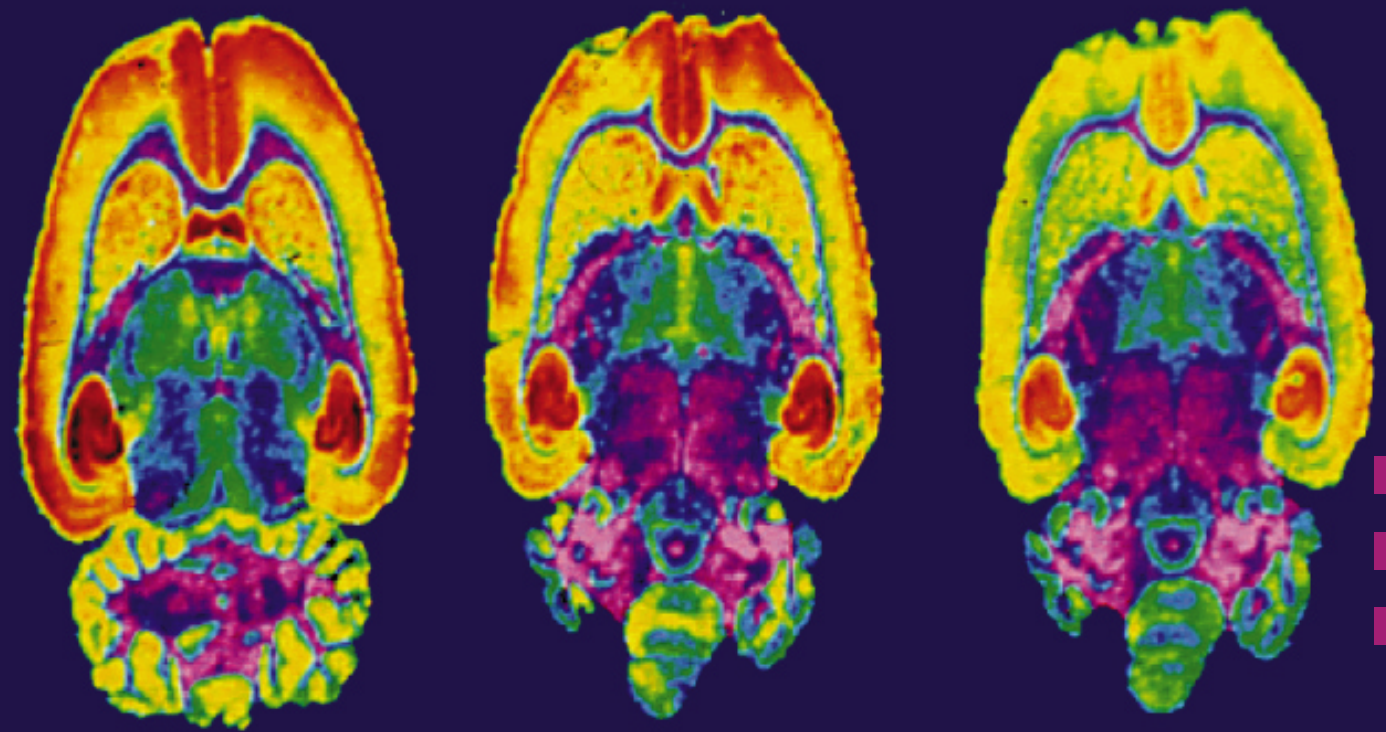


LÆGEMIDDELFORSKNING

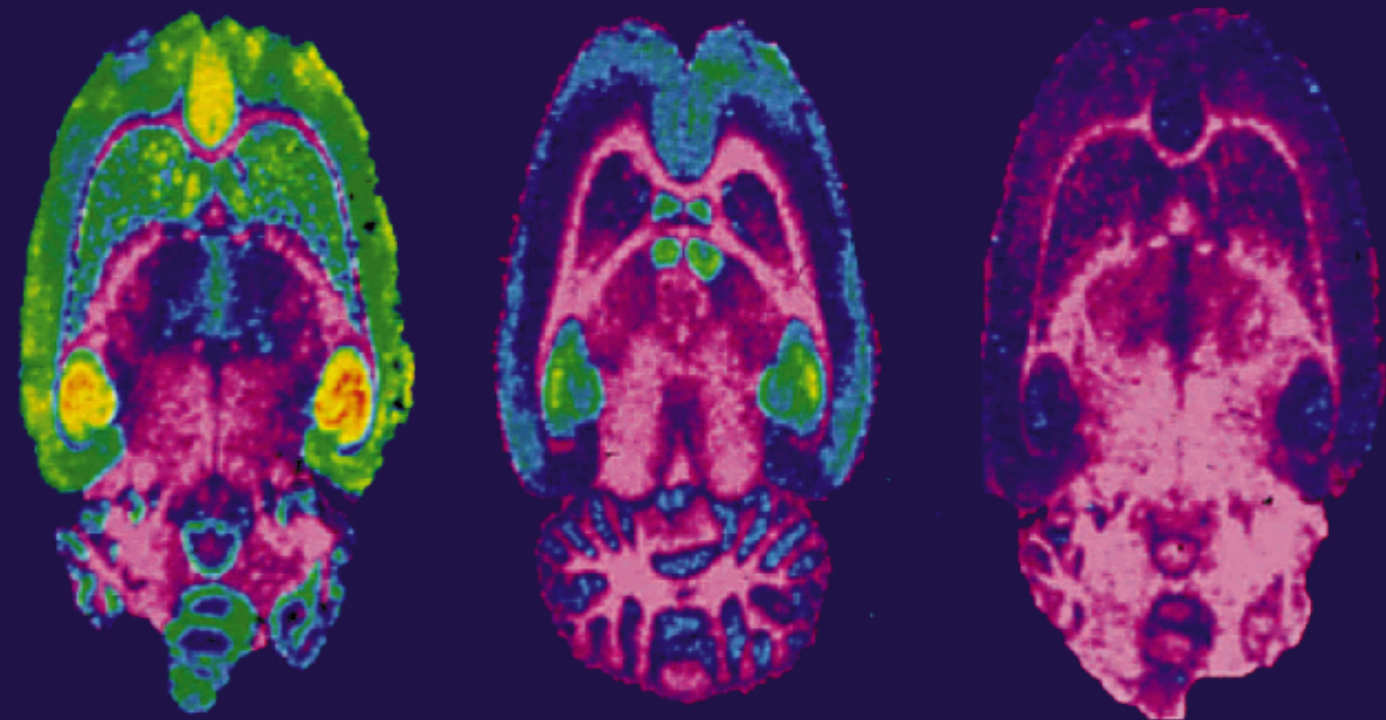
1 9 9 7



0 μ M

0.3 μ M

1 μ M

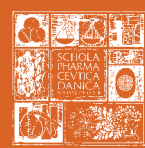


3 μ M

10 μ M

100 μ M

DANMARKS
FARMACEUTISKE
HØJSKOLE



Lægemedelforskning udgives af Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Ansvarshavende: Mette Rasmussen, DFH.

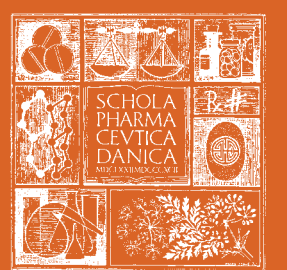
Redaktion: Videnskabsjournalist Rolf Haugaard Nielsen, informationsmedarbejder Jesper Munck og forskningsbibliotekar Annemette Møller Hansen.

Grafisk produktion: Levison+Johnsen+Johnsen as

Layout P.Z. Design

Fotos: Jesper Munck, Tue Askaa, Henrik Fylking Nielsen, Erik Nielsen, Henrik Lund, Bjarke Ebert, Lotte Skjold og Fotogruppen Aps.

Forside: Scanning af snit af rottehjerne tilført radioaktivt stof.



| Indholdsfortegnelse | Side |
|--|-------|
| H.C. Ørsted: Farmaceut og naturstoffkemiker <i>Af Jerzy W. Jaroszewski</i> | 4-5 |
| Bedre behandling af urinvejsinfektioner <i>Af Hanne Hvidberg, Niels Frimodt-Møller og Søren N. Rasmussen</i> | 6-7 |
| Genvej til nye lægemidler <i>Af Hans Bräuner-Osborne og Povl Krogsgaard Larsen</i> | 8-9 |
| Alzheimers syge og hukommelsens kemi <i>Af Alex Haahr Goulliaev og Mikael Begtrup</i> | 10-11 |
| Et forsvar mod nervedød? <i>Af Harald S. Hansen, Birthe Moesgaard, Henrik H. Hansen, Inga Björnsdóttir, Jerzy W. Jaroszewski og Steen Honoré Hansen</i> | 12-13 |
| Lægemiddelforskning med rene spejlbilledformer <i>Af Tommy N. Johansen og Erik Falch</i> | 14-15 |
| Ny strategi for behandling af epilepsi <i>Af Orla Miller Larsson, Tina Bolvig og Arne Schousboe</i> | 16-17 |
| Regulering af hjernens blodkar <i>Af Inger Jansen-Olesen og Anette Sams</i> | 18-19 |
| Model af blod-hjerne barrieren <i>Af Lise Lund, Lars Hovgaard og Lona Christrup</i> | 20-21 |
| Væksthormon gennem næsen? <i>Af Charlotte Vermehren, Peter B. Johansen og Harald S. Hansen</i> | 22-23 |
| Stoffer kan frigøre væksthormon fra hypofysen <i>Af Bjarne Fjalland, Thomas Anderson og Peter B. Johansen</i> | 24-25 |
| Computer beregner om lægemidlet kommer ud i blodet <i>Af Lene Krarup og Inge Thøger Christensen</i> | 26-27 |
| Den svære vej gennem tarmvæggen <i>Af Bente Steffansen, Sven Frøkjær og Mitchell E. Taub</i> | 28-29 |
| Membraner og transport af lægemidler <i>Af Kent Jørgensen</i> | 30-31 |
| Fra lakridsrod til lægemiddel <i>Af Søren Brøgger Christensen, Simon F. Nielsen og Tommy Liljefors</i> | 32-33 |
| Børn skal informeres om deres lægemidler <i>Af Anna Birna Almarsdóttir</i> | 34-35 |
| De samfundsmæssige omkostninger ved afhængighed af psykofarmaka <i>Af Marlene Gyldmark og Ebba Holme Hansen</i> | 36-37 |
| Økotoksikologiske tests påviser hormoneffekter <i>Af Bent Halling-Sørensen, Henrik Rasmus Andersen, Søren Nors Nielsen, Sven Erik Jørgensen og Steen Honoré Hansen</i> | 38-39 |
| Protein binder giftige og livsvigtige metaller <i>Af Carsten Boye Knudsen, Inga Björnsdóttir, Ole Jøns og Steen Honoré Hansen</i> | 40-41 |

H.C. Ørsted: Farmaceut og naturstofkemiker

Hans Christian Ørsted skrev sig ind i historien med opdagelsen af elektromagnetismen, som fik afgørende betydning for den moderne fysik. Men han begyndte sin akademiske karriere som farmaceut. I år er det 200 år siden, Ørsted bestod sin farmaceutiske eksamen.

Af Jerzy W. Jaroszewski

I det Herrens år 1797 gik den tyveårige Hans Christian Ørsted op til farmaceutisk eksamen ved Københavns Universitets medicinske fakultet efter Kong Christian V's Forordning om "Medicis oc Apoteker" fra 1672. For 200 år siden fandtes der ingen farmaceutisk højskole – den blev først indviet i 1892.

Eksamen var en forudsætning for at få apoteksbevilling, men nogen egentlig undervisning af farmaceuter fandtes ikke. Farmaceutuddannelsen bestod i en læretid på apotek kombineret med selvstudium, samt eventuelt forelæsninger ved Københavns Universitet efter muligheder og lyst. Eksaminering blev varetaget af professorer i medicin fra Københavns Universitet samt af københavnske apotekere.

Ørsteds far var apoteker i Rudkøbing, og den unge Hans Christian hjalp sammen med sin yngre bror til på sin fars apotek fra 12 års alderen. I denne periode studerede Ørsted med stigende interesse farmaci og naturvidenskab. I 1794 tog han til København for at fortsætte sine studier.

Efter en periode op til de akademiske adgangseksaminer, der var domineret af sprogstudier, filosofi og æstetik, valgte Ørsted kemi som sit hovedfag. Han studerede farmaceutiske arbejder og gik blandt andet til de netop indførte forelæsninger i kemi, som blev holdt af professor Ludvig Manthey, indehaveren af Løveapoteket.

Henimod det 18. århundredes

slutning eksisterede der ikke nogen selvstændig eksamen i fysik og kemi ved Københavns Universitet. Kemi var jo kun på tærskelen til at udvikle sig til et moderne fag, og vejen til eksperimentel naturvidenskab førte i høj grad gennem et apoteks laboratorium. Det er således denne vej, Ørsted har betrådt.

Den 20. maj 1797 gik han op til Examen chemico-pharmaceuticum, som bestod af fem fag. Af de fire eksaminatorer var tre læger og en apoteker. En af eksaminatorerne, professor J. C. Tode, skrev lidt om Ørsteds eksamen i det af ham udgivne tidsskrift "Medizinisches-chirurgisches Bibliothek" under titlen "Ein ausgezeichnetes Apothekerexamen". Her beskriver Tode, at Ørsted blandt andet identificerede forelagte friske planter, inklusive deres botaniske og farmaceutiske navne samt deres egenskaber, og udviste fint kendskab til den nye "antiflogistiske" kemi (teoriene om, at alle stoffer indeholder såkaldt flogiston, en æterisk substans, muligvis med

en negativ vægt, der slipper ud under forbrænding, var netop blevet tilbagevist af Lavoisier).

Ørsted bag eksamen for farmaceuter

I 1800 blev Hans Christian Ørsted udnævnt til ulønnet adjunkt for "Materia medica og pharmaceutik" ved Københavns Universitet og fungerede som apoteker ved Løveapoteket. Som 23-årig var Ørsted således både en udøvende farmaceut og lærer for fremtidige farmaceuter.

Endnu vigtigere for den farmaceutiske verden var det arbejde han gjorde, efter han er blevet udnævnt til professor i fysik i 1806, for at forbedre den farmaceutiske uddannelse – ofte under modstand fra den medicinske side. Allerede i 1806 og i 1813 fremsatte Ørsted forslag til reformering af farmaceuteksamen. Det var dog først i 1828 at det lykkedes ham, sammen med kemikeren Zeise, at indføre "Ordning for pharmaceutisk eksamen" og den farmaceutiske eksamenskommission, hvori Ørsted, som medlem, eksaminerede i fysik. Eksamen omfattede blandt andet praktiske prøver i kemi. I 1838 blev censorinstitution indført ved de farmaceutiske eksaminer, og det blev overladt til eksamenskommissionen at fastsætte reglerne for bedømmelse. Som resultat heraf indførte Ørsted en karakterskala, som er blevet en forløber til moderne karaktergivning.

Naturstofkemi gennem 200 år

Af de fag, som Ørsted beskæftigede sig med i sit særdeles rige professionelle liv er naturstofkemi det eneste, der er repræsenteret på Højskolen i dag.

I 1820 publicerede Ørsted en afhandling, hvor han beskriver isolering af "Et nyt æsk [dvs. alkaloid] fra peberen" – det skarpt smagende stof piperin. Opdagelsen af piperin kom i kølvandet på Sertüners isolering af morfin fra opium i 1817, og Ørsted har således deltaget i en bølge af nye landvindinger inden for kemi, hvor en række rene stoffer –

Fig. 2



Ørsteds farmaceutiske eksamensbevis fra år 1797.

Teksten lyder:

"1797 d. 20. Maj Indstillede sig til Examen Chemico Pharmaceuticum Candidatus Pharmaci Hans Christian Ørsted Fød i Rudkøbing paa Langeland, hvor hans Foreldre var Apoteker Søren Christian Ørsted, hans Moder Karen Hermansen. Efter at have erholdt Kundskab i de Academiske Videnskaber og Undervisning af hans Fader i de pharmaceutiske, blev han i Aaret 1794 demitteret til Universitetet og erholdt i October Maaned s.a: in Examine Charact: laudab: Aaret derpaa Examine philosophico og Philogogico Charact. laudab. med Udmerkelse. I Vinteren 1795 - 96 lagde han igjen Vind paa Pharmacien under hans Faders Opsigt, fortsatte derpaa sin Academiske Løbebane i Khavn, skrev en Afhandling i Æsthetiquen som blev tilkiendt Præmie, hørte imidlertid Forelæsninger i de medicinske Videnskaber under Etatsr. Saxtorph Prof. Tode og Prof. Aashejm, og i de Chemiske under Prof. Manthey - gjorde derpaa Chemien til sit Hovedfag, og ønskede sig nu Prøvelse i samme."

Herefter følger karakterer og underskrifter.

alkaloider – blev fundet på et rationelt grundlag, som bestod i udnyttelsen af stoffernes syre-base egenskaber. Isolering af et stort antal af de fysiologisk aktive alkaloider i 1820'erne og 1830'erne skabte forstærket behov for strukturelle analyser og var særdeles vigtig for udviklingen af moderne organisk kemi, blandt andet i form af perfektionering af organisk elementæranalyse gennemført af Liebig – der også begyndte sin kemiske karriere i farmacien.

Ørsted giver i sine artikler udtryk for sine intentioner med hensyn til at fortsætte sine naturstofkemiske studier, men kort efter, i april 1820, så han under en forelæsning en magnetisk nål bevæge sig i det

øjeblik, han satte strøm til en kobberledning placeret lige ved siden af, og Ørsteds liv fortsatte ad en anden vej.

Naturstofkemi er som sagt et fag, som er et driftigt forskningsområde på DFH den dag i dag. Området oplever sin store renaissance på verdensplan i disse år. Forskningen omkring naturligt forekommende kemiske forbindelser fortsætter med at være en vigtig naturvidenskabelig grunddisciplin, som stimulerer den organisk-kemiske tankegang. Den bidrager også til identifikation af nye farmakologisk vigtige stoffer, hvilket har en særlig interesse her på DFH.

Samtidig fuldføres sammen- smeltningen af naturstofkemi med

en anden gammel farmaceutisk disciplin, nemlig farmakognosi. Farmakognosi, oprindeligt "læren om lægemidler og deres ydre kendetegn", har altid benyttet sig af den deskriptive naturstofkemi, men, som allerede påpeget af den tidligere professor i naturstofkemi Helmer Kofod under hans festtale på DFH den 20. oktober 1955, "det er en følge af den almindelige udvikling, at hovedvægten mere og mere synes at blive lagt på denne [naturstofkemiske] side af faget, på bekostning af den makroskopiske og mikroskopiske drogeidentifikation".

Rustet med moderne stofidentifikations metoder, især NMR (kerne-magnetisk resonansspektroskopi), favoriseret af en global adgang til planteressourcer, og støttet af biologernes farmakologiske ekspertise, står Højskolens naturstofkemikere og farmakognoster sammen i bestræbelser på at videreføre de stolte traditioner af faget i dette land.

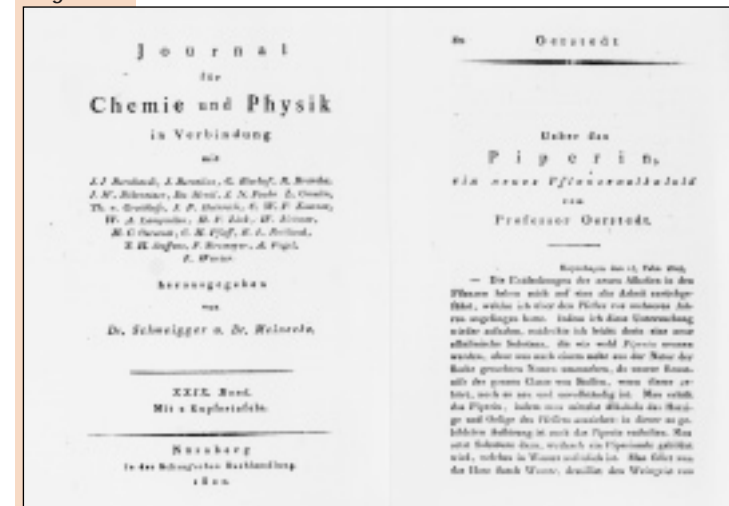
Ørsteds afhandling om piperin, det stærke smagsstof i peber, publiceret i Schweiggers Journal für Chemie und Physik, vol. 29, s. 80-82, i feb. 1820. En kortere, fransk version blev publiceret i Journal de Physique, vol. 90, s. 173-174, i marts 1820. Stoffets bruttoformel blev fastlagt i 1839, og strukturen opklaret i 1880'erne. Det var dog først i 1970, at strukturen af piperin og lignende stoffer fremgik med stor klarhed ud fra en NMR undersøgelse.

Fig. 1



Hans Christian Ørsted (1777-1851) er en af de mest kendte danske forskere gennem tiderne. Det viste billede er Chrétien's blyantsforlæg til et kobberstik af 1803. Dette ungdoms-portræt pryder Danmarks Farmaceutiske Højskoles H.C. Ørsted-medaille af 1956 der indgår, præget i guld, i Rektors embedskæde.

Fig. 3



Bedre behandling af urinvejsinfektioner

Ved urinvejsinfektioner i mus øges effekten af antibiotika, når viden om lægemidlets skæbne i kroppen tages med i beregningerne af dosis, doseringsinterval og behandlingsvarighed. Museforsøg viser også, at antibiotika ikke altid har udryddet bakterierne, selv om urinen er steril. Dét må læger være opmærksomme på ved behandling af blærebetændelse og nyrebækkenbetændelse hos mennesker.

Af Hanne Hvidberg, Niels Frimodt-Møller og Søren N. Rasmussen

Urinvejsinfektioner er blandt de hyppigste infektionssygdomme hos mennesker og forekommer især hos kvinder; således vil mere end hver fjerde kvinde opleve mindst ét tilfælde af urinvejsinfektion.

Normalt begrænser infektionen sig til blæren, og disse tilfælde er ikke livstruende og medfører ikke varige mén.

Men hvis infektionen breder sig til nyrerne, så der opstår nyrebækkenbetændelse, er der risiko for

vævsskader af blivende karakter, fordi nyrevævet omdannes til inaktivt bindevæv. Samtidig stiger risikoen for, at infektionen spreder sig til blodet. En sådan blodforgiftning kan være livstruende.

Princippet for behandling af blærebetændelse er ganske veldokumenterede, men dokumentationen for varigheden af antibiotikabehandling ved nyrebækkenbetændelse er ikke god, og ofte finder der en reinfektion sted.

Langt den største del af tilfældene af urinvejsinfektion forårsages af *Escherichia coli*. Antibiotika, der er effektive overfor bakterier som *E. coli*, er β -lactamer, herunder penicilliner og cefalosporiner, quinoloner og aminoglykosider. Det er karakteristisk for disse stoffer, at de efter indgift resulterer i meget høje koncentrationer i urinen i forhold til i blodet.

Mus som model for mennesker

Mus er generelt følsomme over for de samme bakterielle egenskaber, som sætter bakterier i stand til at kolonisere urinvejene hos mennesker. Med en eksperimentel urinvejsinfektionsmodel i mus kan man derfor undersøge indflydelsen af dosisstørrelse, doseringsinterval og

behandlingsvarighed på effekten af behandlingen. Samtidig kan man studere sammenhængen mellem antibiotikas effekt og farmakokinetik, hvilket vil sige lægemidlets omsætning i kroppen. Undersøgelserne er baseret på resultater fra hele organer og er derfor mere detaljerede, end det er muligt at opnå ved kliniske undersøgelser på patienter.

Vi har etableret en urinvejsinfektionsmodel i hunmus med det formål at efterligne forløbet af en naturligt fremskridende infektion i urinvejene hos mennesker. Et lille volumen bakterieopløsning bestående af et klinisk isolat af en urinvejspatogen *E. coli* stamme blev injiceret i blæren via et urinrørskateter, som blev fjernet umiddelbart efter injektionen. På denne måde opnåede vi en reproducerbar urinvejsinfektion, som etablerede sig i tre fjerdedele af nyrerne hos musene.

Mikroskopi på nyrevæv viste her en signifikant sammenhæng mellem tilstedeværelsen af bakterier i vævet og forandringer i vævet af mere eller mindre permanent karakter.

Behandling med antibiotika

Næste trin var at behandle musene med forskellige antibiotika og måle

lægemidlets virkning. Effekten blev målt ved at bestemme antallet af bakteriekolonier i hver nyre, i blæren og pr. milliliter urin. Virkningen af hvert enkelt antibiotikum blev derefter relateret til stoffernes omsætning i musene.

Effekten af de forskellige typer antibiotika har ved andre infektionstyper kunnet relateres til specifikke farmakokinetiske parametre, som igen afhænger af stoffernes antibakterielle drabseffekt. Således kan effekten af β -lactam antibiotika, som udviser koncentrationsafhængig drabseffekt, relateres til den tid, hvor koncentrationen er over en vis tærskel, der kaldes for den mindste hæmmende koncentration (MIC). Effekten af quinoloner og aminoglykosider, hvis drabseffekt derimod er afhængig af koncentrationen, kan relateres til den maksimale koncentration, der opnås efter indgift af

Gentamicin havde god effekt på bakterietallet i blæren og var generelt mere effektivt end cefuroxim. Men vævsakkumulation i nyrerne, der forlængede tilstedeværelsen af stoffet i nyrevævet, gjorde det svært at relatere effekten til urin- eller nyrevævs-koncentrationer.

De største doser af begge stoffer var de mest effektive, men de valgte doseringer var ikke i stand til at sterilisere urinvejene, og vi antog, at det skyldtes utilstrækkelig behandlingsvarighed.

Varigheden af behandlingen

Vi undersøgte derfor betydningen af, hvor længe behandlingen varede. Inficerede mus blev behandlet i en, to eller fire dage med et af otte antibiotika: Fem β -lactam antibiotika, to quinoloner samt gentamicin. Det viste sig nu, at effekten af alle behandlinger var størst efter fire

behandlinger, men vores resultater tyder på, at det i lige så høj grad kan være blæren, som vedligeholder infektionen.

Resultaterne viser ydermere, at steril urin ikke nødvendigvis er ensbetydende med sterile urinveje, og netop urindyrkning bliver i praksis brugt som indikator for effekten af behandling. Det vil derfor være relevant at undersøge, om der er bakterievækst i blære væg biopsier fra patienter, der efter endt behandling for nyrebækkenbetændelse har steril urin.

Model med bred anvendelighed

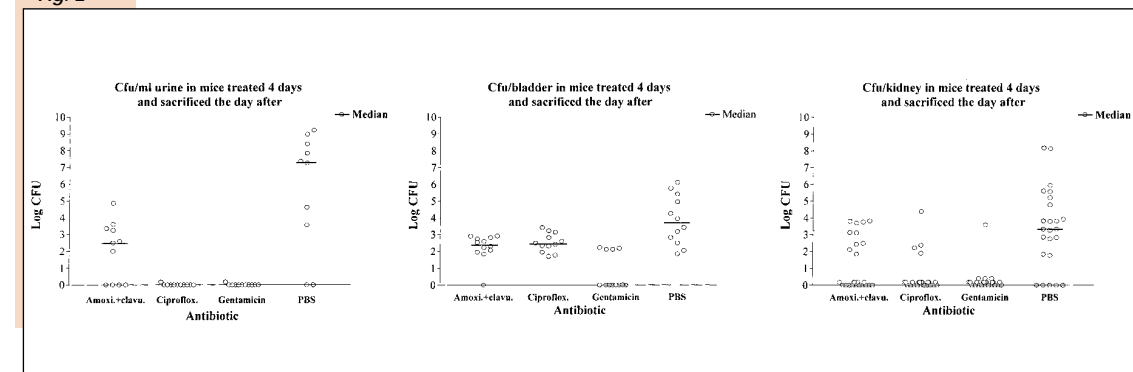
Urinvejsinfektionsmodellen i mus har vist sig at afspejle samme respons på behandling, som kliniske undersøgelser på patienter har vist. Modellen kan derfor anvendes til at undersøge, hvor i urinvejene bakte-

Fig. 1



En bakterieopløsning bestående af en urinvejspatogen *E. coli* stamme injiceres i musens blære via et urinrørskateter. På denne måde opnåede vi en reproducerbar urinvejsinfektion.

Fig. 2



Figuren viser effekten af 4 dages behandling af urinvejsinfektion induceret i mus. Musene blev behandlet med hhv. amoxicillin + clavulansyre, ciprofloxacin og gentamicin. Figuren til venstre viser bakterietallet pr. ml. urin, den midterste figur viser bakterietallet pr. blære, og figuren til højre viser bakterietallet pr. nyre. Bakterietallene i kontrolgruppen, der blev behandlet med saltvand, er vist til sammenligning.

stoffet samt til, hvordan koncentrationen aftager med tiden.

Dosisstørrelse og doseringsinterval

Inficerede mus blev behandlet en dag med forskellige doser cefuroxim, hvis drabseffekt er koncentrationsafhængig, eller gentamicin, hvis drabseffekt er afhængig af koncentrationen. Stoffene blev givet med forskellige intervaller, og doserne blev valgt, så de gav aktive koncentrationer i urin alene, eller i urin, serum og nyrevæv samtidig.

Cefuroxim havde bedst effekt på bakterietallet i urin samt på bakterietallet i nyrevæv, såfremt koncentrationen oversteg den mindste hæmmende koncentration i hele urinvejsystemet. På trods af høje urinkoncentrationer kunne cefuroxim ikke sterilisere blære vævet.

Endvidere var quinolonerne og gentamicin generelt mere effektive end β -lactam antibiotika, hvilket svarer til resultater af kliniske undersøgelser.

For β -lactam antibiotika fandt vi en signifikant sammenhæng mellem omfanget af nyreinfektion og den tid antibiotikakoncentrationerne var over den mindste hæmmende koncentration i nyrevæv og blodserum efter fire dages behandling.

Blæreinfektionen viste sig at være relativt uafhængig af antibiotikabehandling, hvilket kan skyldes, at bakterierne sidder indkapslet i blærens slimlag eller er dækket af biofilm. Begge dele kan forhindre antibiotika i både urin og i blodserum i blære væggen i at påvirke bakterierne. Man mener generelt, at reinfektion forårsages af bakterier, som overlever i nyrerne på trods af

rierte sidder efter endt behandling, og hvilken form for behandling, der vil kunne sterilisere de forskellige væv.

Modellen kan også bruges til at undersøge, om der er sammenhæng mellem effekten af forskellige antibiotikabehandlingsregimer og specifikke egenskaber hos visse *E. coli* stammer, der gør disse bakterier særligt urinvejspatogene. Studierne vil kunne belyse vigtigheden af detaljerede undersøgelser og typebestemmelse af kliniske isolater med henblik på valget af behandling.

Endelig kan modellen også anvendes i tilsvarende undersøgelser af behandlingseffekt ved infektioner forårsaget af andre urinvejspatogene bakterier end *E. coli*.



Cand.pharm. Hanne Hvidberg er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



Dr.med. Niels Frimodt-Møller er overlæge ved Klinisk Mikrobiologisk afdeling, Statens Seruminstitut.



Cand.pharm. Søren N. Rasmussen er lektor ved Institut for Farmakologi.

Genvej til nye lægemidler

Det tager år og koster milliarder at udvikle et nyt lægemiddel. Derfor forskes der intensivt i nye metoder, som hurtigere og billigere kan identificere nye lægemiddelstoffer. DFH er med til at udvikle en genteknologisk metode, som kan screene tusindvis af stoffer på en dag. Metoden anvendes nu til at teste potentielle lægemidler til behandling af Alzheimers sygdom.

Af Hans Bräuner-Osborne og Povl Krosgaard-Larsen

De gennemsnitlige omkostninger ved udvikling af nye lægemidler er i dag på omkring to milliarder kroner. Samtidig tager det typisk 13 år fra et projekt startes, til lægemidlet endelig kan markedsføres.

For at sænke omkostningerne og reducere tidshorisonten sættes voldsomt på at udvikle nye metoder, som vil gøre processen billigere og hurtigere. Der er flere årsager til, at man ønsker en hurtigere udvikling af nye lægemidler. Dels konkurrerer medicinalfirmaerne om at komme først med nye produkter, dels gælder patentet på et lægemiddelstof kun i 20 år, hvoraf de første 10 til 15 år går med udviklingen af medicinen. Ved at markedsføre lægemidlet hurtigere vil

man have eneretten på produktet i længere tid, hvilket øger indtjeningsmulighederne.

Der er især to områder, hvor man sætter stærkt på at udvikle nye metoder. Det første er kombinatorisk kemi, hvor syntesen af nye lægemiddelstoffer systematiseres, så robotter på kort tid kan fremstille et væld af forskellige stoffer. Det andet er biologisk screening (High-Throughput Screening, HTS), hvor den biologiske testning af nye lægemiddelstoffer ligeledes primært foretages af robotter.

Disse metoder har en meget stor kapacitet, og det er i øjeblikket muligt at teste op mod 10.000 stoffer om dagen. Indenfor få år spås det, at antallet kommer op på mellem 100.000 og en million stoffer om dagen.

Stoffer og receptorer

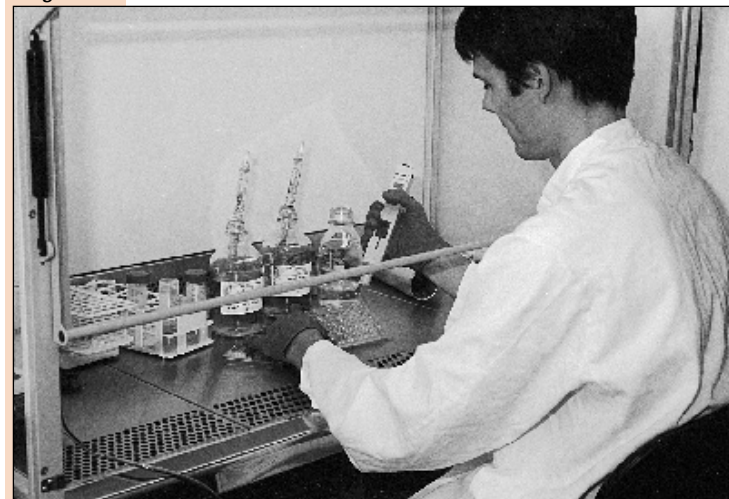
Under et studieophold på University of Vermont i USA indgik Hans Bräuner-Osborne meget centralt i et projekt vedrørende udviklingen af et nyt HTS system, som kaldes Receptor Selection and Amplification Technology (R-SAT). Vi anvender nu systemet til at teste den biologiske aktivitet på receptorer i hjernen af stoffer, som er syntetiseret på Institut for Medicinalkemi, og systemet er samtidig hjørnesteinen i det nye firma Acadia Pharmaceuticals, som netop har startet et datterselskab i Glostrup.

Metoden bruges til at teste, hvordan lægemiddelstoffer og naturlige signalstoffer påvirker celler, og ideen bag R-SAT er egentlig ret simpel. Udgangspunktet er en cellelinie, der består af celler, som i princippet kan blive ved med at dele sig i det uendelige. Den anvendte cellelinie hedder NIH-3T3, og cellerne har den specielle egenskab, at de har "berøringsangst", hvilket indebærer, at cellerne stopper med at dele sig og går i en slags dvaletilstand, når de er vokset så meget, at de begynder at røre hinanden.

Det er dog muligt at overvinde denne kontakthæmning, når man stimulerer cellerne med visse signalstoffer. Da cellerne stammer fra en hudcelle, er der dog mange af hjernens receptorer, som ikke findes på cellerne, hvorfor de ikke reagerer på en del af hjernens signalstoffer. Netop hjernens signalstoffer er vort forskningsfelt, men problemet løses dog nemt ved at tilføre cellen det gen, som koder for den pågældende receptor, som man har isoleret fra hjernen ved hjælp af genteknologi. Herefter vil cellen reagere på hjernens signalstof og begynde at vokse i takt med, at koncentrationen af stoffet øges.

Vækstøgningen kan i princippet måles på mange måder, men i R-SAT valgte vi en metode, som er enkel og let at håndtere. Samtidigt med, at vi indfører genet for receptoren, indfører vi også et gen, der koder

Fig. 2



Hans Bräuner-Osborne arbejder her ved en sterilbænk med hudceller, der har fået indsat gener, så de danner receptorer, som findes på hjernens nerveceller. Cellerne bruges bl.a. til at undersøge de strukturelle krav til potentielle lægemidler til behandling af Alzheimers sygdom.

for enzymet beta-galactosidase. Dette enzym spalter et farveløst substrat til et gult produkt. I det cellerne vokser på grund af stimulationen fra signalstoffet, vil de samtidig producere mere enzym, og dermed øges intensiteten af den gule farve, når substratet tilsættes cellerne. Man identificerer således nye stoffer, der stimulerer receptoren ved at måle intensiteten af den gule farve.

Fordelen ved metoden er, at den er uhyre simpel og relativt nemt har kunnet tilpasses robotudstyr, som muliggør HTS. Alle reagenserne er billige, hvilket også er vigtigt, når stofbiblioteker med et meget stort antal stoffer skal screenes. Vigtigst af alt er det dog, at metoden giver resultater, der svarer nøje til resultaterne af mere traditionelle og besværlige biologiske tests.

Lægemidler mod Alzheimers sygdom

På Institut for Medicinalkemi har vi bl.a. anvendt R-SAT til at undersøge stoffer, der aktiverer receptorerne for acetylcholin, et af hjernens signalstoffer.

Det har vist sig, at acetylcholin langsomt forsvinder fra dele af hjernen hos patienter, der lider af Alzheimers sygdom. Man håber derfor på at kunne lindre sygdommen ved at indgive stoffer, som påvirker receptorerne for acetylcholin.

Acetylcholin selv nedbrydes meget hurtigt i kroppen og er derfor ikke selv egnet som lægemiddel. For at et nyt stof skal være effektivt

mod Alzheimers syge, skal det være selektivt for den rette receptor for acetylcholin. I hjernen er der nemlig identificeret adskillige receptorer for acetylcholin. Der findes i alt 5 såkaldte muscarine acetylcholin receptorer i hjernen, som betegnes mAChR1-5.

I forbindelse med Alzheimers sygdom er interessen samlet om receptoren mAChR1, som menes at være involveret i sygdommen. Samtidig er det sandsynligt, at en anden receptor for acetylcholin, mAChR3, er årsag til nogle af de bivirkninger, som acetylcholinlignende midler ofte giver.

På Institut for Medicinalkemi har vi derfor arbejdet på at udvikle nye stoffer, som gerne skulle være selektive for mAChR1 receptoren. To af disse stoffer er O-Methyl-THPO og O-Methyl-THAO. Der er en vis strukturlighed mellem acetylcholin og de nye stoffer, men i modsætning til acetylcholin, nedbrydes stofferne langsomt i kroppen, hvorfor de er potentielt mere anvendelige som lægemidler mod Alzheimers sygdom.

De to stoffer er testet med R-SAT metoden, som viste, at begge er i stand til at stimulere de muscarine acetylcholin receptorer mAChR1 og mAChR3. Desværre påvirker begge stofferne de to receptorer med næsten samme styrke, hvilket begrænser deres mulige anvendelse som Alzheimersmiddel, fordi stofferne formentlig vil have bivirkninger. Ved at ændre yderligere på struktu-

rerne og syntetisere nye analoger er der dog mulighed for at øge selektiviteten for mAChR1 receptoren og dermed for udvikling af stoffer, der kan anvendes mod Alzheimers sygdom.

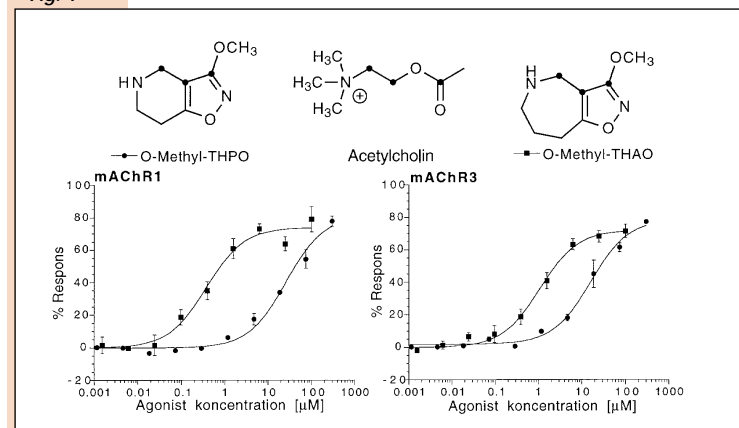
Test på humane receptorer

Der er andre fordele ved R-SAT end den store kapacitet og muligheden for at teste stoffers virkning på specifikke receptorer. F.eks. kan man indsætte gener for flere receptorer samtidigt og dermed screene stofbiblioteker mod flere målreceptorer på en gang. Dermed spares både tid og penge. Stoffer, der viser sig at være aktive, vil herefter kunne testes på hver enkelt receptor for at identificere stoffets selektivitet.

Under udvikling af nye lægemiddelstoffer er det først i de sidste stadier af udviklingsprocessen, at de nye lægemiddelstoffer testes på mennesker i kliniske forsøg. Traditionelt har man udviklet disse stoffer på baggrund af farmakologiske studier på forsøgsdyr. Selvom ligheden mellem receptorerne hos mennesker og f.eks. rotter oftest er meget stor, vil der altid være små forskelle, som nogle gange viser sig at have stor betydning. Man risikerer således at stå med et potentielt nyt lægemiddelstof, som har den ønskede virkning på rottens receptorer, men som har en anden virkning på de tilsvarende receptorer i mennesker.

Da man i R-SAT anvender gener, der koder for receptorer, kan man isolere genet for receptorerne fra menneskets DNA, og dermed har man altså mulighed for at teste på humane receptorer på et meget tidligere tidspunkt i udviklingsforløbet og dermed reducere risikoen for at udvikle et nyt rottelægemiddel. Metoder som R-SAT vil dog aldrig helt kunne erstatte dyreforsøg. Receptorer er en del af en hel organisme, og det vil derfor altid også være vigtigt at teste stofferne i dyr, hvor receptorerne sidder i deres naturlige miljø og indgår i et komplekst samspil med andre receptorer.

Fig. 1



O-Methyl-THPO og O-Methyl-THAO er analoger af signalstoffet acetylcholin, hvor den hydrolyserbare esterfunktion er blevet udskiftet med en heterocyklisk bioisoster gruppe. Dermed bliver de to analoger ikke nedbrudt så hurtigt i kroppen. De to analoger er blevet testet med R-SAT på de to muscarine receptorer, mAChR1 og mAChR3. Som det ses, er stofferne ikke specifikke for en receptor subtype.



Ph.d. Hans Bräuner-Osborne er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



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

Alzheimers syge og hukommelsens kemi

Patienter med Alzheimers sygdom mister gradvist og uigenkaldeligt hukommelsen. Udviklingen af lægemidler, som kan øge deres evne til at huske, kræver indsigt i de biokemiske processer bag hjernens behandling, lagring og genkaldelse af hukommelsesindtryk.

Af Alex Haahr Gouliaev og Mikael Begtrup

Ved Institut for Medicinalkemi arbejder flere forskningsgrupper på at udvikle et effektivt lægemiddel i behandlingen af Alzheimer's syge. En mulig behandling omfatter forbindelser, som mildner demenstilstanden ved at fremme evnen til lagring og genkaldelse af hukommelsesindtryk.

Tilvejebringelsen af sådanne lægemidler kræver en god indsigt i de biokemiske mekanismer i hjernen. I de seneste årtier er der på internationalt plan gjort så væsentlige opdagelser, at man efterhånden kan give rimelige forklaringer på, hvorledes hjernen behandler, lagrer og genkalder information.

Den menneskelige hjerne fungerer ved hjælp af neurale netværk. Nettene består af et stort antal nerveceller, som indbyrdes er forbundet med kontakter, der kaldes synapser. Hver nervecelle i et netværk kan antage to tilstande: aktiv eller inaktiv. Den øjeblikkelige tilstand afgøres af de input, cellen modtager. Disse signaler virker enten hæmmende eller stimulerende.

Alle impulser forårsager imidlertid ikke lige stor effekt på modtagercellen. Derfor taler man om svage

og stærke synapser. Den styrke, hvormed en modtager opfatter en impuls fra en bestemt afsender, kaldes for den synaptiske effektivitet. For at modtagernevecellen kan skifte til aktiv tilstand kræves det, at summen af de enkelte input er større end en vis tærskelværdi.

Indtryk lagres i hukommelsesspor

Lagring af informationer finder sted gennem indstillinger af synaptiske effektiviteter og tærskelværdier. Når disse reguleres, ændres den vigtighed, som modtagernevecellerne tillægger indkommende impulser fra bestemte afsendere. Herved dannes forudbestemte aktivitetsmønstre, som kaldes potentierte netværk. Der er hermed skabt et hukommelsesspor.

Når der efterfølgende sendes en lignende impuls ud i nettet, er der en øget sandsynlighed for, at netop det potentierte net aktiveres. En sådan reaktivering af et allerede potentierte net opfattes som en genkaldelse af information.

Efterhånden som mængden af lignende informationer vokser, vil relaterede informationer ikke blive lagret individuelt i separate net, men i net der forbindes med det allerede eksisterende. Denne fusionsproces kan betragtes som en programmeringsfase, hvor resultatet bliver et program, som kan foretage beregninger på nye input. Herved

mindskes enkeltinformationernes betydning til fordel for en associativ og intuitiv hukommelse.

Vedvarende impulser bag hukommelsen

Man mener i dag, at kraftig vedvarende stimulering fra en eller flere afsendernerveceller kan føre til en ændring i synaptiske effektiviteter og tærskelværdier i de synapser, som er involverede i processen. Herved dannes de potentierte net, som opbevarer vore hukommelsesindtryk. Selve processen er dog underlagt modulation fra andre net, som på et overordnet fortløkningsniveau kan betragtes som værende motivation/opmærksomhed/interesse overfor et givet input. Disse modulatoriske systemer har dermed også indflydelse på, hvorvidt en information skal lagres lang tid, kort tid eller slet ikke.

I hjernesnit fra forsøgsdyr har man kunnet inducere korte potentieringer med varigheder af 20-30 sek., potentieringer med varigheder af minutter, samt potentieringer, som er langtidsstabile. De forskellige potentieringstyper repræsenterer muligvis en form for kort-, mellem- og langtids hukommelse, og ændringer i informationslagringen fra kort tid til lang tid kaldes hukommelseskonsolidering.

Biokemien bag processerne

Spørgsmålet er nu, hvordan sådanne processer kan beskrives biokemisk,

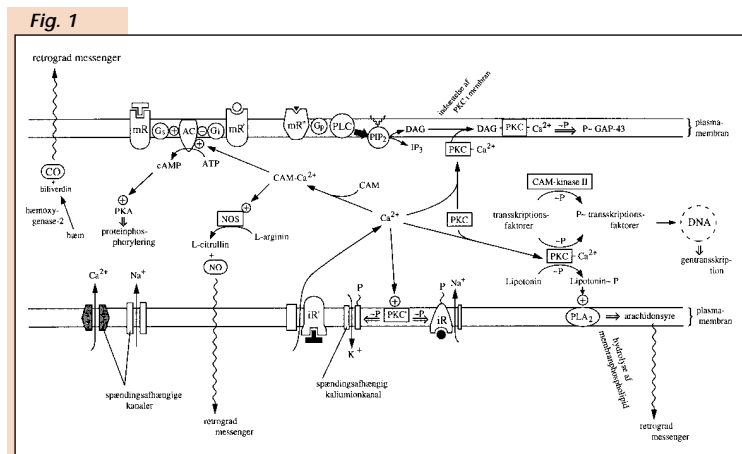


Fig. 1

hvilket er af afgørende betydning for udviklingen af lægemidler. Man mener i dag, at det stimulerende signalstof glutaminsyre og en bestemt modtagerstation for stoffet, NMDA-receptoren, spiller en central rolle i hukommelsesprocesserne.

Når glutaminsyre fra en afsendercelle bindes til modtagerens NMDA-receptorer, er det imidlertid ikke nok til at aktivere modtagercellen. Den skal også depolariseres.

Dette forløb kan ske på to måder. Ved synkron stimulering forårsager en eller flere afsendere den nødvendige depolarisering, medens en eller flere andre afsendere samtidig frigiver det nødvendige glutaminsyre til stimulering af NMDA-receptoren. Alternativt kan vedvarende stimulering gennem en glutaminsyrefrisættende afsendercelle forårsage den nødvendige depolarisering og samtidig stimulere NMDA-receptoren. I begge tilfælde skabes der en langtidspotentiering, hvorigenem hukommelsesindtrykket lagres.

Når NMDA-receptoren aktiveres, sker der en indstrømning af ioner i cellen, hvilket starter en række kaskadeprocesser, som fører til dannelse af nye sekundære budbringere. Det er stoffer, som aktiverer en række forskellige enzymer, der selektivt ændrer faconen af bestemte proteiner og dermed deres egenskaber.

Sådanne proteiner indgår i opbygningen af ionkanaler i nervecellernes membraner. Når proteinerne ændrer facon, ændres kanalernes struktur således, at nervecellen lettere aktiveres, hvorved tærskelværdien for den nødvendige mængde af stimulerende signaler sænkes. Samtidig fører en længerevarende depolarisering af modtagercellen via de sekundære budbringere til stabilitetsændringer af forskellige enzymer, hvilket igen fører til øget synaptisk effektivitet.

Fig. 3



Gener aktiveres ved langtids hukommelse

De hidtil beskrevne forstærkningsprocesser finder sted indenfor minutter. Længerevarende potentieringer kræver aktivering af gener, efterfulgt af produktion af proteiner og overordnede strukturelle ændringer i nervekredsløbene.

Tidligt i hukommelsesforløbet, ca. 30 minutter efter, at forstærkningsprocesserne er startet, begynder bestemte gener at producere proteiner. Disse førstdannede proteiner binder sig til nye DNA-områder. Herved aktiveres en lang række andre gener, som fremstiller proteiner, der er af stor vigtighed for de overordnede strukturelle ændringer. Ændringerne omfatter sandsynligvis en forøgelse af kontaktfladen mellem neuronerne samt flytning af synapsen til en slags udposning på nervecellen. Flytningen bevirker, at depolariseringsforløbet effektiviseres, hvorved tærskelværdien og dermed modtagernevecellens depolarisering lettere nås.

Ud over glutaminsyresystemet indvirker en lang række modulatoriske signalstofs-systemer på hukom-

I et moderne synteselaboratorium arbejdes der ofte med reaktionsdygtige, luftfølsomme og eksotiske udgangsstoffer i en kemisk inaktiv beskyttelsesatmosfære. Her sættes med kanyle en organisk palladium katalysator til en reaktionsblanding. Trykket i reaktionskammeret styres fra ballonen, der indeholder nitrogen.

melsesprocessen. Dette meget komplekse biokemiske samspil rummer et stort antal angrebsmål for lægemidler, der indvirker på hukommelsesprocessen og som således kan tænkes anvendt i behandlingen af demens.

Udvikling af lægemidler

Syntesegruppen har fremstillet flere nye receptorselektive glutaminsyre-analoger. Disse unikke forbindelser vil forhåbentligt bidrage til forståelsen af de strukturelle krav til stoffer, som kan påvirke de enkelte undertyper af glutaminsyre-receptorer. Sådanne informationer er værdifulde ved udviklingen af lægemidler til behandling af demens.

Gruppen udvikler samtidig stoffer, som selektivt påvirker forskellige receptorer for gamma-aminosmørsyre (GABA), der hæmmer nervecellernes aktivitet. Det antages her, at aktivering af den såkaldte GABA_B-receptor fører til formindsket GABA-frisættelse og dermed en svækkelse af det hæmmende signal. Stoffer, som blokerer denne receptor, vil derfor føre til en øget inhibitorisk aktivitet, hvilket kan tænkes hensigtsmæssigt i behandlingen af de sygdomsprocesser, som fører til Alzheimers syge. Stoffer, som stimulerer receptoren, vil derimod mindske de hæmmende signaler, hvilket vil være hensigtsmæssigt på et senere stadie af Alzheimers syge.

Under medicinalkemikernes søgen efter nye potente og selektive forbindelser spiller det en stor rolle, at synteserne kan udføres i stort udbytte og renhed. Det er med sådanne forhold i mente, at syntesegruppen lægger særlig stor vægt på udvikling af nye syntesemetoder, der kan opfylde de krav, som fremstillingen af nye, interessante forbindelser stiller.

Her ses et udvalg af de forbindelser, som syntesegruppen arbejder med. Stofferne påvirker selektivt forskellige receptorer på nervecellerne, som er involveret i hukommelsesprocessen.

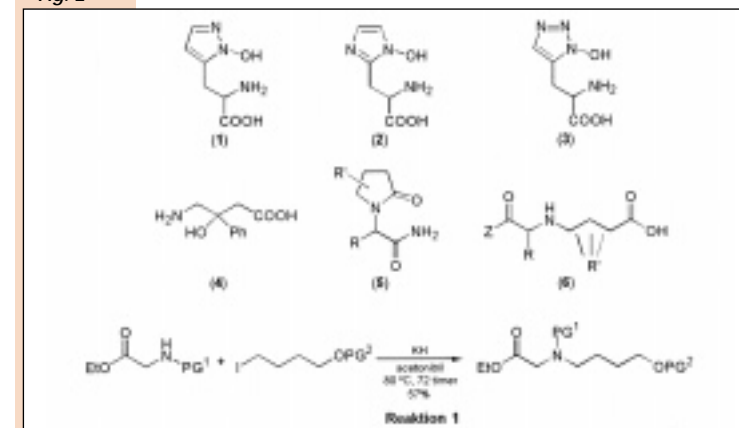


Ph.D. Alex Haahr Gouliaev er seniorkemiker ved firmaet Neurosearch.



Lic. techn. Mikael Begtrup er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Fig. 2



Et forsvar mod nervedød?

Nerveceller dør efter en blodprop i hjernen samt ved Alzheimers sygdom og Parkinsons syge. Forsøg med cellekulturer tyder på, at hjernen søger at forsvare sig mod celledøden ved at danne to specifikke stoffer. Stoffernes biologiske funktioner skal nu nærmere afklares i dyreforsøg. Håbet er, at denne viden kan bidrage til at udvikle nye behandlingsformer mod disse stærkt invaliderende og dødelige sygdomme.

Af Harald S. Hansen, Birthe Moesgaard, Henrik H. Hansen, Inga Björnsdottir, Jerzy W. Jaroszewski og Steen Honoré Hansen

Hvis man anbringer dyrkede nerveceller i et reagensglas og tilsætter høje koncentrationer af signalstoffet glutaminsyre, så dør cellerne gradvist. En tilsvarende proces finder sandsynligvis sted i hjernen ved sygdomme som Alzheimers sygdom, Parkinsons sygdom og Huntingtons sygdom. Desuden bidrager forhøjede koncentrationer af glutaminsyre sandsynligvis til at slå nerveceller ihjel, når der opstår iltmangel i hjernen efter en blodprop.

Imidlertid viser forsøg med cellekulturer ikke blot, at høje doser af glutaminsyre kan få de dyrkede ner-

veceller til at henfalde og dø. Ved dette henfald producerer nervecellerne to stoffer, som kaldes NAPE og NAE. Disse stoffer dannes sandsynligvis som en forsvarsmekanisme mod cellebeskadigelsen.

Teorien bygger bl.a. på, at nervecellerne bedre overlever høje koncentrationer af glutaminsyre, når man samtidig tilføjer NAE til cellekulturen. På den baggrund er det interessant at studere, hvordan de to stoffer dannes i nervecellerne og undersøge deres biologiske funktioner i hjernen.

Aktive lipider fra membraner

NAE og NAPE dannes ud fra byggestenene i biologiske membraner. Alle celler indeholder membraner, herunder også cellemembranen, som omgiver cellen. Byggestenene i membraner er en type fedtstoffer, der hedder fosfolipider. En lille del af membranernes fosfolipider bliver jævnlige spaltet af enzymer, således at der dannes bioaktive lipider, der fungerer som signalstoffer; dels på celleoverfladen, dels inde i cellen.

Prostaglandiner er et eksempel på bioaktive lipider, der virker i kommunikationen mellem cellerne. Prostaglandinerne er lokalhormoner, der medvirker i forskellige processer som f.eks. fødsel og betændelsestilstande. Diacylglycerol er et eksempel på et bioaktivt lipid, der virker som et signalstof inde i cellerne. Stoffet aktiverer her specielle enzymer, som styrer cellens funktioner.

Stofferne dannes i cellekulturer

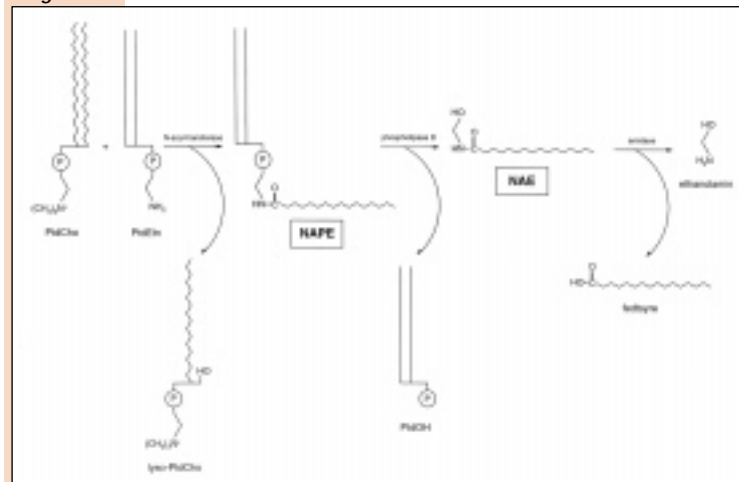
NAPE forekommer normalt ikke i pattedyrceller. Stoffet kan dog dannes relativt langsomt i nerveceller fra hjernen, når cellerne beskadiges. Denne dannelse udføres af et enzym, der aktiveres af calciumioner, som optages af cellen ved beskadigelse af dens cellemembran. En lille del af det dannede NAPE omdannes derpå til det mindre lipid NAE ved hjælp af et andet enzym (fig. 1).

I øjeblikket har man ikke en klar forståelse af de to stoffers biologiske funktion. En række resultater af forsøg med cellekulturer kan imidlertid tolkes i retning af, at stofferne virker som bioaktive lipider, der stabiliserer cellen. De dannes måske som en forsvarsmekanisme mod cellebeskadigelsen.

Høje koncentrationer af signalstoffet glutaminsyre er giftigt for nerveceller. Et forhøjet niveau af glutaminsyre i hjernen bidrager sandsynligvis til det henfald af nerveceller, som man ser både ved iltmangel i hjernen efter en blodprop, og ved en række neurodegenerative sygdomme som Alzheimers sygdom, Parkinsons sygdom og Huntingtons sygdom.

I dyrkede nerveceller stimulerer høje koncentrationer af glutaminsyre dannelsen af NAPE og NAE. Indtil videre er produktionen af NAPE og NAE især blevet studeret i cellekulturer, og man ved endnu ikke nøjagtigt, hvor og hvornår disse lipider dannes i den levende hjerne.

Fig. 1



Figuren viser dannelse af NAPE og NAE samt nedbrydning af NAE ved hjælp af enzymer. NAPE kan dannes ud fra fosfolipidet PtdEtn ved overførsel af en fedtsyre fra PtdCho til PtdEtn. Dette sker ved hjælp af enzymet N-acyltransferase. NAPE kan spaltes til NAE og Ptd-OH ved hjælp af fosfolipase D-enzymet, og NAE kan nedbrydes til fedtsyre og ethanolamin ved hjælp af amidaseenzymet.

NAPE-dannelse i hjernevæv

Vi forsøger at etablere en række analysemetoder, der kan måle mængden af NAPE i hjernevæv fra forsøgsdyr. NAPE udgør kun en forsvindende lille del af hjernens fosfolipider, så derfor skal analysemetoden være meget specifik og følsom. Vi anvender kerne-magnetisk-resonans-spektroskopi (NMR) til at kvantisere akkumulering af NAPE i rottehjerner.

NMR-teknikken er baseret på, at prøven, f.eks. ekstrakter af rottehjerne, anbringes i et kraftigt magnetfelt. Herved ordner atomkernerne sig som små stangmagneter, så de ligger langs med magnetfeltets linier. Denne orden kan forstyrres med radiobølger. Radiobølgerne udsendes i korte pulser, og når en puls afbrydes, roterer atomkernerne tilbage på plads i magnetfeltet. Derved frembringer de elektriske signaler, som giver oplysninger om atomernes art og deres kemiske placering i molekylerne. Sådanne informationer gør det muligt at bestemme prøvens sammensætning.

Radiobølgerens frekvens kan indstilles, så de påvirker specifikke atomer. I dette tilfælde har målet været fosfor-31, som findes i alle typer fosfolipider. Da signalet fra fosfor-31 afhænger af de kemiske omgivelser, har det været muligt at bestemme mængden af de forskellige fosfolipi-

der i ekstraktet fra rottehjerne. På den baggrund kunne vi påvise NAPE-dannelse som følge af den iltmangel i hjernen, der indtræder ved døden (se fig. 2).

NAPE findes i flere former, der adskiller sig ved deres indhold af forskellige fedtsyrer, og som derfor har forskellig masse. En anden teknik, som kaldes electrospray-ioniserings massespektroskopi, har gjort det muligt at påvise mængderne af hvert enkelt type NAPE-molekyle, som findes på ionform. Ionerne sendes nu gennem et magnetfelt, hvor deres baner afbøjes. Graden af afbøjningen afhænger af ionernes masse, hvorved NAPE-molekyler med varierende masse adskilles. Metoden bestemmer samtidig mængden af de forskellige molekyler (se fig. 3).



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



Cand.scient., ph.d. Birthe Moesgaard er forskningsadjunkt ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Henrik H. Hansen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm., ph.d. Inga Björnsdottir er forskningsadjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

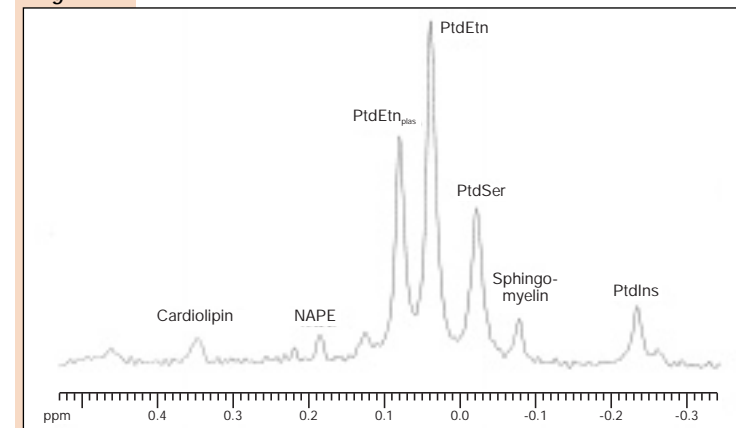


Lic.scient. Jerzy W. Jaroszewski er professor ved Institut for Medicinalkemi.



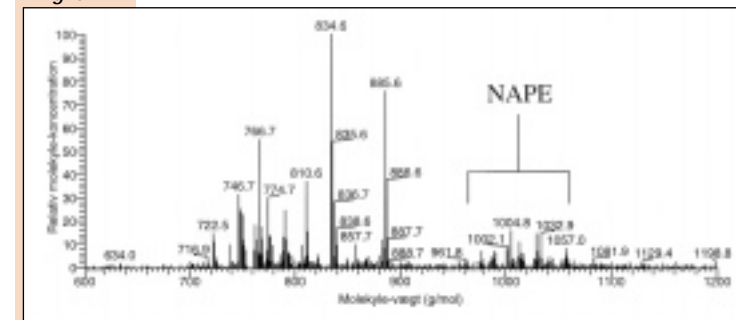
Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

Fig. 2



Her ses et fosfor-31-NMR spektrum af fosfolipider i et ekstrakt af en rottehjerne, der blev udtaget fire timer efter aflivningen. Arealet af toppene er proportional med mængden af de pågældende fosfolipider. Det ses at NAPE kun udgør en lille del af den samlede fosfolipidmængde. Der kan ikke påvises NAPE, når hjernen ekstraheres umiddelbart efter dødens indtrædelse.

Fig. 3



Figuren viser et massespektrum af samme hjerneekstrakt med angivelse af de negativt ladede ioner, som repræsenterer individuelle fosfolipidmolekyler. Toppene med masserne 976-1057 repræsenterer forskellige NAPE-molekyler og de andre toppe er ioner af mere simple fosfolipider som PtdEtn. Højden af toppene er proportional med mængden af de pågældende molekyler.

Lægemedelforskning med rene spejlbilledformer

Mange lægemiddelstoffer findes i to spejlbilledformer, som er kemisk ens, men er rumligt forskellige - ganske som højre og venstre hånd. Normalt er kun den ene form aktiv, mens den anden kan medføre bivirkninger. For at minimere risikoen for bivirkninger er det vigtigt at anvende den rene, virksomme spejlbilledform fremfor en blanding af begge former.

Af Tommy N. Johansen og Erik Falch

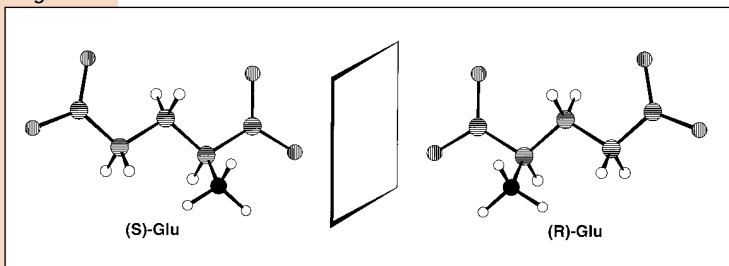
Mange lægemidler på det danske marked tilhører en gruppe af stoffer, som forekommer i to spejlbilledformer. Det vil sige stoffer, der har identiske fysiske og kemiske egenskaber, men som er rumligt forskellige. På trods af, at det ofte kun er den ene spejlbilledform, som har den ønskede virkning, anvendes alligevel en blanding af de to former ved lægemiddelfremstillingen.

Når lægemidlerne indeholder begge spejlbilledformer, skyldes det, at lægemiddelstofferne normalt syntetiseres som en lige blanding af begge former. En sådan ligelig blanding kaldes et racemat eller en racemisk forbindelse. Samtidig har det tidligere været svært at skille spejlbilledformerne fra hinanden. En ny variant af højtryksvæske kromatografi (HPLC) gør det imidlertid muligt at adskille formerne. Dermed kan hver spejlbilledform nu renfremstilles.

Adskillelse af et lægemiddelstofs spejlbilledformer kan blive til gavn for patienterne, fordi man kan reducere dosis og dermed formindske risikoen for bivirkninger. Ydermere er rene spejlbilledformer et fremragende forskningsværktøj ved udvik-

Den kemiske struktur af spejlbilledformerne af APPA, 2-Py-AMPA og 2-Fu-AMPA.

Fig. 1



Begrebet spejlbilledformer er illustreret ved hjælp af (R)- og (S)-glutaminsyre. De to spejlbilledformer kan ikke bringes til fuldstændigt at overlægge hinanden. I hjernen findes kun (S)-glutaminsyre.

ling af nye lægemidler, f.eks. til behandling af hjernens sygdomme.

Alzheimers sygdom og spejlbilledformer

På Institut for Medicinalkemi har vi gennem en årrække beskæftiget os med udvikling af potentielle lægemiddelstoffer til behandling af alvorlige sygdomme i hjernen, f.eks. Alzheimers sygdom, der medfører svær demens og ender med døden. Sygdommen kan ikke behandles i dag.

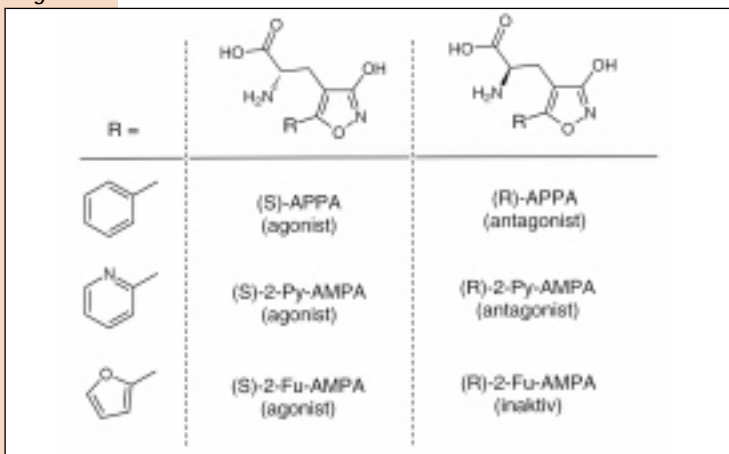
Alzheimers sygdom er en tilstand, hvor områder af hjernen ikke fungerer normalt. På nuværende tidspunkt har man ringe kendskab til de processer, der forårsager Alzheimers sygdom, men overaktivitet i visse nervebaner menes at være af betydning.

Disse nervebaner benytter den ene spejlbilledform af signalstoffet

glutaminsyre til at sende impulser fra en nervecelle til den næste. Denne form kaldes for (S)-formen, mens den anden, (R)-formen, ikke findes i hjernen. Overaktiviteten i glutaminsyresystemet i de pågældende nervebaner medfører, at nerveceller henfalder og dør. En blokade af nervecellernes receptorer for (S)-glutaminsyre er derfor en mulig behandlingsstrategi.

En fuldstændig blokade er imidlertid uheldig, fordi der kræves en vis aktivitet i nervebanerne for at opretholde nogle af hjernens grundlæggende funktioner som evnen til indlæring og hukommelse. Teoretisk kan denne situation løses ved at anvende en forbindelse, der aktiverer receptorerne, men som samtidig forhindrer overstimulationen. Et stof med sådanne biologiske egenskaber kaldes en partiel agonist.

Fig. 2



Studier af stoffers biologiske aktivitet

For nogle år siden blev forbindelsen APPA syntetiseret på Institut for Medicinalkemi. Ved undersøgelse af stoffets biologiske aktivitet, viste det sig, at racemisk APPA var en partiel agonist ved en undertype af (S)-glutaminsyre receptorerne.

For bedre at kunne forstå baggrunden for stoffets evne til at aktivere receptorerne uden at overstimulere dem har vi adskilt de to spejlbilledformer og undersøgt deres biologiske aktivitet. Disse studier viste, at (S)-formen af APPA stimulerer receptorerne maksimalt, mens (R)-formen blokerer de samme receptorer.

Disse modsat rettede effekter har vi undersøgt nærmere ved at syntetisere nye stoffer, der strukturelt ligner APPA. Biologiske studier med racemisk 2-Py-AMPA og 2-Fu-AMPA viste, at de to stoffer er væsentlig stærkere end racemisk APPA. Desuden viste studierne, at de nye stoffer til forskel fra racemisk APPA ikke er partielle agonister, men at de stimulerer receptorerne maksimalt. Men hvordan ser billedet ud, hvis man i stedet studerer de rene spejlbilledformer? For at finde ud af dette måtte vi adskille spejlbilledformerne.

Rene spejlbilledformer med HPLC kromatografi

Inden for de seneste år er det teknisk blevet lettere at opnå rene spejlbilledformer. Det skyldes bl.a. nye kolonner til højtryksvæske kromatografi (HPLC), som specifikt er udviklet til formålet. Kolonnen består af et stålør fyldt op med et fin-kornet pakkemateriale, som kan modstå det høje tryk, der etableres, når væske presses gennem kolonnen.

De nye, såkaldte chirale kolonner indeholder typisk en optisk aktiv forbindelse, som sidder fast bundet til kolonnens pakkemateriale. Forbindelsen udvælges således, at den er i stand til at danne komplekser med de to spejlbilledformer, der ønskes adskilt.

I den ideelle situation vil kun den ene af de to spejlbilledformer danne et stærkt kompleks med den optisk aktive forbindelse og derved blive kraftigt tilbageholdt i kolonnen, mens den anden spejlbilledform bindes og tilbageholdes i langt mindre udstrækning. Herved opnås adskillelse af de to spejlbilledformer. På en udskrift registreres dette som to lige store toppe, der stammer fra hver sin spejlbilledform.

Chirobiotic T kolonnen er en for-

holdt HPLC-system består af en pumpe (nederste modul) og en UV-detektor. Til højre ses en chiral HPLC-kolonne, som er forbundet til systemet ved hjælp af stålør. Det drejer sig om en Chirobiotic T kolonne beregnet til analytiske formål.

holdsvis ny chiral HPLC kolonne, der har det optisk aktive stof teicoplanin bundet til kolonnens inderside. Denne kolonne er særdeles velegnet til adskillelse af aminosyrer som 2-Py-AMPA og 2-Fu-AMPA.

Renhedsanalyse af spejlbilledformer

Ved undersøgelse af en ren spejlbilledforms biologiske aktivitet er det vigtigt, at indholdet af den modsatte spejlbilledform er meget lavt. Tidligere blev renheden typisk bestemt ved måling af molekylernes optiske drejning, men på grund af en lav følsomhed er denne metode ikke velegnet. Chiral HPLC har nu fundet stor anvendelse på grund af væsentlig højere følsomhed.

Et problem ved anvendelse af chiral HPLC til renhedsanalyse er imidlertid toppens form, fordi spejlbilledformer ved analyse på chirale kolonner ofte giver toppe med udtalt "haledannelse". Det betyder, at en given chiral HPLC kolonne er mest velegnet til renhedsanalyse, når den uønskede spejlbilledform, urenheden, kommer ud af kolonnen før den ønskede form. I praksis er det ofte nødvendigt at anvende to forskellige kolonner med selektivitet

Fig. 4

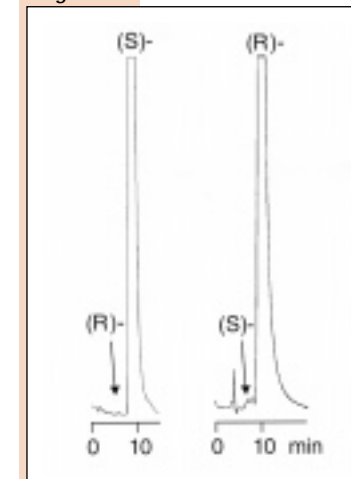


Fig. 3



for hver sin spejlbilledform for at kunne foretage en nøjagtig renhedsanalyse af begge former.

Design af nye modelstoffer

Biologisk karakterisering af de rene spejlbilledformer viste, at (S)-formerne af 2-Py-AMPA og 2-Fu-AMPA i lighed med (S)-APPA, er i stand til selektivt at stimulere AMPA-receptorerne maksimalt. De to nye stoffer er henholdsvis 40 og 100 gange stærkere end (S)-APPA.

Dette viser, at tilstedeværelsen af kvælstof eller ilt i den cykliske gruppe i molekylet tilsyneladende har stor betydning for stoffernes biologiske potens. Endvidere viste målingerne, at de to (R)-former med 6-ledede cykliske grupper, (R)-APPA og (R)-2-Py-AMPA, var lige gode til at blokere receptorerne, mens (R)-2-Fu-AMPA, som har en lidt mindre 5-ledet gruppe, ikke havde denne egenskab.

Racemisk 2-Py-AMPA består således af en (S)-form, der kan stimulere receptorerne maksimalt og en (R)-form, der kan blokere de samme receptorer, men da (S)-2-Py-AMPA er meget kraftigt virkende, ses kun den stimulerende komponent, når man undersøger racematets effekt. Dette viser, at aktivering og blokade af receptorer stiller forskellige strukturelle krav.

De komplicerede sammenhænge mellem de omtalte spejlbilledformers struktur og deres biologiske aktivitet vil blive udnyttet i design af nye modelstoffer til behandlingen af Alzheimers sygdom.

Ved stereokemisk renhedsanalyse ved chiral HPLC er det vigtigt at anvende forskellige kolonner, så urenhederne kommer ud før hovedtoppen. Til højre ses analyse af (S)-2-Fu-AMPA på en (S)-pipercolinsyre kolonne, og til venstre ses analyse af (R)-2-Fu-AMPA på en Chirobiotic T kolonne. De stereokemiske urenheder på hhv. 0.05 og 0.1% er markeret med pile.



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



Akademiingeniør Erik Falch er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.

Ny strategi for behandling af epilepsi

Stoffer, som hæmmer hjernecellers optagelse af signalstoffet GABA, giver mulighed for en mere målrettet behandling af epilepsi, der vil medføre færre bivirkninger for patienterne.

Af Orla Miller Larsson,
Tina Bolvig og
Arne Schousboe

En rask hjerne er der en perfekt balance mellem de stimulerende og hæmmende impulser i nervecellernes indbyrdes kommunikation. Når balancen forrykkes, kan det føre til neurologiske sygdomme som epilepsi.

Ved flere former af epilepsi svækkes de impulser, der formidles af signalstoffet gamma-aminosmørsyre, GABA, hvilket kan udløse alvorlige anfald. Stoffer, som øger effektiviteten i GABA-systemet, er derfor mulige lægemidler til behandling af disse former af sygdommen.

Nervecellers kommunikation foregår ved, at cellerne udsender og modtager signalstoffer. Det vigtigste hæmmende signalstof i centralnervesystemet er GABA, medens glutaminsyre er det mest betydningsfulde stimulerende signalstof. Såvel stimulerende som hæmmende signaloverførsel mellem nervecellerne sker ved, at de forskellige signalstoffer frisættes fra en nervecelle til væsken mellem cellerne, hvorefter stoffet påvirker andre nerveceller via en

Skematisk billede af GABA-transmissionen. GABA udsendes fra nervecellen til venstre. Efter at have påvirket nabocellens GABA-receptor frisættes stoffet til væsken mellem cellerne. GABA optages nu af nerveceller og astrocytter via særlige GABA-transportører, der sluser signalstoffet ind i cellerne. I nervecellen kan GABA dels blive genbrugt som signalstof, dels blive omsat til ravsyre. GABA, som optages i astrocytter, omdannes udelukkende til ravsyre.

kortvarig binding til receptorer på overfladen af cellerne (fig. 1).

For at undgå en vedvarende aktivering af nervecellerne er det vigtigt, at signalstofferne fjernes hurtigt og effektivt fra det ekstracellulære rum. Da GABA ikke kan passere cellemembranen, sker fjernelsen ved hjælp af et specifikt system, der sluser GABA ind i cellerne. Systemet består af et transportørmolekyle, et protein, der er indlejret i nervecellers og astrocytters membraner (fig. 2).

Astrocytter er en speciel type celler, som findes i nervæv, hvor de støtter nervecellernes funktioner. Koncentrationen af transportørmolekyler er størst i astrocytternes udløbere, som findes i nervæv tæt på de områder af nervecellerne, hvorfra signalstofferne frisættes, og hvor der er mange receptorer.

GABA-systemet er svækket ved epilepsi

En af de strategier, som er blevet anvendt for at optimere effekten af GABA, har været at fremstille stoffer, som hæmmer optagelsen og dermed fjernelsen af GABA fra væsken mellem hjernecellerne. Der ved forlænges tilstedeværelsen af GABA i receptorens nærhed, hvilket giver mulighed for en mere effektiv påvirkning af receptorerne.

På Institut for Farmakologi har

vi i en årrække undersøgt effekten af mange forskellige stoffer på optagelsen af GABA i dyrkede nerveceller og astrocytter. Disse stoffer, GABA-analoger, er blevet syntetiseret af kemikere ved Institut for Medicinalkemi og Lundbeck A/S. GABA-analogerne er kendetegnet ved at afspejle en af de mange mulige tredimensionelle strukturer, som GABA kan indtage.

GABA-analogerne er syntetiseret således, at deres struktur er langt mere fastlåst og stiv end strukturen af det meget fleksible GABA-molekyle (fig. 3). Mange af analogerne er såkaldte konkurrerende hæmmere af optagelsen af GABA i såvel nerveceller som astrocytter. Denne type hæmmere bindes til det område på transportøren, hvor også GABA skal bindes. Hæmmeren optager således bindingspladsen for GABA og ned sætter dermed binding og efterfølgende transport af GABA ind i cellerne.

Bedre udnyttelse af signalstoffet

Resultater fra studierne har været væsentlige for klarlægningen af de strukturelle krav, som skal opfyldes af potentielle antiepileptiske lægemidler med virkningsmekanisme via GABA-transportører.

Vore undersøgelser afslørede endvidere hurtigt, at nogle af GABA-analogerne var bedre til at

hæmme GABA-optagelsen i astrocytter end i nerveceller. Samtidig viste farmakologiske undersøgelser, at det var blandt disse selektive hæmmere af GABA-optagelsen i astrocytter, der var størst mulighed for at finde stoffer med antiepileptisk effekt.

Grunden er sandsynligvis, at GABA nedbrydes i astrocytterne. Derimod viste vore forsøg med dyrkede nerveceller, at det GABA, som nervecellerne optog, kunne genbruges som signalstof. En selektiv hæmning af optagelsen i astrocytter betyder derfor dels, at opholdet af GABA i det ekstracellulære rum forlænges, dels at en mindre del af GABA mistes ved nedbrydning i astrocytter. Begge mekanismer fører i den aktuelle situation til en mere effektiv GABA-transmission og dermed dæmpning af eventuelle kramper.

På baggrund af forsøgene skelne man mellem de GABA-transportører, som primært er tilknyttet henholdsvis nerveceller og astrocytter. I dag er billedet mere kompliceret, idet man nu har klonet fire forskellige GABA-transportører fra såvel mus som rotter. Samarbejde med den israelske forsker Nathan Nelson har ført til, at vi nu har fået adgang til de fire klonede transportører fra mus.

Fire klonede GABA-transportører

Ved molekylærbiologiske metoder er vi i stand til at få celler fra en bestemt cellelinie til at udtrykke de forskellige transportører i cellemembranen. Dermed kan vi undersøge effekten af GABA-analoger overfor optagelsen af GABA formidlet af hver af de fire transportører.

Undersøgelser af to humane GABA-transportører har afsløret en meget stor lighed med de tilsvarende transportører fra mus og rotter. Således har alle undersøgte GABA-analoger, som hæmmer funktionen af GABA-transportører fra mus og rotter, også haft effekt på de tilsvarende humane transportører. Det betyder, at sådanne GABA-analoger har interesse som modelstoffer for udvikling af nye lægemidler til behandling af epilepsi hos mennesker.

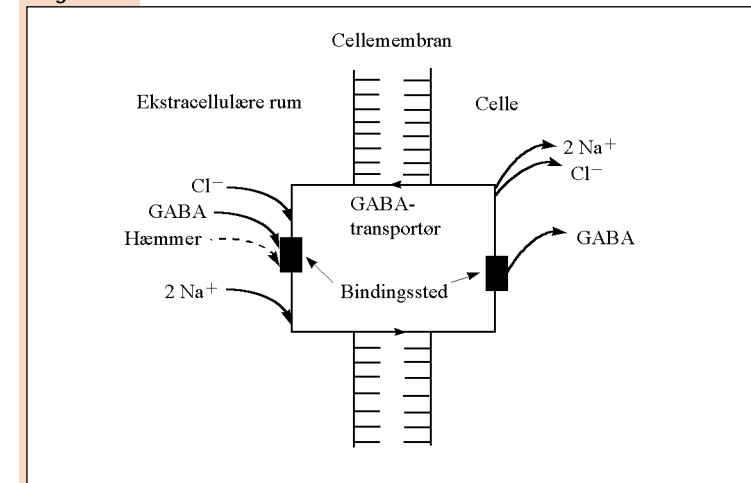
De forskellige GABA-transportører er ikke celledoespecifikke. Man finder en blanding af to eller flere GABA-transportører på både nerveceller og astrocytter. Den aktuelle blanding i de forskellige celler afhænger muligvis af centralnervesystemets udviklingstrin og er sandsynligvis også afhængig af i hvilken hjerneregion, den pågældende celledoespecifik type er lokaliseret.

Epileptiske anfald kan afhængig af type og person involvere fejlfunktion i forskellige dele af hjernen. Det kan derfor være forskellige typer af GABA-transportører, som er relevante for en målrettet og effektiv behandling hos den enkelte pati-

generelt en mere målrettet og individuel behandling af epilepsi.

GABA-analoger med effekt overfor GABA-transportører har som antiepileptiske midler den fordel, at de kun er aktive i forbindelse med en aktiv GABA-transmission. Kun i de områder af nervesystemet, hvor der er en fysiologisk betinget GABA-transmission, vil hæmmere af optagelsen af GABA påvirke overførslen af impulser mellem nervecellerne. Dette forhold kan betyde, at sådanne lægemidler vil yde en mere målrettet og effektiv behandling med færre bivirkninger.

Fig. 2

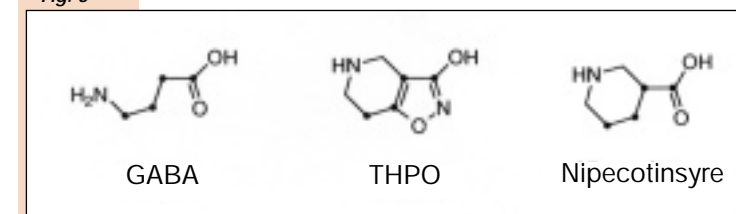


Stoffer, som kan hæmme nervecellers og astrocytters optagelse af GABA, er potentielle lægemidler til behandling af epilepsi. Her ses en skematisk fremstilling af virkningsmekanismen for en GABA-transportør, som fører GABA fra cellevæsken ind i cellerne. Det fælles bindingssted for GABA og konkurrerende hæmmere, GABA-analoger, er vist. Samtidig med transporten af GABA ind i cellerne overføres to natriumioner og en kloridion.

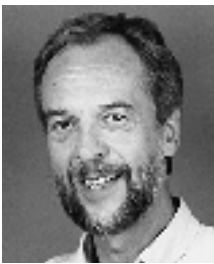
ent.

Vore undersøgelser er nu primært koncentreret om at klarlægge specificiteten af kendte og nye GABA-analoger overfor de fire typer af GABA-transportører. Det er håbet, at undersøgelserne vil afsløre selektive hæmmere for hver af de fire transportører. Analogere med disse egenskaber vil være gode modelstoffer for udvikling af lægemidler til behandling af former for epilepsi, som endnu ikke kan behandles, samt

Fig. 3



Strukturen af GABA sammenholdt med to af de mange GABA-analoger, nipecotinsyre og THPO. "GABA-delen" af nipecotinsyre- og THPO-molekylet er fremhævet.



Lic. scient. Orla Miller Larsson er lektor ved Institut for Farmakologi.



Cand. pharm. Tina Bolvig er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



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

Regulering af hjernens blodkar

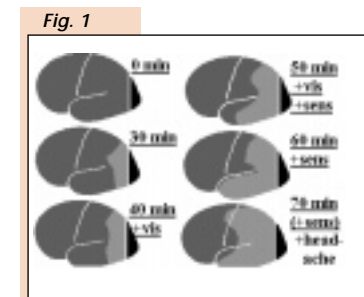
Under et migræneanfald er de store blodårer i hjernen kraftigt udvidede. Omvendt trækker blodkarrene sig sammen efter en blødning mellem hjernehindrene, hvilket kan fremkalde dødelige spasmer. Studier af et signalstof i hjernen kan føre til udvikling af nye lægemidler mod begge sygdomme.

Af Inger Jansen-Olesen og Anette Sams

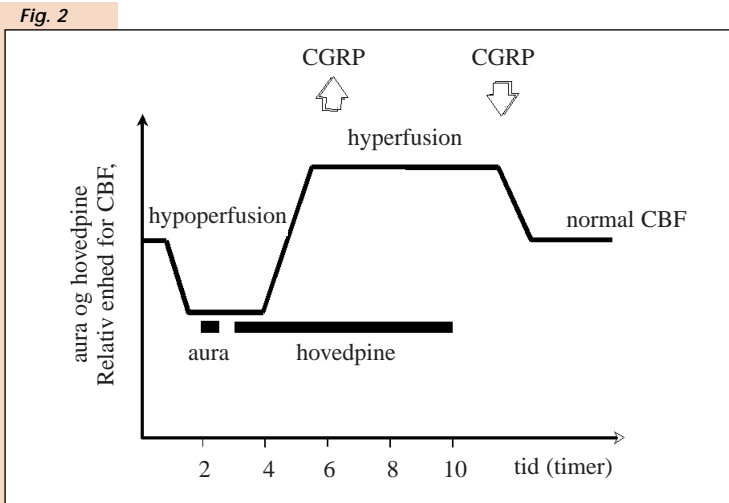
Signalstoffet calcitonin genrelateret peptid (CGRP) spiller en vigtig rolle ved regulering af hjernens blodkar. Øget viden om signalstoffets virkningsmekanismer kan føre til bedre forståelse og behandling af migræne og visse apopleksiformers hjerneblødninger.

Mellem 10 og 15 procent af den danske befolkning har på et tidspunkt i deres liv migræne, som medfører en ensidig pulserende svær hovedpine, kvalme og i nogle tilfælde også overfølsomhed for lys og lyd.

Migræne opdeles i migræne med og uden aura. Ved migræne med aura begynder anfaldet med synsforstyrrelser eller føleforstyrrelser. Måling af hjernens blodgennemstrømning under et migræneanfald med aura har vist et område med nedsat blodgennemstrømning, som



Under et migræneanfald med aura flytter et område med nedsat blodgennemstrømning sig langsomt fremad i hjernebarken. Fænomenet, som er påvist ved hjernescanninger, ses her i et tidsløb, som varer 70 minutter.



Figuren giver et overblik over forandringer i hjernens blodgennemstrømning under et migræneanfald med aura. CGRP-koncentrationen i blod fra kraniet stiger, mens patienten har hovedpine og falder til normale værdier, når patientens hovedpine aftager.

langsomt flytter sig fremad i hjernebarken. Dette fænomen finder man ikke hos patienter med migræneanfald uden aura. Under migræneanfaldet har man både hos patienter med og uden aura fundet, at de store blodårer i hjernen er udvidede. Desuden har man vist, at der sker en øget frigørelse af signalstoffet CGRP, som netop får blodkarrene til at udvide sig.

CGRP spiller ligeledes en central rolle ved subarachnoidal blødning, hvilket vil sige blødning mellem hjernehindrene. Cirka hver fjerde patient med disse blødninger dør. Tre til fire dage efter blødningen opstår spasmer i hjernens blodkar. En uge efter blødningen når spasmen sit maksimum, og den varer ofte ved i to til tre uger. Vi mener, at de kraftige spasmer i hjernens blodkar aktiverer en sensorisk refleks, som stimulerer frigørelsen af det karudvidende stof CGRP fra nerveterminaler på hjernens blodkar. Blodkarrenes diameter normaliseres derved i nogle dage, indtil kroppen ikke længere er i stand til at producere tilstrækkelige mængder CGRP. Så tager spasmen overhånd, og mange patienter dør på grund af iltmangel i hjernen som følge af nedsat blodtilførsel.

Vi har målt mængden af CGRP i hjerneblodkar fra mennesker, som er døde af blødningerne og har sammenlignet dette med blodkar fra mennesker, som er døde af blodprop i hjertet. Blodkar fra patienter med blødninger mellem hjernehindrene havde signifikant lavere koncentrationer af CGRP.

CGRP har altså stor betydning ved både migræne og subarachnoidal blødning. Når det gælder blødningerne, har stoffer, som efterligner CGRP's karudvidende effekter, et potentiale som lægemidler, mens migræne måske kan behandles effektivt med stoffer, som blokerer virkningen af CGRP. På den baggrund er det interessant at undersøge i detaljer, hvor og hvordan signalstoffet CGRP påvirker hjernens blodkar.

Nervesystemet i hjernens blodkar

Hjernens blodkar er forsynet med et fint net af nervefibre, som indeholder en række signalstoffer, der stammer fra hjernens forskellige ganglier. Blodkarrene påvirkes både af nervefibre fra det autonome nervesystem og af sensoriske nervefibre.

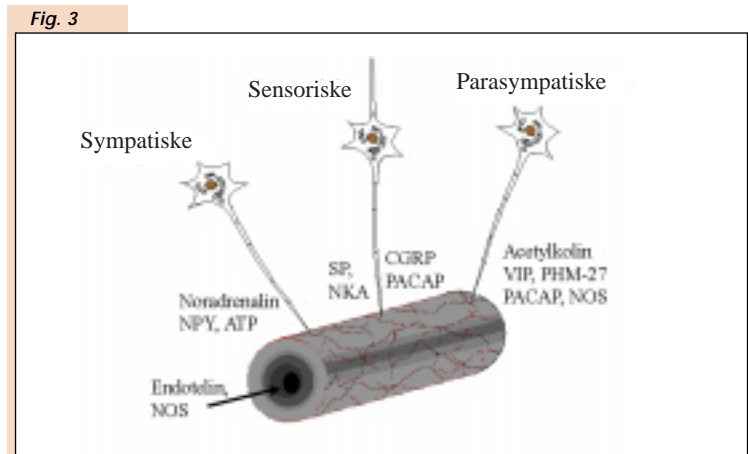
Sensoriske nervefibre udgår fra ganglion trigemini og indeholder

bl.a. signalstoffet CGRP. De sensoriske nervefibre er involveret i en refleks, som blandt andet beskytter hjernen mod for kraftige karsammentrækninger. Signalstoffers sammentrækkende eller dilaterende evne kan undersøges i en dyremodel, hvor man studerer diameteren af hjernens blodkar in situ. Effekten af signalstoffer, som får hjernens blodkar til at trække sig sammen, har hos det normale dyr en varighed af ca. halvandet minut. I dyr, hvor trigeminusnerven er skåret over, får nerveterminaler på blodkarrene ikke tilført CGRP gennem nerven. Dette fører til, at karsammentrækkende stoffer giver en tilsvarende reduktion af blodårenes diameter, men effekten er tre gange så langvarig som hos de dyr, hvor trigeminusnerven er intakt. Dette skyldes, at en sensorisk refleks, som frigør det karudvidende stof CGRP ikke aktiveres. Denne refleks beskytter hjernen mod karsammentrækninger, som via lav ilttilførsel kan slå hjerneceller ihjel.

CGRP receptorer i hjernens blodkar

Af alle stoffer i hjernens nerver er CGRP det stof, som giver den kraftigste og mest potente udvidelse af blodkarrene. Hos mennesket er hjernens blodkar ca. 10 gange mere følsomme overfor CGRP end blodkar fra andre områder i kroppen.

CGRP består af 37 aminosyrer, og stoffet findes i to varianter, som har forskelle i tre aminosyrer. De to varianter syntetiseres ud fra to gener på kromosom 11. Det ene gen giver anledning til dannelse af enten calcitonin i skjoldbruskkirtlen eller humant α -CGRP i centralnervesystemet. Det andet gen producerer humant β -CGRP.



Hjernens blodkar er forsynet med et fint net af nervefibre fra det parasympatiske nervesystem, det sympatiske nervesystem og det sensoriske nervesystem. Tegningen viser den cerebrovaskulære innervation og nervernes forskellige signalstoffer.

For at forstå signalstoffets virkningsmekanismer er det nødvendigt at klarlægge, hvilke receptorer på overfladen af blodkarrene, stoffet påvirker. CGRP aktiverer en gruppe receptorer, som i dag deles op i tre forskellige typer, CGRP, amylin og adrenomedulin. En undergruppering af disse receptorer kan ikke udelukkes.

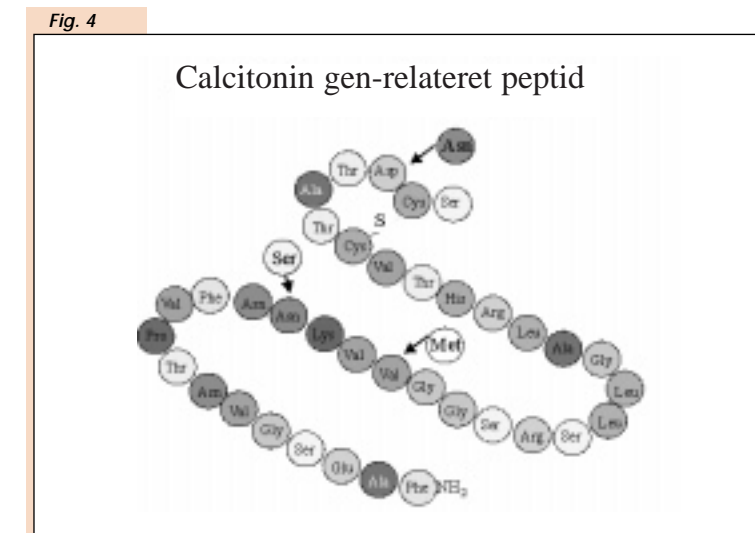
Ved at studere blodkarsreaktionen i vævsbade har vi fundet, at effekten af α -CGRP, men ikke af β -CGRP, kan blokeres af stoffet CGPR₈₋₃₇. En CGRP receptor blev for nylig klonet, og vi har fundet, at hjernens blodkar netop er forsynet med denne receptor.

CGRP analoger som lægemidler

Der er endnu ikke udviklet stoffer, som henholdsvis efterligner eller modvirker CGRP, som er egnet til brug som lægemidler. CGRP selv er heller ikke egnet som lægemiddel,

da det også virker dilaterende på perifere kar med kraftigt blodtryksfald til følge. For at finde terapeutisk anvendelse skal der findes frem til varianter af CGRP, som selektivt stimulerer hjernens CGRP-receptorer.

Samtidig kan stoffer, som selektivt blokerer CGRP-receptorerne i hjernens blodkar, måske give en ny behandlingsmulighed ved migræne. Den øgede frigørelse af CGRP, som vi har set under et migræneanfald, kan være årsagen til udvidelse af de store blodkar i hjernen, som sandsynligvis fremkalder migrænesmerterne.



Her ses aminosyresekvensen for humant α -CGRP. Tre aminosyrer forsynet med pile peger på steder, hvor humant α -CGRP adskiller sig fra humant β -CGRP.



Cand.pharm., dr.med. Inger Jansen-Olesen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Anette Sams er forskningsstipendiat ved Institut for Farmakologi.

Model af blod-hjerne barrieren

Mange lægemidler virker i hjernen, og derfor skal de kunne trænge gennem blod-hjerne barrieren. Traditionelt undersøges lægemidlers evne til at komme ind i hjernen i dyreforsøg. Nu findes der et godt alternativ; en model af blod-hjerne barrieren, som er baseret på dyrkede celler.

Af Lise Lund, Lars Hovgaard og Lona Christrup

Mange lægemiddelstoffer som f.eks. morfin udoer deres farmakologiske virkning i hjernen. For at kunne nå hjernens celler fra blodet, skal et lægemiddelstof passere blod-hjerne barrieren, som er en af kroppens mest uigennemtrængelige barrierer.

Ved udvikling af nye lægemidler til hjernen er det derfor vigtigt at undersøge deres evne til at trænge gennem blod-hjerne barrieren. Dette har traditionelt været gjort ved hjælp af dyreforsøg.

Behovet for at undersøge, om et stort antal af potentielle lægemiddelstoffer kan komme ind i hjernen, har været med til at fremskynde udviklingen af en cellekulturmodel af blod-hjerne barrieren. Modellen, som nu er sat op på Institut for Farmaci, gør det muligt på kort tid at teste mange stoffers evne til at passere barrieren.

Blod-hjerne barrieren er lokaliseret i hjernebarkens små blodkar, hjernekapillærerne. Når lægemiddelstoffer optages i hjernen, sker det fra blodet, der løber igennem hjernens forskellige områder både via de små og de store blodkar. Det indebærer, at stofferne har mulighed for at blive optaget i hjernen uden om blod-hjerne barrieren. Men da de store blodkars overflade kun udgør en meget lille procentdel sammenlignet med blod-hjerne barrierens overflade, er det lægemiddelstoffers evne til at passere blod-hjerne barrieren, som i praksis er afgørende for, om de har en farmakologisk virkning.

Dette blev første gang beskrevet, da et forsøg med injektion af et farvestof i rotter viste, at alle andre organer end hjernen blev farvet.

Blod-hjerne barrierens opbygning og funktion

Hjernens små blodkar er opbygget af flere lag af forskellige celletyper. I direkte kontakt med blodet ligger endothelcellerne, som udgør selve blod-hjerne barrieren. Bagved endothelcellerne ligger nogle hjælpeceller, som kaldes pericytter og astrocytter, samt udløbere fra hjernens nerveceller.

Endothelcellerne er først og fremmest karakteriseret ved deres evne til at danne såkaldte tight junctions. Disse tight junctions er en fusion mellem cellemembranerne, som forhindrer ioner, vand og små

vandopløselige stoffer i at passere mellem cellerne fra blodet og ind i hjernen. Da en række livsnødvendige stoffer som f.eks. glukose og aminosyrer heller ikke kan trænge gennem barrieren, reguleres deres optagelse i hjernen ved hjælp af aktive transportsystemer, som er specifikke for de enkelte stoffer. Specielt optaget af glukose er vigtigt, da det er hjernens eneste brændstofkilde.

Endothelcellerne er ligeledes i stand til at tilbageholde fedtopløselige stoffer, der normalt kan passere igennem celler. Det sker ved hjælp af mekanismer, der pumper stofferne ud af endothelcellerne. Tilstedeværelsen af tight junctions, aktive transportsystemer og pumpemekanismer i endothelcellerne betyder, at passagen af stoffer ind og ud af hjernen kan reguleres med det formål at holde hjernens følsomme indre kemiske miljø stabilt.

Hjælpecellerne, pericytter og astrocytter, er med til at opretholde og regulere blod-hjerne barrieren samt til at udvikle den fra fosterstadiet. Specielt astrocytter menes at have en afgørende rolle for blod-hjerne barrierens funktion.

Endothelceller fra kvæghjerne

I starten af 1980'erne, da man blev klar over, at blod-hjerne barrieren befandt sig i hjernens små blodkar, begyndte udviklingen af en cellekulturmodel for barrieren. Modellen består af endothelceller, som isoleres

fra en dyrehjerne og udsæes på en vækstoverflade, hvor de kan dele sig og danne et sammenhængende cellemonolag.

I øjeblikket eksisterer der cellekulturmodeller af blod-hjerne barrieren fra kvæghjerne, svinehjerne og rottehjerne. Vækstmediets sammensætning og vækstoverfladen har stor betydning for, hvordan cellekulturen udvikles, og mange forskellige vækstbetingelser er afprøvet for at optimere cellekulturene, så de ligner forholdene i den levende hjerne mest muligt. For eksempel er cellekulturens evne til at danne tight junctions afhængig af både vækstoverfladen og vækstmediet.

En cellekultur, som dyrkes over mange generationer, en såkaldt cellegenerationslinie, vil gradvist miste nogle af blod-hjerne barrierens karakteristika. Det kan forhindres ved at dyrke endothelcellerne sammen med astrocytter, som kan foranledige dannelsen af både tight junctions og forskellige enzymer. Vi har valgt at

sætte en model op baseret på endothelceller fra kvæghjerne, der dyrkes som en primær kultur, d.v.s. over et kortere antal generationer. Herved undgås det mere komplekse system med to forskellige celletyper.

Selve isoleringsproceduren er inddelt i to trin. Under aseptiske forhold fjernes hjernebarken fra en kvæghjernes to hjernehalvdele. Hjernebarken homogeniseres og filtreres, hvorefter de små blodkar, hjernekapillærerne, kan opsamles fra filterklædet. Efter en enzymatisk nedbrydning, hvor kontaminerende celler som astrocytter, pericytter og basalmembranen fjernes, udsæes kapillærerne i vækstflasker med vækstmedium.

Endothelcellerne vil nu begynde at dele sig, og efter én uge kan cellerne "høstes" fra flaskens bund. Cellerne udsæes nu på filtre, og efter en uge vil de have dannet et tæt cellemonolag med blod-hjerne barrierens karakteristika.

Transportstudier med cellemodellen

Disse filtre med cellemonolag kan nu bruges til transportstudier af lægemiddelstoffers evne til at passere blod-hjerne barrieren. Det er oplagt at anvende modellen til kvalitativt at screene nye potentielle lægemiddelstoffers transport over barrieren.

Man kan bestemme transporten både ind i hjernen og ud af hjernen ved at tilsætte stoffet på henholdsvis oversiden og undersiden af filteret. Det er ligeledes muligt at undersøge, om stofferne transporteres igennem cellerne via et aktivt transportsystem, såfremt dette transportsystem udtrykkes i cellerne. Mange lægemiddelstoffer trænger ikke ind i hjernen, fordi de pumpes ud af endothelcellerne. Med cellekulturmodellen kan man også afklare, om potentielle lægemiddelstoffer udelukkes fra hjernen med denne mekanisme.



Cand. pharm. Lise Lund er ph.d. studerende ved Institut for Farmaci

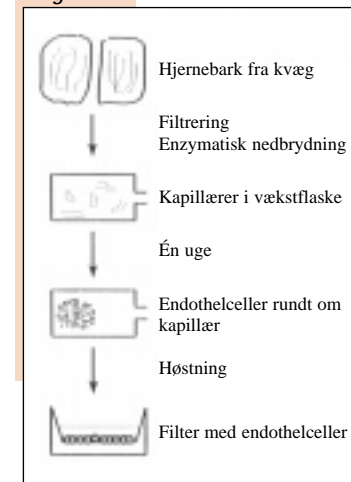


Ph.d. Lars Hovgaard er lektor ved Institut for Farmaci



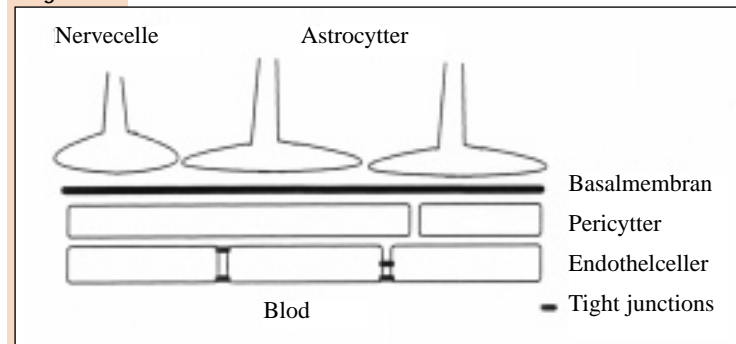
Lic. pharm. Lona Christrup er lektor ved Institut for Farmaci

Fig. 2



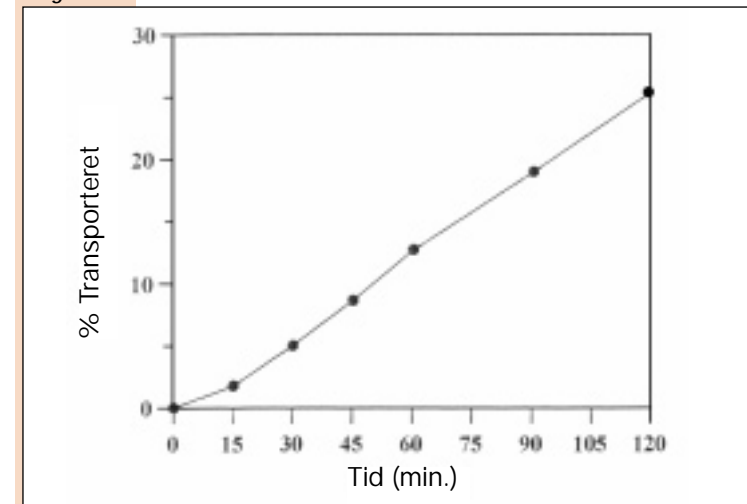
Figuren viser, hvordan hjernekapillærer isoleres fra kvæghjerne og udsæes i vækstflasker. Endothelceller deler sig ud fra kapillærstykkerne, og efter én uge kan cellerne høstes fra flaskebunden og udsæes på filtre. Efter endnu en uge har de dannet et cellemonolag og kan anvendes til transportforsøg, der viser lægemiddelstoffers evne til at trænge gennem blod-hjerne barrieren.

Fig. 1



Her ses en skematisk tegning af et "udfoldet" hjernekapillær; et af hjernens små blodkar. Yderst mod blodet ligger endothelcellerne, som er bundet tæt sammen af tight junctions, og som udgør blod-hjerne barrieren. Direkte herunder ligger hjælpecellerne, som kaldes pericytter. Disse to celletyper er omkranset af basalmembranen, hvorigennem astrocytter og nerveceller kan regulere blod-hjerne barrierens funktioner.

Fig. 3



Figuren viser den procentdel af sucrose, der transporteres fra oversiden af filteret til undersiden af filteret, som funktion af tiden. Til tiden = 0 tilsættes sucrose til oversiden af filteret, og til forudbestemte tider udtages prøver fra undersiden af filteret. Kurvens rettede forløb viser, at der er en konstant flux af sucrose fra oversiden til undersiden.

Væksthormon gennem næsen?

Væksthormon afhjælper dværgvækst hos børn og bruges nu også til at behandle voksne, som lider af mangel på hormonet. I dag injiceres væksthormon, men det vil være behageligere for patienterne og sandsynligvis også mere effektivt at indtage lægemidlet gennem næsen. Nye studier viser imidlertid, at næseslimhinden kan tage skade ved daglig indgift.

Af Charlotte Vermehren, Peter B. Johansen og Harald S. Hansen

Omkring 250 danske børn behandles for dværgvækst med væksthormon, der injiceres på samme måde som insulin. Hvis hormonet kunne indtages som spray gennem næseslimhinden, ville man sandsynligvis kunne opnå en bedre effekt.

Væksthormon er et naturligt stof, som frigives fra hypofysen. Frigivelsen er episodisk, og det er vigtigt at efterligne dette episodiske udskillelsesmønster i forbindelse med væksthormonterapi. Dyreforsøg har vist, at hyppige injektioner af væksthormon resulterer i bedre vækst, end når der kun gives én injektion i døgnet, hvilket i dag er praksis ved behandling af mennesker.

Hyppig indgift gennem næsen er langt behageligere for patienten end mange injektioner, og metoden gør det samtidig muligt at optimere behandlingen ved at efterligne hormonet naturlige udskillelsesmønstre.

Væksthormon er imidlertid et så stort molekyle, at stoffet kun vanskeligt kan trænge gennem næseslimhinden og komme ud i blodet. Af den grund er det nødvendigt at tilsætte hjælpepestoffer, som fremmer optagelsen af hormonet. Nogle af disse hjælpepestoffer kan imidlertid medføre skader på næseslimhinden.

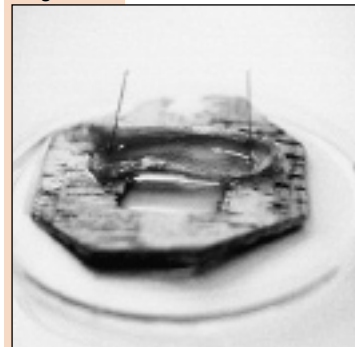
Derfor er det vigtigt at få kendskab til, hvilke konsekvenser behandling med nasalpræparater vil få for næseslimhinden. Det er natur-

ligvis en forudsætning for nasal behandling med væksthormon, at næseslimhindens integritet og funktioner bevares.

Væksthormon til børn og voksne
Væksthormon er med til at opretholde normal vækst. Selv om menneskets gennemsnitshøjde stiger på verdensplan, findes der et stigende antal børn med dværgvækst. Sådanne børn bliver højere, når de behandles med væksthormon.

Voksne, der lider af klassisk væksthormonmangel, som bl.a. kan medføre knogleskørhed, svækkede muskler, depressioner og unormal træthed, har ligeledes gavn af hormonbehandling. I dag anvendes

Fig. 1



væksthormon desuden til at behandle kvinder med den arvelige sygdom Turners syndrom, hvis vækst er nedsat. Samtidig bruges væksthormon til behandling af børn med kronisk nyresvigt, og det er sandsynligt, at der vil findes nye anvendelsesområder i de kommende år.

Behandling af voksne patienter har hidtil været meget begrænset på grund af mangel på væksthormon, som før i tiden måtte udvindes

En Ussing-kammer-opstilling, der anvendes ved elektrofysiologiske målinger på kaninslimhinden. Næseslimhinden spændes op mellem de to kammerhalvdele, og ved hjælp af elektroder på begge sider kan man bl.a. måle spændingsforskellen over vævet. Spændingsforskellen giver udtryk for slimhindens tilstand.

af hypofyser fra afdøde. I midten af 1980'erne lykkedes det imidlertid at fremstille humant væksthormon ved hjælp af gensplejede gærceller. Den øgede tilgængelighed af biosyntetisk væksthormon muliggjorde en øget forskning på området. Novo Nordisk blev tidligt involveret i arbejdet og målrettede sin indsats mod at udvikle en optimal metode til at indgive hormonet på.

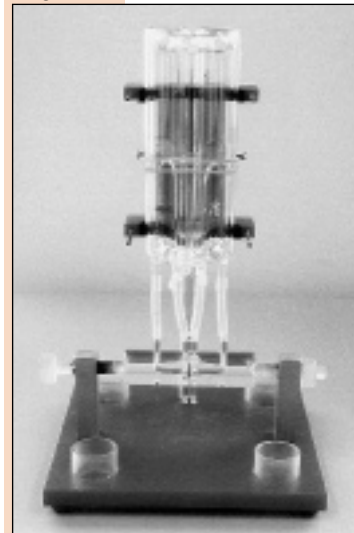
Vejen gennem næseslimhinden

Væksthormon er et peptid. Væksthormon og andre peptidlægemidler som f.eks. insulin må i dag injiceres, hvilket er forbundet med væsentlige gener for patienterne. Man har derfor søgt alternative medicineringsveje, og indgift gennem næsen har her vist sig som en særligt lovende metode.

Imidlertid udgør næseslimhinden en effektiv barriere mod peptider som væksthormon. Desuden er nedbrydende enzymer og slimlagets

Transport over næseslimhinden kan undersøges på en kaninslimhinde. For forsøgene anbringes næseskillevaggen på en ramme. Der anvendes en pincet til forsigtigt at løse næseslimhinden, som anbringes i Ussing-kammer-opstillingen.

Fig. 2



ge fosfolipider i f.eks. cellemembraner. Det andet stof, α -cyclodextrin (α -CD), er det mest almindelige naturlige nedbrydningsprodukt fra stivelse. Molekylet indeholder en ringstruktur med en vandopløselig yderside og et vandskyende indre, hvilket muliggør kompleksdannelse med vandskyende komponenter i næseslimhinden. Denne egenskab medvirker sandsynligvis til, at stoffet kan transportere væksthormon over næseslimhinden.

Hjælpestoffer er nødvendige

Da væksthormon ikke selv kan trænge gennem næseslimhinden, er det nødvendigt samtidig at indgive hjælpepestoffer, som fremmer hormonet evne til at passere. Sådanne stoffer kaldes for absorptionsfremmere.

Der findes flere typer absorptionsfremmere, som er af forskellig kemisk natur og har forskellige virkningsmekanismer, der ikke er klarlagt fuldtud. Dog tyder en række studier på, at stofferne kan øge transporten af peptidlægemidler over slimhinden på fire måder. For det første kan slimlagets viskositet nedsættes, så slimet bliver mere tyndtflydende. For det andet kan aktiviteten af nedbrydende enzymer dæmpes. For det tredje kan porerne mellem de enkelte celler i næseslimhinden åbnes, og endelig kan slimhinden blive blødere.

I mange tilfælde har disse absorptionsfremmere dog udvist skadelige egenskaber, og man har sat spørgsmål ved, om den optagelsesfremmende effekt hænger sammen med skadevirkningerne.

Novo Nordisk har afprøvet mange absorptionsfremmere for at finde frem til de mest effektive. Valget faldt på et fosfolipid og et cyclodextrin, som begge forekommer naturligt i organismen. Fosfolipidet, didecanoylfosfatidylcholin (DDPC), er syntetisk, men minder om de naturlige

Koncentrationen af væksthormon varierer stærkt i blodet hos mennesker. Her ses den naturlige variation over et døgn. Ved behandling af bl.a. dværgvækst med væksthormon opnår man størst effekt ved hyppig indgift af lægemidlet, fordi behandlingen kommer så tæt på den naturlige episodiske udskillelse som muligt.

vet samtidig. Resultatet var umiddelbart lovende, da det tydede på, at næseslimhindens barriere blev genoprettet inden for en halv time. Men samme forsøg udført med DDPC viste ingen genoprettelse af barrieren. Andre forsøg demonstrerede ligeledes, at både DDPC og α -CD forårsagede drastiske ændringer i næseslimhinden hos kaniner.

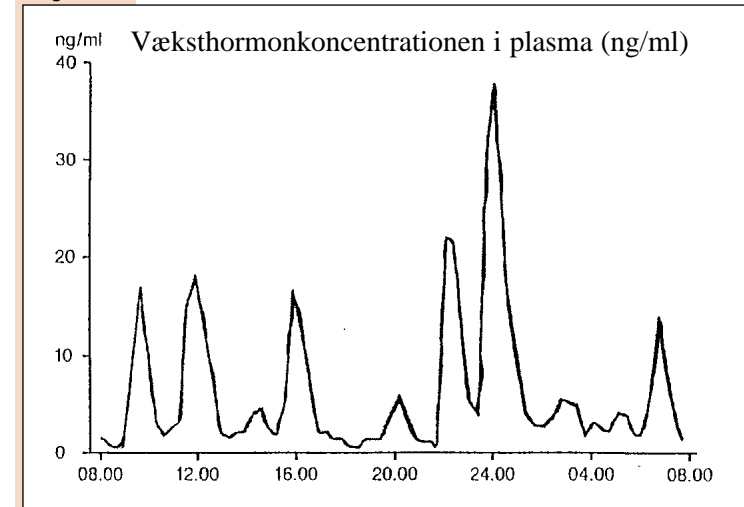
Hjælpestoffer medførte skader

Både vi og andre har vist, at begge absorptionsfremmere øger optagelsen af både insulin og væksthormon tilstrækkeligt til, at man kan opnå effektive koncentrationer af lægemidlet ved indgift gennem næsen.

Det næste skridt var så at undersøge, hvilke skadelige virkninger, der er forbundet ved en sådan behandling. Forudsætningen for nasalterapi må være, at næseslimhinden bevares intakt. Den optimale effekt af en absorptionsfremmer vil være en kortvarig virkning, der aftager straks efter, at lægemidlet er optaget. Dette vil være et udtryk for, at næseslimhindens barriere hurtigt gendannes.

På den baggrund gennemførte vi forsøg med kaniner, som fik indgivet absorptionsfremmeren α -CD i næsen og derefter til forskellige tider fik væksthormon. Koncentrationen af væksthormon i kaninernes blod blev derpå målt for at vurdere, hvor meget der var blevet absorberet. Når væksthormon blev givet en halv, en hel og tre timer efter α -CD, var hormonzoncentrationen væsentligt nedsat i forhold til, når væksthormon og hjælpestoffet blev indgi-

Fig. 3



Cand. pharm. ph.d. Charlotte Vermehren er adjunkt ved Institut For Farmaci.



Lic.pharm. Peter B. Johansen er specialkemiker ved Growth Hormone Biology på Novo Nordisk A/S.



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

Stoffer kan frigøre væksthormon fra hypofysen

Væksthormon anvendes i dag til behandling af dværgvækst og kronisk nyresvigt hos børn samt piger med Turners syndrom. Uheldigvis kan hormonet ikke indgives i tabletter, men må injiceres. En mulig fremtidig løsning er stoffer, som kan frigøre væksthormon fra hypofysen, og som kan indtages gennem munden. Ny forskning tyder tilmeld på, at disse stoffer har andre interessante farmakologiske virkninger.

Af Bjarne Fjalland, Thomas Anderson og Peter B. Johansen

Væksthormon har mange fascinerende fysiologiske virkninger, som bedst kan illustreres ved de symptomer, der opstår hos patienter, som lider af væksthormonmangel. Det drejer sig om øget kropsvægt, større fedtmasse og mindre muskelmasse. Yderligere har disse patienter øget risiko for at udvikle hjerte-karsygdomme og har nedsat mineraltæthed i deres knogler. Omvendt vides væksthormon bl.a. at øge forbrændingen af fedt og vil måske vise sig at kunne hjælpe svært overvægtige mennesker af med overflødige kilo.

Desværre egner væksthormon sig ikke til at blive indtaget i tabletter, fordi hormonet nedbrydes af enzymer i tarmen, inden det når ud i blodet, hvorfra det udøver sine virkninger. Derfor må man injicere stoffet, hvilket begrænser anvendelsesmulighederne.

En elegant, alternativ løsning vil være at få de væksthormonproducerende celler i hypofysen til at frigøre mere væksthormon. Derfor er der stor farmakologisk interesse for en gruppe stoffer, som netop er vist at kunne frigøre væksthormon fra hypofysen. Stofferne er små syntetiske peptider, som består af fem eller seks aminosyrer.

Frigørelse af væksthormon

De væksthormonfrigørende stoffer kaldes med en fælles betegnelse for GHS-stoffer efter det engelske navn Growth Hormone Secretagogues. De første GHS-stoffer blev syntetiseret allerede i slutningen af 1970'erne; det vil sige nogle år før kroppens eget overordnede væksthormonfrigørende hormon (GHRH) blev identificeret og isoleret.

Fra hjernen reguleres udskillelsen af væksthormon af GHRH i samspil med et andet overordnet hormon, somatostatin, som hæmmer udskillelsen. Disse to hormoner dannes i specifikke nervecentre i hypothalamus, en hjernedel, som er placeret lige over hypofysen. De overordnede hormoner transporteres derpå via nervebaner til hypofyseforlappens blodkarnet, hvor de frigives og udøver deres virkning.

Hvorledes GHS-systemet spiller med i processen, er endnu ikke fuldt opklaret, men man forestiller sig, at GHS-stofferne efterligner et ukendt hormon, som der i øjeblikket søges ihærdigt efter.

På internationalt plan foregår der en intens medicinsk og farmakologisk forskning med henblik på at udvikle GHS-stoffer. Ud fra teoretiske overvejelser over molekylernes rumlige struktur er det bl.a. lykkedes at syntetisere det meget potente og stabile peptid GHRP-6. Første generation stofferne var imidlertid dårligt absorberbare efter indtagelse som tabletter. Det vil derfor være et stort fremskridt, hvis det lykkes at frembringe et GHS-stof til indtagelse gennem munden. Dette mål synes at være inden for rækkevidde.

Disse nye potentielle lægemiddelsestoffer udvikles med henblik på

Hypofysen er placeret under hypothalamus, som udsender hjernens overordnede væksthormonfrigørende hormon GHRH. GHRH transporteres til hypofyseforlappen, som herved bringes til at udskille væksthormon.

behandling af børn og voksne med væksthormonmangel. Andre interessante anvendelsesområder er behandling af knogleskørhed, svær fedme og tilstande med øget proteinindbrydning, f.eks i forbindelse med svære kirurgiske indgreb. Endelig kan GHS-stofferne bruges i forbindelse med diagnostisk påvisning af væksthormonmangel.

Stoffernes selektivitet

Der bliver naturligvis fokuseret meget på, hvor specifikke GHS-stofferne er, da man kun ønsker frigørelse af væksthormon og ikke af andre hormoner, som også udskilles fra hypofyseforlappen.

Hidtil er der imidlertid ingen, som har set på, om stofferne påvirker hypofysebaglappen. Denne del af hypofysen udskiller hormoner som vasopressin, der har betydning for henholdsvis organismens salt- og vandbalance, samt oxytocin, som styrer mælkeproduktionen.

Man har indtil videre ikke påvist nogen kommunikation mellem de to hypofysehalvdele. Men for nylig er der påvist nervebaner mellem hypofysebaglappen og de områder i

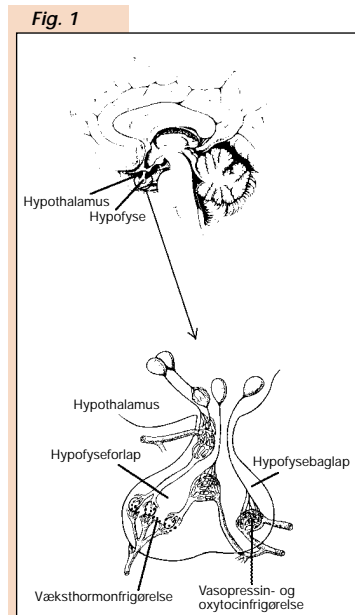


Fig. 1

hypothalamus, som fører til hypofysens blodkarnet, og som indeholder de to overordnede hormoner GHRH og somatostatin.

De biologiske virkninger af de to overordnede hormoner i denne del af hypofysen er ukendte. Derfor besluttede vi at undersøge, hvordan kroppens væksthormonfrigørende hormon GHRH samt et GHS-stof (GHRP-2, en analog af GHRP-6) påvirker udskillelsen af hypofysebaglappens hormoner oxytocin og vasopressin.

Målinger på rottehypofyser

Fra rotter kan hypofysebaglappen isoleres og bringes til at overleve i kunstige næringsvæsker. Man kan herefter ved elektrisk påvirkning efterligne de naturlige nerveimpulser og fremkalde hormonudskillelse, således som det sker i den intakte organisme. Mængden af udskilt hormon bestemmes ved biologiske og radioimmunologiske målinger.

Ved den biologiske analyse anvendes en livmoder fra en rotte. De hormoner, som hypofysebaglappen danner, drypper ned på livmoderen og får den til at trække sig sammen. Sammentrækningen øges med stigende mængder af de hormoner, som hypofysebaglappen danner. Den radioimmunologiske metode er baseret på mærkning af hormonerne med radioaktivt jod, hvorved mængden kan måles i en tæller.

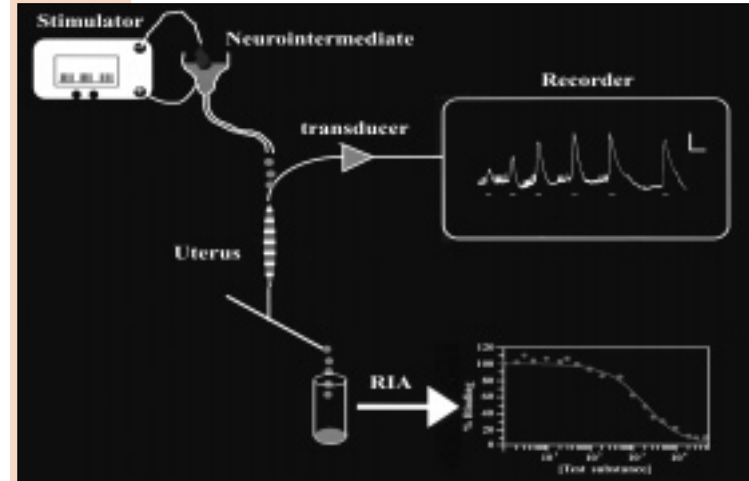
Tilførsel af organismens overordnede væksthormonfrigørende hormon, GHRH, til organbadet medførte en markant nedsat udskillelse af begge hypofysebaglaphormoner. Spørgsmålet var så, om det syntetiske GHS-stof havde en tilsvarende effekt. Overraskende viste det sig, at dette stof ligeledes hæmmede udskillelsen af vasopressin og oxytocin.

Virkningen af GHRH og GHS-stoffet var maksimal i det fysiologiske område, hvilket vil sige i koncentrationer, der svarer til koncentrationen af GHRH i kroppen. Både større og mindre doser gav en ringere effekt. Virkningen af GHS-stoffet stiger med stigende dosis indtil et vist punkt, hvorefter effekten aftager. Hvis man forud for behandlingen påvirkede hypofysebaglappen med et stof, der er kendt for at ophæve GHS-stoffets væksthormonfrigørende effekt, ophævedes stoffets hæmning på udskillelsen af vasopressin og oxytocin.

Nye områder for behandling

Noget tyder altså på, at vi her har at gøre med en stofgruppe, der udover at have markante og terapeutisk

Fig. 2



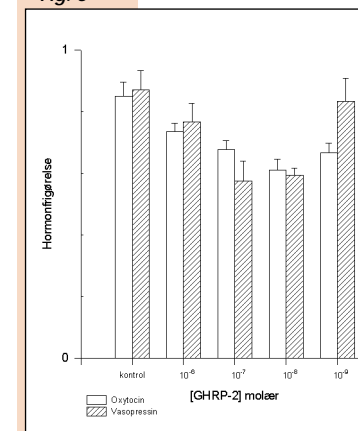
Fra rotter kan hypofysebaglappen isoleres. Ved elektrisk stimulering fremkalder hormonudskillelse, som det sker i organismen. Ved den biologiske analyse anvendes en livmoder fra en rotte. Jo større mængder hormoner, der drypper ned på livmoderen, jo mere trækker den sig sammen. I den radioimmunologiske metode mærkes hormonerne med radioaktivt jod, hvorved mængden kan måles i en tæller.

interessante virkninger i forbindelse med forskellige tilstande med væksthormonmangel, også kan påvirke frigørelsen af hypofysebaglaphormoner og dermed have andre terapeutiske muligheder.

Dette fordrer imidlertid en adskillelse af stoffernes effekter på hypofysens forlap og baglap, så lægemiddelseffekterne specifikt kan påvirke hypofysebaglappen. Ydermere er det nødvendigt med en adskillelse af den hæmmende virkning på vasopressin og oxytocin. Hvis et stof f.eks. specifikt kan hæmme frigørelsen af vasopressin, vil stoffet kunne bruges som et vanddrivende middel. Det skyldes, at en formindsket koncentration af vasopressin i blodet vil medføre nedsat reabsorption af salt og vand i nyrene.

For nylig blev den receptor på cellerne, man mener GHS stofferne virker over, identificeret. Denne receptor er fundet i hypothalamus

Fig. 3



og i hypofyseforlappen. Hvorvidt receptoren også findes i hypofysebaglappen er endnu uvist.

Man taler allerede om eksistensen af forskellige undertyper af denne receptor. Hvis sådanne undertyper findes, er det muligt, at nogle af dem er specifikke for henholdsvis udskillelse af vasopressin og oxytocin. I så fald vil det sandsynligvis være muligt at designe GHS-stoffer, som selektivt påvirker den ønskede receptor.

Receptoren er imidlertid forskellig fra den receptor, som GHRH virker over. Det er derfor på nuværende tidspunkt umuligt at udtale sig om hvilke virkningsmekanismer, der er involveret i begge stoffers hæmmende effekt. Der forestår således et meget stort udredningsarbejde, før det er muligt at give en realistisk vurdering af den farmakologiske betydning af vores observationer. Første skridt på vejen må imidlertid være at påvise, om stoffernes hæmmende effekt på udskillelsen af vasopressin og oxytocin også kan dokumenteres i en intakt organisme.

Det syntetiske peptid, GHRP-2, hæmmer udskillelsen af vasopressin og oxytocin fra hypofysebaglappen. Virkningen er maksimal i det fysiologiske område.



Lic. pharm. Bjarne Fjalland er lektor ved Institut for Farmakologi.



Cand. pharm. Thomas Anderson, Institut for Farmakologi.



Lic. pharm. Peter B. Johansen er specialkemiker ved Growth Hormone Biology på Novo Nordisk.

Computer beregner om lægemidlet kommer ud i blodet

Mange lovende lægemiddelstoffer er blevet kasseret efter en langvarig og kostbar udviklingsindsats, fordi de ikke kan trænge gennem tarmvæggen og derfor ikke kommer ud i blodet. Nye computermetoder kan afsløre problemet, allerede inden et potentielt lægemiddelstof fremstilles i laboratoriet.

Af Lene Krarup og Inge Thøger Christensen

Et lægemiddelstof kan kun udøve sin virkning, hvis det bliver optaget – absorberet – af organismen og dernæst bliver transporteret med blodet til det tiltænkte virkningssted. Normalt overvejes dette aspekt først sent i udviklingen af et nyt lægemiddel, fordi man som regel fokuserer på at fremstille lægemiddelstoffer, som er så effektive som muligt.

I medicinindustrien findes der således mange eksempler på, at et ellers lovende lægemiddelstof er blevet kasseret efter flere års kostbar udvikling, fordi man ikke har taget højde for, om det nye stof kunne absorberes i f.eks. mave-tarmkanalen. Det vil derfor være af stor værdi, hvis man på et tidligt tidspunkt i udviklingen kan forudsige, om de nyudviklede lægemiddelstoffer har en chance for at blive optaget i organismen.

Det er ikke praktisk eller økonomisk muligt at teste absorptionen af alle nye lægemiddelstoffer på dyr, fordi der ofte syntetiseres tusindvis af stoffer i jagten på et enkelt nyt lægemiddel. I stedet kan man f.eks. dyrke tarmceller i laboratoriet og bruge dem som modelsystemer. Et eksempel herpå er cellelinjen Caco-2, som i vid udstrækning anvendes på Institut for Farmaci som model for absorption af lægemiddelstoffer over tarmslimhinden.

Beregninger afløser laboratoriearbejde

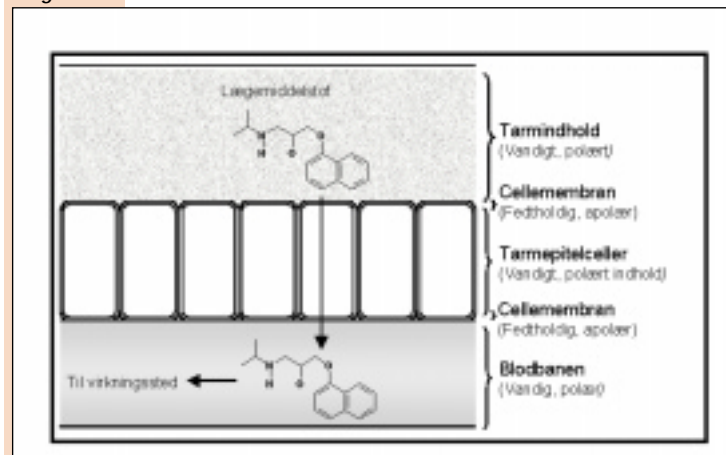
En anden mulighed er en rent teore-

tisk beregning af absorptionen ud fra viden om lægemiddelstoffets molekylære struktur. Herved undgås arbejdskrævende laboratoriearbejde og dermed også brugen af potentielt miljøskadelige kemikalier. En yderligere fordel er, at man kan forudsige absorptionsegenskaberne af lægemiddelstoffer, allerede inden de syntetiseres.

Med en tilstrækkelig udviklet teoretisk basis vil det også være muligt at give anvisninger på, hvordan strukturen af et lægemiddelstof skal ændres for at optimere absorptionsegenskaberne. Det vil alt andet lige være en fordel, at lægemiddelstoffet fra starten har så høj en absorption som muligt, idet man derved minimerer behovet for en senere udvikling af absorptionsfremmende foranstaltninger.

De eksisterende metoder til at beregne et lægemiddelstofs evne til at blive optaget i organismen er i mange tilfælde utilstrækkelige. Formålet med vores arbejde er at udvikle nye og bedre beregningsmetoder ved at uddybe kendskabet til sammenhængen mellem molekylstruktur og absorption. Med vores nye beregningsprincip er det muligt at opnå en nøjagtig forudsigtelse af absorptionen ud fra molekylære egenskaber.

Fig. 1



Når et lægemiddelstof skal fra tarmen over i blodbanen, må det først passere det yderste lag celler, tarmepitелet. For den fedtholdige cellemembran kan passeres, må brintbindingerne mellem lægemiddelstoffet og de omgivende vandmolekyler brydes.

Struktur bestemmer stoffets optagelse

Når et lægemiddelstof skal gennem tarmslimhinden og ud i blodet, må molekylet være i stand til at passere skiftevis vandige og fedtholdige miljøer for at nå over tarmcellen og ind i blodbanen. Lægemiddelstoffer er bygget op af to grupper af atomer – polære og apolære atomer. Polære atomer har en delvis positiv eller negativ elektrisk ladning, mens apolære atomer er overvejende neutrale.

Gruppen af polære atomer omfatter bl.a. ilt og kvælstof, mens kulstof hører til de apolære atomer. De polære atomer kan danne svage bindinger, såkaldte brintbindinger, til de omgivende vandmolekyler, som også er polære. Disse bindinger skal brydes, før molekylet kan passere igennem det apolære miljø i cellemembranen, som omgiver tarmcellen. Jo færre brintbindinger, der skal brydes, jo nemmere slipper molekylet taget i vandet og jo flere molekylet passerer cellemembranen pr. tidsenhed.

Det er derfor rimeligt at antage, at et molekyles evne til at danne brintbindinger også fortæller noget om dets absorptionsegenskaber. Et sådant udtryk fås af overfladearealet af de atomer, der er i stand til at

danne brintbindinger, dvs. de polære atomer. Dette udtryk kaldes det polære vandtilgængelige overfladeareal (PVO).

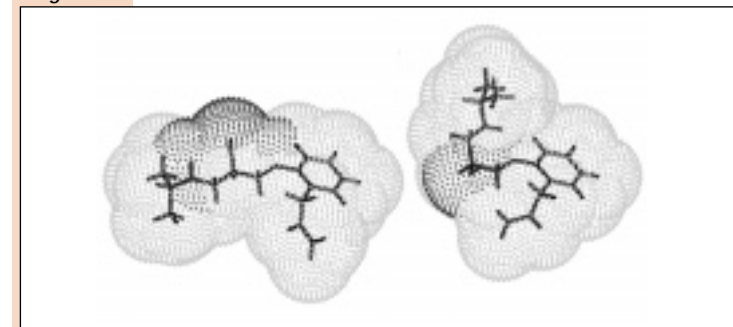
Molekylernes facon og fleksibilitet

Imidlertid er det polære vandtilgængelige overfladeareal ikke en entydig størrelse, hvis der er tale om fleksible molekyler, hvilket ofte er tilfældet. I et fleksibelt molekyle er atomerne bundet til hinanden ved enkelt- eller dobbeltbindinger. Det koster kun lidt energi at flytte to atomer, som er adskilt af tre bindinger, i forhold til hinanden. Det svarer til at rotere omkring en enkeltbinding i molekylet. Resultatet er, at atomernes indbyrdes placering i det tredimensionelle rum let kan ændres, hvilket resulterer i mange kombinationsmuligheder for atomernes indbyrdes placering. Hver kombinationsmulighed betegnes som en konformation.

Størrelsen af det polære vandtilgængelige overfladeareal for den enkelte konformation afhænger af, i hvor høj grad apolære atomer "spærrer" for vandmolekylernes adgang til de polære atomer. Det polære vandtilgængelige overfladeareal er typisk større i en udstrakt konformation end i en mere sammenfoldet konformation, hvor de polære atomer delvist skjules af de øvrige atomer. Variationen i vandtilgængeligheden mellem konformationerne er så betydelig, at det er nødvendigt at tage højde for den, når man ønsker at bruge det polære vandtilgængelige areal til at forudsige absorptionen af et lægemiddelstof.

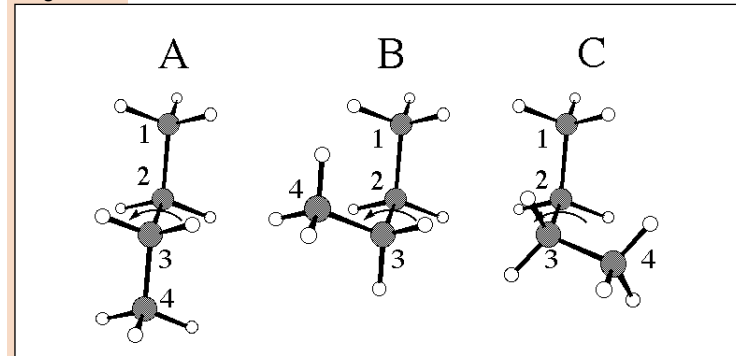
Dertil kommer, at nogle konformationer forekommer hyppigere end andre. Energien eller stabiliteten er bestemmende for hyppigheden af konformationerne. En høj energi betyder, at afstandene og vekselvirkningerne mellem atomerne i konformationen ikke er favorable. Derfor er sådanne højenerge-

Fig. 3



Størrelsen af det polære vandtilgængelige overfladeareal (PVO) afhænger af konformationen. PVO af den udstrakte konformation til venstre er betragteligt større end af den sammenfoldede til højre. De mørke prikker viser polært overfladeareal, de lyse prikker viser ikke-polært overfladeareal.

Fig. 2



tiske konformationer sjældnere end konformationer med lav energi. En enkelt dosis af et lægemiddelstof består af milliarder af molekyler, så graden af absorption afhænger af, om de dominerende konformationer har et favorabelt polært vandtilgængeligt overfladeareal.

Computere på hårdt arbejde

Størrelsen af konformationernes energi bruges til at beregne et vægtet gennemsnit af det polære vandtilgængelige overfladeareal i forhold til hver enkelt konformations sandsynlighed for at forekomme. Problemet er så at bestemme, hvilke og hvor mange forskellige konformationer, molekylet kan antage. Dette problem er ikke trivielt, hvis molekylet har mere end 3-4 bindinger med mulighed for rotation, fordi antallet af kombinationsmuligheder hurtigt bliver uoverskueligt.

For at løse problemet udføres en såkaldt konformationsanalyse. Til dette bruger vi et computerprogram, som ved hjælp af indbyggede parametre og formler for molekylers opførsel kan beregne bl.a. ændringen i energi, når konformationen forandrer sig. Desuden kan man ved hjælp af computergrafik få vist molekylernes på skærmen.

Fremfor at vi selv ændrer molekylernes konformation ved at rotere atomerne i forhold til hinanden, sættes computeren i arbejde. I den proces, der kaldes molekylodynamik, bliver computeren instrueret om at

Den relative placering af atom 1 og 4 i det tredimensionelle rum ændres ved rotation omkring enkeltbindingen mellem atom 2 og 3. Hver kombinationsmulighed for indbyrdes placering af alle molekylets atomer betegnes en konformation. Som eksempel er her vist 3 forskellige konformationer af det samme stof, butan.

give hvert atom et lille puff i en tilfældig retning. Hvis puffene er tilstrækkeligt store, ændres atomernes indbyrdes position og en ny konformation dannes, som så bruges som udgangspunkt for de næste puff, en ny konformation dannes og så fremdeles. Hvis man bliver ved længe nok og gør puffene tilstrækkeligt store, får man ideelt set besøgt alle tænkelige konformationer.

Indtil videre har vi analyseret 15 modelstoffer med denne metode. Resultaterne er meget lovende, da vi har fundet en lineær sammenhæng mellem absorptionshastigheden i Caco-2 tarmceller og det konformationsafhængige polære vandtilgængelige overfladeareal. Vi er nu i gang med at undersøge, om en tilsvarende sammenhæng gælder for andre typer af molekyler med mulighed for endnu flere forskellige konformationer.

Selv om vi bruger store, kraftige computere, kræver metoden alligevel lang beregningstid. For tiden tager det en til to dage at beregne på et enkelt molekyle. For metoden bliver praktisk anvendelig i udviklingen af nye lægemidler, må beregningstiden reduceres væsentligt; så det er en vigtig del af det videre arbejde.



Cand. pharm. Lene Krarup er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



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

Den svære vej gennem tarmvæggen

Mange lægemidler skal ud i blodet for at virke. Men en del af disse stoffer bremses af tarmvæggen, når de indtages som tabletter, kapsler eller lign. En mulig løsning er at bruge de transportsystemer, der sluser små peptider fra føden gennem tarmslimhinden, til at sende lægemiddelstofferne ud i blodet.

Af Bente Steffansen, Sven Frøkjær og Mitchell E. Taub

En række lægemiddelstoffer, som virker, når de indgives direkte i blodet ved injektion, er uvrksomme i tabletform. Årsagen er typisk, at det aktive lægemiddelstof ikke trænger gennem tarmslimhinden. Det medfører, at lægemiddelstoffet ikke får adgang til blodet, som ellers skulle transportere stoffet videre til virkningsstedet.

Da det ubetinget er behageligere at indtage tabletter end at injicere stofferne, forskes der intenst i metoder til at få disse lægemiddelstoffer sendt gennem tarmslimhinden. Og der er en mulig løsning. Ved at koble stoffet til en transportarm, som passer til et bindingssted i tarmslimhinden, en såkaldt aktiv transportør, kan man måske alligevel få det virksomme stof transporteret over i blodet og dermed opnå den ønskede effekt.

Et stof som indgives gennem munden kan passere tarmslimhinden enten ved passiv eller aktiv transport. Passiv transport kræver, at stoffet har sådanne fysisk-kemiske egenskaber, at det af sig selv trænger gennem tarmslimhinden. Ved aktiv transport er det nødvendigt, at stoffet har en kemisk struktur, der passer til en aktiv transportør som en nøgle i en lås.

Der findes en række aktive transportører, som transporterer stoffer fra føden over i blodbanen. Dette gælder visse stoffer, som er nødvendige for, at kroppen kan fun-

gere optimalt, såsom glucose, aminosyrer og små proteinfragmenter, der kaldes peptider.

Transportør for små peptider

Mange steder i kroppen, men især i tyndtarmen, findes en transportør, som sender små peptider ud i blodet. Transportørens naturlige funktion er at optage di- og tripeptider, som kun består af henholdsvis to og tre aminosyrer. Disse peptider stammer fra fødens proteiner.

Peptiderne har kemiske strukturer, som på nogle områder er meget ens, men som på andre er vidt forskellige. Dette gør, at transportøren ikke er udtalt strukturspecifik, når blot de strukturer, som de små peptider har tilfælles tilnærmelsesvis bevares i molekylet. Det har da også vist sig, at nogle kendte peptidliggende lægemiddelstoffer såsom visse antibiotika, penicilliner og cephalosporiner, transporteres fra tarmen og over i blodet via denne transportør.

Man kan også forestille sig, at transportøren for di- og tripeptider kan benyttes til at fragte lægemiddelstoffer med helt andre strukturer gennem tarmvæggen. Ved at udvik-

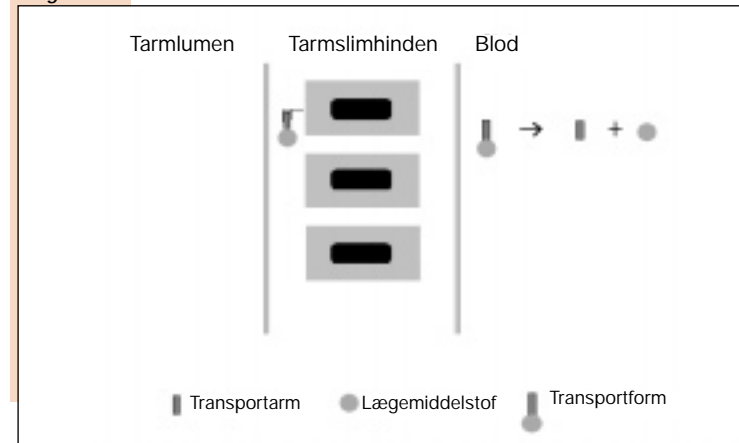
le en transportform (produg) bestående af det oprindelige lægemiddelstof koblet til en transportarm, som er i stand til at binde sig til transportøren, vil man måske kunne få lægemiddelstoffet sendt ud i blodet.

Så længe lægemiddelstoffet er koblet til transportarmen, er det uvrksomt. Det er således hensigten, at transportarmen under eller efter transporten frigiver det oprindelige lægemiddelstof. Det er f.eks. vist, at stoffet valaciclovir, som er en transportform af aciclovir, transporteres fra tarmen og over i blodet via denne transportør. Valaciclovir er registreret under navnet Zelitrex® og anvendes til behandling af herpes.

Transportformer af lægemiddelstoffer

Gruppen arbejder på nuværende tidspunkt med modeltransportformer. Vi koncentrerer primært arbejdet omkring modellægemiddelstoffet benzylalkohol, som kobles til forskellige dipeptider. Dipetiderne er valgt således, at de indeholder en såkaldt ekstra funktionel gruppe, hvortil det er muligt at koble benzylalkohol.

Fig. 1



En transportform binder sig til di- og tripeptidtransportøren på tarmslimhinden. Herved bliver transportarmen sendt over i blodet, hvor lægemiddelstoffet frigives under enzymatisk nedbrydning af transportarmen.

Asparaginsyre eller glutaminsyre indgår som én af aminosyrerne i alle de dipeptider, der anvendes som transportarm for benzylalkohol. Vi anvender stabiliserede dipeptider, hvilket er nødvendigt for at undgå, at der sker enzymatisk nedbrydning af selve transportarmen i mave-tarmkanalen.

D-asparaginsyre-L-alanin er et sådant stabiliseret dipeptid, fordi asparaginsyren anvendes i dens D-konfigurationsform, som er et spejlbillede af den naturlige L-asparaginsyre. De to former er kemisk ens, men har forskellig facon ligesom højre og venstre hånd. Ved at anvende D-formen opnår man, at enzymer i mave-tarmkanalen ikke genkender dipeptidet og dermed ikke nedbryder det til de respektive aminosyrer, hvilket ville være tilfældet, hvis den naturlige L-asparaginsyre havde været anvendt.

Transportøren for små peptider genkender imidlertid stadig dipeptider, hvor den ene aminosyre findes på D-konfigurationsform. Hvis derimod begge aminosyrerne er på D-formen, kan transportøren ikke genkende stoffet. Ved således at anvende D-asparaginsyre-L-alanin med én spejlvendt og én normal aminosyre er det muligt at undgå nedbrydning i mave-tarmkanalen og samtidig bevare transportarmens evne til at binde sig til transportøren.

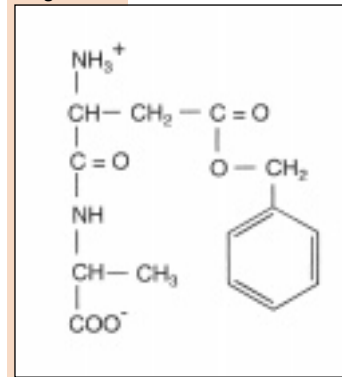
Kobles modellægemiddelstoffet benzylalkohol til den ovenfor beskrevne transportarm D-Asp(OBzl)-Ala opretholdes såvel bindingsevnen samt evnen til at passere tarmslimhinden og komme ud i blodet.

Studier på humane cellekulturer

De ovenfor beskrevne bindings- og transportstudier er udført på cellekulturer stammende fra en human tyktarmscancer, hvilket betyder, at cellerne deler sig hurtigt. Dette er en stor fordel, da man allerede efter ca. tre ugers dyrkning opnår et relativt tæt og homogent cellelag, hvor transportøren er udtrykt. Cellelaget virker som en kunstig tarmslimhinde.

Binding til transportøren måles ved fortrængningsstudier. Man tilsætter her et radioaktivt mærket stof, som man ved binder sig til transportøren, samtidig med det stof man ønsker at undersøge. Herefter vil det stof, man undersøger, helt eller delvist fortrænge det radioaktivt mærkede stof fra bindingsstedet, fordi de to stoffer konkurrerer om det samme bindingssted. Radioaktiviteten vil således være mindre i de prøver, der udover det

Fig. 2



Kemisk struktur af modeltransportarmen D-Asp(OBzl)-Ala. Modellægemiddelstoffet benzylalkohol er koblet til dipeptidet D-Asp-Ala ved en simpel esterbinding.

radioaktivt mærkede stof indeholder et andet stof, som er i stand til at binde sig til transportøren.

Transport over cellelaget måles ved, at tilsætte det stof, man ønsker at undersøge på den side af cellelaget, som svarer til cellernes naturlige tarmside. Derpå måler man, hvor meget stof, der findes på cellelagets anden side. Målingerne viser, hvor meget af stoffet, der har været i stand til at passere den kunstige tarmslimhinde.

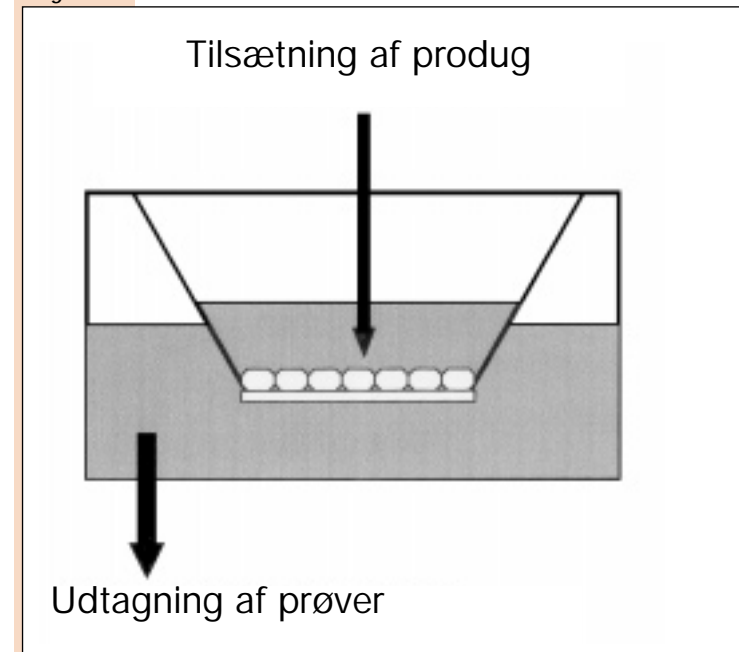
Transportstudier på intakte tarme

I samarbejde med Hans Lennernäs på Uppsala Universitet i Sverige er D-Asp(OBzl)-Ala's binding til transportøren blevet undersøgt på intakt rottertarm.

Resultaterne bekræfter resultaterne udført på cellekulturer. Indgives D-Asp(OBzl)-Ala sammen med markørstoffer, som er i stand til at binde sig til transportøren, mindskes absorptionen af markørstofferne.

Det ser således ud til, at transportøren for di- og tripeptider kan anvendes til at transportere lægemiddelstoffer fra tarmen og over i blodet, når et stabiliseret dipeptid anvendes som transportarm.

Fig. 3



Cellekultur opsat til transportstudier.



Ph.d. Bente Steffansen er lektor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Mitchell E. Taub er forskningsadjunkt ved Institut for Farmaci.

Membraner og transport af lægemidler

Lipidmembraner danner grundstrukturen i cellemembraner og virker samtidig som en transportbarriere for lægemiddelstoffer. Kendskab til lipidmembraners molekylære struktur og dynamik er derfor vigtigt for at forstå, hvorledes lægemiddelstoffer når ud til virkningsstederne. Samtidig kan lipidmembraner og liposomer anvendes til at transportere lægemiddelstoffer til bestemte steder i kroppen.

Af Kent Jørgensen

Lipidmembraner indtager en nøgleposition som et strukturelt og funktionelt grundelement i alle biomembraner. Et eksempel er cellemembraner, der omslutter og afgrænser alle levende celler.

Grundstrukturen i en biomembran udgøres af lipidmolekyler, der danner en dobbeltlagsstruktur, hvor de hydrofile, vandsøgende hoveder på lipiderne vender ud mod vandfasen og de lange hydrofobe, vandskyende fedtsyrekæder udgør membranens indre. Ud over lipidmolekylerne indeholder cellemembraner forskellige proteiner, der blandt andet medvirker ved den aktive stofudveksling mellem cellen og omgivelserne.

Biomembraner har generelt en lav gennemtrængelighed for lægemiddelstoffer. Kendskab til lipidmembraners molekylære struktur og dynamik er vigtigt for at forstå grundlæggende barriereegenskaber af biomembraner. Dertil kommer, at mange lægemiddelstoffer påvirker biomembraners strukturelle og dynamiske opførsel og derved kan udøve en effekt.

Resultater fra den seneste membranforskning, der involverer fysisk-kemiske, farmaceutiske og biologiske discipliner, har vist, at lipidmembraners dynamiske mikrostruktur har afgørende betydning for funktionelle membranegenskaber som f.eks. den passive gennemtrængelighed af lægemiddelstoffer samt for aktivite-

ten af membranassocierede proteiner og enzymer.

Grundlæggende eksperimentelle og teoretiske studier af lipidmembraners mikrostruktur har samtidig frembragt viden og indsigt i vigtige materialeegenskaber af lipidmembraner, som har betydning for udvikling af transportsystemer, der kan bringe lægemiddelstoffer hen til de ønskede virkningssteder i kroppen.

Et eksempel på et lovende transportsystem er liposomer, som er små kugleformede lipidaggregater. Liposomer har potentielle anvendelsesmuligheder som avancerede transportsystemer for vand- og fedtopløselige lægemiddelstoffer, der kan inkorporeres i liposomerne og på den måde være delvist beskyttet mod nedbrydning i blodbanen.

I de senere år har der været forsket intenst i at anvende liposomer til målrettet transport og afgivelse af lægemiddelstoffer til bestemte områder i kroppen. Anvendelse af liposomer som målrettede transportsystemer vil samtidig kunne reducere mange af de bivirkninger, der ofte optræder ved indgift af potente lægemiddelstoffer.

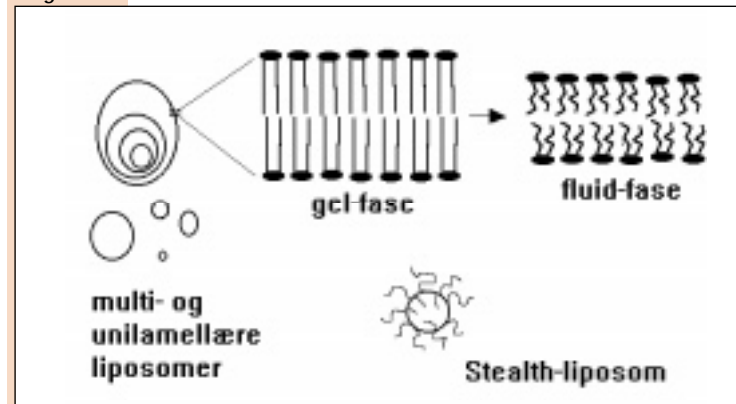
Faseovergange i lipidmembraner

Ved basale studier af lipidmembraners struktur og dynamik anvendes hyppigt liposomer som modelsystemer. Liposomer dannes spontant, når lipidmolekyler blandes med vand. Lipidernes molekylære struktur og de anvendte præparationsmetoder er bestemmende for liposomernes størrelse og antallet af lipiddobbeltslag, som liposomerne er opbygget af.

Lipidmembraner kan undergå adskillige faseovergange, der bl.a. afhænger af lipidernes molekylære struktur og fysisk-kemiske forhold som f.eks. ionstyrke og pH. Den bedst undersøgte faseændring i lipidmembraner er den såkaldte gel-fluid faseovergang, hvor lipidmembranen ændrer sig fra en fast til en flydende struktur. Overgangen er karakteriseret ved, at de lange kæder på lipiderne smelter og ændrer tilstand fra en overvejende ordenet konformation til en uordnet konformation.

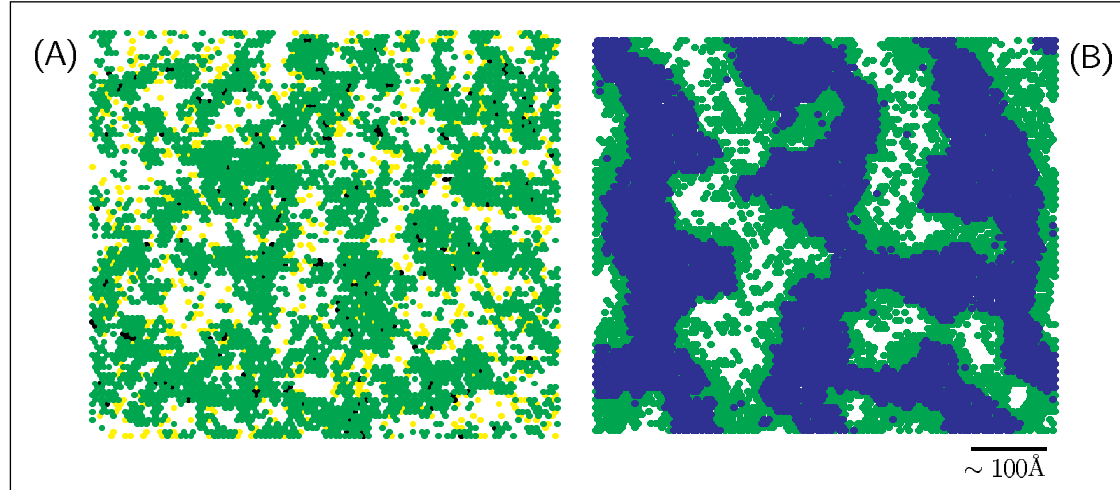
Vigtig indsigt i lipidmembraners kooperative opførsel er fremkommet ved anvendelse af Monte Carlo computersimuleringer af statistisk-

Fig. 1



Liposomer har et potentiale som transportsystemer for lægemiddelstoffer. Til venstre ses en skematisk illustration af små og store liposomer, der kan bestå af et eller flere lipiddobbeltslag. I midten er vist en forstørrelse af lipiddobbeltslaget, der udgøres af fosfolipider. De mørke områder på membranens ydersider er lipidmolekylernes hydrofile hoveder, mens membranens indre består af de lange hydrofobe fedtsyrekæder. Membranen kan undergå en gel-fluid faseovergang som vist øverst til højre. Ved inkorporering af lipopolymerer i membranen beskyttes liposomerne mod nedbrydning i blodet (Stealth-liposomer).

Fig. 2



Monte Carlo computerberegninger af lokalstruktur og lipiddomæner i fosfolipidmembraner. A viser en lipidmembran i ligevægt. B viser en lipidmembran i ligevægt.

mekaniske molekylære modeller. Beregningerne, der giver mulighed for at studere fordelingen af lipiderne i membranen, har afsløret, at faseovergangen mikroskopisk manifesterer sig ved dannelsen af dynamiske lipidstrukturer med en størrelse, der rækker over adskillige molekylære afstande.

Eksistensen af lipiddomæner og differentierede områder i cellemembraner har bl.a. betydning for membranens gennemtrængelighed for lægemiddelstoffer samt for aktiviteten af membranassocierede enzymer og proteiner. Specielt er en sådan struktur-funktionsammenhæng velbeskrevet for enzymet fosfolipase A2, der er et hyppigt forekommende enzym i organismen.

I modelmembraner, der er opbygget af flere forskellige slags lipider, kan en tilsvarende variation i membranstrukturen forekomme som lipiddomæner med en lokal komposition, der er forskellig fra den globale komposition. Påvisning af lokalstruktur i lipidmembraner i den flydende tilstand er af speciel interesse set i relation til de fysiske forhold i biomembraner, der på trods af deres globale flydende karakter alligevel kan have en betydelig grad af lokalstruktur med funktionel betydning.

Studier af fase-separationsdynamikken i lipidmembraner har endvidere været i stand til at afdække en uventet og overraskende langsom tidsskala for vækstprocessen af fase-separerede lipidområder. Dette viser sig ved dannelsen af en membranstruktur, der udgøres af lipiddomæner med en varierende levetid og størrelse. En opdeling af lipidmembranen i afgrænsede områder har indflydelse på fordelingen og

bevægeligheden af f.eks. membranassocierede proteiner og enzymer.

Transport af lægemiddelstoffer

Den forøgede indsigt i lipidmembraners mikroskopiske struktur, der er fremkommet fra teoretiske og eksperimentelle modelstudier, har bidraget til en bedre forståelse af funktionelle og strukturelle forhold i biomembraner. Sideløbende hermed er der opnået øget indsigt i vigtige materialeegenskaber af lipidmembraner, der har betydning for en rationel udvikling af liposomer som målrettede transportsystemer for lægemiddelstoffer.

Et eksempel på en vellykket forsknings- og udviklingsstrategi hentet fra den internationale forskningsverden er overfladefordicerede liposomer med små mængder polymerlipider indbygget i membranen. Sådanne stabiliserede Stealth-liposomer, der nu markedsføres som transportsystemer for lægemiddelstoffer, udviser både en forøget stabilitet i blodet og en forbedret evne til at bringe medicinen hen til det ønskede virkningssted.

Fremtidige undersøgelser af modelmembraner med stigende grad af kompleksitet må forventes at give dybere indsigt i lipidmembraners strukturelle og funktionelle egenskaber. En forøget klarlægning af de mikroskopiske forhold i lipidmembraner er en forudsætning for en bedre forståelse af lipidmembraners funktionelle rolle i biologiske systemer. Sideløbende hermed åbnes der op for en rationel måde at designe liposomer med nye og forbedrede egenskaber, der kan bruges som målrettede transportsystemer for lægemiddelstoffer.



Ph.d. Kent Jørgensen er lektor ved Institut for Farmaci.

Fra lakridsrod til lægemiddel

Der er hårdt brug for nye lægemidler mod parasitære sygdomme som malaria og leishmaniasis. Lakridsrod indeholder et stof, som kan dræbe parasitter, men som også frygtes at være svagt kræftfremkaldende. Computerberegninger bruges nu til at undersøge, hvordan stoffets struktur kan ændres, så bivirkningen elimineres og den helbredende effekt forstærkes.

Af Søren Brøgger Christensen, Simon F. Nielsen og Tommy Liljefors.

Mange naturstoffer har spændende medicinske egenskaber, men nøjere undersøgelser afslører ofte, at de samme stoffer besidder en række uheldige bivirkninger, der gør dem uegnede som lægemidler. Ændring af naturstoffernes struktur kan i nogle tilfælde føre til forbindelser, hvor stoffets favorable egenskaber er fremmet på bekostning af de uønskede. Uheldigvis findes der ingen sikker metode til at forudsige, hvorledes de ønskede egenskaber kan fremmes, men nye computerbaserede statistiske metoder kan anvendes som et værktøj for at lette denne proces.

Vi har anvendt computerberegninger til at undersøge et stof fra lakridsrod, som kan helbrede mus for infektionssygdomme forårsaget af parasitter. Uheldigvis er der en risiko for, at stoffet måske kan fremkalde kræft, og derfor kan det ikke bruges til at behandle parasitære sygdomme hos mennesker. Computermodeellen peger på, hvordan stoffet kan ændres, så det bliver egnet som lægemiddel.

Der er hårdt brug for nye lægemidler mod sygdomme forvoldt af parasitter, fordi mange af de sygdomsfremkaldende parasitter er blevet resistente overfor de eksisterende former for medicin. Alene malaria dræber hvert år over to millioner mennesker.

Biologisk aktive plantestoffer
Planteindholdsstoffer inddeles traditionelt i primære metabolitter og sekundære metabolitter. Karakteristisk for de primære metabolitter er, at de er fælles for et bredt udsnit af levende organismer, og at det er simpelt at forklare deres betydning for organismens livsfunktioner; et eksempel er druesukker. De sekundære metabolitter findes kun i ganske få, oftest nært beslægtede organismer, og deres betydning for organismen er ikke umiddelbart indlysende.

Alle naturstoffer, der er anvendt eller stadig anvendes som lægemidler, tilhører gruppen af sekundære metabolitter. Flere af dem virker særdeles stærkt, hvilket gør det problematisk at benytte den rå eller tørrede plante som lægemiddel. I mange tilfælde svinger mængden af sekundære metabolitter nemlig stærkt med plantens udviklingsstrin.

Såfremt en plante anvendes på grund af tilstedeværelsen af et stærktvirkende stof, er det et problem for en behandling, hvis stoffet i nogle præparationer findes i stor mængde, mens det stort set ikke er tilstede i andre.

Tidligere blev mange patienter med hjerteproblemer behandlet med tørrede digitalisblade. Da indholdet af de aktive metabolitter i disse blade svinger en del, blev hver enkelt præparation af bladene derfor styrkebestemt ved at måle den dosis, der kunne dræbe et marsvin. Problemet kan løses ved at renfremstille de aktive indholdsstoffer. I dag benyttes de aktive indholdsstoffer, der stadig isoleres fra digitalisblade. Den ønskede dosis kan så simpelt afvejes.

Udvikling af lægemidler
Mange naturstoffer har gennem tiden været brugt som lægemidler, og en række stoffer anvendes stadig. Der er dog i nogle tilfælde konstateret uheldige bivirkninger. Således kan kinin, der anvendes som behandling af malaria give uheldige skader i centralnervesystemet. Med udgangspunkt i kinin har man

så ved mere eller mindre systematiske variationer af stoffets struktur formået at fremstille en beslægtet forbindelse, der ikke besidder denne uheldige bivirkning, men stadig kan bekæmpe malariaparasitten.

Der er gennem de senere år udviklet metoder, som gør det muligt at afprøve planteekstrakter for spændende egenskaber. Disse metoder er baseret på reagensglasforsøg med cellekulturer og kræver således ikke anvendelse af levende forsøgsdyr. Da metoderne både er hurtige og effektive, kan et stort antal planteekstrakter afprøves, og de interessante ekstrakter udpeges. Samtidig kan de aktive indholdsstoffer isoleres og karakteriseres.

Denne udvikling har medført en stigende interesse for at anvende planter som udgangspunkt for udvikling af lægemidler. Det fascinerende ved denne metode er, at det ikke på forhånd kan forudsiges, hvilken type naturstoffer, der viser sig at være de aktive indholdsstoffer. Metoden kan derfor lede til helt uventede og interessante resultater.

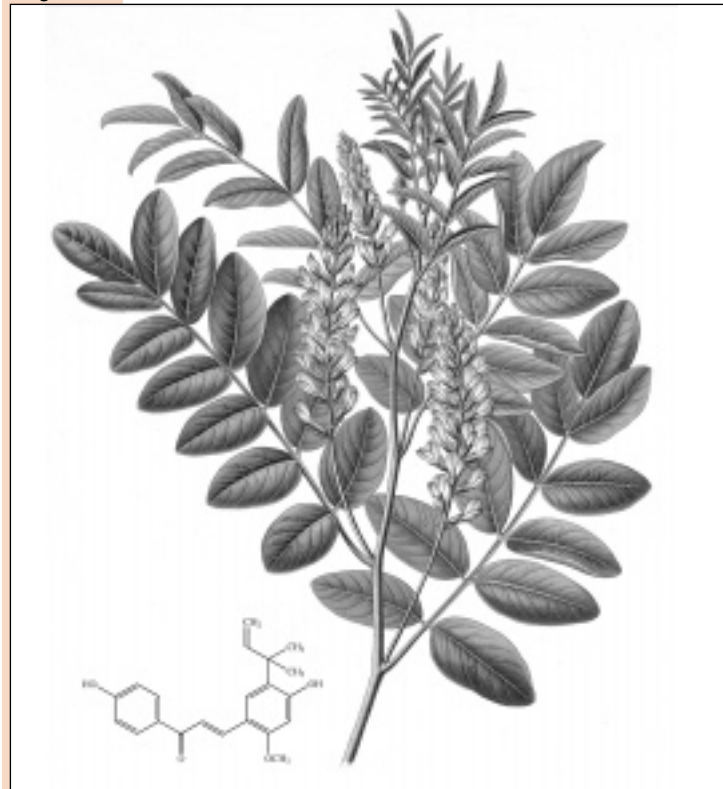
Medicin fra lakridsrod

For nogle år siden gennemførte vort institut i samarbejde med forskere på Rigshospitalet og Panuminstituttet en sådan undersøgelse af kinesisk lakridsrod. Det var allerede på det tidspunkt kendt, at lakridsroden indeholdt forbindelsen licochalcon A, men studiet viste overraskende, at dette stof var i stand til at dræbe såvel malaria- som leishmaniaparasitter.

For at afklare, om stoffet kunne anvendes som lægemiddel til mennesker, blev det underkastet en række forsøg med forskellige cellekulturer. Et af eksperimenterne viste, at stoffet kunne fremkalde forandringer i nogle cellers arvemasse. Det må derfor frygtes, at licochalcon A kan fremkalde kræft i mennesker eller dyr.

Selv om den anvendte testprocedure er meget følsom, og det derfor kan vise sig, at forbindelsen i realiteten ikke er kræftfremkaldende, blev det alligevel besluttet at undersøge,

Fig. 1



Lakridsrod indeholder stoffet licochalcon A, som kan nedkæmpe parasitter. Stoffets kemiske formel er vist nederst til venstre.

om det var muligt at ændre stoffets struktur. Målet var at fjerne bivirkningen og øge stoffets dræbende effekt på parasitterne. Da sygdomme fremkaldt af parasitter er infektionssygdomme, er det samtidig væsentligt, at lægemidlet ikke hæmmer immunsystemet.

På baggrund af overvejelser af denne type blev det besluttet at belyse, hvorledes stoffets struktur kunne ændres, så det kunne opfylde disse kriterier. Vi valgte her at gennemføre en såkaldt 3-Dimensionel Kvantitativ Struktur Aktivitets Relations analyse (3D-QSAR). Metoden omfatter tre trin: design af relevante stoffer, fremstilling og afprøvning af

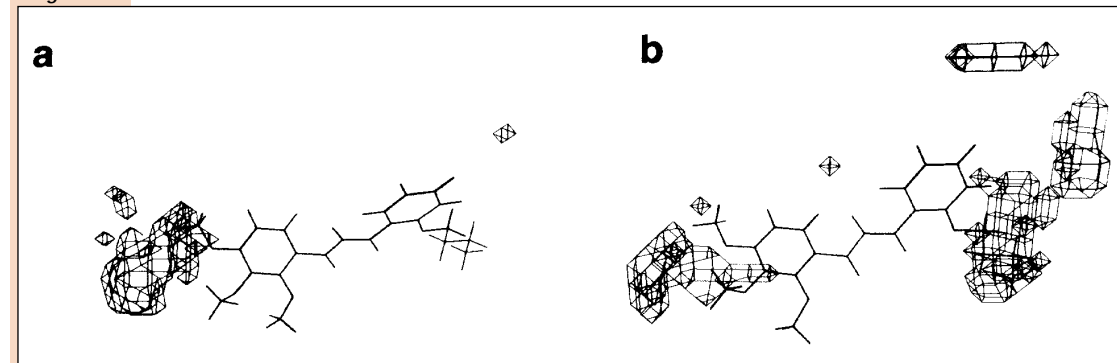
disse stoffer samt selve QSAR-analysen.

I dette tilfælde blev stofferne valgt ved et statistisk eksperimentelt design for at sikre så stor en variation som muligt i deres egenskaber. Denne computerbaserede regneteknik gør det muligt at designe et begrænset antal stoffer og samtidig sikre at et bredt udsnit af stofgruppens egenskaber bliver afprøvet. Selv om mange variable ændres på én gang, er regneteknikken i stand til at belyse de enkelte komponenters betydning. På basis af analysen blev ca. 100 stoffer fremstillet og den koncentration (IC₅₀), der medfører en halvering af parasitternes

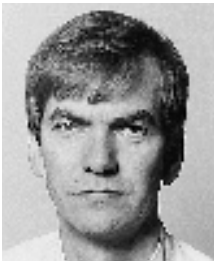
og lymfocytters evne til at formere sig blev målt. Lymfocytter er en type hvide blodlegemer, der indgår i immunsystemet.

I den følgende 3D-QSAR analyse blev stoffernes kemiske egenskaber, der blev repræsenteret ved nogle talværdier, ved statistiske metoder sammenholdt med den biologiske aktivitet (IC₅₀). For en trænet person er det ud fra denne model muligt at se, hvorledes ændringer af opbygningen af molekylet vil påvirke den biologiske aktivitet. Det næste skridt bliver så at fremstille de forbindelser, som denne model peger på, og undersøge om de virkelig er bedre end udgangsstoffet.

Fig. 2



Figuren viser et tredimensionelt billede af en chalcone omgivet af konturer af områder. Disse områder er beregnet ved hjælp af 3D-QSAR. Såfremt chalconen påsættes en kemisk gruppe, der okkuperer disse områder forudsiger modellen, at den pågældende forbindelse vil have mindre aktivitet over for parasitter (a) samt lymfocytter (b). En tilsvarende tredimensionel model, der viser de områder, som forøger stoffernes aktivitet, er også blevet beregnet. Den store forskel mellem områdernes placering og omfang i henholdsvis a og b tyder på, at det er muligt at fremstille en forbindelse med høj aktivitet over for parasitterne og ringe effekt på lymfocytterne og dermed på immunforsvaret.



Lic.pharm. Søren Brøgger Christensen er docent ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Simon F. Nielsen har været ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi i perioden 1994 til 1997.



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

Børn skal informeres om deres lægemidler

Når børn får medicin, skal de informeres om lægemidlerne på en måde, der er passer til deres alder og udviklingstrin. Det er ikke nok, at forældrene får besked. God oplysning fremmer behandlingen og gør det lettere for kronisk syge børn at leve med deres sygdom.

Af Anna Birna Almarsdóttir

I dette årti er børn og unge kommet mere i fokus som lægemiddelbrugere. Især kronisk syge børn og unge har fået større opmærksomhed i kraft af, at de er i stand til – til dels – at afgøre om deres behandling er effektiv. Livlig forskning og udnyttelse af resultaterne er fulgt i kølvandet af den voksende interesse for emnet.

Netop børns opfattelse af sygdomme og lægemidler var emnet for min ph.d.-afhandling, som jeg forsvarede i 1994 fra University of North Carolina, School of Public Health. Afhandlingen udsprang af et samarbejde jeg havde med forskere i USA og Europa omkring børns lægemiddelforbrug. Samarbejdet var finansieret af EU's BIOMED program, som på det tidspunkt hed COMAC.

Problemformuleringen i hele det europæiske projekt var: Hvad er børns oplevelser og tanker omkring sygdomme og brug af lægemidler i forskellige europæiske lande og USA? Formålet var at oplyse praktikere og politikere om, hvad børn ved og tror om lægemidler, og dermed sætte barnet som bruger i centrum.

COMAC projektet var banebrydende med hensyn til formålet, sammensætningen af forskergruppen og brugen af metoder. Forskerne kom fra ni lande og fra vidt forskellige discipliner. Antropologer, farmaceuter, læger, lærere og psykologer arbejdede tæt sammen i et relativt nyt forskningsfelt.

Børns opfattelse af lægemidler

Min egen afhandling fokuserede på børn i 7 og 10 års alderen. De blev rekrutteret fra middelklassen i North Carolina. Metoderne bestod af kvalitative interviews og kvantitative spørgeskemaer samt skalaer. Skalaer består af standardiserede spørgsmål, hvor svarene giver et antal point. Resultatet er et tal, som udgør et mål for, hvor god eller dårlig den adspurgte mener, at en behandling er. De anvendte skalaer stammede fra Children's Health Promotion, et forskningscenter ved Georgetown University.

Ved de kvalitative interviews blev børnene bedt om at tegne et billede af den sidste gang, de var syge. Spørgsmålene blev så stillet ud fra tegningens indhold. Hændelser, følelser og tanker i relation til sygdom og lægemiddelanvendelse blev derpå analyseret.

Hvad tænker børn om lægemidler? Et kortfattet svar fra min afhandling kunne lyde, at de ikke tænker ret meget på lægemidler. I deres tegninger forekom lægemidler kun undtagelsesvis, og forskerne blev nødt til at spørge direkte til medicinforbrug i næsten alle tilfælde. Det afspejler, at børn ikke er særlig autonome i deres beslutninger omkring sygdom; afgørelserne

træffes af lægerne og børnenes forældre.

Der var – ikke overraskende – forskelle mellem 7 og 10 årige i deres måde at omtale lægemidler på. Syvårige var tilbøjelige til at mene, at lægemidler var gavnlige, mens 10 årige var mere neutrale i deres holdning. Den yngre gruppe beskrev lægemidlerne generelt i farver og smag, mens de ældre omtalte dem på en mere voksen manér. De brugte ofte medicinnavne eller betegnelser som f.eks. hostemiddel.

Internationale sammenligninger blev udført af andre forskere i COMAC projektet. De viste bl.a., at børn i de fleste samfund synes, at lægemidler er et vigtigt led i terapien, selv om de ikke uopfordret omtalte dem i interviewene. Alle rapporter fra de europæiske lande, men ikke den amerikanske, pegede på, at børnene havde gjort sig tanker om negative eller farlige sider af lægemiddelterapien.

Fokus på astmaskoler

Samarbejdet fra COMAC projektet fortsætter nu i et europæisk BIOMED projekt, som består af tre delområder. Det første er en kortlægning af astmatiske børns opfattelser og forståelse af deres sygdom og lægemidler i hverdagen. I den anden del ind-

Fig. 2



En 7-årig dreng med skoldkopper og hans mor. Han ligger i et havregrynbad, som han siger hjælper ham med at blive af med skoldkopperne.

samles undervisningsmaterialer om astma; i Danmark stammer de især fra læger og apoteker samt fra Astma og AllergiForbundet. Derefter beskrives materialerne kvalitativt med henblik på at afklare, om deres indhold, svarhedsgrad og billedvalg gør dem velegnede til børn. I den sidste del af projektet studeres brugen af undervisningsmaterialerne for at undersøge, hvordan børn ønsker at blive undervist om astma og lægemiddelanvendelse.

Den danske projektgruppe består af undertegnede og antropolog Sussi Skov Jensen fra DSI – Institut for Sundhedsvæsen. Vi har fokuseret på astmaskolerne i Danmark og især på astmaskolen i Odense, der startede i 1991 som den første her i landet. Skolen er for børn og unge i alderen 6-18 år, og kurserne foregår to dage om ugen i et forløb over seks uger. Børnene henvises typisk til skolen af praktiserende læger.

Odenseskolen har vist meget lovende kliniske resultater. Kort fortalt har undervisningen medført, at børnene har det bedre i dagligdagen. Vi har anvendt en kvalitativ metode, observation, til at forstå, hvorfor skolen har opnået så gode resultater. Her lyttes der til, hvad der bliver sagt, hvordan det siges, og de involveredes kropsprog studeres.

Observationerne tyder på, at det er vigtigt at tilpasse informationsmateriale og undervisningsmåden til aldersgrupperne. Personalet på Odenseskolen og især sygeplejersken Betty Østergaard har anvist en god måde at kommunikere med børn og unge. Når der er tale om små børn, sætter hun sig på gulvet med dem, får børnene til at fortælle og bidrager selv med de relevante oplysninger under samtalen. Når det drejer sig om unge, taler hun til dem som voksne.

For fremtidige astmaskoler og andre programmer, der fokuserer på kronisk syge børn, er det nødvendigt at kunne kommunikere effektivt. Erfaringerne fra Odense er bl.a. relevante for den nye astmaskole, som er startet i København.

31% af de adspurgte angiver at have indtaget smertestillende medicin inden for de sidste 14 dage. Forbruget var størst hos de unge kvinder.

I begyndelsen af 1997 holdt amtet en temadag om emnet. Jeg blev inviteret til at fortælle om resultater af forskning omkring børn og unges brug af lægemidler som forberedelse til debatgrupper om, hvorvidt dette var et problem, som skulle behandles af sundhedsmyndighederne og i så fald, hvilken indsats amtet kunne gøre for at fremme et rationelt forbrug af smertestillende medicin.

Der er siden blevet fremlagt en række konkrete initiativer for at mindske de unges forbrug af smertestillende medicin. Et af forslagene er aldersdifferentieret oplysning i de enkelte skolars sundhedsundervisning. Målet er at forandre de unges holdning til det at anvende smertestillende medicin. Et andet er oplysning og holdningsbearbejdning i forhold til forældre samt lærere og andet personale på de skoler, der udleverer smertestillende medicin. Andre muligheder er bedre diagnosticering hos de praktiserende læger og forbud imod reklamer for smertestillende medicin.

Betty Østergaard kommunikerer livligt med den yngre gruppe børn på Astmaskolen i Odense.

Fig. 3



Cand.pharm., ph.d. Anna Birna Almarsdóttir er adjunkt ved Institut for Samfundsfarmaci.

Fig. 1



En 10-årig pige med influenza og hendes mor. Pigen siger, at hun er imod at tage lægemidler.

De samfundsmæssige omkostninger ved afhængighed af psykofarmaka

Flere hundrede tusinde danskere får ordineret psykofarmaka, typisk nerve- og sovemedicin. Et ukendt antal bliver afhængige af medicinen. Hvad koster det samfundet? Beløbet kan ikke opgøres i dag. Men en kortlægning af udgifterne vil være et skridt i retning af at spare ressourcer og forbedre mange menneskers livskvalitet.

Af Marlene Gyldmark og Ebba Holme Hansen

For et par år siden blev vi kontaktet af et canadisk regeringsorgan, som bad os om at skrive en rapport om de samfundsmæssige omkostninger ved misbrug af psykofarmaka. Vi påtog os med glæde opgaven, da der her var en mulighed for at kombinere vor forskningsmæssige baggrund inden for såvel psykofarmaka som sundhedsøkonomi.

Vi aftalte at lave en kritisk vurdering af den eksisterende litteratur på området og at opstille retningslinier for fremtidige analyser. Det viste sig snart, at planerne var vanskelige at realisere. En omfattende litteratursøgning i internationale databaser opsporede ikke en eneste publiceret undersøgelse af omkostningerne ved misbrug af psykofarmaka.

Herefter var vi overladt til selv at forsøge at opstille et regnestykke. Ved en samfundsmæssig analyse er det nødvendigt at identificere samtlige konsekvenser af misbrug af psykofarmaka. Men det betyder, at vi må kunne definere både "psykofarmaka" og "misbrug". Som det vil fremgå, er dette ikke uden problemer, og det er endnu sværere at kvantificere omfanget af misbruget.

Psykofarmaka og afhængighed
Anvendelsen og udbredelsen af psykofarmaka er kultur- og tidsbestemt.

Særligt i de seneste årtier har man set en meget stor udskiftning af det registrerede sortiment af psykofarmakapreparater.

Mange af de lægemidler, som har været anvendt til behandling af depression, angst og søvnløshed, er blevet markedsført som værende "uden risiko for afhængighed". Men senere har man så opdaget, at virkeligheden var anderledes. Reglen har været, at et nyt lægemiddel herefter har overtaget markedet.

Afhængighed, vanedannelse, overforbrug, misbrug... et stort vokabularium betegner de uønskede virkninger ved behandling med nervemedicin og sovemedicin, men begreberne er ikke veldefinerede. For tiden anbefaler WHO primært at bruge betegnelsen "afhængighed" i relation til psykofarmaka. Men også her skifter definitionerne ved hver ny udgave af de diagnostiske kriterier.

Mange brugere udtrykker imidlertid afhængigheden ganske enkelt på følgende måde: "Jeg er ikke i stand til at kontrollere pillerne – pillerne kontrollerer mit liv."

Ingen viden om problemets omfang

Når afhængighed er vanskeligt at definere, er det selvfølgelig også vanskeligt at måle. Vi må derfor også konstatere, at der hverken i Danmark eller udlandet findes præcise og pålidelige data om omfanget af afhængighed og misbrug af psykofarmaka. En direkte opgørelse vil bestå i en undersøgelse af hvor mange, der falder ind under definitionen "afhængige". Men diag-

Ingen ved i dag, hvor mange danskere, der er afhængige af nervemedicin og sovemedicin.

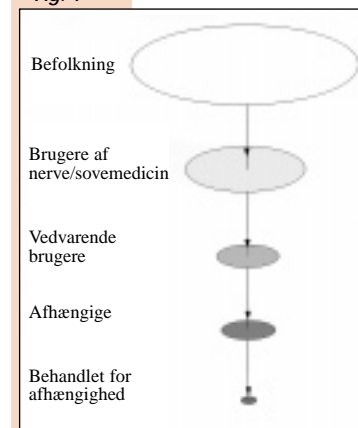
nosen kan ikke stilles ved almindelige kliniske undersøgelser eller i f.eks. telefoninterviews, og man kan derfor højst tilnærme sig problemets omfang igennem indikatorer og indirekte mål.

Såfremt kun ét mål skal vælges som indikator, må det blive varighed af kontinuert brug. Vi må regne med, at dagligt forbrug af nervemedicin af typen benzodiazepiner ud over et år med stor sandsynlighed vil føre til afhængighed som kan give abstinenssymptomer ved ophør. Det samlede antal modtagere af ordinationer på benzodiazepiner i Danmark var i 1995 et sted mellem 350.000 og 600.000. Hvor mange af disse, der er langtidsbrugere, vides endnu ikke.

Samfundsmæssige omkostninger

Cost-of-illness er den metode, man oftest har anvendt til at beregne de samfundsmæssige konsekvenser af misbrug. Metoden består i at opregne samtlige tænkelige omkostninger og ressourceforbrug ved den givne tilstand. Hver komponent tilregnes en værdi, og totalen forventes så at repræsentere den samlede byrde for samfundet.

Fig. 1



Men metoden har flere problemer. Nogle gange kan det være svært at bestemme, hvad der egentlig er en omkostning. Det samlede beløb repræsenterer desuden et mix af bærere af omkostninger, hvoraf nogle aldrig vil blive realiseret i form af egentlige værdier, såfremt problemet forsvandt. At tale om byrden for samfundet er derfor nogle gange misvisende.

Vil man undersøge de samfundsmæssige omkostninger af afhængighed og misbrug af psykofarmaka, bør man stille følgende spørgsmål: Hvad koster det ud fra en samfundsmæssig synsvinkel at behandle og reducere afhængighed? Hvad er effekten? Hvilke alternative metoder er anvendelige? Hvad er disse metoders omkostninger og effekter? Hvad er prisen for at gøre ingenting? Metoden til at besvare denne type spørgsmål hedder Cost-effectiveness analyse.

Det næste spørgsmål er: Er den ene fordeling af ressourcer bedre end den anden? Bliver de, som bliver bedre stillet ved et nyt tiltag, så meget bedre stillet, at det kan betale sig at gennemføre det? Eller er omkostningerne for store? Denne type økonomisk analyse kaldes en Cost-benefit analyse. Heller ikke denne type analyse har været udført inden for psykofarmakaområdet.

Ressourceforbrug ved afhængighed

Afhængighed af psykofarmaka tæller på mange forskellige ressourcer:

- * Det offentlige sundhedsvæsen; herunder sygehussektoren, den primære sektor, information og medicin.
- * Andre offentlige instanser; herunder sociale ydelser, der dækker patienter, som vil ophøre forbrug, patienter som ikke vil ophøre samt patienter med illegalt forbrug.
- * Retslige instanser; herunder retshjælp og omkostninger ved svindel og illegalt forbrug.
- * Den private sektor; herunder private klinikker.
- * Frivillig hjælp; herunder hjælp og behandling fra organisationer.
- * Omkostninger ved uheld og ulykker; herunder ulykker i trafikken, på arbejde og i fritiden samt for tidlig død.
- * Ikke-institutions hjælp; herunder støtte, hjælp, behandling, pleje fra familie og venner samt omkostninger for familie og venner i form af humøreffekter etc.

Peters erfaringer – en case

Da Peter arbejdede på skiftehold og samtidigt byggede sit eget hus, fik han problemer med maven og følte sig ofte stresset. Han gik til bedriftslægen, som ordinerede Librium. Han skulle tage medicinen efter behov.

"Jeg opdagede hurtigt, at jeg ikke kunne undvære pillerne. De var altid med i lommen. Nogle gange blev det tre om dagen, nogle gange blev det seks tabletter".

Sådan gik det i ti år. Peter vidste, at han var afhængig af tabletterne, men han talte ikke med andre om det. Hjertet slog uregelmæssigt og hurtigt. Da han opsøgte en hjertespecialist, fortalte lægen, at han var nødt til at have en hjerteklapoperation. Lægen skrev en recept på oxazepam. Peter tog for givet, at det var hjertemedicin.

"Nu tog jeg tre typer benzodiazepiner samt tabletter mod sur mave. Jeg syntes fra starten, at oxazepam virkede fantastisk godt. Men snart begyndte jeg at mærke uro, når medicinen ikke længere var i kroppen. Der måtte være noget galt".

Peter ville holde op med det samme. Men da han stod i kø til en hjerteoperation, fortsatte han. I 14 måneder ventede han på at

blive opereret. Dagen efter operationen sluttede han helt med den beroligende medicin.

"Men jeg blev forbandet dårlig. Jeg kunne af og til slet ikke stå på fødderne. Når jeg lå i sengen, troede jeg, at loft og vægge ville falde ned. Jeg var bange for at gå ud. I butikker vovede jeg mig slet ikke".

Peter tog kontakt med en patientorganisation, som sendte noget materiale om, hvordan man trapper benzodiazepiner ned og hvilke abstinenser, man kan få.

"Det materiale reddede mit liv. Men efter et halvt års nedtrapning blev jeg endnu dårligere og måtte indlægges på en medicinsk afdeling. Jeg var voldsomt forgiftet. Det skreg i kroppen. Jeg mærkede et stærkt sug efter tabletterne. Jeg måtte være forfærdelig forsigtig og kun fjerne en kvart tablet om ugen".

Peter var på hospitalet i seks uger, hvor sygeplejerskerne tålmodigt hjalp ham.

"Jeg manglede selvtillid. Jeg troede ikke, benene kunne bære mig. Men fysioterapeuterne var stædige. Bid for bid trænede de med mig, jeg fik selvfølelsen tilbage og klarede til sidst at gå rundt".

To år efter hjerteoperation og nedtrapning begyndte Peter på halvtidsarbejde.

Beretningen er fra "Till priset av vad", KILEN, 1996

- * Private omkostninger; herunder udgifter til den afhængigheds-skabende medicin, behandling af bivirkninger og behandling af patienter, som ønsker at holde op. Desuden konsekvenser som ensomhed, depression, selvmordstanker og mistet selv-værdifølelse.
- * Indirekte omkostninger; herunder omkostninger for samfundet pga. mistet produktion.

Der er store vanskeligheder med at indhente den nødvendige information, og beregning af de samfundsmæssige omkostninger af afhængighed af psykofarmaka er således ikke mulig i dag. Men det vil være nyttigt at kortlægge de direkte udgifter for at give et skønsmæssigt indtryk af, hvilke ressourcer afhængigheden koster samfundet. En sådan beregning kan ses som et skridt på vejen til at gøre noget ved problemet.

Direkte omkostninger ved medicinafhængighed

Fig. 2

| Fordeling af årlige udgifter på aktører: | | |
|--|--------------------|-------------------|
| | Afhængigheds-tiden | Aftrapnings-tiden |
| Patient | 14.033 | 40.155 |
| Arbejdsgiver | 180.630 | 182.502 |
| Sygesikring | 43.495 | 95.462 |
| Sygehus og specialistbehandling | 120.272 | 216.500 |
| Kommune | - | 36.000 |
| I alt | 358.430 | 516.619 |



Cand.polit., ph.d. Marlene Gyldmark er ekstern lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.



Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor ved Institut for Samfundsfarmaci.

Økotoksikologiske tests påviser hormoneffekter

Forurening med kemiske stoffer med hormonlignende effekter mistænkes for at være skyld i faldende sæd kvalitet hos mænd. Desuden skader stofferne en række dyr. Nye økotoksikologiske tests kan identificere kemikalier, som har hormonlignende virkninger på levende organismer.

Af Bent Halling-Sørensen, Henrik Rasmus Andersen, Søren Nors Nielsen, Sven Erik Jørgensen og Steen Honoré Hansen

Kemiske stoffer, der virker som hormoner – især som det kvindelige kønshormon østrogen – er udbredt i miljøet og findes også i forskellige fødevarer. Stofferne kan skade reproduktionen hos en række dyrearter, og kemikalierne mistænkes ligeledes for at være skadelige for mennesker.

Mistanken skyldes især, at der gennem de seneste halvtreds år er sket en generel nedsættelse af mænds fertilitet på grund af et markant fald i antallet af sædceller. Et andet foruroligende tegn er, at hypogonadismen af testikelkræft er øget. Samtidig rammes flere og flere drenge af mangelfuld nedsynkning af testiklerne til pungen eller mangelfuldt anlæg af kønsorganerne.

Forskere verden over har derfor sat fokus på, om der er en sammenhæng mellem disse effekter og udsendelsen af en række kemiske stoffer til miljøet. Man har her påvist, at disse stoffer kan efterligne hormoners biologiske aktivitet, specielt virkningerne af det kvindelige kønshormon østrogen.

I dag er der identificeret 25-30 naturlige og syntetiske stoffer med østrogenlignende virkning. Velkendte eksempler er insektgiften DDT og PCB, der tidligere har været anvendt i plast. Derudover gælder det enkelte insektgifte, ukrudtsmidler, forbrændingsprodukter, blødgørere fra

plastindustrien og nedbrydningsprodukter fra grænsefladeaktive stoffer i rensningsmidler. Alle disse kemikalier har vist sig at have en bemærkelsesværdig dårlig nedbrydelighed samt en stor evne til at kunne ophobes i vores fødekæder.

Ingen af stofferne ligner i kemisk struktur hormoner, hvorfor man for øjeblikket ikke kan forudsige, hvorvidt et stof har en hormonlignende effekt ved analyser af dets struktur. Derfor er der i høj grad brug for økotoksikologiske tests, som kan vise, hvordan stofferne påvirker levende organismer.

Mange stoffer med hormonvirkning

De vigtigste grupper af stoffer med hormonlignende virkninger er:

- * **Alkylphenol polyethoxylater (APEs)**, der anvendes som grænsefladeaktive stoffer i rensningsmidler, i maling, som olieadditiver, samt som antioxidant i plastvarer. Den globale produktion er på ca. 360.000 tons årligt, og i Danmark forbruges der ca. 2400 tons årligt. Stofferne er vandopløselige og ret akkumulerbare. I spildevandsslam nedbrydes polyethoxylatkæden bakterielt under iltholdige forhold til alkylphenoler eller alkylphenol carboxylsyre. Ved en videre stabilisering af slammet sker der en yderligere anaerob nedbrydning af stofferne til diverse alkylphe-

noler. Alle disse nedbrydningsprodukter bioakkumuleres let i slammet samt i fødekæderne og mistænkes for at udvise den hormonlignende effekt.

- * **Bisphenol-A (BPA)** anvendes i produktionen af polykarbonatresiner, der bruges i plastprodukter. BPA's virkningsmekanisme beror på, at det kan fjerne naturligt østrogen fra dets receptorer på cellerne. BPA virker østrogen ned til meget lave koncentrationer.
- * **Phthalater** anvendes primært som blødgørende midler ved fremstillingen af plast, især PVC. Phthalater kan frigives til omgivelserne ved for eksempel at vandre fra plastemballage til fede fødevarer som ost, mælkeprodukter og kød. I Norge er phthalatet DEHP påvist i råmælk, skummetmælk og fløde. Det daglige humane indtag af phthalater anslås til at ligge på 10-30 mg. Ved spildevandsbehandling fjernes hovedparten af phthalaterne fra vandet. Ikke desto mindre er der i USA fundet phthalater i vandmiljøet.
- * **Tributyltin (TBT)** bruges som svampedræber i træbeskyttelse og har indtil fornyligt været anvendt i stor mængde i skibsmaling for at hæmme væksten af alger og orme på skibssider. Stoffets udbredelse har betydet, at der i områder med kraftig

skibstrafik er konstateret pseudohermafroditisme hos sneglearten *Nucella lima*, idet der er en nøje sammenhæng imellem tinindholdet og graden af pseudohermafroditisme. TBT er svært opløseligt, og har hormonvirkning ved meget lave koncentrationer.

Mangel på test på levende dyr

I dag er der kun udviklet meget få screeningstests, der kan detektere miljøfremmede stoffers hormonlignende effekt. Dertil kommer, at de fleste af disse tests er baseret på celtekulturer og ikke på levende organismer.

Der findes kun én test på dyr, nemlig på regnbueørred. Her måles et øget niveau af fiskeproteinet vitellogenin, som produceres i leveren ved østrogen stimulering. Proteinet føres med blodet til æggestokkene, hvor det optages i de voksne æg. Både hanfisk og hunfisk har genetisk anlæg for dannelse af vitellogenin. Da hannen dels ikke har nævneværdig østrogenproduktion, dels ikke kan fjerne vitellogenin fra blodet på grund af manglende æggestokke, kan et vitellogenin indhold i hanfisk tages som udtryk for en udefra kommende østrogen påvirkning.

Ny test på krebsdyr

Miljøkemigruppen på DFH er sammen med forskere på Danmarks Tekniske Universitet (DTU) i gang med at udvikle en økotoksikologisk screeningstest på zooplankton krebsdyret *Acartia tonsa* (projektet er finansieret af det strategiske miljøforskningsprogram), der er almindeligt forekommende i indre danske farvande. Testen måler virkningen af østrogenlignende stoffer på krebsdyrets reproduktion. Der er brug for screeningsmetoder, der kan udføres hurtigt. *Acartia tonsa* er her interessant på grund af en kort livscyklus på ca. tre uger.

Krebsdyrets kønnede formering styres af en kompliceret hormonal stimulation. Derfor arbejder vi med en meget simplificeret hypotese; nemlig at det er muligt at påvirke reproduktionen ved at tilføre naturligt østrogen eller stoffer med hormonlignende egenskaber. Denne påvirkning kan resultere i målelige faktorer såsom stimulering til tidligere modenhed til at lægge æg, øget ægproduktion, faldende larveudvikling eller ændring af livsstadietiden.

Ved 20 grader Celsius begynder krebsdyret normalt at lægge æg på

den niende dag efter dets fødsel. Her lægges meget få æg, men antallet forøges på tiende og elvte dag, for så igen at klinge af. Når krebsdyrene stimuleres med østrogen i vækstmediet, bliver de tidligere kønsmodne og lægger hurtigere en større del af æggene. På niende og tiende dag af deres livscyklus har de lagt henholdsvis dobbelt så mange og tre gange så mange æg sammenlignet med ubehandlede krebsdyr.

Vi har udført et tilsvarende forsøg med Bisphenol-A. Det ses også her, at krebsdyrene stimuleres til hurtigere at lægge en større del af den samlede æglægning på den første dag i æglægningsperioden. På niende og tiende dagen af deres livscyklus er henholdsvis tre gange og 40 procent flere æg lagt i forhold til ubehandlede dyr.

Forsøgene med Bisphenol-A er udført af studerende Franziska Kramer og Karin Høgsbro Pedersen under projektarbejde ved miljøkemigruppen på DFH. De anvendte to koncentrationer af stoffet. Den laveste koncentration på 50 µg/l er absolut miljørelevant, da der er målt op

til 9 µg/l bisphenol A i forurenede japanske floder.

Screeningstests, der kan identificere stoffer med en hormonlignende effekt, bør udvikles også for dyr på andre udviklingsstrin end krebsdyr, så man i reguleringssøjemed og til vurdering af nye stoffer har en vifte af testmetoder, der kan identificere denne uheldige sideeffekt. Det vil gøre det muligt at udfase eksisterende stoffer og undgå, at nye stoffer med en østrogen virkning eksponeres til miljøet.



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



Stud.scient Henrik Rasmus Andersen er specialestuderende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Ph.d. Søren Nors Nielsen er ekstern lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

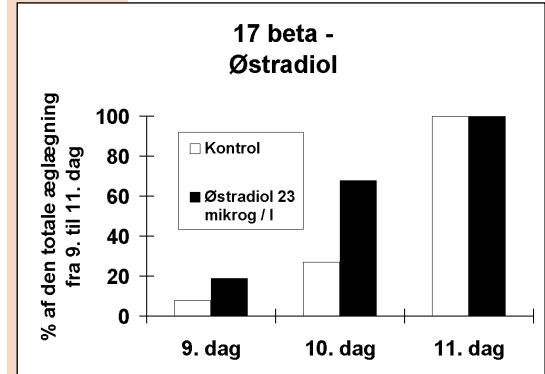


Dr.scient. Sven Erik Jørgensen er docent ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



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

Fig. 2a



Når krebsdyret *Acartia tonsa* udsættes for østrogen i vækstmediet i koncentrationen 23 µg/l, stimuleres det til hurtigere at lægge en større del af dets samlede æglægning (a). På 9. og 10. dagen af deres livscyklus er henholdsvis dobbelt så mange og tre gange så mange æg som normalt. Det samme billede ses for Bisphenol-A (b), et miljøfremmed stof, som mistænkes for at virke som østrogen. Ved en koncentration på 50 µg/l Bisphenol-A er der på 9. og 10. dagen af krebsdyrets livscyklus henholdsvis ca. tre gange og 40 % flere æg end normalt. For koncentrationen 500 µg/l ses stimuleringen ikke så markant, formodentlig fordi der nu begynder at indtræffe andre giftvirkninger end de reproduktionstoksiske.

Fig. 2b

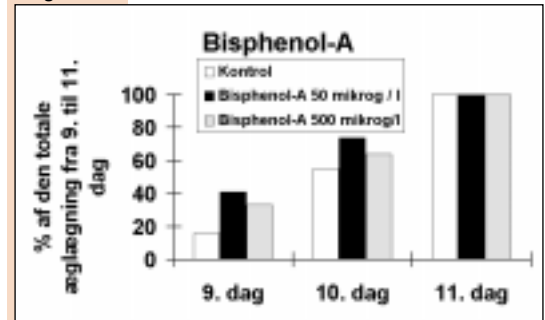
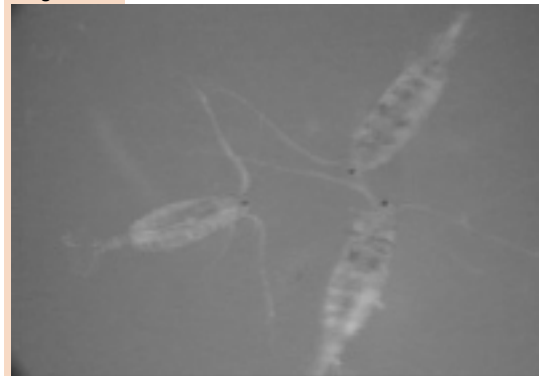


Fig. 1



Krebsdyret *Acartia tonsa*s reproduktion påvirkes af østrogen samt af miljøfremmede kemikalier med hormonlignende effekter. Krebsdyret er derfor velegnet til økotoksikologiske tests.

Protein binder giftige og livsvigtige metaller

Metallothioneiner er naturligt forekommende proteiner, som binder metaller i kroppen. De menes at beskytte celler mod giftige metaller som kadmium, sølv og kviksølv, og de indgår i cellens zink- og kobberstofske. Nye studier skal afklare proteinernes specifikke biologiske funktioner.

Af Carsten Boye Knudsen, Inga Bjørnsdottir, Ole Jøns og Steen Honoré Hansen.

Metallothioneiner er en gruppe proteiner, som er meget effektive til at binde en række metaller som zink, kobber, kadmium, sølv og kviksølv. Det første af proteinerne blev oprenset fra hestenyre i 1957 og siden er der fundet metallothionein i lever, blod, fedtvæv og hjerne fra andre pattedyr, i fisk, insekter, bløddyr og mikroorganismer.

Proteinet overproduceres ved flere former for fysisk og kemisk stress, hvilket har gjort det svært at opklare den specifikke biologiske

funktion. Da proteinet overproduceres ved tilstedeværelsen af giftige metaller, er det muligt, at metallothionein har en rolle i beskyttelse af cellerne mod kadmium, sølv og kviksølv.

Dette er dog en yderst kontroversiel hypotese, fordi proteinet findes i et væld af dyrearter, hvilket tyder på, at det har eksisteret langt tilbage i evolutionen, mens den store påvirkning af giftige metaller først for alvor har taget fart efter samfundets industrielle udvikling. Flere forskere mener derfor, at metallothioneins grundlæggende funktion har forbindelse med cellernes omsætning af de livsvigtige spormetaller zink og kobber, som proteinet binder i sin naturligt forekommende form.

De biologiske funktioner

En faktor, som har gjort det vanskeligt at opklare proteinets biologiske funktioner, er eksistensen af isoformer. Isoformer er proteiner fra samme gruppe, men med små forskelle i sammensætningen af de aminosyrer, som proteinerne er opbygget af.

Der er til dato blevet fundet fire hovedisoformer af metallothionein, som klassificeres som MT-1 til MT-4.

Yderligere er der fundet undergrupper i to af hovedisoformerne, som klassificeres med bogstaver, f.eks. MT-1a og MT-1b.

MT-1 og MT-2 findes hovedsagelig i leveren og nyrerne, hvor proteinerne sandsynligvis indgår som zinkleverandør i produktionen af zinkholdige enzymer, og man mener også, at de fungerer som antioxidant ved øget eksponering overfor frie radikaler, UV-stråling og oxygen. De endelige beviser mangler dog fortsat.

MT-3 er fundet i hjernen, hvor proteinet har en hæmmende effekt på væksten af nerveceller. Divergerende opfattelser af MT-3's indvirkning på Alzheimers sygdom er rapporteret i litteraturen.

MT-4 findes specifikt i hudceller. Man ved her, at zinkmangel giver hudforandringer samt dårlig sårhelning, men der er til dato ikke påvist nogen sammenhæng mellem MT-4, zink og hudopbyggende processer.

Separation af proteinerne

Et vigtigt led i opklaringen af metallothioneins biologiske funktioner er udviklingen af analysemetoder med stor følsomhed samt mulighed for at detektere de forskellige isoformer.

Kapillarelektroforese har inden for de seneste år opnået stor anvendelse til separation af molekyler med forskellige masse-ladnings forhold. Separationen foregår i et tyndt silica kapillar med en indre diameter på mellem 50 og 150 µm. Kapillaret er et rør, som fyldes med en væske. Der pålægges en spænding over kapillaret, hvorefter molekylerne bevæger sig gennem kapillaret med en hastighed, der afhænger af deres størrelse og ladning.

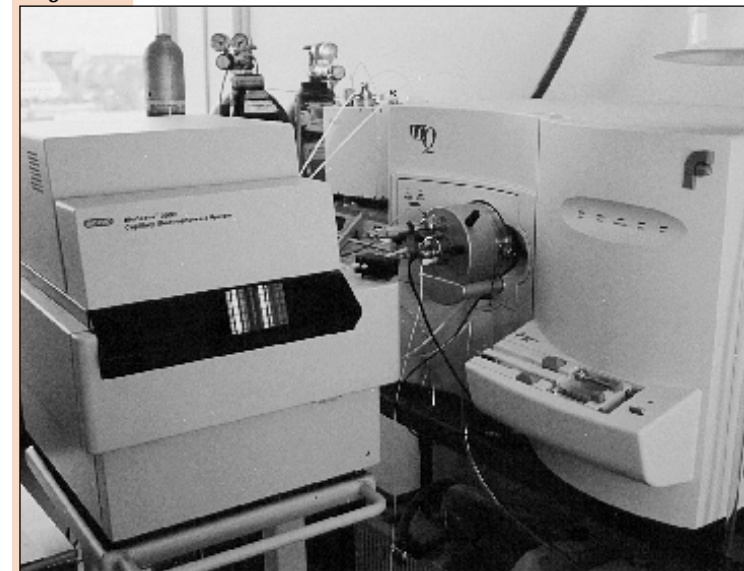
Normalt detekteres molekylerne ved hjælp af deres evne til at absorbere ultraviolet lys, og mængderne af de forskellige molekyler udskrives som toppe som funktion af den tid, det tager molekylerne at vandre gennem kapillaret. Da mange molekyler absorberer ultraviolet lys, er metoden imidlertid ret uspecifik og giver derfor ringe informationer om indholdet og renheden af de detekterede toppe, som i dette tilfælde repræsenterer metallothioneins forskellige isoformer.

Ved yderligere at anvende et massespektrometer som detektor er det muligt at få flere informationer om den analyserede prøve. Massespektrometrien giver oplysninger om molekylvægt og strukturelle egenskaber samt om renheden af de forskellige isoformer i toppene.

Før molekylerne i en prøve kan analyseres ved massespektrometri, skal de gøres elektrisk ladede. Molekylerne bringes på ionform ved at forstøve væsken i kapillaret, inden introduktion i massespektrometret. Forstøvningen opstår ved, at der udenom kapillaret er placeret en nål, som er pålagt en spænding. De relativt store dråber, der dannes, når væsken sprøjtes ud af kapillarenden, får overført ladninger fra den pålagte spænding på nålen. En strøm af nitrogen omkring kapillarenden og nålen øger fordampning af væske fra dråberne, som så formindskes i størrelse.

Ladningstætheden på overfladen af dråberne forøges, hvilket betyder, at dråberne spaltes op i endnu mindre dråber som følge af elektrostatisk frastødning. Denne process fortsætter indtil hver dråbe består af et enkelt molekyle med en eller flere ladninger. Denne forstøvnings teknik mindsker desuden dannelsen af associerede molekyler, hvilket er væsentligt, da molekylerne analyseres efter deres masse-ladnings forhold og en association ville give anledning til fejlagtige resultater.

Fig. 2



Opsætning af CE-MS udstyret. Til venstre ses kapillarelektroforesen og til højre massespektrometret.

Efter forstøvningen ledes de ladede molekyler videre ind i massespektrometret. Her sendes ionerne gennem et magnetfelt, hvor deres baner afbøjes. Graden af afbøjningen afhænger af ionernes masse og ladning, hvorved metallothioneins forskellige isoformer kan separeres.

Metallothionein i fostertilstanden

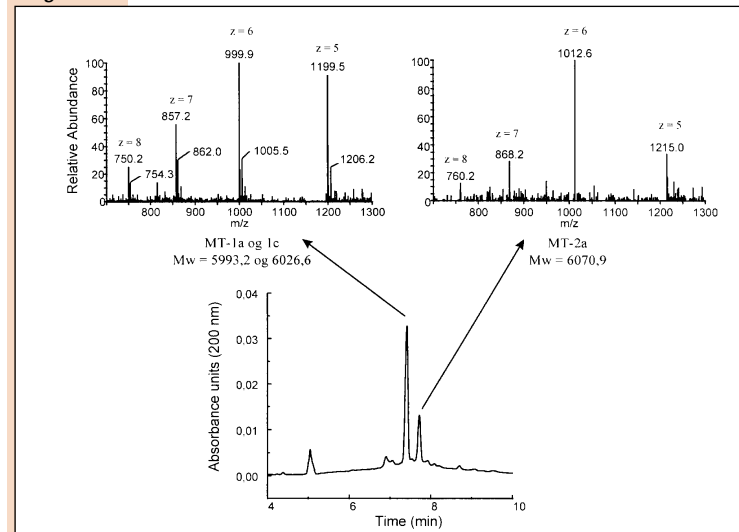
I et samarbejde med partnere fra the Rowett Research Institute i Skotland har vi tidligere undersøgt sammensætningen af metallothioneins hovedisoformer i fostre fra får ved hjælp af kapillarelektroforese og detektion af ultraviolet lys.

Vi fandt her, at koncentrationen af den totale mængde metallothionein falder med tiden hen mod fødslen, samt at forholdet mellem hovedisoformerne varierer gennem graviditeten. Metallothioneins funktion som stressprotein er i dette tilfælde tvivlsom. Forklaringen skal sandsynligvis findes i, at fostercellerne mindsker deres omsætning af zink og kobber hen mod slutningen af graviditeten.

Når man alene anvender ultraviolet lys til detektion, er det ikke muligt at belyse undergruppesammensætningen af hovedisoformerne. Det har vi imidlertid opnået ved at supplere med massespektrometri. Sidstnævnte metode har også været anvendt til strukturoptælling af to modificerede former for gær-metallothionein samt undersøgelse af metallothionein isoformer fra kani-

Kombinationen af kapillarelektroforese og massespektrometri er derfor et vigtigt værktøj til opnåelse af en bedre viden om metallothionein isoformernes funktion inden for et bredt spektrum af arter.

Fig. 1



Figuren viser resultatet af en kombineret kapillarelektroforese og massespektrometri undersøgelse af en leverprøve fra et 90 dage gammelt fårefoster. Nederst ses et UV-spor af prøven, hvor de to hovedtoppe stammer fra henholdsvis MT-1 og MT-2. Øverst ses de respektive massespektre, hvor MT detekteres som multiladede ioner (z = 5+, 6+, 7+ og 8+). Af spektrene ses det, at den første top i UV-sporet indeholder to MT-1 isoformer, henholdsvis MT-1a og MT-1c. Derimod ses, at UV toppen fra MT-2 kun indeholder en MT-2 isoform (MT-2a).



Cand. pharm. Carsten Boye Knudsen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand. pharm., ph.d. Inga Bjørnsdottir er forskningsadjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Lic. pharm. Ole Jøns er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



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