

LÆGEMIDDELFORSKNING

1 9 9 6

D A N M A R K S

F A R M A C E U T I S K E

H Ø J S K O L E



Lægemiddelforskning
udgives af Danmarks Farmaceutiske
Højskole.

Ansvarshavende:
Mette Rasmussen, DFH.

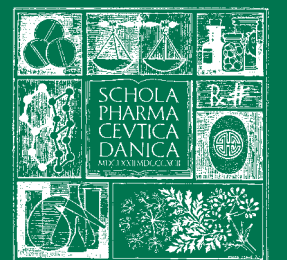
Redaktion:
Videnskabsjournalist Rolf Haugaard
Nielsen, informationsmedarbejder
Jesper Munck og forskningsbibliote-
kar Annemette Møller Hansen.

Grafisk produktion:
Levison+Johnsen+Johnsen

Layout
P.Z. Design

Fotos:
Jesper Munck, Tue Askaa,
Henrik Fylking Nielsen, Erik Nielsen,
Henrik Lund, Gert Jensen og
Fotogruppen Aps.

Forside:
Pituicytter dyrket i 15 dage og der-
efter farvet med Giemsa. 100 gange
forstørrelse (fra artikel Immunforsva-
rets og nervesystemets rolle i stress,
side 20 - 21).



Indhold:

	Side
The W. Th. Nauta Award. <i>Af Jesper Munck.</i>	2-3
Nitrogenoxid - et vigtigt signalmolekyle i øjet. <i>Af Niels C. Berg Nyborg.</i>	4-5
Tungtopløselige lægemiddelstoffer i tabletform. <i>Af Finn Norring Christensen, Betty Lomstein Pedersen, Lisbet Bønløkke, Niels Hønberg Zangenberg og Henning Gjelstrup Kristensen.</i>	6-7
Målrettet afgift af lægemiddelstoffer til tyktarmen. <i>Af Charlotte L. Andersen, Helle Brøndsted og Lars Hovgaard.</i>	8-9
Hvilken vej? Luftvejen, især via næsen! <i>Af Erik Bechgaard, Morten Bagger og Sveinbjörn Gizurarson.</i>	10-11
Bedre smertebehandling efter operation. <i>Af Tina Hahn, Janne Rømsing og Mette Rasmussen.</i>	12-13
Lægemidler kan medføre allergi. <i>Af Ulla Grove Sidelmann og Steen Honoré Hansen.</i>	14-15
Protein kan føre til behandling af septisk shock. <i>Af Lars Fogh Iversen, Jette Sandholm Kastrup og Ingrid Kjølner Larsen.</i>	16-17
Metalioners rolle i sygdom og sundhed. <i>Af Ole Farver.</i>	18-19
Immunforsvarets og nervesystemets rolle i stress. <i>Af Erik Wind Hansen, Dorte Malling og Jens Dencker Christensen.</i>	20-21
Enzym er nøglen til malariaparasittens resistens. <i>Af Inge Thøger Christensen, Thomas Lemcke og Flemming Steen Jørgensen.</i>	22-23
Tidlig diagnostik af blodkræft. <i>Af Erik Riise, Jan Engberg og Lisbeth Roslund.</i>	24-25
Når hjernens signalprocesser løber løbsk. <i>Af Ulf Madsen, Frank A. Sløk og Povl Krosggaard-Larsen.</i>	26-27
Hvæpsegifte og lægemidler til hjernens sygdomme. <i>Af Lisa Matzen og Jerzy Jaroszewski.</i>	28-29
Receptorstudier viser lægemidlers effekt. <i>Af Uffe Kristiansen.</i>	30-31
Forurener lægemidler naturen? <i>Af Bent Halling Sørensen, Søren Nors Nielsen og Sven Erik Jørgensen.</i>	32-33
Toksikologi har stor betydning for samfundet. <i>Af Erling Sonnich Thomsen og Mads Skak Jensen</i>	34-35

The W. Th. Nauta Award

*gik i 1996 til
professor Povl Krosggaard-Larsen,
Danmarks Farmaceutiske Højskole*

Af Jesper Munck

Nauta-prisen tildeles hvert andet år en europæisk forsker, der på internationalt plan har gjort sig forskningsmæssigt banebrydende gældende inden for det medicinal-kemiske område. I år - og for blot tredje gang overhovedet - gik prisen til professor Povl Krosggaard-Larsen, Danmarks Farmaceutiske Højskole. Ud over de 15.000 hollandske gylden, der følger med prisen, er det essentielle - når der nu er tale om prisen inden for området - den ære og internationale opmærksomhed, der tilfalder modtageren og den glans, der samtidig kastes over Højskolens navn ude i den store verden. Prisen tildeles for Krosggaard-Larsens forskningsmæssige indsats inden for tre projektområder:



GABA-systemet

Krosggaard-Larsen og gruppen omkring ham har afdækket væsentlige aspekter af hjernens inhibitoriske signalsystem, som påvirker alle vore hjerneceller i retning af at dæmpe aktiviteten, og som går under betegnelsen GABA-systemet. Projektet med GABA-systemet, der etableredes på Institut for Medicinalkemi tilbage i 1970, havde som hovedformål at afdække mulighederne med at påvirke GABA-systemet i hjernen rent farmakologisk. En stimulering af dette system har en beroligende effekt til følge. Omvendt går man i krampes, hvis systemet blokeres og hjernen dermed så at sige løber løbsk.

I midten af 70'erne var Krosggaard-Larsen og hans gruppe i stand til meget præcist at kunne påvise, hvordan man farmakologisk ved hjælp af syntetiserede modelstoffer kunne påvirke GABA-systemet.

Et anti-epilepsimiddel, der markedsføres i dag, kan føres tilbage til den opdagelse, Krosggaard-Larsen gjorde i midten af 70'erne.

Også indlæringsprocesserne er under en dæmpende kontrol af GABA-systemet, og man ved fra dyreforsøg, at man er i stand til at lette indlæringsprocessen gennem blokering af GABA-systemets receptorer. Denne iagttagelse forsøges i

dag udnyttet til udvikling af lægemidler til behandling af Alzheimer- og andre demenspatienter.

Om det på baggrund af disse principper skal lykkes at udvikle et lægemiddel til effektiv symptombehandling af disse patienter, vil tiden vise.

THIP - en GABA agonist

En anden af de iagttagelser der gjordes, førte frem til udviklingen af stoffet THIP - en GABA agonist - som gennemgik kliniske undersøgelser i starten af 80'erne i meget tæt samarbejde med H. Lundbeck A/S. Det store perspektiv var, at man med dette stof kunne behandle smerter ligeså effektivt som med morfin, men med en helt anden mekanisme og uden morfins bivirkninger. THIP blev dog ikke til et lægemiddel mod smertebehandling. Stoffet stimulerede hjernens håndbremse-system - GABA-systemet - og derfor, udover at virke effektivt smertedæmpende, beroligende det også patienterne på uønsket vis.

På samme tidspunkt startedes en ligeledes banebrydende forskning inden for hjernens overordnede stimulerende system - stik modsat GABA-systemets virkning. Hjernens generelle aktivitetsniveau kan siges at være en funktion af, om det er det inhiberende GABA eller det stimulerende stof, glutaminsyre, der har overvægten.

På baggrund af denne forskning var Krosggaard-Larsens gruppe i stand til at syntetisere stoffer, som fik afgørende indflydelse på udviklingen inden for feltet, f.eks. stoffet AMPA, som virkede på ét bestemt glutaminsyre receptor-system i hjernen. At dette receptor-system først identificeredes under selve forsøgene er årsagen til, at dette bestemte receptor-system i dag går under betegnelsen AMPA-receptorerne - et stående vidnesbyrd om gruppens pionérfunktion på området. AMPA og AMPA-receptorerne er i dag genstand for livlig udforskning - blandt andet i relation til indlæring og hukommelse.

Acetylcholin-systemet

Hvor man generelt kunne forøge indlæringen ved at lette hæmnin-

gen eller øge stimuleringen i hjernefunktionen, kan man gøre det meget specifikt ved at hjælpe acetylcholin-systemet. Acetylcholin er det stof, der spiller den direkte rolle i alt, hvad der vedrører hukommelse og indlæring. Også for acetylcholins vedkommende er der tale om en stimulerende hjerneeffekt, men kun i få og bestemte områder, specielt i hjernebarken. Hvor de to første systemer grundet deres overall-effekt er vanskelige at håndtere, er det lettere at gribe ind med acetylcholin, der virker centralt på hukommelse og indlæring.

Inhibitor-systemets opdagelse er det felt, hvor Povl Krosggaard-Larsens indsats foreløbig har fået den største internationale betydning, fordi opdagelsen samtidig betød startskuddet på en international interesse rettet mod dette systems kemi. Herefter var man ikke alene på feltet - og da slet ikke da gruppen fra midten af 80'erne arbejdede med acetylcholin-systemet. Allerede fra starten stod hundredvis af forskningsgrupper nu klar i kulisserne, hvilket ikke mindst skyldtes firmaernes interesse i stoffet og dermed meget massive forskningsindsats på området. Et håndgribeligt resultat af dette, er et lægemiddel mod Alzheimers sygdom, som netop nu er under udvikling på Novo Nordisk A/S.

Det vi fra en Højskole-synsvinkel først og fremmest kan være stolte af er, at Povl Krosggaard-Larsen har været primus motor inden for ovennævnte banebrydende forskningsmæssige områder, at resultaterne har vakt international opmærksomhed og at denne opmærksomhed nu har resulteret i Nauta-prisen 1996. Men også at Højskolen har været leverandør af mange af de medicinalkemi-kere, som stod på spring i kulisserne, og som ude omkring på virksomhederne har fået omsat de forskningsmæssige resultater til udvikling og produktion af lægemidler.

Det er sådanne faktorer, der på afgørende vis er med til at placere navnet The Royal Danish School of Pharmacy solidt på forskningens verdenskort.

Redaktionen ønsker Povl Krosggaard-Larsen tillykke med prisen!

Tungtopløselige lægemiddelstoffer i tabletform

I dag må tungtopløselige lægemiddelstoffer ofte injiceres. Men brugerne vil helst have tabletter. Nye forskningsprojekter skal øge forståelsen af, hvordan medicin i tabletform opløses og optages i tarmen.

Af Finn Norring Christensen, Betty Lomstein Pedersen, Lisbet Bønløkke, Niels Hønborg Zangenberg og Henning Gjelstrup Kristensen.

Et lægemiddelstof, der indtages i tabletform, skal opløses, før det kan trænge gennem tarmens membran. Mange af de nye lægemiddelstoffer, er imidlertid tungtopløselige i vand og i fordøjelsesvæsken i mave-tarmkanalen.

Derfor er den mængde lægemiddelstof, som optages i kroppen af de tungtopløselige lægemiddelstoffer ofte meget lille, hvilket resulterer i en ringe virkningsgrad.

Da tabletter stadig er den foretrukne måde at indgive medicin på, er formulering af de tungtopløselige lægemiddelstoffer et væsentligt problem ved udviklingen af nye lægemidler.

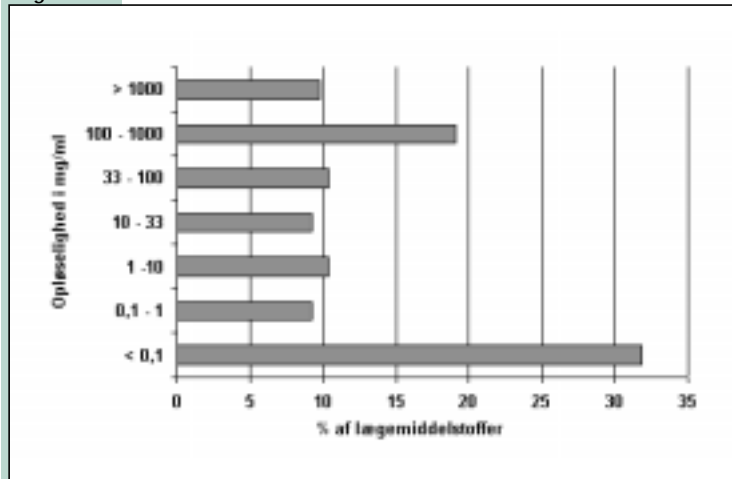
Der findes i dag flere metoder til at forøge biotilgængeligheden for tungtopløselige lægemiddelstoffer. Da der ikke eksisterer noget systematisk overblik over disse metoder, anvendes de ofte i flæng.

Et nyt forskningsområde ved Institut for Farmaci, som kaldes GISOL-projekterne (Gastrointestinal Dissolution of Low Solubility Drugs), skal udfylde hullerne i den eksisterende viden.

Optagelse af lægemiddelstoffer

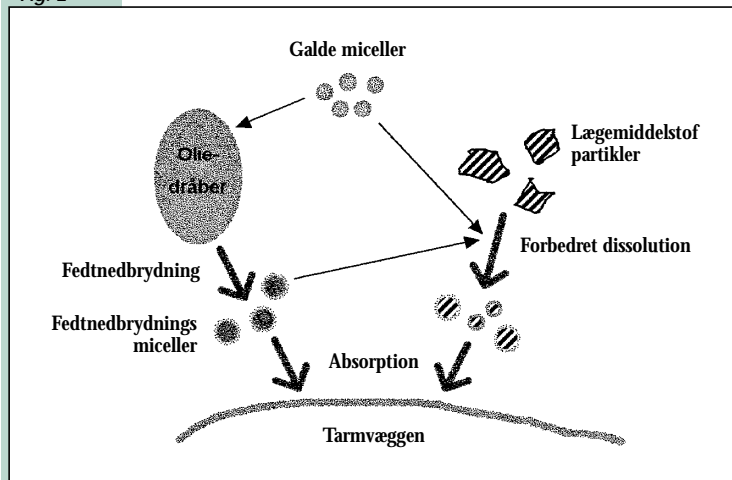
Når et lægemiddelstof indtages i tabletform, er optagelsen i kroppen en trinvis proces. Først skal stoffet opløses, så skal det transporteres hen til det yderste cellelag i tarmvæggen, epitelet, og endelig skal lægemiddelstoffet trænge ind igennem tarmvæggen til blodet eller til

Fig. 1



Mange nye lægemiddelstoffer er tungt opløselige i maven og tarmen. Figuren viser 173 nye lægemiddelstoffer fra perioden 1992-1995 fordelt efter deres opløselighed.

Fig. 2



Tilstedeværelsen af galde og fedt - især fedtmetabolitter - menes at øge opløsningshastigheden af fedtopløselige lægemiddelstoffer gennem dannelsen af miceller, dvs. ordnede samlinger af overfladeaktive stoffer. Øget opløselighed kan fremme lægemidlets optagelse igennem tarmvæggen.

lymfen. Når man skal forbedre biotilgængeligheden, må man vide hvilke af disse processer, der virker begrænsende.

Matematiske modeller af forholdene i tarmen kan bruges til at identificere de processer, der begrænser og dermed styrer optagelsen af lægemiddelstofferne. Derfor opbygger gruppen PC-baserede computermodeller over væsketransport og opløsningsprocesserne.

Samtidig opbygges en PC-database over de eksisterende lægemiddelstoffer. Basen rummer informationer om lægemiddelstoffernes dosering, fedtopløselighed, vandopløselighed, molvægt m.m. Disse informationer kan så sammenholdes med biotilgængeligheden af forskellige formuleringer af det enkelte lægemiddelstof.

De overfladeaktive stoffer i tarmen

De fleste tungtopløselige lægemiddelstoffer er vandafvisende. Derfor er det svært at befugte overfladen af partikler af lægemiddelstoffet. I tarmen findes der imidlertid en del naturlige overfladeaktive stoffer, som påvirker befugtningen og dermed opløsningen af de fedtstoffer, som findes i føden.

I dette projekt undersøges, hvordan tarmens egne overfladeaktive stoffer påvirker befugtningen og opløsningen af tungtopløselige lægemiddelstoffer. Da de overfladeaktive stoffer virker sammen i tarmen, studerer vi blandinger af overfladeaktive stoffer.

Vi forventer, at disse opløsningsfremmende effekter vil være mest udprægede for de mere lipofile, dvs. fedtopløselige og olieagtige, lægemiddelstoffer.

Første forsøg på mennesker

I gennem mange år har man studeret opløsning af lægemiddelstoffer i vandige medier ved forskelligt pH, ionstyrke m.m. Der er anvendt mange sindrige apparater. Målet har ofte været at bestemme opløsningsprocessen for de forskellige lægemidler i menneskets tarm. Hvordan processen faktisk foreløber i tarmen, har man dog endnu ikke kunnet måle direkte.

Et GISOL-projekt skal derfor følge opløsningsprocessen i tarmen. Projektet udføres i samarbejde med en gruppe ved Uppsala Universitet. En sonde lægges ned i tarmen på frivillige forsøgspersoner. Igennem sondens pumpes testpræparaterne ned i tarmen, og prøver suges op. De første resultater tyder på, at det ved denne metode er muligt at føl-

ge opløsningsprocessen i tarmen.

Ved at sammenligne opløsningsprocessen i forskellige vandige medier med den, man finder i mennesker, kan man identificere de medier, som bedst afspejler forholdene i den menneskelige tarm.

En vej til bedre formuleringer

Ved indtag af 100 gram fedtstof i føden optages over 93 procent. I tarmen findes en række enzymer og overfladeaktive stoffer, som håndterer disse i vand tungtopløselige fedtstoffer. Omsætningen af fedtstofferne styres i et kompliceret spil imellem føden, mave, galde og tarm.

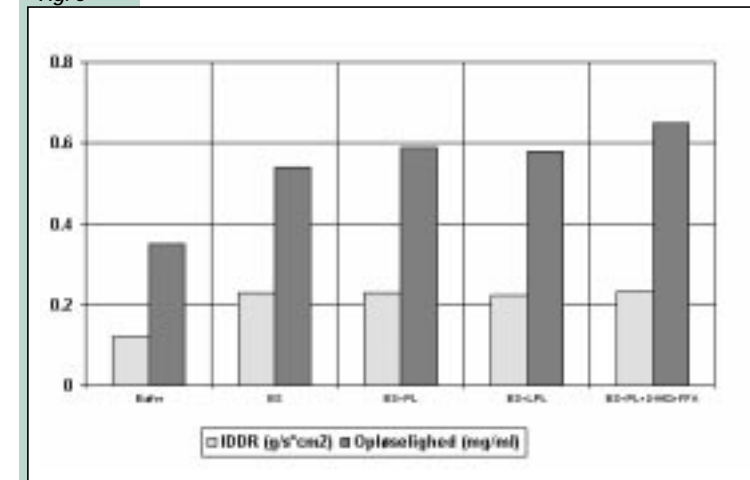
I et GISOL-projekt undersøger vi, hvordan lægemiddelstoffer bliver opløst og optaget samtidig med, at fødens fedtstoffer omsættes. En model af fedtstofomsætningen er blevet genskabt i laboratoriet for at studere, hvordan lægemiddelstofferne påvirkes.

Nogle af de mest lovende teknikker til forbedring af optagelsen af lipofile lægemiddelstoffer, der indtages som tabletter, er baseret på olieformuleringer.

Med denne model kan opløsningen af sådanne oliebasebaserede lægemidler studeres i laboratoriet.

I bedste fald vil det blive muligt at udnytte naturens egne redskaber til at lave helt nye og bedre tabletformuleringer af tungtopløselige lægemiddelstoffer.

Fig. 3



Tarmens egne overfladeaktive stoffer har betydning for lipofile lægemiddelstoffers opløsningshastighed og opløselighed. Her ses opløsningshastighed (IDDR) og opløselighed for stoffet hydrokortison i medier, der indeholder galdesalt (BS), fosfolipid (PL), lyso-fosfolipid (LPL), 2-monoglycerid (2-MG) samt frie fedtsyrer (FFA).



Dr.pharm. Henning Gjelstrup Kristensen er professor ved Institut for Farmaci.



Lic.ind.cand.polyt. Finn Norring Christensen er lektor ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm. Betty Lomstein Pedersen er Ph.D.-studerende ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm. Lisbet Bønløkke er Ph.D.-studerende ved Institut for Farmaci.



Cand.polyt. Niels Hønborg Zangenberg er Ph.D.-studerende ved Institut for Farmaci.

Målrettet afgift af lægemiddelstoffer til tyktarmen

Nogle lægemiddelstoffer er i dag uegnede til tabletter, fordi de nedbrydes i maven eller tyndtarmen. Men ny forskning viser, at stofferne kan beskyttes af et hydrogelsystem, indtil de når tyktarmen. Herfra kan de komme ud i blodet og virke.

Af Charlotte L. Andersen, Helle Brøndsted og Lars Hovgaard.

Tabletter er ofte den bedste og behageligste måde at indtage lægemidler på. Men nogle lægemiddelstoffer egner sig ikke til indgift via munden. Det gælder bl.a. for peptider og proteiner, der spås en stor fremtid til smertebehandling samt behandling af sygdomme som sukkersyge og dværgvækst.

Problemerne opstår, fordi der i mavesækken og tyndtarmen findes en række enzymer, som nedbryder de aktive lægemiddelstoffer, før de kan trænge gennem tarmvæggen og videre ud i blodet for at virke.

I tyktarmen er mængden af disse enzymer imidlertid væsentlig lavere, hvilket betyder, at optagelsen af peptider og proteiner gennem tarmvæggen kan finde sted her.

Derfor er det af stor interesse at udvikle et lægemiddelsystem som kan beskytte lægemiddelstoffet under passagen gennem mavesækken og tyndtarmen, så stoffet først frigives i tyktarmen.

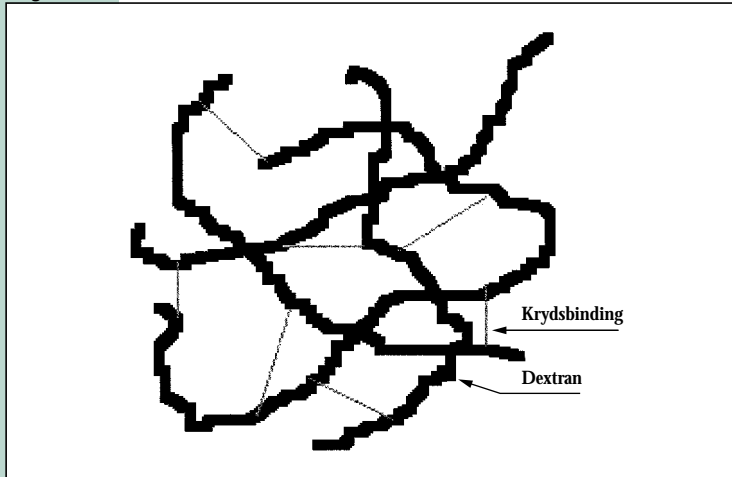
Vore undersøgelser viser, at et nyt lægemiddelsystem baseret på dextran hydrogeler, er meget lovende til formålet.

Lægemidler til tyktarmen

Specifik afgift til tyktarmen er relevant for to grupper af medicin:

- Lægemiddelstoffer, som er ustabile i den øvre del af mave-tarmkanalen. F.eks. vacciner, peptider og proteiner. Peptider er små proteiner.

Fig. 1



Tegningen viser strukturen af en dextran hydrogel. Antallet af de tredimensionelle krydsbindinger kan varieres og har betydning for gelens mekaniske styrke og for nedbrydeligheden i tyktarmen.

- Lægemiddelstoffer til behandling af sygdomme i tyktarmen. Blandt disse findes antiinflammatoriske stoffer til behandling af tarmbetændelse samt kemoterapeutiske stoffer til behandling af kræft i tyktarmen.

Fysiologien i mave-tarm-kanalen

For at udvikle et lægemiddelsystem, som specifikt afgiver lægemiddelstoffer i tyktarmen, er det nødvendigt at tage en del fysiologiske faktorer i betragtning. De vigtigste forhold er mave-tarmkanalens variation i mængden af bakterier, pH og kemisk reaktivitet.

Antallet af bakterier er markant højere i tyktarmen end i den øvre del af mave-tarmkanalen, hvilket hænger sammen med de lave pH-værdier øverst i mave-tarmkanalen og en forholdsvis kort transitid af føden. Transitiden i mavesækken og tyndtarmen er henholdsvis 1-3 timer og 5-6 timer, mens transitiden i tyktarmen kan variere fra 24-72 timer.

Bakterierne i tyktarmen producerer en række enzymer, som man kan drage nytte af ved formuleringen af et lægemiddelsystem til specifik afgift af lægemiddelstoffer i tyktarmen.

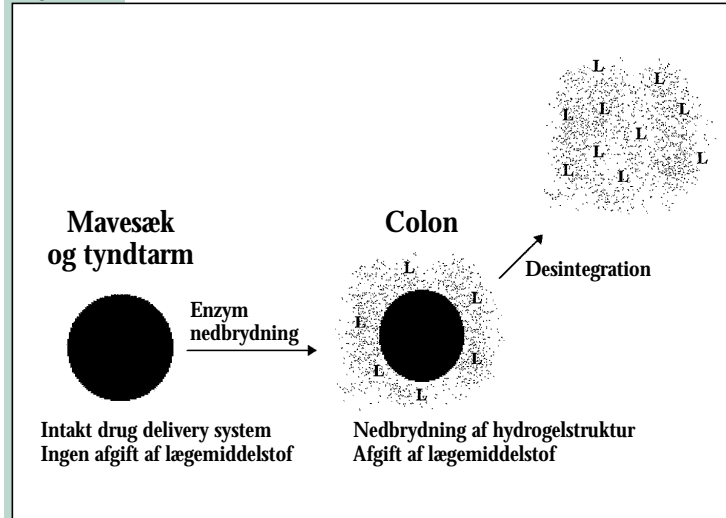
Det er muligt at fremstille lægemidler, som passerer mavesækken og tyndtarmen i intakt stand og først nedbrydes af et bestemt enzym, som kun bakterierne i tyktarmen udskiller. Derved begynder afgiften af det aktive lægemiddelstof netop her.

DFH har udviklet et lægemiddelsystem

På Institut for Farmaci har vi udviklet et sådant specifikt lægemiddelsystem. Systemet er baseret på en enzymatisk nedbrydelig hydrogel, som lægemiddelstoffet er pakket ind i. Gelen kan formuleres som en tablet, en kapsel eller et overtræk.

Hydrogeler er krydsbundne polymerer, som danner et 3-dimensionelt netværk. Gelerne er uopløselige i vandige miljøer, men indeholder selv

Fig. 2



store mængder vand.

Hydrogelen består af den bio-nedbrydelige polymer dextran. Dextran nedbrydes af enzymet dextranase, som udelukkende produceres af de bakterier, som findes i tyktarmen.

Når dextranhydrogelen nedbrydes, frigives lægemiddelstoffet, som nu enten kan passere tarmvæggen eller udoøve sin virkning lokalt i tyktarmen.

Undersøgelser med dextran hydrogeler

Vi har syntetiseret og karakteriseret dextran hydrogeler med henblik på at klarlægge sammenhængen mellem gelernes struktur og deres fysiske-kemiske egenskaber. Desuden er den enzymatiske nedbrydning af systemet blevet undersøgt i laboratoriemodeller, der reproducerer forholdene i tyktarmen.

Vi har fundet, at det er muligt at ændre styrken og krydsbindingsgraden i en dextran hydrogel ved at anvende dextran med varierende molekylstørrelse. Desuden har det vist sig, at jo mere krydsbundet en hydrogel er, jo større mekanisk styrke har den, men jo mindre er dens evne til at optage vand. Jo mere vand, gelen indeholder, jo hurtigere nedbrydes den.

Disse forhold har alle betydning for nedbrydningen af hydrogelen. Derfor skal man være særdeles opmærksom på krydsbindingsgraden ved formulering af et lægemiddelsystem baseret på dextran hydrogeler.

Forskellige lægemiddelstoffer er blevet inkorporeret i hydrogelerne, og modelforsøg har vist, at afgiften af lægemiddelstof netop udløses af enzymet dextranase.

Det tyder på, at dextran hydro-

geler ikke nedbrydes i den øvre del af mave-tarm-kanalen. Dyreforsøg har siden bekræftet, at dextran hydrogelerne ikke bliver nedbrudt i en rottes mave, men først i tyktarmen, hvor dextranase findes.

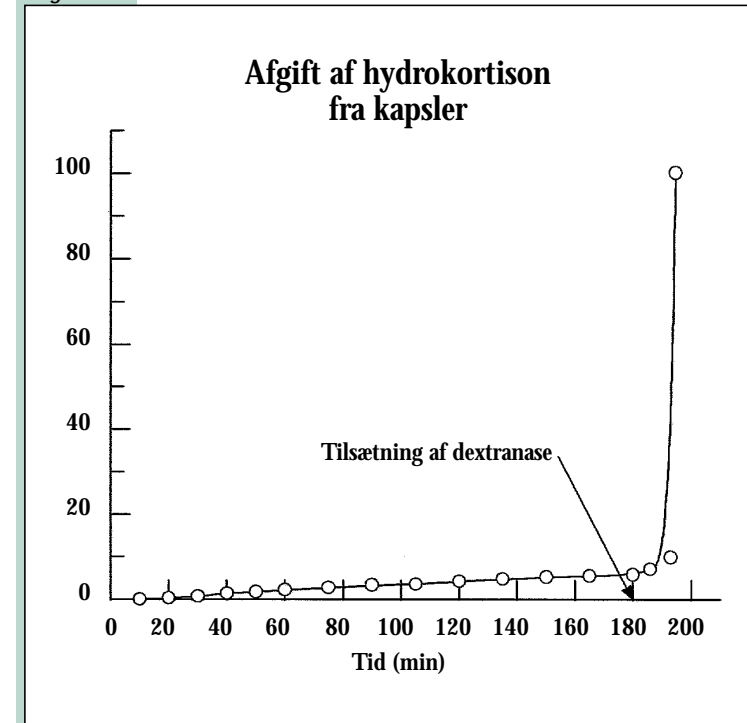
Gelerne har et stort potentiale

Vores resultater viser, at det er muligt at udvikle et lægemiddelsystem baseret på dextran hydrogeler, som med stor sikkerhed afgiver lægemiddelstoffer specifikt i tyktarmen. Samtidig er systemet ugiftigt.

Derfor har dette lægemiddelsystem en stor fremtid inden for behandling med peptider, proteiner og vacciner, samt inden for behandlingen af sygdomme i tyktarmen.

Hydrokortison blev brugt som modelstof for at måle frigivelsen af lægemiddelstoffer fra dextrankapsler. Som det ses, bliver kun små mængder af stoffet frigivet, indtil enzymet dextranase tilsættes. Dette enzym, som kun findes i tyktarmen, åbner dextrankapslen helt.

Fig. 3



Cand.pharm. Charlotte L. Andersen er forskningsassistent ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm., Ph.D. Helle Brøndsted er lektor ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm., Ph.D. Lars Hovgaard er lektor ved Institut for Farmaci.

Hvilken vej? Luftvejen, især via næsen!

Akutte tilstande som et epileptisk anfald kan i dag kun behandles med en injektion. Det kræver normalt, at der er en læge eller en sygeplejerske til stede. Næsespray er et godt alternativ, som enhver kan bruge.

Af Erik Bechgaard, Morten Bagger og Sveinbjörn Gizurarson

Kan administration af lægemiddelstoffer via luftvejene helt erstatte injektion?

Nej, formentlig ikke. For det første er det svært at undgå skader i luftvejene, når det gælder lægemidler, som hele livet igennem skal indtages flere gange dagligt. For det andet findes der en øvre grænse for, hvor store molekyler der kan optages via næsen eller lungerne.

Imidlertid rummer indgift via næsehulen eller lungerne mange muligheder, især i akutte situationer som ved et epileptisk anfald eller ved feberkræmper. Her er et hurtigt indgreb til stor gavn for patienten, og hvis medicinen findes som næsespray, kan enhver i patientens nærhed straks yde førstehjælp.

Ved dosering via luftvejene undgås desuden anvendelse af kanyler, hvilket ikke blot sparer patienterne for ubehag, men også begrænser risikoen for smitte via blod, f.eks. i forbindelse med leverbetændelse og

AIDS, samt ved brug af medicin i udviklingslandene.

Luftvejene er et godt alternativ til injektion, fordi slimhinderne er forholdsvis lette at gennemtrænge, hvorved lægemiddelstoffet optages direkte i blodet og virker hurtigt.

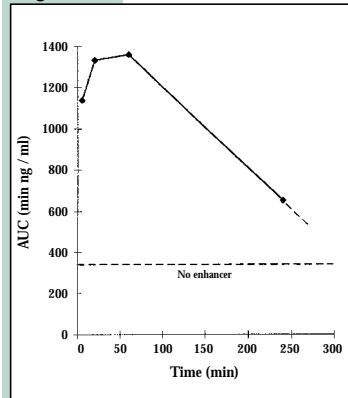
Administration via næsen eller lungerne er ikke mindst interessant i forbindelse med medicinsk anvendelse af peptider, der let nedbrydes i mave-tarmsystemet, hvis de indtages som tabletter. Peptider er små proteiner, som består af op til ca. 100 aminosyrer, og de spås en stor fremtid som lægemidler. De kan i dag fremstilles ved hjælp af genteknologi.

Indgift via næse og lunger

Når et lægemiddelstof indgives via næsehulen eller lungerne, skal stoffet optages gennem en barriere, som i begge tilfælde kun består af ét enkelt epithelcellelag. Ved nasal administration skal stoffet derudover passere et markant slimlag, mucus.

I lungernes alveoler foregår ilt-optaget fra indåndingsluften, og her er epithellet særligt let gennemtrængeligt og overfladen meget stor. Derfor kan selv store peptider passere celletaget i rimelige mængder. Et eksempel er insulin, der har en molekylvægt på ca. 5000 D. Molekyler som er væsentligt større end væksthormon, med en molekylvægt på ca. 20.000 D, kan næppe indgives uden brug af absorptions-

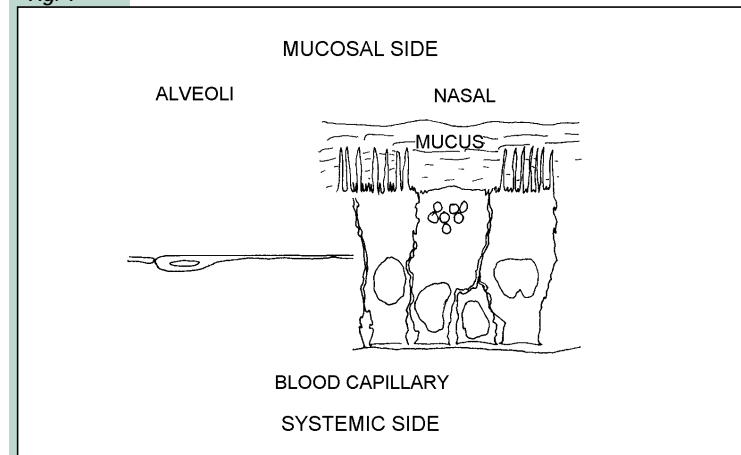
Fig. 2



Når store molekyler skal indtages via næsen, er det ofte nødvendigt at anvende et absorptionsfremmende stof. Kurven viser varigheden af den absorptionsfremmende effekt, der måles som den mængde af peptid T, der kommer ud i blodet (AUC). Næsehulen er forbehandlet med et absorptionsfremmende stof i forskellige antal minutter, før applikation af peptidet (Bechgaard og Bagger).

Et lægemiddelstof, som optages via lungerne (tv.) eller næsehulen (th) skal krydse en barriere, der kun består af ét enkelt epithelcellelag, for at komme ud i blodet. I næsen skal stoffet dog først passere et tykt slimlag, mucus.

Fig. 1



fremmede stoffer. Man er imidlertid betænkelig ved at anvende disse stoffer i lungerne af frygt for skadevirkninger.

Ved indgift via lungerne er hovedproblemet at bringe mere end 10-20% af den anvendte dosis forbi bronkierne og ned i alveolerne. Som led i indhalationen skal patienten ånde kraftigt ind, hvilket kan være begrænset af sygdomstilstanden og patientens fysiske formåen. Denne administrationsvej er derfor uanvendelig, når patienten er bevidstløs. Her kan applikation i næsen anvendes.

Hovedproblemerne ved nasal applikation er, at kun 50-150 µl kan indgives i hvert næsebor, samt at absorptionsoverfladen er relativ lille. Endelig fjernes uabsorberet lægemiddelstof hurtigt fra næsehulen af fimrehår. Nasalt er det ikke muligt at indgive så store molekyler, som man kan via lungerne. Anvendelse af et absorptionsfremmende stof vil normalt være nødvendigt for peptider med en molekylvægt større end 500-1000 D.

Afvejning af fordele og ulemper

Kunsten ved indgift af lægemidler via næsehulen er oftest at fremme absorptionen uden at beskadige slimhinden.

Ved kronisk behandling, f.eks. af sukkersyge med insulin, hvor den kliniske effekt af den eksisterende behandling er meget tilfredsstillende, vil kravene til nye administrationsformer være særdeles restriktive. I andre tilfælde opvejes eventuelle ulemper som irritation af slimhinden derimod klart af fordelene. Dette beror således på en cost-benefit vurdering.

Varigheden af øget absorption

Absorptionsfremmende stoffer søger man såvidt muligt at undgå i lægemidler til næsen. Et stof, der øger slimhindens gennemtrængelighed, skal være så virksomt og lidet skadeligt som muligt. Samtidig bør virkningen helst forsvinde hurtigt efter, at lægemiddelstoffet er absorberet, så eventuelle allergener eller vira får mindst mulig chance for at trænge ind.

Virkningen af et stærkt absorptionsfremmende stof kan vare i dagevis. I et pilotforsøg med et af de nyere stoffer har vi fundet, at effekten aftager i løbet af ca. fire timer.

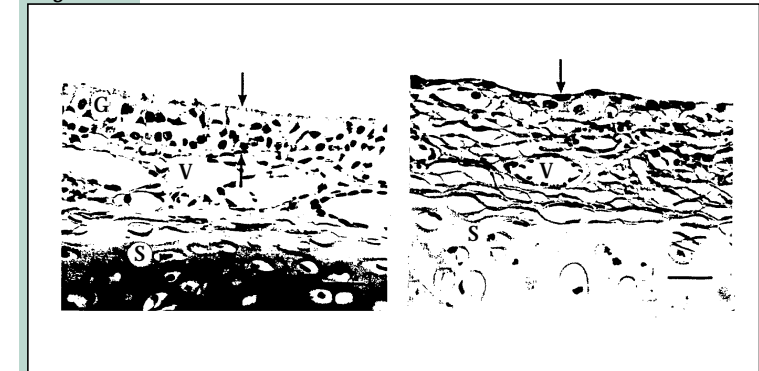
Lokaltoksitet og klinisk relevans

Et stofs skadevirkning på cellemembraner kan bl.a. undersøges på dyrkede celler eller dyrevæv. Men vi kender meget lidt til den kliniske

relevans af disse tests. Derfor undersøgte vi forandringer i næseslimhinden efter en uges behandling af kaniner med de velkendte 1% efedrin næsdråber. Efedrin påvirker epithelcellerne stærkere end de fleste nyere lægemidler. Kaninerne fungerede helt normalt, men de cylinderformede epithelceller var flade efter behandlingen. Efter få dage var slimhinderne igen normale.

Vi har desuden lavet forsøg med nasal indgift af det muskelafslappende lægemiddelstof diazepam givet til mennesker. Forsøge-

Fig. 3



Histologisk forandring af næseslimhinden efter en uges behandling af kaniner med 1% efedrin, DAK. Til venstre ses normale cylinderformede epithelceller (G). Til højre ses, at de tilsvarende celler efter behandling er flade og uden fimrehår. (Bechgaard og Bagger i samarbejde med E. Bindseil, KVL).

ne viste, at næsen er velegnet til akut behandling af f.eks. epileptiske anfald og feberkræmper.

Nye vacciner og lægemidler

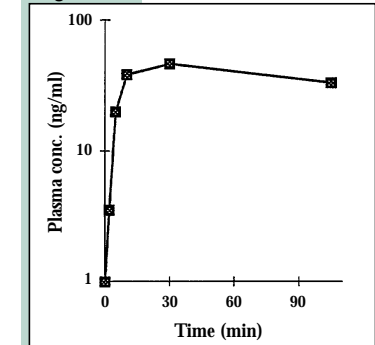
Effekten af en række vacciner kan øges ved nasal indgift. Traditionel vaccination ved injektion stimulerer primært dannelse af antistof i kroppen. Vaccination via næsen danner samtidig antistof lokalt i alle slimhinder. Kroppen vil derfor være bedre beskyttet mod de infektionssygdomme, der benytter slimhinder som indgangsport. Det gælder f.eks. difteri og kolera.

Med hensyn til nasale lægemidler har især industrien forsket intenst i formulering af store peptider - f.eks. insulin - til kronisk anvendelse som næsespray. Det vil nok i første omgang være sikrest primært at satse på akutte, kortvarige anvendelser samt på vaccination.

Til lungeapplikation forskes der i inhalatorer, der kan bringe størst mulig del af dosis ned i selv "svage" lunger. Nyere undersøgelser tyder på, at op til 95 procent er muligt.

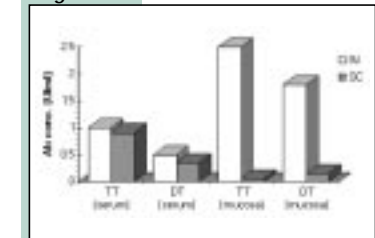
Fremtiden er udfordrende og lovende.

Fig. 4



Eksempel på plasmakoncentration af diazepam til forskellige tider efter nasal administration til mennesker. (E. Bechgaard, S. Gizurarson, H. Jónsson og F.K. Gudbrandsson)

Fig. 5



Søjlerne viser det immunologiske respons målt i slimhinderne og blodet efter nasal vaccination (IN) og injektion (SC). Immunresponsen for de to administrationsformer er nogenlunde ens i blodet. Desuden stimulerer nasal vaccination den lokale beskyttelse på slimhinden. TT = tetanus toxoid; DT = difteri toxoid (Gizurarson).



Lic.pharm. Erik Bechgaard er lektor ved Institut for Farmaci, DFH.



Morten Bagger er scholarstipendiat ved Institut for Farmaci, DFH.



Cand.pharm., Ph.D. Sveinbjörn Gizurarson er docent ved Institut for Farmaci, Islands Universitet.

Bedre smertebehandling efter operation

Lægemiddelstoffet paracetamol er meget anvendt til smertebehandling efter operationer. Flere undersøgelser tyder imidlertid på, at de anbefalede doser er for små.

Fig. 1



Af Tina Hahn, Janne Rømsing og Mette Rasmussen

Når patienter har brug for smertelindring efter operationer, er paracetamol alene eller i kombination med morfika i dag førstevalget indenfor gruppen af svage smertestillende lægemidler.

Selv om paracetamol bruges i stort omfang, er det først nu, at der bliver sat fokus på sammenhængen mellem dosis og den smertestillende effekt.

Dét er der i høj grad brug for. Flere undersøgelser viser, at de anbefalede doser af paracetamol ikke har en tilstrækkelig virkning på postoperative smerter.

Ingen studier af dosis og effekt

Vi har netop afsluttet en undersøgelse, der viser, at standarddoser af paracetamol på 60 mg/kg/døgn som tabletter og 90 mg/kg/døgn som stikpiller indgivet med faste intervaller ikke er tilstrækkelige til at forebygge stærke smerter tre

dage efter operationen hos børn, der har fået fjernet mandlerne.

Den utilfredstillende effekt kan have flere årsager. Muligvis er den effektive dosis af paracetamol højere end den anbefalede. Specielt med hensyn til rektal dosering kan dette være tilfældet, fordi biotilgængeligheden er lav, når paracetamol gives som stikpiller.

Ydermere er der meget stor variation fra person til person i forholdet mellem dosis og koncentrationen i blodet ved rektal dosering. En foreløbig undersøgelse har vist, at maksimumkoncentrationerne efter enkeltindgift til børn har en spredning på 64 procent.

Endelig er det uvist, hvilken koncentration i blodet, man skal søge at opnå, fordi der aldrig er foretaget dosis/respons studier af paracetamols smertestillende effekt.

Doser valgt ud fra virkning på feber

Paracetamol lindrer ikke blot smerter, men virker også febernedsættende. De doser, som i dag anvendes i smertebehandlingen, er valgt ud fra dosis/respons-forholdet for paraceta-

En frivillig forsøgsperson får induceret en 1. grads forbrænding med et varmelegeme. Ved anvendelse af kunstigt påførte smerter opnås en højere grad af standardisering end hos patienter efter en operation.

mols febernedsættende virkning - altså en helt anden effekt.

For de fleste lægemidler er der en sammenhæng mellem den koncentration af lægemidlet, som opnås i forskellige kropsvæsker og virkningen. Dog skal koncentrationen op over et bestemt tærskelniveau, før man opnår en virkning. En dosis af et lægemiddel, som resulterer i en koncentration, der ligger under dette tærskelniveau, er altså nytteløs.

Det er muligt, at de doser af paracetamol, der anvendes i dag, giver koncentrationer, som ligger under tærskelværdien for den smertestillende effekt.

Nu undersøges den smertestillende effekt

Vi undersøger nu sammenhængen mellem den smertestillende effekt og koncentrationen af paracetamol i forskellige kropsvæsker.

For at få afklaret, om effekten er betinget af koncentrationen i hjernen målt i rygmarsvæsken og/eller af koncentrationen i blod, undersøges sammenhængen mellem disse koncentrationer og lægemidlets smertestillende virkning.

Fig. 2

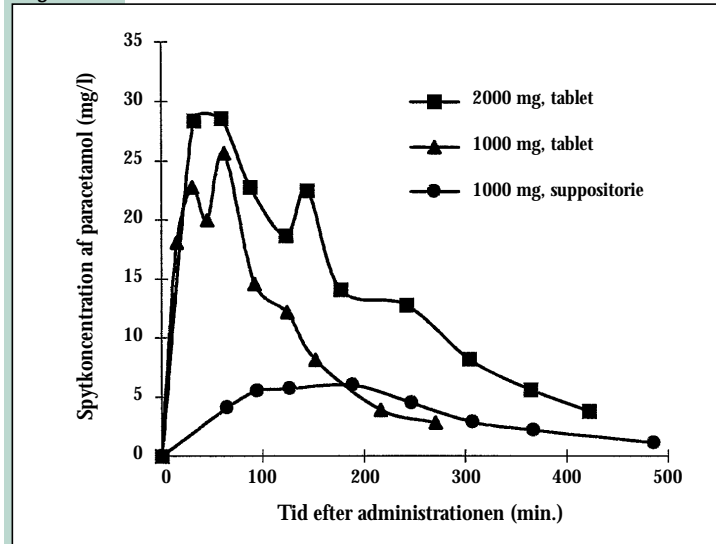
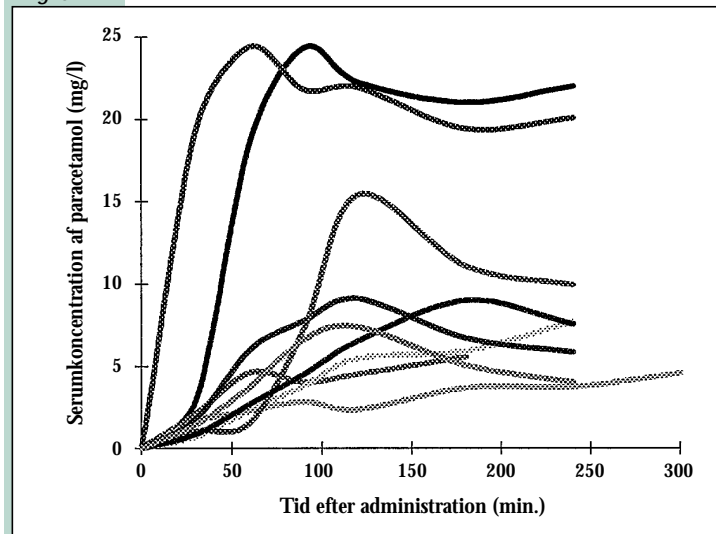


Fig. 3



Der er stor forskel på koncentrationen af paracetamol i blodet, når lægemidlet gives som stikpiller. Kurverne viser koncentrationerne hos ni børn der har fået 25 mg. pr. kg.

Samtidig undersøger vi, om spyt-koncentrationen er et godt spejl af serumkoncentrationen hos både børn og voksne i dagene efter en operation. Håbet er, at behandlingen kan styres og justeres uden, at det er nødvendigt at "stikke" for at tage blodprøver. De hidtidige resultater lover godt. Hos raske voksne optræder koncentrationen af paracetamol i serum og spyt i forholdet 1:1.

Der er planlagt flere kliniske undersøgelser til afklaring af forholdet imellem paracetamols koncentration i kropsvæsker og den smertestillende effekt. I to undersøgelser følges voksne patienter i de første timer efter operationen.

Her tages der prøver af blod, rygmarsvæske og spyt. Samtidig angiver patienten sin smerte på en smerteskala. Patienten sætter en streg på en vandret linie, hvor den ene ende repræsenterer "ingen

Koncentrationen af paracetamol i spyt kan måske bruges som en nem indikator for lægemidlets smertestillende effekt. Grafen viser spyt-koncentrationerne hos en rask forsøgsperson efter tre forskellige doser. Det febernedsættende område ligger mellem 10 og 20 mg/l, mens området for den smertestillende effekt muligvis er højere.

smerte" og den anden ende "uudholdelig smerte".

Model i stedet for naturlige smerter

I en anden undersøgelse, som er dobbeltblind og placebokontrolleret, får frivillige forsøgspersoner induceret en 1. grads forbrænding, svarende til en solskoldning, ved hjælp af et varmelegeme. Under opvarmningen, som varer 7 minutter, angiver deltagerne deres smerte på smerteskalaen.

Ved at anvende kunstigt påført smerte opnår vi en højere grad af standardisering, og den variation mellem personer, der især er forbundet med kvantisering af smerter, kan udelukkes. Undersøgelserne har også den fordel, at smerten ikke er forbundet med nervøsitet, som det ofte er tilfældet med postoperative smerter.

Langvarige smerter hos børn

Efter større operationer hos børn, hvor der er et længerevarende behov for at lindre smerter, benyttes ofte gentagen indgift af paracetamol som stikpiller i kombination med morfinpræparater. Stikpillerne anvendes, fordi børn kan have besvær med at sluge tabletter eller på grund af kvalme, som ofte optræder i forbindelse med morfinpræparater.

Selvom dette doseringsskema benyttes i vid udstrækning, er forholdene dårligt belyst. Derfor er en undersøgelse nu iværksat for at afklare, hvordan forholdet mellem dosis og koncentrationen i blod er hos børn, når paracetamol gives over en længere periode.

Effektiv dosering af paracetamol

Resultaterne af undersøgelserne kan få stor betydning for optimeringen af den postoperative smertebehandling af både børn og voksne.

Hvis der er god korrelation mellem koncentrationen af paracetamol i blod eller rygmarsvæske og den smertestillende effekt, kan det udnyttes til at fastlægge effektive doseringsskemaer til behandling af smerter efter operationer. Sammen med data om den enkelte patient kan resultaterne også fremme en individualisering i smertebehandlingen.



Cand.pharm. Tina Hahn er Ph.D.-studerende ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm., Ph.D. Janne Rømsing er adjunkt ved Institut for Farmaci.



Lic.pharm. Mette Rasmussen er lektor ved Institut for Farmaci.

Lægemedler kan medføre allergi

Når medicin omdannes i kroppen, er produkterne i nogle tilfælde årsag til allergiske reaktioner. Øget forståelse af processerne kan føre til forbedret design af nye lægemidler.

Af Ulla Grove Sidelmann og Steen Honoré Hansen

Hovedpine og gigtsmerter behandles i vid udstrækning med en gruppe lægemidler, der kaldes non-steroidale antiinflammatoriske lægemidler (NSAID-stoffer). Typiske eksempler er ibuprofen, naproxen og acetylsalicylsyre.

Nogle af disse lægemiddelstoffer medfører hyppigt allergi hos brugerne, og derfor er flere af dem, f.eks. zomepirac, benoxaprofen, indoprofen og alclofenac, nu trukket tilbage fra klinisk anvendelse.

De allergiske reaktioner opstår sandsynligvis ved, at nogle af de stoffer, som lægemidlerne omdannes til i organismen, binder sig til proteiner i blodplasma. Det er disse lægemiddel-protein komplekser, som forårsager allergi hos brugerne.

Når NSAID-lægemedler omsættes i organismen, dannes der acylglucuronider, som kan kobles til proteiner. Man har her fundet ud af, at der er sammenhæng mellem høj reaktivitet af acylglucuroniderne og den høje hyppighed af allergiske reaktioner.

Derfor er det i vores interesse at undersøge de faktorer, der har indflydelse på lægemiddelstoffers evne til at danne acylglucuronider. Samtidig er det vigtigt at kende disse glucuroniders reaktivitet og dermed deres evne til at danne komplekser med proteiner i organismen.

Derigennem håber vi at kunne forudsige et nyt lægemiddelstofs evne til at forårsage allergiske reaktioner under terapeutisk anvendelse.

Omdannelse af glucuroniderne
NSAID-stoffer og andre lægemidler, der indeholder en carboxylsyregruppe, danner de såkaldte β -1-O-acylglucuronider i organismen. Disse glucuronider kan derefter omdannes på tre forskellige måder i kroppen.

Med hensyn til stoffernes evne til at fremkalde allergi er den vigtigste af de tre reaktioner acylmigrering. Jo mere reaktive glucuroniderne er, jo hurtigere forløber acylmigreringen, og jo større er lægemidlets evne til at danne komplekser med proteiner og derved fremkalde allergi.

Acylmigreringen foregår ved, at selve lægemiddelstoffet flyttes fra sin oprindelige plads i glucuronidet over på de hydroxylgrupper, der stikker ud fra glucuronsyremolekylet. Der er tre led i processen, hvor lægemiddelstoffet hver gang rykker videre til den næste hydroxylgruppe på glucuronsyre.

Under forløbet dannes der altså tre nye varianter af glucuronidet.

Reaktionerne opstår spontant i kroppen, og alle tre omdannelsesprodukter i reaktionskæden kan binde til proteiner i organismen.

Glucuronidernes reaktivitet kan vurderes ud fra, hvor hurtigt acylmigreringen forløber - jo kortere halveringstid jo mere reaktive glucuronider. Halveringstiden er den tid, der går, inden halvdelen af det oprindelige β -1-O-acylglucuronid er omdannet til de tre varianter, der kaldes henholdsvis β -2-O-acyl, β -3-O-acyl og β -4-O-acyl isomerer.

Reaktionen fra β -1-O-acylglucuronid til β -2-O-isomeren er irreversibel, men de øvrige omdannelses-trin fra β -2-O-acyl over β -3-O-acyl til β -4-O-acyl kan løbe begge veje.

Adskillelse og strukturopløsning

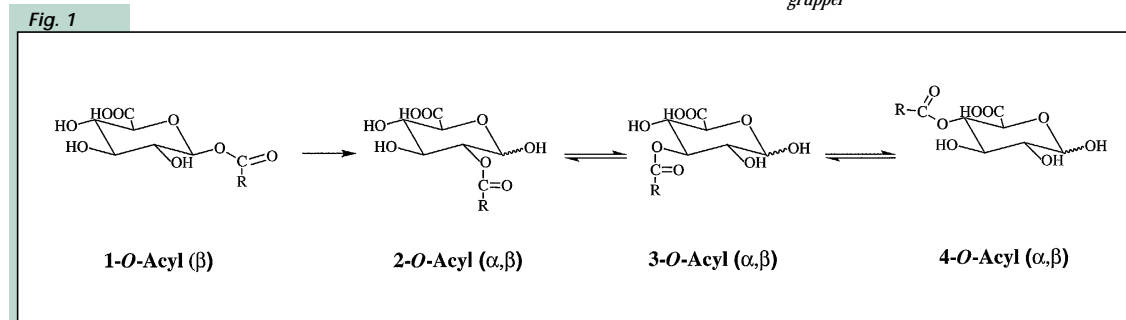
Man står over for en svær analytisk problemstilling, når man skal måle acylmigreringshastigheder, fordi man skal kunne skelne mellem meget nært beslægtede stoffer, der hele tiden hurtigt omdannes til hinanden.

Kernemagnetisk resonans (NMR) er en optimal teknik til at identificere de forskellige glucuronider, der dannes som følge af acylmigrering. NMR-teknikken udmærker sig ved at kunne bestemme strukturen af nært beslægtede stoffer selv i meget komplekse blandinger.

Oftentimes er det dog nødvendigt at adskille komponenterne i blandingerne fra hinanden, inden selve strukturopløsningen. Det gøres normalt ved hjælp af højtryks væskechromatografi (HPLC).

Inden for de seneste år er det blevet muligt at koble HPLC direkte

Tegningen viser acylmigrerings reaktioner for acylglucuronider. Den oprindelige udgave β -1-O-acylglucuronid har lægemiddelstoffet (R) koblet til carbonyl-carbon (C). Man ser tre hydroxylgrupper (OH) stikke ud fra glucuronsyremolekylet. Ved den første acylmigrering flyttes carbonyl-carbon med lægemidlet over på den nærmeste hydroxylgruppe, hvorved β -2-O-acyl-forbindelsen dannes. Ved de to følgende reaktioner flyttes gruppen hen på de næste hydroxylgrupper



med NMR. Herved kan man først adskille ukendte stoffer og derefter opklare deres struktur enkeltvis. Ved et sådant direkte-koblet HPLC-NMR eksperiment er det muligt at lave analyser, der ellers ville være uhyre tidskrævende.

I den her beskrevne problemstilling var det muligt at skille samtlige glucuronider ad og derefter direkte identificere dem enkeltvis.

Når de enkelte glucuronider først er adskilt, kan man isolere de forskellige varianter, der dannes som følge af acylmigreringen, i NMR magneten. Ved hjælp af direkte-koblet HPLC-NMR kan deres individuelle acylmigreringsreaktioner derefter følges online ved at optage NMR-spektre med givne tidsintervaller.

På den måde kunne vi få oplysninger om de enkelte glucuroniders omdannelse til de før nævnte varianter. Ved hjælp af NMR-spektrene er det samtidig muligt at optegne koncentrationen af de forskellige varianter som funktion af tiden, og ud fra disse kurver kan de individuelle acylmigreringshastigheder derefter bestemmes.

Model viser allergirisiko

Der er blevet indsamlet information omkring sammenhængen mellem strukturen af lægemiddelstoffer og reaktiviteten af deres acylglucuronider. Det er gjort ved at bestemme halveringstider for acylmigreringen af modelglucuronider.

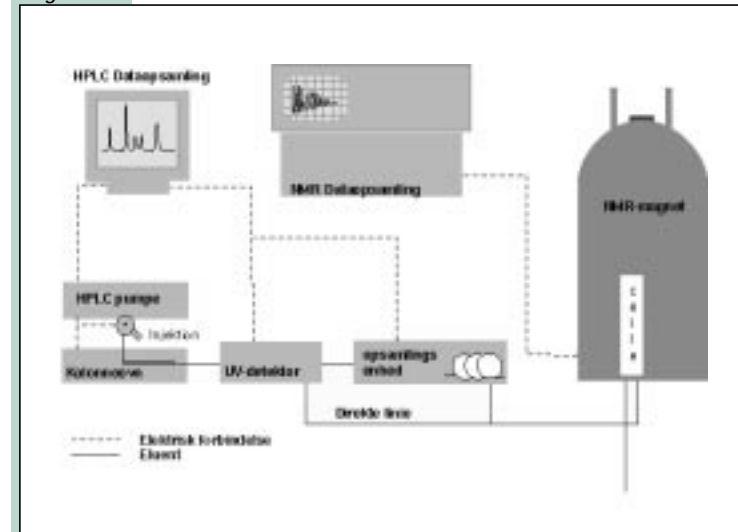
Det blev erfaret, at både strukturelle og elektroniske faktorer har betydning for glucuronidernes reaktivitet. På det strukturelle plan er det vigtigt, om angrebepunktet for acylmigreringen er let eller svært tilgængeligt. Dette angrebepunkt er carbonyl-carbon i carboxylsyregruppen.

På den elektroniske side er det vigtigt, hvor stor den positive ladning af carbonyl-carbon er. Jo større positiv ladning, jo mere modtagelig er carbonyl-carbon for elektroner og jo hurtigere forløber acylmigreringsreaktionerne.

Vi fortsætter nu med at undersøge acylmigreringshastighederne for acylglucuronider af lægemiddelstoffer. Vi håber derigennem at øge vores viden omkring de fysisk-kemiske forhold, der bestemmer acylglucuronidernes reaktivitet og de relaterede allergiske reaktioner, der observeres hos brugerne af lægemidlerne.

Derigennem kan man opstille forbedrede designkriterier for nye lægemiddelstoffer, der indeholder en carboxylsyregruppe.

Fig. 2



Ved hjælp af direkte koblet HPLC-NMR er det muligt at adskille de forskellige acylglucuronider og bestemme strukturen af dem. Princippet er, at man først adskiller sine stoffer i det chromatografiske system og leder dem enkeltvis hen til gennemstrømningscellen i magneten, hvor NMR-spektrene optages. De enkelte stoffers acylmigreringsreaktioner kan følges ved at optage NMR-spektre med givne tidsintervaller.



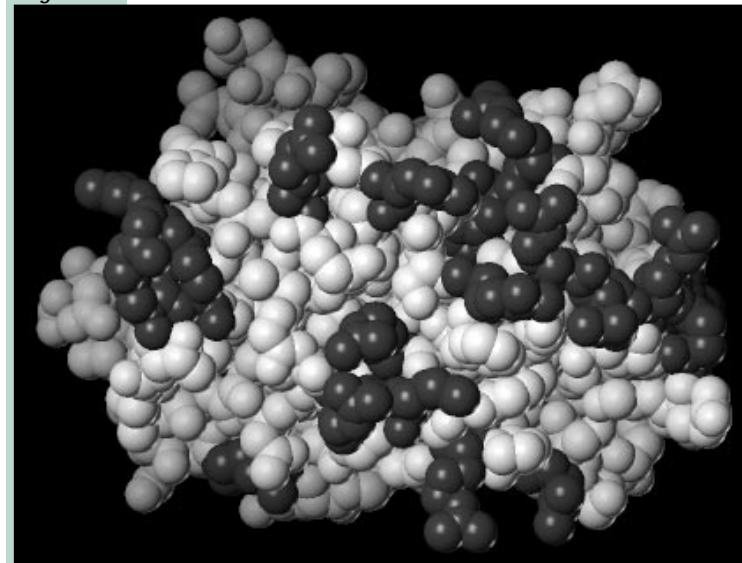
Cand.pharm., Ph.D. Ulla Grove Sidelmann er adjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



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

Protein kan føre til behandling af septisk shock

Fig. 1



Figuren viser hvordan atomerne, som udgør HBP, er placeret. I mørke farver ses atomerne, der formodes at binde til heparin.

Bakterielle infektioner kan medføre døden ved septisk shock, fordi et overaktivt immunforsvar får organerne til at svigte. Opdagelsen af proteinet HBP kan føre til en effektiv behandling.

Af Lars Fogh Iversen, Jette Sandholm Kastrup og Ingrid Kjølter Larsen

Trods medicinske fremskridt i behandlingen af blodforgiftning med septisk shock, findes der i dag ingen effektiv behandling mod denne sygdom, som ofte har dødelig udgang.

Nye forskningsresultater tyder imidlertid på, at der med opdagelsen af Heparin Binding Protein (HBP) åbnes mulighed for at udvikle en effektiv behandling.

HBP har flere funktioner og besidder en række egenskaber, som alle er rettet mod immunforsvaret og bekæmpelse af bakterielle infektioner. Proteinet bliver frigivet fra de hvide blodlegemer, når de skal nedkæmpe en infektion.

I samarbejde med Novo Nordisk A/S har vi bestemt strukturen af HBP, og vi arbejder nu med at opklare proteinets biologiske funktioner.

Shock skyldes gift i bakterier

I et klassisk forsøg, som blev udført sidst i det 19. århundrede i Berlin, demonstrerede Richard Pfeiffer, at varmeinaktiverede kolerabakterier kunne fremkalde en række sygdomstilstande i forsøgsdyr, deriblandt irreversibelt, dødeligt forløbende shock.

Det giftige materiale var resistent overfor varmebehandling og måtte derfor være forskelligt fra det kendte, varmfølsomme giftstof, som kolerabakterien udsender. Observationen fik Pfeiffer til at postulere, at det nye giftstof var bundet til bakteriens cellekrop. Han kaldte derfor giftstoffet for et endotoksin, hvilket betyder internt giftstof.

Mekanismen bag blodforgiftning

Senere er det blevet kendt, at mange såkaldt gramnegative bakterier har giftstoffer med de samme egenskaber som endotoksinet fra kolerabakterien.

Mekanismen bag sepsis begynder simpelt, men ender komplekst. Forløbet kan starte med en bakteriel infektion, som går i blodbanen, eller som udvikler sig på infektionsstedet og sender store mængder af bakterielle produkter ud i blodet.

De primære igangsættere af blodforgiftning og septisk shock er de bakterielle endotoksiner. Endotoksinerne aktiverer immunforsvarets hvide blodlegemer, der frigiver kaskader af stoffer, som i mange tilfælde har en selvaktiverende mekanisme, eller som tænder for andre typer aktiverende stoffer. Denne overaktivering af immunforsvaret fører til blodtryksfald, organsvigt og i sidste ende til døden.

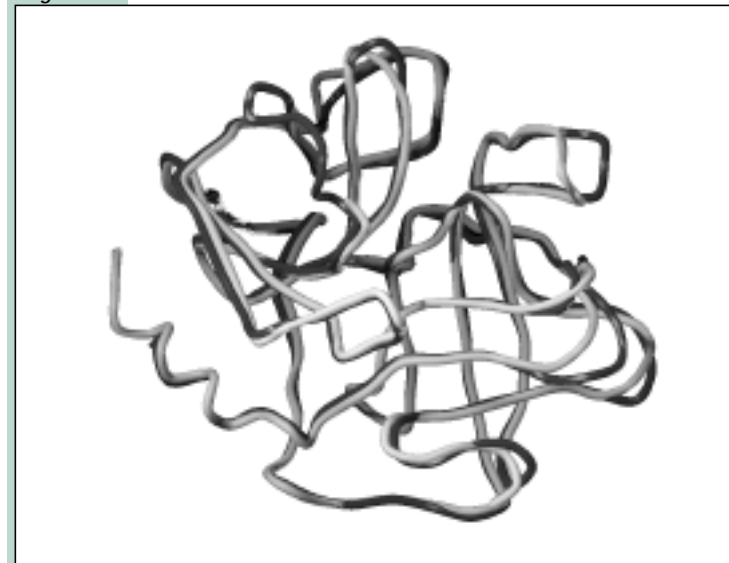
Endotoksiner kommer fra bakteriers overflade og udgør sammen med fedtstoffer og proteiner den ydre membran hos gramnegative bakterier. Endotoksin er et relativt stort molekyle, der består af to dele: En stor og varieret sukkerkæde, som normalt stikker ud fra bakteriens overflade, samt en fedtstofkomponent, kaldet Lipid A, der sidder fast som et anker i bakteriens membran.

Det er Lipid A, som indeholder alle de giftige egenskaber af endotoksin.

HBP i sepsis-behandling

Når HBP bliver frigivet fra de hvide blodlegemer, hæfter det sig til sukkermolekylet heparin i vævet mellem cellerne samt til heparansulfater, som findes på overfladen af de celler, som danner blodkarrene. Herfra udøver proteinet sine virkninger.

Fig. 2



HBP har vist sig at kunne dræbe gramnegative bakterier. Denne egenskab skyldes sandsynligvis, at HBP binder stærkt til Lipid A på endotoksinet. I løbet af de sidste 20 år har der været en række forsøg på at behandle blodforgiftning ved neutralisering af endotoksin med antistoffer. Denne strategi har vist sig ikke at være brugbar, og derfor formoder vi ikke, at binding af HBP til endotoksin alene kan danne grundlag for en behandling af blodforgiftning og septisk shock; der skal mere til.

Her kan man muligvis udnytte en særlig egenskab ved HBP. Proteinet udsender nemlig signaler, der fortæller immunforsvarets virkelige skraldemænd, monocytterne, at de skal vandre hen til det sted, hvor infektionen finder sted og æde bakterierne.

Hvis dét sker tilstrækkeligt effektivt, vil infektionen blive bremset. Hermed kan man undgå, at immunforsvaret koger over og ødelægger kroppens vitale organer.

Sammenligning af proteinkæderne af HBP (i lyse farver) og en serinprotease (i mørke farver). Figuren viser hvordan hovedkæden af proteinerne løber for at danne den tredimensionelle struktur af proteinet. Kun i yderområderne af de to proteiner løber kæderne forskelligt. Dette viser, at proteiner med forskellige funktioner godt kan have samme opbygning.

Håbet om at udvikle en effektiv behandling mod septisk shock er baseret på, at monocytternes aktivitet muligvis kan stimuleres ved at bruge HBP som lægemiddelstof.

HBP's struktur giver vigtige oplysninger

For at en sådan strategi kan lykkes, er det nødvendigt at kende den rumlige struktur af den receptor på monocytterne, som HBP binder sig til. Det er en forudsætning for at finde ud af, hvordan HBP tilkalder og aktiverer monocytterne.

Endnu er det ikke lykkedes at isolere receptoren og opklare dens struktur, men vi kender nu den rumlige opbygning af HBP. Kendskabet til strukturen af proteinet vil gøre det lettere at finde receptoren på monocytterne, da HBP efter alt at dømme passer ind i receptoren som en nøgle i en lås.

Strukturen af HBP er blevet bestemt ved hjælp af proteinkrystallografi, hvor alle atomernes positioner i proteinet er blevet kortlagt.

På den ene side af HBP molekylet har vi lokaliseret det område, der binder til heparin. På en af de andre sider af HBP molekylet regner vi

med at finde bindingsstedet for endotoksin, og sandsynligvis også det område på HBP molekylet, hvorfra signalet sendes til monocytterne om, at de skal vandre mod infektionsstedet.

HBP ligner kendte enzymer

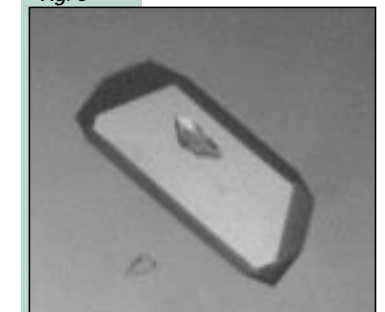
Ordsproget om, at man skal ligne dem, man bevæger sig iblandt, passer på HBP. Sammen med HBP frigives en stribe andre proteiner fra de hvide blodlegemer, blandt dem mange såkaldte serinproteaser. Det er enzymer, som nedbryder proteiner i vævet, så vævet bliver lettere gennemtrængeligt for de celler, der kommer senere i infektionsbekæmpelsen.

HBP er over millioner af år ændret fra at være en serinprotease til at have en unik rolle i immunforsvaret. HBP's kernestruktur ligner serinproteasernes, men yderområderne er anderledes. Det er i disse yderområder af HBP, at vi forventer at finde grundlaget for HBP's monocytaktivering og binding til endotoksiner.

Krystaller af HBP for første gang

HBP har som en række andre proteiner sukkerkæder bundet til sin overflade. Sukkerkæderne bringer ofte uorden i krystallen, fordi de stikker ud fra proteinet og er meget forskellige i deres struktur. Til trods for sukkerkæderne har vi opnået diffraktionsdata på vores krystaller af HBP med en detaljeringsgrad, der ikke tidligere er beskrevet i litteraturen for denne type af proteiner. De gode krystaller er opnået efter halvandet års intenst arbejde i laboratoriet.

Fig. 3



HBP krystal egnet til dataopsamling. Krystallen er 0.5 x 0.2 x 0.2 mm stor, hvilket er en normal størrelse for en proteinkrystal.



Cand.pharm. et scient. Lars Fogh Iversen er Ph.D.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



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



Lic.pharm. Ingrid Kjølter Larsen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Metalioners rolle i sygdom og sundhed

Alle levende organismer kræver metalioner for at kunne eksistere. Derfor er en øget forståelse af samspillet mellem metaller og biologiske molekyler af afgørende betydning for udvikling af nye lægemidler.

Af Ole Farver

Et af de mest fascinerende og hurtigst ekspanderende områder i den kemiske forskning er samspillet mellem store biologiske molekyler og metalioner. Fagområdet kaldes biouorganisk kemi.

Metaller indgår i et væld af livsvigtige funktioner som respiration, stofskifte, nervetransmission, muskelsammentrækning og beskyttelse mod giftstoffer. Samtidig er metaller aktive i knap halvdelen af alle kendte enzymer, og i cellemembranerne er tilstedeværelsen af bestemte metalioner essentiel.

Metaller er altså af fundamental betydning for helbredet, og både underskud og overskud kan medføre alvorlige sygdomme. Derfor vil den moderne biouorganiske kemi fremover udgøre en vigtig del af grundlaget for rationel udvikling af nye lægemidler.

Kobber, oxidation og frie radikaler

Undersøgelser af mulige årsager til celleforandringer er et område, hvor forskningen i biouorganisk kemi har farmaceutiske perspektiver. Viden om, hvordan og hvorfor cellerne ældes, kan få stor betydning for udviklingen af nye lægemidler, både i forbindelse med forebyggelse af sygdomme og egentlig medicinsk behandling.

En central mekanisme i de cellulære aldringsprocesser er de såkaldte redoxprocesser, hvor biologiske molekyler oxideres ved fjernelse af elektroner eller reduceres ved tilførsel af elektroner.

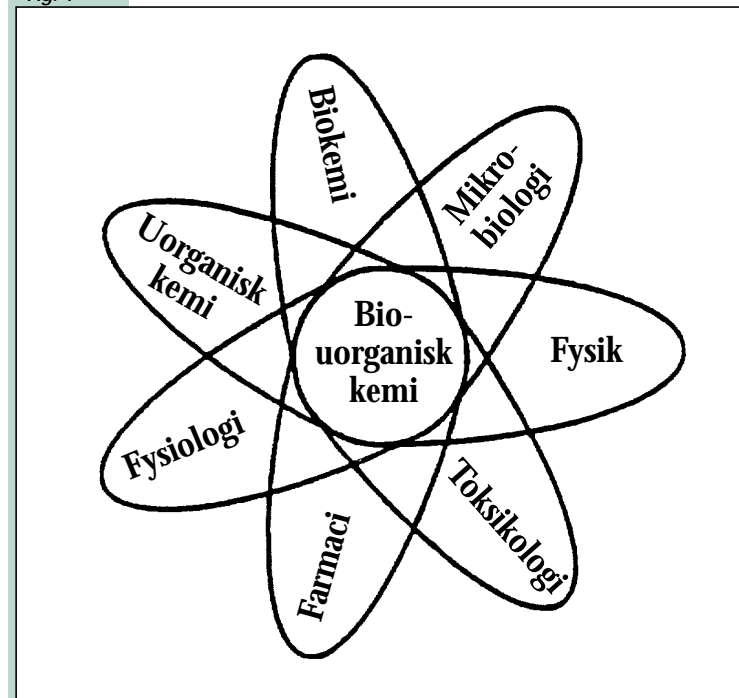
Jeg har gennem tyve år sammen med forskere på Weizmann Institut-

tet i Israel foretaget både eksperimentelle og teoretiske studier af elektrontransport gennem biologisk materiale i et forsøg på at forstå, hvordan redoxprocesserne kan styres og kontrolleres i humane og bakterielle proteiner.

I visse situationer kan der dannes store koncentrationer af stoffer, som frigør kobber fra humane proteiner under dannelse af frie radikaler, hvorved der skabes det ideelle miljø for oxidering af kolesterol, hvilket bl.a. kan bidrage til udvikling af åreforkalkning. Større viden på dette område vil kunne skabe grundlag for anvendelse af mere specifikke antioxidanter som lægemidler.

Det samme gælder for et andet hyppigt forekommende problem, som sandsynligvis forårsages af frie kobberioner: Disse kan katalysere produktion af meget aggressive radikaler, som bl.a. vil kunne ødelægge blodkarrene og hermed nedsætte blodtilførselen til hjertet (iskæmi), hvilket kan føre til hjertestop.

Fig. 1



Kobber og mental retardering

Fejl i cellernes omsætning af kobber spiller en central rolle i Menkes sygdom og i Wilsons sygdom. Begge er sjældne arvelige former for mental retardering.

Menkes sygdom giver sig udtryk i en hastigt fremadskridende ødelæggelse af blodkar og nerveceller, hvilket medfører døden i en tidlig alder. Disse symptomer skyldes nedsat produktion af det kobberholdige enzym ceruloplasmin, som findes i blodplasma, og som har en afgørende betydning for kobberbalancen i den menneskelige organisme. Produktionen af enzymet er nedsat på grund af en defekt i et intracellulært kobbertransport protein.

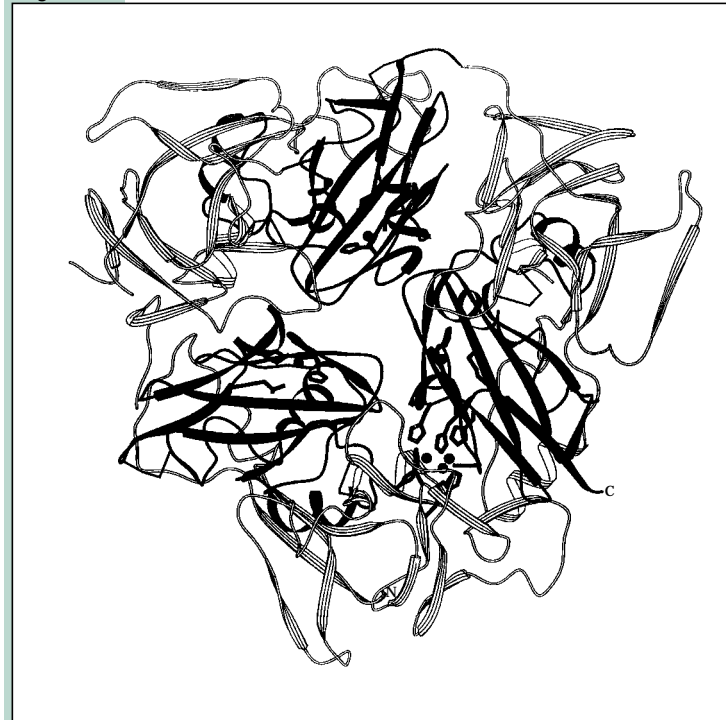
I 1993 isolerede dr. med. Nina Horn fra Kennedy Institutet sammen med Ph.D. Zeynep Tümer genet for Menkes sygdom. Hermed er det blevet muligt at producere det defekte kobbertransportprotein i tilstrækkelige mængder til, at man kan foretage kemiske undersøgelser af det.

Jeg har netop startet et Ph.D. projekt sammen med cand. pharm. Pia Y. Jensen med det formål at studere bindingsforholdene for kobber i både det intakte og det defekte transportprotein. På den måde kan et biouorganisk projekt medvirke til behandling af en alvorlig sygdom.

Wilsons sygdom skyldes forgiftning på grund af kobberophobning i

Biouorganisk kemis placering som et interdisciplinært forskningsområde.

Fig. 2



Enzymet ceruloplasmin spiller en vigtig rolle bl.a. i Menkes sygdom, der skyldes en fejl i kobberstofskiftet på grund af nedsat produktion af enzymet. Her ses den tredimensionale struktur af ceruloplasmin. Kobberatomernes placering er angivet med sorte cirkler.

lever og hjerne. Hidtil har den eneste behandling været med præparater af penicillamin-typen. Sygdommen forårsages af en defekt i et leverspecifikt kobberprotein. Genetiske studier har vist, at ceruloplasmin har stor betydning i forbindelse med Wilsons sygdom, ligesom det er tilfældet med Menkes sygdom.

Helt generelt er der påvist en tæt sammenhæng mellem kobber og jernoptagelse i cellerne, men det er forbløffende, så lidt vi ved om transporten af disse metalioner på molekylært niveau. Ceruloplasmin synes imidlertid at have en væsentlig rolle også i jernstofskiftet.

Sygdommen systemisk hemosiderose, der medfører ophobning af jern inde i cellerne, menes således at være forårsaget af en fejl i sammensætningen af aminosyrerne i humant ceruloplasmin. Defekten bevirker, at overskydende jern ikke fjernes, hvorved cellerne forgiftes. Jeg samarbejder med en britisk gruppe omkring jern-kobber stofskiftet og sammenhængen med ceruloplasmin.

Kvælstofilte, jern og hjernens signaler

Kvælstofilte, et ganske lille molekyle bestående af blot ét iltatom og ét kvælstofatom, har vist sig at spille en kolossal vigtig rolle i mange biologiske sammenhænge, f.eks. ved muskelafspænding, regulering af blodtrykket og i immunforsvaret.

Sidst, men ikke mindst, dannes kvælstofilte i visse hjerneceller. Her bindes molekylet til jern i et enzym og starter produktionen af stoffer, der medvirker til signaloverførsel mellem hjernens nerveceller. I den forbindelse samarbejder jeg med tyske forskere omkring de enzymprocesser i hjernen, hvor der dannes forbindelser mellem jern og kvælstofilte.

Metaller som gift og som lægemidler

Det er velkendt, at metaller kan være giftige for mennesker: klassiske eksempler er tungmetalforgiftning med cadmium, kviksølv og bly. Men også de livsnødvendige metaller som zink, kobber og jern er giftige, når de forekommer i for store mængder.

Studier af de naturlige reguleringsmekanismer samt udvikling af analytiske værktøjer og fremstilling af nye kemiske stoffer til binding af bestemte metaller er et andet vigtigt aspekt af det hastigt voksende forskningsfelt i grænseområdet mellem biouorganisk kemi og medicin.

Et bredt udvalg af metalholdige forbindelser har i mange år været benyttede som lægemidler. To produkter er baseret på metallerne platin og guld, som ellers ikke findes i organismen. Cis-platin bliver benyttet i stor udstrækning ved behandling af visse kræftformer, mens det guldholdige lægemiddel auranofin anvendes til behandling af leddegigt. Men der er stadig et stort behov for forskning omkring design og udvikling af nye specifikke metalbaserede lægemidler.

Der er ingen tvivl om, at den grundvidenskabelige forskning i fundamentale biouorganiske processer vil vokse kolossalt i de kommende år, og den opnåede viden vil kunne danne basis for en mere rationel og målrettet udvikling af nye lægemidler.



Dr.scient. Ole Farver er docent ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

Immunforsvarets og nervesystemets rolle i stress

Forskning i kommunikationen mellem immunforsvaret og nervesystemet kan føre til bedre forebyggelse af sygdomme, som skyldes stress.

Af Erik Wind Hansen, Dorte Malling og Jens Dencker Christensen

Det er en gammel folkelig erfaring, at stress - såvel psykisk som fysisk - kan være sygdomsfremkaldende.

I de senere år er der udført en hel del videnskabelige studier, som belyser, hvordan stress påvirker immunforsvaret. Undersøgelserne er typisk foretaget på studenter eller på depressive patienter.

I eksamensperioder har studenterne symptomer, som tyder på en hæmning af immunforsvaret. Det samme gælder for andre befolkningsgrupper, som er udsat for belastende begivenheder, f.eks. ægteskabsproblemer, overarbejde, voldsomme fysiske belastninger og arbejdsløshed.

Sammenfattende kan man sige, at stress kan påvirke immunforsvaret og medføre øget sygdom, som f.eks. kan give sig udslag i, at man lettere bukker under for infektioner.

Vi arbejder med at forklare kommunikationen mellem immunsystemet og nervesystemet. En forståelse heraf vil selvsagt åbne nye muligheder for at udvikle behandlingsmetoder til forebyggelse af sygdomme, som skyldes stress.

Immunforsvaret og infektioner

Når mennesker udsættes for en infektion, udskiller nogle hvide blodlegemer, makrofagerne, en type signalstoffer, som kaldes cytokiner. Cytokinerne regulerer immuncellernes specialisering og modning, men de medvirker også til at skabe de ændringer i stofskiftet og fysiologien, der ledsager en infektion. F.eks. er feber, nedsat appetit og øget søvnbehov fremkaldt af cytokiner.

Cytokiner er altså immunforsvarets signalstoffer og produceres i immunceller. Nu har det imidlertid vist sig, at disse stoffer også kan produceres af nervecellerne og deres støtteceller.

Ydermere er nerveceller udstyret med receptorer for cytokiner. Hermed er der altså mulighed for, at cytokiner kan påvirke nervesystemet.

Signaler mellem de to systemer

Nervesystemets egenskaber er bl.a. betinget af nervecellernes evne til at danne og frigive signalstoffer. Som eksempel på sådanne stoffer kan

nævnes oxytocin og vasopressin.

Det er i de senere år blevet klart, at mange immunceller også er i stand til at producere neuronale signalstoffer samt, at cellerne har receptorer for disse stoffer.

De fælles elementer i de to systemer muliggør en kommunikation mellem systemerne. Som et eksempel på dette samspil vil vi beskrive et projekt, der udføres her på instituttet.

Projektet fokuserer på frigørelsen af to af nervecellernes vigtige signalstoffer, hormonerne oxytocin og vasopressin.

Oxytocin har betydning i forbindelse med fødsler, mens vasopressin kontrollerer kroppens vand- og saltbalance. Samtidig øges udskillelsen af de to hormoner ved bakterielle infektioner.

Cytokiner påvirker hormonfrigørelsen

Oxytocin og vasopressin dannes i hjernedelen hypothalamus og transporteres derpå hen til neurohypofysen, hvorfra de frigives til blodet ved passende stimuli.

Når man skal undersøge, hvordan bakterieinfektioner påvirker udskillelsen af de to hormoner, anvender man ofte injektion af lipopolysakkarid som modelsystem. Det skyldes, at lipopolysakkarid er hovedansvarlig for bakteriers stimulering af immunforsvaret.

Injektion af lipopolysakkarid til rotter er i stand til akut at øge koncentrationen af oxytocin og vasopressin i blodplasma. Denne effekt fandt vi meget vel kunne være startet via udsendelse af cytokiner, da indgift af lipopolysakkarid netop er kendt for at fremkalde sekretion af cytokiner.

Vi var nu i stand til at vise, at injektion af cytokinet interleukin-1 β til kaniner medførte en kraftig stigning af frigivelsen af oxytocin.

Vi undersøgte derpå, om cytokinet havde en direkte virkning på nerveenderne i neurohypofysen. Hertil anvendte vi en isoleret neurohypofyse, som blev elektrisk stimuleret på en måde, der svarer til de elektriske signaler ved nerveimpulser.

Neurohypofysen frigiver de to hormoner oxytocin (Ox) og vasopressin (VP), som produceres i hypothalamus. Udsendelsen øges ved bakterieinfektioner. Dette kan skyldes, at en type celler i hjernens immunforsvar, pituicytterne, udsender signalstoffer, cytokiner, som modtages af nervecellerne i neurohypofysen. Her er der altså en direkte kobling mellem nervesystemet og immunforsvaret.

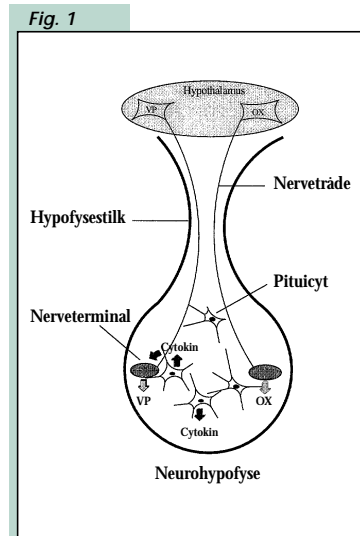
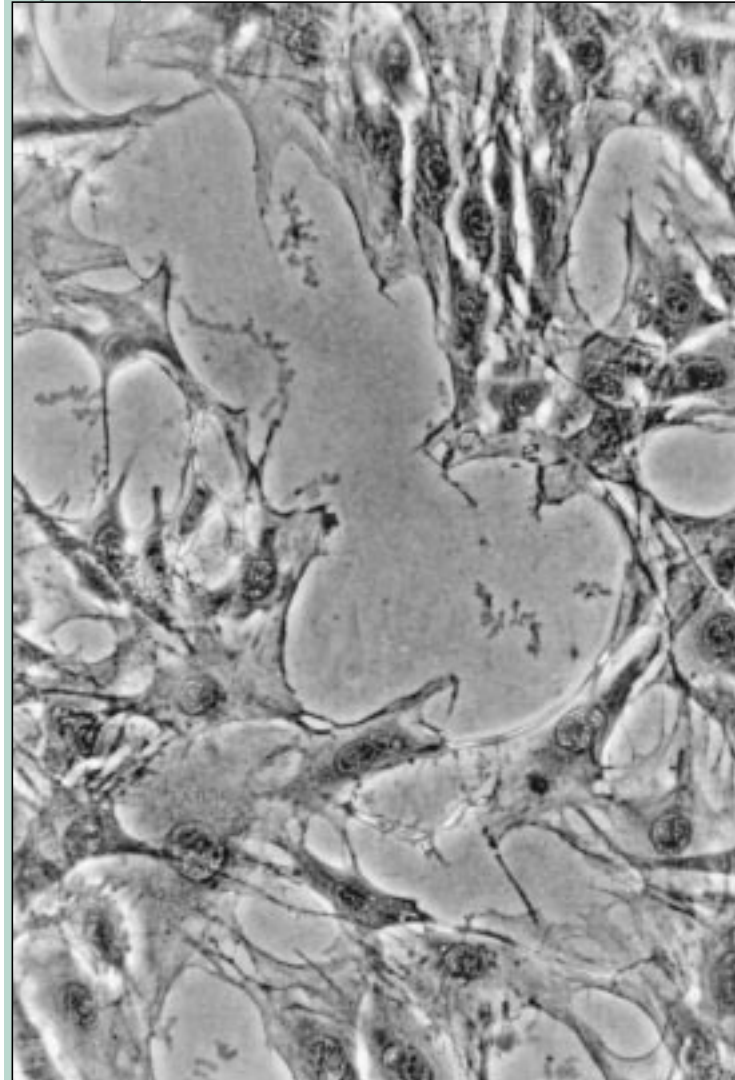


Fig. 1

Fig. 2



Pituicytterne dyrket i 15 dage og derefter farvet med Giemsa. 100 gange forstørrelse.

Forsøg på at måle cytokiner i den frisk isolerede neurohypofyse viste, at den ikke indeholdt cytokiner. Imidlertid kunne vi påvise cytokiner, når neurohypofysen blev stimuleret med lipopolysakkarider.

For nærmere at bestemme kilden til denne cytokinproduktion dyrker vi pituicytterne i cellekulturer (fig. 2). Under normal vækst producerer cellerne en smule cytokin, men hvis de stimuleres med lipopolysakkarid øges produktionen 10-15 gange. Når lipopolysakkarid igen fjernes fra cellerne, falder cytokinproduktionen til et lavt niveau (fig. 3).

Vi mener derfor - den nære kontakt mellem nerveender og pituicytterne taget i betragtning - at have fundet stedet, hvor immunforsvaret og nervesystemet kommunikerer med hinanden i neurohypofysen.

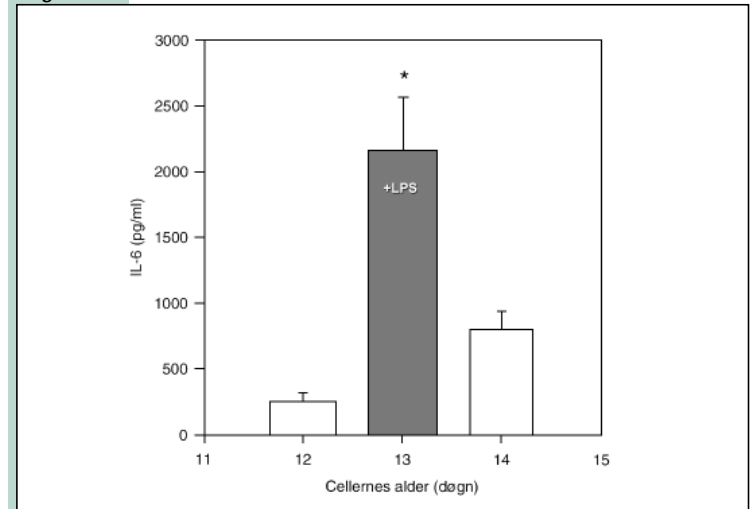
Strømstød af passende styrke medfører frigivelse af oxytocin og vasopressin. Det viste sig, at interleukin-1 β øgede udsendelsen af begge hormoner.

Hvis disse iagttagelser skal have betydning i den levende normale organisme, er det nødvendigt, at cytokinerne kan nå frem til nerveenderne i neurohypofysen. Da der endnu ikke er påvist nerveceller i neurohypofysen med indhold af cytokiner, så synes den eneste mulighed at være, at stofferne kommer via blodet eller ved sekretion fra andre celler i neurohypofysen.

Cytokiner dannes i neurohypofysen

I 1990 blev det påvist, at neurohypofysen indeholder immunceller bl.a. pituicytterne, der indgår i hjernens støttevæv. Disse celler kunne meget vel være i stand til at producere cytokiner, der så vil kunne afgives til nerveenderne.

Fig. 3



Sekretionen af cytokinet IL-6 fra dyrkede pituicytterne blev målt i perioder af 24 timer. Under dag 12 og 14 er sekretionen målt uden stimulation, mens cellerne under dag 13 er stimuleret med 100 ng lipopolysakkarid/ml. LPS skaber samme respons som en bakterieinfektion.



Lic.pharm. Erik Wind Hansen er lektor ved Institut for Biologi.



Stud.pharm. Dorte Malling er skolarstipendiat ved Institut for Biologi.



Lic.pharm. Jens Dencker Christensen er prorektor og lektor ved Institut for Biologi.

Enzym er nøglen til malariaparasittens resistens

Hvert år dør en million mennesker af malaria, og resistente malariaparasitter udgør et stigende problem. Forklaringen på parasittens modstandsdygtighed overfor lægemidler kan måske ligge i strukturen af et enzym.

Af Inge Thøger Christensen, Thomas Lemcke og Flemming Steen Jørgensen

Malaria er en af de mest udbredte sygdomme i verden. Hvert år bliver mere end 100 millioner mennesker smittet, og op mod 1 million dør, fordi de ikke får tilstrækkelig behandling. Malaria er bl.a. forårsaget af parasitten Plasmodium falciparum, som overføres til mennesker, når man bliver stukket af malariamyggen.

Vi kender i dag flere effektive lægemidler, der hæmmer forskellige trin i parasittens livscyklus. Men desværre er malariaparasitten i stand til at ændre nogle egenskaber, så den bliver modstandsdygtig overfor lægemidlerne. Resistente parasitter er derfor et af de alvorligste problemer indenfor malariabehandling.

Forsøg har vist, at malariaparasitten bl.a. kan udvikle resistens ved at ændre opbygningen af bestemte enzymer. Et af de vigtigste er enzymet dihydrofolat reductase.

Hvis man kender den tredimensionelle struktur af et enzym, der påvirkes af et lægemiddel, kan man i princippet forklare, hvorfor lægemidlet virker. På samme måde kan man forklare, hvordan en ændring i

Tredimensionelle strukturer af enzymerne dihydrofolat reductase fra kylling, menneske samt coli- og mælkesyrebakterie. Billedet illustrerer, at de fire enzymer har en fælles kerne, som ses i midten, mens de variable regioner findes på overfladen.

enzymet kan føre til, at lægemidlet bliver virkningsløst.

Vi har derfor opbygget en tredimensionel model af dihydrofolat reductase hos malariaparasitten. Formålet med projektet er at blive i stand til at forklare parasittens resistens på et molekylært niveau. Denne viden vil øge mulighederne for at udvikle lægemidler, som parasitten ikke kan udvikle resistens imod.

Dihydrofolat reductase - en gammel kending

Dihydrofolat reductase er af meget stor betydning for vores celler, fordi enzymet medvirker til opbygningen af nukleinsyrer, der bl.a. er en bestanddel af generne. Cellerne danner hele tiden nye nukleinsyrer, og hvis produktionen bremses, fører det til cellens død.

Stoffer, som hæmmer dihydrofolat reductase, anvendes derfor bl.a. i cancerbehandling. Enzymet findes også hos f.eks. bakterier, og lægemidler, som hæmmer dihydrofolat reductase hos bakterier, anvendes derfor til bekæmpelse af infektioner. I et sådant tilfælde er det meget vigtigt, at det anvendte lægemiddel kun hæmmer det bak-

terielle enzym, da hæmning af det menneskelige enzym ville give bivirkninger.

Lægemidlet pyrimethamin anvendes i dag til behandling af malaria, og det virker ved at hæmme dihydrofolat reductase hos malariaparasitten. Pyrimethamin har en meget ringe effekt på dihydrofolat reductase hos mennesker, men til gengæld er malariaparasitten i stand til at forandre sig, mutere, således at pyrimethamin ikke virker længere.

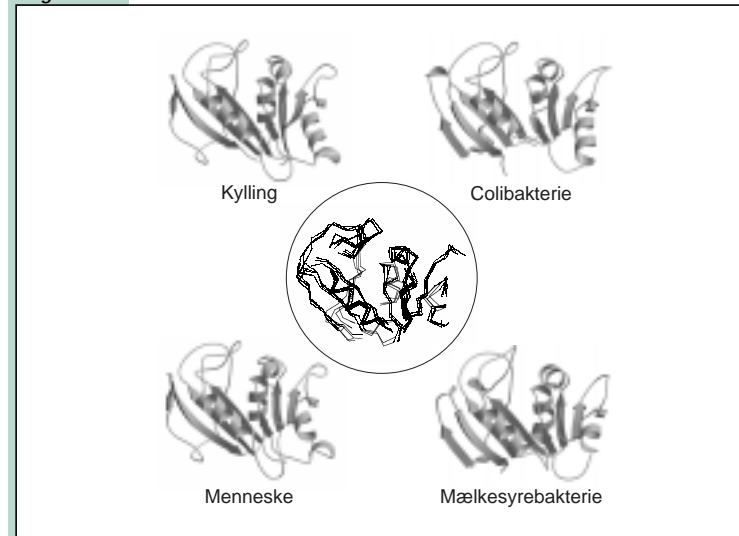
Man ved præcis, hvilken del af enzymet, der forandres, men vi kender endnu ikke den tredimensionelle opbygning af dihydrofolat reductase hos malariaparasitten.

3D-modelbygning af enzymer

Der findes i dag meget effektive metoder til at bestemme den tredimensionelle struktur af enzymer, men der er stadig grænser for, hvilke enzymer, man kan opklare strukturen af.

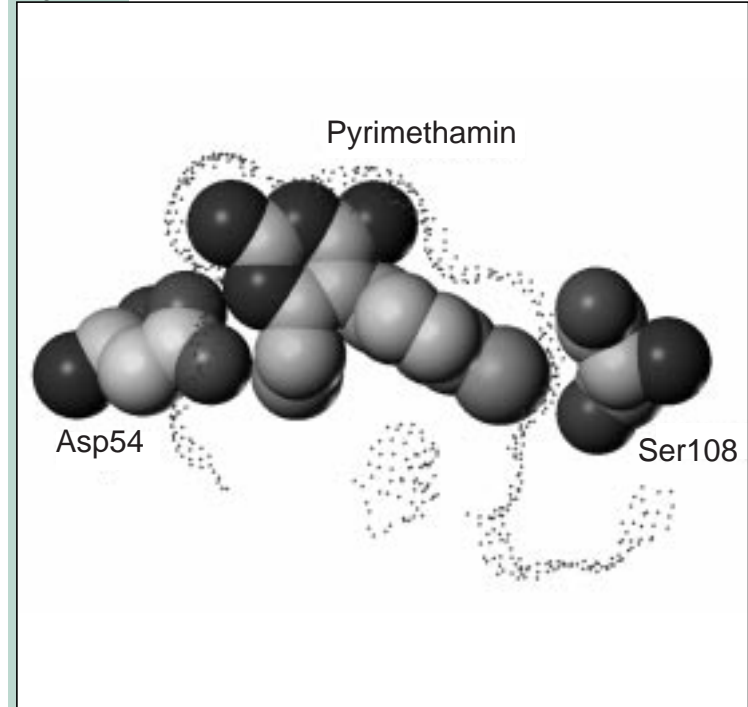
Det er derfor fantastisk vigtigt, at man inden for dette område har en langvarig tradition for at deponere sine resultater i internationale databaser. De fleste af disse databa-

Fig. 1



Lægemidlet pyrimethamin ses her bundet til enzymet dihydrofolat reductase hos malariaparasitten. Bindingstedets facon er illustreret med en prikket overflade. Pyrimethamin fastholdes bl.a. af en asparaginsyre (Asp54). Hos resistente malariaparasitter er en serin (Ser108) muteret til en anden og større aminosyre.

Fig. 2



ser er i dag tilgængelige på Internettet, så man kan hele tiden fra sin egen computer få adgang til den nyeste viden.

Til modelbygningen af dihydrofolat reductase fra malariaparasitten udnyttede vi de tilgængelige strukturer af enzymet fra menneske, kylling samt mælkesyre- og colibakterie.

Princippet i modelbygning - eller homologibygning - er, at man udnytter kendskabet til den tredimensionelle struktur af beslægtede enzymer til at forudsige, hvordan det pågældende enzym er opbygget rumligt.

Det første trin i modelbygningen er at identificere de strukturelle egenskaber, som de kendte enzymer har tilfælles. Denne fælles kerne anvendes som et skelet for opbygningen af modellen af det ukendte enzym - i dette tilfælde dihydrofolat reductase hos malariaparasitten.

Derefter modellerer man de variable regioner. Dette gøres igen ved at udnytte information fra strukturelle databaser. Den endelige model opnås ved omfattende energiberegninger, fordi enzymet vil foretrække en facon, der har lav energi.

Da man ikke kender strukturen

af dihydrofolat reductase hos malariaparasitten, ved man heller ikke, hvordan pyrimethamin binder til enzymet.

Man ved imidlertid, hvordan andre inhibitorer binder til andre typer af dihydrofolat reductase. Udfra denne viden har vi forsøgt at beregne, hvordan pyrimethamin binder til malariaparasittens udgave af enzymet.

Simpel mutation skaber resistens

Som nævnt ved man præcis hvilken del af enzymet, der er involveret i udviklingen af resistens. Ved at skifte

én aminosyre - ud af 250 - er malariaparasitten i stand til at beskytte sig mod f.eks. pyrimethamin.

Vi er derfor i gang med at undersøge, om vores model kan forklare, hvordan denne ene ændring forhindrer pyrimethamin i at binde sig til enzymet og hæmme dets funktion. Foreløbige resultater tyder på, at der lige akkurat er plads til pyrimethamin i det oprindelige enzym, mens den punktmutation, der er forbundet med resistens, medfører, at der ikke længere er plads til pyrimethamin i enzymets bindingssted.

Formålet med projektet er således at kunne forklare, hvorfor en punktmutation forhindrer pyrimethamin i at virke. Det er endvidere et mål at kunne forklare, hvorfor pyrimethamin foretrækker parasittens enzym fremfor det menneskelige enzym.

På længere sigt er det vores håb at kunne udnytte kendskabet til den tredimensionelle struktur af dihydrofolat reductase hos malariaparasitten til at designe mere effektive og selektive lægemidler mod malaria.

Malariamyggen spreder flere og flere resistente malariaparasitter.

Fig. 3



Lic.pharm. Inge Thøger Christensen er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.D. (pharm) Thomas Lemcke er lektor ved Institut für Farmazie ved Universität Hamburg, Tyskland.



Lic.scient. Flemming Steen Jørgensen er docent ved Institut for Medicinalkemi.

Tidlig diagnostik af blodkræft

Blodkræften multipelt myelom kan slås ned med kemoterapi, men breder sig normalt igen med døden til følge. Hvis sygdommens genopblussen opdages i tide, er der håb om at forbedre behandlingen. En tidlig diagnostisk test er nu under udvikling.

Af Erik Riise, Jan Engberg og Lisbeth Roslund

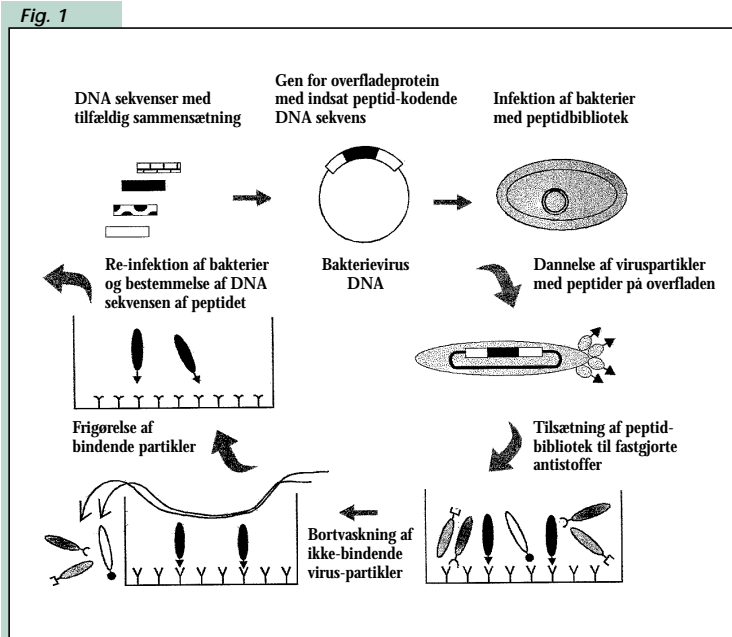
Blodkræften multipelt myelom er kendetegnet ved, at en enkelt af immunforsvarets antistofproducerende celler af ukendte årsager ændrer sit normale livsmønster og begynder at dele sig uhæmmet. I Danmark opdages omkring 200 tilfælde om året. Sygdommen behandles med kemoterapi, men den kureres ikke, og efter varierende tid blusser den op igen og ender ofte med døden. Det er af stor betydning, at man så hurtigt som muligt kan konstatere et tilbagefald, så man straks kan starte en ny behandling.

På grund af kræftcellernes uhæmmede deling producerer de store mængder af et bestemt antistof. Da dannelsen af dette monoklonale antistof er forbundet med sygdommen, er det vigtigt at kunne påvise tilstedeværelsen af antistoffet, inden sygdommen tager overhånd.

Med den hidtidige test skal der være relativt store mængder antistof i blodet, før tilbagefaldet kan påvises, og så er det ofte for sent. Derfor er der behov for en ny testmetode, som kan stille diagnosen på et tidligere tidspunkt.

Vi har udviklet en sådan test, som kan identificere selv meget små mængder af sygdommens karakteristiske antistof ved hjælp af peptider, som specifikt binder til patienternes antistof i en blodprøve.

På jagt i store peptidbiblioteker
Peptider er små proteiner, der er opbygget af nogle få aminosyrer.



Peptiderne til den nye test er fundet i såkaldte peptidbiblioteker, som består af gensplejede bakterievirus, der har peptiderne siddende på deres overflader.

Bibliotekerne er konstrueret på følgende måde: Nogle af de virus, som inficerer bakterier, er forsynet med overfladeproteiner, som de bruger til at hæfte sig fast på bakterierne under deres infektionscyklus. Det har vist sig, at man kan indsætte et peptid på op til 15 ekstra aminosyrer i disse overfladeproteiner uden, at det forhindrer viruspartiklerne i at inficere bakterierne.

Derfor har man indsat små stykker DNA i virus for enden af det gen, der koder for overfladeproteinet. Dette DNA indeholder opskriften på et peptid. Da de genetiske byggesten, baserne, i det indsatte DNA sidder i en tilfældig rækkefølge, bliver aminosyrerne i peptidet også tilfældige af slags og rækkefølge.

Det er på den måde forholdsvis let at fremstille 100 millioner forskellige viruspartikler, som hver har et specifikt peptid siddende i deres overfladeprotein.

Den nye diagnostiske test for multipelt myelom er baseret på peptider, som specifikt binder sig til et monoklonalt antistof, som bliver overproduceret hos patienter med sygdommen. Tegningen viser de enkelte trin i selektionen af peptiderne.

Peptid bindes til kræftantistoffet

I sådanne biblioteker kan man finde peptider, der binder specifikt til det af patientens antistoffer, der overproduceres ved multipelt myelom. De bindende peptider blev i første omgang fundet ved at bruge antistof fra patienter, hvor sygdommen er i udbrud, så antistoffet kunne isoleres med gængse metoder. Antistoffet blev derefter hæftet fast til indersiden af et lille plastikrør.

De 100 millioner viruspartikler blev nu tilsat til plastikrøret, og de viruspartikler, hvis peptid bandt til antistoffet, blev hængende, mens de andre blev vasket væk. Herefter kunne vi frigøre de bundne viruspartikler ved at deformere antistofmolekylerne.

De således frigjorte viruspartikler kan nu inficere nye bakterier. På den måde kan man opformere virus med det bindende peptid.

Ved at bestemme DNA-sekvensen af de ekstra baser, der er indsat i genet for overfladeproteinet, har vi opklaret aminosyresekvensen af det peptid, der er indsat i overfladeproteinet. Herefter kan peptidet fremstilles syntetisk.

Da det er forskellige antistoffer, der udtrykkes i forskellige patienter, er man nødt til at finde virus, der binder for hvert af disse antistoffer, men vi har forenklet metoden og har relativt let fundet bindere for syv ud af otte patienter. Her er med andre ord markørerne til en diagnostisk test, der kan påvise et tilbagefald på et tidligt tidspunkt.

Kontrol af testmetoden

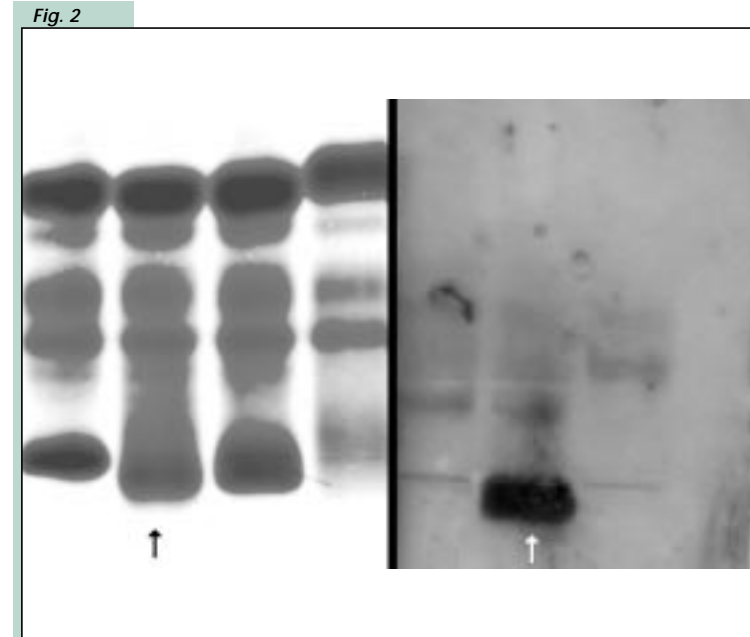
Det er afgørende for testens pålidelighed, at bindingen af viruspartikler til antistoffet alene skyldes det ekstra peptid i overfladeproteinet. Derfor har vi kontrolleret testen i forsøg.

Dette blev gjort ved at tilsætte en syntetisk udgave af det bindende peptid til røret med antistof, inden viruspartikler med peptidet blev tilsat. Hermed kunne vi undersøge, om disse peptider konkurrerede med viruspartiklerne om bindingen til antistoffet. Det viste sig at være tilfældet.

Endelig er det vigtigt at vise, at bindingen er specifik, det vil sige, at det peptid, der binder til det monoklonale antistof ikke binder til andre antistoffer eller andre serumkomponenter.

Det har vi gjort ved at adskille de forskellige komponenter i patienternes blodserum ved hjælp af gelelektroforese, en separationsmetode, der kan adskille stoffer ved hjælp af deres molekylvægt eller elektriske ladning.

Efter adskillelsen blev de forskellige blodproteiner overført til et filter. Filteret blev så "badet" i viruspartikler, som tidligere var fundet at binde til antistoffet fra en af patienterne. Efter vask af filteret kan man



påvise, hvor der er bundet viruspartikler.

Undersøgelsen viste, at der kun kunne påvises binding til netop det monoklonale antistof og kun til den enkelte patients antistof, som viruspartiklen oprindeligt var fundet at binde til.

Diagnostik og mulig behandling

Sådanne peptider kan altså bruges til at diagnosticere et tilbagefald af multipelt myelom allerede ved begyndende ophobning af antistoffer.

Man vil også kunne påvise selve kræftcellerne ved at gøre dem permeable for peptider, som kan trænge ind og binde til antistof, som endnu ikke er udskilt.

Desuden vil vi undersøge, om myelomacellerne i lighed med andre blodkræftformer beholder antistofferne på overfladen. Er dette tilfældet, er der mulighed for i hvert fald delvis fjernelse af de syge celler fra blodet.

En anden mulighed er at koble celletoksiske stoffer til peptiderne med henblik på et specifikt drab af kræftcellerne.

Til venstre ses en gel med proteiner fra forskellige patienters blod. Til højre ses et filtertryk, hvor det protein, som viruspartiklerne binder til, er fremkaldt.



Lic.scient. Erik Riise er lektor ved Institut for Biologi.



Dr.scient. Jan Engberg er professor ved Institut for Biologi.



Cand.pharm. Lisbeth Roslund er farmaceut på Kastrup Apotek.

Når hjernens signalprocesser løber løbsk

Overaktivitet i hjernens receptorer for signalstoffet glutaminsyre er involveret i alvorlige sygdomme som Alzheimers syge og epilepsi. Derfor ønsker vi at fremstille stoffer, som kan blokere den løbske proces.

Af Ulf Madsen, Frank A. Sløk og Povl Krosgaard-Larsen

Henfald og død af nerveceller er årsag til en række alvorlige sygdomme i hjernen. Det gælder bl.a. for kroniske sygdomme som Alzheimers syge, epilepsi, Huntingtons sygdom og parkinsonisme, men neurodegeneration ses også ved akutte tilstande som hjertestop og slagtilfælde.

I de to sidstnævnte tilfælde nedsættes blodforsyningen til hjernen, hvilket fører til, at nervecellerne frigiver store mængder af signalstoffet glutaminsyre. Den frisatte glutaminsyre forårsager en kraftig overstimulation af nervecellerne og er derfor en medvirkende faktor i udviklingen af de hjerneskader, som ofte ses efter hjertestop og slagtilfælde.

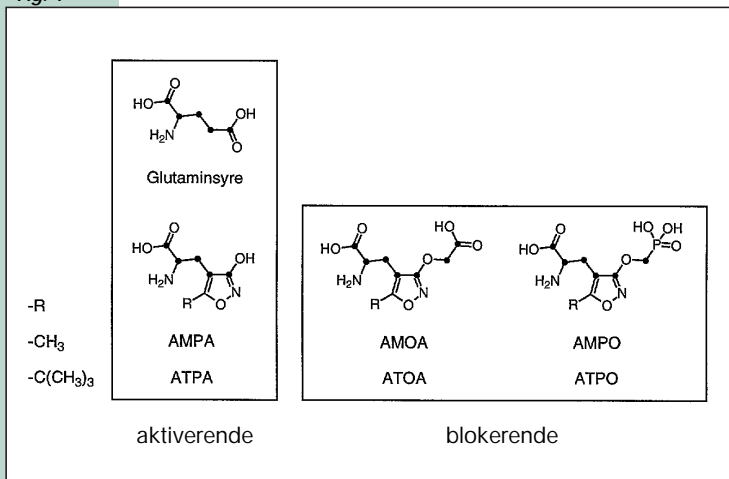
I nogle af de neurodegenerative sygdomme er mængderne af glutaminsyre ligeledes for høje, hvilket er med til at fremkalde nervecellernes henfald og død.

Det vigtigste stimulerende stof

Glutaminsyre stimulerer, også under normale forhold, nervecellerne i hjernen via deres receptorer for stoffet. Disse receptorer er opdelt i et stort antal under typer. Med henblik på at udvikle lægemidler til behandling af hjernens sygdomme er det vigtigt at opklare de enkelte under typer funktioner.

Derfor fremstiller vi stoffer med selektiv virkning på de forskellige under typer. Det gælder både stoffer, som stimulerer receptorerne i lighed med glutaminsyre selv, og stoffer, som kan blokere glutaminsyres effekt.

Fig. 1



Sådanne selektive aktiverende og blokerende stoffer har stor betydning for at opklare de mekanismer, som er involveret i såvel den normale stimulation af nervecellerne som i de neurodegenerative tilstande. De stoffer, som kan blokere effekten af glutaminsyre, har ydermere potentiale som lægemidler til behandling af de nævnte hjernesygdomme.

AMPA stimulerer receptorerne

Glutaminsyre stimulerer alle under typerne af receptorer for signalstoffet. I bestræbelserne på at fremstille forbindelser med en selektiv virkning er stoffet AMPA tidligere blevet syntetiseret på DFH.

AMPA har en potent og meget selektiv virkning på én af under typerne af receptorerne for glutaminsyre, som derfor har fået betegnelsen AMPA-receptorer.

Den kemiske struktur af AMPA bevirker, at molekylet er mindre fleksibelt end glutaminsyre selv. Dette menes at være en medvirkende årsag til den selektive virkning af AMPA.

Yderligere modifikation af AMPAs struktur har ført til udvikling af et stort antal lignende stoffer med forskellig styrke og virknings-

mekanisme på de enkelte receptorer for glutaminsyre. Øverst til venstre ses strukturen af signalstoffet glutaminsyre. Nedenunder ses analogerne AMPA og ATPA, der ligesom signalstoffet selv virker stimulerende på AMPA-receptorerne, en under type af receptorerne for glutaminsyre. Stofferne AMOA, ATOA, AMPO og ATPO til højre blokerer AMPA-receptorerne og nedsætter de stimulerende stoffers effekt.

mekanisme på de enkelte receptorer for glutaminsyre.

En serie analoger er syntetiseret med forskellige kemiske grupper på isoxazolringen i AMPA. Størrelsen af den kemiske gruppe har stor betydning for, hvor kraftigt stofferne stimulerer AMPA-receptorerne. De stærkest virkende forbindelser har små påsatte grupper, mens større substituenter fører til svage eller inaktive stoffer.

AMOA blokerer receptorerne

Ved modifikation af hydroxy-gruppen på isoxazolringen i AMPA er stoffet AMOA blevet syntetiseret. AMOA har vist sig at kunne blokere AMPAs stimulerende virkning på nervecellerne.

Ved undersøgelser af AMOAs blokerende effekt på de forskellige typer af glutaminsyre receptorer blev der påvist en selektiv, men for-

Fig. 2



holdsvis svag virkning på AMPA receptorerne.

Med henblik på udvikling af nervecellebeskyttende lægemidler er denne blokering særdeles spændende. Den ret svage effekt gør det dog ønskeligt at fremstille mere kraftigt virkende forbindelser, som bedre kan beskytte nervecellerne mod at blive overstimuleret af glutaminsyre.

Vi har nu fremstillet en række stoffer med forskellige substituenter på isoxazolringen i AMOA. Ydermere blev en tilsvarende serie forbindelser fremstillet, hvor den ene carboxylsyre er erstattet med en fosfonsyre.

Nyt stof er ti gange så effektivt

Vi har målt, hvor kraftigt disse stoffer blokerer for den stimulerende virkning af glutaminsyre og AMPA. Den blokerende effekt udtrykkes ved en såkaldt EC₅₀-værdi. Værdien

angiver, hvor stor en koncentration af det blokerende stof, der skal til for at reducere den stimulerende effekt til 50 procent.

Ved målinger med AMPA anvendte vi en koncentration på 5 µM til stimulation af receptorerne. For AMOA kræves en koncentration på 320 µM for at reducere effekten til 50 procent.

For forbindelsen ATOA var en koncentration på 150 µM tilstrækkelig. For analogerne AMPO og ATPO med en fosfonsyre i molekylet blev en yderligere forøgelse af effekten opnået. AMPO viste EC₅₀ på 60 µM og ATPO en EC₅₀ på 28 µM. Vi har altså opnået en gradvis forøgelse af den blokerende effekt på AMPA-receptorerne, så den mest potente forbindelse, ATPO, er mere end ti gange så aktiv som AMOA.

Udover øget styrke viser de to forbindelser ATOA og ATPO også

Denne forsøgsopstilling anvendes til undersøgelser af stoffer med virkning på glutaminsyre receptorerne. Til forsøgene anvendes skiver af rottehjerne, som indeholder et meget stort antal nerveceller med de pågældende receptorer. Skiverne er ved hjælp af elektroder forbundet til en skriver, som registrerer, om nervecellerne bliver stimuleret, eller om effekten af et stimulerende stof kan hæmmes ved samtidig tilsetning af et blokerende stof.



Lic. pharm. Ulf Madsen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Lic. techn. Frank A. Sløk er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



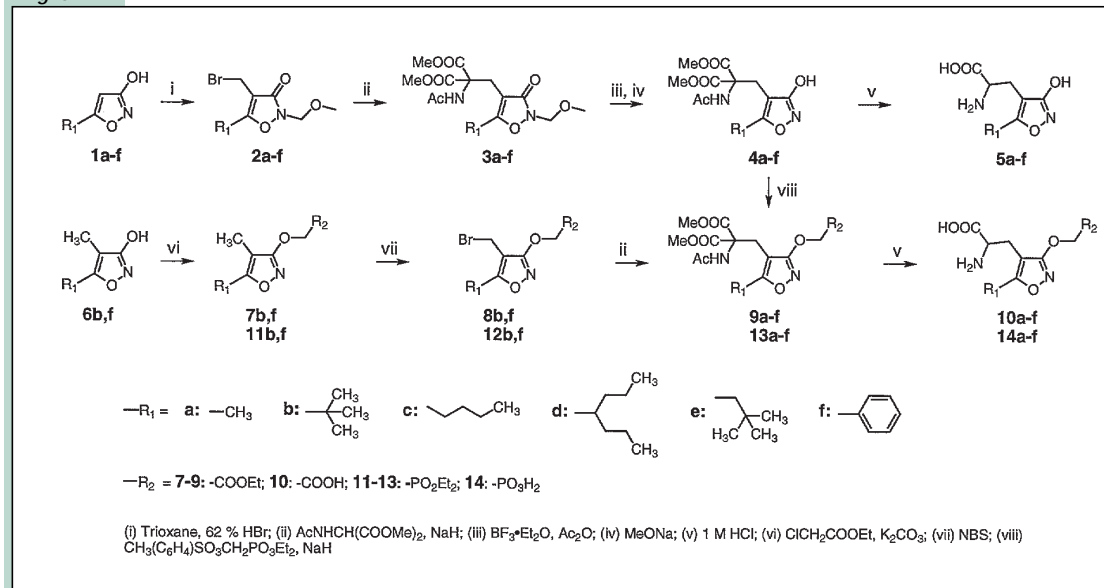
Dr. pharm. Povl Krosgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi.

øget selektivitet. AMOA og ATOA udviser i en koncentration på 1 mM en svag blokerende effekt på andre receptorer for glutaminsyre end AMPA-receptoren, hvorimod AMPO og ATPO er helt uden effekt på disse receptorer.

Yderligere undersøgelser på cellekulturer såvel som på klonede receptorer gennemføres i øjeblikket med ATPO til afdækning af stoffets farmakologiske muligheder.

Synteseskema: 5a er AMPA, 10a er AMOA. Figuren viser en række nye analoger til AMPA, 5b-f, og til AMOA, 10b-f samt 14a-f. De to serier af AMOA-analoger adskiller sig ved R₂-gruppen, som består af en carboxylsyre i 10a-f og en fosfonsyre i 14a-f.

Fig. 3



L æ g e m i d d e l f o r s k n i n g

Hvepsegifte og lægemidler til hjernens sygdomme

Den parasitiske hveps *Phanthus Triangulum* har udviklet neurotoksiner, som bruges til at lamme andre insekter, således at byttet omdannes til en levende, men forsvarsløs klump af fersk føde. Det lyder paradoksalt, men gifterne bruges nu som basis for udvikling af lægemidler til behandling af sygdomme i hjernen.

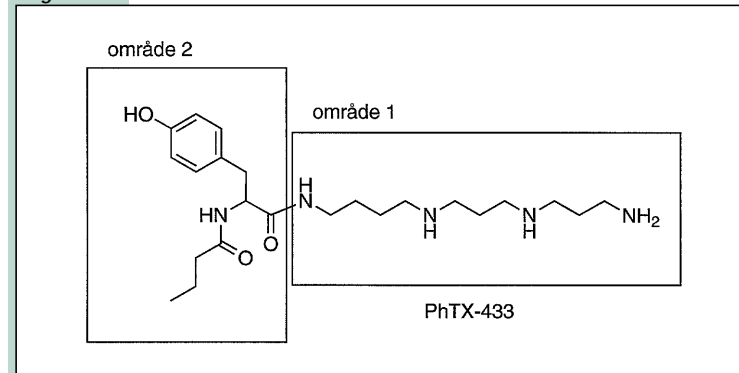
Af Lisa Matzen og Jerzy W. Jaroszewski

Der eksisterer i dag ingen effektive metoder til at behandle sygdomme, som skyldes fremadskridende henfald og død af nerveceller i centralnervesystemet, det vil sige i hjernen og rygmarven.

Til disse invaliderende sygdomme hører kroniske lidelser som Alzheimers syge, Parkinsons syge og skizofreni samt akut nedvædd, som bl.a. forårsages af iltmangel i hjernen efter en blodprop.

Kommunikation mellem nerveceller foregår ved, at cellerne udsender signalstoffer, der påvirker recep-

Fig. 2



Strukturelt er hvepsetoksinet PhTX-433 opbygget af en polyaminkæde (område I) og den aromatiske aminosyre tyrosin (område II).

torer på andre nerveceller og dermed sørger for signaltransmissionen.

Et af de vigtigste signalstoffer i centralnervesystemet, (S)- glutaminsyre, er ofte blevet forbundet med ovennævnte sygdomme, og ubalance i det centrale glutaminsyresystem menes at være en af årsagerne til de karakteristiske irreversible forandringer i centralnervesystemet.

Ionkanaler og nervecelledød

Nervecellernes receptorer for glutaminsyre inddeles i fire hovedklasser: NMDA, AMPA, KAIN og metabo-

trope receptorer. De tre førstnævnte klasser er proteinkomplekser, der danner en ionkanal i nervecellernes membraner.

Når glutaminsyre aktiverer disse receptorer, åbnes kanalen for gennemstrømning af calcium- og natriumioner, hvilket fører til et fysiologisk respons. Overstimulation af receptorerne bevirker derimod neuronhenfald, idet massiv iongennemstrømning er skadelig for cellerne.

Eftersom denne mekanisme menes at være involveret i ovennævnte sygdomme, er NMDA, AMPA og KAIN receptor-regulerede ionkanaler vigtige medicinskemiske mål. På trods af mange års intensiv forskning er der i dag ingen lægemidler til rådighed, som selektivt påvirker glutaminsyre receptorer.

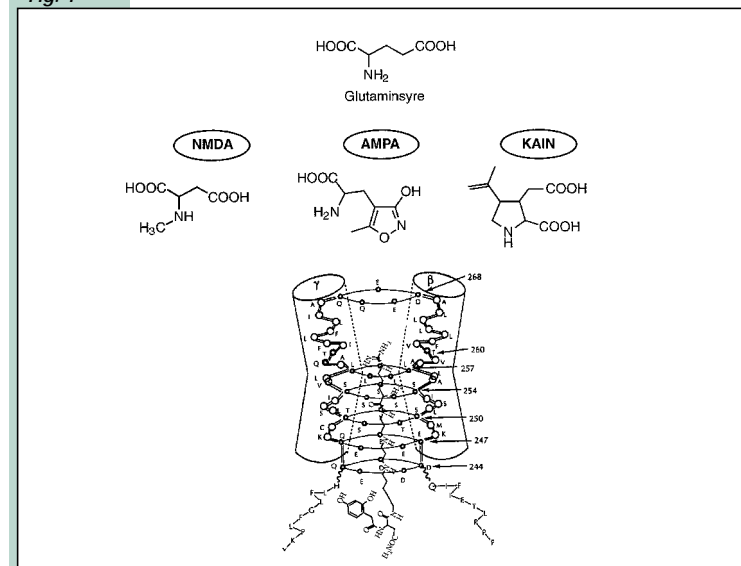
Neuroaktive hvepsetoksiner

Rationel udvikling af nye selektive lægemiddelstoffer forudsætter en forståelse for neuroaktive stoffers virkningsmekanisme samt de involverede biologiske strukturers opbygning.

Detaljeret viden om den molekylære arkitektur af NMDA, AMPA og KAIN receptor-regulerede ionkanaler

Ionotrope glutaminsyre receptorer klassificeres i NMDA, AMPA og KAIN receptorer. Nederst illustreres, hvordan et hvepsetoksin formodes at blokere en ionkanal.

Fig. 1



er således nødvendig for at udvikle lægemiddelstoffer, som kan hæmme den ødelæggende, massive iongennemstrømning under patologiske forhold.

Studier af hvepsetoksiner biologiske aktivitet har afsløret interessante bioaktive stoffer, der binder sig til disse ionkanaler. Således indeholder giften, isoleret fra hvepsen *Phanthus triangulum* F., mindst fire neuroaktive kemiske strukturer, kaldet philanthoxiner, hvis funktion består i at lamme hvepsens bytte.

Naturstoffet, philanthotoxin-433 (PhTX- 433) og den syntetiske analog philanthotoxin-343 (PhTX-343) blokerer NMDA, AMPA og KAIN receptor-regulerede ionkanaler i glutaminsyresystemet, hvorved signaltransmission under fysiologiske og patologiske forhold hæmmes.

Strukturelt set er philanthotoxin opbygget af en polyaminkæde, som er bundet til aminosyren tyrosin. Flere studier tyder på, at polyaminkæden binder dybt nede i ionkanalen og således fungerer som en slags prop i kanalen.

Bindingen mellem ionkanalens vægge og polyaminkæden er sandsynligvis resultatet af bl.a. tiltrækningen mellem modsat ladede grupper. Man forestiller sig således ionkanaler som vandige porer, på hvis indre overflade negative ladede aminosyrerester er fordelt.

Derimod bærer de basiske aminogruupper i hvepsetoksinerne positive ladninger ved fysiologisk pH.

For at belyse bindingsmekanismen er det især relevant at bestemme størrelsen af de positive ladninger og deres fordeling i toksinerne ved fysiologisk pH. Størrelsen af de positive ladninger samt ladningsfordelingen i polyaminkæden er fysisk-kemiske egenskaber, der kan bestemmes ved hjælp af kernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR).

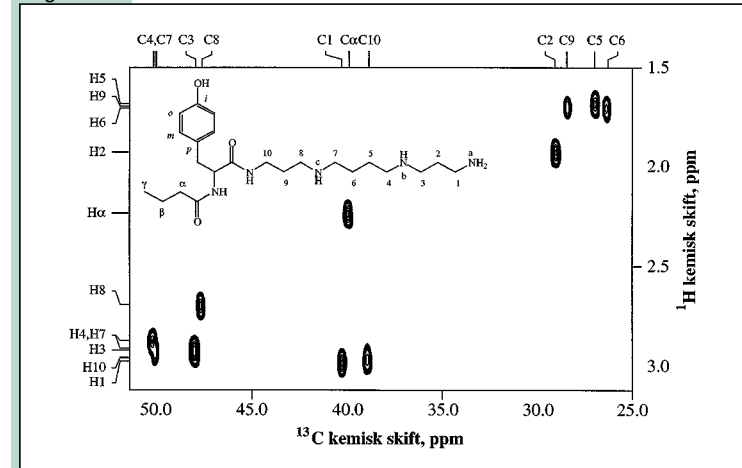
NMR spektroskopi på hvepsegiftene

NMR er en spektroskopisk metode af stor betydning inden for talrige naturvidenskabelige discipliner. Til undersøgelserne af hvepsetoksinerne har vi anvendt en teknik, der kaldes kulstof-13 NMR spektroskopi.

Kulstof-13 NMR spektroskopi beror på disse kerner evne til at absorbere energi under visse betingelser. Anbringes en kulstof-13 kerne i et ydre magnetfelt, vil der på grund af det magnetiske moments to mulige orienteringer ske en opsplitning af kernerne i to forskellige energiniveauer.

Elektromagnetisk bestråling

Fig. 3



af denne kerne med frekvenser svarende til energiforskellen giver anledning til absorption af energi. Absorptionen registreres som funktion af frekvensen, hvorved NMR-spektret fremkommer.

Energiforskellen afhænger af kernernes kemiske omgivelser, hvilket danner basis for metodens brede anvendelsesmuligheder. NMR er bl.a. velegnet til beskrivelse af dynamiske forhold som f.eks. ladningsfordelingen som funktion af pH.

Vi har gennemført en række NMR studier af hvepsegiftene ved fysiologisk pH. Resultaterne er i overensstemmelse med, at toksinets blokade af ionkanalen beror på tiltrækning mellem positivt ladede grupper i hvepsetoksinet og negativt ladede aminosyrerester i NMDA, AMPA og KAIN receptor regulerede ionkanaler.

NMR-studierne har afsløret nye aspekter for giften biologiske aktivitet ved at fremhæve de grupper i PhTX-343, der har særlig betydning for bindingen til ionkanalen.

Figuren viser et eksempel på et 2D-NMR spektrum af hvepsetoksinet PhTX-343.

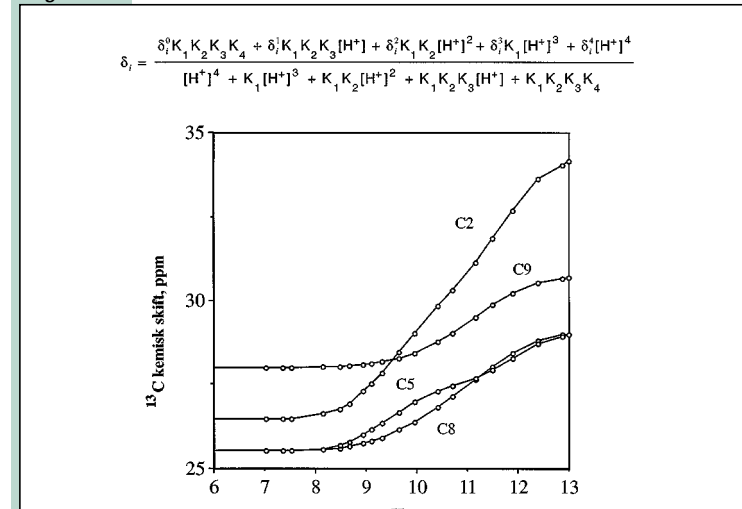
Rationelt design af lægemidler

Undersøgelserne er et godt eksempel på, hvordan man kan opnå viden om bioaktive forbindelsers virkningsmekanisme og receptorer strukturelle elementer ved at bestemme stoffernes fysisk-kemiske egenskaber.

Tiltag af denne art baner vejen for lægemiddeldesign på rationelt grundlag. En bedre forståelse af det centrale glutaminsyresystem kræver en interdisciplinær indsats, hvor naturstoffer indtager en vigtig rolle - både som farmakologiske værktøjer og som mulige modelstoffer til udvikling af lægemiddelstoffer.

Titreeringskurver demonstrerer ændringen af kemisk skift i hvepsetoksinet som funktion af pH. Matematisk analyse af kurverne giver oplysninger om mulige vekselvirkninger mellem toksinmolekylet og ionkanalen.

Fig. 4



Cand. pharm Lisa Matzen er Ph.D. studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Lic. scient. Jerzy W. Jaroszewski er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Receptorstudier viser lægemidlers effekt

Stoffer, som i princippet kan forbedre en sygdomsvækket hukommelse, vil samtidig fremkalde kramper. Men måske kan man finde en balance, så de uacceptable bivirkninger undgås.

Af Uffe Kristiansen

Nervesystemet står for hovedparten af informationsbehandlingen i kroppen. I nervecellernes indre er informationen kodet som elektriske signaler, mens kommunikationen mellem nervecellerne især foregår ved hjælp af kemiske signalstoffer.

Nervecellernes signalstoffer påvirker andre nerveceller ved at binde sig til receptorer på cellernes overflader. Nogle signalstoffer stimulerer modtagercellens aktivitet, mens andre virker hæmmende.

Hos raske mennesker er der en hårfin balance mellem de stimulerende og hæmmende signaler. Men når balancen forskydes i forbindelse med sygdom, giver det sig udslag i alvorlige neurologiske symptomer.

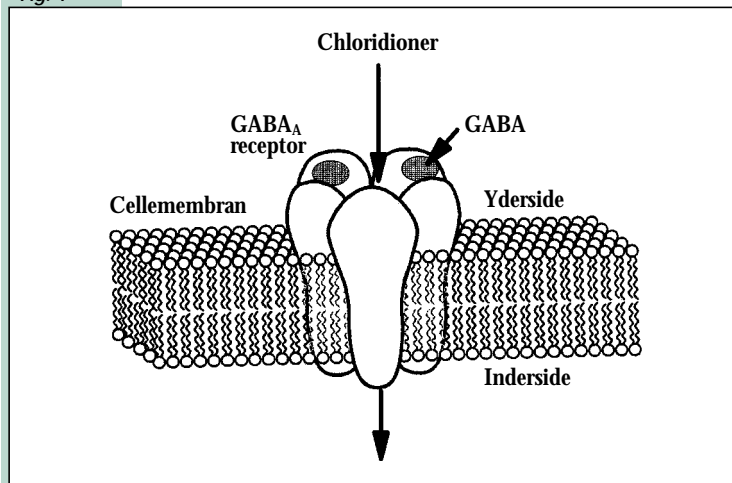
Det er derfor af stor farmaceutisk interesse at kunne regulere niveauet tilbage mod det normale, når nervecellerne på grund af sygdom har et for stort eller for lille aktivitetsniveau.

Regulering af nerveaktiviteten

Reguleringen kan f.eks. ske ved at aktivere eller blokere receptorerne for gamma-aminosmørsyre (GABA). GABA er det vigtigste hæmmende signalstof i hjernen. Der findes flere forskellige typer af receptorer for GABA, men fælles for dem alle er, at når de aktiveres, sker der en nedsættelse af modtagercellens aktivitet.

På Institut for Biologi har vi i en årrække udforsket GABA receptorerens funktion. Samtidig har forskere på Institut for Medicinskemi fremstillet en lang række stoffer, som kan påvirke disse receptorer. Virkningen af de nye stoffer er ofte

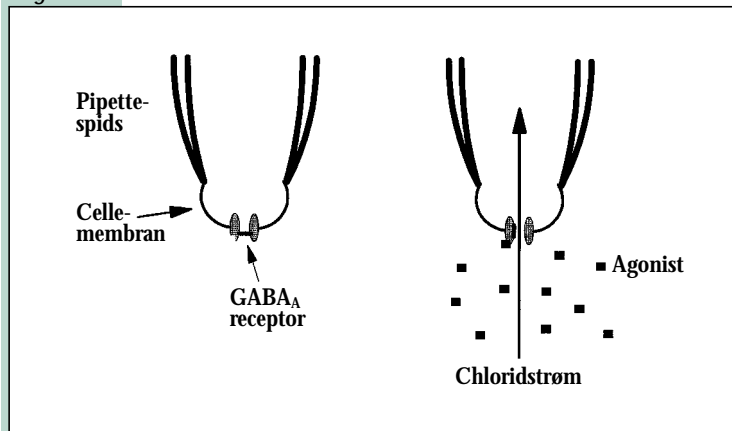
Fig. 1



GABA_A-receptorerne sidder i nervecellernes membran. De består af fem mindre enheder, som omgiver en central kanal, der er gennemtrængelig for chloridioner. Kanalen er normalt lukket, men åbnes, når signalstoffet GABA bindes til receptoren. Strømmen af chloridioner ind i cellen dæmper nervecellens aktivitet.

Ved at udtage et lille stykke af cellemembranen på en nervecelle med en fin pipette er det muligt at isolere én enkelt GABA_A-receptor. Receptoren bruges til at teste nye lægemiddelstoffers evne til at åbne chloridkanalen.

Fig. 2



undersøgt i samarbejde mellem de to institutter.

Vi interesserer os bl.a. for en type receptorer, som kaldes GABA_A. Receptorerne sidder i cellemembranen og indholder en kanal, der er selektivt gennemtrængelig for chloridioner. Når GABA bindes til GABA_A receptoren, åbner kanalen sig, og chlorid strømmer ind i cellen, hvilket virker dæmpende på modtagercellens aktivitet.

Indlæring uden kramper

Stoffer, der er gode til at aktivere GABA_A-receptorer, nedsætter nervecellernes aktivitet og virker sovndyssende og angstdæmpende. Der findes også stoffer, som kan binde sig til GABA_A-receptorerne, men som ikke er i stand til at aktivere dem. Sådanne stoffer blokerer for GABAs adgang til receptorerne og øger herved aktivitetsniveauet i nervecellerne.

Disse stoffer vil sandsynligvis kunne forbedre evnen til at lære og at huske hos f.eks. patienter med den alvorlige form for senilitet, Alzheimers syge. Men på grund af den effektive blokade af receptorerne virker stofferne ofte krampefremkaldende.

Indenfor de seneste år har forskerne på Institut for Medicinskemi derfor udviklet en serie nye stoffer, som er en mellemting mellem de aktiverende og blokerende stoffer.

Disse stoffer, som kaldes partielle agonister, er i stand til at binde sig til GABA_A-receptorerne, men er ret dårlige til at aktivere dem. Samtidig blokerer de ved deres binding GABAs adgang til receptorerne. Det vil sige, at de fjerner GABAs effektive receptoraktivering og låser aktiveringen fast på et lavere niveau.

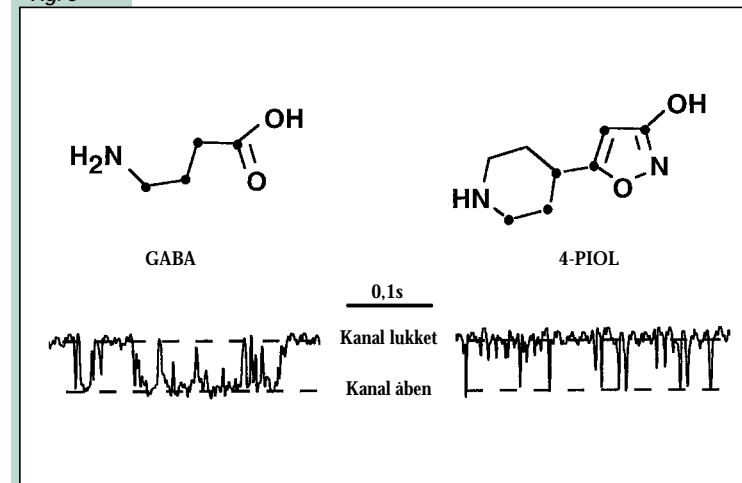
Målet er at udvikle et stof, der forbedrer evnen til at lære og huske, men samtidig bibeholder så meget aktivering af GABA_A-receptorerne, at det ikke virker krampefremkaldende.

Vi ved endnu ikke, om det er muligt, men selv om det lykkes, er der fortsat lang vej til målet. For de hidtil udviklede partielle agonister er ikke i stand til at trænge ind i hjernen og er derfor uegnede som lægemidler. Der forestår altså stadig et stort udviklingsarbejde.

Aktivering af GABA_A-receptorer

For at øge forståelsen af GABA_A-receptorerens aktiveringsmekanisme og dermed muligheden for at udvikle bedre lægemidler, har vi undersøgt, hvorfor de partielle agonister er dårligere til at aktivere receptoren end GABA selv.

Fig. 3



Man kunne på forhånd gætte på flere mulige forklaringer. Det viser sig, at GABA_A-receptorerne ikke er helt ens. Selv inden for samme nervecelle findes der GABA_A-receptorer med lidt forskellige egenskaber. Det kunne være, at de partielle agonister virkede som GABA på visse GABA_A-receptorer, mens de blokerede andre. Det kunne også tænkes, at partielle agonister virkede ens på de forskellige receptorer og generelt var dårligere til at åbne kanalen.

Fokus på en enkelt receptor

Vi anvendte en teknik, der satte os i stand til at se aktiveringen af en enkelt GABA_A-receptor. En nervecelles membran indeholder normalt i hundredvis af disse receptorer, men det er muligt at isolere et lille stykke cellemembran med en diameter på ca. 1/1000 mm. ved hjælp af spidsen af en meget fin pipette.

Af og til indeholder et sådant membranstykke netop én GABA_A-receptor med tilhørende chloridkanal. Fordi chloridioner har en negativ ladning, vil de, når de vandrer, bære en elektrisk strøm, som kan måles med elektroder i og udenfor pipetten. Hvis der ikke er GABA til stede ved receptoren, er kanalen lukket, men når GABA bin-

Som det ses, er stoffet 4-PIOL større end GABA selv. Det er sandsynligvis årsagen til, at 4-PIOL kun åbner ionkanalen i kort tid. Ionstrømmen bliver derfor reduceret, og hæmningen af nervecellens aktivitet formindskes i forhold til, når GABA bindes til receptoren.



Cand.pharm., Ph.D. Uffe Kristiansen er adjunkt ved Institut for Biologi.

Forurener lægemidler naturen?

Lægemidler til mennesker og dyr er i følge sagens natur biologisk aktive, og de er ofte svært nedbrydelige. Derfor er det på høje tid, at vi nu begynder at vurdere risikoen ved udledning af lægemidler til miljøet.

Af Bent Halling Sørensen, Søren Nors Nielsen og Sven Erik Jørgensen

Lægemidler er i forbindelse med deres anvendelse og produktion indtil for nylig næsten upåagtet blevet udledt til miljøet i større eller mindre mængder.

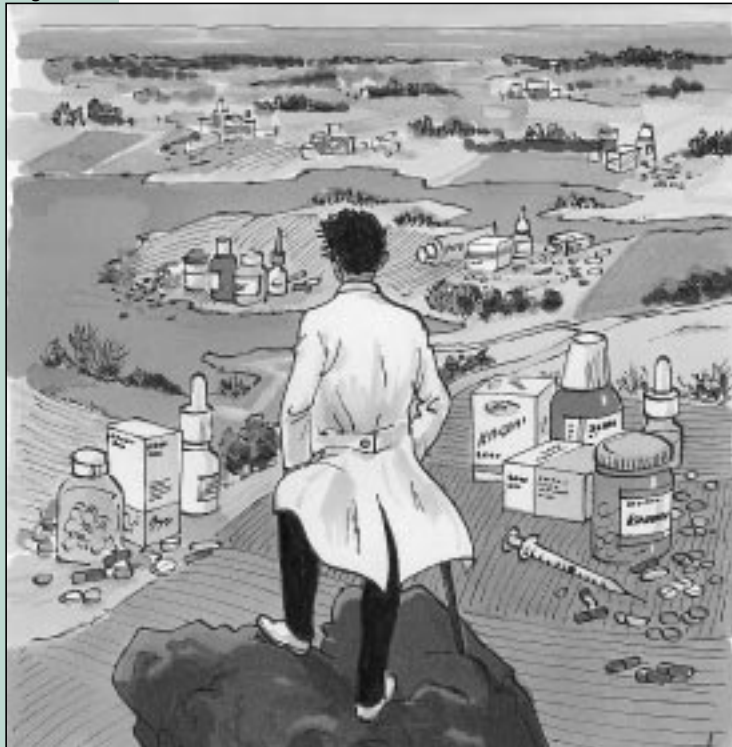
Ny forskning har imidlertid vist, at en række lægemidler påvirker miljøet. Opmærksomheden omkring de hormonlignende stoffer har lært os, at selv om stofferne kun findes i så lave koncentrationer som nanogram pr. liter i miljøet, så kan de godt have uheldige direkte effekter på naturen og dermed også indirekte effekter på mennesket.

Derfor kræver et EU-direktiv under udarbejdelse, at fremstillingen af visse nye lægemidler følges op med en miljømæssig risikovurdering, der viser, at utilsigtet udledning af stofferne ikke medfører miljøskader.

Det er egentlig ikke så underligt, at lægemidler kan være skadelige for miljøet, da de jo netop er designet til at være biologisk aktive. Samtidig er lægemidler ofte fedtopløselige for at kunne passere cellemembraner, og de er robuste over for biologisk nedbrydning, så de ikke bliver nedbrudt, inden de når at virke i organismen. Disse egenskaber gør, at stofferne kan bioakkumuleres i vores fødekæder eller ophobes i sedimentet i have og søer.

Flere undersøgelser viser, at man kan finde lægemidler i miljøet. En norsk undersøgelse fra 1995 viser bl.a., at visse antibiotika anvendt i dambrug ikke nedbrydes i sedimentet indenfor en periode af 300 dage. Derfor må man forvente, at stofferne ophobes.

Fig. 1



I en undersøgelse af grundvandsprøver fra Grinsted udført af Grinsted Products og DTU i 1994 er der fundet lægemiddelstoffet propyphenazone i grundvandet. Et stof, som ikke har været anvendt i mange år.

Mange mulige spredningsveje
Der er mange spredningsveje for lægemidler til miljøet. Lægemidler til mennesker udledes til kloaknettet via urin og afføring. Stofferne når frem til rensningsanlægget, hvorfra de kan blive spredt på markerne i slam eller blive udledt i vandmiljøet.

Veterinær medicin anvendes i stalde, til dyr på markerne og i dambrug. De vigtigste lægemidler er de antibiotika, der bruges som væksthjælpere i husdyrbruget. Disse stoffer vil via staldens affald blive spredt i relativt høje koncentrationer på markerne og kan påvirke bakterier og dyr i jorden. Fra dambrug udledes medicin og desinfektionsmidler i store mængder til direkte åbne vandområder.

Miljøriskoen er ofte ukendt
I dag har man ikke styr på hvilke lægemiddeltypen, som har potentiel risiko for miljøet, men man ved, at både antibiotika og lægemidler mod kræft udledes og har virkning på miljøet.

De primære spørgsmål er selvfølgelig hvor store koncentrationer, der findes i miljøet, og hvilke effekter stofferne har. Det ved man heller ikke meget om endnu. Nogle huma-

Lægemidler er indtil fornylig stort set upågtet blevet udledt til miljøet.

ne lægemidler, som det vanddrivende furosemid og det smertestillende ibuprofen er blevet testet i foreløbige forsøg, som viste, at de har tydelige effekter på alger i koncentrationer på ned til 1/10.000 del af døgndosis for mennesker regnet som mg/l.

Begge stoffer udledes i Danmark i mængder på henholdsvis over 10 og 25 tons pr. år, mens udledningerne af væksthjælpere fra landbruget langt overgår disse mængder. De årlige udledninger af desinfektionsmidler fra dambrug er på ca. 13 tons.

Lægemiddelstoffer udledes altså i samme omfang som andre miljøfremmede stoffer med kendt skadevirkning. Derfor er der al mulig grund til at undersøge lægemidlers effekt på miljøet.

Lægemidler til mennesker og dyr ender især i jord og vand. Figuren viser spredningsvejene.

Fig. 2

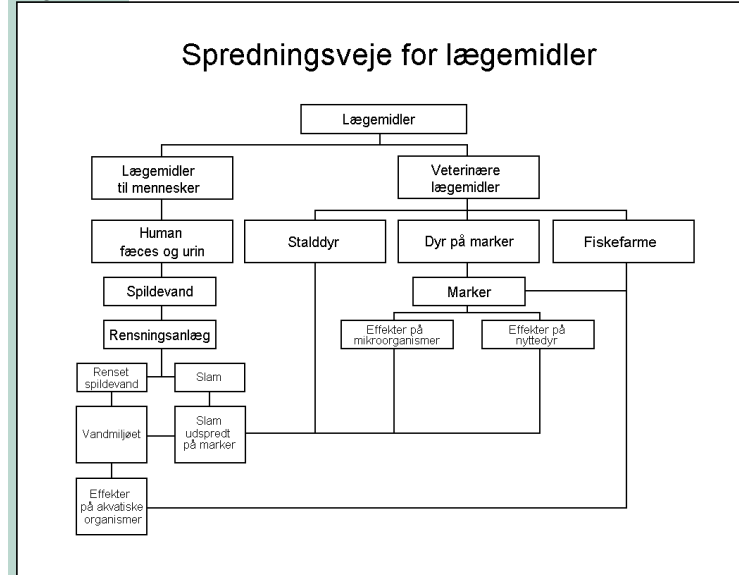
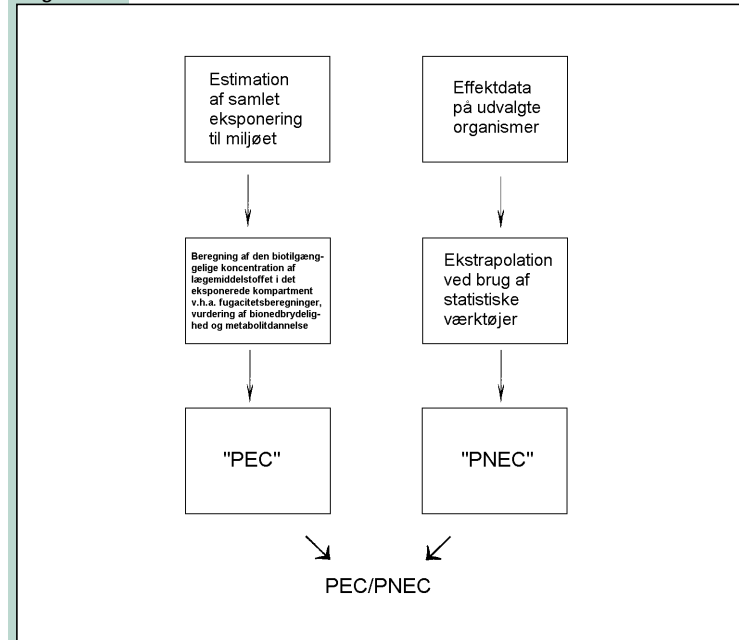


Fig. 3



Koncentrationer og grænseværdier

EU har foreslået en procedure til at vurdere miljøriskoen af et lægemiddel. Proceduren har to faser. I fase I estimeres, hvor stoffet ender i miljøet samt i hvor store mængder.

Fra producenter og Sundhedsstyrelsen kan man få oplysninger om produktion og forbrug af et lægemiddel. Kommunale spildevandsmålinger giver oplysninger om spild og udledning til kloaknettet. Disse data kombineres med kendskab til lægemidlets kemi, spredningsveje, bionedbrydelighed og omdannelse i miljøet.

På den måde kan man beregne en "Estimeret Miljømæssig Koncentration", som estimerer, om stoffet ender i jord, vand eller luft, og som kvantificerer koncentrationerne i det pågældende miljø.

Derefter eftersøges litteratordata for effekten på organismer i det relevante miljø - i det omfang det er muligt. For de fleste lægemidler findes sådanne data endnu ikke.

Effektdata vil i givet fald foreligge som EC₅₀ eller EC₁₀ værdier. Det vil sige den koncentration af et stof, hvor man ser en effekt på henholdsvis 50 eller 10 procent på udvalgte parametre, f.eks. død eller nedsat reproduktionsevne.

Herefter beregner man en "Uskadelig Miljømæssig Koncentration", som ikke menes at skade organismene i det pågældende miljø.

Hvis den "Estimerede miljømæssige koncentration" er på under 10 µg/kg i jord og på under 0,001 µg/l i overfladevand, er stoffet i følge EU's direktivforslag ufarligt. Når koncentrationerne er større, startes en fase II undersøgelse.

Dybtgående økotoxikologi

Fase II er en dybtgående økotoxikologisk vurdering af lægemidlet. Vurderingen indledes med at få et bedre kendskab til det miljø, hvor stoffet ender, og med at bestemme den nøjagtige eksponeringsvej.

Hvis bakterier ikke nedbryder stoffet i en aerob laboratorietest, eller hvis nedbrydningen varer mere

end otte timer, viser det, at jordbakterierne heller ikke, eller kun langsomt, vil kunne nedbryde stoffet.

Næste trin er så at kvantificere effekten af stoffet på organismer i det pågældende miljø. Når lægemidlet ender i overfladevand, undersøges stoffets giftvirkninger på f.eks. alger, krebsdyr og fisk. I jord testes effekten på f.eks. jordbakterier og regnorme.

Derved fås en mere nøjagtig "Uskadelig miljømæssig koncentration". Til sidst vurderes forholdet mellem den "Estimerede Miljømæssige Effekt" og den "Uskadelige Miljømæssige Koncentration". Hvis den estimerede koncentration i miljøet er større end den uskadelige

Figuren viser, hvordan man beregner koncentrationen af et lægemiddel, som udledes i miljøet samt, hvordan man fastsætter grænser for, hvornår udledningen ikke medfører nogen miljørerisiko.

koncentration, må udledningerne af stoffet nedsættes.

EU-direktivet er endnu ikke vedtaget, og det forlyder, at det sandsynligvis ikke bliver vedtaget i sin nuværende form. Producenter af lægemidler kan derfor fortsætte med blot at sandsynliggøre, at et lægemiddelstof ikke skader miljøet. De skal ikke bevise det, selvom mange faktorer peger på, at en del lægemidler påvirker miljøet.



Lic.pharm. Bent Halling Sørensen er adjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.scient., Ph.D. Søren Nors Nielsen er forskningsadjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Dr. scient. Sven Erik Jørgensen er docent ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

Toksikologi har stor betydning for samfundet

Samfundet har brug for kemikere og toksikologer med paratviden. DFH får hvert år mange henvendelser om hjælp, som viser behovet for den toksikologiske forsknings resultater.

Af Erling Sonnich Thomsen og Mads Skak Jensen

Toksikologi er i stigende grad relevant for samfundet, og der er brug for velkvalificerede forskere. Det gælder i krisituationer; hvor farligt er det, når et kemikalielager brænder, og hvordan skal man gribe ind over for en akut livstruende forgiftning? Men vi skal også holde øje med politikerne og sige fra, når f.eks. toksikologien er glemt i risikanalyser.

Med hensyn til forskeruddannelsen har vi for nylig i samarbejde med Risø gennemført to Ph.D. projekter ved Lene Smith-Hansen og Anette Schipper omkring sammensætning og giftighed af røggasser fra brande i kemikalielagre med pesticider.

En anden væsentlig sag er, at amylnitrit er undsagt af Arbejdstilsynet som modgift mod cyanid - men det virker faktisk!

Dette kunne give en mistanke om, at det er nitrogenoxid (NO), der frigøres fra amylnitrit, som har en gunstig virkning.

Indtil for få år siden mente man, at mekanismen bag cyanidforgiftning var helt klarlagt. Cyanid hæmmer sidste led i respirationskæden, hvilket bevirker, at cellerne ikke kan udnytte oxygen.

Nye modgifte mod cyanidforgiftning (MJS)

Amylnitrit er den klassiske modgift. Stoffet omdanner blodets oxygen-transportør hæmoglobin til methæmoglobin, der ikke kan transportere oxygen, men som til gengæld kan binde cyanid. Dette giver kroppen bedre tid til selv at uskadeliggøre giften.

Det viste sig bare, at ved normal dosering var methæmoglobinindannelsen mindre end den klinisk effektive dosis. Først da man begyndte at sætte spørgsmålstegn ved det rimelige i, at amylnitrit virkede som modgift, kom der på ny gang i diskussionen om cyanidforgiftning.

Amylnitrit måtte derfor have en anden, eller en yderligere effekt. Det har startet jagten på nye modgifte med andre virkningsmekanismer end de traditionelle.

Stoffer, der frigør nitrogenoxid, er blandt kandidaterne. Da en af effekterne af nitrogenoxid er blodtrykssænkning, var det en mulighed, at nedsættelse af blodtrykket i sig selv måske kunne have en effekt. Mads Skak Jensen undersøgte dette i en dyremodel i samarbejde med Tue Johansen under deres specialestudium.

Fire blodtryksnedsættende stoffer blev testet. Resultatet var, at den rene blodtryksnedsættelse ikke havde nogen virkning, men til gengæld syntes der at være modgifteffekt af de to NO-donorer, der var medtaget i forsøget.

Dette skal nu studeres nærmere, og planen er at screene forskellige interessante stoffer med en cellemodel, hvorved vi gerne skulle få en håndfuld stoffer, der så skal testes i en dyremodel.

Resultatet bliver forhåbentlig en modgift, der kan administreres af ikke-læger, og som dermed er et godt alternativ til amylnitrit, som ved forkert anvendelse kan være potentielt farligt, især for mennesker med et svagt hjerte.

Bedre formidling til brugerne

Et af resultaterne af forskningen på Danmarks Farmaceutiske Højskole er de svar, vi kan give til dem, som henvender sig til Højskolen om hjælp.

Det er indlysende for mig, at formidling af egne og andres resultater bør have større prioritet i trilogien "forskning, undervisning, administration". Vel at mærke en formidling, som er forståelig og umiddelbart anvendelig for brugerne, og

som finder sted på deres egne betingelser. Det gælder, hvad enten der er tale om fagfolk, myndigheder, politikere, medierne eller manden på gaden.

Bare i løbet af det sidste år har jeg haft et halvt hundrede formidende henvendelser. En af de større sager var om forældreløse kemikalier på Bygmestervej i København:

Et par unge fyre havde opdaget, at der var fri adgang fra gaden til et galvaniseringsfirma. Da virksomheden krakkede i 1993, havde direktøren kun sørget for at fjerne ca. 100 kg cyanider. Nu i januar 1996 var der grafitti i rummene, og narkomaner havde overnattet.

TV2, som drengene havde ringet til, bad mig komme ud og se på de kemikalier, man blot havde efterladt. Der var et syndigt rod af proceskar, kemikalieaffald og umærkede kemikalier i 400-liters plastbeholdere. Andre beholdere havde ødelagte etiketter. Vi kunne identificere stærkt ætsende stoffer som fast natriumhydroxid i en mængde på over 250 kg., kaliumpermanganat og ammoniumhydrogenfluorid. Der var tungmetallforbindelser, især nikkel-salte, i kar, på gulv og sivet ned i jorden. Af de kræftfremkaldende stoffer kan nævnes 250 kg. chromtrioxid samt dichromater.

Forholdene var aldeles uforvarselige, idet børn kunne gå frit ind fra gaden og fylde lommerne med dødsfarlige kemikalier. Vi fik arrangeret afspærring, inden TV gik i luften, for at hindre en valfart af kemiinteresserede drenge, og selve oprydningen skete dagen efter.

Sådanne henvendelser udefra danner på mange måder et godt grundlag for at gøre undervisningen vedkommende!

100 nøglestoffer bør læres udenad

Gennem de seneste årtier er der sket en uheldig udvikling i bl.a. fagene kemi og toksikologi: Det er ikke længere "in" at kunne stofegenskaber udenad, hverken i Danmark eller i udlandet. Man har i stedet søgt at lære de studerende teori og regler i håb om, at de så kunne udlede stofegenskaberne, når der er brug for det. Den strategi har spillet fallit.

Samfundet har brug for kemikere og toksikologer med paratviden både til umiddelbar brug og til at slå alarm, når vigtige beslutninger træffes på et tvivlsomt grundlag. Databaser gør det ikke alene, for det forudsætter faglig baggrund at vurdere indholdet kritisk.

Fig. 1



Vi bør sikre, at de studerende på Danmarks Farmaceutiske Højskole opnår en større paratviden, også om farlige stoffer.

Først og fremmest arbejdes der på at definere et sæt stoffer, 50 organiske og 50 uorganiske, som skal vælges således, at de dels er umiddelbart relevante, dels udgør et solidt grundlag for at skønne over egenskaberne af lignende stoffer. Udvalgte egenskaber ved stofferne som udseende, fysiske og kemiske data, reaktioner, farlighed m.v. skal så læres udenad.

Indlæringen kan gøres mere attraktiv ved, at listen og indholdet præsenteres på samme måde som WWW-sider på internet.

Brug af internet er i øvrigt spændende og uundværligt i dag, men her skal man være særlig kritisk, fordi informationerne langt fra

altid er vurderet fagligt, inden de føres frem. Højskolen bør imidlertid være i frontlinien, hvad angår anvendelser af internet, både for de studerende og for de ansatte.

Vi tager også på anden måde konsekvensen af, at samfundet mangler jordnære risikokemikere og toksikologer. Allerede i sikkerhedskurset på 1. semester introducerer vi de studerende for farlige stoffer og reaktioner. Man bør udbygge kurset med at demonstrere disse i stinkskab eller udendørs. Laboratoriekurset i uorganisk kemi på 2. semester kunne med fordel drejes hen mod farlige stoffer og reaktioner; på 7. semester rundes der så af med selve toksikologien.

Kontroversiel sag omkring DAMP-børn

Det mest spændende er grænseom-

Forældreløse kemikalier på Bygmestervej i København. Der var fri adgang fra gaden til et krakket galvaniseringsfirma, som havde efterladt et syndigt rod af proceskar og kemikalieaffald. Vi fandt stærkt ætsende stoffer, tungmetallforbindelser og kræftfremkaldende stoffer.



Lic.pharm. Erling Sonnich Thomsen er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.pharm. Mads Skak Jensen er Ph.D. studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.