



Lægemedselforskning

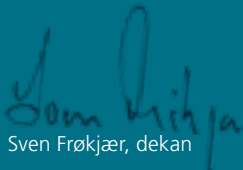
2011



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. Det er et område i vækst og med mange spændende udfordringer. Her spiller universiteternes grundforskning inden for naturvidenskab, teknisk videnskab og sundhedsvidenskab positivt sammen med lægemiddelindustriens mere målrettede forskning. 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 Lægemiddelforskning 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

Mød os på nettet – og ansigt til ansigt

Lægemiddelforskning

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

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 er med til at fremstille lægemidler indeholdende ibuprofen 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 4 forskellige øvelsesprojekter, som afvikles over 2 dage fra kl. 9-17. Læs mere på farma.ku.dk/studieretningsprojekt

Gymnasielærerdag

Det Farmaceutiske Fakultet, Det Biovidenskabelige Fakultet og Det Naturvidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet inviterer med den årlige **gymnasielærerdag** lærerne til faglig inspirationsdag. Foredrag og workshops giver rig mulighed for at høre nyt fra den natur-, sundheds- og biovidenskabelige forskningsverden. Nærmere oplysninger på: www.science.ku.dk/inspirationsdag

For gymnasieelever

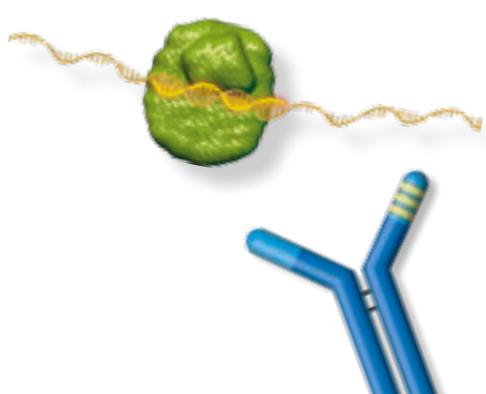
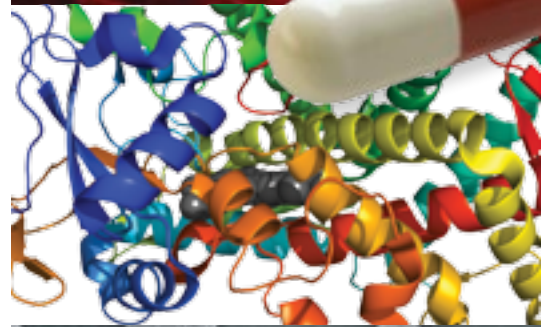
På www.farma.ku.dk/besoeg kan man læse mere om hvordan gymnasieelever kan komme i **3-dages studiepraktik** som farmaceutstuderende, om mulighederne for at skrive **studieretningsprojekt** samt hvad man skal gøre for at opleve farmaceutuddannelsen som **studerende for en dag**. Det er også her vi fortæller om, hvornår eleverne kan komme til **åbent hus**, hvor og hvornår de kan møde farmaceutstuderende på **uddannelsesmesser** eller være vidne til et festfyrværkeri af indtryk leveret af farmaceuter i alle aldre på **kulturnatten**.

Ønskes yderligere trykte eksemplarer af Lægemiddelforskning?

Send din bestilling til bestil@farma.ku.dk

Indhold

- 1 Nanobodies fra kameler – en ny klasse antistoffer til diagnostik og behandling** 4-6
Peter Durand Skottrup, Rasmus Prætorius Clausen og Erik Riise
- 2 Genetisk nanomedicin til behandling af leddegigt** 7-9
Camilla Foged, Linda Boye Jensen og Hanne Mørck Nielsen
- 3 Massespektrometri viser fordelingen af lægemiddelstoffer i planter og væv** 10-12
Christian Janfelt, Janina Thunig, Bin Li, Niels Wellner, Harald S. Hansen og Steen Honoré Hansen
- 4 Gendannelse af ødelagt væv med stamceller** 13-15
Eva Horn Møller, Yanhong Wen og Hanne Mørck Nielsen
- 5 Personlig medicinering af type-2 diabetes ud fra patientens genetiske profil** 16-19
Malene Hornbak og Åsa Andersson
- 6 Funktionelle fibriller som depotmedicin mod prostatakræft** 20-22
Minna Grønning Jensen, Andreas van Maarschalkerweerd og Tine Gottschalk
- 7 Medicinplanter og abort – ny viden kan hjælpe afrikanske kvinder** 23-25
Anna K. Jäger, Uffe Kristiansen og Vibeke Rasch
- 8 Måltret fisketur i hjernen giver ny viden om Fantasys virkningssted** 26-28
Inge S. Villumsen, Stine B. Vogensen, Bente Frølund, Rasmus P. Clausen og Petrine Wellendorph
- 9 Mysteriet om kavas toksicitet** 29-32
Line Olsen, Steen Honoré Hansen, Claus Cornett og Christian Skonberg
- 10 Uklare retningslinjer om D-vitamintilskud til etniske minoriteter** 33-35
Anna Mygind, Janine Morgall Traulsen og Lotte Stig Nørgaard
- 11 Farmaceut i krydsfeltet mellem hospital og læge** 36-39
Christine Tilsted Villesen, Jette Højsted og Lona Louring Christrup
- 12 Forsøgsmodel skal forudsige lægemiddelstoffers samspil i kroppen** 40-43
Anne Sophie Grandvuiet, Henrik Tang Vestergaard, Nicolas Rapin og Bente Steffansen
- 13 Computeren forudsiger lægemidlers omdannelse i leveren** 44-46
Patrik Rydberg og Lars Olsen
- 14 Ny testmetode afslører lægemidlers bivirkninger på immunforsvaret** 47-49
Alex Boje, Lise Moesby, Michael Timm og Erik Wind Hansen



Nanobodies fra kameler

– en ny klasse antistoffer til diagnostik og behandling

Dyr i kamelfamilien danner specielle antistoffer i blodet, hvorfra man kan konstruere små fragmenter, som kaldes nanobodies. De små antistofdele har unikke egenskaber, som gør dem meget anvendelige som lægemidler og til diagnostik. Vi har udviklet et nanobody, der kan detektere en bakterie, som medfører parodontose.

Af Peter Durand Skottrup, Rasmus Prætorius Clausen og Erik Riise

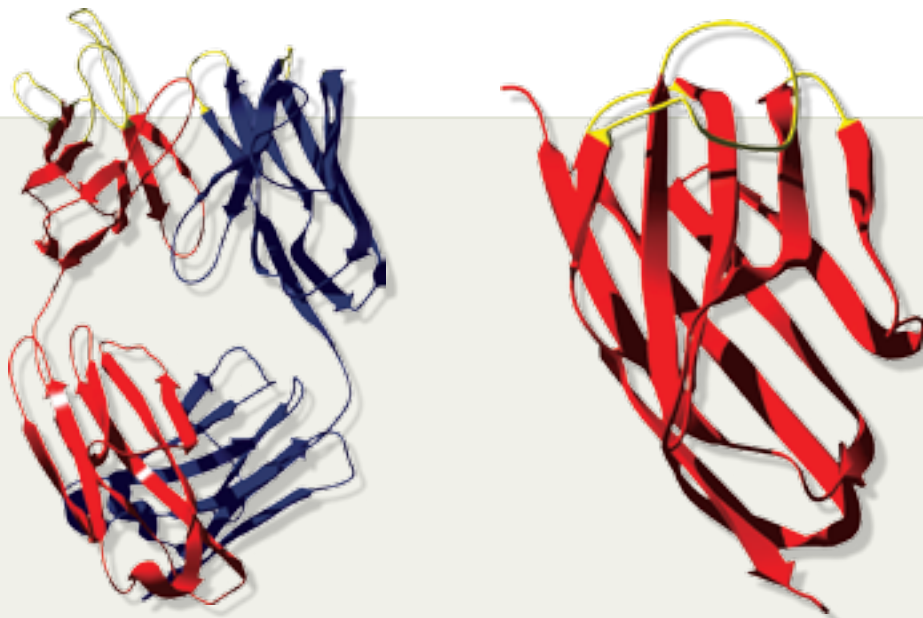
Antistoffer er en del af kroppens immunforsvar, som beskytter os mod bakterier, svampe og virus, men nu udvikles antistoffer i stigende udstrækning som lægemidler og til diagnosticering af sygdomme. I begge tilfælde udnytter man, at antistoffer kun binder sig til ét bestemt mål-molekyle, som kaldes for antigenet. Ved medicinsk behandling er antigenet typisk et protein i kroppen, som lægemidlet skal påvirke, og ved diagnostik kan antigenet fx være et protein, som er specifikt for en sygdomsfremkaldende mikroorganisme. Mange farmaceutiske antistoffer fremstilles ved hjælp af en teknik, hvor man fusionerer en antistofproducerende celle og en kræftcelle. Derved får man en cellelinie, som konstant vokser via celledeling, og hvor alle cellerne danner antistof. Men desværre er der ulemper ved metoden. Antistof-

fer kan være ustabile, og samtidig er de ofte store molekyler, der kan have svært ved at trænge ind til deres antigen, som kan være væv dybt inde i kroppen. Desuden er det både vanskeligt og kostbart at dyrke cellelinier.

Småt er godt

Derfor produceres antistoffer også i gensplejsede bakterier. Her behøver man ikke få dannet hele antistoffet, fordi man selv bestemmer, hvor stor en del af genet for antistoffet, man vil klonere og indsætte i bakterien. På den måde kan man fremstille et mindre og mere stabilt antistoffragment, som stadig besidder de dele, som er nødvendige for, at antistoffet kan genkende og binde sig til sit antigen.

Antistoffer er proteiner, der består af aminosyrer, som danner to tunge kæder og to lette kæder. Den struktur af antistoffet, der binder antigenet, befinder sig i de yderste domæner af disse kæder. Forskere og medicinalfirmaer, som fremstiller antistoffer i bakterier, nøjes derfor med at klonere de antigenbindende domæner af kæderne. Det er nemlig tilstrækkeligt til, at det formindskede antistof kan binde sig til det antigen, som det skal detektere ved diagnostik eller påvirke medicinsk. Undersøgelser har imidlertid vist, at det primært er den tunge kæde i det antigenbindende domæne af antistoffet, som er vigtig for bindingen til antigenet, så for at få et end-



Til venstre ses strukturen af et almindeligt antistoffragment, som består af to tunge kæder (rød) og to lette kæder (blå). De gule yderområder er den del af antistoffet, som binder antigenet. Bindingsområdet har en konkav form, og det fanger antigenet som et par kæber, der klapper sammen om sit bytte. Til højre ses et nanobody, der kun består af de tunge kæder. Den antigenbindende del har en konvex form, og denne top passer ind i en kløft på antigenet.

nu mindre, men fuldt funktionsdygtigt fragment, har man uden held forsøgt at fremstille antistoffer, som kun består af det relevante domæne af den tunge kæde. Når det ikke er lykkedes, skyldes det, at disse domæner er meget ustabile, når man forsøger at fremstille dem uden tilstedeværelse af det tilsvarende domæne fra den lette kæde.

Naturens minimalisme

Som så ofte før har det nu vist sig, at naturen selv har fundet på en løsning, idet så forskellige dyr som kameler og hajer danner specielle antistoffer, som adskiller sig fra normale antistoffer ved kun at have to tunge kæder. Tung-kæde-antistoffernes antigen-bindende domæner er markant forskellige fra normale antistoffers i flere afgørende aminosyrepositioner. Det gør domænet meget stabilt, når det klones og produceres alene. Det antigen-bindende domæne af kamelens antistoffer kaldes for et nanobody. De små nanobodies har typisk en udstrækning på kun 4x3 nanometer, og det øger deres evne til at trænge ind til antigener i kroppen.

Tilmed har nanobodies endnu en interessant egenskab, fordi de binder til antigenet på en helt unik måde. Normale antistoffer fanger antigenet i en konkav lomme, men det er omvendt for nanobodies, hvor de bindende aminosyrer udgør en konvex spids, som kan passe ind i en kløft på antigenet (se ill. side 6). Man forventer derfor at kunne finde antistoffer mod antigener, som vi ikke har antistoffer mod i det traditionelle antistofsystem. Specielt er det interessant at identificere nanobodies, som kan hæmme enzymer og receptorer ved at binde i områder, hvor der ikke er adgang for almindelige antistoffer.

Hurtig identifikation af bakterier

Nanobodies er også lovende til detektion af sygdomsfremkaldende bakterier. At skelne mellem ufarlige og farlige bakterier med antistoffer er særdeles attraktivt i situationer, hvor det er

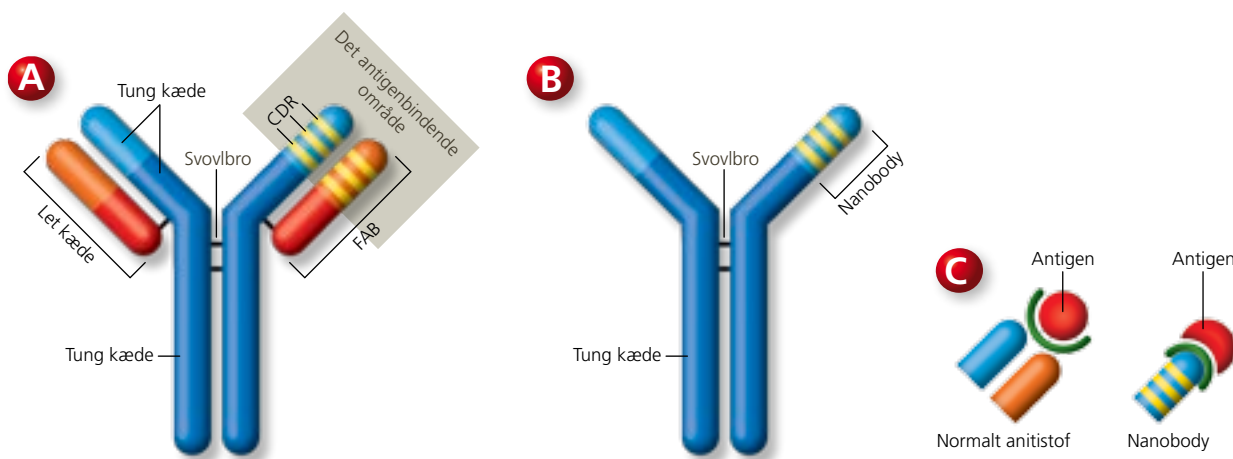
vigtigt at stille en korrekt diagnose hurtigt og præcist; fx på hospitaler, i fødevareproduktionen eller på lægens kontor. Det er dog tit vanskeligt at udvikle antistoffer, som er tilstrækkelig specifikke, fordi mange bakterier danner de samme overfladeproteiner, hvilket medfører risiko for fejldiagnoser. Ved at udnytte den specielle konvekse antigen-bindende struktur i nanobodies, kan man fange antigener, som er dybere begravet under bakteriers overflade, og på den måde opnå en mere specifik detektion. Derfor kan nanobodies blive en vigtig del af fremtidige tests for sygdomsfremkaldende bakterier.

I vores laboratorium har vi udviklet et stort bibliotek af nanobodies ud fra kamelblod. Biblioteket indeholder kamelblodets naturlige antistoffer og kaldes 'naivt', fordi kamelen ikke blev immuniseret, inden blodet blev aftappet. Vi har konstrueret biblioteket således, at de enkelte nanobodies bliver præsenteret på overfladen af bakteriofager, som er virus, der inficerer bakterier. Biblioteket består af millioner af fager, som hver især præsenterer et enkelt nanobody på overfladen, samtidig med at det kodende DNA for det pågældende antistof er indbygget i viruspartiklens genom. Denne teknik giver en enestående mulighed for hurtig isolering af et bindende nanobody til et givet antigen.

Diagnostik af parodontose

I et af vores projekter udvikler vi metoder til at detektere bakterier, der forårsager parodontose. Parodontose kaldes de løse tænders sygdom og rammer en stor del af den voksne befolkning. Forløbet starter typisk midt i 30'erne, og sygdommen skrider langsomt frem. Parodontose skyldes, at bakterier nedbryder de knogler, som tænderne er hæftet fast i, indtil tænderne med tiden begynder at løsne sig. Behandlingen består af hyppige tandlægebesøg, grundig mundhygiejne og antibiotikabehandlinger.

Parodontose kan også i sjældne tilfælde forekomme hos



KONVENTIONELLE ANTISTOFFER OG NANOBODIES

Almindelige antistoffer er større og mere komplekse end de små nanobodies, som udmærker sig ved at binde sig til deres antigen på en helt speciel måde.

A Konventionelle antistoffer er opbygget af to identiske lette kæder og to identiske tunge kæder. De lette kæder er hver især bundet til en tung kæde med svovlbroer, og de to tunge kæder er ligeledes bundet til hinanden med svovlbroer. Tilsammen ligner antistoffets struktur et Y. Den yderste del af de tunge og lette kæder kaldes tilsammen for Fab-delen og udgør bindingsstedet for et antigen. Dvs. at forskellen mellem to antistoffer ligger i strukturen af det bindende domæne, mens resten er næsten ens. Variatio-

nen i Fab-delen, som afgør, hvilket antigen antistoffet kan binde, ligger i tre områder, der kaldes CDRs (Complementary Determining Regions).

B Antistoffer i kamelen mangler den lette kæde, og deres bindende domæne kaldes et nanobody. Dette nanobody kan klones ind i et fag-bibliotek. Ud fra 10 ml blod fra en kamel i Københavns Zoologiske Have har vi lavet et stort 'naivt' nanobody fag-bibliotek med ca. 70 millioner kloner, som kan bruges til at isolere nanobodies mod forskellige proteiner i menneskekroppen eller fra bakterier.

C Nanobodies binder i dybe lommer på antigenen. Det skyldes deres specielle konvekse struktur, som bruges til bindingen.

børn, og her kan der være tale om en speciel form af sygdommen, hvor knogledbrydningen går ekstra hurtigt, hvilket kræver mange og omfattende behandlinger. Endelig har den nyeste forskning vist, at paradentose kan føre til andre lidelser i kroppen, især hjerte-kar-sygdomme, sukkersyge og leddegigt. Derfor er en hurtig og præcis detektion af paradentosebakterier vigtig for at kunne identificere sygdommen på et tidligt tidspunkt, så en korrekt behandling kan blive sat i værk. Desuden kan en sådan test bruges til at måle effekten af antibiotikabehandlinger.

Måling i spytpøver

I mundhulen findes der hundredevis af forskellige bakterier, men kun en lille gruppe forårsager paradentose. En af de værste hedder *Porphyromonas gingivalis*, og denne bakterie producerer som den eneste et proteaseenzym – RgpB – som nedbryder knoglevævet omkring tanden. Vi har derfor

valgt at benytte RgpB som en specifik biomarkør for denne patogene bakterie.

Vi brugte vores bibliotek til at isolere et nanobody, der binder sig til enzymet, og det udvalgte nanobody blev efterfølgende anvendt til at udvikle en test til specifik detektion af RgpB på overfladen af *P. gingivalis*. Testen kan foretages i spytpøver, hvilket gør det nemt at få biologisk materiale fra patienten til undersøgelsen. Vores metode kan potentielt overføres til en nem og hurtig test i stil med en graviditetstest. Det vil give tandlægen et nyttigt redskab, som kan bruges i klinikken, og som ikke er afhængig af stort og kompliceret laboratorieudstyr.

Udover dette projekt arbejder vi målrettet med at udnytte nanobody-teknologien til at udvikle lægemidler rettet mod receptorer i centralnervesystemet til behandling af psykiatriske lidelser, til at neutralisere enzymer, som er involveret i kræft, samt til at bekæmpe skadelige bakterielle enzymer.

Ph.d. Peter Durand Skottrup er postdoc på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Rasmus Prætorius Clausen er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Erik Riise er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi



Genetisk nanomedicin til behandling af leddegigt



Der er mange fordele ved at benytte genetisk medicin til sygdomsbehandling, men det er svært at smugle makromolekyler som DNA og RNA forbi kroppens forsvarsbarrierer. En ny mulighed er at pakke det genetiske materiale ind i nanopartikler, som beskytter lægemiddelstoffet mod nedbrydning og transporterer det hen til virkningsstedet. Forsøg med at behandle mus med leddegigt med genetisk nanomedicin viser positive resultater.

Af Camilla Foged, Linda Boye Jensen og Hanne Mørck Nielsen

Leddegigt er en smertefuld autoimmun sygdom, hvor en kronisk betændelsestilstand i kroppens led fører til ødelæggelse af brusk og knogler. På verdensplan får et ud af hundrede voksne mennesker leddegigt, som typisk bryder ud i alderen mellem 40 og 60 år. Omkring 35.000 danskere lider af sygdommen, og tre fjerdedele af de ramte er kvinder. Årsagen til leddegigt er ikke fastslået, men sygdommen kan skyldes forskellige genetiske faktorer, som får immunforsvaret til at angribe kroppens eget væv. Leddegigt behandles i dag ved at forsøge at kontrollere symptomerne så godt som muligt for at forebygge yderligere skader på leddene. Metoderne spænder fra smertestillende og antiinflammatoriske lægemidler til kirurgiske indgreb.

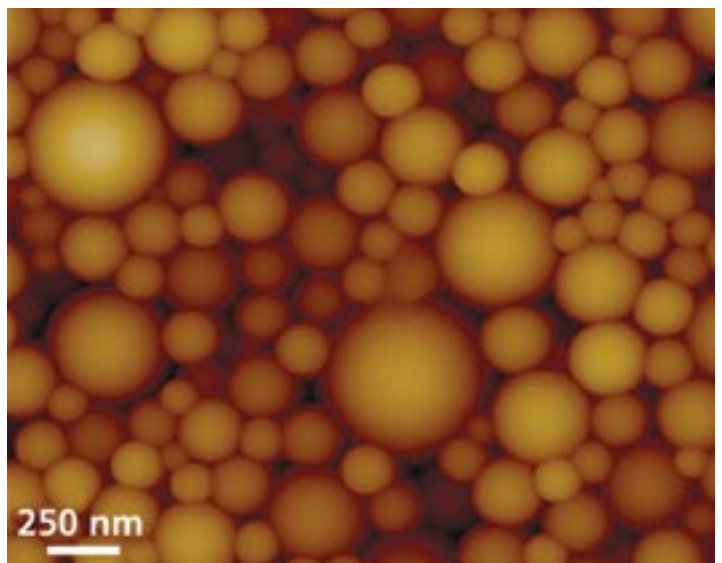
Genetisk nanomedicin åbner nye muligheder for at gribe direkte ind i sygdomsprocessen. Målet er at bruge skræddersyede gensekvenser til at nedregulere dannelsen af inflammatoriske proteiner i leddene. På den måde kan man reducere betændelsestilstanden, så smerterne lindres, og ødelæggelse af knoglerne standses. I praksis er det dog svært at transportere DNA eller RNA ind i de celler, hvor de genetiske instrukser skal aktiveres for at bremse sygdommens fremadskriden. En lovende løsning er at pakke den genetiske medicin ind i nanopartikler, som består af en uskadelig og bionedbrydelig polymer, der frigiver lægemiddelstoffet på virkningsstedet. For nylig har vi – i samarbejde med en hollandsk forskningsgruppe – testet sådanne nanopartikler på mus. Inden forsøgene fik musene induceret leddegigt via indsprøjtning af en antistof-cocktail rettet mod bindevævsproteinet kollagen, som findes i sener og led. Ved hjælp af en billeddan-

MRI-SCANNING: DETALJEREDE 3-D BILLEDER AF KROPPENS VÆV

Magnetisk resonans imaging (MRI) er en noninvasiv metode, der bruges til at fremstille billeder af alle typer væv i kroppens indre.

Ved undersøgelsen placeres patienten, eller i dette tilfælde forsøgsdyret, i en MRI-scanner, som frembringer et stærkt magnetfelt, der ensretter magnetiske atomkerner i kroppen. Derpå påsættes et radiofrekvensfelt, som systematisk ændrer ensretningen for udvalgte atomkerner. Herved sættes atomkernerne i svingninger, og det skaber et roterende magnetfelt omkring dem, som scanneren detekterer og bruger til at danne et billede. Styrken af det magnetiske felt har stærke gradienter, hvilket får atomkernerne til at rotere med forskellige hastigheder forskellige steder i kroppen. Dette udnyttes til at opbygge tredimensionelle billeder.

MRI har mange fordele. Teknikken giver en høj opløsning og en god kontrast mellem forskellige væv. Scanningen menes ikke at have skadelige effekter og kan anvendes uden brug af kontrastvæske. I modsætning til fx CT-scanning og PET-scanning udsættes patienten eller forsøgsdyret ikke for ioniserende stråling.



Disse nanopartikler indeholder genetisk gigtmedicin. Partiklerne er fremstillet af en uskadelig og bionedbrydelig polymer, som fremmer transporten ind i de celler i sener og led, hvor medicinen skal virke.

nende metode, magnetisk resonans imaging, undersøgte vi derpå de levende mus og påviste en gavnlig effekt på deres gigtramte led efter indsprøjtning af genetisk nanomedicin i leddene.

Forbi kroppens grænsekontrol

Genetisk medicin er baseret på DNA eller RNA. Når en kunstig gensekvens kommer ind i cellerne, indgår den i cellens normale maskineri, og alt efter strategien bliver gensekvensen brugt til at danne nye proteiner, som kan gøre cellen rask, eller til at hæmme dannelsen af de af cellens proteiner, som forårsager eller forværrer sygdommen. Medicinen består således af kroppens egne genetiske byggesten, som man ved hjælp af nanopartikler kan målrette til at gå efter bestemte celler i kroppen. På den måde bliver det muligt at udvikle meget specifikke lægemidler, der virker i meget lav koncentration og med færre bivirkninger end almindelige lægemidler.

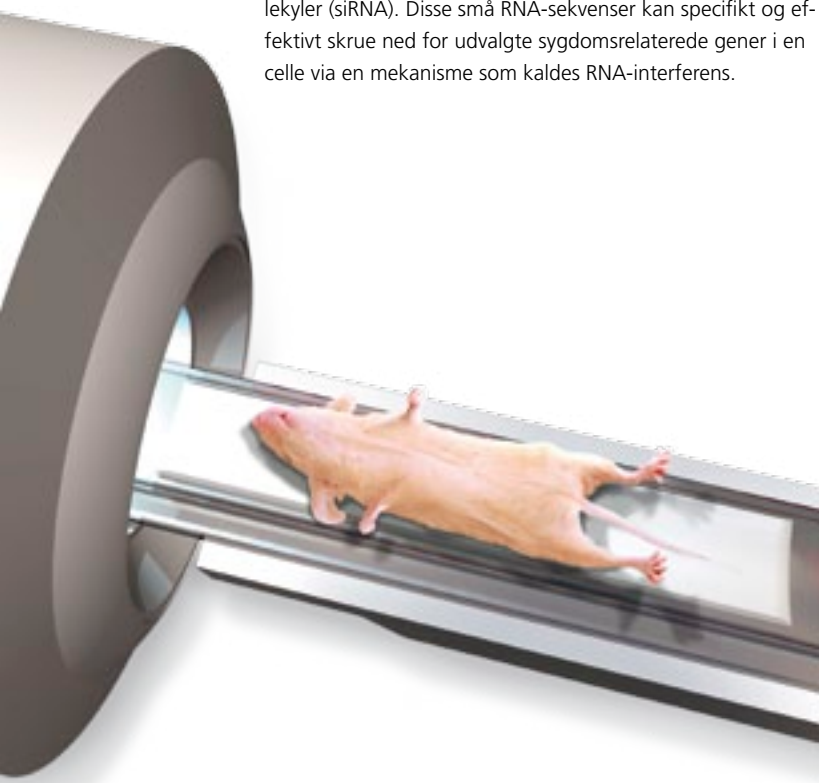
Udfordringen er imidlertid, at det genetiske materiale skal ind i cellerne for at virke. Det er vanskeligt, fordi DNA og RNA er store negativt ladede molekyler, som i fri form hurtigt bliver elimineret af kroppens forsvarsmekanismer. Desuden kan DNA og RNA ikke selv passere gennem cellemembraner på grund af molekylernes størrelse og ladning. Derfor bruger vi nanopartikler til at transportere en bestemt type genetisk materiale ind i cellerne, nemlig små interfererende RNA-molekyler (siRNA). Disse små RNA-sekvenser kan specifikt og effektivt skruer ned for udvalgte sygdomsrelaterede gener i en celle via en mekanisme som kaldes RNA-interferens.

Bionedbrydelige nanopartikler

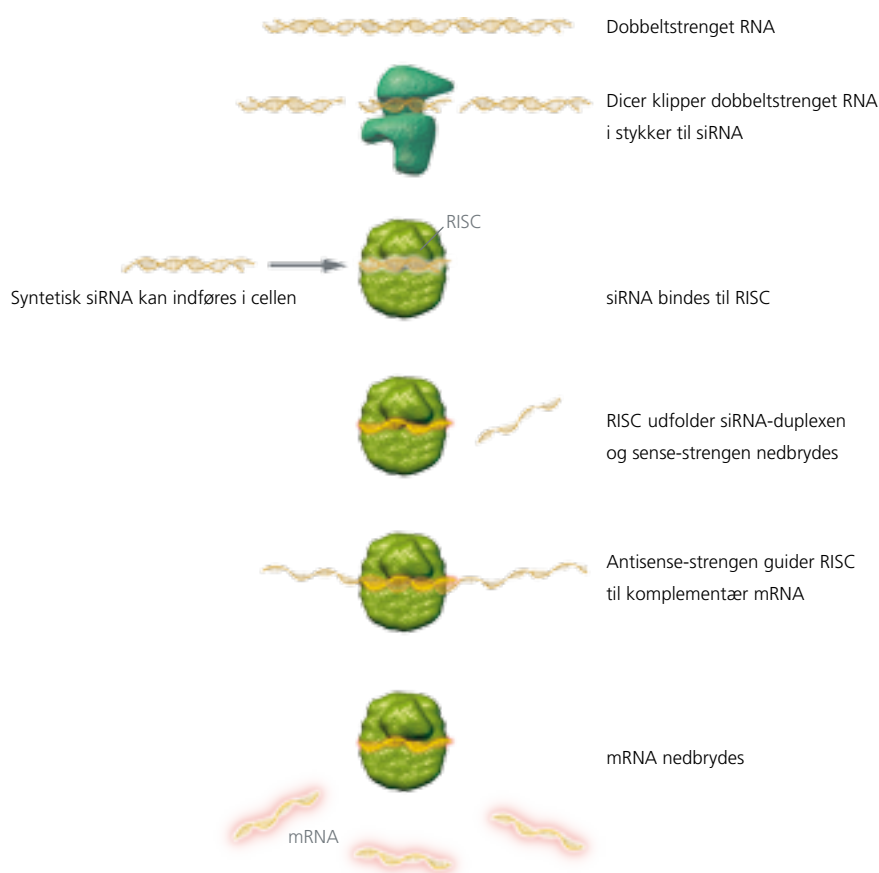
Nanopartiklerne er baseret på polymeren polylactic-co-glycolic acid (PLGA), som er bionedbrydelig og biokompatibel. I kroppen nedbrydes polymeren ved hydrolyse til naturligt forekommende stoffer, der nemt udskilles igen. Polymeren bruges i dag til implantater og til kontrolleret afgift af lægemiddelstoffer, og den er godkendt af den amerikanske lægemiddelstyrelse FDA.

Ved at indkapsle siRNA i nanopartikler kan man beskytte den genetiske medicin mod nedbrydning under transporten gennem kroppen. Desuden har vi modificeret nanopartiklerne med et positivt ladet fedtstof, som giver partiklerne en positiv ladning, så de både kan binde de negativt ladede siRNA molekyler og skabe kontakt til celleoverfladen, som også er negativt ladet. Denne egenskab fremmer optagelsen over cellemembranen og ind i cellerne. Endelig kan man ved at justere kompositionen af polymeren kontrollere afgiften af siRNA fra nanopartiklerne og dermed forlænge virkningen af lægemiddelstoffet inde i cellerne.

Studier med cellekulturer har vist, at nanopartiklerne er rigtig gode transportører af siRNA rettet mod det inflammatoriske protein tumor necrosis factor- α (TNF- α). Proteinet produceres af makrofager, når immunforsvaret aktiveres, og det styrer dannelsen af yderligere inflammatoriske signalstoffer i cellerne. Når produktionen af proteinet blokeres med siRNA, dæmpes den inflammatoriske proces. Vore forsøg med mus bekræfter dette og giver håb om, at det vil blive muligt at udvikle et nyt lægemiddel til gigtramte mennesker baseret på genetisk nanomedicin, som hæmmer dannelsen af proteinet.



En levende mus undersøges i MRI-skanneren (venstre). MRI-billedet viser et gigtramt knæled fra bagbenet på en mus. Ved skanning fremkommer vand som lyse områder. Hos mus med inflammation ses der en større væskeindtrængning i leddet i forhold til raske eller behandlede mus, hvilket tyder på en mere betændt tilstand. Ved et længerevarende sygdomsforløb vil knoglenedbrydning også være synlig på billedet som en utydelig afgrænsning af knoglen.



SMÅ RNA-MOLEKYLER SKRUER NED FOR SYGDOMSGENER

Menneskers og dyrs genomer er opbygget af DNA. Den menneskelige arvemaske rummer mellem 20.000 og 25.000 gener, som hver især indeholder opskriften på et af de proteiner, som dannes i kroppen.

Når et gen aktiveres, fremstilles en enkeltstrengt kopi af genet, som kaldes messenger-RNA (mRNA), og som transporterer opskriften på et specifikt protein ud fra cellekernen og hen til cellens proteinfabrikker, ribosomerne, som befinder sig i cytoplasmaet. Ribosomet aflæser opskriften og producerer proteinet.

Kroppens værn mod virus

RNA-interferens er et naturligt forsvarssystem mod fremmed genetisk materiale, fx virus, som formerer sig ved at udnytte cellens genetiske produktionsapparat til at danne sine egne virale proteiner. Det sker ved, at virus får sine gener aflæst i proteinfabrikkerne. Forsvarssystemet slår til, når det opdager dobbeltstrengt RNA i cellevæsken. Dobbeltstrengt RNA kan nemlig være et tegn på, at en virus er ved at inficere cellen.

Et enzym ved navn dicer nedbryder nu det dobbeltstrengede RNA til små dobbeltstrengede siRNA-molekyler, som indbygges i et

proteinkompleks kaldet RNA-induced silencing complex (RISC). Komplekset katalyserer derpå en opsnoning til enkeltstrengt RNA, som efterfølgende guider proteinkomplekset hen til mRNA med en komplementær sekvens – dvs. det virale mRNA, som RISC-komplekset så nedbryder, og derved slukkes der for dannelsen af virale proteiner.

siRNA blokerer dannelsen af inflammatoriske proteiner

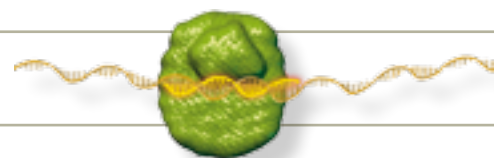
Mekanismen kan udnyttes terapeutisk ved at tilføre cellerne kunstigt fremstillet siRNA, som kan hæmme dannelsen af hvilket som helst protein i kroppen – fx et eller flere af de inflammatoriske proteiner, som er involveret i sygdomsprocessen ved leddegigt. Her guider de kunstige siRNA-molekyler RISC-komplekset hen til mRNA, som koder for de inflammatoriske proteiner, hvorefter komplekset nedbryder mRNA, og derved slukkes for udtrykkelse af genet.

I det seneste årti har der været en stor interesse for udvikling af lægemidler baseret på kunstigt fremstillet siRNA, og i 2006 fik Andrew Z. Fire og Craig C. Mello Nobelprisen i Medicin for opdagelsen af mekanismen bag RNA interferens.

Ph.d. Camilla Foged er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.

Ph.d. Linda Boye Jensen er R&D Scientist på LEO Pharma A/S.

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





Masse- spektrometri

viser fordelingen
af lægemiddelstoffer
i planter og væv

Planters blade er beskyttet af et vokslag, hvilket gør det umuligt at fordampe og ionisere biomolekylerne i overfladen. Derfor tager man et aftryk af bladet på en porøs overflade, som trækker plantestofferne ud af bladet. På fotoet ses et aftryk samt dysen på DESI-MS-udstyret.

En ny form for massespektrometri gør det muligt at optage billeder, som viser fordelingen af kemiske forbindelser i vævsprøver og plantemateriale. Teknikken måler stofferne direkte fra en overflade, så man præcist ved, hvor på overfladen molekylerne befandt sig, da de blev detekteret. Det kan udnyttes til at vise, hvor farmaceutisk aktive stoffer befinder sig i planter, eller til at måle, hvordan et lægemiddelstof fordeler sig i hjernen og kroppen på en rotte.

Af Christian Janfelt, Janina Thunig, Bin Li, Harald S. Hansen, Niels Wellner og Steen Honoré Hansen

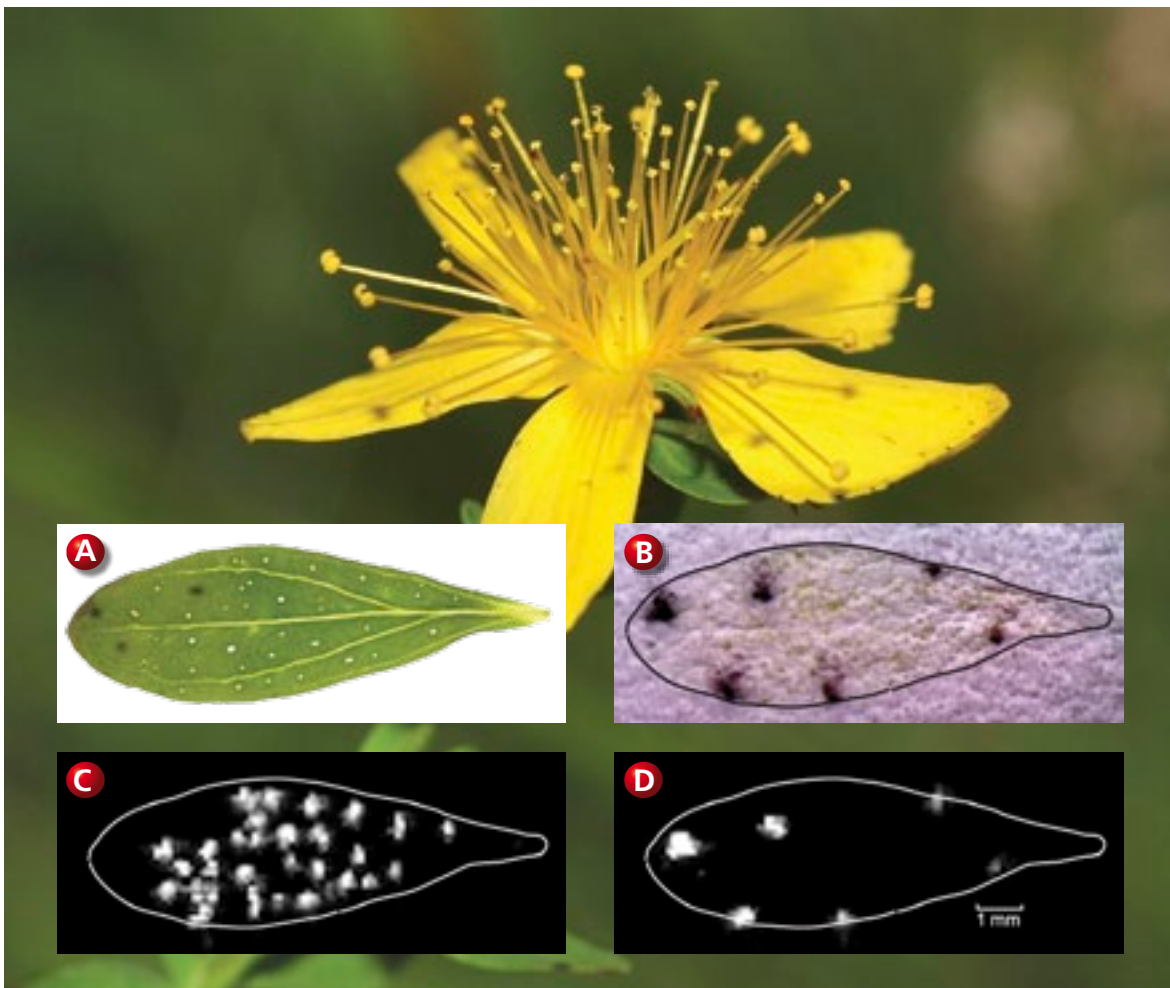
De fleste kemiske analyser af biologiske prøver foretages i dag med massespektrometri, hvor detektion og identifikation af indholdsstofferne er baseret på molekylernes masse. Før målingen ioniseres molekylerne, og derpå vejes de i massespektrometret ved at måle, hvor kraftigt deres bevægelse påvirkes af et elektrisk felt: Ioner med lave masser afbøjes mere end tunge ioner. Resultatet er et massespektrum med en række toppe, hvor hver top repræsenterer et individuelt molekyle med en bestemt masse, og hvor toppens højde viser mængden af det pågældende molekyle

i prøven. Den store fordel ved massespektrometri sammenlignet med andre teknikker er, at målemetoden både er meget følsom og meget selektiv. Derfor benytter man fx massespektrometri til at finde pesticidrester i drikkevand, hvor koncentrationerne ofte er små, og hvor stofferne skal identificeres med stor sikkerhed.

Massespektrometri er også velegnet til at analysere biologiske prøver som blade, vævsprøver eller blodprøver. Her ekstraheres indholdsstofferne normalt over i en væske som metanol, hvorefter ekstraktet analyseres med en metode, som hedder Electrospray ioniserings-massespektrometri (ESI-MS). Inden målingen omdannes væsken til en spray af bittesmå dråber, som fordamper og frigiver molekylerne i prøven som ioner, uden at de går i stykker.

DESI-massespektrometri

For nogle år siden blev metoden videreudviklet til Desorption Electrospray ioniserings-massespektrometri (DESI-MS). Det nye er, at prøven ikke længere behøver at befinde sig på væskeform. I stedet bruger man en elektrisk ladet spray, som rettes mod prøvens overflade og som ioniserer molekylerne på overfladen, hvorefter de analyseres i massespektrometret. Metoden har den åbenlyse fordel, at man kan springe eks-



Billederne viser fordelingen af to naturligt forekommende antidepressive stoffer i et blad fra perikon. **A** er et mikroskopibillede af bladet, mens **B** er et billede af et aftryk. **C** og **D** er optaget med DESI-imaging. **C** viser, at stoffet hyperforin fordeler sig i de gennemsigtige kirtler i bladet, mens **D** viser, at hypericin fordeler sig i nogle olieagtige kirtler i kanten af bladene.

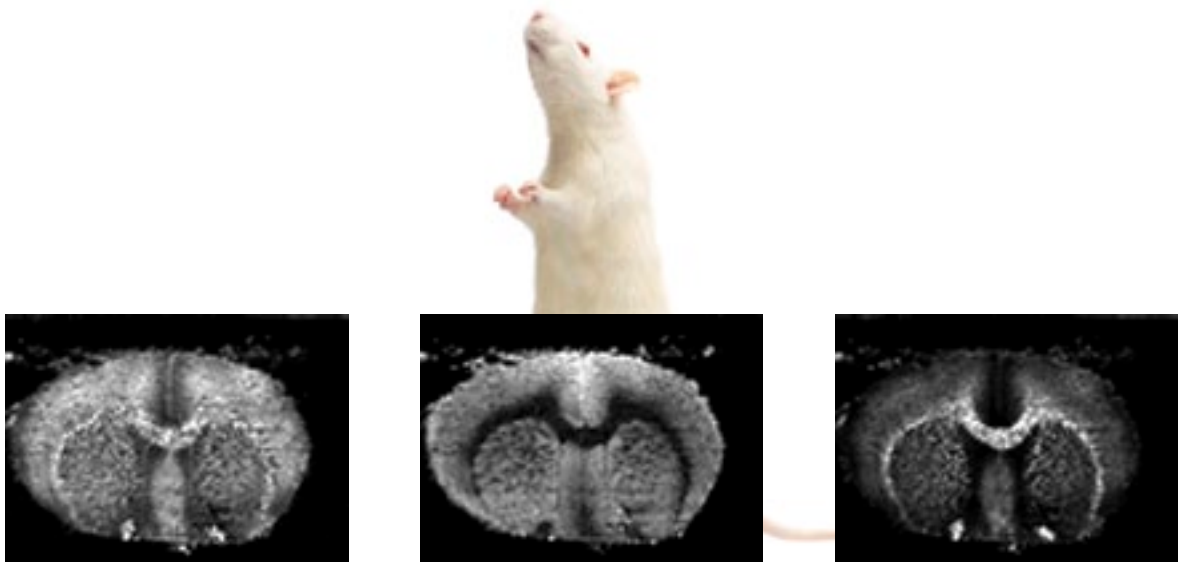
traktionen over og måle stoffer direkte fra et blad eller en vævsprøve, hvilket giver en analysetid på ned til få sekunder. Samtidig bliver stofferne målt på det sted, hvor de befinder sig, i modsætning til ved en ekstraktion, hvor molekyler fra hele prøven blandes i samme ekstrakt, så man derved mister information om præcis, hvor i prøven molekylerne oprindeligt var placeret. Ved at bevæge prøven, mens massespektrometret optager spektre, kan man holde øje med præcis, hvor og hvornår stoffet af interesse viser sig i spektrene.

Scanning og billeddannelse

Ved mere systematiske undersøgelser styrer en computer prøveholderen, så hele overfladen bliver scannet, række for række og punkt for punkt, imens massespektrene bliver optaget. Når det er gjort i løbet af et par timer, har man tusinder af massespektre, et fra hvert punkt på overfladen. Hvis man nu vil kende fordelingen af et bestemt stof, fx et lægemiddel i en vævsprøve, får man computeren til at løbe alle massespektrene igennem og hente intensiteten for massen af lægemidlet ud for samtlige punkter i prøven. Disse intensiteter kan nu afbildes i et diagram, som viser, hvor i prøven de blev målt, og jo større intensiteten er i et givet punkt,

jo stærkere farves det pågældende punkt. Resultatet er et billede af lægemidlet i prøven.

Teknikken er stadigvæk relativt ny, og mange af de første anvendelser har især handlet om undersøgelser af forsøgsdyr, hvor man måler på tynde skiver af vævsprøver monteret på en glasplade. Man kan undersøge vævssnit fra en aflivet rotte og se, om lægemiddelstoffet er nået derhen, hvor det skal virke. Eller man kan kigge på endogene stoffer, som roten selv producerer. Det er fx en kendt sag, at lipiderne, dvs. fedtstofferne, i kroppen er anderledes i en kræftsvulst end i sundt væv. Man kan derfor bruge DESI-imaging både til at lokalisere en svulst meget nøjagtigt og til at undersøge molekulære forandringer i vævet, når det rammes af en sygdom. På Institut for Farmaci og Analytisk Kemi har vi konstrueret en DESI-imaging-ionkilde, som er i stand til at tage billeder af prøver med en opløsning ned til 100 µm. Opløsningen er ikke nede i cellulært niveau – der er altså ikke tale om mikroskopi – men vi er i stand til at visualisere fordelingen af stoffer, som ikke lader sig skelne med almindelige optiske metoder. Noget af det første, vi kastede os over, var at undersøge planter, som indeholder aktive stoffer med anvendelse som lægemidler.



DESI-MS-billeder af et vævssnit, som viser fordelingen af tre forskellige lipider i hjernevævet på en rotte.

Første undersøgelser af lægeplanter

Imens andre forskningsgrupper har lavet mange undersøgelser af vævsprøver fra dyr, var der endnu ikke nogen, som havde brugt metoden til undersøgelser af plantemateriale. Det skulle vise sig, at det heller ikke var så ligetil, fordi blade og blomster har et vokslag, kutikula, som ikke blot beskytter dem imod udtørring, men også imod DESI-imaging, eftersom sprayen har svært ved at trænge gennem voksen. Løsningen blev at lave et aftryk af plantevævet på en porøs teflonoverflade. Fordelen er, at alle stoffer af interesse trækkes ud af plantevævet, samtidig med den rumlige fordeling af stofferne bevares.

Vi brugte denne fremgangsmåde til at analysere blade og kronblade fra prikbladet perikon, *Hypericum perforatum*. Ekstrakter af denne plante sælges som naturlægemiddel på apotekerne til behandling af mild depression på grund af plantens indhold af stofferne hyperforin og hypericin. Forsøg med DESI-imaging af plantens blade viste, at hyperforin befinder sig i gennemsigtige kirtler i bladene, mens hypericin befinder sig i nogle sorte, olieagtige kirtler i kanten af bladene. Dette har tidligere været påvist ved at klippe bladene i meget små stykker og analysere delene hver for sig, men ved hjælp af DESI-imaging var det altså muligt at give et samlet billede af fordelingen af stoffer på et blad.

Analysen af kronbladene viste, at hypericin var lokaliseret i sorte kirtler i kanten af bladene. Da kronbladene, i modsætning til de almindelige blade, ikke har nogen gennemsigtige kirtler, var det ikke åbenlyst, hvordan hyperforin ville fordele sig her, men også her så vi for nogle af kronbladene, at stoffet fordelte sig i lignende prikker. Da prikkerne på kronbladene ikke er synlige, er denne fordeling altså ikke noget man

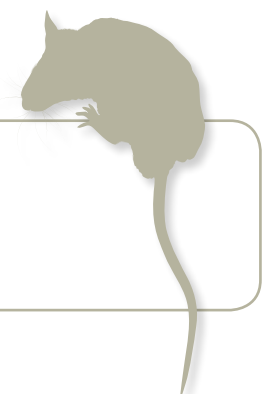
umiddelbart ville kunne fastslå uden brug af imaging masse-spektrometri.

Vi lavede lignende analyser af blade fra pigæble, som er kendt for sit indhold af atropin, som almindeligvis er giftigt, men som i kontrollerede doser anvendes som hjertemedicin og som modgift mod krigsgasser. Billederne viste, at mens kulhydrater såsom sukrose var relativt homogent fordelt i bladet, var atropin især lokaliseret i ledningsstrengene i bladet, hvilket tyder på, at stoffet transporteres rundt i netop ledningsstrengene. Ved at lave imaging massespektrometri på planter kan man altså blive klogere på, hvor i planter farmaceutisk interessante stoffer dannes, hvorledes de transporteres rundt i planten, og hvilken funktion de har i planterne. Det er fx muligt at sammenholde den kemiske fordeling af plantestoffer med, hvor og hvordan insekter angriber den pågældende plante og på den måde bliver klogere på planternes forsvarsmekanismer.

Vævsprøver viser lægemidler i hjernen

Senest har vi benyttet DESI-imaging til analyser af vævsprøver fra mus og rotter for at undersøge, hvilke molekyllære ændringer, der sker i hjernevævet som følge af en hjerne-skade, hvor ilttilførslen til hjernen rammes. Vi har desuden lavet billeder, som viser fordelingen af et antidepressivt stof i nyren og hjernen fra en mus, som kort tid forinden havde fået stoffet injiceret i bughulen. Foruden selve stoffet påviste undersøgelsen også metabolitter af det, hvilket gør det muligt at følge omsætning af lægemiddelstoffer i organismen. Det er ingen tvivl om, at imaging med massespektrometri giver en lang række nye muligheder inden for det farmaceutiske område.

*Ph.d. Christian Janfelt er adjunkt på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Kandidat i miljøvidenskab Janina Thunig er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Cand.pharm. Bin Li er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Cand.scient.pharm. Niels Wellner er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.scient. Harald S. Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi*



Gendannelse af ødelagt væv med stamceller

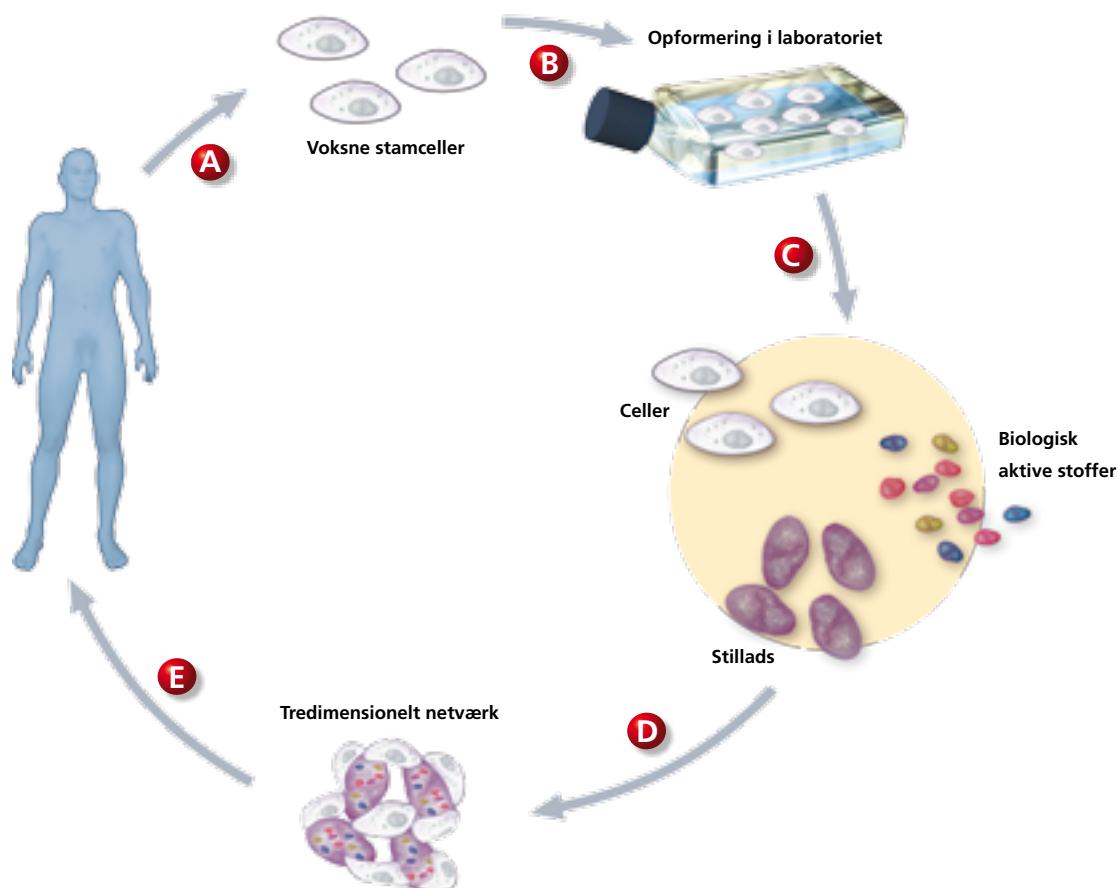
Stamcelleterapi åbner store perspektiver: Ødelagt væv som muskler, brusk, sener og knogler kan gendannes med patientens egne stamceller fra tilsvarende væv andetsteds i kroppen. Efter implantation gror cellerne på et biokompatibelt stillads af mikropartikler, som frigiver vækststimulerende stoffer, der får cellerne til at trives og forblive på det sted, hvor det nye væv skal dannes.

Af Eva Horn Møller, Yanhong Wen og Hanne Mørck Nielsen

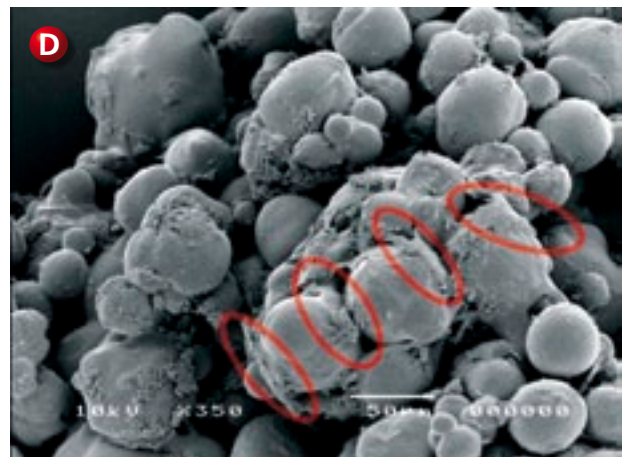
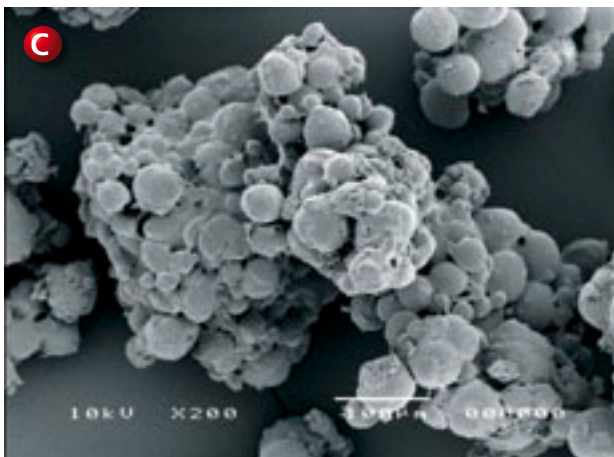
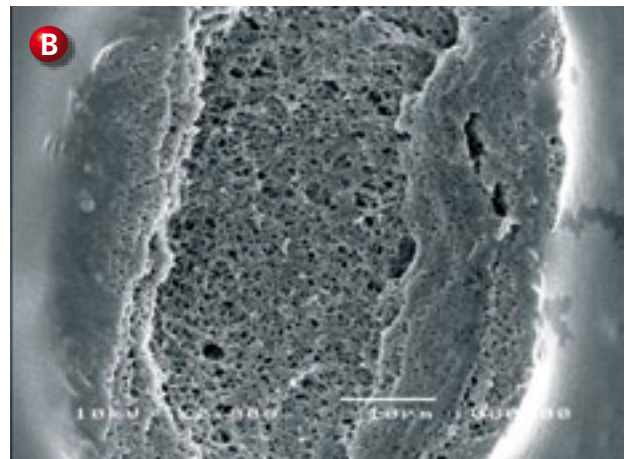
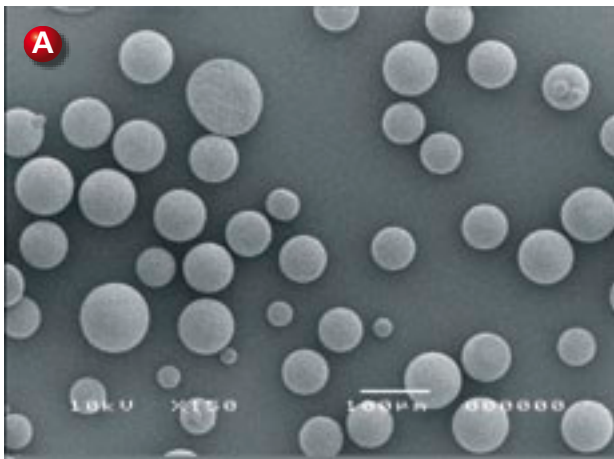
Både i Danmark og udlandet har stamcelleforskning været omgivet af en hidsig debat. Debatten har især fokuseret på

de etiske aspekter ved at anvende stamceller fra fostre, men der bliver også forsket i behandlingsformer, hvor man benytter patientens egne stamceller. Her kan man fx bruge stamceller fra brusk til at genopbygge brusken i et ødelagt knæ, som er beskadiget som følge af sport eller slidgigt, eller man kan anvende stamceller fra muskelvæv til at gendanne en skadet muskel andetsteds i kroppen.

Fosterstamceller og voksne stamceller har forskellige egenskaber. Fostre danner pluripotente stamceller, som har potentialet til at udvikle sig til en hvilken som helst celletype i kroppen. Voksne mennesker danner også stamceller i mange væv, men det er en anden type stamceller, som allerede er



Anvendelse af voksne stamceller kan foregå ved at **A** væv udtages ved en biopsi og stamceller isoleres, hvorefter **B** stamcellerne opformerer i laboratoriet. **C** Biologisk aktive faktorer kombineres med stilladset og stamceller, hvorved **D** et tredimensionelt netværk dannes, **E** og dette kan implanteres i patienten.



A Billede af mikropartikler optaget med et scanning-elektron-mikroskop. **B** Her ses et tværsnit af en mikropartikel. Den indre porøse struktur tillader diffusion af næringsstoffer. **C** Mikropartikler og celler klumper sig sammen til et større tredimensionelt netværk, hvorpå cellerne kan gro og danne nyt væv. **D** Nærbillede af stilladset. De røde cirkler markerer steder, hvor celler vokser og deler sig mellem mikropartiklerne. Med tiden danner cellerne nyt væv, mens mikropartiklerne nedbrydes og forsvinder.

delvist udviklede, hvilket betyder, at deres endelige celle-type er bestemt. Voksne stamceller kan således danne nye og færdigudviklede celler, men kun af deres egen slags; fx kan muskelstamceller kun blive til muskelceller, men ikke til bruskceller, blodceller eller nerveceller. Voksne stamceller er en fællesbetegnelse for alle typer stamceller, der findes i børn og voksne – eksempelvis i knoglemarven, i blodet og i muskler – og disse stamceller kan fungere som reservedels-celler for kroppen.

Sammenlignet med pluripotente fosterstamceller er voksne stamcellers udviklingspotentiale begrænset, men til gengæld er der en langt mindre risiko for, at de deler sig ukontrolleret og skaber uhensigtsmæssig cellevækst eller kræft. På sigt vil man kunne udtage sundt væv fra patienten, opformere stamcellerne fra vævet og genimplantere dem i det defekte væv, som herved kan gendannes. Denne form for stamcelle-terapi rummer et meget stort potentiale, men også store udfordringer for forskere fra forskellige fagdiscipliner.

Mikropartikler fungerer som stillads

Mange celler vokser bedst på en overflade, og efter en implanteret gror og udvikler stamcellerne sig bedst, når man lader dem vokse på et stillads af fx mikropartikler, som er lokaliseret på behandlingsstedet. Optimalt kan mikropartiklerne indeholde vækststimulerende faktorer eller andre biologisk aktive stoffer, som kan sørge for, at cellerne trives og forbliver dér, hvor de er implanteret. Design og formuleringen af mikropartiklerne er vigtig for at kontrollere afgiften og dermed for virkningen af de vækststimulerende faktorer. Det Farmaceutiske Fakultet på KU er med til at udvikle egnede mikropartikler i et forskningssamarbejde med Herlev Hospital, Glostrup Hospital, Aarhus Universitetshospital og Coloplast A/S med støtte fra Højteknologifonden. Formålet med forskningen er at forbedre mulighederne for stamcelle-terapi ved hjælp af farmaceutisk designede stilladser. Tidlige forsøg har vist, at kugleformede mikropartikler er gode til at understøtte stamcellerne, så de modnes og formerer sig.

Kuglerne fungerer som et stabilt, men porøst underlag, der tillader diffusion af næringsstoffer, og samtidig kan de langsomt over måneder frigive biologiske faktorer, som hjælper cellerne med at gro fast og trives.

Mikropartiklerne fremstilles af en langsomt nedbrydelig polymer, som bl.a. består af mælkesyre. Regenerationen af væv er langsom proces – fra en måned og op til et år – og derfor er det vigtigt, at det vækstaktiverende stillads nedbrydes langsomt. Under vævgendannelsen skal mikropartiklerne dog gradvist blive nedbrudt og forsvinde, så terapien til sidst kun efterlader det regenererede og fuldt funktionsdygtige væv.

Kontrolleret afgift af vækstfaktorer

For at optimere de nyimplanterede stamcellers overlevelse og vækst er der arbejdet med at tilsætte biologisk aktive molekyler til mikropartiklerne. Det kan fx være vækstfaktorer eller andre faktorer, der hjælper med at danne et biologisk polymernetværk, som fastholder stamcellerne efter injektion, så de ikke flytter sig fra injektionsstedet og bevæger sig rundt i kroppen.

Mikropartiklerne er porøse, hvilket er vigtigt for flowet af næringsstoffer igennem dem og dermed for væksten af cellerne, men porøsiteten udgør en stor udfordring med hensyn til at indlejre biologisk aktive stoffer, som skal frigives over måneder. Det er dette dilemma, som skal løses via et avanceret design af partiklerne. En lovende metode er at formulere nanopartikler med kontrolleret afgift af fx vækstfaktorer og indbygge disse nanopartikler i komposit-mikropartikler.

Komposit med indbyggede nanopartikler

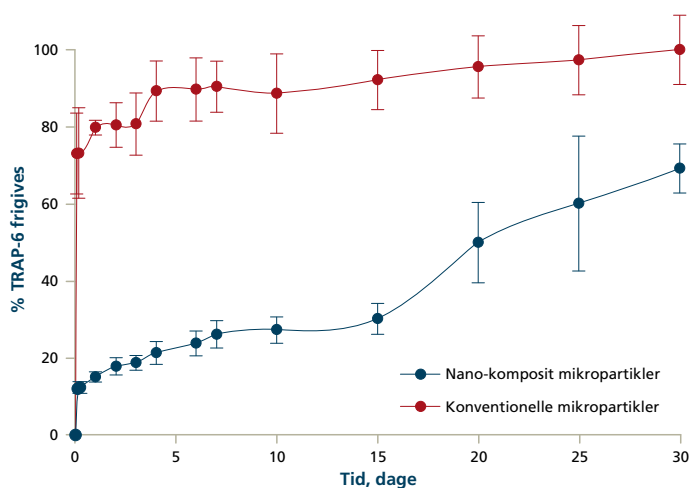
Undervejs i forskningsarbejdet er der således udviklet komposit-mikropartikler med indlejrede nanopartikler, hvorfra biologiske faktorer frigives langsomt og kontrolleret. Vore samarbejdspartnere har derpå udført laboratorieforsøg med vævgendannelse, som viser, at komposit-mikropartiklerne har en god udløsningsprofil. Komposit-mikropartiklerne vil nu blive yderligere undersøgt med forskellige typer biologiske faktorer, som kan fremme gendannelsen af ødelagt væv ved stamcelleterapi.

Der er stadig lang vej, før man kan lave de første kliniske forsøg med mennesker med stilladser af komposit-mikropartikler med kontrolleret frigivelse af indlejrede vækstfaktorer. Men allerede nu viser resultater i laboratorier verden rundt, at stamcelleterapi med voksne stamceller har potentialet til at blive enkel og bivirkningsfri vej til behandlinger, som kan kurere eller lette tilværelsen for mange patienter. Formuleringsoptimerede partikler vil gøre potentialet for anvendelse endnu større.

FREMSTILLING AF KOMPOSIT-MIKROPARTIKLER

Nanopartikler med de ønskede karakteristika kan fremstilles ved fx dobbeltemulsions-metoden gennem hvilken det aktive stof indlejres i partiklerne. Ved denne teknik inkorporeres det hydrofile, biologisk aktive stof i en vandig fase, som emulgeres i en oliefase. Derpå overføres blandingen til endnu en vandfase, der indeholder et grænsefladeaktivt stof, som fuldender dannelsen af nanopartiklerne. Efter frysetørring er nanopartiklerne klar til indlejring i komposit-mikropartiklerne.

Nanopartiklerne opløses nu i en opløsning, som indeholder den polymer, der skal anvendes til stilladset, og komposit-mikropartiklerne dannes ved at spraye opløsningen til et andet flydende medium og dernæst tørre partiklerne. Karakteristika af både nanopartiklerne og stilladspartiklerne er afhængig af metode og proces, som varieres afhængigt af, hvilke biologisk aktive stoffer, som skal indlejres i nanopartiklerne.



Biologisk aktive stoffer som vækstfaktorer fremmer dannelsen af nyt væv. Frigivelse skal helst ske gennem hele vækstperioden, som kan vare flere måneder. En meget langsom og kontrolleret frigivelse af biologisk aktive stoffer kan opnås ved en ny formulering, som kaldes komposit-mikropartikler. Her frigives stofferne fra nanopartikler, som er indbygget i mikropartiklerne. TRAP-6 er et eksempel på et peptid, der kan indbygges i nano-komposit mikropartiklerne.

NUTIDENS STAMCELLETERAPI – OG FREMTIDENS

Stamcelleterapi med voksne stamceller bruges i dag eksperimentelt til at behandle alvorlige sygdomme som leukæmi og hjertelidelser og desuden til vævgendannelse af fx hornhinder.

Potentialet for fremtidig anvendelse af stamcelleterapi illustreres ved rapporter om genetablering af lungeret i cancerpatienter og behandling af lammelser i centralnervesystemet.

Ph.d. Eva Horn Møller er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Yanhong Wen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Hanne Mørck Nielsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

Personlig medicinering af type-2 diabetes ud fra patientens genetiske profil



Når mennesker med samme sygdom reagerer forskelligt på den samme medicin, kan det skyldes genetiske variationer, som påvirker lægemidlers omsætning, transport og målmolekyler i kroppen. Scanning af patientens genom med DNA-chips, som tester for udvalgte punktmutationer, kan gøre det muligt at identificere og klassificere patienter, som vil have gavn af en bestemt behandling. Det kan nedbringe antallet af fejlbehandlinger til gavn for både patienterne og samfundskøkonomien.

Af Malene Hornbak og Åsa Andersson

Når en person bliver syg, får stillet en diagnose hos lægen og går hjem med et bestemt lægemiddel, sætter han eller hun sin lid til, at diagnosen er korrekt, og at lægemidlet er det rigtige og virker efter hensigten. Men det er ikke altid tilfældet. I USA dør over 100.000 patienter om året som følge af

medicinske bivirkninger, og over to millioner patienter oplever alvorlige bivirkninger, hvilket medfører store personlige og samfundsmæssige omkostninger.

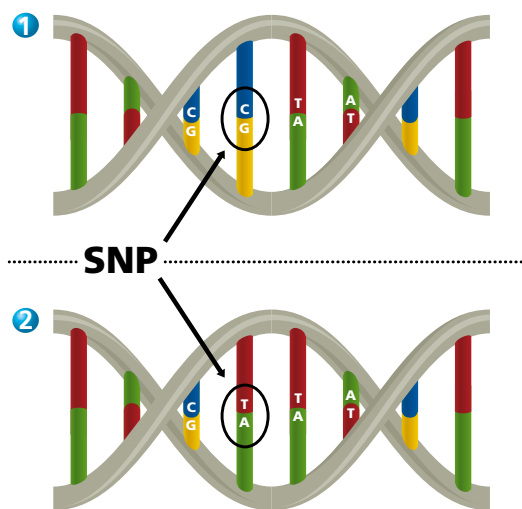
Bivirkninger kan blandt andet skyldes variationer i vores arvemateriale, som påvirker effekten af lægemidler. Tidligere har man især forsket i farmakogenetik, som fokuserer på enkelte geners indflydelse, men et nyere forskningsområde, farmakogenomik, sætter fokus på, hvordan samspillet mellem mange gener samt individuelle genetiske variationer i befolkningen kan have betydning for, hvordan et bestemt individ vil reagere på et givent lægemiddel. Farmakogenetik og farmakogenomik er redskaber til at udvikle skræddersyet medicin, som både behandler sygdommen og tager hensyn til hver enkelt patients genetiske profil. Målet er at øge effekten af lægemidlet, minimere bivirkningerne og ikke mindst at skelne mellem patienter, som responderer godt, og patienter, der responderer mindre godt på en given behandling.

DET HUMANE GENOM OG DEN GENETISKE MANGFOLDIGHED

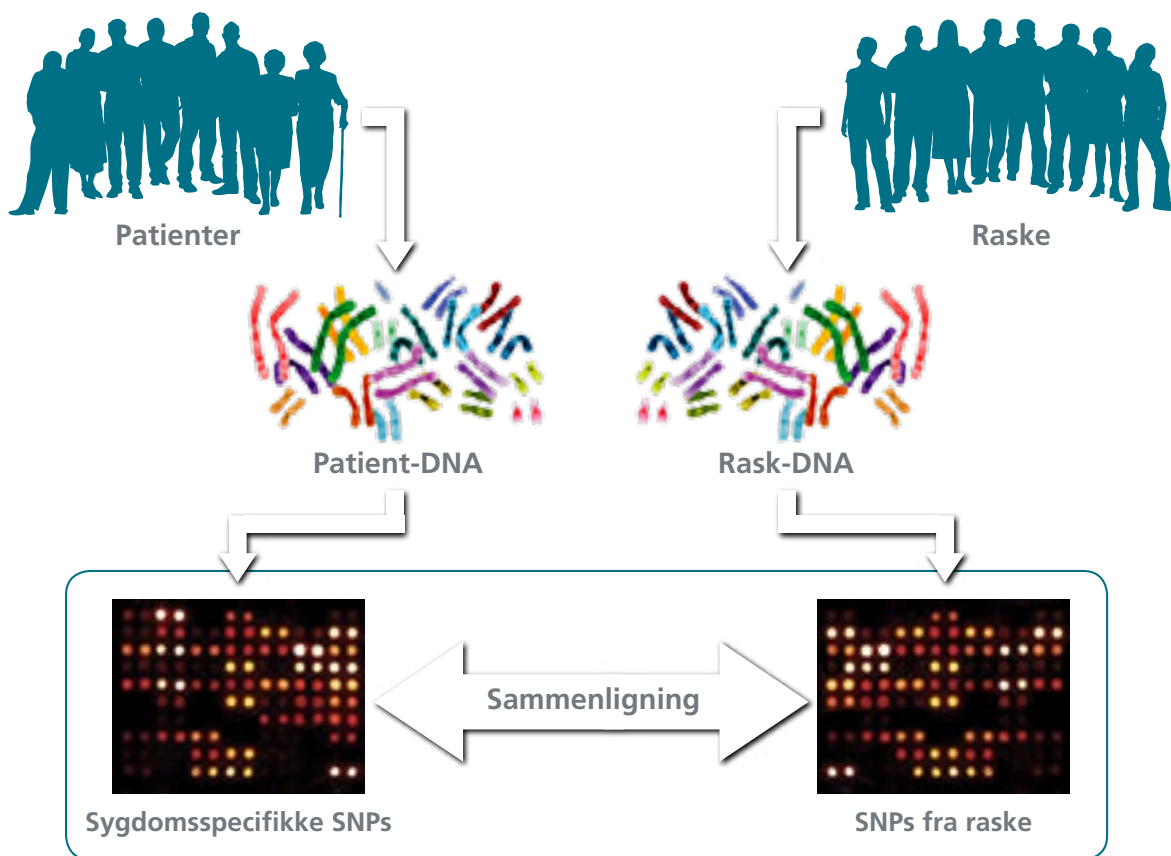
Det humane genom er opbygget af 3,2 milliarder basepar, som danner DNA-sekvensen. En lille del af genomet indeholder menneskets 20.000-25.000 gener, som koder for proteiner. Hovedparten af genomet er ikke-kodende, men har regulerende funktioner.

Blandt to tilfældige individer er 99,9 procent af genomet fuldstændig ens, mens de resterende godt tre millioner basepar danner grundlag for den genetiske variation og mangfoldighed i befolkningen.

Ni ud af ti genetiske variationer er Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). En SNP er en ændring i et enkelt basepar, der forekommer hos mere end et ud af 100 mennesker. SNPs findes i genomet med mellemrum på omkring 300-1000 basepar, og de kan opstå i både kodende og ikke-kodende sekvenser. Deres placering har derfor afgørende betydning for, hvordan mutationen kommer til udtryk.



En Single Nucleotide Polymorphism (SNP) er en ændring af et enkelt basepar, som er hyppigt forekommende i befolkningen. Nogle SNPs har betydning for, hvordan vi reagerer på medicin.



Hel-genoms-associationsstudier scanner genomet og sammenligner SNPs mellem en gruppe af syge og en gruppe af raske individer. På den måde kan man identificere SNPs, som er associeret med et sygdomstræk.

Medicinering af type-2 diabetes

Udfordringen med at finde den helt rigtige medicin til hver enkelt patient er især vanskelig ved behandling af multifaktorelle sygdomme, som udspringer af et kompliceret samspil mellem gener og miljø. Et godt eksempel er type-2 diabetes, som er karakteriseret ved forhøjet glukose i blodet, hvilket skyldes varierende grader af nedsat produktion af insulin i bugspytkirtlen samt nedsat følsomhed overfor insulin i muskler, lever og fedtvæv. De typiske symptomer er stærk tørst, hyppig vandladning, kvalme og træthed, og desuden opstår der ofte følgesygdomme som hjerte-kar-sygdomme, nervesygdomme, nyrekomplikationer, fodsår og øjenkomplikationer.

Til dato har scanninger af forskellige menneskers genomer identificeret over 40 genetiske varianter, som forbindes med type-2 diabetes, mens de vigtigste miljømæssige risici er alder, fysisk inaktivitet og fedme. Sygdommen er blevet en af de mest almindelige sygdomme på verdensplan med en global prævalens på 6,6 procent, som anslås at stige til 7,8 procent i år 2030. Livsstilsændringer såsom sundere kost og mere motion er den grundlæggende behandling, men der-

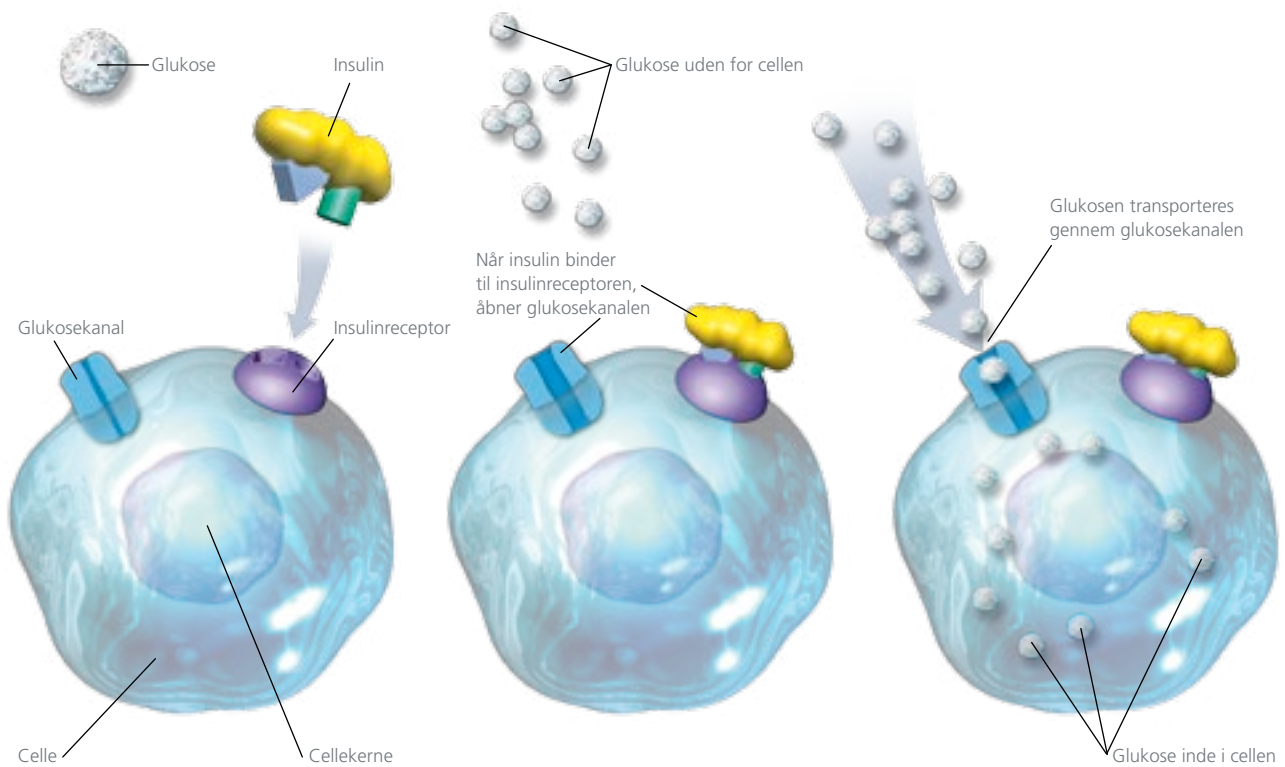
udover anvendes adskillige typer af antidiabetisk medicin, som kan nedsætte glukoseindholdet i blodet og dermed reducere risikoen for komplikationer. Tabletter kan indeles i insulinstimulerende lægemidler, som øger udskillelsen af insulin fra bugspytkirtlen, og insulinsensibiliserende, som øger følsomheden over for insulin i kroppens væv. I begge tilfælde er behandlingens primære mål at nedbringe mængden af blodsukker, hvilket har en beskyttende effekt imod følgesygdommene.

De fleste patienter med type-2 diabetes indtager derudover blodtryksmedicin og kolesterolsænkende medicin, og den daglige brug af flere lægemidler gør dem ekstra udsatte for at opleve bivirkninger eller manglende effekt af deres medicin, hvilket medfører, at op mod 40 procent af patienterne på oral antidiabetisk behandling ikke opnår den ønskede kontrol af blodsukkeret. Derfor er identificering af genetiske varianter, som kan forbindes med bestemte lægemiddelvirninger, et vigtigt element i forskningen i de cellulære mekanismer, der ligger til grund for både sygdommen og den farmakologiske respons.

INSULINS BETYDNING FOR BLODSUKKERET

Når blodsukkeret stiger, fx efter et måltid, stimuleres β -cellerne i bugspytkirtlen til at producere og udskille insulin, og når insulin binder til insulinreceptorer på kroppens celler, tillades transport af glukose fra blodet ind i cellerne. Patienter med type-2 diabetes har enten en nedsat evne til at producere

og udskille insulin og/eller deres perifere væv har en nedsat følsomhed overfor insulin, hvilket reducerer den mængde glukose, som transporteres væk fra blodet og ind i cellerne. Resultatet er forhøjet blodsukker.



Genvariationer og behandling

Genetiske variationer kan påvirke et lægemiddels virkning i organismen på flere måder. De kan spille en rolle i lægemidlets omsætning eller være involveret i de intracellulære signaleringsveje for den pågældende sygdom. En af de hyppigste årsager til en varierende effekt af lægemidler skyldes variationer i de gener, som koder for cytochrom P450-enzymene, som spiller en central rolle for omdannelsen af lægemiddelforløbere i leveren. Genetiske variationer i disse enzymer fører ofte til, at en patient omsætter et lægemiddel hurtigere eller langsommere end gennemsnitligt i befolkningen, og det kan påvirke, at det pågældende lægemiddel ikke virker optimalt eller giver alvorlige bivirkninger.

Derudover har en række monogene diabetesformer givet indsigt i, hvordan genetiske forskelle påvirker responset på medicinsk behandling. Maturity onset diabetes of the young (MODY) er en genetisk heterogen form for diabetes, som er arvelig og karakteriseret ved sygdomsgennembrud før 25-årsalderen, nedsat β -celle funktion og normal insulinfølsomhed.

Der findes seks forskellige undergrupper af patienter, og hver undergruppe har en specifik mutation i et gen. Behandlingen afhænger derfor af genotypen. Fx er sulfonylurea, som stimulerer β -cellerne til at frigive mere insulin, det foretrukne valg for patienter i undergruppe 3, mens patienter i undergruppe 2 normalt ikke kræver behandling. Det skyldes, at de har behov for en højere glukosekoncentration end normalt for at stimulere bugspytkirtlens udskillelse af insulin, mens selve evnen til at producere og udskille insulin er bevaret. Derfor har hverken insulinstimulerende eller insulinsensibiliserende lægemidler nævneværdig effekt.

For overvægtige type-2 diabetikere er metformin det foretrukne lægemiddel. Metformin er et insulinsensibiliserende stof, der bl.a. virker ved at nedsætte glukoseproduktionen i leveren. Lægemiddelstoffet metaboliseres ikke, men elimineres i stedet via nyrerne. Flere kliniske studier har vist, at variationer i de gener, som koder for proteiner, der er ansvarlige for lægemidlets transport ind i leveren og nyrerne, medvirker til, at patienter reagerer forskelligt på lægemidlet.



Farmakologisk behandling	Virkningsmekanisme	Kendte genetiske regioner
Sulfonylurea	Øger insulinfrigivelsen fra β -cellen i bugspytkirtlen.	CYP2C9 CYP2C19 IRS1 KCNJ11 ABCC8 TCF7L2 NOS1AP
Meglitinider	Øger insulinfrigivelsen fra β -cellen i bugspytkirtlen.	CYP2C9 CYP2D6 CYP2C8 CYP3A5
Metformin	Nedsætter glukoseproduktionen i leveren og øger insulinfølsomheden i muskler, lever og fedtvæv.	SLC22A1 SLC22A2 SLC47A1
Thiazolidinedioner	Nedsætter koncentrationen af cirkulerende frie fedtsyrer i lever og muskler, hvilket er med til at øge insulinfølsomheden.	CYP2C8 PPARG SLCO1B1

Tabellen giver en oversigt over antidiabetiske lægemidler på tabletform, deres virkningsmekanisme og de genetiske regioner, som vides at have indflydelse på effekten af lægemidlet.

Et farmakogenetisk studie af metformin

Addition-studiet er et populationsbaseret interventionsstudie, hvor man ved trinvis screening har identificeret 1500 personer med ikke-erkendt type-2 diabetes. Formålet med studiet er at undersøge om et intensivt og multifaktoriel behandlingsregime fører til bedre behandling af type-2 diabetikere sammenlignet med den normale standardiserede behandling. Ud fra Lægemiddelstatistikregisteret har det været muligt at indsamle information om patienternes medicinmønstre med særlig henblik på at belyse forbruget af metformin. Disse informationer vil blive koblet til patienternes lægemiddelrespons, målt som glykosyleret hæmoglobin, som er et mål for det gennemsnitlige blodsukkerniveau over tre måneder. Det er således muligt at inddеле patienterne i to grupper: Patienter, som responderer dårligt på lægemidlet, fordi deres blodsukkerniveau ikke nedsættes, og patienter som responderer godt. Herefter skal vi sammenligne forekomsten af bestemte genotyper i de to grupper for at identificere specifikke genvarianter, som kan associeres med patienternes respons på metformin.

Færre fejl i fremtiden

Inden for en overskuelig fremtid kan scanning af hele genomer med DNA-chips, der påviser genetiske variationer, sandsynligvis gøre det muligt at identificere og klassificere patienter med en bestemt genetisk profil, som vil have gavn af en bestemt behandling. Det er imidlertid stadig svært at forudsæ effekten af en given genetisk variation, fordi andre genetiske og miljømæssige faktorer kan spille en væsentlig rolle for, hvordan medicinen virker, og hvorvidt den genetiske variation udtrykkes i cellerne. Desuden rejser forskningen et etisk spørgsmål om, hvad man stiller op med patienter med en "forkert" profil, som medfører, at de ikke vil få gavn af behandlingen eller få alvorlige bivirkninger.

Der er dog ingen tvivl om, at anvendt farmakogenomik vil kunne spare samfundet for mange penge ved at nedsætte antallet af fejlbehandlinger, som ofte er forbundet med dyre indlæggelser. Derudover kan man opnå en bedre behandling ikke mindst af patienter, som indtager flere lægemidler, fordi en bestemt genotype potentielt kan sige noget om den optimale lægemiddeldosis og den kombinerede effekt af samspillet mellem flere slags medicin.

Cand.scient.pharm. Malene Hornbak er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi og ved The Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, Københavns Universitet
Dr.med. Åsa Anderson er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi



Funktionelle fibriller som depotmedicin mod prostatakræft

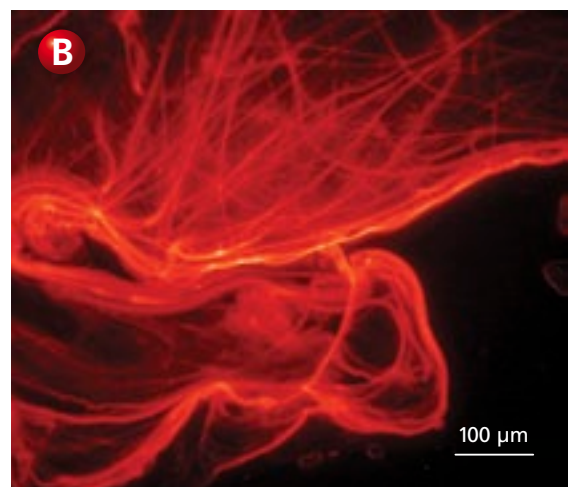
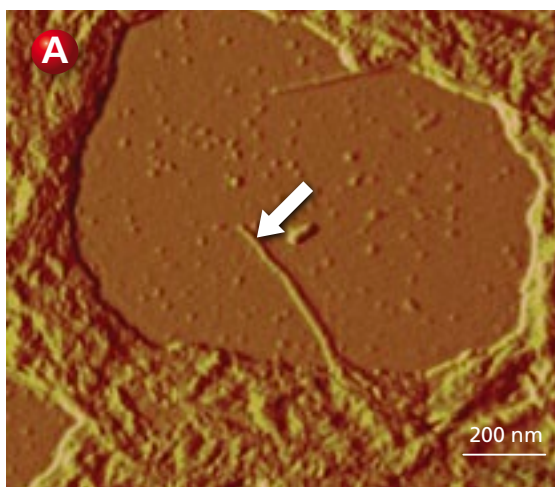
Mindst 27 sygdomme er blevet forbundet med tilstedeværelsen af trådagtige sammenfletninger af proteiner, som kaldes amyloide fibriller. Men det er ikke hele historien. Naturlige fibriller kan også være gavnlige, og ny forskning peger på, at syntetiske fibriller kan udnyttes medicinsk. Et depotpræparat til behandling af prostatakræft frigiver lægemiddelstoffet fra funktionelle fibriller, som dannes spontant efter injektion i underhuden.

Af Minna Grønning Jensen, Andreas van Maarschalkerweerd og Tine Gottschalk

Proteiner og korte proteinsekvenser – peptider – har tendens til at aggregere og kan bl.a. danne trådformede fibriller. Mest kendt er de amyloide fibriller, som ophobes i hjernen ved alvorlige neurodegenerative sygdomme som Alzheimers sygdom og Parkinsons sygdom, og som ligeledes spiller en rolle i type-2 diabetes. I de senere år har man imidlertid fået øjnene op for, at fibriller udfører vitale funktioner i bakteri-

er og svampe og endda i pattedyr, hvor de indgår i cellernes beskyttelse imod ultraviolet stråling. Det viser, at amyloid-lignende strukturer ikke nødvendigvis er patogene. Men at fibriller kan bruges til terapeutiske formål er helt nyt. Vores forskning sandsynliggør, at spontan dannelse af fibriller er mekanismen bag en forbedret behandling af prostatakræft, hvor lægemidlet frigives langsomt og kontrolleret fra et depot i underhuden.

Prostatakræft er den trediehyppigste kræftform blandt danske mænd over 50 år. Over 20.000 danskere lever med diagnosen, og hvert år opdages 3700 nye tilfælde. Dødeligheden inden for fem år efter diagnosticeringen er 32 procent, og sygdommen fører til omkring 1100 dødsfald om året. Behandlingsmetoderne omfatter operation, hvor prostata fjernes, stråleterapi, kirurgisk kastration samt medicinsk kastration. Ved medicinsk kastration anvender lægerne stoffer, som regulerer effekten af hormonet Gonadotropin udløsende hormon (GnRH), hvilket blokerer det mandlige kønshormon, testosteron. Den medicinske behandling kan ofte bremse sygdommens udvikling i en længere periode.



Depotlægemidlet degarelix til behandling af prostatakræft består af et peptid, som danner fibriller, når det i opløst form injiceres i underhuden. I laboratoriet er fibriller af degarelix blevet visualiseret ved hjælp af Atomic Force Mikroskopi (A); en fibril er markeret med pilen. Tykkelsen af en fibril er 1,3 nm, men de små fibriller finder sammen i tykke fibre med diametre på op til 5-10 µm. Når farvestoffet Nil-rød binder sig til fibre, kan de ses med fluorescensmikroskopi (B).

Ferring Pharmaceuticals A/S har udviklet lægemidlet degarelix, som er en GnRH-antagonist – dvs. et stof, som virker i prostata ved at blokkere cellernes GnRH-receptorer og derved hæmme de signalprocesser, som hormonet normalt medierer. Lægemidlet blev godkendt af de amerikanske og europæiske lægemiddelmyndigheder til behandling af prostatakræft i 2008-2009. Selve lægemiddelstoffet er et syntetisk peptid, som danner funktionelle fibriller efter injektion i under huden, hvor fibrillerne fungerer som et depot, der frigiver lægemiddelstoffet langsomt og kontrolleret.

Gode og onde fibriller

Formodenlig kan alle proteiner og peptider forme amyloide eller amyloidlignende fibriller. Disse yderst stabile fibriller måler typisk nogle få nanometer i diameter og op til flere mikrometer i længden. Den formelle definition på de sygdomsrelaterede amyloide fibriller er stadig til debat på internationalt plan

blandt feltets førende forskere. Men de fleste er enige om, at amyloide fibriller farvet med Congo-rød giver en æblegrøn dobbeltbrydning under polariseret lys, og at de er symmetrisk opbygget af en karakteristisk kryds- β -struktur. I denne struktur er peptidstrengene samlet i plader, hvori strengene ligger på tværs af fibrillernes længderetning som leddene i en lynlås, og pladerne er samlet i flere lag, som til sammen danner fibrillen. Mindst 27 sygdomme er til dato blevet forbundet med tilstedeværelsen af amyloide fibriller, som er opbygget af kropens egne proteiner eller peptider. Meget tyder dog på, at de amyloide fibriller i sig selv er inaktive, og at de fungerer som et lager for giftstoffer, som dannes under fibrilleringsprocessen. Mens amyloide fibriller primært forbindes med sygdomme, så har forskerne i de seneste år fået øjnene op for, at en tilsvarende type fibriller udøver en række gavnlige funktioner i mange levende organismer. Blandt andet indgår amyloidlignende fibriller i mammale cellers forsvar mod ultraviolet

DANNELSE AF FUNKTIONELLE FIBRILLER

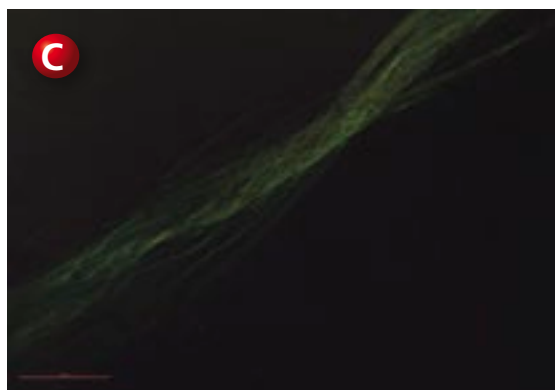
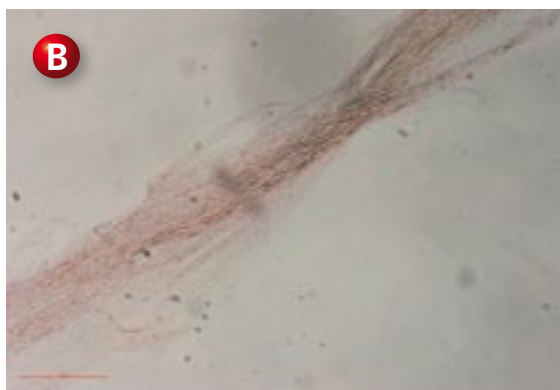
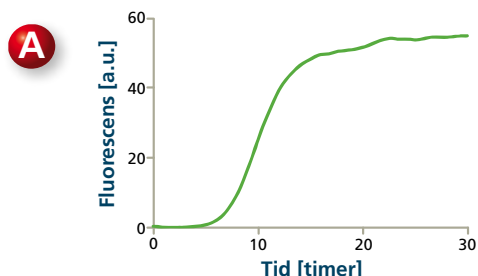
Fibriller er komplekse strukturer, og det er nødvendigt at anvende en bred vifte af metoder for at karakterisere dem. Vi har undersøgt de fibriller, som dannes af peptidlægemidlet degarelix, og sammenlignet resultaterne med kendt viden om amyloide fibriller.

Efter injektion i huden danner opløsningen med degarelix en gel, hvorfra det terapeutiske peptid frigives over tid. Tilsvarende geler kan fremstilles i laboratoriet, når degarelix opløses i vand, og vore undersøgelser viser, at disse geler består af amyloidlignende fibriller. For at fremskynde fibrilleringsprocessen blev degarelix rystet ved 37 °C svarende til den humane kropstemperatur.

De enkelte fibriller i gelen har en diameter på omkring 1,3 nanometer, og de kan visualiseres ved hjælp af Atomic Force Mikroskopi. Desuden anvendes farvestoffet Thioflavin T ofte til at følge dannelsen af fibrillerne. I denne sammenhæng

udnyttes det, at farvestoffet bliver fluorescerende, når det binder sig til fibriller.

Efter den umiddelbare fibrildannelse samles de små tynde fibriller spontant i tykke fibre med en diameter på 5-10 μm . Disse fibre er så store, at de kan observeres med fluorescensmikroskop, hvis fibre først farves med eksempelvis Nil-rød. Samlingen er atypisk for amyloide fibriller.



Degarelix-fibrillerne har mange amyloidlignende karakteristika. Overordnet følger fibrildannelsen et forløb, som er typisk for amyloide fibriller. Denne udvikling monitoreres ved at følge ændringerne i Thioflavin T fluorescens som funktion af tiden **A**. Et andet amyloid-lignende karakteristika fremkommer, når fibrillerne farves med Congo-rød **B**, hvorefter de fremstår æblegrønne, når de belyses med polariseret lys **C**.

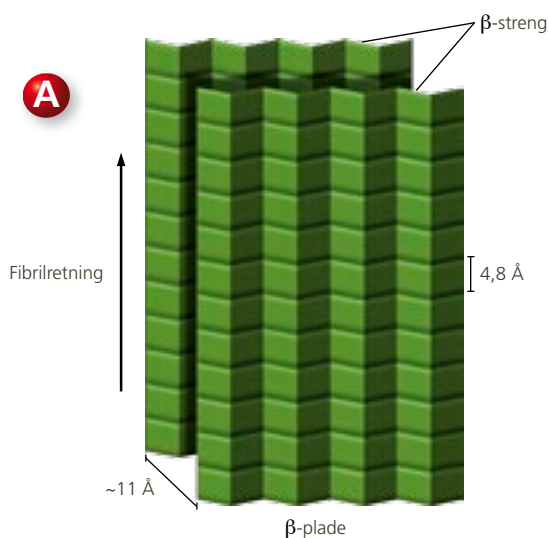
OPKLARING AF FIBRILLERNES INTERNE STRUKTUR

Et af de mest udprægede fysisk-kemiske karakteristika ved amyloide fibriller er deres interne opbygning af plader, der er dannet af peptidstrengene orienteret på tværs af fibrillens længderetning. Denne særlige struktur kan identificeres ved at farve fibrillerne med Congo-rød, hvilket giver en æblegrøn dobbeltbrydning under polariseret lys.

Strukturen kan undersøges nøjere med en metode, der hedder røntgen-fiberdiffraktion. Inden undersøgelsen tørres fibrillerne med en speciel teknik, hvorved de orienterer sig parallelt. Når en røntgenstråle derpå sendes gennem fibrillerne,

spredes den i et bestemt mønster, som afslører afstandene mellem β -strengene og mellem β -plader.

Amyloide fibriller udviser typisk signaler ved 4,8 Å, hvilket svarer til afstanden mellem strengene inde i pladerne, og omkring 10-11 Å, hvilket svarer til den indbyrdes afstand mellem pladerne i fibrillen. I degarelixfibrillerne genkendes dette klassiske mønster, men derudover fremkommer der større indbyrdes afstande på omkring 13, 22,5 og 25,9 Å, hvilket fint kan stemme overens med, at de tynde degarelix-fibriller går sammen og danner tykkere fibre.



Amyloide fibriller er opbygget af kryds- β -plader, i hvilke peptidstrengene er orienteret på tværs af fibrillernes længderetning med en indbyrdes afstand på 4,8 Å, mens afstanden mellem pladerne i fibrillen er 10-11 Å **A**. Vore forsøg med røntgen-fiberdiffraktion viser, at degarelixfibrillerne overordnet set har samme karakteristiske afstande, hvilket ses i diffraktionsmønsteret **B**.

stråling, og de medvirker til bakteriers frigivelse af sporer. De nye funktionelle fibriller til medicinsk brug har slående strukturelle ligheder med både de skadelige amyloide fibriller og de nyttige amyloidlignende fibriller, og det sandsynliggør, at funktionelle fibriller har et medicinsk potentiale, som rækker langt ud over at være et farligt fænomen, som for enhver pris skal undgås.

Funktionelle fibriller mod prostatakræft

Lægemidlet degarelix er en GnRH-antagonist, som anvendes til behandling af prostatakræft. Aktivstoffet er et lineært syntetisk peptid, som består af ti aminosyrer, og lægemidlet fremstilles som et frysetørret, hvidt præparat. Inden brugen opløses præparatet, hvorpå det injiceres i underhuden. Her dannes der spontant en gel ved mødet med det omgivende miljø som følge af blandt andet pH-værdien, ionstyrken og kropstemperaturen. Når gelen er dannet, afgives peptidet langsomt til

blodkredsløbet, hvorved der opnås en depoteffekt.

Gelen består sandsynligvis af fibriller med amyloidlignende karakteristika. Denne anvendelse af funktionelle fibriller er ganske unik, og derfor er det interessant at undersøge nærmere, hvor mange fællestræk disse fibriller har med amyloide fibriller. Vore undersøgelser bekræfter, at degarelix i laboratorieforsøg er i stand til at danne amyloidlignende fibriller, og at disse fibriller derpå samles i større netværk. Peptidet danner også et tæt netværk af fibriller ved injektion i mennesker, men om det sker på helt samme måde som i laboratorieforsøgene, er stadig ved at blive undersøgt. Både laboratorieforsøg og dyreforsøg viser, at et syntetisk, unaturligt peptid med terapeutisk effekt kan danne funktionelle fibriller med amyloide karakteristika. At der eksisterer funktionelle fibriller, som kan anvendes i terapeutisk øjemed, er noget helt nyt, som åbner nye døre for fremtidig medicinsk brug af disse strukturer.

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

Cand.pharm. Andreas van Maarschalkerveerd er ph.d.-studerende på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning

Ph.d. Tine Gottschalk er seniorforsker på Ferring Pharmaceuticals A/S

Medicinplanter og abort

– ny viden kan hjælpe afrikanske kvinder

Kan plantemedicin forhindre, at kvinder dør af blødning under fødslen, eller bruges til at fremkalde abort? Vi har undersøgt en række planter, der anvendes til abort i Tanzania, og fundet, at nogle af dem har en kraftig sammentrækkende effekt på livmoderen. Sammentrækningen kan udstøde et foster eller standse livstruende blødninger efter fødslen.

Af Anna K. Jäger, Uffe Kristiansen og Vibeke Rasch

Hvad gør du, hvis du er en 16-årig skolepige, der venter et uønsket barn, og du ved, at skolen vil smide dig ud, fordi du er gravid, og at din kæreste kan ende i fængsel, fordi det er forbudt at gøre skolepiger under 18 år gravide? Eller hvis du er gravid efter en voldtægt, og din mand, som snart kommer hjem på sit årlige besøg fra arbejdet i byen, vil straffe dig og udstøde dig – eller hvis du ganske simpelt ikke kan brødføde endnu et barn? Mange gravide kvinder i udviklingslandene befinder sig i så vanskelige sociale og økonomiske situationer, at de ikke ser andre udveje for deres egen eller familiens overlevelse end at abortere deres foster.

I Tanzania er det illegalt at få foretaget en abort, så kvinderne må selv fremkalde aborten. 40 procent af de kvinder, som vælger abort, bruger planter til at udløse aborten. Her henter kvinderne hjælp hos de traditionelle fødselshjælpere, som er kvinder uden formel uddannelse, der fungerer som jordemødre. Fødselshjælperne synes at vide, hvilke planter man kan bruge, og hvordan planterne skal tilberedes og doseres. De må dog ikke selv fremstille præparaterne og give dem til kvinderne, men de må godt instruere gravide kvinder i, hvilke planter de skal samle, og hvordan de skal bruges.

Mange kvinder i Afrika dør af blødninger efter fødslen. Andre gravide er så pressede af sociale og økonomiske forhold, at de ikke ser anden udvej end at abortere deres foster. Plantemedicin kan både standse blødninger og fremkalde abort.





Mange afrikanske medicinplanter har sammentrækkende virkning på livmoderen. Til venstre ses *Commelina africana* og til højre *Desmodium barbatum*.

Men virker planterne? Det vil vi gerne finde ud af. I programmet People and Plant Medicine undersøger vi derfor videnskabeligt, om de planter, som traditionelle healere rundt omkring i verden anvender, rent faktisk har farmakologiske virkninger, som gør planterne egnede som medicin. Ud over at identificere de planter som virker, er det også vigtigt at få sorteret virkningsløse eller direkte skadelige planter fra.

I vores projekt blev 22 fødselshjælpere i Tanzania interviewet om deres viden om planter til fremkaldelse af abort. De kendte 23 planter. En af planterne bliver brugt som en spids pind, som man stikker ind gennem skeden og op i livmoderen for at inducere abort på samme måde, som strikkepinde tidligere blev brugt i Danmark. Denne plante så vi ikke nærmere på, da det jo er en ren mekanisk effekt. Af de øvrige 22 planter bliver to anbragt i skeden, mens resten indtages som afkog eller te eller tygges. Man fortsætter med at tage planten, indtil virkningen indtræder, hvilket kan tage op til et par dage.

Sammen med fødselshjælperne indsamlede vi materiale af de 22 planter. For at være sikre på identiteten af de udvalgte planter blev de artsbestemt videnskabeligt af en lokal botaniker – med det yderst passende navn Flora – hvorpå pressede herbarieeksemplarer af alle planterne blev oplagret på herbariet i Dar es Salaam, hvor de tjener til dokumentation af planternes identitet.

Abort ved sammentrækning af livmoderen

Hjemme i laboratoriet i Danmark fremstillede vi ekstrakter af planterne, så vi kunne undersøge deres virkning. Vi valgte at undersøge planteekstrakternes evne til at få livmoderen til at trække sig sammen, da dette er den klassiske måde at udstøde et foster på. Til forsøgene skulle vi bruge livmoderen fra rotter, der var i brunst og havde ægløsning, fordi det er lettest at inducere sammentrækninger på livmoderen på dette tidspunkt i cyclus. Hver morgen måtte vi tage et skrab fra rotternes skeder, hvorefter vi under et mikroskop kunne se, om der var forandringer i skedeslimen, som viste, at rotten havde ægløsning. Når rotten kom i brunst, blev den aflivet, hvorpå livmoderen blev udtaget og klippet i mindre stykker, så en enkelt livmoder kunne bruges til flere forsøg.

Livmodervævet blev placeret i næringsvæske og spændt op mellem to snore. Den ene snor var fastgjort til en fjeder med en kraftmåler, som kunne måle, hvor meget fjederen blev strakt, og dermed om livmodervævet trak sig sammen. Derpå tilsatte vi planteekstrakterne til næringsvæsken, som livmodervævet befandt sig i. Målingerne viste nu, om ekstrakterne fik livmoderen til at trække sig sammen, hvor stærk sammentrækningen var, og hvor lang tid, der gik mellem hver sammentrækning – ligesom ved veer.

At fremkalde en abort kræver en stærk sammentrækning af livmoderen. Halvdelen af de testede planter fik livmoder-

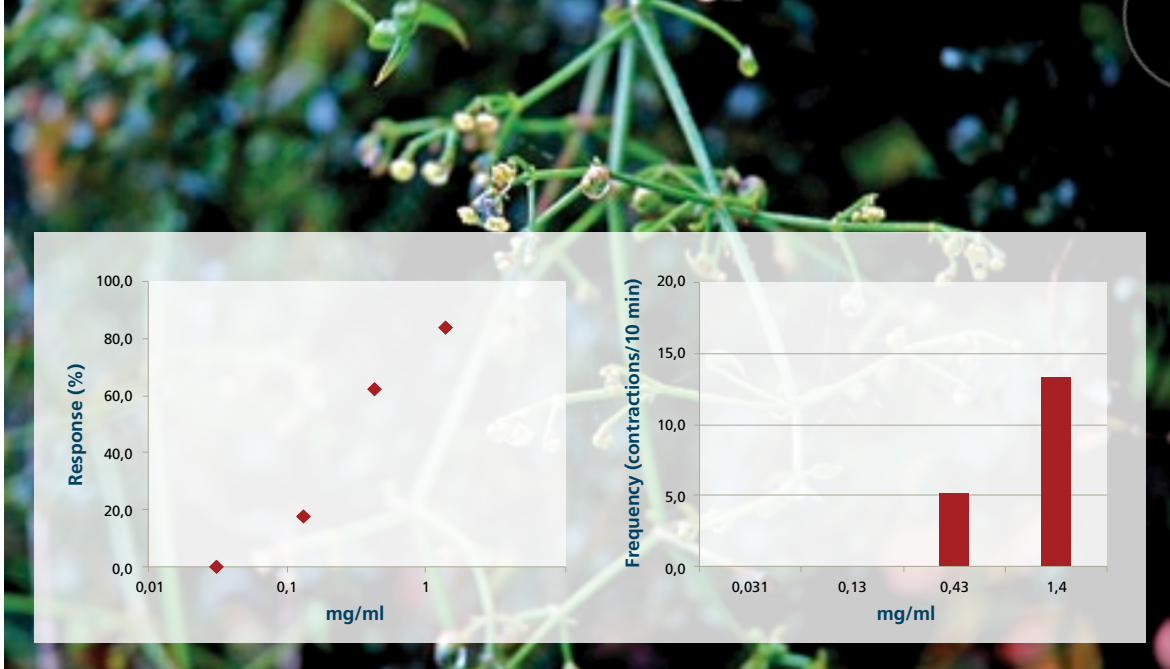
TRADITIONEL FØDSELHJÆLP I UDVIKLINGSLANDE

Traditionelle fødselshjælpere (Traditional Birth Attendants) er en del af behandlingssystemet i mange udviklingslande, hvor de fungerer som jordemødre og tager sig af omkring halvdelen af alle fødsler. Ude på landet føder næsten alle kvinder med hjælp fra en traditionel fødselshjælper.

Fødselshjælperne er normalt kvinder uden en egentlig uddannelse, men med erfaring fra mange fødsler, og i

mange kulturer skal de selv være mødre. Deres manglende uddannelse og knaphed på udstyr og medicin betyder, at fødselshjælperne ikke kan stille meget op ved komplicerede fødsler.

I nogle lande er der initiativer i gang for at give de traditionelle fødselshjælpere en basal uddannelse, så de kan klare flere situationer og blive bedre til at bedømme, hvornår en kvinde skal sendes videre i sundhedssystemet.



Målinger viser, at et ekstrakt af *Rubia cordifolia* forstærker sammentrækningen af livmodervævet og øger antallet af sammentrækninger. Begge virkninger stiger med stigende dosis.

vævet til at lave kraftige sammentrækninger, mens 11 af ekstrakterne fik sammentrækningerne til at komme med kortere mellemrum. Syv af planteekstrakterne havde begge virkninger: *Commelina africana*, *Desmodium barbatum*, *Obetia radula*, *Ocimum suave*, *Rubia cordifolia*, *Sphaerogyne latifolia* og *Triumfetta microphylla*. Vi sammenlignede virkningen af planteekstrakterne med kontrolstoffet acetylcholin, som får livmodervævet til at trække sig sammen, og flere af planteekstrakterne virkede lige så godt som acetylcholin. De traditionelle fødselshjælpere foreslog ikke altid kun at bruge en enkelt plante, men somme tider blandinger af to eller tre planter. Og det ser ud til, at der er god grund til dette. For eksempel anvendes et afkog af en blanding af *Obetia radula*, *Rubia cordifolia* og *Zehneria scabra*, hvor de alle tre giver sammentrækninger med korte tidsintervaller, mens de to første også giver sammentrækninger med stor styrke.

Standsning af blødninger efter fødslen

Planter, som kan få livmoderen til at trække sig sammen, kan ikke kun bruges til at fremkalde abort, men også til at stoppe blødninger efter fødsler. Det anslås, at der hvert år på verdensplan dør 350.000 kvinder på grund af blodtab, efter at de har født. I Afrika dør en ud af 16 kvinder i forbindelse med graviditet, og i de hårdest ramte lande dør hver ottende gravide kvinde.

Det skyldes især, at kvinderne ikke har adgang til medicinsk hjælp, enten fordi de ikke har råd, eller fordi de bor for langt væk fra byerne. I disse landområder kan kendskabet til effektive planter, der kan trække livmoderen sammen efter fødslen og stoppe blødningen, være en gratis eller i hvert fald billig løsning. Det er ikke kun den enkelte kvindes død, som kunne forhindres, men også katastrofen for hendes efterladte børn, der kastes ud i en fortvivlet kamp for at overleve og som kommer til at vokse op under svære vilkår.

FORMIDLING AF DEN NYE VIDEN

People and Plant Medicine programmets ultimative mål er at hjælpe folk, så derfor er det afgørende at få den nye viden om plantemedicin ud til udøverne og brugerne. Det håber vi at gøre ved informationsseminarer i de traditionelle healeres og fødselshjælperes organisationer i Tanzania.

Det er generelt meget svært for forskere at få deres forskningsresultater om effekten af medicinplanter ud til dem, der har brug for den nye viden i behandlingsøjemed. Nogle enkelte lande har velorganiserede sammen-

slutninger af traditionelle healere, men i mange lande er der dårlig organisering, og store geografiske afstande gør det svært at nå helt ud i landdistrikterne. Der mangler måske også en fælles forståelsesramme af sygdom og behandling, hvilket kan gøre det svært for forskere og healere at kommunikere. Endeligt er det sådan i forskningsverdenen, at det kun er artikler publiceret i videnskabelige tidsskrifter eller patenter, der tæller og giver prestige, mens det desværre ikke tæller ret meget at få viden ud til brugere i et udviklingsland.

Ph.d. Anna K. Jäger er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Uffe Kristiansen er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.med. Vibeke Rasch er på Gynækologisk - Obstetrisk Afdeling, Odense Universitetshospital



Målrettet fisketur i hjernen giver ny viden om Fantasys virkningssted



Vi har udviklet en molekylær fiskestang, som hjælper os til at forstå, hvordan misbrugsstoffet GHB – kendt som Fantasy – virker i hjernen. Med fiskestangen har vi fanget det specifikke protein, som GHB reagerer med i hjernebarken. Dermed bliver det muligt at undersøge stoffets virkning, og om det kan modificeres, så det ikke længere er farligt og kan bruges til at behandle sygdomme.

Af Inge S. Villumsen, Stine B. Vogensen, Bente Frølund, Rasmus P. Clausen og Petrine Wellendorph

GHB er en kemisk forbindelse, der forekommer naturligt i menneskets hjerne, men som er bedst kendt som misbrugsstoffet Fantasy. Når GHB indtages i moderate mængder, medfører det euforiske og afslappende effekter, men i højere doser eller blandet med alkohol kan misbrug af stoffet medføre koma og død. Den naturlige funktion er stadig ukendt, men GHB fungerer sandsynligvis som et signalstof i hjernen. Målet med vores forskning er at karakterisere GHB's bindingssteder i hjernen på molekylært plan og korrelere dem med stoffets fysiologiske og farmakologiske funktion.

Hjernens signalstoffer virker ved at binde til og aktivere særlige proteiner, men det vides ikke, hvilket af hjernens proteiner GHB binder sig til. Ved brug af radioaktivt mærkede GHB-lignende stoffer har vi tidligere vist, hvor i hjernen det ukendte protein findes. Men først når selve proteinet er identificeret, kan man for alvor be-

gynde at forstå GHB's rolle i hjernen. Derfor er vi nu gået på fisketur i hjernevæv fra rotter for at få proteinet på krogen.

Den molekylære fiskestang

Vi har brugt medicinskemiske metoder til at udvikle fiskestangen i form af et molekyle, som kan fiske GHB's bindingsprotein ud fra hjernens samlede pulje af proteiner. Kravene til en sådan molekylær fiskestang er, at molekylet skal binde specifikt til det rigtige protein, at det har en krog, som kan hage sig fast i proteinet, og at det indeholder en lampe, som lyser, så man kan detektere fiskestangen og dermed fangsten.

GHB-fiskestangen indeholder forskellige funktionelle grupper, som hver især opfylder disse forskellige krav. Den ene ende af stangen er strukturelt identisk med GHB og fungerer som madding, der sørger for, at fiskestangen binder til det samme protein i hjernen som GHB. Fiskestangen indeholder også to aromatiske ringe, der forstærker stangens tilknytning til proteinet. Eksperimenter har vist, at tilstedeværelsen af ringene medfører, at molekylet binder op til 700 gange stærkere til bindingsproteinet end GHB selv, hvilket medfører, at fiskestangen er selektivt overfor det ønskede protein; det binder ikke til andre af hjernens proteiner.

Fiskestangen fanger proteinet i prøven, mens det har sin naturlige facon. Men derefter opstår der et problem. For når man ønsker at isolere og oprense et protein i laboratoriet, er det normalt nødvendigt at udsætte proteinet for et kemisk miljø, som ødelægger proteinets tredimensionelle struktur.

GHB GENNEM TIDEN: FRA NATURSTOF TIL MISBRUGSSTOF OG LÆGEMIDDEL

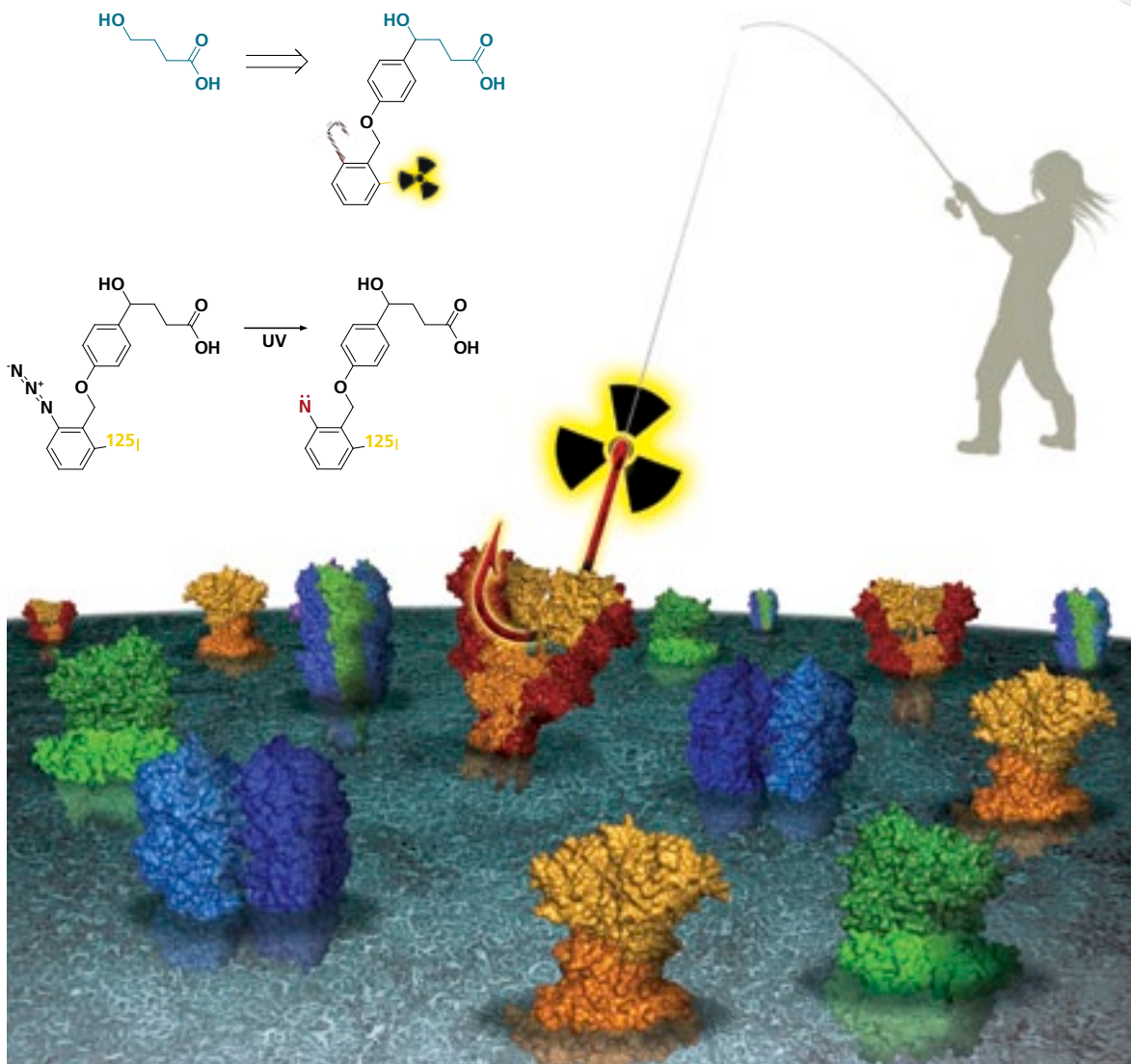
γ -hydroxymørsyre (GHB) blev første gang beskrevet i 1960'erne som et stof, der let passerer ind i hjernen, hvor det hæmmer nervecellernes signaloverførsel. Man opdagede også, at GHB er naturligt forekommende i hjernen i små mængder, men stoffets fysiologiske betydning er stadig ukendt.

I højere doser er GHB blevet brugt både rekreativt og medicinsk. I Danmark er GHB mest kendt som misbrugsmidlet Fantasy, der anvendes som rus-

middel, som giver euforiske og afslappende effekter, men som i høje doser kan føre til koma og død. GHB er også kendt som et Date Rape Drug, fordi stoffet er blevet brugt som bedøvelsesmiddel ved voldtægter, hvor GHB kommer i offerets drink, uden at det kan smages. Der findes ikke nogen modgift.

Siden 1970'erne har GHB været anvendt medicinsk som bedøvelsesmiddel, til behandling af søvnløshed og til smertelindring ved fødsler. GHB er i dag et registreret lægemiddel mod nogle former for søvnforstyrrelser samt alkoholisme.





På fisketur i hjernen: Søen er en proteinopløsning fra en rottehjerne. Maddingen er et GHB-lignende molekyle, og fisken er det protein, som GHB binder til i hjernen. Når fisken bider på, fanges den på krogen. Ved de efterfølgende analyser i laboratoriet kan proteinet detekteres, fordi det afsløres af en radioaktiv lampe på fiskekrogen. Den molekylære fiskestang er baseret på strukturen af GHB (blå) og designet, så der er plads til to aromatiske phenylringe, som bidrager til proteinets genkendelse af GHB. Krogen er en azidgruppe, $N=N=N$ (sort), som kan fraspalte et kvælstofmolekyle, N_2 , og omdannes til en nitren (rød), når gruppen belyses med ultraviolet lys. Nitrener er meget reaktive og reagerer kemisk med proteinet, hvorved der dannes en stærk kovalent binding. Lampen et radioaktivt atom, jod¹²⁵ (gul), som er placeret på den ene ring.

Under sådanne betingelser kan GHB og GHB-lignende molekyler ikke længere binde til proteinet som en nøgle i en lås, fordi låsen har ændret form.

For at sikre, at vores GHB-maddning ikke falder af bindingsstedet på proteinet under oprensningen, har vi inkorporeret en kemisk azidgruppe i den molekylære fiskestang. Når stangen belyses med ultraviolet lys, reagerer azidgruppen med aminosyrer i proteinet og binder sig kovalent til dem som en fiskekrog, der sætter sig fast i munden på en fisk. Efter denne reaktion kan man udsætte proteinet for de nødvendige forsøgsbetingelser uden at fiskestangen falder af. Derved kan GHB's bindingsprotein adskilles fra de øvrige proteiner i hjernevævet via klassisk separation af proteiner efter størrelse. Den molekylære fiskestangs sidste egenskab er en lampe, som gør det muligt at følge molekylet under forsøgene. Lampen består af en radioaktiv jod-isotop, der udsender et kraftigt signal, som radiofølsomme målere opfanger i form

af lysglimt. Metoden er særdeles følsom og gør det muligt at påvise tilstedeværelsen af molekylet ned til meget små mængder.

Bid i laboratoriet

Ved at udnytte det specialdesignede molekyle er det lykkedes at isolere GHB-bindingsproteinet fra rottehjernevæv og bestemme størrelsen på proteinet. Vi har anvendt vævs materiale fra det cerebrale cortex, også kaldet hjernebarken, som er det yderste lag af hjernen hos mennesker og højere dyr. Her er der tidligere observeret en høj grad af GHB-binding. Vi kastede fiskestangen ned til blandingen af proteiner fra rottehjernevævet og opnåede en selektiv og stærk binding til bindingsproteinet. Blandingen blev efterfølgende fotoreageret ved belysning med ultraviolet lys, så azidgruppen på fiskestangen kunne reagere med proteinet og fange det på krogen. Herefter blev proteinblandingen analyseret ved at

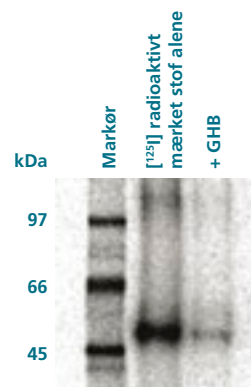
ADSKILLELSE AF PROTEINER VED GELELEKTROFORESE

For at kunne identificere proteinerne i en prøve af fx hjernevæv er det nødvendigt først at denaturere proteinerne og derpå at adskille dem. Det kan opnås med metoden SDS polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE).

SDS står for natriumdodekylsulfat, som er et meget anvendt opløsningsmiddel inden for biokemien. Stoffet denaturerer proteiner, dvs. ødelægger deres oprindelige tredimensionelle facon ved at bryde bindinger mellem aminosyrerne og ved at give proteinopløsningen en negativ ladning. Fidusen er, at de denaturerede proteiner nu kan adskilles efter størrelse.

Adskillelsen opnås med polyakrylamid gelelektroforese, hvor proteinblandingen fra prøven anbringes øverst i gelen, som påføres et spændingsfelt. Da proteinerne er negativt ladede, vil de vandre fra den negative katode på toppen af gelen imod den positive anode i bunden af gelen, sådan at de mindste proteiner vandrer hurtigst. Man anbringer oftest en blanding med kendte proteiner i en af yderbrøndene for at have noget at sammenligne med.

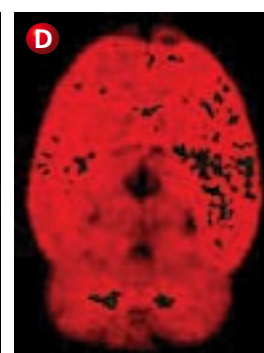
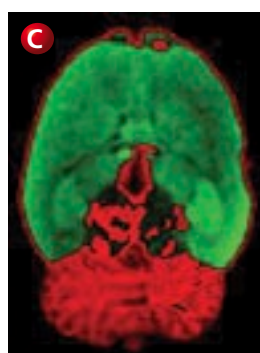
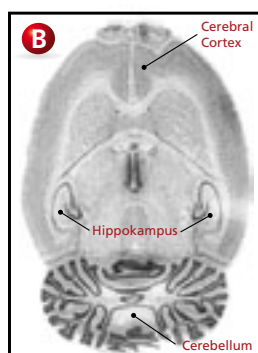
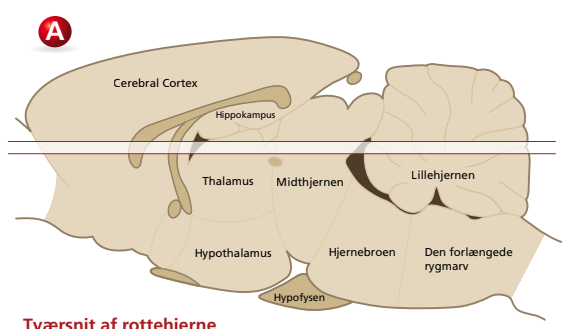
Når proteinerne i prøven er adskilt, viser den radioaktive markør på fiskestangen, hvilket protein GHB binder sig til.



Her ses en gel af proteinopløsningen fra en rottehjerne. Det mørke bånd i den centrale brønd repræsenterer det indfangede bindingsprotein, som hænger sammen med den radioaktivt mærkede fiskestang. Til højre kan man se, hvordan tilsætning af en høj koncentration af GHB fortrænger det mærkede stof inden belysning med ultraviolet lys, hvilket bekræfter, at båndet kommer fra et protein, der kan binde GHB. Det GHB-bindende protein har en størrelse på ca. 50 kDa estimeret ud fra forskellige kendte proteins størrelse yderst til venstre i gelbilledet.

sortere proteinerne efter størrelse. Derpå blev proteinet detekteret ved hjælp af den radioaktive jod-isotop, og størrelsen blev målt til at være på omkring 50 kDa. De næste skridt bliver at oprense proteinet yderligere, bestemme aminosyresekvensen og identificere det gen, som koder for proteinet. Når det er lykkedes, bliver det muligt at udtrykke det GHB-bindende protein i pattedyrsceller ved brug af genteknologi og undersøge proteinet isoleret frem for blandt alle hjer-

nens proteiner. Herved vil vi mere præcist kunne bestemme, hvordan proteinet fungerer på det molekylære plan, bygge modeller af proteinet og gå i gang med at designe stoffer, som præcist aktiverer eller hæmmer proteinet. Alt afhængig af, hvilken rolle proteinet spiller i hjernen, vil vores fangst på sigt muliggøre udvikling af stoffer med målrettet effekt mod visse sygdomme i hjernen, men uden de farlige bivirkninger, som Fantasy medfører.



A Anatomien af en rottehjerne. De røde streger markerer det horisontale plan, hvor der er udtaget tynde skiver til bindingsstudierne. **B** En vævsskive med markering af de relevante hjernedele. **C** Den radioaktivt mærkede fiskestang binder til det cerebrale cortex og hippokampus (grønt), men ikke til lillehjernen (rødt). **D** Ved tilstedeværelse af GHB under reaktionen fortrænges det radioaktive stof fra sit bindingssted, og radioaktiviteten aftager. Forskellen mellem **C** og **D** svarer til de specifikke GHB-bindingssteder som overvejende er i cortex og hippokampus.



Stud.scient Inge S. Villumsen er specialestuderende på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning og Aarhus Universitet
Ph.d. Stine B. Vogensen er postdoc på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Bente Frølund er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Rasmus P. Clausen er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Petrine Wellendorph er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning



Mysteriet om kavas toksicitet



Vandige ekstrakter af den euforiserende plante kava har været anvendt på øer i Stillehavet gennem årtusinder uden at forårsage alvorlige bivirkninger. Men i Vesten har brug af kava medført leverskader. Hvorfor? Nye undersøgelser tyder på, at toksiciteten skyldes, at organiske opløsningsmidler har erstattet vand ved fremstilling af ekstrakterne.

Af Line Olsen, Steen Honoré Hansen, Claus Cornett og Christian Skonberg

Vandige ekstrakter af planten kava har været anvendt i ceremonielle sammenhænge i flere årtusinder på øer i Stillehavsregionen. Drikken har en beroligende og let euforiserende virkning, men påvirker ikke de mentale funktioner. Den traditionelle drik forekommer relativt sikker, idet den mest udbredte bivirkning er et skællet udslæt, som kaldes kava-dermopati. Men efter introduktion af produkter baseret på kava på det europæiske og amerikanske marked blev flere tilfælde af leverskader observeret. Mange af skaderne blev forbundet med indtag af kava, og produkter indeholdende kava blev derfor forbudt i en række lande, heriblandt Danmark. Mekanismen bag levertoksiciteten er ukendt og beskrives derfor som idiosynkratisk. Det vil sige, at kun meget få personer rammes, og at man ikke kan påvise en sammenhæng mellem dosis og giftvirkning. Nye forskningsresultater tyder imidlertid på, at leverskaderne observeret i Vesten kan skyldes, at kava her ekstraheres i organiske opløsningsmidler frem for i vand, som bruges på Stillehavsøerne. Desuden sandsynliggør vore resultater, at en gruppe pigment-stoffer i ekstraktet er involveret i processen.

James Cook beskrev planten

Kava eller Kava-Kava blev første gang beskrevet i litteraturen af kaptajn James Cook under hans sejlads i Stillehavsområdet fra 1768 til 1771. Ekstrakter af planten bliver anvendt i ceremonielle sammenhænge og effekten beskrives som beroligende og sammenlignes ofte med alkohol, dog uden at medføre afhængighed eller ophidselse.

På sin anden rejse i Stillehavsområdet fra 1772 til 1775 havde James Cook en ung botaniker med, Johann Georg Forster, som navngav planten *Piper methysticum*. Forster gav samtidig en udførlig beskrivelse af fremstillingsmetoden af ekstraktet. Traditionelt bliver ekstrakterne fremstillet ud fra roden, som skæres i små stykker, hvorefter stykkerne tygges – evt. af landsbyens jomfruer – og saften spyttes ud i en stor skål. Her blandes saften med vand eller kokosmælk, hvorefter ekstraktet drikkes. Mere hygiejniske fremstillingsmetoder er også beskrevet, hvor roden udblødes eller knuses og sies gennem palmeblade.

Kava blev indført i Europa i løbet af det næste århundrede og blev optaget i forskellige farmakopéer, bl.a. i den britiske farmakope i 1914 til behandling af gonoré. Den dag i dag kan man stadig blive tilbudt traditionelt fremstillede kavaekstrakter på Stillehavsøerne.

Svært at forklare giftvirkninger

Kava indeholder flere forskellige kemiske stoffer, hvoraf de mest dominerende er laktoner, som udgør 3-20 procent af tørret kavarod og op til 96 procent af et organisk ekstrakt. Laktonerne er ansvarlige for kavas beroligende effekt. Ud over laktoner indeholder planten forskellige alkaloider samt en gruppe af pigmenter, som kaldes flavokavainer. I vestlige



Traditionel fremstilling af et kavaekstrakt.

Øverst: Roden skæres i mindre skiver.

I midten: Skiverne findeles og æltes, indtil fibrene er adskilt.

Nederst: Fibrene blandes med lidt koldt vand, og saften vrides ud.

Ekstraktet er en brunlig væske.

lande fremstilles primært standardiserede organiske tørrede ekstrakter med et laktonindhold på 30-70 procent.

I løbet af 1990'erne steg kavas popularitet i den vestlige verden, og samtidig blev en stigning i antallet af leverskader observeret i forbindelse med indtag af ekstrakterne. Denne sammenhæng førte til et forbud mod salg af kavaprodukter i en række europæiske lande samt i Canada, og i USA mærkes alle kavaprodukter med advarsler. En større undersøgelse udført af WHO konkluderede i 2007, at der var en mulig sammenhæng mellem brug af kavaprodukter og levertoksicitet, men den konkrete årsag til leverskaderne kunne ikke fastslås, og man kunne heller ikke påvise nogen sammenhæng mellem toksicitet og dosis eller eksponeringstid. Forekomsten af leverskader blev estimeret til at være et tilfælde blandt 2500 brugere. Siden er adskillige studier blevet udført med henblik på at forklare den bagvedliggende mekanisme for toksiciteten, men til dato uden succes.

At kava har været anvendt i flere årtusinder på Stillehavsøerne uden at medføre en øget forekomst af levertoksicitet, har været et mysterium for alle involverede forskere, fordi der ikke synes at være andre forskelle på kommercielle produkter og traditionelle ekstrakter end selve fremstillingsmetoden. Vandige og organiske ekstrakter er blevet testet både i laboratorieforsøg med cellekulturer og i dyreforsøg, men uden entydige resultater. Konklusionen har i mange tilfælde været, at kavainduceret levertoksicitet er idiosynkratisk, hvilket er karakteriseret ved, at der ikke kan påvises dosisafhængighed, og at kun meget få individer rammes.

Idiosynkratisk toksicitet

Giftvirkninger af kava kan ikke påvises i dyremodeller. Dette kan skyldes, at mennesker og dyr omdanner lægemidler og rusmidler forskelligt, så det ofte er forskellige metabolitter af et stof, som dannes i forskellige arter. Blandt andet derfor er involvering af reaktive metabolitter en udbredt teori i forklaringen af idiosynkratisk toksicitet hos mennesker ved indtagelse af kava. Hvis der dannes reaktive forbindelser i leveren, kan de reagere med leverens proteiner, hvilket kan ødelægge proteinernes funktion eller fremkalde et immunrespons.

Idiosynkratiske reaktioner har ofte ligheder med allergiske reaktioner, og det kan ikke forudsiges, hvilke personer der vil reagere. Omdannelse af indholdsstofferne i kava foregår for en stor del i leveren, som ofte er involveret ved idiosynkratisk toksicitet. En del lægemidler omdannes således til reaktive metabolitter i leveren. Et eksempel er det smertestillende stof, paracetamol, men her dannes metabolitterne dosisafhængigt, og kun når de dannes i store mængder, vil de give anledning til at levercellerne tager skade. Leverens robusthed skyldes i høj grad, at cellerne indeholder høje koncentrationer af stoffet glutathion. Glutathion kan nemlig reagere med de dannede reaktive metabolitter, før cellen bliver angrebet, og på den måde forhindre, at cellen tager skade.



Vores forskergruppe har i mange år arbejdet med at identificere og karakterisere kemisk reaktive omsætningsprodukter af lægemiddelstoffer i leveren, primært med fokus på karboxylsyreholdige lægemidler. Det er især smertestillende medicin, de såkaldte NSAID – non-steroide antiinflammatoriske drugs – som kan danne reaktive acylglucuronider og acyl-Coenzym A-addukter. Disse lægemidler kan reagere med såvel glutathion som proteiner i leveren. Forskningsgruppen har endvidere arbejdet med chalconer, en stofgruppe som omfatter lægemiddelkandidater mod bl.a. malaria, og som i lighed med flavokavainerne indeholder en α,β -umættet keton som reagerer med glutathion.



Reaktive flavokavainere

Flavokavainerne og laktonerne er potentielt reaktive, fordi de indeholder en molekylær struktur, en α,β -umættet keton, som villigt indgår i kemiske reaktioner. Flavokavainerne findes kun i små mængder i kavaplanten, men pigmenterne er de mest toksiske indholdsstoffer. Nyere forskning har vist, at denne type af stoffer har potentiale som lægemidler til behandling af visse kræftformer, fordi de inducerer kontrolleret celledød. Denne effekt kan ophæves ved at behandle cellerne med *N*-acetylcystein. *N*-acetylcystein har i denne forbindelse samme beskyttende egenskaber, som glutathion har i leveren.

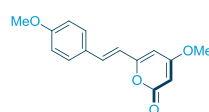
Opløseligheden af både laktoner og flavokavainere er meget højere i organiske opløsningsmidler som ethanol og acetone end i vand. Indholdet af flavokavainere i et standardiseret vestligt ekstrakt vil således være højere end i et vandigt ekstrakt, som er fremstillet med de traditionelle metoder på Stillehavsøerne. Ydermere viser tidligere forskning, at kemiske stoffer med strukturer, der ligner flavokavainers, nedbrydes i vandige opløsninger til stoffer, som sandsynligvis ikke er reaktive. Desuden har man påvist glutathion i vandige ekstrakter af kava, men ikke i organiske ekstrakter. Eventuelle reaktive stoffer, der måtte ekstraheres i vand, vil derfor kunne "afgiftes" ved at reagere med co-ekstraheret glutathion.

Mistanke til organiske ekstrakter

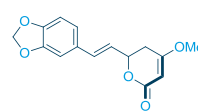
Vi har undersøgt forskellige vandige og organiske ekstrakter af kava, og ved hjælp af væskechromatografi og massespektrometri (LC-MS/MS) har vi påvist konjugater mellem flavokavainere og glutathion, hvor de to stoffer er gået i forbindelse med hinanden. Dette bekræfter, at flavokavainerne er reaktive, i hvert fald i laboratorieforsøg.

Konjugaterne mellem flavokavainere og glutathion blev påvist i tre forskellige organiske ekstrakter, mens der ikke blev fundet konjugater mellem kavalaktoner og glutathion. Mængden af flavokavainere, der blev ekstraheret i vand, var forsvindende lille sammenlignet med mængden i et organisk ekstrakt. Vores forsøg bekræfter desuden, at flavokavainerne i vandige opløsninger nedbrydes til ikke-reaktive forbindelser med en hastighed, som er signifikant hurtigere end i or-

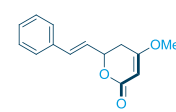
KAVALAKTONER



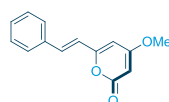
Yangonin
Molecular Weight: 258.27



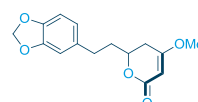
Methysticin
Molecular Weight: 274.27



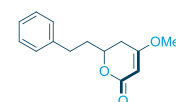
Kavain
Molecular Weight: 230.26



Desmethoxyyangonin
Molecular Weight: 228.24

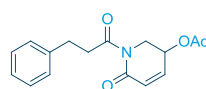


7,8-Dihydromethysticin
Molecular Weight: 276.28

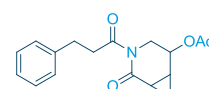


7,8-Dihydrokavain
Molecular Weight: 232.28

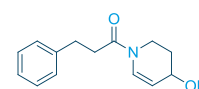
KAVA-ALKALOIDER



Pipermethystine
Molecular Weight: 287.31

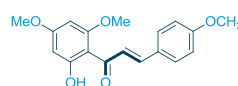


3,4-epoxy-5,6-pipermethystine
Molecular Weight: 303.31

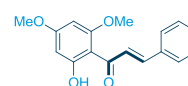


Awainine
Molecular Weight: 231.29

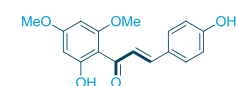
FLAVOKAVAINER



Flavokavain A
Molecular Weight: 314.33

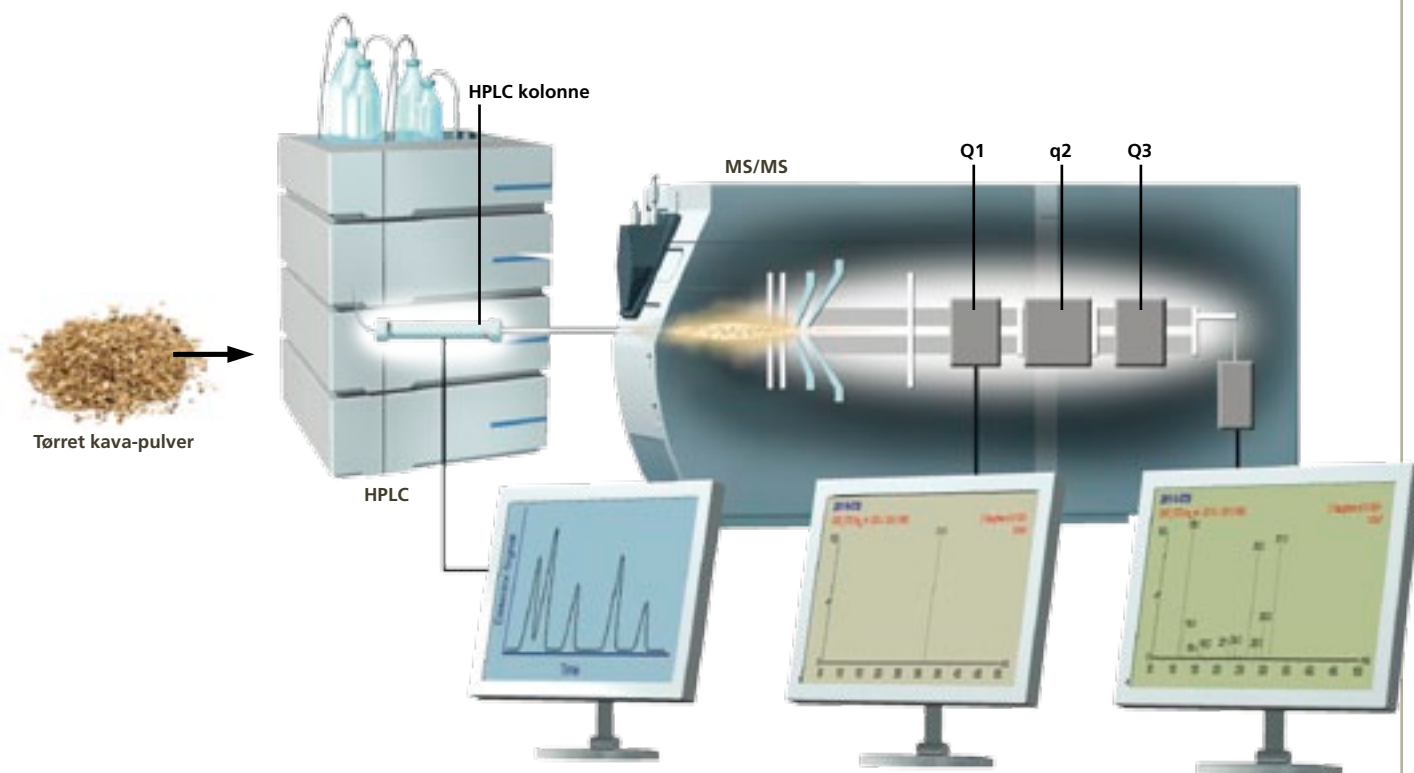


Flavokavain B
Molecular Weight: 284.31



Flavokavain C
Molecular Weight: 300.31

De vigtigste indholdsstoffer i kava er kavalaktoner, alkaloider og flavokavainere. Både laktoner og flavokavainere indeholder en såkaldt α,β -umættet keton (tegnat med fede linier). Dette strukturelle element er potentielt kemisk reaktivt. Reaktive kemiske forbindelser kan være årsagen til de sjældne tilfælde af levertoksicitet, som er observeret i Vesten. Her fremstilles kavaekstrakt ved brug af organiske opløsningsmidler, og sådanne ekstrakter indeholder bl.a. flavokavainere i langt større mængder end i de traditionelle drikke på Stillehavsøerne, hvor kava ekstraheres i vand.



SÅDAN ANALYSERES INDHOLDSTOFFER I EKSTRAKTER

Indholdsstofferne i traditionelle og vestlige kavaekstrakter blev analyseret via en kombination af væskrokromatografi og massespektrometri, som kaldes LC-MS/MS. Først adskilles de forskellige stoffer i ekstrakterne ved hjælp af højtryksvæskrokromatografi (HPLC). Derefter fordampes opløsningsmidlet, og indholdsstofferne ioniseres ved at påføre dem en spænding, hvorpå de sendes ind i massespektrometret.

Ioner med et specifikt masse-ladningsforhold kan nu isoleres i massespektrometrets første kammer. I det andet kammer slås ionerne i stykker til mindre fragmenter, og i det tredje kammer kan specifikke fragmenter isoleres.

Teknikken er velegnet til at detektere konjugater, fordi man i det første kammer kan isolere ioner med et masse-ladningsforhold, som svarer til summen af de stoffer, som tilsammen udgør et givet konjugat. Efter fragmenteringen i det andet kammer kan man bestemme masse-ladningsforholdet af udgangsstofferne i det tredje kammer og derigennem vise, hvilke stoffer konjugatet blev dannet af.

Metoden kan også anvendes til at søge efter konjugater i en prøve. Hvis man fx forventer, at et stof reagerer med glutathion, kan man bruge et fragment fra glutathion til at lede efter større forbindelser, som indeholder dette fragment.

ganiske opløsningsmidler. I organiske solventer var flavokavainerne stabile over en periode på mere end 8 timer. Disse opdagelser tyder på, at flavokavainerne kan være involveret i leverskader, samt forklare årsagen til, at der ikke ses en øget forekomst af leverskader på Stillehavsøer, hvor brugen af kava er udbredt. Ved den traditionelle fremstilling af de ceremonielle drikke vil flavokavainerne blive ekstraheret i meget mindre mængde, og den andel, som ekstraheres, vil blive

nedbrudt i løbet af relativ kort tid.

Selvom man skulle synes, at mysteriet om kavas toksicitet nu er løst, så mangler der naturligvis yderligere studier af flavokavainerne for at bekræfte vores teori. I praksis er det dog næsten umuligt at fastslå med absolut sikkerhed, at flavokavainerne er skyld i de få tilfælde af levertoksicitet ved indtagelse af kavaekstrakter, man har observeret i de vestlige lande – netop fordi så få personer rammes.

*Cand.pharm. Line Olsen er research scientist i EntomoPharm
Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Claus Cornett er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Christian Skonberg er research scientist i ADME-afdelingen på Novo Nordisk, Måløv*



Uklare retningslinjer om D-vitamintilskud til etniske minoriteter

D-vitaminmangel er udbredt i den danske befolkning, og visse etniske minoriteter har en forøget risiko for at mangle vitaminet. Men hvilke minoriteter? I forskellige officielle vejledninger defineres etniske minoriteter forskelligt og upræcist, hvilket gør det svært at vurdere, om en person med minoritetsbaggrund er i særlig risiko. Det kan medføre, at anbefalingen om D-vitamintilskud ikke gives til netop de mennesker, som har forøget risiko for D-vitaminmangel.

Af Anna Mygind, Janine Morgall Traulsen og Lotte Stig Nørgaard

D-vitamin fremmer optagelsen af calcium og fosfat fra tarmen og øger aflejringen af de to mineraler i knogler og tænder. Desuden bruger vores immunforsvar vitaminet i bekæmpelsen af sygdomsfremkaldende organismer. D-vitamin optages gennem kosten eller dannes via sollys på huden, og på vore breddegrader er den naturlige tilførsel af D-vitamin ofte utilstrækkelig i de mørke vintermåneder. Derfor har op imod halvdelen af den danske befolkning D-vitaminmangel, hvilket kan forårsage engelsk syge, hvor knoglerne bliver "bløde", samt knogleskørhed. For nylig er mangel på D-vitamin også blevet kædet sammen med øget risiko for depression, svækkelse af immunforsvaret, hjerte-kar-sygdomme og kræft.

Forskellige grupper i befolkningen har en særlig risiko for D-vitaminmangel. Det gælder fx for gravide, da behovet for D-vitamin øges under graviditet. Også ældre udgør en risikogruppe, fordi de ofte opholder sig mindre ude i sollyset, og fordi omdannelsen til den aktive form af D-vitamin i nyrerne mindses med alderen. Desuden nævnes etniske minoriteter ofte som en risikogruppe. Men hvad mener sundhedsmyndighederne egentlig, når man taler om etniske minoriteter i denne sammenhæng? Det satte vi os for at undersøge. Undersøgelsen fokuserede på, hvordan etniske minoriteter bliver defineret i danske retningslinjer som risikogruppe for D-vitaminmangel. Vi fandt frem til ti officielle dokumenter, som alle handlede om dette. Dokumenterne var udgivet

af styrelser, regioner, hospitaler og faglige organisationer, og et enkelt dokument var skrevet af en praktiserende læge. Vi sammenlignede de forskellige dokumenters definitioner af etniske minoriteter og forklaringer på den øgede risiko, og resultatet var højst overraskende. Der var nemlig otte forskellige definitioner på etniske minoriteter, og en del af definitionerne var temmelig upræcise.



FAKTA OM D-VITAMIN

Definition på D-vitaminmangel

Grænserne for, hvornår koncentrationen af D-vitamin er for lav, er løbende til debat. I øjeblikket benyttes nedenstående grænser:

- Svær D-vitaminmangel: < 12 nmol/L
- D-vitaminmangel: 12 - 25 nmol/L
- D-vitamininsufficiens: 25 - 50 nmol/L

Ved en plasmakoncentration på 50 - 200 nmol/L vurderes D-vitaminiveauet at være optimalt.

Hvordan måles D-vitaminmangel?

D-vitaminmangel konstateres på baggrund af en blodprøve. Her måles koncentrationen af den form for D-vitamin, der kaldes 25-OH-vitamin D. Analysen af blodprøven er relativt dyr, så der skal være en særlig grund til at få foretaget en blodprøve.

Behandling for D-vitaminmangel

Behandlingen varierer alt efter, hvor lavt D-vitaminiveau man har. Ofte er et tilskud i form af tabletter tilstrækkeligt. Desuden kan øget indtag af fisk, æg og anden D-vitaminholdig mad hjælpe til et højere niveau. Det anbefales generelt ikke at øge solbadningen, selvom man så kan optage mere D-vitamin via sollyset. Det skyldes risiko for hudkræft. Ved svær D-vitaminmangel kan man få større mængder D-vitamin som intramuskulære indsprøjtninger.



Den mørke vinter i Danmark medfører risiko for D-vitaminmangel hos hele befolkningen, men nogle etniske minoriteter er særligt udsatte.

Hvem er i risiko og hvorfor?

Gennem analysen fandt vi frem til de temaer, som indgik i definitionerne i hvert enkelt dokument og sammenlignede temaerne på tværs af dokumenterne. Langt de fleste dokumenter indeholdt temaerne hudfarve og tildækning. Der var altså bred enighed om, at mennesker, som har mørk hudfarve og/eller går tildækket, var i risiko for at få D-vitaminmangel.

Men her stopper enigheden. Nogle dokumenter holdt sig udelukkende til hudfarve og tildækning, mens andre vurderede, at det var en risikofaktor at være muslim uden at præcisere, om risikoen gjaldt for alle muslimer, eller kun folk, der bærer tørklæde eller har særlige madvaner, som må formodes at øge risikoen for D-vitaminmangel. I andre dokumenter stod der, at indvandrere var i risiko for at mangle D-vitamin, uden at det blev specificeret, hvad der mentes med at være indvandrer. Gjaldt det fx svenskere og tyskere eller kun folk fra fjernere dele af verden? Andre dokumenter vurderede, at indvandrere fra bestemte områder har en særlig risiko, men der var stor uenighed om, hvilke områder der var tale om. I dokumenterne var der også forskelle på, om begge køn og alle aldersgrupper blev anset som værende i risiko, eller om dette kun eller særligt gjaldt kvinder og børn.

Et par af dokumenterne kom ind på teorien om evolution. Den går ud på, at mennesket gennem genetisk selektion tilpasser sig livsvilkårene der, hvor man lever – en proces, som foregår over adskillige generationer. Argumentet i dokumenterne var, at mennesker med lys hudfarve har tilpasset sig den begrænsede mængde sollys her nordpå ved, at der meget langsomt er sket en genmutation, så hudpigmenteringen er ændret. Derved kan D-vitamin lettere optages via solens stråler. Tilsvarende har de lyshudede danskere tilpasset sig

kulturelt ved ikke at dække huden så meget med tøj, lød argumentet. De fleste indvandrergupper i Danmark har imidlertid boet her i alt for få generationer, til at genetiske mutationer vil slå igennem. I dokumenterne er dette et argument for, at livsstilsændringer er nødvendige for at opretholde et tilstrækkeligt D-vitaminiveau.

En anden udfordring er tde emmelig upræcise definitioner af risikogrupperne. Fx udpeger nogle af dokumenterne "islamske kvindelige førstegenerationsindvandrere fra Nære Orient, Asien og Somalia" og "andengenerationsindvandrere, der bevarer forældrenes levevis" som særlige risikogrupper. Et andet sted stod der, at "indvandrere defineres som indvandrere, der genetisk og livsstilmæssigt er tilpasset et solrigt klima". I de to første eksempler er det uklart, hvad det vil sige at være islamsk eller fra den Nære Orient, eller hvilken levevis, det er risikabelt at bevare fra sine forældre. Hvad det vil sige at være genetisk og livsstilmæssigt tilpasset et solrigt klima, er heller ikke klart.

Indvandring fra fjernere egne er nyt

Hvorfor er der så forskellige og upræcise definitioner af hvilke etniske minoriteter, der har risiko for D-vitaminmangel? Det kan der være flere årsager til. For det første har indvandring fra fjernere egne af verden i større omfang kun fundet sted gennem kort tid i Danmark. Det er derfor en forholdsvis ny ting at forholde sig til etnicitet og migration – også i sundhedsvæsnet.

For det andet er etnicitet en svær kategori at afgrænse. Der er en tendens til at tænke etnicitet som en fast og mere eller mindre biologisk kategori som køn og alder, men i virkeligheden er det ofte en social kategori. Det indebærer, at det samme menneske kan både tilhøre og ikke tilhøre

kategorien, alt efter øjnene der ser. Derfor er der ingen fast definition af etnicitet, som man kan læne sig opad, når sundhedsmyndighederne skal udarbejde retningslinjer om D-vitamintilskud. Det hele kompliceres yderligere af, at D-vitaminstatus er påvirket af både genetiske faktorer, fx hudpigmentering, og adfærd, fx kost og hvordan man klæder sig.

Men kan styrelser, regioner og hospitaler ikke bare kigge på forskningen om forskellige befolkningsgruppers D-vitaminstatus, når de udarbejder retningslinjerne? Jo, og det gør man også. Men også her er definitionerne upræcise. Fx har nogle videnskabelige undersøgelser målt D-vitaminsniveauer blandt "tildækkede arabiske kvinder" og "pakistanske indvandrere og efterkommere" uden nærmere at definere, hvad det vil sige at være "arabisk" eller "pakistansk efterkommer". I undersøgelserne sammenlignes deltageres D-vitaminsniveau med niveauet hos "etniske danskere", men ofte er det heller ikke klart, hvem det præcist er.

Udfordring for rådgivningen

Rådgivning om D-vitamin foregår i flere dele af sundhedsvæsenet, fx hos egen læge, på hospitalet og på apoteket. Her skal de sundhedsprofessionelle foretage konkrete vurderinger af, om en person bør vurderes at være i risiko for D-vitaminmangel.

En blodprøve kan vise, om en person lider af D-vitaminmangel, men undersøgelsen er dyr, så den sundhedsprofessionelle er nødt til først at vurdere, om den pågældende person er i særlig risiko eller ej. Denne vurdering baseres bl.a. på retningslinjer fra sundhedsmyndighederne, og når definitionerne på de sårbare etniske minoriteter i disse retningslinjer er så forskelligartede og uklare, som vores undersøgelser viser, vanskeliggøres vurderingen af, hvorvidt en person bør tage ekstra D-vitamintilskud eller ej. Dermed risikerer vi, at rådgivningen ikke bliver givet til de mennesker, der reelt er i risikogruppen, hvorved D-vitaminmangel ikke bliver forebygget hos de pågældende mennesker. Det kan føre til sygdomme, som ellers kunne være undgået, men der findes i dag ingen videnskabelige undersøgelser af, hvor omfattende problemet er.

De danske retningslinjer kan sandsynligvis blive mere entydige og klare til gavn for udsatte etniske minoriteter, hvis vi bliver bedre til at afgrænse og definere, hvilke etniske minoriteter, som er særligt udsatte for D-vitaminmangel. Et godt sted at starte vil være ved at skabe klare definitioner i den epidemiologiske forskning, som sundhedsmyndighederne derefter vil kunne læne sig opad, når de skal udarbejde retningslinjer. Derved vil vi også kunne blive klogere på, hvor stor rolle de genetiske, adfærdsmæssige og socioøkonomiske forhold spiller for vores D-vitaminstatus.

	Hudfarve	Tildækning og islam		Andre traditioner	Indvandring		Køn og alder		Evolution
	Mørk hudfarve	Tildækning	Islam	Andre traditioner	Fra bestemte områder	Fra uspecificerede områder	Især kvinder	Kvinder og børn	Genetisk og kulturel evolution
1	✓		✓	✓		✓		✓	
2	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
3	✓	✓							
4	✓	✓						✓	
5	✓	✓	✓	✓		✓	✓		
6	✓	✓		✓			✓		✓
7	✓	✓		✓	✓		✓		
8	✓	✓							
9		✓			✓		✓		
10	✓	✓	✓						

Hvilke etniske minoriteter har forøget risiko for mangel på D-vitamin? Ti officielle dokumenter påpeger næsten samstemmende, at mørk hud og tildækning øger risikoen. Men der er uenighed om, hvad der ellers karakteriserer etniske grupper med særlig risiko.

Cand.scient.san.publ. Anna Mygind er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
 Fil.dr. Janine Morgall Traulsen er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
 Ph.d. Lotte Stig Nørgaard er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi



Farmaceut i krydsfeltet mellem hospital og læge

Mangel på kommunikation mellem hospitaler, praktiserende læger og hjemmeplejen kan føre til forkert medicinering, dårlig behandling og unødvendige bivirkninger. En farmaceutisk gennemgang af patientens medicinforbrug kan afhjælpe lægemiddelrelaterede problemer, der opstår som følge af tværsektoriel behandling.

Af Christine Tilsted Villesen, Jette Højsted og Lona Louring Christrup

En 80-årig mand kommer ind på Tværfagligt Smertecenter på Rigshospitalet med en pose lægemidler. Han har tid hos farmaceuten til en gennemgang af hans medicin. Forinden har farmaceuten kontaktet hans praktiserende læge og modtaget mandens medicinliste, orienteret sig på internettet i den Personlige Elektroniske Medicinprofil, hvor udlevering af receptpligtig medicin registreres, samt i det Elektroniske Patient Medicineringsmodul, som er sygehusets database over ordineret medicin. Manden fortæller, at han har kroniske smerter i venstre skulder, forhøjet blodtryk og lider af migræne engang imellem. Desuden bruger han en håndkøbscreme mod svamp i knæhaser og skridt. På et spørgsmål om, hvorvidt han er allergisk overfor noget, fortæller han, at han klør overalt og har gjort det i ni måneder. Hans læge har ordineret medicin mod nældefeber, men det kunne ikke afhjælpe kløen. I stedet blev han henvist til en dermatolog, som har ordineret Betnovat, et stærkt virkende præparat til behandling af alvorlig eksem. Det hjælper lidt, men kløen er ikke væk. Manden startede i Tværfagligt Smertecenter for ni

måneder siden og blev sat i behandling med Gabapentin for smerter i skulderen. En hyppig bivirkning af dette lægemiddel er udslæt, og sammenfaldet mellem ordinationstidspunktet og starten på den utålelige kløe er påfaldende. Manden har ikke talt med smertelægen om kløen. "Det er jo mine smerter, jeg er her for".

Efter samtalen kontakter farmaceuten lægen i Tværfagligt Smertecenter, som får et resume af samtalen, og farmaceuten sender samtidig et brev til mandens praktiserende læge med en fuldstændig medicinliste samt information om, at behandlingen med Gabapentin ophører på grund af bivirkningerne, plus en anmodning til lægen om at overvåge, om der fortsat er behov for Betnovat mod kløen og det anvendte lægemiddel mod svamp.

Historien er en ud af mange, som farmaceuten på Tværfagligt Smertecenter oplever, og et eksempel på et lægemiddelrelateret problem, der opstår som følge af tværsektoriel behandling. Patienten kontaktede flere sundhedsprofessionelle med sine symptomer, men deres manglende overblik over hans medicinering resulterede i symptombehandling af bivirkningerne af Gabapentin med tre lægemidler.

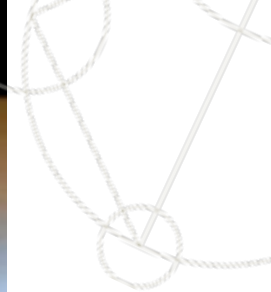
Tabt information ved tværsektoriel behandling

Det danske sundhedsvæsen er opdelt i en primær sektor, som omfatter læger, hjemmepleje og apotek, og en sekundær sektor, som er hospitalerne. I løbet af et liv involveres flere og flere aktører fra sundhedsvæsenet i medicinsk behandling af en person i takt med, at vi bliver ældre og får skavanker. Men desværre resulterer dårlig koordinering og kommunikation mellem sektorer og aktører ofte i uoverens-

BEHANDLING PÅ TVÆRFAGLIGT SMERTECENTER

Tværfagligt Smertecenter modtager patienter med komplekse kroniske smertetilstande såsom rygsmerter, nervesmerter på grund af operationer, skader eller sygdomme i nervesystemet, fibromyalgi, piskesmældslæsioner og smerter efter overståede kræftsygdomme. Med den stigende levealder og de forbedrede behandlinger af kræft henvises en stigende del af den ældre befolkning til vurdering og behandling i centret.

Patienten behandles kun for sin kroniske smertetilstand og ikke for andre fysiske sygdomme, men den farmakologiske smertebehandling kombineres med psykologisk og social rådgivning. I forløbet, som kan være langvarigt, sker der løbende medicinjusteringer, som kommunikerer til egen læge, hjemmepleje og plejehjem, eller til apoteket, hvis patienten modtager dosispakket medicin.



Ældre og kroniske patienter bruger ofte mange slags medicin, som ikke altid er fornuftigt afstemt efter hinanden. Ved en farmaceutisk gennemgang på Tværfagligt Smertecenter på Rigshospitalet gennemgås patientens samlede medicinforbrug. Herved opdager farmaceuten i gennemsnit fire lægemiddelrelaterede problemer pr. patient.

stemmelser mellem de forskellige medicinlister, hvilket kan medføre lægemiddelrelaterede problemer.

For patienterne er den tværsektorielle problemstilling ligegyldig. De forventer, at lægen, hjemmeplejeren, apoteket eller hospitalet har det samlede overblik uanset sektor, og mange udtrykker overraskelse over, at alle medicinoplysninger ikke umiddelbart er tilgængelige. Hver gang en patient flytter fra en aktør til en anden, er der behov for en fuldstændig og opdateret medicinliste. Men processen med at identificere den korrekte opgørelse over patientens aktuelle medicinforbrug, som inkluderer lægemiddelnavn, dosering, frekvens og administrationsvej og dertil redegørelser for forskelle mellem ny og tidligere medicinlister, er tidskrævende og udføres sjældent systematiseret og fuldt ud.

På Rigshospitalets Tværfaglige Smertecenter har man i samarbejde med Institut for Farmakologi og Farmakoterapi og Region Hovedstadens Apotek igangsat en undersøgelse af forekomsten og den kliniske relevans af lægemiddelrelaterede problemer hos ældre kroniske smertepatienter med komplicerede lidelser, der behandles tværsektorielt, samt om interventionen medfører ændringer i ordination i både den primære og den sekundære sektor.

Den ældre befolkning har ofte multiple lidelser, der kræver farmakologisk behandling med flere typer og kombinationer

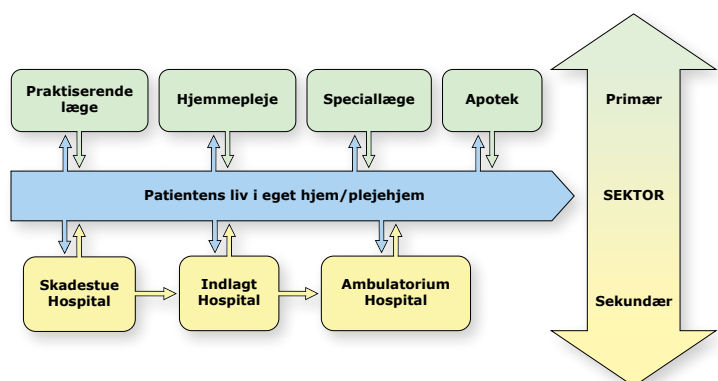
af lægemidler, hvorfor de ældre benytter flere aktører i sundhedsvæsenet. I projektet kortlægges farmaceuten patientens aktuelle medicinering, inklusive recept, håndkøb og naturmedicin. Det sker ved at afstemme medicinoplysninger via journal, apotekets og hospitalernes elektroniske registre, egen læge, hjemmepleje og patient. Gennemgangen omfatter en patientsamtale, som kan identificere patientens egen oplevelse af lægemiddelrelaterede problemer. Farmaceuten bliver således et bindeled med fokus på medicin mellem patienten og de forskellige aktører i det tværsektorielle system.

Medicingennemgang afslører problemer

En medicingennemgang kan foretages på forskellige niveauer. For eksempel kan man foretage en systematisk teknisk medicingennemgang, hvor farmaceuten gennemgår de skriftlige kilder og identificerer uhensigtsmæssige ordinationer, der inkluderer vurdering af dosering, doseringstidspunkt, administrationsvej, dobbeltdoseringer, interaktioner og rationale i lægemiddelvalg. Dette kan være optimalt for svært syge eller kognitive svage patienter, hvor samtale ikke er mulig.

En anden tilgang er en systematisk klinisk medicingennemgang, der udover ovenstående omfatter en afklaring af patientens ønsker og behov. Denne metode giver det mest

Mange aktører er involveret i den ældre patients medicinering, og hver aktør repræsenterer potentielle medicinjusteringer, som skal kommunikeres til de øvrige aktører. I dag findes der ikke et IT-system, der samler medicinjusteringerne, men forhåbentlig løses problemet via det fælles medicinkort, som ventes lanceret sidst i 2011.





HVAD ER LÆGEMIDDELRELATEREDE PROBLEMER?

Et lægemiddelrelateret problem er en uønsket situation, som patienten oplever, der skyldes eller mistænkes at skyldes medicinsk behandling, og som indebærer eller muligvis indebærer problemer for det ønskede resultat af behandlingen.

Et eksempel kan være, at patienten anvender et lægemiddel u hensigtsmæssigt uden at vide det, som illustreret i denne samtale.

Patient: "Jeg er så tør i halsen. Jeg er bange for, at der en dag sætter sig noget fast i halsen som jeg ikke kan skylle væk". **Farmaceut:** "Tager du medicinen med et stort glas vand?" **Patient:** "Ja, men jeg deler altid tabletterne, så er de nemmere at sluge."

Farmaceut: "Panodil TMU 665 mg må du ikke dele, fordi tabletten er designet til at virke længere end en almindelig Panodil. Derfor får du tabletten tre gange dagligt i stedet for fire. Når du deler tabletten, mister du den forlængede virkning." **Patient:** "Nå, så er det måske derfor, jeg får flere smerter inden næste dosering?" **Farmaceut:** "Formodentlig, jeg kontakter lægen og foreslår, at du i stedet får ordineret almindelig Panodil, som du kan dele eller knuse. Det vil dog kræve, at du skal tage tabletterne fire gange dagligt i stedet for tre. Vil du det?" **Patient:** "Ja, hvis det kan lindre mine smerter."

Oplyst via:	Medicin:
EPM/PEM	Kapsler Gabapentin 400 mg x 3 mod smerter
EPM/PEM	Tablet med modificeret udløsning Panodil 1330 mg x 3 mod smerter
EPM/PEM	Depottablet Tradolan Retard 100 mg x 4 mod smerter
EPM/PEM	Depotkapsel Gemadol Retard 50 mg x 2 mod smerter
Egen læge/PEM	Tablet Lisinopril/hydroklorthiazid 20/25 mg x 1 for blodtrykket
Egen læge/PEM	Tablet Levocetirizin 5 mg x 1 mod nældefeber
Speciallæge/PEM	Kutan opløsning Betnovat 1 mg/ml mod eksem ved behov
Egen læge/PEM	Smeltetablet Oriptan 50 mg mod migræne ved behov
Patient	Creme Canesten 1 % mod svamp ved behov

Tabellen viser en 80-årig mands medicinforbrug inden samtalen med farmaceuten på Tværfagligt Smertecenter på Rigshospitalet. PEM = Personlige Elektroniske Medicinprofil, hvor udlevering af receptpligtig medicin registreres. EPM = Elektroniske Patient Medicineringsmodul, som er sygehusets database over ordineret medicin.

retvisende resultat, når patienten inddrages via samtaler, eftersom patientens perspektiv kan og vil være et andet end den sundhedsprofessionelles. For eksempel vil en utilsigtet interaktion mellem to lægemidler ikke være et lægemiddelrelateret problem af klinisk relevans, hvis patienten af en eller anden årsag er stoppet med at tage et af lægemidlerne på trods af, at det er ordineret og registreret i det Elektroniske Patient Modul samt købt på apoteket og registreret i den Personlige Elektroniske Medicineringsprofil.

De foreløbige resultater af vores undersøgelse viser, at farmaceuten finder uoverensstemmelser mellem de forskellige registreringer af de ældre smertepatienters aktuelle medicin især vedrørende præparat, doser, doseringstidspunkter og dobbeltordinationer. Når uoverensstemmelserne er klarlagt, påviser medicingennemgangen gennemsnitligt fire lægemiddelrelaterede problemer pr. patient, som typisk omfatter problemer med uhensigtsmæssig anvendelse af lægemidler hos patienten, bivirkninger, medicinering uden begrundet indikation og uhensigtsmæssigt præparatvalg. De foreløbige resultater viser, at farmaceuten er med til at ændre ordinationer både i den primære og sekundære sektor, og at patienten får en øget viden om virkning og korrekt håndtering af sin medicin.

Fremadrettede udfordringer

Farmaceutisk omsorg via en patientspecifik medicingennemgang er ikke daglig praksis, og man møder flere barrierer. Især er det tidskrævende for den kliniske farmaceut at få adgang til den Personlige Elektroniske Medicinprofil, samt at opnå adgang til laboratoriedata og journaloplysninger, som er afgørende for kvaliteten af medicingennemgangen. En samlet gennemgang tager to timer i gennemsnit, hvoraf pa-

tientsamtalen typisk varer en halv til en hel time. Patienterne skal også vænne sig til, at en ny faggruppe har en rolle i deres medicinske behandling, som rækker ud over udlevering af lægemidler på apoteket.

I januar 2011 lancerede de danske regioner en medicinpolitik som foreslår, at alle ældre medicinske patienter eller kronikere, som får seks typer medicin eller mere, skal have tilbudt medicingennemgang ved udskrivelse fra sygehus eller en gang årligt ved praktiserende læge. Det er den praktiserende læge, som har ansvaret for patientens totale medicinering, hvilket umiddelbart er rationelt, da den praktiserende læge er patientens gennemgående sundhedsfaglige kontaktperson livet igennem. I dette projekt er det imidlertid farmaceuten på et ambulatorium på et sygehus, som har ansvaret at gennemføre medicingennemgangen, og erfaringerne kan danne baggrund for at optimere behandlingen af patienten på tværs af sektorerne og dertil spare ressourcer for lægen. Der er allerede mange tiltag for at lukke kløften i det tværsektorielle behandlingssystem. Det fælles medicinkort lanceres snart, der er forsøg med "følge med hjem" teams i forbindelse med udskrivelse af svage ældre patienter, og der foretages datafangst i regionerne, så den enkelte praktiserende læge kan identificere patienter, hvor det er hensigtsmæssigt at udføre medicingennemgang. Men der er ikke nogen entydig model for en systematisk medicingennemgang på tværs af sektorerne. Det kan være fordelagtigt at udvikle en model for systematisk medicingennemgang, som er brugbar og tidsbesparende for alle aktører i patientens medicinske behandling samt at definere farmaceutens rolle i en sådan model. Hvordan kan farmaceuten arbejde på tværs? Projektet "Lægemiddelrelaterede problemer som følge af tværsektoriel behandling" er et bud.

Cand.pharm. Christine Tilsted Villesen er videnskabelig assistent på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi og klinisk farmaceut på Region Hovedstadens Apotek
Cand.med. Jette Højsted er overlæge på Tværfagligt Smertecenter, Rigshospitalet
Ph.d. Lona Louring Christrup er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi





Forsøgsmodel skal forudsige lægemiddelstoffers samspil i kroppen

Når patienter indtager flere slags medicin, kan lægemidlerne forstærke eller svække hinanden, og begge dele kan få uønskede konsekvenser. Når effekten af et lægemiddel øges, kan der opstå bivirkninger, mens nedsat effekt kan gøre behandlingen virkningsløs. En ny forsøgsmodel skal vise, om samspillet mellem lægemiddelstoffer og kroppens egne stoffer kan bruges til at forudsige lægemidlers indbyrdes vekselvirkninger.

*Af Anne Sophie Grandvuinet, Henrik Tang Vestergaard,
Nicolas Rapin og Bente Steffansen*

Det sker ofte, at især ældre patienter og kronisk syge har behov for at indtage flere forskellige lægemidler samtidigt. Det vil sædvanligvis være i form af tabletter, hvorfra lægemiddelstofferne skal optages i kroppen via tarmsystemet. Når en patient bruger flere slags medicin, er der nogle gange risiko for, at de forskellige lægemidler enten forstærker eller formindsker hinandens effekt.

Sådanne vekselvirkninger mellem lægemidler kaldes lægemiddelinteraktioner, og de kan bl.a. indtræffe, hvis lægemiddelstofferne konkurrerer om transportører, som er placeret i cellemembranerne på cellerne i tarmvæggen, i leveren og i andre organer. Membrantransportørerne er selektive porte, som gør det muligt for nogle stoffer at bevæge sig fra den ene side af membranen til den anden. Sådanne transportører i tarmvæggen sørger for, at nogle lægemiddelstoffer føres fra tarmen via leveren ind i det systemiske blodkredsløb, hvorved de kan udøve deres terapeutiske virkning. Lægemidlers konkurrence om membrantransportører i tarmen kan fx føre til, at der kommer mindre lægemiddelstof ind i blodet end beregnet, så behandlingen ikke virker.

Vejen gennem tarme og lever

For at et lægemiddelstof kan udøve en terapeutisk effekt, skal det nå fra tarmvæsken og frem til virkningsstedet via leveren og det systemiske blodkredsløb (se ill. side 41). Lægemiddelstoffet skal således frigives fra tabletten, opløses i tarmvæsken og efterfølgende transporteres over tarmvæggen til blodet i den store portalvene, som transporterer lægemiddelstoffet hen til leveren. I levercellerne kan lægemiddelstoffet blive nedbrudt, sendt videre til det systemiske

blodkredsløb og/eller overført til galden. Hvis stoffet ender i galden, vil det blive returneret til tarmen, hvorfra lægemiddelstoffet eller dets nedbrydningsprodukter så udskilles med afføringen, medmindre det optages på ny over tarmvæggen. Der sidder membrantransportører både i leveren og i tarmvæggen. Transportørerne i tarmvæggen kan vende ud mod tarmvæsken eller ind mod det portale blod. I levercellerne er transportørerne placeret ud mod det portale blod, ud mod galdegangen eller i cellemembranen ind mod det systemiske blodkredsløb. Transportører i leveren kan med andre ord fragte lægemiddelstoffer til eventuel nedbrydning i levercellerne, videre til det systemiske blodkredsløb og/eller tilbage til galde og tarm afhængigt af, om kroppen anser stoffet som brugbart eller uønsket.

En lægemiddelinteraktion i tarmen eller leveren kan enten føre til en nedsat eller øget optagelse af lægemiddelstoffet. En øget optagelse af lægemiddelstoffet kan ske, hvis to stoffer er i konkurrence om at binde sig til en transportør, som returnerer stoffer til tarmen, mens en nedsat optagelse af lægemiddelstoffet sker, hvis to stoffer konkurrerer om en transportør, som sender stoffer ind i blodet. Det er især øget optag af lægemiddelstoffer, som vækker bekymring, fordi det kan føre til bivirkninger, hvilket kan være farligt for patienten. Men der er også situationer, hvor et lægemidlets effekt er livsnødvendig, og her er det afgørende, at en tilstrækkelig mængde lægemiddelstof bliver optaget i kroppen. Derfor er det vigtigt at kunne vurdere på forhånd, hvorvidt en patient vil blive udsat for en lægemiddelinteraktion, fordi det vil give lægen mulighed for at justere dosis af et eller flere lægemidler, så de rette mængder af lægemiddelstofferne når ud i blodkredsløbet, og de ønskede virkninger opnås.

Desværre er det meget svært at forudsige lægemiddelinteraktioner, som forårsages af konkurrence om membrantransportører. Det skyldes bl.a., at et lægemiddelstof ofte vil blive transporteret af flere forskellige transportører, således at der både vil ske transport til blodet og til galden og tarmen. Desuden er mange af transportørerne udtrykt i flere forskellige væv, fx både i tarmvæggen og i leveren, og endelig kan nogle stoffer blive transporteret gennem cellevæggene på andre måder.



KONKURRENCE MELLEM LÆGEMIDLER – OG ET GLAS ÆBLEJUICE

Lægemedelstoffet aliskiren, som anvendes mod forhøjet blodtryk, optages fra tarmen til det portale blod via transportøren OATP2B1. Når stoffet indtages sammen med rifampicin, som er et antibiotikum, kan der opstå en lægemiddelinteraktion.

Rifampicin, som kan blokere vejen gennem transportøren, har nemlig vist sig at halvere koncentrationen af aliskiren i det systemiske blodkredsløb, når disse lægemidler indtages sammen. Noget lignende sker, når aliskiren indtages sammen med 150 ml grapefrugtjuice eller æblejuice, hvis indholdsstoffer også genkendes af transpor-

tøren. Her reduceres koncentrationen af aliskiren i det systemiske blodkredsløb med omkring 60 procent. Der er derfor god grund til at tro, at den mindskede koncentration af aliskiren i begge tilfælde skyldes en interaktion på OATP2B1, som potentielt kan føre til en mindre effektiv blodtrykssænkende virkning. Det sidste eksempel viser desuden, at der ikke kun sker interaktioner mellem lægemidler, men også mellem lægemidler og fødevarer, hvilket illustrerer, hvor komplekst det er at forudsige interaktioner på transportører.

Interaktioner med kroppens egne stoffer

Vi udvikler nu en model baseret på dyrkede tarmceller, som kan måle, hvorvidt lægemiddelstoffer påvirker transporten af kroppens egne stoffer gennem transportører i tarmvæggen. Formålet er at bane vej for at kunne forudsige interaktioner mellem lægemiddelstoffer.

Modellen er baseret på dyrkede tarmceller, som bruges til at undersøge lægemiddelinteraktioner på membrantransportører. Cellerne dyrkes på et filter, hvor de danner en membran svarende til tarmvæggen. I forsøgene kan man måle koncentrationen af påførte stoffer ovenover cellelaget, inde i cellerne og under cellelaget. På den måde kan man undersøge, hvor meget stof, der transporteres gennem cellerne fra det ene kammer til det andet kammer. Indtil videre fokuserer vi på, hvordan forskellige lægemiddelstoffer påvirker transporten af kroppens egne stoffer (kaldet endogene stoffer), og her har vi undersøgt interaktioner mellem lægemiddelstoffer og galdehyren taurocholinsyre samt østrogenmetabolitten estrone-3-sulfat.

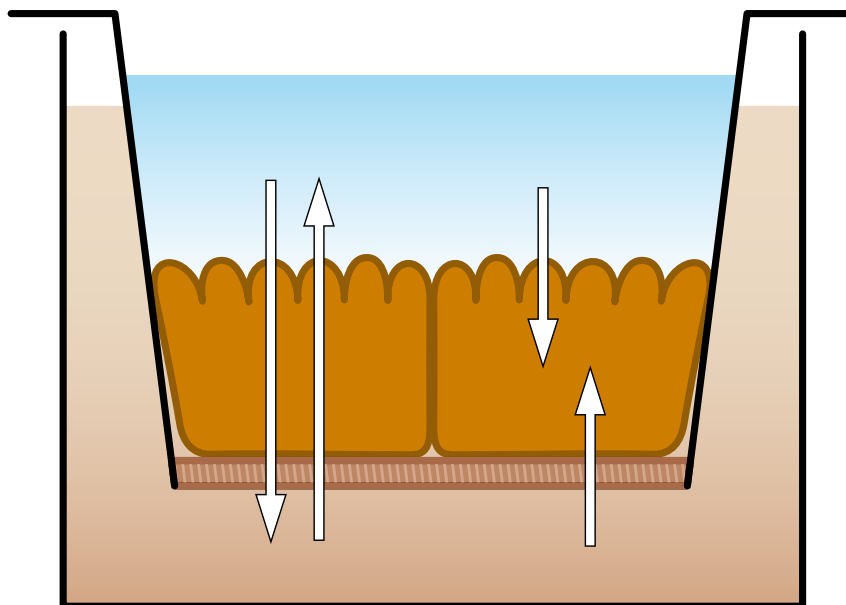
Det kolesterolsænkende lægemiddelstof fluvastatin er et eksempel på et stof, som har vist sig at påvirke transporten af begge disse stoffer, som kroppen selv danner. Fluvastatin kan altså forhindre, at andre stoffer får adgang til det systemiske blodkredsløb, såfremt disse stoffer transporteres over tarmen og leveren via de samme transportører som fluvastatin. Ligeledes er det muligt, at andre stoffer kan forhindre fluvastatin i at blive ført ind i det systemiske blodkredsløb.

Vi har valgt at arbejde med taurocholinsyre og estrone-

3-sulfat, da det er kendt, at de hver især transporteres i et samspil mellem flere centrale transportører i tarmen. Derfor giver disse to endogene stoffer mulighed for at undersøge lægemiddelinteraktioner, der opstår i et samspil mellem flere transportører. Denne tilgang, hvor samspillet mellem flere transportører undersøges samtidig, er ny og forventes at være en forbedret model til at kunne forudsige lægemiddelinteraktioner i tarmen.

Biomarkører for lægemidlers vekselvirkninger

Cellemodeller er naturligvis meget forsimplede i forhold til de processer, som afgør, hvordan et lægemiddel vil opføre sig i et levende menneske. Det er derfor altid nødvendigt i sidste ende at udføre kliniske forsøg for at afklare, om der er en reel risiko for de lægemiddelinteraktioner, som man har opdaget i celleforsøg. Men brugen af cellemodeller er nødvendig for at kunne udrede, hvilke transportører der har betydning for en interaktion mellem to eller flere lægemidler. På sigt håber vi på at kunne bruge kroppens egne stoffer som biomarkører i kliniske forsøg, så man ved måling af en række endogene stoffer vil kunne forudsige lægemiddelinteraktioner på membrantransportører direkte i menneskekroppen, hvor et kompliceret samspil mellem flere transportører finder sted. Før man når så langt, kræver det, at vi opnår et bedre overblik over de transportører, som de enkelte endogene stoffer bruger. Dette kan med fordel undersøges i cellemodeller.



I laboratiormodellen danner tarmceller en membran svarende til tarmvæggen. Modellen indeholder ligesom tarmvæggen transportører, der fungerer som porte, som kan sende lægemiddelstoffer tværs gennem membranen. Ved forsøgene indføres lægemiddelstoffer for oven eller for neden. Derefter kan man måle stoftransporten begge veje gennem membranen og bestemme stofkoncentrationen inde i tarmcellerne.

MODEL SÆTTER FOKUS PÅ CENTRALE TRANSPORTØRER

Lægemiddelstoffer i tabletter har rige muligheder for at vekselvirke med hinanden i tarmen og i leveren. Vi har udviklet en forsøgsmodel, der kan undersøge samspillet mellem vigtige membrantransportører, som ofte spiller en central rolle for sådanne lægemiddelinteraktioner.

Tarmen

I tyndtarmen kan to lægemiddelstoffer konkurrere om at binde sig til transportører i tarmvæggen, som regulerer transporten til og fra den store portalvene. Hvis det ene stof har tendens til at fortrænge det andet fra transportøren, vil transporten af det fortrængte lægemiddelstof til blodet enten blive reduceret eller forøget afhængigt af, hvilken transportretning der blokeres.

Leveren

Når lægemiddelstofferne kommer ind i det portale blod, føres de til leveren, hvorfra de kan blive sendt ind i det systemiske blodkredsløb og transporteret hen til virkningsstedet i kroppen. Alternativt kan stofferne nedbrydes i levercellerne og/eller blive ført til galdeblæren og derfra sendt tilbage til tarmen. Optagelsen til det systemiske blodkredsløb øges, hvis de to lægemiddelstoffer konkurrerer om en transportør i

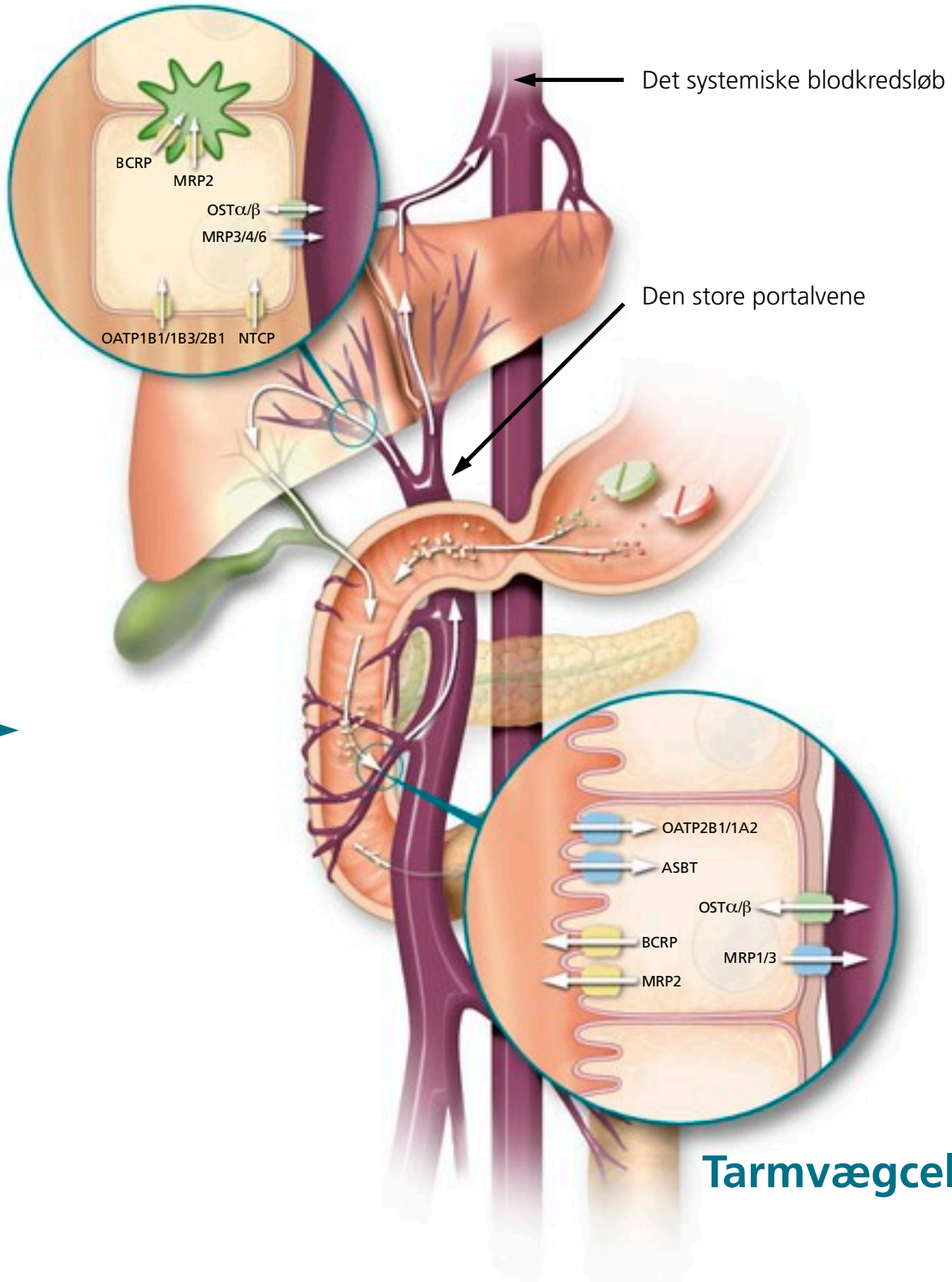
leveren, som sender stofferne ud til galden og tarmen, mens den formindskes, hvis de konkurrerer om en transportør, som åbner vejen ind til det systemiske blodkredsløb.

Modellen

De viste transportører indgår i vores model. Det er disse transportører, som vore endogene modelstoffer estrone-3-sulfat og taurocholinsyre benytter for at komme gennem cellemembranerne i tarmen og leveren. I modellen bruges de to stoffer til at måle lægemiddelstoffers evne til at blokere disse transportører for kroppens egne stoffer og for andre lægemiddelstoffer, der benytter de samme transportører. Herved kan vi undersøge lægemiddelstoffers evne til at forårsage interaktioner, som enten kan føre til, at en større eller mindre mængde lægemiddelstof når ind til det systemiske blodkredsløb, hvorfra stoffet kan udøve sin terapeutiske virkning.

De blå transportører på figuren hjælper til at videreføre endogene stoffer og lægemiddelstoffer til det systemiske kredsløb. De gule transportører sender stofferne af veje, hvor stofferne enten nedbrydes eller føres ud af kroppen, og de grønne transportører kan fungere i begge retninger – ind til det systemiske kredsløb eller ud af kroppen.

Levercelle



Cand.pharm. Anne Sophie Grandvuiet er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Henrik Tang Vestergaard er toksikolog i Sektionen for Medicin og Toksikologi, Godkendelsesafdelingen, Lægemiddelstyrelsen
Ph.d. Nicolas Rapin er postdoc på Biotech Research and Innovation Center, Københavns Universitet
Ph.d. Bente Steffansen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

Computeren forudsiger lægemidlers omdannelse i leveren

Næsten alle lægemiddelstoffer omdannes i leveren, og denne metabolisme gør stofferne mindre aktive og lettere at udskille fra kroppen. Under udvikling af nye lægemiddelstoffer er det vigtigt at forstå de egenskaber, som bestemmer, om stoffet er let eller svært at omdanne, samt hvilket nyt stof, det omdannes til. Vi har udviklet et computerprogram, som kan forudsige dannelsen af metabolitter ved omsætning af lægemiddelstoffer.

Af Patrik Rydberg og Lars Olsen

Alle lægemiddelstoffer, som indtages gennem munden, fx i tablettform, passerer gennem leveren, før stofferne kommer ud i blodet, som transporterer dem hen til deres mål i

kroppen. Leveren er en slags rensningsanlæg, der forsøger at omdanne fremmedstoffer som lægemiddelstoffer og giftstoffer til mere opløselige stoffer, som lettere kan udskilles fra leveren og fjernes fra kroppen via urin eller afføring. Stofskiftet i leveren er hovedansvarlig for, hvor meget lægemiddelstof, der kommer ud i blodet, hvilket er afgørende for at opnå den ønskede terapeutiske effekt. Der er en nedre grænse, hvorunder medicinen ikke har nogen virkning, og en øvre grænse, som typisk bestemmer, hvornår bivirkningerne indtræder. Samtidig kan en for kraftig nedbrydning af et lægemiddelstof i leveren føre til, at der dannes forskellige metabolitter, som også kan medføre bivirkninger. Derfor er det vigtigt at kunne forudsige, hvordan et nyt lægemiddelstof vil blive metaboliseret i leveren.

SÅDAN ARBEJDER LEVERENZYMERNE

Cytochrome P450-enzymene i leveren omdanner primært lægemiddelstoffer via oxidationsreaktioner.

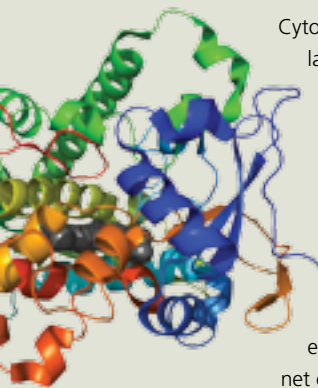
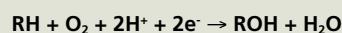
Oxidation

Når et grundstof er i ren form, vil hvert atom have lige så mange elektroner, som det har protoner, og så er oxidationstrinnet nul. Hvis en elektron afgives, stiger oxidationstrinnet med én – det kaldes en oxidation. Når en elektron optages, falder oxidationstrinnet med én – det kaldes for reduktion. Et velkendt eksempel på oxidation er, når metallisk jern rustet. Jernet oxideres fra Fe til Fe⁺³ under afgivelse af tre elektroner.

Hydroxylering

Ved oxidation i leveren bliver et oxygenatom typisk indsat i lægemiddelstoffet. Den mest almindelige reaktion bag omdannelsen er hydroxylering. En hydroxyleringsreaktion udført af et cytochrome P450-enzym involverer, at et hydrogenatom i reaktanten (R) udskiftes med en hydroxylgruppe (OH), som består af et hydrogenatom (H) og et oxygenatom (O). Til det formål har enzymet brug for molekylært oxygen, to protoner og to elektroner.

Reaktionen forløber således:



Cytochrome P450-enzymmer

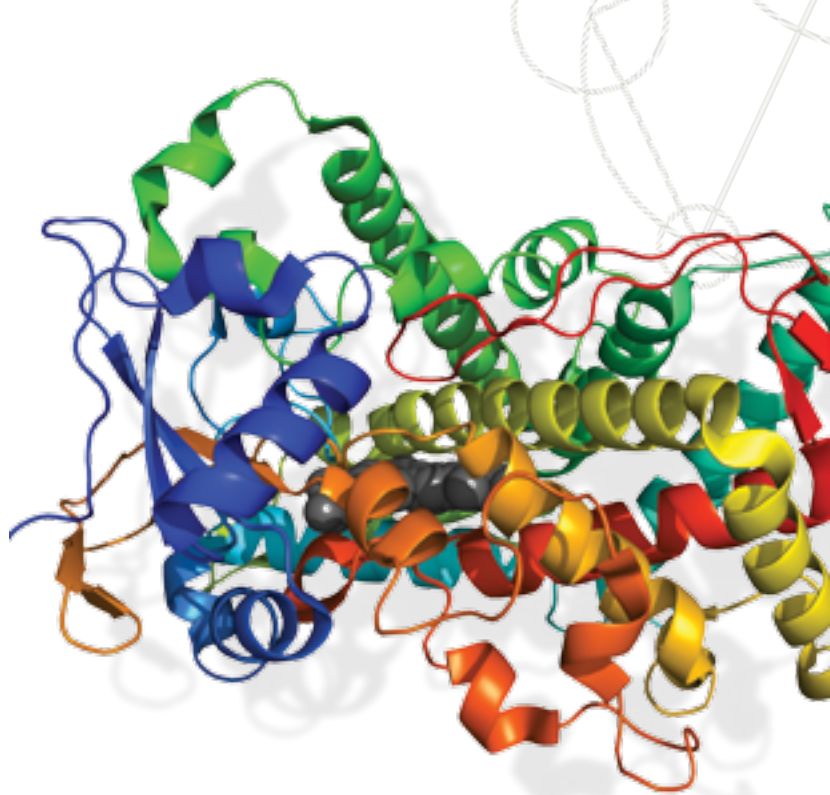
Leveren omdanner lægemiddelstoffer ved hjælp af enzymer, og blandt alle leverenzymene er den vigtigste gruppe cytochrome P450-enzymene, som metaboliserer 90 procent af alle anvendte lægemiddelstoffer. I alt kender man over 11.500 af disse enzymer fra levende organismer på Jorden, og menneskets lever danner mere end 60 medlemmer af familien. Af dem er der fire, som tager sig af 80 procent af al omdannelse af lægemiddelstoffer, mens de øvrige medlemmer omdanner 10 procent af samtlige lægemiddelstoffer. Cytochrome P450-enzymene er specielle sammenlignet med de fleste andre enzymer. Den bindingslomme, hvori lægemiddelstoffet binder sig under omdannelsen, er begravet dybt inde i enzymet, og når et lægemiddelstof skal metaboliseres, åbner enzymet sig, så stoffet kan komme ind i lommen, hvor reaktionen finder sted. I modsætning til andre enzymer, som normalt er meget specialiserede, er cytochrome P450-enzymene en slags altnuligmand. De kan omdanne næsten hvilket som helst lægemiddelstof og er hver især i stand til at udføre mange forskellige typer reaktioner, hvor andre enzymer normalt kun udfører én bestemt type reaktion.

Det er disse leverenzymers evne til at metabolisere lægemiddelstoffer, som vi har fokuseret vores forskning på i mange år. Mange af deres reaktioner er nu forstået ned til mindste detalje, men der er stadig reaktioner, hvor mekanismen endnu ikke er helt opklaret.

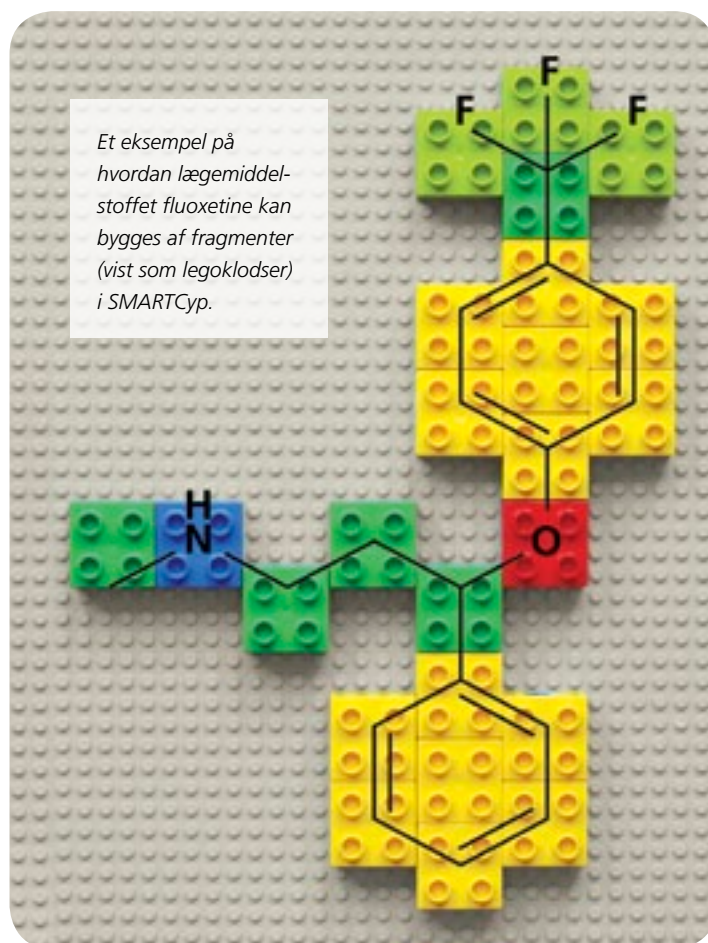
Fælles for cytochrome P450-enzymene er, at de har en hæm-gruppe, som udfører reaktionen. Gruppen er placeret i bunden af bindingslommen, og den indeholder et jernatom (Fe), som spiller sammen med et reaktivt oxygenatom. Under selve reaktionen gennemgår jernionen forskellige oxidationstilstande, og ionen har afgivet fem elektroner (Fe^{+5}), når selve reaktionen med lægemiddelstoffet udføres. Den kraftige oxidation sætter ionen i stand til at oxidere næsten alle typer stoffer.

Vi har anvendt meget præcise kvantekemiske metoder på supercomputere, som er tilgængelige på Københavns Universitet, til at studere 99 procent af alle de mulige typer reaktioner, som heme-gruppen i enzymene kan udføre. I alt har vi beregnet mere end 200 oxidationsreaktioner på fragmenter af lægemiddelstoffer, hvoraf hver enkelt beregning tager omkring to uger at udføre.

På grund af den lange beregningstid pr. reaktion, og fordi der potentielt set er op til 30 forskellige mulige reaktioner for et almindeligt lægemiddelstof, er det ikke praktisk muligt for medicinalindustrien at benytte kvantekemiske metoder til forudsigelse af, hvilke metabolitter der vil dannes af et stort antal potentielle lægemiddelstoffer. Derfor har vi brugt vores data og erfaringerne fra vores kvantekemiske beregninger på de 200 fragmenter til at udvikle SMARTCyp – et nyt softwareprogram til forudsigelse af dannelse af metabolitter ved omsætning af lægemiddelstoffer i leveren.




Figuren viser strukturen af et cytochrome P450-enzym. De sorte bolde i centrum markerer hæm-gruppen i bunden af bindingslommen, hvor oxidationsreaktionen foregår. De grønne kæder over gruppen danner en låge ind til det sted, hvor reaktionen sker. Lågen lukker sig omkring lægemiddelstoffet, når det er kommet ind i lommen og åbnes igen, når metabolitten skal sendes ud af enzymet.



KVANTEKEMI BEREGNER ATOMERS OG ELEKTRONERS BEVÆGELSER I MOLEKYLER

I kvantekemi kan man opklare komplicerede sammenhænge, der beskriver positionerne og bevægelserne af alle atomerne og elektronerne i et molekyle. Da elektronerne bevæger sig hurtigt og er meget lette i forhold til atomkernerne, påvirkes de af et kvantemekanisk fænomen, som kaldes usikkerhedsprincippet, som indebærer, at vi ikke på samme tidspunkt

kan vide, hvor elektronerne befinder sig, og med hvilken hastighed de bevæger sig. Matematisk betyder det, at vi skal løse den såkaldte Schrödingers ligning. Da ligningen er ekstremt kompleks at løse, er man nødt til at benytte meget store og hurtige computere og avanceret software til denne type studier.



The image shows a screenshot of the SMARTCyp Web Service interface. The page title is "SMARTCyp Web Service" and the current version is 1.5.3. It states that SMARTCyp predicts the sites in molecules that are most liable to cytochrome P450 mediated metabolism. There are three options for entering molecules: "Draw a molecule", "Upload a file", and "Enter SMILES". The "Draw a molecule" section shows a chemical structure editor with a toolbar and a list of elements (C, H, O, N, P, S, F, Cl, Br, I, etc.). The "Upload a file" section has a "File" button and a "Start SMARTCyp" button. The "Enter SMILES" section has a text input field and a "Start SMARTCyp" button. Below the interface, there is a citation: "If this service is useful to you, please cite P. Rydberg, S. E. Skolnik, J. Zaretski, C. Brennan and P. Rydberg, S. E. Skolnik and L. Olsen, *Bioinformatics*, 2010, 26, 2988-2989". SMARTCyp is a service from the Department of Medicinal Chemistry at the University of Copenhagen. To the right of the screenshot is a computer monitor displaying several chemical structures, including a complex molecule with a benzene ring, a nitrogen atom, and a chlorine atom, and another molecule with a benzene ring and a nitrogen atom. The monitor is on a stand.

Computerprogrammet SMARTCyp kan forudsige, hvilke metabolitter et givet lægemiddelstof omdannes til i leveren. Eksemplet viser, hvilke metabolitter, der kan dannes af lægemiddelstoffet Diazepam.

Program forudsiger metabolitter

I SMARTCyp inddeles lægemiddelstoffet i fragmenter, der ligner ét af de 200 fragmenter, som vi har regnet på kvantekemisk. Det svarer til, at molekylet er bygget op af en masse legoklodser, og at vi på forhånd har regnet på, hvordan reaktionen sker for hver klods. Det gælder med andre ord om at bygge molekylet bedst muligt med de eksisterende legoklodser.

For at bruge SMARTCyp skal man bare tegne lægemiddelstoffets molekylære struktur på vores website, og i løbet af

få sekunder giver programmet så en forudsigtelse af de sandsynlige metabolitter. Programmet har vist sig at være et af de mest pålidelige af sin art og er derudover hurtigt til at lave forudsigtelsen. SMARTCyp blev lanceret i 2010 og bruges allerede af flere store farmaceutiske virksomheder rundt om i verden. Vores metode er ydermere blevet inkluderet i flere andre software-pakker, såvel gratis som kommercielle pakker.

Du kan selv prøve SMARTCyp programmet på www.farma.ku.dk/smartcyp

Ph.d. Patrik Rydberg er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Lars Olsen er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning

Ny testmetode afslører lægemidlers bivirkninger på immunforsvaret

Det tager op til 20 år og koster milliarder af kroner at udvikle et nyt lægemiddel. Derfor er det vigtigt at opdage uacceptable bivirkninger så tidligt som muligt i udviklingsprocessen, så man ikke spilder tid og penge. En mulig bivirkning er, at et lægemiddel utilsigtet kan påvirke immunforsvaret, så det bliver hæmmet eller aktiveret. En ny test kan hjælpe med at identificere immunmodulerende lægemiddelstoffer.

Af Alex Boje, Lise Moesby, Michael Timm og Erik Wind Hansen

Udviklingen af et nyt lægemiddel er en kompliceret og risikofyldt proces, hvor blandt andet uacceptable bivirkninger kan medføre, at et ellers potentielt lægemiddelstof aldrig kommer patienterne til gode. En bivirkning kan være, at stoffet påvirker immunforsvaret uhensigtsmæssigt, så brugeren kan have sværere ved at bekæmpe en infektion. Derfor er det vigtigt, at den farmaceutiske industri har værktøjer til rådighed, som kan hjælpe med at identificere immunmodulerende lægemiddelstoffer så tidligt som muligt i udviklingsprocessen. I vores laboratorium er vi ved at udvikle et sådant værktøj.

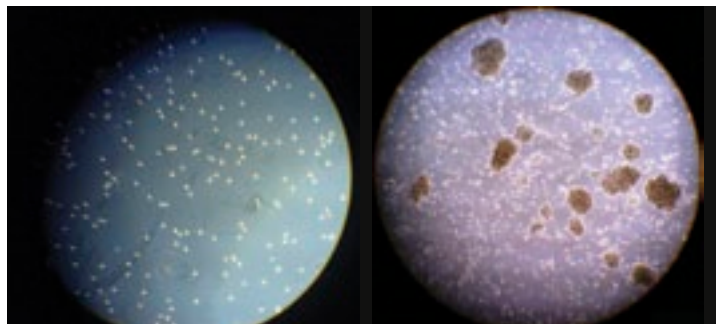
Ofte har medicin bivirkninger i større eller mindre grad, lige fra moderate gener som hovedpine til alvorlige følger som blodpropper. En del af disse bivirkninger er acceptable for brugeren, som kan lære at leve med dem og tage sine forholdsregler under behandlingen. For eksempel kan brugen af beta-blokkere, som anvendes til behandling af hjertesygdomme og mod forhøjet blodtryk medføre kolde hænder og mæredragsagtige drømme. Men det er også kendt, at beta-blokkere kan påvirke immunforsvaret. Ligeledes findes der en lang række lægemidler på markedet, som kan påvirke immunforsvaret, selv om det ikke er hensigten. Denne gruppe omfatter bl.a. morfin, antibiotika, hormoner og antidepressive lægemidler. I praksis er disse uønskede effekter på immunforsvaret dog ofte minimale for lægemidler, der allerede er godkendt af myndighederne.

DET MEDFØDTE IMMUNFORSVAR

Det medfødte immunforsvar kan ikke tilpasse sig i løbet af livet i modsætning til det adaptive immunforsvar, som hele tiden udbygges, så det kan genkende og bekæmpe mikroorganismer, man tidligere har været inficeret af.

Det medfødte immunforsvar er programmeret til at genkende mange af de mikroorganismer, vi bliver udsat for. Det er relativt hurtigtvirkende inden for et døgn og fungerer som kroppens første forsvarslinje imod infektioner. De vigtigste celler er neutrofile celler, makrofager og monocytter.

De neutrofile celler, vi anvender som model i vores testsystem, genkender bestemte komponenter fra bakterier. Det kan fx være endotoksin, som findes i cellemembranen på Gram-negative bakterier som *Salmonella* og *E. coli*. Når dette sker, vil de neutrofile celler optage bakterierne og nedbryde dem ved at producere store mængder af giftige, reaktive iltforbindelser.



Til venstre: Udifferentierede HL-60 celler, som stadig kan dele sig. Til højre: Tilsætning af A-vitaminsyre har medført, at cellerne er blevet færdigudviklede og ikke længere deler sig. De er nu en model for immunforsvarets mest talrige celler, de neutrofile celler.

Når immunforsvaret ændres

Når et lægemiddel tilsigtet eller utilsigtet hæmmer immunforsvaret, kan en infektion opleves som værre og vare i længere tid end normalt. Personer med et svækket immunforsvar har en øget risiko for at blive inficeret med bakterier, som normalt ikke vil give infektioner, fx visse bakterier fra den normale tarmflora.

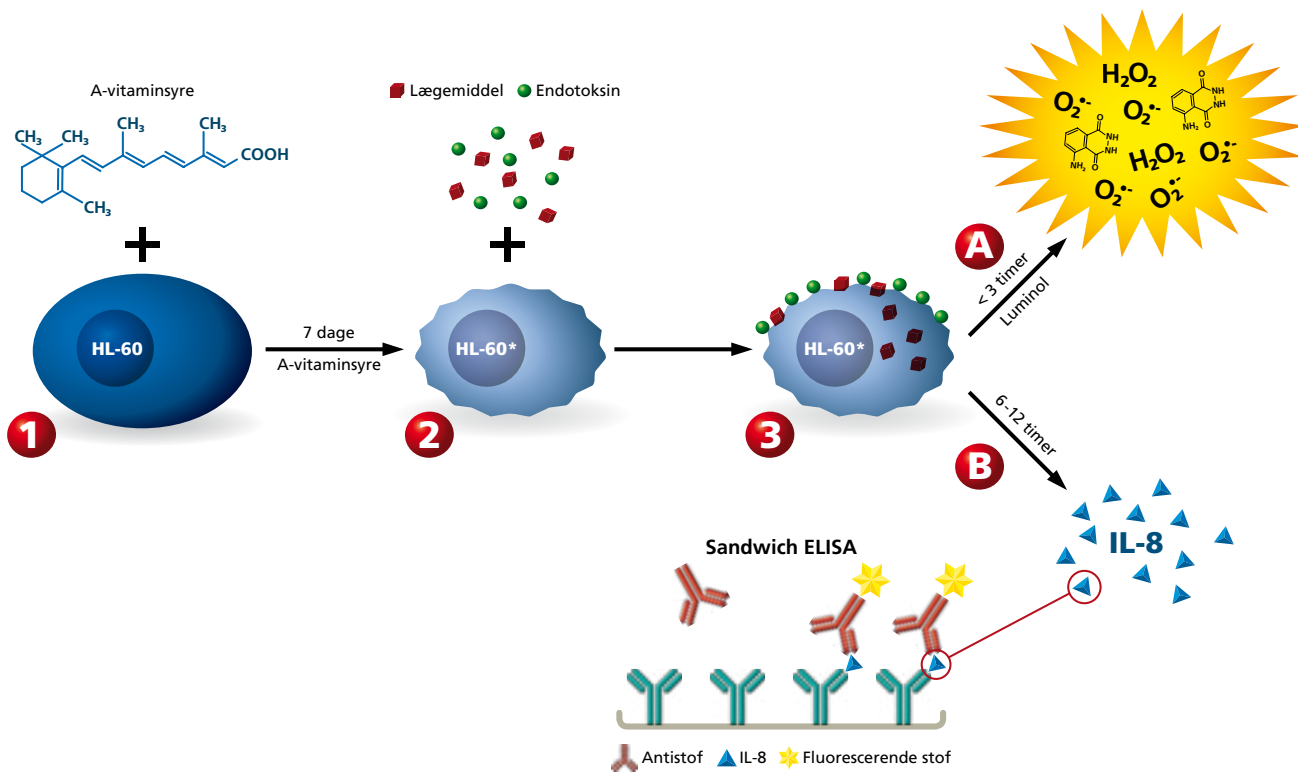
Omvendt kan immunforsvaret blive aktiveret af et lægemiddel. Dette behøver ikke at involvere en infektion, idet immuncellerne kan blive aktiveret på samme måde, som hvis kroppen var inficeret rigtigt. Her kan konsekvenserne blive meget forskellige alt efter måden lægemidlet er indgivet på, fx via et plaster, hvor virkningen er lokal, eller via munden eller blodbanen, hvor hele kroppen bliver behandlet. Hvis det sker, og brugeren samtidig får en infektion, kan immunforsvaret blive aktiveret endnu mere, hvilket potentielt set kan medføre

anafylaktisk shock. Derfor er det vigtigt, at nye lægemidler både bliver tjekket for, om de kan aktivere immunforsvaret eller hæmme det, inden de kommer på markedet.

Laboratorieforsøg viser immunrespons

Der findes et væld af metoder til at undersøge, om et lægemiddel kan ændre brugerens immunrespons, og på internationalt plan er der lavet officielle retningslinjer for, hvordan disse tests skal udføres. De amerikanske, japanske og europæiske myndigheder har alle tilsluttet sig guidelinien: "Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals".

Et af punkterne er, at medicinalfirmaerne skal udføre laboratorieforsøg på immunceller fra det medfødte immunforsvar. Her isolerer man immunceller fra humant blod, aktiverer dem og tilsætter derpå lægemidlet for at se, om immunrespons ændres. Det lyder simpelt, men i praksis er der mange



SÅDAN VIRKER LABORATORIEMODELLEN

Forsøgene viser, om lægemiddelstoffer kan påvirke det medfødte immunforsvars evne til at producere reaktive iltforbindelser og proteinet interleukin-8.

- 1 HL-60 cellerne skal færdigudvikles til neutrofile celler, før de kan anvendes i testen. Dette opnås ved at inkubere cellerne med A-vitaminyrsyre i syv dage.
- 2 Når cellerne er klar, tilsættes endotoksin til kulturen sammen med det lægemiddelstof, vi ønsker at undersøge.

- 3 HL-60 cellerne vil herefter reagere på endotoksinet og eventuelt også på det tilsatte lægemiddel:
 - A Cellerne vil først danne et hurtigt respons i løbet af minutter, hvor de producerer reaktive iltforbindelser. Dette måles ved at tilsætte stoffet luminol, som ved reaktion med iltforbindelserne udsender lys, der kan måles.
 - B På længere sigt, i løbet af nogle timer, vil cellerne producere proteinet og

signalstoffet interleukin-8, som måles ved en metode, der kaldes "Sandwich-ELISA". Her anvender man først et specifikt antistof, som binder alt tilstedeværende interleukin-8 i en prøve. Derefter tilsættes et nyt antistof, som også binder sig til interleukin-8, og som er mærket med et fluorescerende stof. På den måde kan vi måle, hvor meget interleukin-8, der er til stede i prøven.

parametre, man skal tage højde for, så man ikke risikerer at drage forkerte konklusioner. I vores laboratorium udvikler vi en test, som er baseret på neutrofile celler fra det medfødte immunforsvar. De neutrofile celler udgør omkring 70 procent af alle immunceller i kroppen og er således en meget vigtig del af immunforsvaret. Men i stedet for at isolere neutrofile celler fra forsøgspersoner, anvender vi en cellelinje, som nemt kan dyrkes i laboratoriet. Dermed har vi ikke behov for et stort antal frivillige forsøgspersoner, og samtidig opnår vi mere stabile resultater, fordi vi undgår den naturlige donorvariation såsom alder og køn.

Vi anvender en cellelinje, der hedder HL-60, som i udviklingsprocessen til den neutrofile celle er standset i et forstadie, hvor cellerne stadig er i stand til at vokse og dele sig. Når cellerne skal anvendes i testen, skal de derfor først færdigudvikles, hvilket opnås ved at tilsætte A-vitaminsyre. Derefter deler cellerne sig ikke længere, og de ligner normale neutrofile celler og har mange af de samme egenskaber.

Hurtigt og langsomt immunrespons

Ved test af lægemidler fremkalder vi et immunrespons i de færdigudviklede HL-60 celler med endotoksin, som er isoleret fra *E. coli*, og tilsætter samtidigt det lægemiddel, vi ønsker at undersøge. Herefter reagerer cellerne i løbet af en time med en hurtig immunrespons, hvor de producerer reaktive iltforbindelser. Senere, i løbet af 6-12 timer, udvikler cellerne en langsom immunrespons, hvor specifikke gener først skal aktiveres, før forskellige proteiner kan blive syntetiseret, heriblandt interleukin-8. I kroppen virker interleukin-8 ved at tiltrække flere neutrofile celler til det inficerede område, så infektionen kan blive bekæmpet mere effektivt.

Det medfødte immunforsvar består af en hurtig immunrespons, hvor immuncellerne "æder" indtrængende mikroorganismer for herefter at nedbryde dem ved hjælp af reaktive iltforbindelser, samt en langsom immunrespons, hvor cellerne danner signalstoffet interleukin-8, som tilkalder flere immunceller til infektionsstedet. Tabellen viser testresultaterne fra en række undersøgte lægemidler, der kan påvirke de to typer immunrespons på forskellig vis, enten ved at hæmme eller stimulere immuncellernes funktioner.

I vores forsøgsopsætning måler vi, om lægemiddelstoffet ændrer det hurtige og det langsomme immunrespons i positiv eller negativ retning. De to typer af responser dækker de mest almindelige reaktioner i det medfødte immunforsvar, så hvis lægemiddelstoffet ændrer dem, er der en forøget risiko for, at stoffet også vil være immunmodulerende i den menneskelige organisme.

Undersøgelser af lægemidler

I udviklingen af modellen har vi testet en række lægemidler, som allerede er beskrevet i litteraturen som værende immunmodulerende. Her har vi bl.a. inddraget det mandlige kønshormon testosteron og det anabolske steroid stanozolol, samt morfin, adrenalin og litium. Vi har opnået forskellige resultater, hvad angår lægemidlernes evne til at påvirke de to typer af responser, vi måler i vores model. Et lægemiddel kan således aktivere det ene respons uden at påvirke det andet, eller det kan måske have modsatrettede effekter på de to responser. Netop derfor er det afgørende, at flere parametre altid bliver undersøgt, da man ellers risikerer at drage forkerte konklusioner. Dette er den store styrke ved vores model.

Før modellen kan bruges i praksis, skal de fundne resultater sammenlignes med forsøg på isolerede celler fra forsøgspersoner. På den måde kan vi få verificeret, om resultaterne fra vores cellelinje svarer til resultater, man ville have opnået ved at bruge friskisolerede celler. Det har vi gjort igennem en række forsøg, som har vist, at dette er tilfældet. Det næste skridt er herefter at teste lægemidlerne i forsøgsdyr, for at være mere sikker på, at vores model er valid – nemlig om et lægemiddel kan ændre dit immunforsvar.

	Reaktive iltforbindelser	Interleukin-8
Testosteron <i>Kønshormon</i>	↓	↓
Stanozolol <i>Anabolsk steroid</i>	↑	Ingen effekt
Dexamethason <i>Antiinflammatorisk stof</i>	↓	↓
Adrenalin <i>Blodtryksmedicin</i>	↓	↓
Morfin <i>Smertestillende</i>	↓	Ingen effekt / svag stigning
Ketamin <i>Bedøvelse</i>	↓	↓
Litium <i>Antidepressiva</i>	↑	↑
Lovastatin <i>Kolesterolsænkende</i>	Ingen effekt	↓
Erythromycin A <i>Antibiotika</i>	↓	↓
Chlorprothixen <i>Antipsykotika</i>	↓	↓

Cand.pharm. Alex Boje er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Lise Moesby er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Michael Timm er adjunkt på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Erik Wind Hansen er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

Lægemiddelforskning

udgiver af Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Redaktion

Jesper Munck, Rolf Haugaard og Lise Moesby (ansvarshavende)

Billedredaktion

Jesper Munck og Jens Raadal

Fotos

Imageclub (4)

Stock.xchng (6, 12, 34, 44)

Eur. J. Pharm. Biopharm., Jan 2011; 77 (1): 26-35 med tilladelse fra Elsevier (7)

Bernard Boekhorst (8)

Christian Janfelt (10)

Dean Morley (11)

Yanhong Wen (12)

iStockphoto (23)

Paxinos og Watson, 1997 (24, 25)

SEKUCo (25)

Quentin Cherrier (26)

Wally Gobetz (29)

Lina Kallehave Hansen (39)

NASA (33)

Mircea Turcan (33)

Joe Faizal (35)

Jesper Munck (37, 45)

Ingram (38)

Juicingcafe (38)

Grafik/illustrationer

Jens Raadal (6, 16, 17, 27, 28, 42, 46, 48)

Henning Dalhoff (8, 9, 13, 18, 22, 32, 43)

Grafisk design og produktion

Jens Raadal

Tryk

Best-Buy-Broker

ISSN 0905-0051

Det Farmaceutiske Fakultet

Københavns Universitet

Universitetsparken 2

2100 København Ø

Tlf · 35 33 60 00

Fax · 35 33 60 01

E-mail · farma@farma.ku.dk

Internet · www.farma.ku.dk

