsevne. En påvirkning, som kan udløse stress, er ofte kendetegnet ved, at den signalerer, at organismens interne eller eksterne miljø er blevet mindre kontrollerbart eller forudsigeligt. Det kan dreje sig om fysiske forhold som støj eller smerte eller om psykiske belastninger som sorg eller sociale problemer.

Hvis stressresponsen udløses gentagne gange med korte mellemrum over en længere periode, kan reaktionen imidlertid gøre mere skade end gavn. Gentagen stress kan lede til kognitiv hæmning, et svækket immunforsvar, hjerte-kar-sygdomme, søvnforstyrrelser og psykiske lidelser som skizofreni og depression. Til trods for de potentielt meget alvorlige konsekvenser af langvarig stress, er de signalbaner i hjernen, som medierer stress, kun kendt i begrænset omfang. Men det står klart, at det hormonale stressrespons i kroppen udløses af Corticotropin Releasing Hormone (CRH), som frigives fra nerveceller i det paraventriculære nukleus i hjerneområdet hypothalamus.

Fra stressor til stress

Påvirkninger, som udløser stress i os, kaldes stressorer. I dag er det uklart, hvordan hjernen klassificerer forskellige påvirkninger som stressorer. Vi ved, at den udløsende stimulus

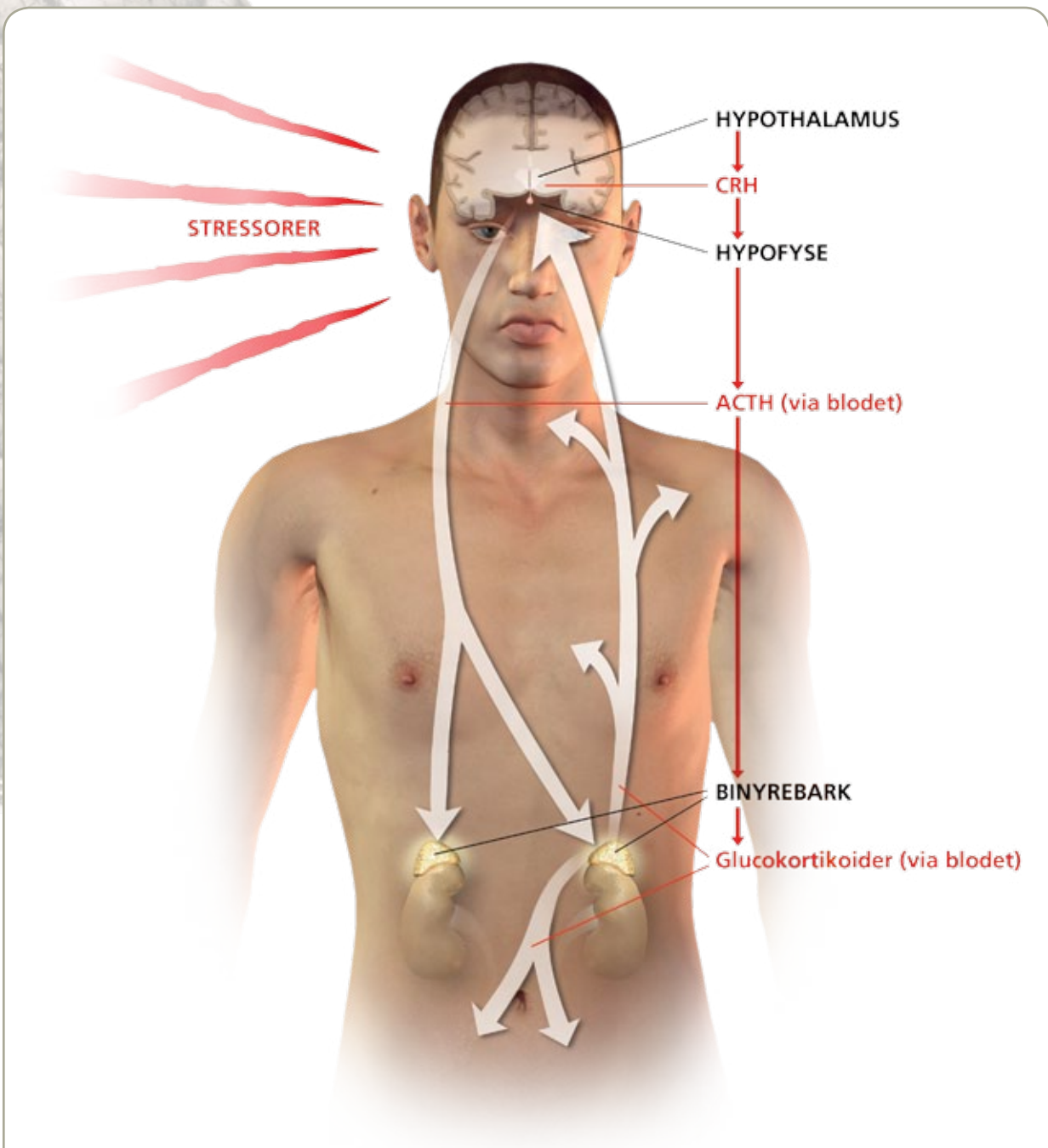
ultimativt må aktivere nerveceller i det paraventriculære nukleus for at kunne iværksætte det hormonale stressrespons. Men vi ved ikke, hvilke signalbaner og neurotransmittere, som er involveret i aktivering af de stressmedierende og CRH-holdige neuroner i det paraventriculære nukleus.

Ligeledes er det uklart, i hvor høj grad disse nerveceller bidrager til den stimulusintegration, som er ansvarlig for at identificere og klassificere en stressor. Aktiveres de samme sæt af neuroner af vidt forskellige typer stressorer som fx støj og sorg? Eller drejer det sig om separate undergrupper af nerveceller? For at besvare sådanne spørgsmål er det nødvendigt at kunne måle nervecellernes aktivitet i de hjerneområder, der medierer stress. Det kan gøres i dyremodeller, mens dyrene sanser stressorer. Forsøgsdyrene skal være ved bevidsthed og veltilpasse, så de – udover den kortvarige eksperimentelle påvirkning – i øvrigt er fri for stress.

Sådanne forsøgsopstillinger og dyremodeller har vi nu til vores rådighed. Det er muligt at måle nerveaktiviteten med såvel elektrofysiologiske som optiske metoder med høj tidsopløsning i fritgående dyr, mens de påvirkes med relevante stressorer. Vi arbejder derfor på at afdække netop de hjerne-mekanismer, der medierer stress med udgangspunkt i det paraventriculære nukleus.

Fokus på forskellige stressorer

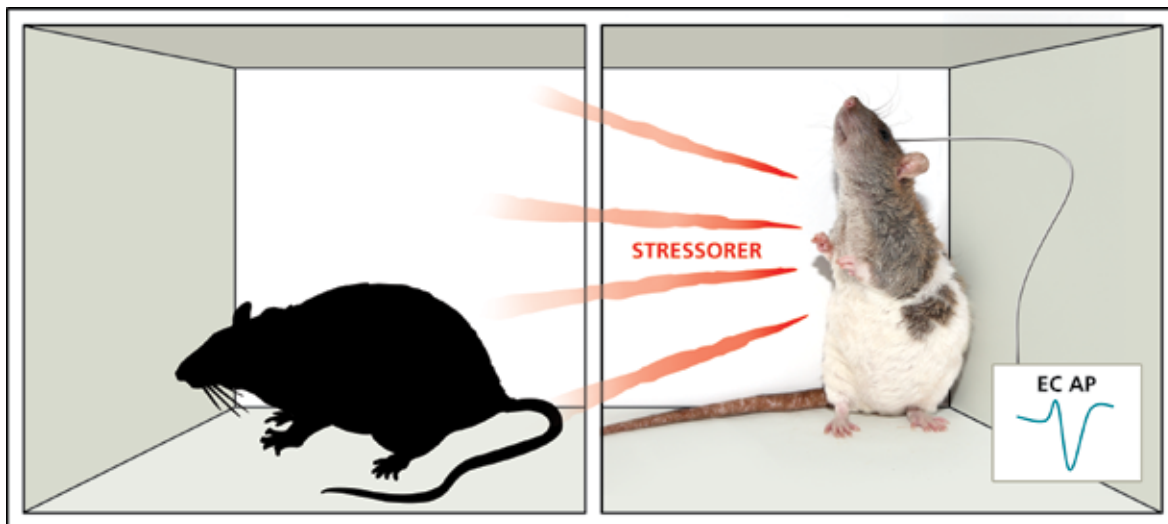
Vi har tidligere demonstreret aktivering af nerveceller i store områder af det paraventriculære nukleus under kortvarigt akustisk stress i fritgående dyr; stressoren var 90 sekunders støj ved en lydstyrke på 90 dB. Den stressorudløste nerveaktivitet steg umiddelbart markant, men aftog derefter, hvilket er forventeligt i kraft af de mange negative feedbackmekani-



**DEN HORMONALE STRESSRESPONS:
 AKTIVERING AF HYPOTHALAMUS-HYPOFYSE-BINYREBARK-AKSEN**

Corticotropin Releasing Hormone (CHR) udløser det hormonale stressrespons i kroppen. CHR produceres af nerveceller i det paraventrikulære nukleus i hypothalamus, hvorfra det frigives og transporteres i specielle blodårer til hypofysen. I hypofysen bindes CRH til receptorer på endokrine celler, som frigiver signalstoffet AdrenoCorticoTropic Hormone (ACTH) i blodcirkulationen. Dette hormon transporteres i blodet til binyrebarken, hvor det udløser frigivelse af glucokortikoider. Disse steroide hormoner kan binde til receptorer på mange

celler i kroppen og herefter blive optaget i cellerne, hvor glucokortikoiderne kan påvirke et væld af mekanismer, som har betydning for bl.a. cellernes overlevelse, stofskiftet og immunforsvaret. Ved akut aktivering tjener disse mekanismer til at mobilisere organismens fysiologiske og adfærdsmæssige reaktioner, så vi bedre kan klare umiddelbare udfordringer. Langtidseksponering som følge af gentagen stress fører imidlertid til forhøjede niveauer af glucokortikoider, og det kan medføre alvorlige sygdomstilstande.



DYREMODELLER

Når nerveceller kommunikerer, udsender cellerne sekvenser af kortvarige elektriske udladninger, kaldet aktionspotentialer (AP), som kan ledes langs en nervecelle og udløse frigivelse af signalstoffer eller hormoner fra dens terminaler.

Vi kan måle sådanne elektriske signaler i fritgående forsøgsdyr ved at implantere elektroder i udvalgte grupper af nerveceller. Elektroderne kan implanteres permanent, og signalerne måles kontinuert via denne extracellulære (EC) afledning. I hanrotter som dyremodel vil vi nu benytte denne metode til at registrere ændringer i signalmønstret i neuronerne i det paraventrikulære nukleus i hypothalamus, mens rotterne påvirkes med kortvarige stressorer.

Stressorerne er dels fysiske som støj og æterbedøvelse, dels sociale og psykogene som lugt af rovdyrurin, en dominant hanrotte eller en hunrotte i brunst, som ikke kan nås. På den måde kan vi undersøge, om nervecellernes aktiveringsmønstre er afhængigt af typen af stressorer.

Alternativt kan de elektriske signaler måles indirekte ved hjælp af optiske metoder. Aktive nerveceller svulmer nemlig op, og det ændrer deres optiske egenskaber. I stedet for elektroder kan man derfor implantere en sonde, hvorigenem man optisk kan måle aktivitetsændringer over et større område af nervevævet i fritgående dyr.

nismer, som regulerer aktiviteten i hypofyse-binyrebark akse. Cellerne i det paraventrikulære nukleus udviser lignende ændringer i aktivitetsniveauet under forandringer i søvn/vågenstadier. Dette er interessant set i lyset af de væsentlige gensidige vekselvirkninger, som eksisterer mellem søvn og stress. Stresshormoner kan således hæmme søvn.

Vort næste skridt bliver at måle i en rottemodel, om den stressfremkaldte elektriske nerveaktivitet i det paraventrikulære nukleus er afhængig af, hvilken type stressor dyret oplever. Vi undersøger her effekten af gentagen påvirkning med forskellige stressorer såsom støj og rovdryrlugt.

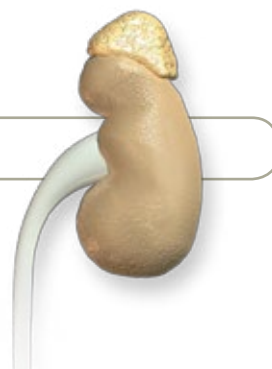
Endvidere kan vi teste, hvilke signalstoffer og receptorsystemer, der regulerer nerveaktiviteten i det paraventrikulære nukleus. Det gør vi ved hjælp af agonister og antagonist; dvs. stoffer, som henholdsvis aktiverer eller blokerer et udvalgt receptorsystem. Sådanne neurofarmakologiske undersøgelser er vigtige i forbindelse med udvikling af lægemidler, som kan blokere skadelige stressreaktioner på et tidligt tidspunkt i processen snarere end at foretage symptombehandling af de negative konsekvenser af stress.

Vi har nyligt set, at stimulering af såvel nikotinreceptorer

som CRH-receptorer udløser aktivering af neuroner i det paraventrikulære nukleus. CRH kan dermed bidrage til feedback-regulering af det hormonale stressrespons, fordi CHR kan påvirke aktiviteten i forskellige typer celler i det paraventrikulære nukleus og derigennem nedregulere aktiveringen af hypofysen og binyrebarken. Tilsammen udgør cellegrupper, som modtager input fra begge disse neurotransmittersystemer, et potentielt center for samspil mellem separate mekanismer og signalbaner, der hver især kan modulere stressrespons. Nogle eksempler herpå kunne være CRH-medierede feedbackmekanismer og angstreaktioner samt stressfremkaldt søvnløshed.

Vi har nu mulighed for at foretage funktional afprøvning af disse hypoteser via dyreforsøg i laboratoriet, hvor vi i detaljer kan afdække de stressmedierende signalbaner i hjernen via elektrofysiologiske målinger i fritgående dyr. Dette vil være nyttigt med henblik på at identificere potentielle mål for en tidlig medicinsk behandling af vedvarende stress – inden stressresponsen medfører alvorlige skader.

Ph.d. Morten Pilgaard Kristensen er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi



Proteiner i lægemidler

– de sætter sig alle de forkerte steder

En tredjedel af alle nye lægemidler i kliniske forsøg er baseret på proteiner. Imidlertid er proteinlægemidler vanskelige at formulere, fordi proteiner binder sig til grænseflader og overflader, hvilket kan medføre, at det færdige lægemiddel ikke virker efter hensigten. Nye metoder kan screene for kombinationer af hjælpestoffer, som kan løse problemet.

Af Stefania Baldursdottir, Signe Hougaard Nielsen, Maria Fullerton og Lene Jørgensen

I proteinlægemidler er det aktive stof et biomolekyle – et protein eller et peptid. Et velkendt eksempel er insulin, som anvendes til behandling af sukkersyge. Vi vil meget gerne bruge flere proteiner som lægemidler, mest af alt fordi de er specifikke i deres virkning og derfor kun medfører få bivirkninger. Rigtig mange og vidt forskellige sygdomme kan behandles med proteiner. Det gælder bl.a. kræft, en række mangelsygdomme, infektioner med bakterier, svampe eller parasitter samt virusbårne sygdomme som AIDS. Et nyere eksempel er den meget specifikke behandling af en bestemt type brystkræft ved hjælp af lægemidlet Herceptin®, som indeholder et monoklonalt antistof.

Desværre er proteiner vanskelige at arbejde med i lægemiddelindustrien. En af ulemperne er, at proteiner er grænsefladeaktive, hvilket vil sige, at de vil forsøge at sætte sig i græn-

seflader mellem vand og olie, mellem vand og luft eller på overfladen af beholdere. Det kan føre til mangel på protein i det færdige lægemiddel, så dosis bliver for lav. Der er også risiko for at fremstille uhensigtsmæssige formuleringer, hvor proteinet enten frigives for tidligt eller slet ikke. Hvis proteinet i lægemidlet befinder sig i en grænseflade, fx mellem et fast stof og en væske, vil proteinet måske ikke have nogen terapeutisk effekt overhovedet, og det er selvfølgelig et stort problem.

Adsorption til grænseflader

Under fremstilling af et lægemiddel vil de anvendte proteiner møde flere forskellige typer af grænseflader og overflader. Det gælder eksempelvis, når proteiner indbygges i partikler, som skal beskytte proteinet imod enzymatisk nedbrydning i blodet og transportere det hen til virkningsstedet i kroppen. Her er der risiko for, at proteinet i løbet af produktionsprocessen kommer til at befinde sig i olie-vand lignende grænseflader, og det kan påvirke stabiliteten, effektiviteten og aktiviteten af det færdige lægemiddel på en negativ måde. For eksempel kan proteinet ændre sin tredimensionelle form, hvilket ofte vil hindre det i at udføre sin terapeutiske funktion. Når man producerer proteinlægemidler, er det derfor vigtigt at have kendskab til og forståelse for den indflydelse, som grænseflader har på stabiliteten af det anvendte protein.



Skematisk udvikling af adsorptionen af proteiner til en olie-vand-grænseflade. Over tid adsorberes mere og mere protein. Proteinet kan ændre struktur, når det adsorberes til grænsefladen – med risiko for, at det mister sin biologiske aktivitet og ikke længere virker som lægemiddel. Strukturændringen kan påvirke strukturen af ikke-adsorberede proteiner, specielt hvis adsorptionen er reversibel.



Et billede af en vanddråbe i et oliekar. Et multilag af proteinmolekyler er adsorberet til grænsefladen mellem olien og vandet, hvilket ses som en slags film. Filmen er fleksibel og kan pustes op som en ballon. Billedet er taget ved hjælp af et apparatur, som kan måle grænsefladespænding.

Når et protein adsorberer til en grænseflade, vil proteinmolekylerne over tid opbygge et lag i grænsefladen, som det ofte er svært at detektere. Vi har anvendt nogle avancerede, men dog ret enkle metoder til at bestemme adsorptionen af proteiner ved olie-vand grænseflader. En forståelse for, hvordan adsorptionen foregår, og hvordan den kan ændres ved at finjustere formuleringen af lægemidlet, vil gøre det lettere og mere effektivt at designe gode partikulære eller flydende formuleringer af proteinlægemidler.

Grænsen mellem vand og olie

Når proteiner adsorberer til en vand-olie grænseflade, vil energien over grænsefladen falde, mens der dannes et monolag af proteiner. Vi kan derfor følge processen under den tidlige adsorption og opbygningen af monolaget ved at måle ændringer i grænsefladespændingen mellem vanddråben og olien.

Hvis der fortsat er overskud af protein, vil monolaget med tiden blive udbygget til et multilag, og denne sene adsorption og opbygning af multilaget kan observeres ved hjælp af reologi. Reologi er en meget følsom metode, som traditionelt bruges til at bestemme væskers flydeegenskaber. Vi har benyttet en ny og ikke så ofte anvendt reologisk opsætning, der gør det muligt at måle flydeegenskaberne direkte i grænsefladen mellem vand og olie. På den måde kan vi observere og karakterisere den del af processen, som fører frem til dannelsen af et multilag af proteiner.

Omdannelsen fra monolag til multilag begynder så småt ef-

ter en halv times adsorption af proteinet, og den medfører en forandring i lagets flydeegenskaber, så det bliver stærkere. Efter 40 minutter ændres flydeegenskaberne fra at minde om en tyktflydende væske til at blive dominerende elastisk, og netop ved dette skift forandres proteinlaget fra et monolag til et multilag. Derefter fortsætter opbygningen af multilaget, som vokser i tykkelse. Ved forstørrelse i et mikroskop kan man nu direkte se laget i grænsefladen mellem olie og vand som et fleksibelt lag på overfladen af en vanddråbe. Faktisk er laget så fleksibelt, at det kan pustes op som en ballon.

Bedre proteinlægemidler

De to anvendte metoder – målinger af grænsefladespændingen og reologi – gør det muligt at beskrive dannelsen af proteinlaget lige fra den første adsorption af ganske få proteiner, dannelsen af et monolag og videre til dannelsen af det fleksible multilag.

Dét åbner op for, at man kan bruge disse to metoder til at undersøge påvirkningen af forskellige parametre på adsorptionen af proteiner i en olie-vand grænseflade; fx proteintypen og anvendelse af hjælpestoffer med forskellige egenskaber. I forbindelse med optimering og design af nye og forbedrede formuleringer af proteinlægemidler kan de anvendte metoder benyttes til at screene for brugbare kombinationer af hjælpestoffer, som kan forhindre uønsket proteinadsorption under produktion af lægemidler.

FORMULERING AF PROTEINLÆGEMIDLER

At formulere et lægemiddel vil sige at fremstille det i en stabil form og sørge for ved brug af passende hjælpestoffer, at det aktive lægemiddelstof efter indgift er tilgængeligt for kroppen via den valgte administrationsvej.

Proteiner egner sig generelt ikke til tabletter, fordi de nedbrydes i mave-tarm-kanalen, og skal derfor normalt injiceres. Den mest enkle formulering vil være at opløse proteinet i vand, men denne formulering vil ikke være stabil eller acceptabel for patienterne. Det skyldes, at proteinlægemidler til injektion skal være sterile og tæt på pH-neutrale. En vandig proteinformulering vil derfor indeholde hjælpestoffer, typisk salte, til at holde pH stabil. Ellers vil proteinet kunne fælde ud, fordi dets opløselighed eller den kemiske nedbrydning af proteinet kan accelereres. Begge dele vil betyde, at der ikke administreres den angivne mængde af det aktive protein, og at virkningen af lægemidlet udebliver. Rent prak-

tisk kan udfældningen også betyde, at proteinet slet ikke kan administreres, fordi det klumper sammen, så det ikke kan komme ud gennem nålen.

Derudover anvender man ofte stabilisatorer, fx grænsefladeaktive stoffer, i flydende formuleringer. Et andet hjælpemiddel er co-faktorer, som er nødvendige for, at proteinet præsenteres på dets aktive form, eller for at beskytte proteinet, så det forbliver stabilt og ikke ændrer struktur i formuleringen.

Proteiner kan også formuleres som frysetørrede pulvere eller i partikler. Under fremstillingen udsættes proteinet for påvirkninger som frysning og tørring eller for grænseflader, der vil kunne påvirke strukturen og stabiliteten af proteinet. Derfor tilsættes hjælpestoffer, som beskytter proteinet mod effekten fra frysningen og grænsefladerne. Det kan fx være sukkerstoffer eller grænsefladeaktive stoffer.

REOLOGI VISER OPBYGNINGEN AF PROTEINLAGET

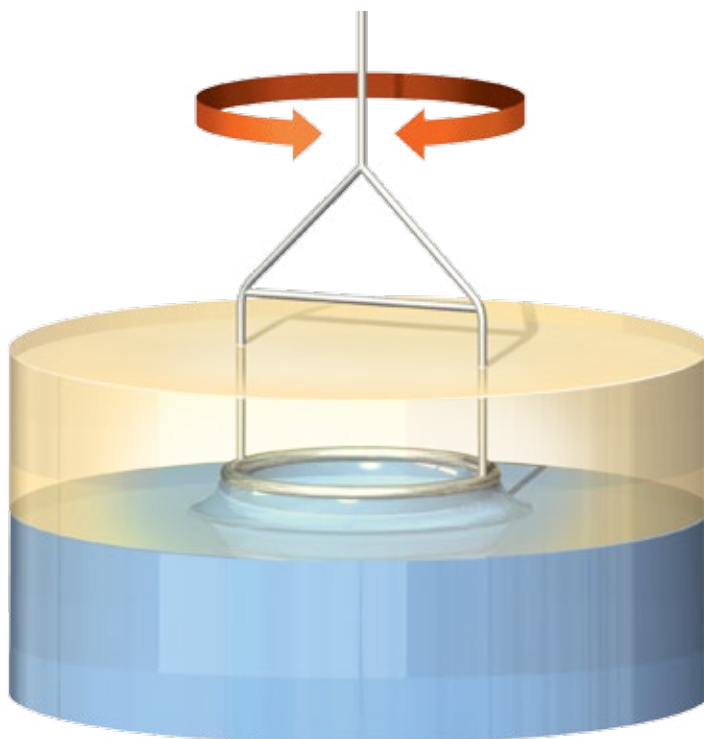
Reologiske målinger kan følge overgangen fra monolag og multilag, når proteiner adsorberes til grænseflader mellem olie og vand.

Målingen indledes ved at stille et bæger med proteinopløsning på reometret, derefter placere en såkaldt Du Noüy-ring i grænsen mellem vand og luft og lægge en bestemt mængde olie oven på den vandige opløsning. Ringen begynder nu at oscillere, og modstanden under bevægelsen bliver registreret.

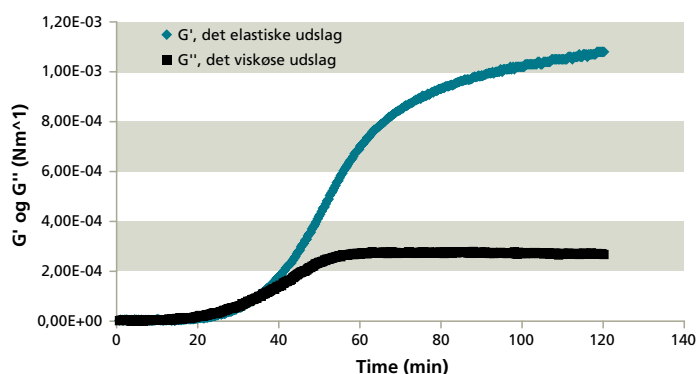
Når proteinerne diffunderer op til overfladen og samles i et monolag ved ringen, giver det et signal. Under målingen ændres monolagets struktur og multilag dannes. Senere for-

andres multilagets opførsel fra at minde om en tykflydende væske til at være dominerende elastisk. Ændringerne undervejs i processen fører alle til en gradvist øget modstand imod ringens bevægelser.

Når proteinlagets flydeegenskaber måles, kan de deles op i to forskellige udslag: Et viskositets-udslag og et elasticitets-udslag. Viskositet er et mål for, hvor meget grænsefladen ændrer sig under målingen via frigivelse af energi. Elasticitet beskriver den energi, der bliver bevaret under målingen; dvs. hvor meget af den oprindelige struktur, der er tilbage, når målinger er afsluttet.



Øverst ses en Du Noüy-ring, som måler dannelsen af et proteinlag i grænsefladen mellem vand og olie. Diagrammet til højre viser en reologisk beskrivelse af opbygningen af proteinlaget. Med tiden stiger det elastiske udslag i takt med, at det dannede multilag bliver tykkere og tykkere.



Ph.d. Stefania Baldursdottir er adjunkt på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi
Cand.pharm. Signe Hougaard Nielsen er tidligere specialestuderende på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi
Cand.pharm. Maria Fullerton er tidligere specialestuderende på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi
Ph.d. Lene Jørgensen er lektor på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi

UV-imaging

visualiserer frigivelse af lægemiddelstoffer

Udvikling af avancerede lægemidler kræver et detaljeret kendskab til lægemiddelstoffets transport både i formuleringen – fx tabletter, plastre eller salver – og i kroppen umiddelbart efter administrationen. UV-imaging er en ny teknik, som kan visualisere lægemiddelstoffers diffusion i opløsninger og geler og bestemme de lokale koncentrationer over tid.

Af Fengbin Ye, Emil Meng-Lund, Anan Yagmur, Susan Weng Larsen, Claus Larsen, Henrik Jensen og Jesper Østergaard

Et lægemiddelstofs virkning afhænger ikke kun af effekten på virkningsstedet. Først skal stoffet transporteres hen til virkningsstedet i kroppen, og her skal det frigives med den rette hastighed. Det aktive stof i et avanceret lægemiddel får derfor ofte hjælp af et transportsystem, som beskytter stoffet mod nedbrydning på vejen gennem organismen, og et afgiftssystem, som regulerer frigivelsen af stoffet, når lægemidlet når frem til målet. At udstyre lægemiddelstoffet med de nødvendige hjælpesystemer kaldes at formulere et lægemiddel, og formuleringen er afgørende for lægemidlets effekt, uanset om det indgives i tabletter, injektionsvæsker, plastre, tyggegummi, salver eller præparater, som indsprøjtes under huden.

Detaljeret viden om et lægemiddelstofs transport inde i formuleringen vil være til stor hjælp, når man ønsker at modificere den hastighed, hvormed stoffet frigives i kroppen på

eller i nærheden af virkningsstedet. En sådan indsigt kan nu opnås ved hjælp af UV-imaging. Det er en ny teknologi til karakterisering af lægemiddelstoffers transport i opløsninger og geler, som er transparente for ultraviolet stråling. Metoden er baseret på, at lægemiddelstoffet absorberer UV-lys, og i modsætning til traditionel UV-spektrofotometri måles absorptionen både som funktion af tid og position. Man kan med andre ord følge det aktive stofs bevægelser inde i formuleringen under afgiften.

Diffusion af lægemiddelstof i gel

Vi har for nylig sat fokus på piroxicam, et antiinflammatorisk middel, som anvendes ved behandling af gigt og andre inflammatoriske lidelser. Stoffet indgives normalt i tabletter, men formuleres også som en gel til påsmøring på huden med henblik på lokal behandling af gigtsmerter. Vi målte diffusionen af piroxicam gennem en gel fra et område med høj koncentration af lægemiddelstoffet til en del af gelen, som oprindeligt ikke indeholdt piroxicam. Man kan sammenligne med bevægelsen af lægemiddelstoffet fra en creme og ind i huden. Diffusionen af piroxicam blev visualiseret direkte ved en bølgelængde på 355 nm i form af en film. Ud fra de enkelte billeder i filmen kan koncentrationsgradienterne bestemmes, og vi opnår på den måde kvantitativ information om piroxicams diffusion i gelen. Forsøget viste, at diffusionen af piroxicam foregår ca 5 gange langsommere i 20 procents poloxamergel end opløst i en fosfatbuffer ved pH 7,4. Det

UV-IMAGING FØLGER STOFTRANSPORTEN I TID OG RUM

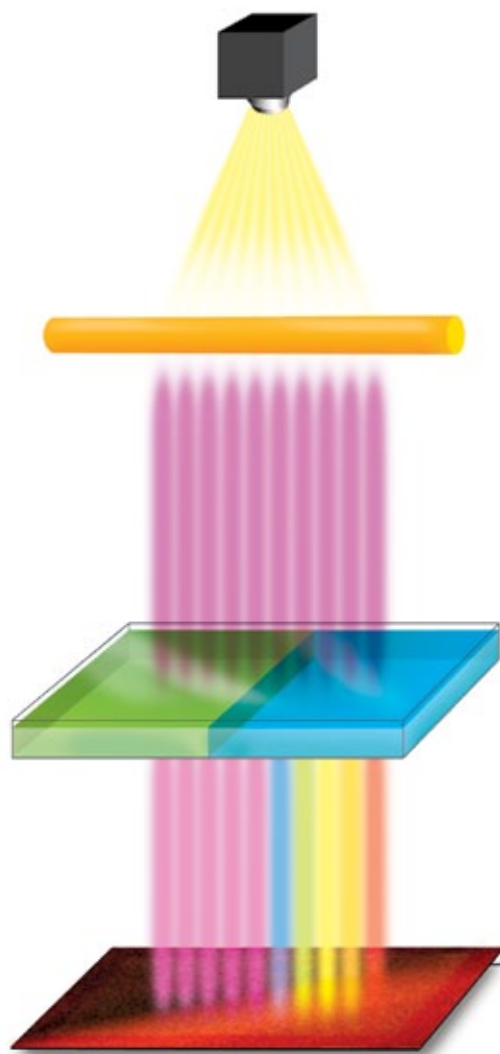
UV-imaging – billeddannelse med ultraviolet lys – er en videreudvikling af klassisk UV-spektrofotometri. Denne teknik bygger på, at mange lægemiddelstoffer absorberer lys i det ultraviolette område; dvs. lys med bølgelængder mellem 200 og 400 nm. Målinger af absorptionen ved en given bølgelængde kan anvendes til at bestemme koncentrationen af det stof, som absorberer lyset.

Først måles intensiteten af lyset, når det passerer gennem et rent opløsningsmiddel, og derefter måles intensiteten i en opløsning med lægemiddelstoffet. Ved relativt lave koncentrationer er absorptionen af UV-lyset proportional med lysvejens længde og koncentrationen af det absorberende stof, hvilket bruges til at bestemme den molære absorptionsko-

efficient ved hjælp af Beers lov.

UV-imageren er et kamera, som består af en samling af individuelle UV-spektrofotometre. Hver pixel stammer fra ét mini-spektrofotometer og har en udstrækning på $7 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$. Som i de konventionelle spektrofotometre passerer lyset gennem en quartzkuvette, før det rammer imagerens sensorområde, som maksimalt er $7 \text{ mm} \times 9 \text{ mm}$ svarende til 1.3 megapixel.

Der optages typisk 2-3 billeder i sekundet, hvilket gør det muligt at følge lægemiddelstoffets transport gennem formuleringen over tid. Vi er langt fra at kunne detektere enkelte molekyler, men den opnåede rumlige opløsning i μm -området er passende for de fleste diffusionsstudier.



Skematisk illustration af komponenterne i UV-imageren. Lampen blinker 2-3 gange i sekundet og belyser hver gang quartzcellen, hvor lægemiddelstoffet diffunderer fra en gel over i en opløsning. Lægemiddelstoffet absorberer ultraviolet lys, og positionelle forandringer i absorptionen over tid repræsenterer ændringer i de lokale koncentrationer. Forløbet registreres af sensoren, som overfører de målte data til computeren, der generer øjeblikksbilleder, som kan sættes sammen til en film.

skyldes, at polymeren i vand danner et komplekst netværk, en gel-lignende struktur, som kan sammenlignes med en svamp, hvor igennem piroxicam skal diffundere. Hvis man øger koncentrationen af polymeren, reduceres diffusionshastigheden yderligere.

Forsøgene illustrerer et hyppigt anvendt formuleringsprincip til at forsinke og kontrollere frigivelse af et lægemiddelstof ved brug af en diffusionsmatrix. Sådanne polymerbaserede gel-lignende afgiftssystemer forventes anvendt i nye præparater, som skal indsprøjtes under huden. Dette vil især være realistisk, når lægemiddelstofferne er store molekyler som terapeutiske peptider og proteiner, fordi de vil blive kraftigere tilbageholdt af polymernetværket end små molekyler som piroxicam.

I modsætning til andre metoder muliggør UV-imaging kvan-

titative studier af lægemiddelstoftransport direkte i gelen, hvilket eksperimentelt er langt mindre krævende end eksisterende teknikker og måske også mere interessant, fordi metoden forventes at give os ny mekanistisk indsigt i lægemiddelstoffrigivelsen fra denne type formuleringer.

Frigivelse af nikotin fra plaster

Vores første eksperimenter med UV-imaging blev udført på små udsnit af Nicorette®-nikotinplastre med en diameter på 2 mm. Undersøgelsen viste niktins frigivelse fra en plasterprøve og efterfølgende diffusion ud i vandig buffer, hvor man kunne se, at absorptionen af UV-lyset og dermed niktinkoncentrationen steg over tid.

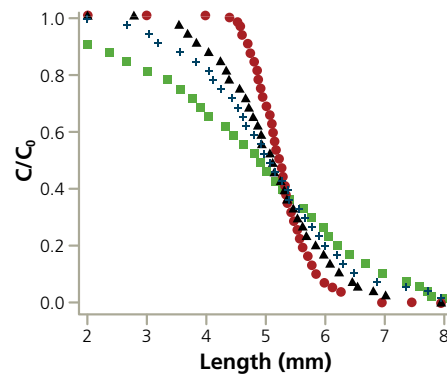
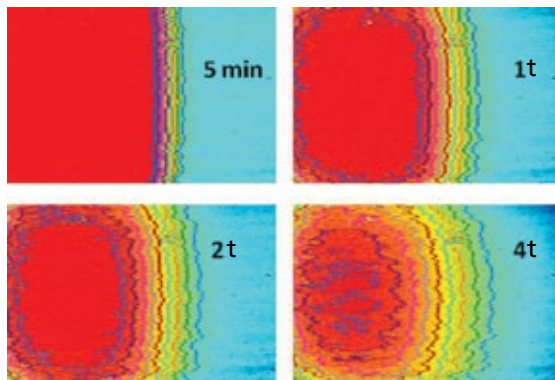
Ved summering af UV-absorbansen over billedområdet kunne vi bestemme mængden af nikotin frigivet fra plastrer som

DIFFUSION SKABES AF FORSKELLE I KONCENTRATIONER

Diffusion er en proces, hvorved koncentrationsgradienter af et stof mindskes og til sidst forsvinder som følge af molekylernes tilfældige bevægelser. Stoftransporten sker fra områder med en høj lokal koncentration til områder med lav koncentration.

Diffusion er en relativt langsom proces, som især har betydning ved transport af molekyler over små afstande, typisk

fra μm til mm. Transport over længere afstande sker normalt ved hjælp af andre mekanismer, fx via væskers flydning. Matematisk bruges diffusionskoefficienten som et mål for et lægemiddelstofs evne til at diffundere gennem en given matrix. Diffusionskoefficienten vil bl.a. afhænge af molekylets størrelse samt af matrixens egenskaber.



Billederne er optaget ved UV-imaging af diffusion af gigtmedicinen piroxicam i en 20 procents poloxamergel; imagingområdet er 3 mm × 8 mm. De fire snapshots viser, hvordan lægemiddelstoffet, som oprindeligt kun var placeret i den ene halvdel af gelen, bevæger sig fra den del af gelen med høj piroxicamkoncentration (rød) til den del af gelen, som oprindeligt ikke indeholdt piroxicam (blå). Diagrammet viser koncentrationsgradienten i billedernes længderetning til de fire tider: 5 minutter (rød), 1 time (sort), 2 timer (blå) og 4 timer (grøn). Som forventet bliver koncentrationsgradienten mindre stejl over tid.

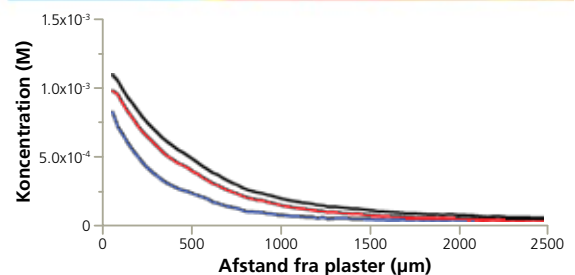
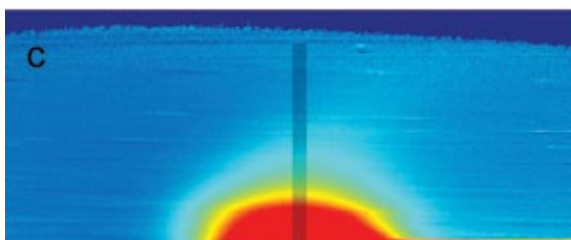
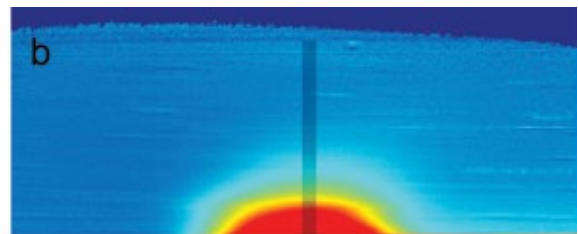
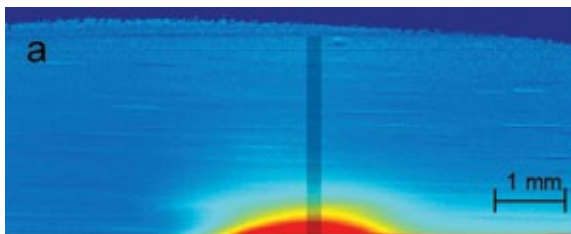
funktion af tiden, hvilket tillod bedømmelse af plastrets effektivitet som afgiftssystem. For et nikotinplaster kræves det, at nikotinen frigives langsomt i små mængder over en periode på op til 16 timer.

UV-imageren giver mulighed for at måle mængden af frigivet lægemiddelstof helt tæt på formuleringen, fordi man kan måle på små prøver som med nikotinplastret. De traditionelle laboriemetoder til afprøvning af lægemiddelformuleringer kræver ofte omfattende prøveforberedelse. Til sammenligning ventes UV-imaging at medføre mindre prøvestørrelser, mindre tidskrævende eksperimenter og færre arbejdsstrin.

Et vigtigt nyt værktøj

UV-spektrofotometri er en velkendt og robust analytisk målemetode. UV-imaging tilføjer muligheden for at lave målinger af lysabsorption opløst med hensyn til position. Herved kan der optages serier af billeder, som gør det lettere at følge lægemiddelstoffets transport over tid, fx via diffusion.

UV-imaging kræver, at den matrix, som undersøges, er transparent for lys i UV-området, hvorfor teknikken er begrænset til undersøgelser i laboriet. Vores indledende forsøg viser, at UV-imaging kan blive et vigtigt værktøj i udviklingen af nye lægemiddelformuleringer.



UV-billeder af frigivelsen af nikotin fra prøve med en diameter på 2 mm af et Nicorette®-plaster og tilhørende koncentrationsgradienter til tiderne 1 minut (a; blå), 2 minutter (b; rød) og 3 minutter (c; sort).

Cand.scient. Fengbin Ye er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi Stud.pharm. Emil Meng-Lund er specialestuderende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi Ph.d. Anan Yaghmur er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi Ph.d. Susan Weng Larsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi Ph.d. Henrik Jensen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi Dr.pharm. Claus Larsen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi Ph.d. Jesper Østergaard er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi



Forkert medicinering og unødige indlæggelser

Dårlig kommunikation mellem hospitaler og praktiserende læger medfører, at mange patienter får problemer med deres medicinske behandling, hvilket ofte er skyld i unødige indlæggelser. Det planlagte elektroniske Fælles Medicinkort vil give alle involverede læger adgang til patientens medicinoplysninger med mulighed for opdatere dem.

Af Søren Ilsøe-Kristensen, Steffen Thirstrup og Mette Rasmussen

Når en patient udskrives fra hospitalet, overtages den medicinske behandling ofte af patientens egen læge. Dette kræver god kommunikation mellem hospitalslægen og den alment praktiserende læge for at sikre, at begge parter er enige om, hvordan patienten skal behandles. Imidlertid viser

flere undersøgelser, at kommunikationen ikke er god nok, og at kommunikationsbrister i sundhedsvæsenet kan være årsag til, at mange patienter får problemer med deres medicinske behandling.

For den praktiserende læge betyder dårlig information fra hospitalet, at det bliver sværere at tage stilling til, om den igangværende behandling er hensigtsmæssig for patienten, eller om der skal foretages ændringer. Nye symptomer, som opstår efter udskrivelsen, kan fx være bivirkninger af medicin, som lægen ikke har kendskab til. Valg af ny medicin bliver vanskeliggjort, fordi lægemidler kan vekselvirke med hinanden, så det nye 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, så det i sidste ende går ud over helbredet.

DET FÆLLES MEDICINKORT

Formålet med det Fælles Medicinkort (FMK) er at få reduceret de medicineringsfejl, som opstår på grund af manglende oplysninger om en borgers medicinering, når sundhedspersonalet skal håndtere borgerens medicin, eller når borgeren behandles hos forskellige læger. I dag bruger sundhedspersonalet mange ressourcer på at ringe eller sende e-mail til hinanden for at indhente oplysninger om patienters medicinering. Manglende oplysninger kan forårsage fejlmedicineringer.

Grundlæggende er ideen med det Fælles Medicinkort, at alle involverede sundhedspersoner skal dele de samme medicindata frem for at sende data til hinanden. Løsningen indebærer, at alle aktører fremover

gemmer oplysninger om medicinering i en fælles, elektronisk service hos Lægemiddelstyrelsen. Hver gang en borgers medicin ændres, skal den læge, der udskriver lægemidlerne, ajourføre oplysningerne i det nationale register. Herved vil relevante sundhedspersoner altid kunne få adgang til en opdateret liste over borgerens medicin. Det er meningen, at det Fælles Medicinkort skal integreres i de eksisterende IT-systemer på hospitalerne og hos de praktiserende læger. Hensigten er, at kommunikationen mellem blandt andet hospitaler og praktiserende læger forbedres ved, at beslutningerne om patienternes medicinering baseres på de samme medicinoplysninger. Således vil sundhedspersoner få et bedre overblik over borgeres aktuelle brug af lægemidler, og borgerne vil potentielt opleve færre fejl i forhold til den medicin, de får udskrevet, og dermed færre gener.

Det Fælles Medicinkort skal være etableret i samtlige regioner, hos praktiserende læger og i kommunerne inden udgangen af 2011.





Efter udskrivelse fra hospitalet får mange patienter ikke en optimal medicinering, fordi den praktiserende læge, som overtager behandlingen, får mangelfulde oplysninger om de anvendte lægemidler under indlæggelsen. Kommunikationsbristerne kan i værste fald føre til, at lægen udskriver medicin, som i sidste ende skader patientens helbred.

På trods af de mange risici er der ikke på nuværende tidspunkt noget sted, hvorfra hospitaler og praktiserende læger kan få et samlet overblik over en patients medicinske behandling. De lægemidler, som patienten anvender eller tidligere har anvendt, kan således være registeret i hospitalsjournaler, i journaler hos den praktiserende læge samt i optegnelser hos sundhedshjælpere, hjemmesygeplejersker og hjemmehjælpere.

Det manglende overblik kompliceres yderligere af, at patienterne ofte undlader at købe den medicin, som lægen har udskrevet. Og selv når lægemidlerne er indkøbt på apoteket, tager patienten ikke altid medicinen. Undersøgelser har vist, at patientens manglende medicin efterlevelse eller andre lægemiddelrelaterede problemer er årsag til mellem 4 og 28 procent af alle hospitalsindlæggelser.

Mangelfuld oplysning til lægen

Når en patient udskrives fra et hospital, sender hospitalet en såkaldt epikrise til patientens egen læge. Epikrisen indeholder oplysninger om den medicin, patienten udskrives med, i form af en medicinstatus. Desuden findes der et resumé af journalen fra indlæggelsen samt eventuelle forslag til videre behandling. Epikrisen er på nuværende tidspunkt den formaliserede vej til at videregive oplysninger fra hospitalet til den praktiserende læge, og omkring 80 procent af alle epikriser sendes i dag elektronisk.

På Det Farmaceutiske Fakultet har vi undersøgt, hvad epikriserne indeholder af information efter patientens udskrivelse. Studiet viste, at de ofte rummer forslag til videre medicinsk

behandling. Men andelen af epikriser, som indeholdt en fyldestgørende medicinstatus, var påfaldende lav. Blandt de 593 undersøgte epikriser manglede der en medicinstatus i over to tredjedele af tilfældene. Desuden manglede der alt for ofte detaljerede beskrivelser af de udskrevne lægemidler, og endelig var dokumentationsfejl hyppige. Enten manglede der dokumentation for den medicin, som var udskrevet under indlæggelsen, eller også blev der tilføjet medicin i epikrisen, som ikke var ordineret i hospitalsjournalen.

Medicinering efter udskrivelse

Flere undersøgelser har vist, at patienters medicin ofte bliver ændret, uden at ændringen bliver kommunikeret videre til andre relevante fagpersoner. For at undersøge anvendelsen af lægemidler efter udskrivelse blev 164 patienter fra Region Hovedstaden og Region Syd rekrutteret til at deltage i et projekt, hvor vi indhentede oplysninger om deres medicinhistorie gennem de første seks måneder efter udskrivelsen.

Udgangspunktet var patienter med hjertesvigt, fordi de typisk har et stort forbrug af forskellige lægemidler, og fordi de i samme periode er tilknyttet både et hospital og en praktiserende læge. Patienternes medicinhistorie blev indsamlet fra journaler på tre hospitaler, hos de praktiserende læger og via recepter hentet på apoteket. Vi fandt, at ingen af datakilderne gav et samlet overblik over den enkelte patients medicinhistorie. Men ved at sammenligne de respektive data fik vi et overblik over, i hvor høj grad medicinoplysningerne stemmer overens, og hvilke ændringer patienterne oplever.

Der var betydelige ændringer i patienternes medicinforbrug



gennem observationsperioden. Både hospitalslæger og praktiserende læger deltog i behandlingen af patienterne, men de observerede ændringer i patienternes medicinforbrug var tilsyneladende ikke koordineret mellem de praktiserende læger og hospitalslægerne. 24 procent af patienterne i undersøgelsen undlod at tage medicin udskrevet af hospitalets læger, mens andre fik helt nye lægemidler ordineret af deres praktiserende læge.

Hjertepatienter indtager ofte adskillige lægemidler i nøje afstemt kombination, men i mange tilfælde blev kombinationen af lægemidler ændret af patientens praktiserende læge, uden at sundhedsprofessionelle på hospitalet nødvendigvis blev inddraget.

Behov for et samlet overblik

De to studier peger samlet på betydelige kritiske problemstillinger ved patientovergange i sundhedssektoren. Der skal

mere fokus på at højne kvaliteten af epikriser, så det står helt klart, hvilke lægemidler patienterne bliver udskrevet med fra hospitalet. Desuden skal koordineringen mellem hospitalerne og de praktiserende læger forbedres, når patienternes medicin ændres efterfølgende.

De fleste hospitaler og praktiserende læger anvender i dag elektroniske patientjournaler. Imidlertid kan de forskellige IT-systemer sjældent kommunikere direkte med hinanden. Hvert hospital har typisk sit eget system, og de praktiserende læger har mindst 18 systemer at vælge i mellem. Som løsning på problemet arbejder man i sundhedsvæsenet med at indføre et nyt system; det Fælles Medicinkort. Kortet vil give adgang til patientens medicinoplysninger på tværs af alle eksisterende systemer, og alle involverede læger kan på den måde få adgang til at se og opdatere den aktuelle medicinering af patienten.

*Ph.d. Søren Ilsøe-Kristensen er ansat på Institut for Rationel Farmakoterapi
Ph.d. Steffen Thirstrup er institutchef på Institut for Rationel Farmakoterapi
Ph.d. Mette Rasmussen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi*

Veterinære lægemidler i natur og miljø:

Er miljørisikovurderingen god nok?

Et EU-projekt med deltagelse af Det Farmaceutiske Fakultet har identificeret problemer i den europæiske guideline for miljørisikovurdering af veterinære lægemidler. Vort modelstof, et ormemiddel, opfylder de gældende miljøkrav, men nye eksperimentelle metoder viser, at stoffet udgør en uacceptabel risiko for organismer, som lever i gylle, overfladevand, sedimenter og jord.

Af Kristine A. Krogh, Gitte G. Anskjær og Bent Halling-Sørensen

Lægemidler til mennesker og dyr er i sagens natur biologisk aktive stoffer, som kan påvirke og i værste fald forgifte levende organismer, når de spredes i miljøet – fx via gyllen fra svin, kvæg og får. Derfor indførte EU for fem år siden et sæt retningslinier for miljørisikovurdering af veterinære lægemidler, som skal sikre, at anvendelsen af medicin i husdyrbruget er miljømæssigt forsvarlig.

Det Farmaceutiske Fakultet har medvirket i et større EU-finan-

sieret forskningsprojekt, Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPharm), som undersøgte, om den gældende miljørisikovurderingsguideline lever op til lovgivningens krav om, at lægemidler ikke må forårsage nogen risiko for uønskede effekter på miljøet. I projektet benyttede forskergruppen det antiparasitære lægemiddel ivermectin som modelstof. Ivermectin anvendes i stor stil til behandling af kvæg og får mod indvoldsorm, og stoffet ender i miljøet enten via fæces fra græssende dyr eller via spredning af gylle fra dyr på stald.

Retningslinjerne for miljørisikovurdering af veterinære lægemidler er beskrevet af European Medicines Agency (EMA) og International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH).

Tærskelværdien i jord

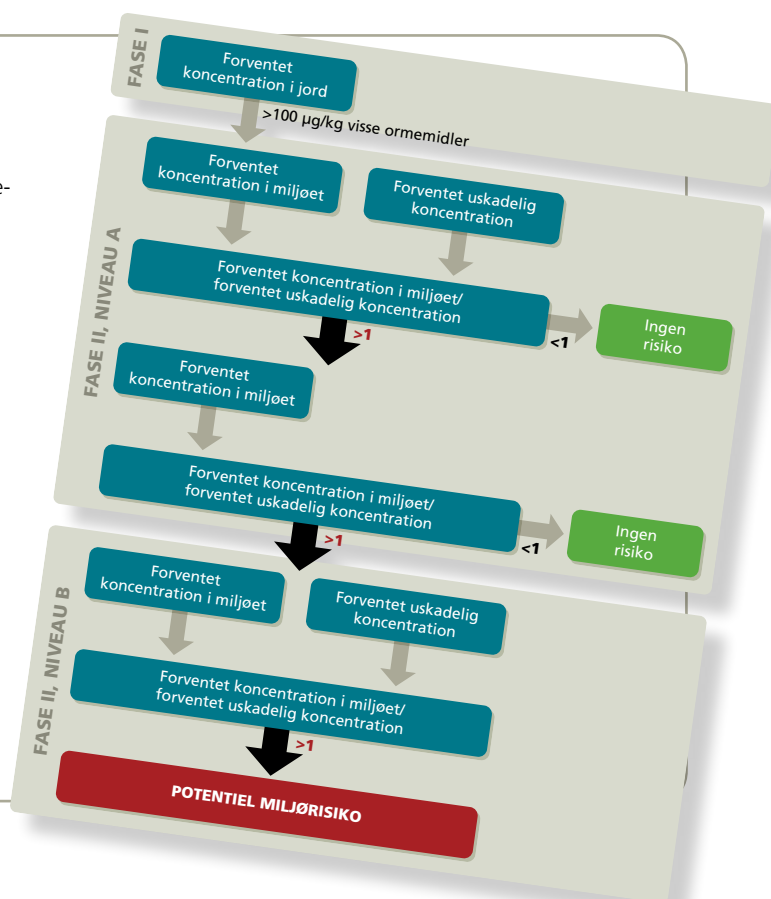
Den internationale forskergruppe startede med at følge EMA-guidelinens fase I, hvor man estimerer den forventede koncen-

EMA RISIKOVURDERINGEN

Flowdiagrammet viser forløbet i miljørisikovurderinger af veterinære lægemidler efter den europæiske EMA-guideline.

Fase I: Indledende estimering af den forventede koncentration af lægemiddelstoffet i jord. Hvis koncentrationen er under 100 µg/kg jord, standser miljøvurderingen normalt her. For visse ormemidler som ivermectin, der anvendes til græssende dyr, går man videre til fase II. I fase II niveau A inddrages parametre som stoffets fysiske og kemiske egenskaber samt metabolisme og udskillelse af stoffet fra de behandlede dyr. Desuden laves specifikke studier af lægemiddelstoffets skæbne i forskellige miljøer som overfladevand, sediment, jord, fæces og gylle. De forventede koncentrationer af lægemiddelstoffet sammenholdes med den højeste uskadelige koncentration i de forskellige matricer. Den højeste uskadelige koncentration bestemmes ud fra effektstudier, som afklarer virkningen på udvalgte testorganismer. Hvis risikokvotienten er større end 1, går man videre med en mere detaljeret risikokarakterisering, hvorpå kvotienten igen beregnes.

Er risikokvotienten efter niveau A større end 1, forsætter vurderingen til niveau B. Her undersøger man bl.a. lægemiddelstoffets effekter på flere arter i samme miljø, fx vand, hvorpå den endelige risikovurdering laves.



Dafnier (*Daphnia Magna*), som lever i overfladevand, er mest følsomme over for ormemedlet ivermectin. Koncentrationer på få ng/l, kan immobilisere dyrene



tration af et lægemiddel i jorden. Vurderingen blev udført ud fra kendskab til dosis og anvendeshyppighed af ivermectin samt ud fra data om dyrehold. Koncentrationen blev estimeret for to scenarier. I det ene opdrættes dyrene på stald, og lægemiddelresterne ender i gyllen, som spredes på markerne. I det andet scenarium går dyrene på græs, og lægemiddelresterne udskilles direkte på jorden via urin og fæces.

De estimerede koncentrationer i jorden var i begge scenarier under den gældende tærskelværdi på 100 µg/kg jord, hvilket for de fleste veterinære lægemidler betyder, at miljørisikovurderingen stopper her, og lægemidlet miljøgodkendes. Men for visse ormemedler som ivermectin, der anvendes til dyr på græs, skal man i følge guidelinien gå videre med risikovurderingens fase II. I projektet blev det gjort for begge scenarier.

Estimatet forbedres

I fase II niveau A forbedres estimaterne af koncentrationen af ivermectin i omgivelserne ved, at man specifikt beregner koncentrationen i overfladevand, grundvand, sediment, jord og fæces. De estimerede koncentrationer sammenholdes med effektkoncentrationer af ivermectin, som forventes at påvirke testorganismer i de forskellige miljøer.

Desuden inddrages kendskab til ivermectins fysisk-kemiske egenskaber samt viden om omsætningen af lægemiddelstoffet i husdyr og i miljøet. Via eksperimenter afklares absorption, metabolisme og udskillelse fra kvæg, svin og får. Desuden be-

lyses ivermectins skæbne i omgivelserne: Fordeling i jord, nedbrydning i jord og nedbrydning i sediment. Ivermectin bindes til jordpartikler, hvorfor lægemiddelstoffet kun i ringe grad udvaskes til grundvand og overfladevand. Man må dog forvente, at ivermectin, som bindes til eroderende jordpartikler, kan udvaskes til vandmiljøet. Endvidere viser studierne, at ivermectin er svært nedbrydeligt i jord og sediment.

Resultaterne fra de specifikke studier anvendes til at beregne mere realistiske estimater af koncentrationen af lægemiddelstoffet i fæces, jord, grundvand og overfladevand for både græssende dyr og dyr på stald. I første omgang estimeres den forventede koncentration i miljøet ud fra data om dosis, anvendeshyppighed, dyrehold og fordeling i jord, mens der ikke tages hensyn til metabolisme af lægemidlet i de behandlede dyr. I et efterfølgende estimat inkluderes information om metabolisme, udskillelse og nedbrydning i vand, jord og fæces. Dette mere realistiske estimat forudsagde dobbelt så høje koncentrationer af ivermectin i jorden som det indledende estimat i fase I.

Effektstudier med organismer

Effektstudier afklarer ivermectins virkning på organismer, der lever i henholdsvis vand og jord samt i fæces. For vandlevende organismer blev der udført akutte effektstudier over 48-96 timer med alger, dafnier og fisk. Dafnierne var mest følsomme, idet der blev observeret effekter i form af immo-

Miljømatricer	Organisme	Fase II-A Groft estimat af koncentrationen i miljømatricerne	Fase II-A Mere realistisk estimat af koncentrationen	Fase II-B Koncentrationen estimeret ud fra felt data
Overfladevand	Alger	Ingen risiko	Ikke krævet	Ikke krævet
	Dafnier	Risiko	Risiko	Risiko
	Fisk	Risiko	Risiko	Ingen data tilgængelige
Sediment	Dansemyg og bentiske organismer	Risiko	Risiko	Risiko
Jord	Planter	Ingen risiko	Ikke krævet	Ikke krævet
	Regnorme	Ingen risiko	Ikke krævet	Ikke krævet
	Springhaler	Ingen risiko	Ikke krævet	Ikke krævet, risiko observeret i testsystem med to arter sammen
Fæces/møg	Kvægflue og møgbille	Risiko	Risiko	Risiko (feltstudie)

Tabellen viser den overordnede miljørisikovurdering for organismer, som lever i overfladevand, sediment, jord og fæces.

Kvægfluer, som lever i fæces, udvikler sig langsommere fra æg til flue, når kvæget er blevet behandlet med ivermectin.



FELTFORSØG BEKRÆFTER LABORATORIEFORSØG

I følge VICH-guidelinen skal der ikke udføres feltforsøg med antiparasitære stoffer som ivermectin under fase II, niveau B, men i forbindelse med det europæiske forskningsprojekt blev der alligevel lavet et modelstudie samt to feltstudier i York i England og Madrid i Spanien.

Modelstudiet var et semifeltstudie baseret på intakte jordkolonner, hvor der på overfladen af kolonnen spredes kvæggylle tilsat ivermectin i forskellige koncentrationer. Resultaterne støtter laboratorieforsøg, der indikerer at ivermectin nedbrydes langsomt i jord. Studiet viste også, at ivermectin er mere toksisk overfor leddyr end andre dyr, hvilket bekræfter resultaterne af laboratorieforsøgene.

I feltstudierne blev kokasser fra køer, som var blevet behandlet med ivermectin, placeret på græsmarker og overdækket med net. Koncentrationen af ivermectin blev efterfølgende bestemt i kokassen samt i den underliggende jord efter en måned. Resultaterne bekræfter, at ivermectin er meget svært nedbrydeligt i fæces under feltforhold, samt at ivermectin ikke transporteres fra fæces til jorden under kokassen. Ud fra disse forsøg kunne man forbedre estimaterne for koncentrationen i de forskellige miljøer, som indgik i projektet. Feltforsøgene bekræftede også laboratorieforsøgene ved at påvise, at organismer, der lever i fæces påvirkes af ivermectin.

billet helt ned til koncentrationer af ivermectin på få ng/l. De jordlevende testorganismer var regnorme og springhaler, mens testorganismerne i fæces og gylle var kvægfluer, gødningsfluer og møgbiller. Effekter på udviklingsraten fra æg til flue af kvægfluen optrådte helt nede ved koncentrationer omkring få µg/kg frisk møg. Ud fra disse studier bestemmer man den højeste uskadelige koncentration, hvor lægemiddelstoffet ikke forventes at have noget effekt på organismerne.

Næste trin er en risikokarakterisering, hvortil de genererede estimater anvendes til at beregne en risikokvotient; dvs. forholdet mellem den forventede koncentration i miljøet og den uskadelige koncentration for de forskellige organismer. Risikokvotienten var mindre end 1 for de testede jordorganismer, hvorfor der ikke forventes effekter. Derimod var kvotienten større end 1 for dafnier og fisk samt for kvægfluer og møgbiller, og her må det forventes, at ivermectin har skadelige effekter på organismerne. Når risikokvotienten er større end 1 for vandlevende hvirvelløse organismer, skal der udføres en risikokarakterisering for sediment. Den viste, at der også er en risiko for organismer, som lever i sedimentet.

Yderligere effektstudier under fase II, niveau B, er krævet for de organismer, hvor risikokvotienten i niveau A er større end 1. Her bestemmer man eksperimentelt de laveste koncentrationer, hvor ivermectin ikke medfører skadevirkninger på organismer i de undersøgte miljøer. Den uskadelige minimumskoncentration for de mest følsomme arter i overfladevand, dafnier, var helt nede på 0,0003 ng/l. I sediment var den laveste uskadelige koncentration i sedimentet 0,6 µg/kg tørstof sediment for rundorme, mens den uskadelige koncentration for organismer i fæces var på 53 µg/kg tørstof.

For vandmiljøet omfattede de udførte test både forsøg med enkeltarter samt flere arter i samme testsystem; fx med vand eller med sediment eller med vand og sediment sammen. Desuden blev der udført forsøg i jord med flere arter i samme testsystem. I et sådant testsystem med springhaler og mider sammen, var springhalerne betydelig mere følsomme end i testsystemer med enkeltarter.

Risiko for organismer i miljøet

Til sidst laves så den endelige risikokarakterisering ud fra data, som er opnået i niveau B. Der er en meget stor risiko for vandlevende invertebrater som dafnier og dertil en risiko for organismer, der lever i sediment samt i fæces og gylle. Jordtoksicitetstesten med to arter i samme testsystem viste endvidere, at der var en risiko for springhaler. Uanset om husdyrene er på græs eller på stald, var der en uacceptabel risiko for de undersøgte miljøer; overfladevand, sediment og jord samt fæces.

Resultaterne af miljørisikovurderingen viser, at tærskelværdien på de 100 µg/kg jord for den beregnede jordkoncentration under fase I ikke er tilstrækkelig beskyttende for flere arter i de undersøgte scenarier. Alt i alt konkluderer den europæiske forskergruppe, at lovgivningens miljøkrav ikke overholdes.

Hvad gør man så? Resultaterne er nu publiceret med 28 medforfattere i et velanskrevet internationalt tidsskrift, og vi afventer nu med spænding EMA's udspil til, hvordan man vil igangsætte risikoreducerende initiativer, så det kan undgås, at ivermectin ender i miljøet og dermed giver anledning til skadelige effekter på organismer.

Ph.d. Kristine A. Krogh er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Cand.scient. Gitte G. Anskjær er ph.d. studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Bent Halling-Sørensen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi



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

Lægemiddelforskning

udgives af Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Redaktion

Jesper Munck, Rolf Haugaard og Lise Moesby (ansvarshavende)

Billedredaktion

Jesper Munck og Jens Raadal

Fotos

Dan Sørensen (4, 5)
Stock.xchng (6, 18, 21, 25, 30, 35, 38, 39, 40, 49, 52)
LEO Pharma A/S (11)
Getty Images (16)
Jesper Munck (14, 34)
Rachel Prunier (19)
Nina Rønsted (20)
Hans Christian Helms (22,23)
iStockphoto (31, 37, 50)
Polfoto (50)
EPO (51)
Flagstaffotos (54)

Grafik/illustrationer

Henning Dalhoff (4, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 41, 43, 45)
Jens Raadal (13, 17, 25, 27, 28, 32, 42, 47)
Cs4fn (36)

Grafisk design og produktion

Jens Raadal

Tryk

Best-Buy-Broker

ISSN 0905-0051