

LÆGEMIDDELFORSKNING

1999

DANMARKS

FARMACEUTISKE

HØJSKOLE





Dr. med. Ole J. Bjerrum er forskningsrådgiver hos Novo-Nordisk A/S og adjungeret professor ved Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Syddansk Universitet samt eksternt medlem af konsistorium på Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Behov for hurtigere udvikling af lægemidler

I dag opdages nye potentielle lægemiddelstoffer hurtigere end nogensinde før, men desværre kan den videre udvikling, validering og produktion ikke følge med. En øget støtte til de farmaceutiske videnskaber gennem EU's kommende forskningsprogram vil kunne afhjælpe flaskehalsen på europæisk plan. Der argumenteres for en aktiv dansk indsats.

Af Ole J. Bjerrum

Biotechnologien har givet opdagelsen af lægemiddelstoffer et stort skub fremad. De direkte resultater er udvikling af lægemidler, som består af biologiske molekyler, f.eks. insulin, erythropoitin (EPO) og væksthormon. Mere indirekte er det ved hjælp af biotechnologien lykkedes at identificere tusinder af nye mål - de såkaldte targets - for lægemidler i kroppen, bl.a. receptorer, ionkanaler, enzymer og transkriptionsfaktorer. Da målene for lægemidlerne ofte befinder sig bag barrierer i organismen, vil de pågældende sygdomme normalt kun kunne behandles med små organiske lægemiddelstoffer, som kan trænge gennem barriererne.

Den første del i udviklingen af lægemidler, opdagelsesprocessen - også kaldet discovery - har fået et gevaldigt løft med biotechnologien i kombination med teknologiske discipliner som analyse, automatisering, miniaturisering og informationsteknologi. Fremskridtene skyldes især den igangværende kortlægning af menneskets genom, kombineret med den nu rutinemæssige produktion af de proteiner, som generne rummer opskriften på. Dette har gjort det muligt at fremstille analysesystemer, hvor disse proteiner fungerer som mål for potentielle lægemiddelstoffer.

Med automatiserede analyser kan man screene titusinder af organiske stoffer om dagen. Effekten af stoffer, der binder sig til mål molekylerne - de såkaldte hits - konfirmeres i efterfølgende analyser, hvor stoffernes potens og specificitet optimeres med halvautomatiseret medicinalkemi f.eks. i form af kombinatorisk kemi.

De nye landvindinger har fået stor bevågenhed og er blevet støttet i såvel offentligt som privat regie. Mange nye virksomheder er blevet oprettet; for Danmarks vedkommende mere end 50 bioteknologiske virksomheder siden 1988. Hovedparten af firmaerne er under en eller anden form beskæftiget med opdagelsen af nye lægemiddelstoffer. Det betyder, at vi om ganske få år vil råde over et væld af nye lægemiddelkandidater.

Flaskehalsen er udviklingsprocessen

Der er imidlertid lang vej mellem identifikationen af mulige lægemiddelstoffer, til et lægemiddel er færdigudviklet. Udviklingsarbejdet, eller development, omfatter mange flere discipliner og teknologier end opdagelsesprocessen: farmakologi, toksikologi, farmaci, stor-skalaproduktion, analytisk kemi og kliniske forsøg.

Det er karakteristisk, at disse discipliner ikke har gennemgået den samme hurtige teknologiske udvikling som metoderne til at opdage potentielle lægemiddelstoffer. Det skyldes blandt andet en mere beskedne forskningssøtte og den omfattende kontrol fra registreringsmyndighedernes side. Selv om incitamentet til at få introduceret hurtigere metoder altid er tilstede, har firmaerne afvejet denne gevinst mod risikoen for på et senere stadium ikke at kunne få anerkendt de anvendte procedurer.

Udviklingsprocessens langsommelighed slår nu tydeligt igennem med åbenbare konsekvenser. Snart vil gamle som nye firmaer stå med en række lovende lægemiddelkandidater. Men da det ikke er muligt sådan lige at dublere alle aktiviteter i udviklingsprocessen, vil firmaerne foretage en stram prioritering af, hvilke kandidater der skal i udvikling. Kriteriet vil alene være den forventede indtjening på lægemidlet. Derfor vil sygdomme med begrænset patientunderlag blive forfordelt. Den lange udviklingstid medfører også, at medicinen bliver dyrere. Desuden risikerer vi tab af arbejdspladser, hvis den teknologiske udvikling sker i andre lande.



Indhold

1. Behov for hurtigere udvikling af lægemidler <i>Af Ole J. Bjerrum</i>	2-3
2. Antisense-medicin - en vej til bedre lægemidler <i>Af Lise Smith, Jerzy W. Jaroszewski, Klaus Bahl Andersen og Lars Hovgaard</i>	4-5
3. Peptider hjælper nye lægemiddelstoffer gennem tarmvæggen <i>Af Mikael Begtrup, Gerda Friedrichsen og Bente Steffansen</i>	6-7
4. Model kan hjælpe peptider ud i blodet <i>Af Lene Hjorth Alifrangis, Inge Thøger Christensen, Flemming Steen Jørgensen, Lars Hovgaard og Sven Frøkjær</i>	8-9
5. Fordøjelsen af fedtstoffer påvirker optagelsen af lægemidler <i>Af Niels Hønborg Zangenberg, Henning Gjelstrup Kristensen, Anette Müllertz og Lars Hovgaard</i>	10-11
6. Færre injektioner med depotlægemidler <i>Af Simon Bjerregaard, Sven Frøkjær, Charlotte Vermehren og Ingrid Soderberg</i>	12-13
7. Nye virkninger af gamle hormoner <i>Af Uffe Kristiansen, Suzanne Hansen og Bjarne Fjalland</i>	14-15
8. Regulering af hjertets blodkar ved kredsløbslidelser <i>Af Niels Chresten Berg Nyborg og Majid Sheykhzade</i>	16-17
9. Nitrogenoxid som mulig modgift mod cyanid? <i>Af Mads Skak Jensen og Erling Sonnich Thomsen</i>	18-19
10. Opiumvalmuen - døgnsvingninger og morfinproduktion <i>Af Kim Itenov og Per Mølgaard</i>	20-21
11. Afhængighed af psykofarmaka set fra brugernes side <i>Af Ebba Holme Hansen og Stig Helweg-Jørgensen</i>	22-23
12. Miljörisikovurdering af lægemidler <i>Af Bent Halling-Sørensen, Jette Tjørnelund, Flemming Ingerslev, Hans Christian Holten Lützhøft, Marie-Louise Loke, Sven Erik Jørgensen og Steen Honoré Hansen</i>	24-25
13. På sporet af antibiotika i miljøet <i>Af Jette Tjørnelund, Marie-Louise Loke, Bent Halling-Sørensen og Steen Honoré Hansen</i>	26-27
14. Specifikke stoffer belyser Alzheimers sygdom <i>Af Tine Bryan Stensbøl, Tommy Nørskov Johansen og Jan Egebjerg</i>	28-29
15. AMPA-receptorer - et mål for lægemidler mod Alzheimers sygdom <i>Af Frank A. Sløk, Ulf Madsen og Povl Krosgaard-Larsen</i>	30-31
16. AMPA-receptorer og celledød <i>Af Jette Bisgaard Jensen</i>	32-33
17. Antistoffer finder specifikke receptorer <i>Af Lene K. Jespersen og Jan Engberg</i>	34-35
18. Glutaminsyre-pumpen regulerer hjernens aktivitet <i>Af Torben Bruhn, Thomas Christensen, Arne Schousboe og Nils Henrik Diemer</i>	36-37
19. Acetylcholin - et terapeutisk koncept under forandring <i>Af Henrik Pedersen, Hans Bräuner-Osborne, Karla Frydenvang og Povl Krosgaard-Larsen</i>	38-39
20. Ny indgang til at påvirke hjernens aktivitet <i>Af Hans Bräuner-Osborne, Bo Enemark Madsen og Povl Krosgaard-Larsen</i>	40-41
21. 3D-modeller fremmer forståelsen af samspillet mellem receptor og lægemiddelstof <i>Af Flemming Steen Jørgensen, Karla Frydenvang, Hans Bräuner-Osborne og Kurt Kristiansen</i>	42-43
22. Den randomiserede kliniske undersøgelse <i>Af Søren Troels Christensen, Ebba Holme Hansen og Poul Reinhardt Kruse</i>	44-45

Støtte gennem EU's forskningsprogrammer

Problemstillingen omkring introduktion af nye sikre, hurtige og effektive teknikker til udvikling af lægemidler er så kompleks, at den ikke kan løses på Danmarks Farmaceutiske Højskole, selv ikke i Danmark, om så alle farmaceutiske industrier gik sammen. I den anledning er det naturligt at se på, hvad EU har at byde på.

EU's forskningsprogrammer er i dag så omfattende, at ca. 5% af medlemslandenes forskningsmidler fordeles via Bruxelles. Så hvorfor ikke få en del af disse penge kanaliseret over i farmaceutiske videnskaber? Her skal anføres, at Danmarks Farmaceutiske Højskole har stået sig godt i den internationale konkurrence. Under 4. rammeprogram i perioden 1994-1998 har Højskolen således i alt tiltrukket 11,6 millioner forskningskroner fra Bruxelles.

I 5. rammeprogram blev forskningsområderne samlet i nøgleaktioner, der hver især har ca. 2,5 milliarder kr. til rådighed. Til udmøntning i det 6. rammeprogram for årene 2003-2007 har en arbejdsgruppe nedsat af Komiteen for Industrielle Anliggender under European Federation of Pharmaceutical Sciences, hvor undertegnede har siddet som repræsentant for Danmarks Farmaceutiske Højskole, udarbejdet et forslag til en ny nøgleaktion "New Safe Medicines Faster" til afhjælpning af den beskrevne flaskehalsproblematik.

Kommissionen synes om forslaget og har direkte anmodet om at få det udbygget. Dette vil ske gennem workshops finansieret af EU. Forslaget nyder også støtte fra European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations.

Nok er Kommissionens og industriens holdning vigtig, men de enkelte medlemslandes støtte er vigtigere. Her skal forslaget konkurrere med andre fagområder, og en eventuel prioritering afgøres af forskningsministrene. Det er således overordentligt vigtigt, at interessenter inden for de farmaceutiske videnskaber bakker op om forslaget nationalt som internationalt.

Hvis Danmark ønsker at se sine bidrag til EU's forskningsprogrammer komme tilbage som støtte til vore hjemlige forskningsaktiviteter, må dette ske ud fra en styrkeposition. At den allerede er tilstede fremgår f.eks. af indholdet af dette blad, men den vil kunne styrkes yderligere gennem tilførsel af dedikerede nationale midler til dansk farmaceutisk forskning.

Selvom den omtalte nøgleaktion ikke bliver til noget, skulle alle tiltag til sikring af en hurtigere og mere pålidelig udvikling af nye lægemidler have befolkningens støtte. Danmark har en stærk offentlig forskningsbastion, en stor etableret farmaceutisk industri og mange bioteknologiske start-up firmaer med et stort potentiale. Oprustning af udviklingsprocessen ville hjælpe dem alle. Må det lykkes.

Forslaget "New Safe Medicines Faster" kan fås ved henvendelse til Prof. Sven Frøkjær, Danmarks Farmaceutiske Højskole (sf@dfh.dk) eller hos artiklens forfatter (obj@novo.dk).

Antisense-medicin - en vej til bedre lægemidler

Antisense-medicin består af korte DNA sekvenser, som kan hæmme gener i at danne sygdomsfremkaldende proteiner. Selv om det første antisense-lægemediel netop er markedsført i USA, er der behov for basal forskning i den lovende teknologi.

Af Lise Smith, Jerzy W. Jaroszewski, Klaus Bahl Andersen og Lars Hovgaard

Der har i mange år været en intens offentlig debat om genterapeutisk behandling af sygdomme. Hele debatten har været præget af bekymringer af etisk karakter - med eller uden berettigelse. Imidlertid bør man inddеле de genetiske behandlingsformer i tre principielt forskellige hovedområder, der kan medføre en mere eller mindre permanent ændring i genmaterialet: Genterapi, DNA-vacciner og antisense-medicin.

Ved traditionel genterapi indsættes en korrekt udgave af et sygt gen i en celle. Her skal det indsatte gen danne den rette version af det protein, som er misdannet eller mang-

lende på grund af sygdommen. Genterapi benyttes bl.a. eksperimentelt ved behandling af arvelige sygdomme som f.eks. cystisk fibrose.

DNA-vaccination forsøges anvendt imod kræft og alvorlige virus sygdomme, men også mod almindelige infektionssygdomme. Traditionelle vacciner består ofte af døde eller svækkede sygdomsfremkaldende bakterier eller vira, som sætter kroppens immunforsvar i alarmberedskab overfor den pågældende mikroorganisme. Ved DNA-vaccination indfører man et gen, som koder for et eller flere proteiner fra mikroorganismernes overflade. Man risikerer derfor ikke at pådrage sig den sygdom, som vaccinen er rettet imod.

Antisense-terapi virker på en tredje måde; nemlig ved at blokere produktionen af sygdomsfremkaldende proteiner. Når et gen skal danne sit protein, udsender genet en enkeltstrenget kopi af sig selv, budbringer-RNA, som bevæger sig hen til cellernes proteinfabrikker, der aflæser opskriften og producerer proteinet. Antisense-medicin består ligeledes af en genstreng. Den binder sig nu til budbringer-RNA, hvilket hindrer proteinfabrikkerne i at aflæse opskriften og danne proteinet.

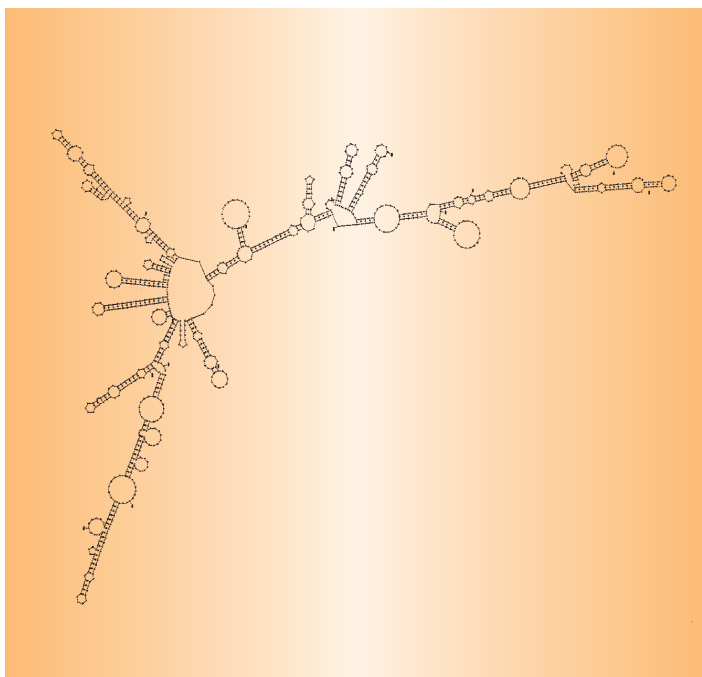
Antisense-medicin tegner især lovende til behandling af arvelige sygdomme, kræft og infektionssygdomme. Ved arvelige sygdomme og kræft slukker antisense-medicinen for produktionen af sygdomsfremkaldende proteiner, og ved behandling af infektionssygdomme blokeres dannelsen af udvalgte proteiner, som de sygdomsfremkaldende mikroorganismer behøver for at overleve.

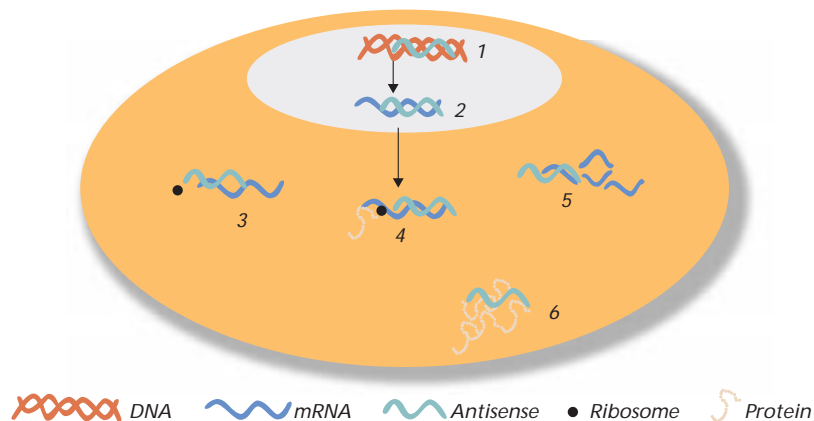
DNA-gruppen på Danmarks Farmaceutiske Højskole beskæftiger sig med flere aspekter af farmaceutisk fremstilling af DNA til medicinsk behandling. Projekterne strækker sig fra formuleringer af DNA-vacciner over studier af, hvordan cellerne optager gener ved genterapi, til fremstilling af antisense-præparater. Denne artikel beskriver antisense-terapi og berører de fremskridt, der er set i DNA-forskningsgruppen.

Specifik virkning med antisense-medicin

I traditionel medicinsk behandling, f.eks. kemoterapi mod cancer, forsøger man med større eller mindre held at slå celler med defekte gener ihjel. Specificiteten i denne behandling er yderst begrænset, fordi raske celler også rammes, og

Budbringer-RNA er målet for antisense-medicinen. Budbringer-RNA er en lineær polymer, som folder sig sammen i cellen. Kendskab til foldningen er nødvendig for at skræddersy antisense-molekylet. Her ses en computergrafisk gengivelse af et budbringer-RNA's (for GFP) foldede struktur opnået ved hjælp af M-FOLD programmet. Åbne regioner er potentielt mere attraktive som mål for antisense-molekyler.





Antisense-molekyler har mange mulige virkningsmekanismer. Antisense: 1 - forhindrer transkription. Antisense: 2 - blokerer for transport af RNA fra cellekernen til cellernes proteinfabrikker; 3 - hæmmer proteinsyntesen; 4 - forhindrer proteinsyntesens start. RNase-H induktion: 5 - inducerer intracellulær nedbrydning af budbringer-RNA. Protein folding: 6 - påvirker færdige proteins tredimensionelle struktur.

bivirkningerne er derfor betydelige og ubehagelige for patienten. Behandlingen af en lang række virus sygdomme som AIDS, Herpes simplex og simpel influenza er ligeledes vanskelig og uspecifik.

Medicin, som virker på genniveau, åbner mulighed for udvikling af langt mere specifikke behandlingsformer. Sideløbende med at det humane genoms kode opklares, og metoderne til DNA-sekventering hele tiden forbedres, opbygges en stor viden om præcis hvilke sekvenser i et gen, der er ansvarlige for dannelsen af syge celler eller forkert fungerende proteiner. Det betyder i praksis, at behandlingen i flere og flere tilfælde kan ramme sygdomskilden direkte. Til dette formål er antisense-genstrengene oplagte kandidater.

DNA er opbygget af fire forskellige byggesten, kaldet baser, som ved simpel kemisk sammenkobling danner lange kæder af DNA. Hvis man kender sekvensen for det sygdomsfremkaldende gen, kan man fremstille den komplementære sekvens på typisk 15-20 baser. Denne korte kæde er det nye lægemiddelstof, som kan blokere det defekte gen.

Valg og test af antisense-sekvensen

Teorien bag antisense er smuk og tilsyneladende ukompliceret. Men i praksis er der mange vanskeligheder. For det første er budbringer-RNA meget store makromolekyler, hvilket gør det svært at målrette antisense-genstrengen, så den binder sig optimalt til budbringer-RNA. Budbringer-RNA er lineære polymerer, men de optræder ikke som sådan. I stedet folder de sig selv op i en sekundær konformation, som er speciel for hver enkelt udgave af budbringer-RNA. Foldningen er styret af, at molekylet ønsker at optræde i den lavest mulige energitilstand. I udvælgelsen af antisense-molekylerne må man således tage hensyn til, hvordan det pågældende budbringer-RNA folder sig sammen.

Antisense-molekylerne kan udvælges på en række forskellige måder. I forskningsgruppen anvendes en computergrafisk metode til at finde egnede, tilgængelige områder i budbringer-RNA. Udvalgte antisense-molekyler testes derefter i en cellemodel, som udtrykker det grønne fluorescerende protein GFP. I det omfang antisense-molekylerne hæmmer budbringer-RNA, produceres GFP ikke og den grønne farve forsvinder fra cellerne. Derudover benytter vi cellefrie analysesystemer, som indeholder alle de komponenter, der er nødvendige for proteinsyntesen, og hæmmer målgenet her. På disse måder er det muligt at teste for en lang række potentielle antisense-effekter.

Vejen ind i målcellerne

Når egnede kandidater er udvalgt, går det farmaceutiske formuleringsarbejde i gang. Antisense-molekyler er polære makromolekyler med en negativ ladning, og de er samtidig vandopløselige. Derfor har de kun en lille chance for på egen hånd at trænge igennem den fedtholdige cellemembran og ind i cellerne, hvor de udøver deres effekt.

Derfor arbejder vi med transportmolekyler, som kan fragte antisense-medicinen ind i cellerne. Positivt ladede poly-L-lysiner er blandt kandidaterne. Disse polymerer udvikles i samarbejde med professor Glen Kwon fra universitetet i Wisconsin, USA. Polymererne kompleksbinder antisense-molekylerne takket være tiltrækningen mellem de positivt ladede polymerer og de negativt ladede antisense-strengene. I en række indledende studier med kompleksene har det vist sig, at det sandsynligvis er muligt at øge cellernes optag af antisense-molekyler. Dermed er der forhåbning om, at det bliver lettere at opnå terapeutiske koncentrationer i målcellerne.

Behov for basal grundforskning

Den amerikanske biotech virksomhed ISIS har slået sig op på antisense-området og har over en periode på et årti været hele forskningsfeltets opture og nedture igennem. Imidlertid har ISIS nu markedsført det første antisense-præparat, Vitravene®, som er et lægemiddel til behandling af en HIV-relateret øjeninfektion. I dette produkt er der tale om en simpel opløsning af antisense-medicinen i en vandig buffer til lokal applikation i øjet.

For at mere avancerede antisense-præparater i fremtiden skal have en chance, er det nødvendigt at udvikle farmaceutiske formuleringer, som kan tre ting. For det første skal formuleringerne kunne beskytte antisense-molekylerne mod nedbrydning i kroppen. For det andet skal de være i stand til at styre lægemiddelstoffet hen til det rette organ. For det tredje er det nødvendigt at øge cellernes optag af medicinen.

Det er derfor vigtigt at indsamle faktuelle data om kinetikken og mekanismerne i den subcellulære transport, om stabiliteten og om mulighederne for at anvende eksisterende farmaceutiske formuleringsmetoder for at kunne udvikle disse bioteknologiske lægemidler til bred fremtidig anvendelse.

Projektet er bl.a. støttet af Centre for Drug Design and Transport.



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



Ph.d. Jerzy W. Jaroszewski er professor ved Institut for Medicinalkemi.

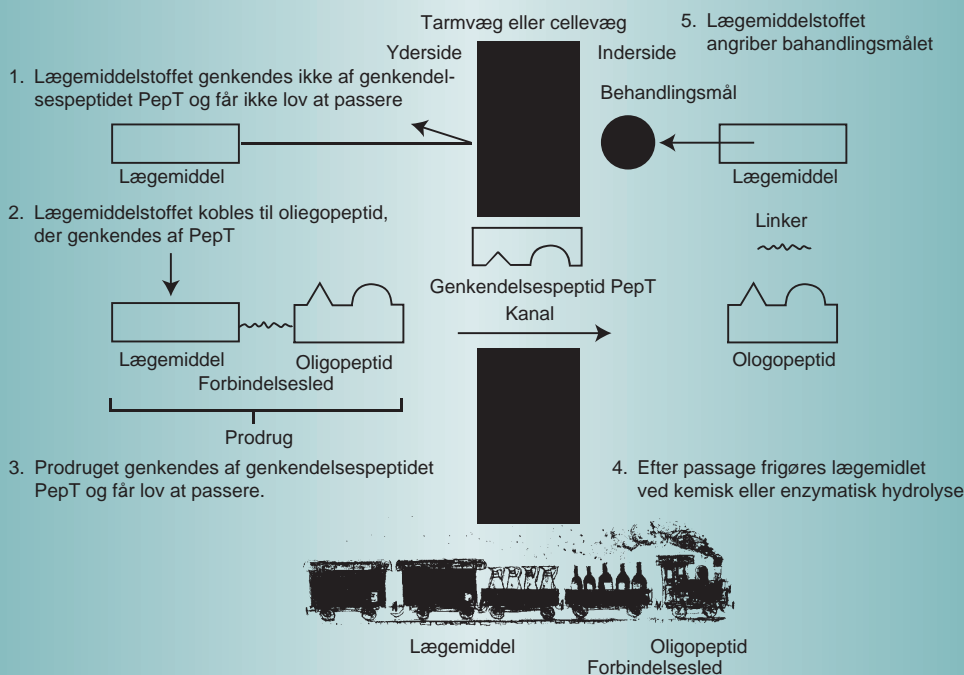


Ph.d. Klaus Bahl Andersen er lektor ved Institut for Farmakologi.



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

Transport af lægemiddelstof efter kobling til oligopeptid



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



Cand.pharm. Gerda Friedrichsen er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinskemi.



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

Fremstilling og test af transportformer

Når man rent praktisk skal koble et lægemiddelstof på et lille peptid, skal peptidets struktur bevares, så transportøren er i stand til at genkende transportformen. Her ser det ud til, at peptidtransportøren foretrækker en fri syregruppe og en fri aminogruppe såvel som en amidbinding.

I de første studier blev der fokuseret på at fremstille et egnet peptid. Efter en del indledende forsøg udvalgte D-Glutaminsyre-L-Alanin (D-Glu-Ala) som kandidat. Valget er ikke tilfældigt. Glutaminsyren har en ekstra fri syregruppe, hvortil det er muligt at tilkoble et aktuelt lægemiddelstof. Spejlbilledformen af den naturlige L-konfiguration af glutaminsyre er valgt, fordi bindingen mellem glutaminsyre og alanin herved stabiliseres overfor enzymatisk nedbrydning i mave-tarmkanalen.

De næste store udfordringer var at finde frem til en egnet kobling mellem glutaminsyre og lægemiddelstoffet, og derpå at undersøge, hvordan lægemiddelstoffets struktur påvirker transportformens egenskaber. Indtil nu er der fremstillet en række modelstrukturer, hvor dels en række benzylalkoholer, dels et egentligt lægemiddelstof er koblet til dipeptidet D-Glu-Ala med en esterbinding.

De fremstillede transportformers egnethed er derpå blevet vurderet ved at måle, hvor let lægemiddelstoffet spaltes fra D-Glu-Ala af enzymer under de forhold, der findes før og efter passage af tarmvæggen. Transportformens egnethed er endvidere blevet vurderet ved at bestemme dets evne til at blive transporteret af peptidtransportøren i dyrkede celler. Resultaterne viser, at det er muligt at variere transportformernes stabilitet og samtidig bevare deres evne til at smutte gennem tarmslimhinden ved hjælp af peptidtransportøren.

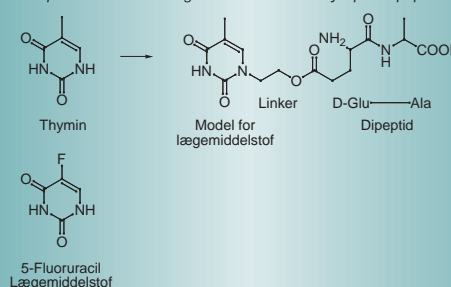
Transport af lægemidler mod kræft

I andre laboratorier har man vist, at visse kræftceller udtrykker peptidtransportøren, måske fordi kræftcellerne har brug for næringsstoffer og dermed aminosyrer til deres hurtige celledeling.

Dette kan muligvis udnyttes til at målrette kemoterapeutiske lægemidler til kræftsvulster. En af årsagerne til at kræftmedicin giver så mange bivirkninger er, at de virker på såvel raske som syge celler. Man kan derfor forestille sig, at bivirkningerne kan nedsættes betydeligt, hvis lægemiddelstoffet primært dirigeres til hen til svulsten. Ved at koble et lægemiddelstof mod kræft som f.eks. 5-fluorouracil til D-Glu-Ala peptidet, kan man måske transportere transportformer ind i kræftcellerne. Herved kan lægemiddelstoffet bringes direkte frem til angrebepunktet inde i cellen.

På nuværende tidspunkt undersøger vi i en model peptidet D-Glu(thymin)-Ala. Thymin minder strukturmæssigt meget om lægemidlet 5-fluorouracil, men har ingen virkning mod kræftsvulster. Vi har netop vist, at transportformen kan bindes til peptidtransportøren. Dette positive resultat er det første spæde skridt på vejen mod en tilsvarende binding af 5-fluorouracil, der kan tjene til at målrette lægemidlets angreb direkte på kræftcellerne.

Transport af anticancerlægemiddelstoffer ved hjælp af dipeptid



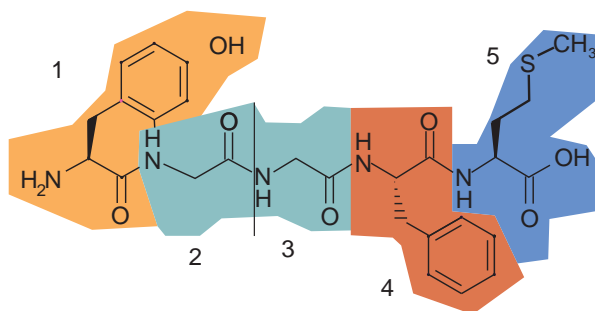
Model kan hjælpe peptider ud i blodet

Peptider er små proteiner med et stort terapeutisk potentiale. Men desværre nedbrydes peptiderne ofte, inden de når frem til virkningsstedet. Ved at kombinere computerberegninger, statistik og eksperimenter, har vi opstillet en model, der kan forbedre mulighederne for at få peptiderne optaget i kroppen.

Af Lene Hjorth Allfrangis, Inge Thøger Christensen, Lars Hovgaard og Sven Frøkjær

Peptider er en meget vigtig kategori af potentielle lægemiddelforbindelser, men de lider af to alvorlige skavanker. For det første bliver peptiderne ofte nedbrudt i tarmsystemet, før de når ind i kroppen, og for det andet har de svært ved at passere tarmvæggen og komme ud i blodbanen. Kun hvis peptidet kommer over i blodet, kan det blive transporteret hen til det sted i kroppen, hvor det skal virke.

En væsentlig del af forskningen med at finde nye lægemidler baseret på peptider er fokuseret på at løse disse to problemer. De er nemlig årsag til, at man kun sjældent kan indtage et lægemiddel med et peptid i form af en tablet. I stedet må det gives som en indsprøjtning. Den hurtige nedbrydning og den dårlige optagelse betyder desuden, at lægemidlet skal indgives meget tit og i stor dosis, fordi der skal være en vis koncentration i blodet for, at peptidet har en virkning.



Figuren viser peptidet met-enkephalin, som består af fem aminosyrer. Hver aminosyre er vist med forskellig skravering. Rækkefølgen og sammensætningen af aminosyrerne er afgørende for peptidets virkning og egenskaber, fordi hver aminosyre har forskellige egenskaber med hensyn til størrelse og placering af fedtopløselige og vandløslige dele.

Typisk vil halvdelen af et peptid været uvirksomt efter fem minutter. Det er dels til stor ulempe for patienterne og dels meget dyrt på grund af det store peptidforbrug. Desuden er der større risiko for bivirkninger, fordi det er svært at styre doseringen, hvis optagelsesgraden er lav. Der vil ofte være en stor grad af variation, så man f.eks. optager en procent den ene gang og fem procent næste gang. Selvom kun en lille del bliver optaget, vil dosis alligevel være fem gange så høj anden gang. Dermed øges risikoen for bivirkninger.

Årsagen til problemerne skal findes i den molekylære struktur af peptiderne, så håbet er, at man i fremtiden kan ændre peptidernes struktur, så de bliver bedre optaget i kroppen fra tarmen. Vores bidrag til dette mål er at finde ud af, hvilke dele af strukturen, der virker henholdsvis blokerende og fremmende for optagelsen i kroppen.

Nedbrydning i tyndtarmen

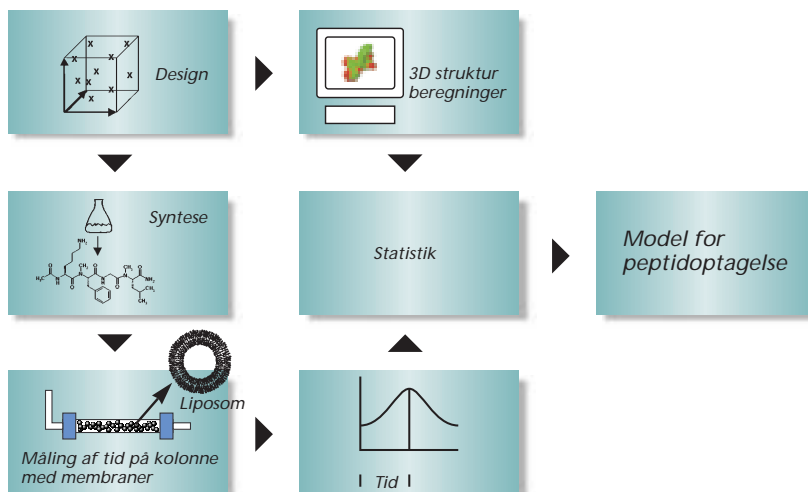
Nedbrydningen i tarmen skyldes, at der i tyndtarmen findes en mængde fordøjelsesenzymer, som er indrettet til at nedbryde proteiner og peptider i føden, eksempelvis i kød. Såfremt peptidlægemidlet er opbygget på fuldstændig samme måde som naturligt forekommende peptider, kan tarmenzymene ikke kende forskel på en bøv og et peptid, der var tænkt som et lægemiddel.

Derfor vil det normalt være nødvendigt at modificere den molekylære struktur, så peptidet både kan modstå fordøjelsesenzymerne og være fedtopløseligt nok til at komme over tarmslimhinden. Man har en del erfaring inden for feltet, men endnu ingen gode systematiske modeller, som beskriver sammenhængen mellem peptidens molekylære struktur og deres evne til at blive optaget.

Peptider og proteiner er opbygget af aminosyrer, som i kroppen sættes sammen i forlængelse af hinanden til kæder af varierende længde. De små kæder med 2-50 aminosyrer kaldes peptider, og de store, ofte foldede kæder kaldes proteiner og indeholder ofte mange hundrede aminosyrer.

Kroppen har naturligt tyve forskellige slags aminosyrer, og det er primært sammensætningen og rækkefølgen af aminosyrerne, der afgør, hvilken virkning peptidet har i kroppen. Et af de mest kendte peptider er insulin, som består af to peptidkæder på 21 og 30 aminosyrer.

Insulin er et forholdsvis stort peptid sammenlignet med de mange små peptider, som spiller væsentlige roller for f.eks. hormonbalancen. Som eksempler kan nævnes TRH med tre aminosyrer, som stimulerer udskillelsen af hormoner fra skjoldbruskkirtlen, vasopressin med ni aminosyrer, som styrer, hvor meget vand nyrerne udskiller, samt enkephalin med fem aminosyrer, som er kroppens egen smertestiller, fordi peptidet har samme virkning som morfin.



Ved at kombinere statistisk design, eksperimenter og computerberegninger har vi opstillet en model for sammenhængen mellem peptidernes struktur og deres evne til at blive optaget i kroppen. Eksperimenterne blev udført med en kromatografisk kolonne, hvor modeller for en cellemembran, liposomer, er sat fast. Jo længere tid peptidet er om at komme igennem kolonnen, jo bedre vekselvirker det med membranen, og jo bedre bliver det sandsynligvis optaget i kroppen.

Den svære vej gennem tarmen

Når man ønsker at indgive et peptid som lægemiddel, er det vigtigt at kende til de kræfter, der virker mellem peptidet og dets omgivelser i tarmen.

De fedtopløselige dele af peptidet vil trække ind imod tarmcellernes membran, som består af fedtmolekyler i to lag. Andre dele af peptidet kan bedst lide at være i nærheden af vandmolekyler. Dem er der flest af udenfor membranen, så de vandelskende dele af peptidet vil helst blive der.

Problemet med peptider er oftest, at de indeholder for mange vandelskende dele. Derfor kan de ikke passere tarmslimhinden og komme over i blodet. Vores opgave er at finde ud af, hvordan balancen skal være mellem de fedtopløselige og vandelskende dele af peptiderne for, at de kan passere barrieren.

For at komplicere sagen yderligere kan det også have betydning, hvordan delene sidder i forhold til hinanden rent rumligt. Altså er man nødt til at kigge på den tredimensionelle opbygning af peptiderne. Vi bruger hurtige computere med avanceret grafik til dels at beregne balancen mellem de forskellige dele, dels at studere den tredimensionelle struktur.

Peptiders evne til at komme ud i blodet

Målet er at kunne forudsige, hvordan et hvilket som helst peptid vil absorberes i kroppen bare ved at kigge på molekylstrukturen. Med den viden er det i teorien også muligt at forbedre strukturen, så peptiderne bliver bedre optaget.

Man hverken kan eller vil lave samtlige peptider, der findes, for at få svar på det spørgsmål. F.eks. udgør alle kombinationer af de tyve aminosyrer i et lille peptid med fire aminosyrer 160.000 kombinationer. I stedet for de 160.000 muligheder har vi udvalgt tyve strukturer, som skal repræsentere de resterende 159.980 peptider.

Det er særdeles vigtigt at udvælge de tyve repræsentanter omhyggeligt. Man skal være helt sikker på, at alle de egenskaber, der menes at have betydning for absorptionen, er repræsenteret i de udvalgte peptider. Man kan regne sig frem til i hvor høj grad, det er tilfældet, ved hjælp af statistisk design.

Til at illustrere princippet kan man forestille sig, at man ønsker at finde en model, der kan forudsige hvilken farve, der fremkommer ved blanding af forskellige forhold af de tre grundfarver rød, gul og blå, hvor blandingsfarven illu-

strerer absorptionen, og farverne illustrerer de molekylære egenskaber. I stedet for at blande alle mulige sammensætninger ønsker vi at udvælge nogle få, som kan repræsentere resten. Ved hjælp af statistisk design, finder vi de blandinger, som giver den bedste repræsentation, og som derfor kan give den bedste model. Uden statistisk design risikerer vi at udvælge for få eller for ens blandinger med f.eks. blå. Det vil efterfølgende gøre det vanskeligt at give en nøjagtig forudsigelse af, hvordan blandinger med blå vil opføre sig.

Fra statistik til forsøg

Ud fra det statistiske design har vi udvalgt de tyve peptider og dernæst syntetiseret dem, dvs. sat aminosyrerne sammen i en fastlagt rækkefølge. Derefter har vi undersøgt hvor godt de vekselvirker med en cellemembran, som er den del af cellerne, der bremser optagelsen af peptiderne mest.

Til at undersøge disse vekselvirkninger har vi anvendt liposomer, som er simple modeller for cellemembranen. De består af kugleformede dobbeltlag af fedtmolekyler med en kerne af vand i midten. Liposomerne er sat fast inden i et tyndt glasrør, som man pumper væske igennem sammen med det peptid, man ønsker at undersøge. Ved hjælp af en detektor kan man se, hvor lang tid peptidet er om at komme igennem glasrøret. Jo længere tid det tager, jo bedre vekselvirker peptidet med membranen. Ideen er, at dette også fortæller noget om, hvor godt peptidet vil være til at passere den membran, som omkranser tarmcellerne.

Repræsentativ computermodel

Resultaterne af forsøgene med liposomerne har vi søgt at forklare ud fra de computerberegninger, vi har lavet med de samme peptider.

På det grundlag har vi opstillet en model for sammenhængen mellem molekylstruktur af peptider og deres evne til at blive absorberet. Fordi vi har anvendt statistisk design til at finde de mest repræsentative peptider, kan vi nu med rimelig sikkerhed forudsige i hvor høj grad ukendte peptider, som ligner dem i designet, vil blive optaget i kroppen.

Den viden er et skridt på vejen i retning af at kunne ændre peptidernes struktur i en gunstig retning for absorption. Derfor vil udviklingen af modeller i sidste ende gavne patienterne, dels fordi det vil være hurtigere at udvikle lægemidler baseret på peptider, og dels fordi det vil mindske risikoen for bivirkninger.



Lene Hjorth Allfrangis er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinskemi.



Ph.d. Inge Thøger Christensen er kemiker på Novo Nordisk A/S



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



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

Fordøjelsen af fedtstoffer påvirker optagelsen af lægemidler

Alle stoffer, som indtages gennem munden, skal opløses i mavetarmkanalen, før de kan optages til blodet. Det gælder også fedtstoffer fra føden og tungtopløselige lægemiddelstoffer. I begge tilfælde styres optaget af de samme mekanismer. Derfor kan en kortlægning af disse mekanismer føre til udvikling af mere pålidelige lægemidler.

Af Niels Hønberg Zangenberg, Henning Gjelstrup Kristensen, Anette Müllertz og Lars Hovgaard

Den farmaceutiske industri udvikler i dag lægemiddelstoffer, som er skræddersyet til deres virkningssted i kroppen. Desværre er disse lægemiddelstoffer ofte meget tungtopløselige i de vandige væsker i mavetarmkanalen, og opløseligheden bliver den begrænsende faktor for optagelsen. Det kan derfor være svært at opnå en sikker effekt, når stofferne indgives gennem munden som tabletter eller kapsler.

Mekanismerne bag lægemiddelstoffers opløsning og optagelse i mavetarmkanalen er meget komplekse. De påvirkes tilmed ved indtagelse af et måltid samtidig med tabletterne. Opløseligheden af lægemiddelstoffer i mavetarmvæsken og deres efterfølgende optagelse varierer ikke blot fra person til person, men også fra dag til dag for samme person. Det betyder, at biotilgængeligheden af lægemidler - karakteriseret ved optagelsens hastighed og omfang - kan være varierende og lav.

Det er en central opgave i lægemiddelformuleringen at udvikle lægemidler, der sikrer en høj og reproducerbar biotilgængelighed. Der er således behov for enkle og hurtige

metoder til at teste forskellige formuleringer for at kunne udvælge den formulering, som med størst sandsynlighed fører til den ønskede biotilgængelighed.

Vi har udviklet en laboratoriemodel af fordøjelsen af fedtstoffer i mavetarmkanalen, som kan være en nem og hurtig metode til at opfylde behovet.

Fordøjelse af fedtstoffer

Udgangspunktet er, at vi via maven indtager fedtstoffer, som er tungt opløselige i vand. Ligesom lægemiddelstofferne skal de opløses i mavetarmvæskerne, før de kan optages fra tarmen. Da biotilgængeligheden af en lang række tungtopløselige lægemiddelstoffer øges ved samtidig indtagelse af et måltid, er det logisk at antage en sammenhæng mellem fedtfordøjelsen og biotilgængeligheden af disse lægemiddelstoffer.

Fra naturens hånd er mennesket udstyret med en fedtfordøjelse, der sikrer, at over 90% af fødens fedtstoffer optages fra mave-tarmkanalen. Men inden fedtstofferne når så langt, gennemgår de en lang række processer.

Maden homogeniseres ved tygning, og bearbejdning i maven, og det medfører, at fedtstofferne samler sig i små fedtdråber med en fedtkerne og en overflade, der indeholder overfladeaktive stoffer som f.eks. monoglycerider. Overfladeaktive stoffer reducerer overfladespændingen mellem fedt og vand og reducerer fedtdråbernes størrelse.

Fra maven føres maden videre til tolvfingertarmen, hvor den bl.a. tilføres galdesalte, fosfolipider og fordøjelsesenzymer. Galdesaltene og fosfolipiderne sætter sig på overfladen af fedtdråberne, hvor de skaber adgang for, at et af bugspytkirtlens enzymer, lipasen, kan sætte sig på fedtdråben. Her kan lipasen nedbryde fedtstofferne i mindre bestanddele.

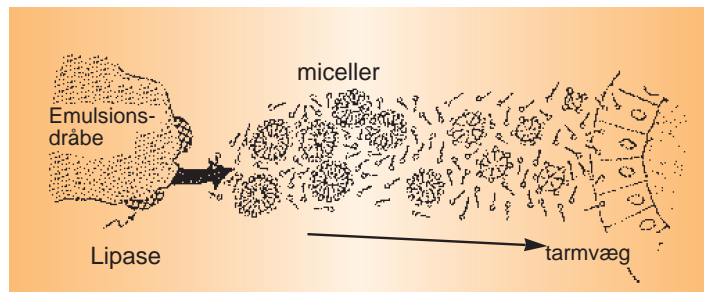
Lipasen nedbryder et triglycerid til et monoglycerid og to frie fedtsyrer. Triglycerider udgør mere end 90% af fedtstofferne i den føde, vi indtager.

Fedtstoffers vej fra tarmen til blodet

Den enzymatiske nedbrydning af triglyceriderne medfører, at fedtdråbens kerne, der primært består af triglycerider, reduceres og til sidst forsvinder, samtidig med at mængden af overfladeaktive stoffer øges.

Nedbrydningsprodukterne, monoglycerider og frie fedtsyrer, danner sammen med galdesalte og fosfolipider miceller, der er runde eller kubiske strukturer med en vandelskende overflade og en fedtelskende kerne. I kernen findes fedtelskende stoffer, som f.eks. vitaminer og tungtopløselige lægemiddelstoffer, som hellere vil finde sig i micellernes indre end i det omgivende vand.

Micellerne diffunderer ind til tarmvæggen, hvor fedtsyrerne og monoglyceriderne optages af tarmcellerne. Inde i cellerne gendannes triglyceriderne ud fra fedtsyrer og



Fedt og tungtopløselige lægemiddelstoffers vej fra en fedtdråbe via miceller til tarmvæggen. Nedbrudt fedt danner miceller, som opløser tungtopløselige lægemiddelstoffer. Micellerne diffunderer ind til tarmvæggen, hvor micellen går i stykker og komponenterne optages af tarmcellerne.



Forsøgsopstillingen i laboratoriet. På billedet ses fra højre reaktionskammer og titratorenhed, der styrer tilsætningen af base. Data opsamlles på en PC, der samtidig styrer titratorenheden.

monoglycerider og vandrer videre via blodbanen eller lymfen.

Vi antager, at det tungtopløselige lægemiddelstof vil vandre fra fedtdråben over i micellerne og ind til tarmvæggen, hvorfra lægemiddelstoffet optages i blodet.

Model til test af lægemiddelstoffer

Vi har udviklet en laboriemodel af fedtdøjelsen til at teste opløsningen af tungtopløselige lægemiddelstoffer. Modellen fremstilles ved at blande bugspytkirtelekstrakt og galdeekstrakt fra grise og derefter tilsætte en olie-i-vand emulsion. Emulsionen svarer til fedtdråberne fra maden. Lipasen fra bugspytkirtelekstraktet nedbryder fedtdråberne til monoglycerider og fedtsyrer. Modellen gør det muligt at følge nedbrydningens forløb.

I første omgang har vi undersøgt to forskellige lægemiddelstoffer; probucol og danazol. Begge stoffer optages let, men har vidt forskellig opløselighed i vand og sojabønneolie.

Ved at fremstille en emulsion med det pågældende lægemiddelstof, er det muligt at følge opløseligheden af lægemiddelstoffet i de strukturer, som dannes under nedbrydningen af fedtdråberne. Vi har udført forsøg, hvor der er udtaget prøver ved 0,50 og 75% nedbrydning af triglyceriderne. 100% svarer til at samtlige triglycerider er spaltet til et monoglycerid og to fedtsyrer. De udtagne prøver er ultracentrifugeret for at fjerne eventuelle rester af emulsionen og opnå en så ensartet prøve som muligt.

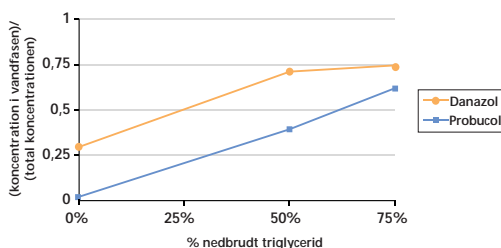
Analyserne viste, at det er muligt at forøge begge stoffers opløselighed i vandfasen væsentligt ved nedbrydning af

triglyceriderne. Men for probucols vedkommende er effekten langt mere markant end for danazol. Det stemmer overens med probucols større opløselighed i sojabønneolie og den meget lave opløselighed i vand. Jo mindre opløselighed i vand, eller jo større opløselighed i olie, jo større effekt har nedbrydningen af triglyceriderne på opløseligheden i vandfasen.

Dette er de første resultater. Efterfølgende skal prøverne yderligere karakteriseres med hensyn til partikelstørrelse, indhold af galdesalte, triglycerider, diglycerider, monoglycerider og fedtsyrer.

En vej til bedre formuleringer

Resultaterne fra modellen af fedtdøjelsen skulle gerne føre til en større viden om de mekanismer, der påvirker biotilgængeligheden af tungtopløselige lægemiddelstoffer. Samtidig skal modellen være et nyttigt værktøj til at teste og kontrollere nye formuleringer. I sidste ende håber vi, at resultaterne fra modellen kan bruges til at forudsige biotilgængeligheden af lægemiddelstoffer fra forskellige formuleringer i mennesker.



Lægemiddelstoffernes opløselighed i modellen af den vandige tarmvæske som funktion af nedbrydningsgraden af triglyceriderne.

Opløselighed		Probuco	Danzol
i vand	mg/l	<0,01	0,6
i sojabønneolie	mg/g	80	5
i vandfase fra model	mg/l	1058	70

Modelstoffernes opløselighed i vand, sojabønneolie og vandfase fra model.



Cand.polyt. Niels Honberg Zangenberg er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



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



Cand.polyt., ph.d. Anette Müllertz er forskningslektor ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm., ph.d. Lars Hovgaard er lektor ved Institut for Farmaci.

Færre injektioner med depotlægemidler

Mange lægemidler til injektion skal indsprøjtes med korte mellemrum. Denne ulempe for patienten kan minimeres ved hjælp af depotlægemidler, hvor medicinen frigives langsomt. Vand-i-olie emulsioner er lovende depoter for lægemidler til injektion.

Af Simon Bjerregaard, Sven Frøkjær, Charlotte Vermehren og Ingrid Söderberg

Tabletter er den mest populære form for lægemidler, men mange lægemiddelstoffer kan ikke indtages gennem munden. Det skyldes f.eks., at de nedbrydes i fordøjelsessystemet af enzymer eller er ude af stand til at passere tarmslimhinden i tilstrækkelige mængder.

Til denne gruppe hører de nye bioteknologiske lægemidler som f.eks. væksthormon, som det er nødvendigt at injicere. Da disse lægemidler ydermere omsættes meget hurtigt i kroppen, vil det ofte være nødvendigt med hyppige injektioner for at opnå en effektiv koncentration i blodet. Alternativt kan lægemidlet injiceres som depotlægemiddel i en muskel eller under huden, hvorefter lægemidlet langsomt frigives fra injektionsstedet. Samtidig undgås meget høje koncentrationer af lægemiddel i blodet, som eventuelt kan virke giftigt.

Nyudviklet vand-i-olie emulsion med depoteffekt

På Institut for Farmaci har vi udviklet en ny depotformulering til injektion i muskler; især med henblik på de vanskelige bioteknologiske lægemidler. Ved at indarbejde lægemiddelstoffet i en vegetabilisk olie i form af en vand-i-olie emulsion opnås en depoteffekt.

Frigivelsen af lægemiddelstoffet fra depotet er afhængig af, at stoffet overføres fra sine fedtholdige omgivelser i emulsionen til et vandigt miljø, nemlig vævsvæskerne omkring depotet. Denne overføring kan til en vis grad styres via valg af hjælpestoffer og forarbejdningsgrad af depotet. Det er således muligt at opnå forlænget afgift i op til flere dage afhængig af den farmaceutiske formulering.

Før et lægemiddelstof, der injiceres i en muskel eller under huden, kan udøve sin effekt, f.eks. på bestemte receptorer, må flere processer have fundet sted. Efter overførslen af lægemiddelstoffet fra depotet til vævsvæsken, må det frigjorte stof diffundere fra vævsvæsken og ud i blodet enten direkte gennem blodkarrenes vægge eller indirekte via lymfesystemet. Derefter må lægemiddelstoffet igen forlade blodet for at nå sit mål, f.eks. en bestemt gruppe af receptorer i et bestemt organ.

Det er den langsomme af disse processer, som bestemmer, hvor hurtigt lægemidlet virker. I praksis er frigivelsen af lægemiddelstof hastighedsbestemmende, såfremt der er tale om en reel depoteffekt. Det betyder, at effekten principielt kan gøres uafhængig af egenskaber som f.eks. blodgennemstrømning på injektionsstedet.

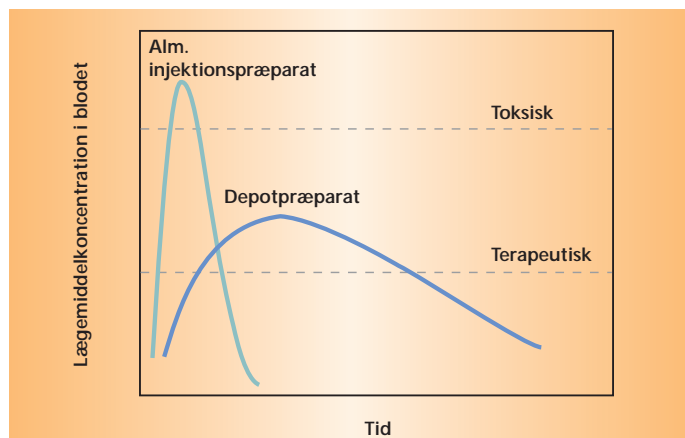
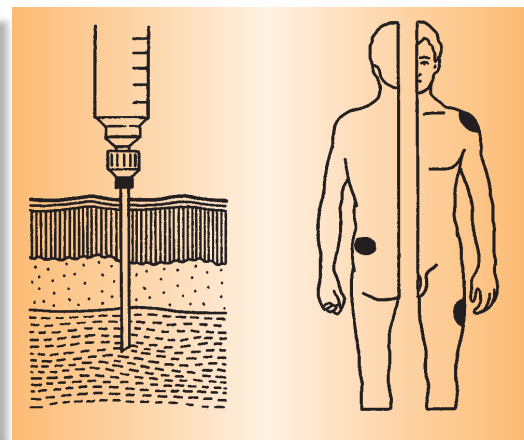
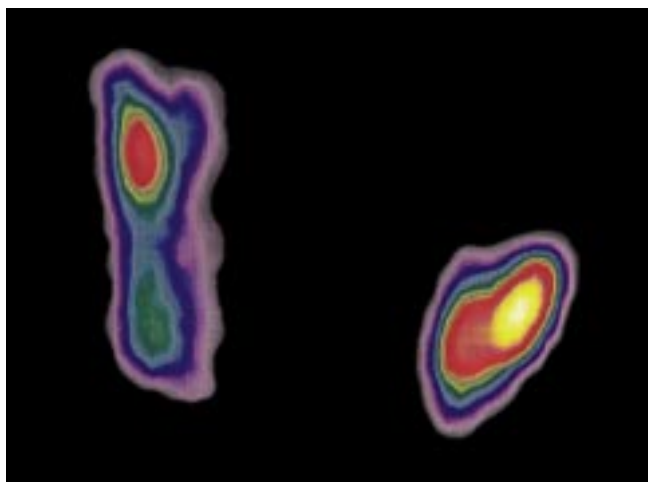


Illustration af depotvirkning. Almindelige injektionspræparater er karakteriseret ved, at lægemiddelstoffet optages hurtigere i blodet end fra depotpræparater. Ved anvendelse af depotpræparater kan en evt. toksisk lægemiddelkoncentration i blodet ofte undgås.



Intramuskulære injektioner foretages i bestemte muskler, hvor sandsynligheden for at beskadige nerver eller ramme større blodkar er minimal. Disse muskler er sorte på tegningen.



Gammabillede af spredning af hhv. en tykflydende og tyndflydende emulsion efter injektion i en kanins venstre og højre lårmuskel. Ved denne type forsøg opnås viden om, hvilke flydeevner oliedepotet skal have for at forblive omkring injektionsstedet.

Mekanismerne bag depotvirkningen

Et af fokusområderne for forskningsgruppen er derfor at forstå de mekanismer, der påvirker frigørelses hastigheden af lægemiddelstof fra et oliedepot i en muskel. Her er det centralt at vide, hvordan oliedepoter spredte sig i musklen. Ved at kunne styre udspreddingen af oliedepotet, er det muligt at kontrollere det areal af depotet, som er i kontakt med muskeltvæv og vævs væske og hermed frigørelses hastigheden af et lægemiddelstof.

Et andet vigtigt område er at opnå en bedre forståelse af, hvordan et oliedepot forsvinder fra en muskel og dermed hvor lang tid, man kan gøre sig forhåbninger om, at depot-effekten varer ved. På nuværende tidspunkt er der kun ringe viden inden for dette område.

Vores studier af spredningen af oliedepoter i muskler er foregået i samarbejde med Afdelingen for Radiofarmaci i Lægemiddelstyrelsen. I disse studier har vi anvendt et radioaktivt stof som markør. Den radioaktive markør indarbejdes i vandet i vand-i-oliedepotet. Med en avanceret stråletæller, et såkaldt gammakamera, kan man herefter følge intensiteten af den radioaktive stråling på injektionsstedet uden at lave indgreb på forsøgsdyret.

Dette har åbenlyse fordele. Dels er metoden skånsom overfor dyret, og dels kan man foretage flere målinger på samme dyr. Herved nedbringes usikkerheden på målingerne, fordi forsøgsdyret kan anvendes som sin egen reference. Ved injektion af oliedepoter, som er mere eller mindre tykflydende, er det muligt at følge forskelle i udspreddingsgraden og udspreddingshastigheden.

De første 2-3 timer efter injektionen spreder oliedepotet sig langs muskelfibrene og især langs de bindevævshinder, der omslutter muskelfibrene. Der bør derfor skelnes mellem spredning i og mellem musklerne. Efter de første 2-3 timer forbliver depotlægemidlet mere eller mindre stationært i en række små depoter rundt omkring langs muskelgrupperne.

Spredningsgraden kan styres ved at anvende mere eller mindre tykflydende oliedepoter. Således spreder tykflydende oliedepoter sig betydeligt mindre end de tyndflydende. Dette afspejles i en lavere afgiftshastighed af lægemiddelstof fra de tykflydende vand-i-olie emulsioner.

Depotlægemidlers levetid kan styres

Oliedepoterne forsvinder med tiden som følge af en kombination af flere processer. Således eksisterer der en balance mellem enzymatisk nedbrydning af olien på injektionsstedet og dræning af emulsionerne via lymfesystemet.

Lymfesystemet består af lymfekar, som i modsætning til blodkarrene er relativt utætte. Herved kan større molekyler og partikler under en vis størrelse, såsom små oliedråber, uhindret drænes væk via lymfævæskens. Partiklerne opfanges undervejs i lymfeknuderne, mens lymfævæskens med det frigivne lægemiddelstof drænes videre til de store centrale vener og dermed tilbage til blodet. Graden af dræning fra lymfesystemet er bl.a. afhængig af muskelbevægelse, fordi lymfævæskens strømmer hurtigere, når musklerne trækkes sammen.

Injektion af et lægemiddel og herunder også en vand-i-olie emulsion vil frembringe en vis immunreaktion i vævet i form af betændelse. Det betyder, at der samtidig med dræning til lymfesystemet også vil forsvinde en del af emulsionen, som fjernes af makrofager og af andre betændelsesceller, der bl.a. udskiller fedtspaltende enzymer. Typen og omfanget af betændelsesreaktionen må i høj grad forventes at bestemme depotets levetid. Hvis depotet kan gøres "usynligt" overfor makrofagerne, må man gå ud fra, at levetiden forlænges.

I vores studier har vi valgt at fokusere på betændelsesreaktionen. Således tager vi vævsprøver efter forskellige behandlinger for efterfølgende at undersøge prøverne for enzymatisk aktivitet. Dette gøres ved at følge den løbende dannelse af fedtsyrer, som er et nedbrydningsprodukt af vegetabiliske olier.

Studierne viser, at der er store forskelle i den enzymatiske aktivitet som følge af de forskellige behandlinger. Dermed bliver det på lidt længere sigt måske muligt at styre forsvindingshastigheden af et oliedepot - og dermed frigørelsen af lægemiddelstoffet - via kroppens egne oprydningmekanismer.



Cand.pharm Simon Bjerregaard er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Lic.pharm. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.



Lic.pharm. Charlotte Vermehren er adjunkt ved Institut for Farmaci.



Lic.scient Ingrid Söderberg er videnskabelig medarbejder ved H. Lundbeck A/S.

Nye virkninger af gamle hormoner

Den klassiske virkning af steroider er som hormoner med betydning for bl.a. forplantningen. De senere års forskning har vist, at steroider kan have en effekt på receptorer i hjernen. Også receptorer i hypofysebaglappen bliver påvirket af disse steroider. Denne mekanisme kan spille en rolle i for tidlige fødsler.

Af Suzanne Hansen, Uffe Kristiansen og Bjarne Fjalland

Steroider er en gruppe kemiske stoffer, som syntetiseres i kroppen af bl.a. binyrerne og kønskirtlerne. Mange af steroiderne virker som hormoner, og flere af kroppens vigtigste hormoner er steroider; f.eks. kønshormonerne.

Det har længe været kendt, at steroiderne udøver deres effekt inde i cellerne, hvor de påvirker receptorer på cellekernen og derigennem aktiverer gener. Resultatet er, at cellens produktion af proteiner reguleres, hvorved steroiderne udøver deres effekt på bl.a. forplantningen.

Nyere forskning viser imidlertid, at nogle steroider er i stand til at påvirke nervecellerne i hjernen. Det sker ved, at steroiderne binder sig til nervecellernes receptorer for signalstoffer, som befinder sig i cellemembranerne. Denne gruppe af steroider kaldes neuroaktive steroider, og deres

virkninger adskiller sig på flere måder fra de øvrige steroiders effekter på cellekernen. De steroider, som påvirker cellekernen, er inaktive på receptorerne i nervecellernes membraner.

Samtidig er virkningsmekanismerne for de to typer steroider vidt forskellige. Mens effekterne på cellekernen først viser sig efter timer til dage, virker de neuroaktive steroider øjeblikkeligt i løbet af sekunder til minutter.

Neuroaktive steroider er bl.a. i stand til at modulere receptorerne for hjernens vigtigste hæmmende signalstof, gamma-aminosmørsyre (GABA), samt for det vigtigste stimulerende signalstof, glutaminsyre. Steroidernes virkning på disse receptorer tyder på, at de spiller en rolle i finmoduleringen af den kemiske og elektriske signalering i hjernen.

Påvirker receptorer på nervecellerne

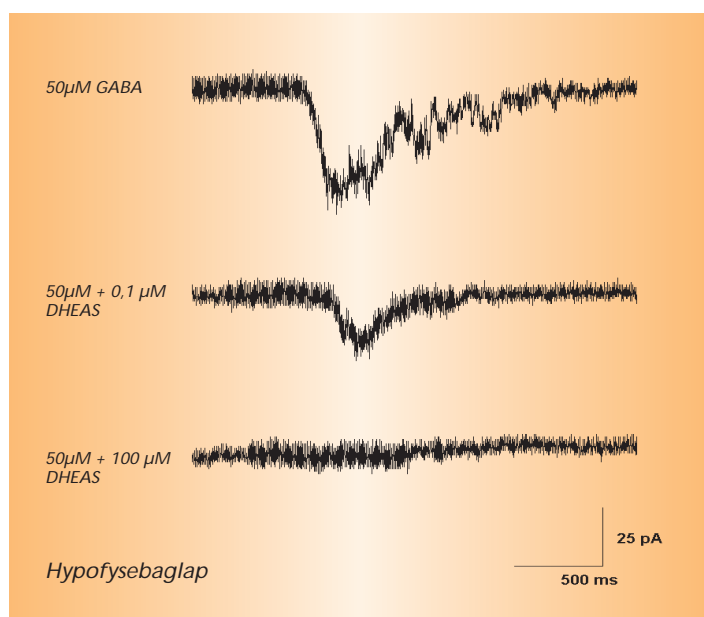
GABA-receptorer findes i de fleste celletyper i hjernen. Der eksisterer flere forskellige typer af receptorer for GABA, men fælles for dem er, at en stimulation af receptorerne fører til en dæmpet aktivitet i modtagercellen. Omvendt fører en hæmning af GABA-receptorerne til en øget aktivitet i modtagercellen.

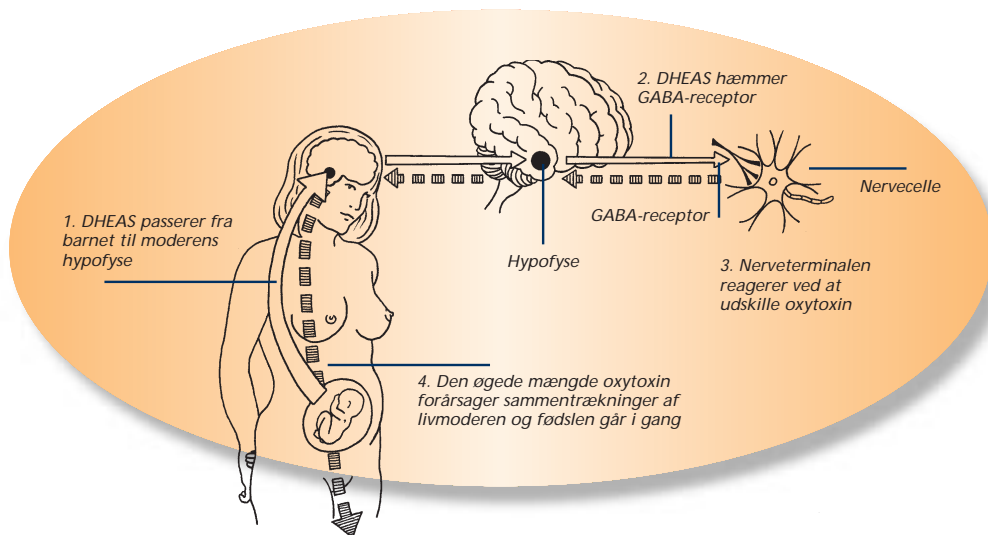
Det er blevet påvist, at neuroaktive steroider er i stand til enten at stimulere eller hæmme GABA-receptorerne, og det er gennem disse receptorer, at steroiderne formodes at udøve deres indflydelse på vores adfærd, samt deres angst-dæmpende, smertestillende og krampedæmpende virkninger.

Det neuroaktive steroid dehydroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) har en hæmmende virkning på GABA-receptoren, og DHEAS menes at have en positiv indvirkning på bl.a. udvikling, hukommelse og indlæring. Samtidig menes DHEAS at modvirke ældelsesprocesser i kroppen, og i USA sælges DHEAS i håndkøb som en "foryngelseseliksir".

I lighed med andre strukturer i hjernen indeholder hypofysebaglappens nerveender også GABA-receptorer. Herfra udskilles der to hormoner, vasopressin og oxytocin, som inden da er dannet i den nærliggende hjernedel hypothalamus og transporteret til nerveenderne i hypofysebaglappen. Den klassiske virkning af vasopressin er, at hormonet øger reabsorptionen af vand i nyrerne, således at urinnmængden mindskes og kroppens væskebalance bevares. Hormonet oxytocin er vigtigt i forbindelse med fødsel og amning.

Data som viser den koncentrationsafhængige hæmning af GABA aktiviteten på hypofysebaglappens GABA-receptorer. Øverst er vist aktiviteten som følge af tilsætning af 50 μM GABA. I midten er vist at 0,1 μM DHEAS hæmmer GABA aktiviteten med ca. 50%, og nederst, at 100 μM DHEAS hæmmer GABA aktiviteten fuldstændigt.





Kan DHEAS føre til for tidlig fødsel?

Oxytocin forårsager sammentrækningerne af livmoderen under fødslen, som er medvirkende til at presse barnet ud. Ved amning vil barnets stimulation af brystvorten sende et signal til hjernen, og som svar frigøres der oxytocin, som virker sammentrækkende på mælkekanalerne i brystet og som resulterer i mælkesekretionen.

Tidligere studier har vist, at påvirkning af GABA-receptorerne i hypofysebaglappen modulerer sekretionen af oxytocin og vasopressin. Vi satte os for at undersøge DHEAS' mulige virkning på disse receptorer. Denne interesse var afstedkommet af en hypotese om, at DHEAS kan have en rolle ved for tidlige fødsler.

Under graviditeten producerer fosteret DHEAS, som er vigtigt for fosterets udvikling. DHEAS kan passere fra fosteret over til moderen, og der er blevet målt forhøjede koncentrationer af DHEAS i moderens blod under stresspåvirkninger af fosteret. Endvidere er det kendt, at stress under graviditeten kan føre til en for tidlig fødsel. Hypotesen går så ud på, at det stressede foster udskiller DHEAS, som passerer over til moderen. Her vil DHEAS hæmme GABA-receptorerne i hypofysebaglappen, hvilket kunne føre til en øget udskillelse af oxytocin, som kunne sætte fødslen i gang i utide.

Forsøg med rottehypofyse

Vi gav os derfor til at undersøge, om DHEAS var i stand til at påvirke GABA-receptorerne i hypofysebaglappen, og om denne påvirkning kunne finde sted med koncentrationer af DHEAS, som svarer til niveauet i kroppen.

Dette blev gjort ved at lave nogle meget tynde snit (80 μM) af hypofysebaglappen fra rotter. Ved at stikke en meget

tynd elektrode ind i en nerveende kan man måle GABA-receptorens aktivitet, og således også måle, om et stof stimulerer eller hæmmer receptoren.

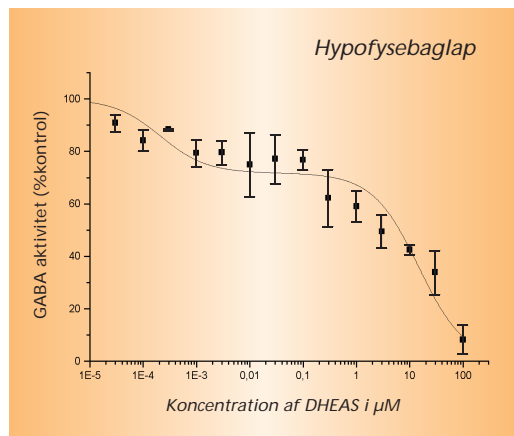
Forsøgene viste, at DHEAS hæmmer GABA-aktiviteten op til 100 procent afhængig af koncentrationen af DHEAS. Dermed er det altså vist, at DHEAS er i stand til at påvirke aktiviteten af GABA-receptorer i hypofysebaglappens nerveender selv ved meget lave koncentrationer.

Ud fra en sådan forsøgsrække kan man tilpasse en passende teoretisk model til sine data og bruge modellen til tolkning af resultaterne. På den måde kan man få et bud på, hvor mange bindingssteder der er på receptoren, hvor stor en del af aktiviteten hvert bindingssted er ansvarlig for, samt hvor stor en koncentration der skal til for at hæmme 50% af receptorens aktivitet. Denne såkaldte EC_{50} -værdi er et udtryk for, hvor kraftigt stoffet virker, dvs. jo lavere EC_{50} -værdi desto kraftigere virker stoffet. Det er bl.a. disse værdier man bruger til at sammenligne virkningen af forskellige lægemidler.

Tilpasningen til de eksperimentelle data tyder på, at der er to bindingssteder for DHEAS på receptoren. Modelberegningerne viser, at det første bindingssted, som er ansvarlig for knap en trediedel af hæmningen af GABA-aktiviteten har en EC_{50} værdi, som er næsten 100.000 gange lavere end det andet bindingssteds.

For at finde ud af om denne grad af hæmning er fysiologisk relevant, sammenlignede vi de opnåede EC_{50} -værdier med de koncentrationer af DHEAS, som normalt er tilstede i kroppen. I mennesker findes typisk en koncentration af DHEAS, som er tusinde gange større end hos rotter. Her viser forsøgsresultaterne, at DHEAS i fysiologiske relevante koncentrationer i en vis udstrækning vil være i stand til at hæmme aktiviteten af GABA-receptorerne.

Som tidligere nævnt er koncentrationen af DHEAS forhøjet under stresspåvirkninger, hvorved en større del af GABA-receptorernes aktivitet vil være hæmmet. Det kunne tænkes at føre til en øget sekretion af oxytocin og deraf mulige følgende virkninger såsom for tidlig fødsel. Yderligere undersøgelser må dog gennemføres, før hypotesen kan bekræftes.



Koncentrationsvirknings-kurve for DHEAS. De eksperimentelt opnåede værdier er vist som firkanter (middelværdier) med der til hørende spredninger, og den optrukne linie viser den bedste tilnærmelse til en teoretisk model. Figuren viser at selv ved meget lave koncentrationer af DHEAS ($\sim 10 \text{ pM}$) ses en hæmning af GABA aktiviteten. Endvidere antyder det bifasiske kurveforløb, at der er to bindingssteder for DHEAS på receptoren.



Ph.d. Suzanne Hansen er amanuensis ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Uffe Kristiansen er lektor ved Institut for Farmakologi.



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

Regulering af hjertets blodkar ved kredsløbsslidelser

Flertallet af befolkningen rammes på et eller andet tidspunkt af for højt blodtryk eller åreforkalkning, som i værste fald kan medføre alvorlige og livstruende sygdomme. Måske kan undersøgelser af kroppens egen forsvarsreaktion føre til nye behandlingsformer.

Af Niels Chresten Berg Nyborg og Majid Sheykhzade

Den største del af befolkningen rammes på et eller andet tidspunkt i deres liv af en kredsløbsslidelse i form af forhøjet blodtryk eller åreforkalkningsrelaterede hjertesygdomme såsom hjertekramper, blodpropper i hjertet og hjertepumpesvigt. Ofte hænger disse forskellige kredsløbsslidelser sammen i et komplekst samspil.

De åreforkalkningsrelaterede hjertesygdomme forårsager ofte en indskrænkning i patienternes fysiske formåen, og sygdommene belaster samfundøkonomien med store omsorgsudgifter. Derfor har behandlingsformer, som sigter på at nedbringe risikoen for udvikling af åreforkalkning, altid været højt prioriterede i sundhedssektoren og den farmaceutiske industri.

Blandt de nyere behandlingsformer, som bidrager væsentligt til at nedsætte risikoen for blodpropper, kan bl.a. nævnes lavdosisbehandling med acetylsalicylsyre, kolesterolsænkende lægemidler, betablokkere, angiotensin convertering enzyme (ACE)-inhibitorer, by-pass operationer og ballonudvidelse af hjertets store blodårer. Fælles for alle behandlingsformerne gælder, at de søger at opretholde en tilstrækkelig blodforsyning til hjertemuskulaturen, så balancen i stofskiftet opretholdes.

Sensoriske nerver med dobbelt funktion

Når blodgennemstrømningen til hjertet nedsættes uden en

samtidig reduktion af iltbehovet, eller når iltbehovet øges uden samtidig stigning i blodgennemstrømningen, opstår der iskæmi, dvs. iltmangel, i dele af hjertemuskulaturen. Iltmanglen nedsætter hjertemuskulaturens evne til at trække sig sammen, og dermed svækkes hele hjertets pumpefunktion. Resultatet er, at blodforsyningen til både hjertet og andre vitale organer som centralnervesystemet og nyrerne reduceres, hvilket i værste fald kan være livstruende.

Den iskæmiske tilstand i hjertemuskulaturen leder også til et fald i pH, som aktiverer de sensoriske nerveender, der findes i musklerne i hjertets forkammer, samt omkring de blodårer, som forsyner ventrikelmuskulaturen. Ved aktiveringen af de sensoriske nerveender frigives nervecellernes signalstoffer, calcitonin genrelateret peptid (CGRP) og substans P.

Der optræder stærke smerter, som igen leder til angst, hvilket i sidste ende øger det sympatiske nervesystems aktivitet. Den nedsatte pumpefunktion medfører en reflektorisk øget aktivitet i det sympatiske nervesystem, som kan udløse alvorlige arytmier. Således dør omkring 30 procent af patienterne med blodpropper i hjertet, inden de når at blive bragt til hospital, og yderligere ca. 30 procent dør indenfor de første dage efter indlæggelsen.

Man kan således sige, at aktiveringen af det sensoriske nervesystem ved hjerteiskæmi har en dobbelt funktion. Ud over at lede til en bevidst opfattelse af smerter i hjertet, medfører frigivelsen af CGRP også to fysiologisk gavnlige virkninger under iskæmitilstande. Dels har CGRP en kraftig positiv virkning på hjertets pumpefunktion, og dels har CGRP en meget potent afslappende virkning på de store hjerteblodårer, således at blodforsyningen til ventrikelmuskulaturen om muligt kan genoprettes.

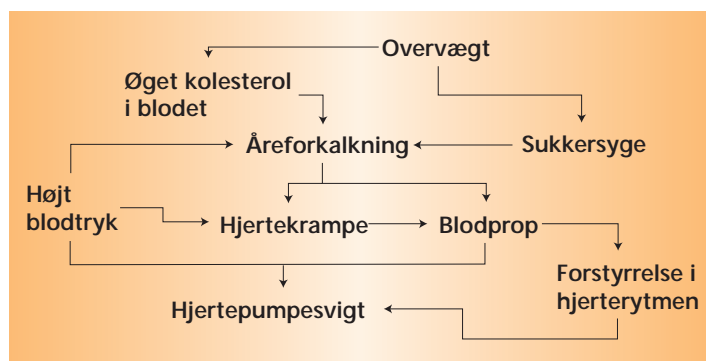
Receptorer for signalstoffet CGRP

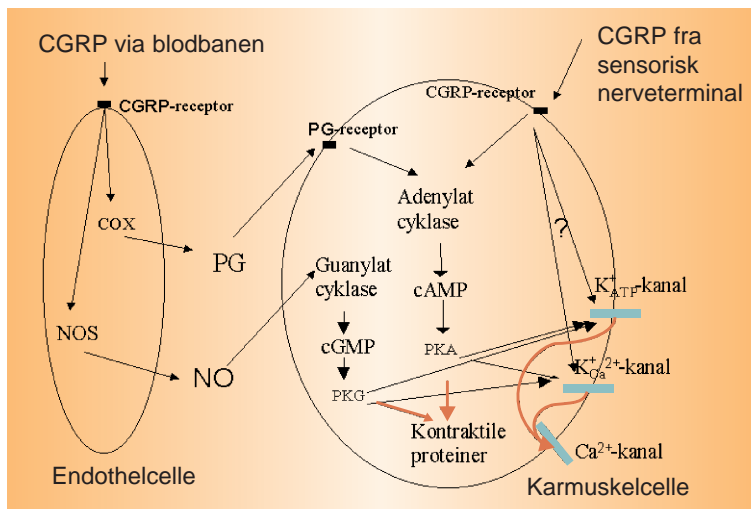
Signalstoffet CGRP er et peptid, dvs. et lille protein, som består af 37 aminosyrer, og stoffet findes i to varianter, som kaldes α -CGRP og β -CGRP. CGRP minder strukturelt om to andre peptider, amylin og adrenomedullin. Ydermere har disse to peptider også stor lighed med CGRP, når det gælder rækkefølgen af de aminosyrer, som peptiderne er opbygget af.

Det er vanskeligt at lave en farmakologisk karakterisering af receptorerne for CGRP, amylin og adrenomedullin. For det første er receptorerne ikke særligt selektive overfor peptiderne, og for det andet råder vi ikke over stoffer, som tilstrækkeligt selektivt kan aktivere eller blokere for receptorerne.

Receptorer, som binder signalstoffet CGRP er nu klonet

Skemaet viser sammenhængen mellem forskellige hjerte-karsygdomme, som ofte influerer på hinanden.





Mulige virkningsmekanismer for CGRP i blodkar. De røde pile viser reaktionsveje med hæmmende virkning. COX = cyklo-oxygenase. NOS = nitrogenoxid syntase. PG = prostaglandin. NO = nitrogenoxid. cGMP = cyklisk guanosin monofosfat. cAMP cyklisk adenosin monofosfat. PKA = proteinkinase A. PKG = proteinkinase G.



Dr.med. Niels Chresten Berg Nyborg er professor ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Majid Sheykzade er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.

fra forskellige dyrearter, herunder mennesket. Samtlige receptorer sidder i cellemembranen, hvor de aktiverer G-proteiner, som så sætter gang i en reaktionskaskade inde i cellerne. Alle receptorerne har da også en klassisk 7-transmembran G-proteinkoblende opbygning.

CGRP-receptorer er påvist i muskulaturen i hjertes forkommer samt i blodårerne på hjertets overflade og i det indre af hjertet. I de ydre blodårer findes der CGRP-receptorer på både karmuskulceller og på endothelceller, hvor en aktivering leder til frigivelse af signalstoffet nitrogenoxid (NO). I de små blodårer i hjertet findes CGRP-receptorerne udelukkende på karmuskulcellerne.

Der findes flere udgaver af CGRP-receptorer, men vores undersøgelser af receptorerne og deres virkningsmekanismer i hjertets blodårer hos rotter har vist, at der udelukkende findes CGRP1-receptorer på karmuskulcellerne i hjertets små blodårer. Disse receptorerers virkningsmekanisme er kompleks, men når de stimuleres af CGRP, er resultatet en karafslapning dels via en nedsat intracellulær koncentration af calcium, og dels via en nedsat følsomhed for calcium i de proteiner, som trækker karcellerne sammen.

Forbindelse til sukkersyge

Ved karakteriseringen af CGRP-receptor undertypen i hjertets små blodårer hos rotter har vi meget overraskende fundet, at amylin, som normalt stimulerer receptorerne meget svagt, har en hæmmende effekt på receptorerne, når effekten af CGRP undersøges.

Dette bringer et meget interessant aspekt op omkring CGRP receptorer og type-II diabetes, der også kendes under betegnelsen gammelmandssukkersyge. Her optræder der en øget koncentration af amylin i blodplasmaet samt aflejringer af amylin i blodkarrene. Vores undersøgelser tyder derfor på, at iltmangel i hjertemuskulaturen ikke bliver reguleret godt

nok ved denne sygdom. Kliniske studier viser også, at den relative risiko for at dø af blodpropper i hjertet er forøget hos patienter med type II diabetes i forhold til normalbefolkningen.

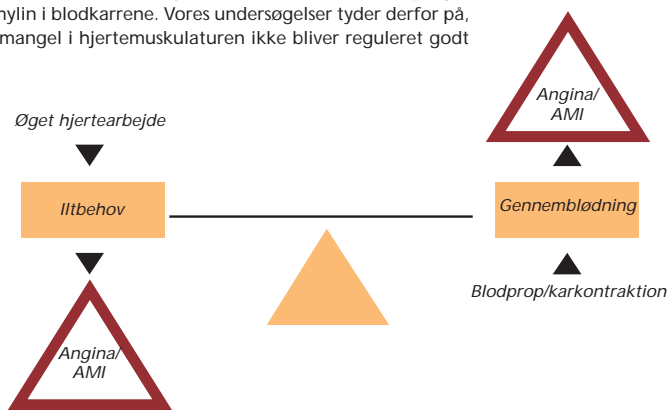
CGRP som muligt lægemiddelstof

Selv om CGRP har en positiv virkning på hjertets pumpefunktion og en afslappende virkning på de små hjerteblodårer, er signalstoffet ikke umiddelbart egnet som et lægemiddel til behandling af hjertepumpesvigt, hjerteiskæmiske tilstande og forhøjet blodtryk. Det skyldes, at CGRP er et peptid, som hurtigt nedbrydes i kroppen.

Et andet stort problem ved anvendelse af CGRP er, at CGRP-receptorerne findes i alle kroppens blodårer, hvilket medfører at blodtrykket falder voldsomt ved for stor indgift af CGRP. Derudover har CGRP også i lighed med amylin en hæmmende virkning på insulin, hvilket leder til en relativ insulin-resistens.

Det er dog muligt, at der ved visse sygdomstilstande sker ændringer i CGRP-receptorernes funktion, hvilket kan medføre en bedre virkningsprofil for CGRP. Således har infusion af CGRP til patienter med alvorlige hjertepumpesvigt vist meget lovende resultater, idet pumpefunktion og dermed også den fysiske tilstand blev kraftigt forbedret, uden at blodtrykket faldt hos denne patientgruppe. Yderligere viste undersøgelserne, at nyrefunktionen også blev bedre.

Under alle omstændigheder er udviklingen af stabile og hjerte-selektive CGRP-analoger dog nødvendig for at kunne introducere en ny behandlingsform for patienter med hjertesygdomme.



Figuren viser balancen mellem hjertets iltbehov og gennemblødningen. Ved øget hjertearbejde stiger iltbehovet i hjertemuskulaturen, og hvis dette ikke modsvarer af en øgning i gennemblødningen udvikles der hjertekramper (angina pectoris) eller blodpropper (akut myokardieinfarkt). De samme sygdomme kan opstå, hvis gennemblødningen nedsættes uden at iltbehovet reduceres; f.eks. p.g.a. sammentrækning af blodårerne.

Nitrogenoxid som mulig modgift mod cyanid?

Gennem mange år er cyanidforgiftning blevet behandlet med en cocktail af tre modgifte, men virkningsmekanismen er ikke fuldt forstået. Nye forsøg med cellekulturer tyder på, at nitrogenoxid spiller en vigtig rolle i afgiftningen.

Af Mads Skak Jensen og Erling Sonnich Thomsen

Cyanid er et af de klassiske giftstoffer, der måske bedst er kendt under navnene blåsyre eller cyankalium. Cyanider er ekstremt giftige og hurtigtvirkende; der er ofte tale om minutter, før døden indtræder. Udover de mere dystre anvendelsesområder som brug til mord og selvmord, benyttes cyanid også til et utal af fredelige anvendelser, f.eks. metalforarbejdning, produktion af syntetisk gummi og plastic, organisk syntese osv.

Cyanidforgiftning forekommer ikke sjældent, om end antallet af cyanidrelaterede dødsfald i Danmark på årsplan formentlig er ret begrænset. Størst forgiftningsrisiko er der naturligvis ved direkte håndtering af cyanider, men også brandrøg udgør en stor potentiel risiko, specielt når der er tale om nitrogenholdige syntetiske materialer. En yderligere komplikation er, at en sådan brandrøg ofte også indeholder kulilte. I USA er cyanid sammen med kviksølv, arsen og bly de uorganiske stoffer, der hyppigst er involverede i forgiftninger, hvorfor en hurtig og effektiv behandling med modgift er uhyre væsentlig.



Nerveceller fra kyllingefostre er blevet anvendt til at undersøge effekten af nitrogenoxid på cyanidforgiftning. Her ses kyllingefostrene umiddelbart efter udtagning fra æggene.

Virkningsmekanismen klarlagt - troede man...

I cellerne binder cyanid sig til enzymet cytochrom-c-oxidase og hæmmer derved sidste led i respirationskæden. Det bevirker, at cellerne ikke kan udnytte ilten i blodet, selv om der er rigeligt med ilt tilstede.

Den traditionelle modgiftsbehandling omfatter amylnitrit til inhalation efterfulgt af intravenøs indgift af natriumnitrit og natriumthiosulfat. Amylnitrit og natriumnitrit omdanner blodets hæmoglobin, der sørger for ilttransporten til kroppens organer, til methæmoglobin, som ikke er i stand til at transportere ilt, men som derimod binder cyanid, hvorved cytochrom-c-oxidase genaktiveres. Hermed er cyanid bundet i en ugiftig form, hvilket giver kroppens egne afgiftningsmekanismer bedre tid til at klare forgiftningen. Funktionen af det sidste stof i den modgiftscocktail, der anvendes, nemlig natriumthiosulfat er at supplere kroppens egne lagre af svovlforbindelser.

Denne behandling har med held været brugt i mange år. Problemet er blot, at amylnitrit i den normale dosering ikke er i stand til at danne klinisk effektive mængder af methæmoglobin. Men behandlingen virker, oven i købet inden den beskedne mængde methæmoglobin er dannet, hvorfor der må være en anden, yderligere effekt.

Dette betyder, at tendensen til at forklare cyanids virkningsmekanisme som værende udelukkende hæmning af cytochrom-c-oxidase, er oversimplificeret.

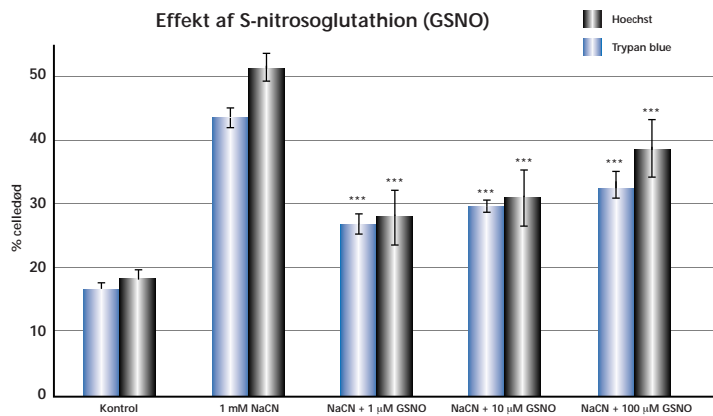
Hvilken rolle spiller nitrogenoxid?

Amylnitrit frigiver det lille signalmolekyle nitrogenoxid, der de seneste år er fundet at spille en betydelig rolle i en lang række biologiske processer. Høje koncentrationer af nitrogenoxid anses normalt at være giftigt for cellerne, men alligevel kunne dette stof tænkes at spille en væsentlig rolle for amylnitrits virkning som modgift mod cyanid.

For at undersøge nitrogenoxids rolle er en model med nerveceller fra kyllinger blevet anvendt. Rugeæg inkuberes i syv dage, hvorefter forhjernen udtages af kyllingefostrene. Hjernehalvdelen renses og homogeniseres og udsås derefter i cellekulturflasker. Dette giver en ren nervecellekultur, der er klar til brug efter fem dage. Typisk tilsættes så et medium med natriumcyanid, samt et af de stoffer der ønskes undersøgt, og efter endt inkubering undersøges effekten af det testede stof ved f.eks. at bestemme antallet af celler med ødelagt cellemembran.

Dette kan gøres på flere forskellige måder, men vi anvendte farvning med trypanblåt. Som navnet antyder, har trypanblåt en meget kraftig blå farve, der tillader, at man skelner mellem celler med beskadiget cellemembran, der er farvet blå, og intakte celler, der er i stand til at holde trypanblåt udenfor.

Forskellige donorer af nitrogenoxid er undersøgt ekspe-



Stoffer, der frigiver nitrogenoxid (NO), er blevet testet for deres beskyttende effekt mod cyanidforgiftning. På grafen er vist den beskyttende effekt af 10-100 µM S-nitrosoglutathion.



Cand.pharm. Mads Skak Jensen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



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

rimentelt. Resultaterne viser, at nitrogenoxid i små koncentrationer har en betydelig beskyttende effekt, lige meget hvilken donor det er frigivet fra, mens højere koncentrationer er toksiske.

At høje koncentrationer er toksiske er ikke overraskende, men at der ses en beskyttende effekt ved lave koncentrationer kunne underbygge hypotesen om en alternativ mekanisme for amylnitrits effekt. Da de samme stoffer ingen effekt har, hvis opløsningerne står til dagen efter, hvor nitrogenoxid er fuldstændigt forsvundet, styrkes hypotesen om, at det er nitrogenoxid, der er ansvarlig for den beskyttende effekt.

Mulige forklaringer på NO's gavnlige virkning

Da en række donorer af nitrogenoxid med forskellig mekanisme for frigivelsen af nitrogenoxid viser sig at have effekt, er det vanskeligt at komme med et entydigt bud på en virkningsmekanisme. Dog tyder både resultater fra denne undersøgelse samt undersøgelser publiceret i litteraturen på, at NMDA-receptoren kan være involveret. NMDA-receptoren er en receptor for signalstoffet glutaminsyre, som er involveret i kommunikationen mellem nervesystemets celler. Cyanid er tidligere vist at kunne aktivere NMDA-receptoren både indirekte og direkte, hvilket muligvis spiller en større rolle i cyanids toksicitet end tidligere antaget. Desuden er stoffer, som blokerer NMDA-receptoren, i stand til at yde en signifikant beskyttende effekt mod cyanidforgiftning.

En mulig, om end en smule kontroversiel, sammenhæng mellem nitrogenoxid og NMDA-receptoren kunne være binding af nitrogenoxid til thiolgrupper, hvorved receptoren hæmmes og en beskyttende effekt opnås. I denne undersøgelse findes faktisk et ophør af nitrogenoxids effekt, hvis cellerne behandles med dithiotreitol, der reducerer thiolgrupper, inden natriumcyanid tilsættes.

Billedet bliver imidlertid yderligere kompliceret, når cyanids virkningsmekanisme undersøges nærmere. Det viser sig nemlig, at en meget stor del af cellerne dør på en måde, der kan karakteriseres som apoptotisk. Apoptose, eller programmeret celledød, er en slags selvmordsprogram, der aktiveres ved et givent signal, og får cellen til at pakke sig pænt sam-

men, hvorefter den fjernes uden at påvirke de omkringliggende celler.

Bekræftelse af apoptotisk celledød er foregået ved detaljeret undersøgelse af cellerne med elektronmikroskop, samt farvning af cellernes DNA med Hoechst 33258. Resultaterne fra denne undersøgelse viser, på linie med de andre udførte forsøg, at lave koncentrationer af nitrogenoxid giver en betydelig beskyttende effekt mod cyanid.

En sammenhæng mellem nitrogenoxid og apoptose er tidligere beskrevet, men effekten af nitrogenoxid viser sig at være tvetydig, da både pro-apoptotiske og anti-apoptotiske effekter af nitrogenoxid er påvist. Igen kan en mulig forklaring være koncentrationen af nitrogenoxid, idet lave koncentrationer kan være beskyttende, mens høje fremkalder apoptose.

En foreslået mulig kontroversiel mekanisme er hæmning af proteiner af typen caspaser, der spiller en afgørende rolle for gennemførelse af programmeret celledød, kombineret med induktion af det anti-apoptotiske protein Bcl-2.

Alternativer til amylnitrit

En konsekvens af disse resultater kunne være, at man erstatter amylnitrit med en anden donor for nitrogenoxid. Amylnitrit skal gives ved inhalation fra små glasrør, der knækkes, hvorefter amylnitrit fordampes. Dette vanskeliggør i høj grad en korrekt og ensartet dosering, hvorfor en nitrogenoxid-donor som nitroglycerin med fordel vil kunne anvendes i stedet.

Dette stof gives som små tabletter, der lægges under tungen, hvorved det aktive stof optages gennem mundslimhinden. Ganske vist danner nitroglycerin kun beskedne mængder methæmoglobin, således at den beskyttende virkning heraf mistes, men samtidig opnås flere fordele.

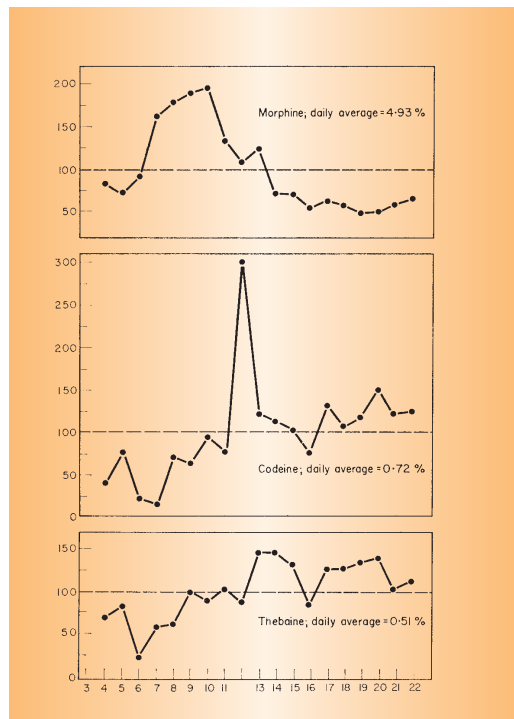
For det første er det en fordel ved en røgforgiftning, hvor kullilten binder en del af blodets hæmoglobin, at man undgår at binde yderligere hæmoglobinmængder med henblik på methæmoglobindannelse for at modvirke cyanidvirkning fra røgen. For det andet giver nitroglycerintabletter en yderligere behandlingsfrist, nemlig de minutter der går, mellem at åndedrættet ophører og kredsløbet svigter.

Opiumvalmuen - døgnsvingninger og morfinproduktion

Koncentrationen af morfin i opiumvalmuens mælkesaft svinger mere end 100 procent i løbet af et døgn med maksimale niveauer i dagtimerne. Nye undersøgelser peger på, at morfin er et akkumuleret slutprodukt i plantens stofskifte - ganske som man mente for 35 år siden.

Af Kim Itenov og Per Mølgaard

Indenfor planteriget er døgnsvingninger som resultatet af den lyststyrede fotosyntese den mest udbredte årsag til døgnvariationer i koncentrationen af de stofskifteprodukter, som planterne danner. Siden begyndelsen af 1960'erne har svingninger i indholdet af kvælstofholdige stofskifteprodukter, specielt alkaloider, været genstand for intense studier.



Den centrale figur i den klassiske afhandling af Fairbairn & Wassel (1964), som er baggrunden for antagelsen at alkaloidindholdet svinger voldsomt inden for døgnet. Figuren er gentaget i et stort antal review-artikler og lærebøger og er aldrig blevet betvivlet.

I opiumvalmuen, *Papaver somniferum*, forekommer alkaloiderne i mælkesaften i en speciel celletype, mælkekærerne, hvor stofferne akkumuleres i små sække, der kaldes vesikler. Døgnsvingninger i alkaloidkoncentrationen i mælkesaften af de økonomisk vigtige opiumalkaloider morfin, codein og thebain er tidligere blevet påvist med udsving på mere end 200 procent for codein og mere end 100 procent for morfin og thebain. Det skete i en klassisk artikel, som blev offentliggjort af Fairbairn og Wassel i 1964.

Fairbairn og Wassel tolkede de store svingninger i koncentrationen som resultatet af en hurtig omsætning af alkaloiderne i en irreversibel biokemisk proces, som går fra thebain over codein til morfin. Resultaterne var epokegørende og medførte, at tidligere antagelser, der gik ud på, at morfin udgjorde et akkumuleret affaldsprodukt i planten, blev forkastet.

Fairbairns forskergruppe ved University of London forsøgte efterfølgende at forklare morfins forsvinden ved blandt andet at antage, at alkaloiderne indgår i plantens energistofskifte og proteinsyntese, eller aflejres i frøene som en bundet form.

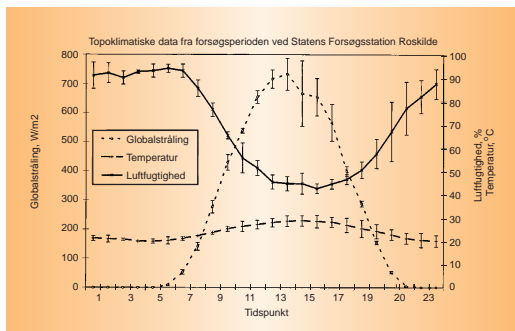
Hvis den opstillede hypotese om hurtig omsætning af opiumalkaloiderne er korrekt, har indsamlingstidspunktet og håndteringen af stoffet en afgørende betydning for alkaloidindholdets kvalitative og kvantitative sammensætning. Det gælder både, når der er tale om indsamling af råopium på traditionel vis og ved høst af valmuestrå til industriel ekstraktion.

Vore nye undersøgelser tyder imidlertid på, at den oprindelige teori - at morfin er et akkumuleret affaldsprodukt - er rigtig. Svingningerne i koncentrationen af morfin i mælkesaften kan i stedet forklares ud fra døgnvariationer i vandindholdet i planten. Der er hele tiden den samme totale mængde morfin, men koncentrationen svinger, fordi vandindholdet i mælkesaften varierer som en funktion af vandoptagelse og fordampning.

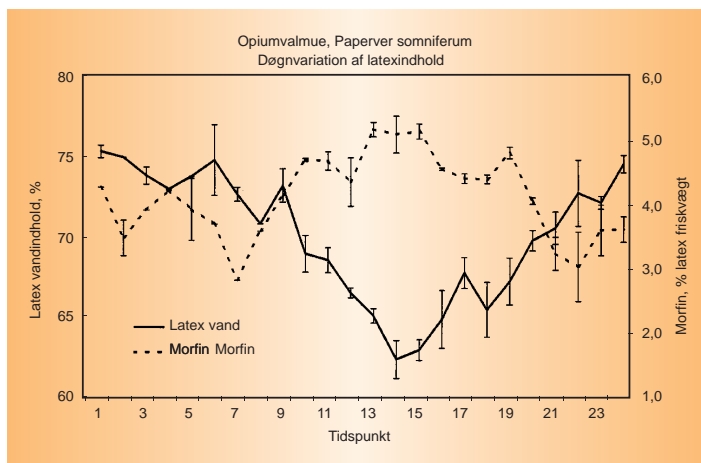
Morfins skæbne i valmuens stofskifte

For at afdække mysteriet om morfins skæbne i valmuens stofskifte har Danmarks Jordbrugsforskning og Danmarks Farmaceutiske Højskole i fællesskab udført en række dyrkningsforsøg med opiumvalmuen, der dels beskriver alkaloidudbyttet under danske klimaforhold, og dels gentager de tidligere forsøgsserier under anvendelse af forbedrede kemiske analysemetoder.

For at kunne beskrive de temperaturafhængige enzymprocessers reaktionshastighed i planten mere præcist blev dyrkningsforsøgene udlagt i nær tilknytning til en automatisk klimastation, der hvert tiende minut registrerer de vigtigste klimaparametre. Fra de umodne kapsler blev der i en 48-timers periode hver time i døgnet tappet mælkesaft, som



Døgnsvingninger for de parametre, der styrer fordamningen i den forsøgsperiode, hvor morfinkoncentrationen er målt.



Døgnsvingninger i morfinkoncentrationen i mælkesaften af opiumvalmue under danske klimaforhold. Der er samme totale mængde til stede hele tiden, men koncentrationen svinger, fordi vandindholdet varierer som funktion af vandoptagelse og fordampning.

blev analyseret for indholdet af vand og tørstof.

Tørstoffet i mælkesaften blev efter ekstraktionen analyseret for indhold af hovedalkaloiderne morfin, codein, thebain, noscapin og papaverin. Analyserne blev udført ved hjælp af højtryksvæskekromatografi (HPLC). Vores analyseresultater har stor lighed med den tidligere engelske undersøgelse, hvad angår døgnsvingningerne, og viste et maksimalt indhold af alkaloider midt på dagen og et lavt indhold om natten.

Efterfølgende dynamisk modelsimulering af analyseresultaterne og de dertil svarende klimadata viste imidlertid, at svingningerne i koncentrationen af thebain, codein og morfin ikke kunne forklares ved en irreversibel biokemisk proces. Derimod viste en statistisk analyse af resultaterne en høj grad af sammenhæng mellem morfinkoncentrationen og vandindholdet i mælkesaften samt med de klimatiske parametre solstråling, relativ luftfugtighed og temperatur.

Vandindholdet i mælkesaften svinger

Den naturlige forklaring er, at vandindholdet i mælkesaften svinger i takt med det osmotiske potentiale i plantevævet, hvorved alkaloiderne skiftevis fortyndes og opkoncentreres. Osmose er den proces, som planterne bruger til at trække vand op gennem stænglerne. Princippet er, at vandet bevæger sig fra områder med lav koncentration til områder med høj koncentration, indtil koncentrationsforskellene er udlignet.

Plantens vandpotentiale er kontrolleret via transpirationen igennem bladenes læbeceller, der styres af de klimatiske parametre solstråling, relativ luftfugtighed, temperatur og vindhastighed. På cellulært niveau kan koncentrationsændringerne forklares som regulering af det osmotiske potentiale ved hjælp af ionkanaler, protonpumper og aquaporiner, som findes i cellemembranerne. Osmotisk regulering alene kan således forklare de iagttagne koncentrationsvingninger.

Som en logisk konsekvens af den nyfremstillede hypotese må den oprindelige teori - fra før Fairbairn og Wassels artikel

fra 1964 - om morfin som et akkumuleret slutprodukt gennemses. Det er endvidere nødvendigt med det nye perspektiv at gentage flere af de undersøgelser, som dengang blev gjort for at forklare morfins forsvinden.

Selv om Fairbairn og hans forskergruppe ved University of London overså vandets funktion i deres epokegørende artikel, vil deres forskningsarbejde og den efterfølgende række af publikationer, der beskæftiger sig med opium og opiumvalmue, stadig fremstå som et banebrydende arbejde indenfor den fytokemiske forskning.

Professor Ulf Nyman fra Institut for Medicinalkemi og forskningslektor Søren Nors Nielsen, Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi har deltaget i diskussion og modelsimulering af vor nye teori.

Planternes svingninger

En biologisk cyklus defineres som en sekvens af begivenheder i en organisme, der gentager sig i samme rækkefølge og med samme tidsinterval. Døgncyklus er betegnelsen for en cyklus, der er bestemt af dag og nat, mens betegnelsen circadian-svingninger benyttes mere specifikt om de svingninger, der er bestemt af Jordens rotation og de deraf afledte påvirkninger af omgivelserne med en periode på ca. 24 timer.

Circadian-svingninger i de cellulære koncentrationer af stofskifteprodukter er kendt fra litteraturen og beskrevet for mange organismer. Disse svingninger kan primært forklares som forårsaget af svingninger af fysiske faktorer i omgivelserne såsom lys, temperatur og tilgængelighed af vand, eller af afledte cellulære mekanismer, forårsaget af regulering af stofskiftet på cellulært niveau, hvor hovedrollerne spilles af gener og enzymer.

En speciel type svingninger er de endogene svingninger, der fortsætter i flere perioder under konstante omgivelser, efter at den eksterne påvirkning er slået fra. Dette er f.eks. tilfældet med lysstyrede døgnsvingninger, der fortsætter med langsom dæmpning efter at organismen er anbragt i totalt mørke.



Cand.scient et agro, lic.pharm. Kim Itenov er forsker ved Danmarks Jordbrugsforskning, Afdelingen for Plantebiologi.



Lic.agro. Per Mølgaard er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Afhængighed af psykofarmaka set fra brugernes side

Et stort antal danskere er afhængige af nerve- og sove- medicin. Medicinen bruges ofte til at opretholde en facade, men kan ende i afhængighed med store menneskelige omkostninger. Forløbet af lægemiddelanvendelsen afspejler sundhedsvæsenets manglende kompetence.

Af Ebba Holme Hansen og Stig Helweg-Jørgensen

Omsætningen af nervemedicin og sove- medicin i Danmark svarer til, at ca. 6 procent af befolkningen - fra spæd til olding - kan være i behandling hver dag året rundt. En del af brugerne bliver afhængige af den ordinerede medicin. Der findes ingen eksakte opgørelser over hvor mange, det drejer sig om, men et forsigtigt skøn ligger på ca. 100.000 mennesker.

Medicinafhængigheden indebærer store menneskelige omkostninger, men vor viden om brugernes situation er sparsom. Hvilke problemer fører til brug af nervemedicin og sove- medicin? Hvordan oplever brugerne lægemidlernes virkninger? Hvordan erfarer man, at man er blevet afhængig? Hvordan kommer man ud af misbruget igen? Og hvilken hjælp får man? Det er nogle af de spørgsmål, vi har stillet i et forskningsprojekt, som gennemføres ved Institut for Samfundsfarmaci.

Vore resultater er baseret på dybdeinterviews med 50 mennesker, som har oplevet medicinafhængighed. Nogle er kommet ud af det, mens andre stadig kæmper med deres afhængighed. På trods af den meget forskelligartede baggrund, der oprindeligt førte til medicinudskrivningen, gennemlever brugerne nogle karakteristiske og ensartede forløb, der typisk består af seks faser.

Forbruget starter

Den første fase er tiden, før personen begynder at bruge lægemidler. Næsten alle brugerne i undersøgelsen kan karakteriseres ved, at der blev stillet store krav til dem i barndom og opvækst. De har f.eks. haft det primære ansvar for deres (syge) forældre eller for deres søskende, eller de har mistet en eller begge forældre.

I mange tilfælde har forældrene været krævende med hensyn til børnenes præstationer, ofte ledsaget af stærk kritik. Nogle forældre har lidt af angst eller været afhængige af alkohol og piller. I mange familier har oprettelse af en ydre facade været det afgørende omdrejningspunkt. Som konsekvens af opvæksten stiller brugerne i voksenlivet store krav til sig selv, ofte kombineret med lavt selvværd.

I den anden fase begynder forbruget af lægemidler. Den første ordination sker i relation til tre typer af begivenheder og stress. Den første er dødsfald blandt nærtstående, f.eks. et barn eller en af forældrene, der dør eller begår selvmord. Den anden typiske igangsætter er en forestående begivenhed, f.eks. en eksamen. Endelig kan medicinforbruget udløses af fysiske forhold, f.eks. ved en smertefuld sygdom.

Behovet etableres

Den tredje fase i medicinkarrieren kaldes instrumentel brug. Her anvendes lægemidlerne som et redskab til at klare hverdagslivets krav og opretholde facaden. Brugeren oplever, at de kan gennemføre præstationer, som de ikke kan klare uden medicinen, f.eks. at gå til fest, møder eller gå på arbejde. De kan være "som en klud" bagefter, men føler at de "har klaret det". En typisk kommentar er, at "ingen i mine omgivelser har lagt mærke til noget". I denne periode er brugerne meget tilfredse med medicinen. Ved kontinuert instrumentel brug strækker fasen sig typisk over et halvt år, men den kan vare adskillige år, hvis medicinen kun bruges af og til.

Derefter starter den fjerde fase, afhængigheden, hvor der er opstået et fysiologisk behov for stoffet, som hurtigt kommer til at dominere den afhængige brugers liv. Når behovet ikke opfyldes, medfører abstinenssymptomerne angst, rysten og intenst ubehag, og brugerne udvikler en "narkomanagtig" adfærd, ikke mindst set med deres omgivelseres øjne.

De lægelige kontrolstrategier involverer ofte forsøg på

Forbruget af nervemedicin og sove- medicin svarer til, at ca. 6 procent af befolkningen konstant er i behandling. I starten kan brugerne gennemføre præstationer, som de ikke kan klare uden medicin; fest, møder eller arbejde. En typisk kommentar er, at "ingen har lagt mærke til noget". Men forbruget fører ofte til afhængighed.

Foto: Nordfoto

Fase	I	II	III	IV	V	VI
	Før	Ordination	Instrumentel anvendelse	Behov installeret	Ophør	Efter
Livsbetainger	Belastet opvækst	Stress	Øget socialitet	Øget isolation	Øget isolation	Øget socialitet
Handlestrategier	?	Lægekonsultation	Lejlighedsvis lægemiddel-anvendelse mod sociale problemer	Jævn indtagelse mod kropslig/ psykisk ubehag	Nedtrapning	Psykologisk bearbejdning
Personlig Erfaring	?	Angst krise søvn-problemer	Tilfredshed med medikament	Abstinens Medicin "livsvigtig"	Abstinens Ekstremt ubehag	Øget frihed Indgangskrise genopstår Abstinens aftager

Mange brugere af psykofarmaka gennemgår et forløb med seks karakteristiske faser.



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



Cand. psych. Stig Helweg-Jørgensen er forskningsassistent ved Institut for Samfundsfarmaci.

Jans liv og død - et illustrativt eksempel

Jans mor var afhængig af Restenil®, en ældre type nervemedicin. Hun havde angstanfald og turde ikke gå alene på gaden. Hele sin barndom var Jan derfor nødt til at følge hende rundt i byen.

Da Jan skulle til eksaminer og blev nervøs, foreslog hans mor, at han tog en halv Restenil® for at styre angsten. Som voksen fik han arbejde et sted, hvor der var mange kvinder. Han var lidt bange for kvinder og havde svært ved at være på arbejdspladsen. Han spurgte derfor sin læge, om der ikke "fandtes et eller andet". Lægen gav ham Temesta®, en nervemedicin af benzodiazepingruppen.

I mange år brugte Jan medicinen ved behov. Men der blev kortere og kortere mellem angstanfaldene, og på et tidspunkt gik han over til at tage pillerne fast hver dag. Han havde tidligere - også i starten af sin medicinkarriere - dyrket sport på et meget ambitiøst niveau, hvilket desværre affødte en knæskade. Derfor fik Jan nogle år senere invalidepension. Smerten fra knæet gjorde også, at han fik ordineret Kodein til at dæmpe smerten.

Jan brugte Kodein og Temesta® i et slags parløb, hvor Kodein kunne kvikke ham op, mens Temesta® kunne berolige ham. Han vendte døgnet rundt og var vågen om natten, hvor han bl.a. sad og chattede på Internettet. Dette passede

ham godt, da han var blevet temmelig menneskesky. Efter 16 år på piller tog han 15 stk. Temesta® og 15 stk. Kodein i døgnet.

Dette fungerede efter hans egen opfattelse fint. Jan var dog, specielt i forhold til sin kone, bekymret over sin "narkomanadfærd", og ønskede derfor at blive trappet ud. Hans læge foreslog, at han skulle trappe ud på 8 dage og samtidigt starte op på Cipramil®. Dette havde han selv nok viden om pillerne til at nægte. Han forsøgte at blive indlagt til nedtrapning på en psykiatrisk afdeling, men blev afvist. Jan kontaktede en psykolog, men havde ikke råd til selv at betale i længden. Til sidst besluttede han sig for at trappe ned selv fra dag til dag.

Jan vidste godt, at en "kold tyrker" ikke var den bedste måde, men han var simpelt hen desperat. Hans læge forsynede ham med en større mængde Fenemal, et barbiturat, som bruges mod krampes og abstinenser. På andendagen i nedtrapningen havde han spist næsten al sin Fenemal. Han havde taget alt for mange piller, idet han havde mistet fornemmelsen for tid. Han lagde sig dernæst til at sove, men vågnede aldrig op igen.

Jan døde af en kombination af abstinenser, for meget Fenemal, mangel på information og behandlingsmuligheder.

at erstatte benzodiazepiner med SSRI-præparater, såkaldte "lykkepiller", at henvise til andre eksperter eller forsøg på nedtrapning, som normalt mislykkes. Det, der nu kontrollerer de langtidsafhængiges forbrug, er de eskalerede fysiologiske impulser til at tage stoffet.

Nye problemer efter ophør

I den femte fase ønsker langtidsbrugere at ophøre med at tage medicinen. Men de oplever, at det er svært at få hjælp. Den manglende viden omkring nedtrapning er slående. Nogle af brugerne indleder en længere henvisningskæde af forskellige eksperter, der så tilbyder forskellige og ofte modstridende forklaringer på deres problemer. Det er også typisk, at brugerne selv forsøger at finde hjælp til deres nedtrapning, men uden succes, da der ikke findes nogen offentlige specialiserede behandlingstilbud til denne gruppe af patienter. De få brugere, der alligevel får den fornødne hjælp, er yderst taknemmelige. Nedtrapning er altid forbundet med stor lidelse og ekstreme abstinenser. Jo hurtigere nedtrapning, jo stærkere abstinenser.

For de brugere, som klarer nedtrapningen, begynder den sjette fase; tiden efter ophøret. Efter et afhængighedsforløb er det meget almindeligt, at brugerne bliver meget vrede på deres læge og på sig selv, fordi de føler, at de har "spildt en masse år". Desuden skal en række af problemer konfronteres.

De problemer, man oprindeligt fik benzodiazepiner for, kan komme frem igen. Ofte har brugerne benyttet benzodiazepiner som strategi til håndtering af angst, og her skal der udvikles nye strategier. Dertil kommer abstinenser fra lægemidlerne, som kan vare ved i op til år efter ophør med medicinen.

Mangel på viden og behandlingsmuligheder

Det forbrug, som senere bliver til afhængighed, er initieret i sundhedsvæsenet, typisk af en praktiserende læge. Brugere har ofte været i en stresset situation, som kan bunde i mange forskellige sociale problemer. I sundhedsvæsenet omdefineres problemerne til sygdom.

Sundhedsvæsenets behandlingsstrategi er altid den samme: Ordination af medicin. Hermed får brugerne også selv en opfattelse af at være syge og have behov for medicinen. Det er først langt senere, i fase 5 og 6, at de begynder at forholde sig kritisk til medicineringen.

Det er slående, hvor dårligt sundhedsvæsenet har stået rustet til at tage sig af vore informanternes problemer. De brugere, som kommer gennem hele forløbet giver udtryk for stor vrede over den fejlbehandling og manglende kompetence, de har været udsat for hos dem, der skulle være eksperterne. Det må konkluderes, at der er en stor mangel på hjælpemuligheder for disse mennesker i Danmark.

Miljørisikovurdering af lægemidler

Farmaceuter og den farmaceutiske industri bør deltage aktivt i miljørisikovurderinger af lægemidler. Vi må blive i stand til at sandsynliggøre, at nutidens lægemidler ikke ender som morgendagens miljøproblemer.

Af Bent Halling-Sørensen, Jette Tjørnelund, Flemming Ingerslev, Hans Christian Holten Lützhøft, Marie-Louise Løke, Sven Erik Jørgensen og Steen Honoré Hansen

For mere end 25 år siden begyndte man at miljørisikovurdere alle nye industrikemikalier. Ikke fordi at alle industrikemikalier er farlige, men fordi man ikke kunne bedømme miljørisikoen uden at foretage en egentlig vurdering. I løbet af

1980'erne gik man i gang med at vurdere miljørisikoen ved allerede eksisterende kemikalier, som anvendes i stort omfang.

I miljøsammenhæng kan lægemidler tildels ligestilles med andre kemikalier, og derfor var det naturligt, at EU i 1996 vedtog retningslinier for, hvordan alle nye veterinære lægemidler skulle miljørisikovurderes (EMEA/CVMP/055/96). Tilsvarende retningslinier for humane lægemidler er på vej og ventes at træde i kraft år 2000.

Når EU adskiller den humane og veterinære anvendelse af lægemidler, selvom de kan indeholde de samme aktive stoffer, skyldes det, at eksponeringsvejene er forskellige. Lægemidler anvendt til mennesker passerer ofte rensningsanlægget og havner i slam eller overfladevand, hvorimod lægemidler til dyr spredes i miljøet med gylle. Derfor betyder disse eksponeringsveje uhyre meget for belastningen af miljøet, selv om der kan være tale om det samme aktive stof, og den deraf resulterende miljøkoncentration.

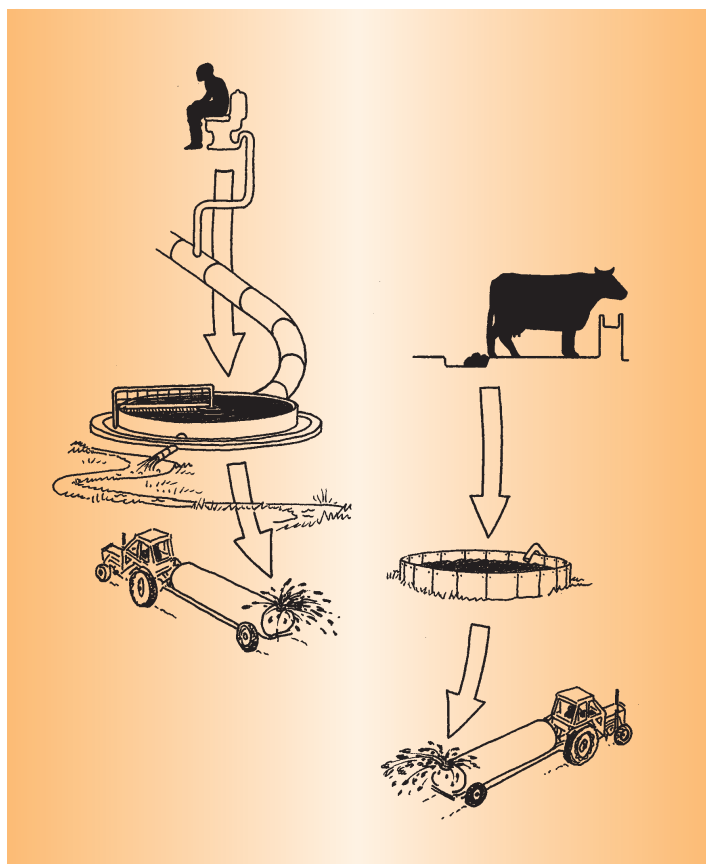
At lægemidler vitterligt findes i miljøet vises af en opgørelse fra 1999 publiceret af Ingerslev med flere. I 1996 havde man påvist 25 forskellige lægemiddelstoffer i miljøprøver. I 1999 var antallet steget til 68 forskellige aktivstoffer. Disse tal viser, at der er ved at herske det samme fænomen, som kendes på pesticidområdet: man finder de stoffer, man søger efter. De analytiske kemiske målemetoder er efterhånden så veludviklede, at man kan opspore og ofte måle stoffer i koncentrationer på nanogram pr. liter, selv i prøver som grundvand og overfladevand.

Risikovurdering er et værktøj

Der er tre væsentlige grunde til, at farmaceuter og den farmaceutiske industri må deltage aktivt i udviklingen og implementeringen af de retningslinier, som foreskriver miljørisikovurderinger af lægemidler.

Målet er på ingen måde at forbyde nogen former for lægemidler og slet ikke et lægemiddel, som kan helbrede en alvorlig sygdom. Risikovurderingen ønsker derimod at opstille en cost-benefit analyse, der gør det muligt at kunne beslutte ud fra kendte risici. En miljørisikovurdering er simpelt hen et værktøj, som synliggør miljøpåvirkningen. Viser

Spredningsvejene for humane og veterinære lægemidler i miljøet. Lægemidler til mennesker transporteres via toiletter og kloakker til rensningsanlæggene. Herfra kan lægemidlerne og deres nedbrydningsprodukter enten blive udledt til åer og søer med det rensede spildevand, eller de kan blive spredt på markerne med slammet, der bruges som gødning. Lægemidler til dyr spredes typisk på markerne med husdyrgødning.





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



Lic.pharm. Jette Tjørnelund er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.polyt. Flemming Ingerslev er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

det sig, at et lægemiddel er uhensigtsmæssigt for miljøet, kan det være, at man må tage initiativ til at opsamle patientens urin og afføring til speciel destruktion.

Et andet aspekt af miljørisikovurderingen kan være, at lægemiddel A,B og C er terapeutisk ligeværdige. Hvorfor så ikke anvende det lægemiddel, som er mest miljøvenligt? I Sverige er denne vinkel blevet et salgsmæssigt argument over for læger for visse antibiotikas vedkommende. Man taler om, at antibiotika, som skaber mindre resistens, har en bedre miljøprofil.

Den tredje grund til, at farmaceuter og den farmaceutiske industri må interessere sig for miljøvurderinger er, at der på verdensplan er opstået en generel forståelse for, at enhver branche eller profession ikke kun skal arbejde for at løse de miljøproblemer, de skaber ved deres produktion. Erhvervet skal også sandsynliggøre, at branchens produkter ikke skaber miljøproblemer på længere sigt. Når man f.eks. producerer biler, må producenten sandsynliggøre, at bildeleene 10 til 15 år senere kan destrueres eller genanvendes på forsvarlig vis.

At producere miljøvenligt har i mange år været en integreret del af den farmaceutiske industri, og kun få brancher er underlagt så megen kontrol på miljøområdet. Derimod er spørgsmålet om at sandsynliggøre, at lægemidlerne ikke skaber fremtidige miljøproblemer, ikke løst. Det kan kun gøres ved at udføre miljørisikovurderinger på aktivstofferne. Det er vigtigt, at farmaceuterne tager del i dette arbejde og dermed sikrer en fagligt forsvarlig lovgivning på området.

Så i bund og grund er miljørisikovurdering af lægemidler et værktøj til at udvikle strategier for, hvordan man skal forholde sig, hvis det viser sig, at et lægemiddelstof har negative virkninger på miljøet. Det er selvfølgelig langt fra alle lægemiddelstoffer, som er miljøproblematisk, men vurderingsproceduren er nødvendig på alle stoffer for at udpege de få problematiske stoffer og blåstempe alle andre på den tilgængelige viden.

Fokus på lægemidlers skæbne i miljøet

En gennemgang af litteraturen viser, at man specielt for antibiotika, antiparasitmidler, cancermidler og hormoner begynder at få et overblik over stoffernes skæbne i miljøet.

Specielt for antibiotika er det vigtigt at forstå deres skæbne i miljøet, da antibiotika til forskel fra andre lægemiddelstofgrupper har en tildels irreversibel effekt på miljøet - nemlig udvikling af resistente bakterier. Hvis en fiskebestand bliver slået ihjel i en sø, kan man rense søen og gendætte en fiskebestand, hvorved balancen er genoprettet efter nogle år. Anderledes forholder det sig, hvis naturens mikroorganismer får ændret deres arveanlæg. Hvis genopretning overhovedet er mulig, vil det tage meget længere tid, og man skal huske på, at bakterier bl.a. deltager som

centrale aktører i så vigtige processer som jordens omsætning af kvælstof og kulstof.

En anden type effekt, som man ikke kan udelukke i forbindelse med spredning af lægemidler i miljøet, er hormonelle virkninger. I begyndelsen af 1990'erne gik det op for forskerne, at en række industrikemikalier såsom bisphenol-A og phtalater havde en hormonlignende effekt i miljørealistiske koncentrationer på 1-10 mikrogram pr. liter. Man kan ikke udelukke, at de mange hormonlægemidler, hvis skæbne i miljøet, man intet kender til, kan påvirke de samme hormonale systemer på fisk og krebsdyr, som de identificerede industrikemikalier har vist sig at kunne.

Behovet for forskning

Fremtidens forskning inden for miljørisikovurdering af lægemidler vil efter vores mening fokusere på tre videnskabelige discipliner: analytisk kemi, økotoxikologi og skæbnemodellering.

Et centralt indsatsområde vil blive at udvikle og validere analysemetoder til analyse af lægemiddelstoffer og i særdeleshed lægemiddelstofmetabolitter i miljøprøver. Der vil blive stigende krav til dokumentationen af disse analyseresultater, hvorfor der forude ligger vanskelige arbejdsopgaver for analytiske kemikere. Samtidig er det vigtigt at udvikle og afprøve testmetoder, der kan vurdere de specifikke effekter som lægemidler har på miljøet.

Ved vurderingerne er det nødvendigt at være i stand til at tage højde for, at naturen er meget inhomogen, hvorfor det er svært kun at stole på måledata. En tilfældig valgt naturlig prøve kan have en meget uensartet matrice, f.eks. en kompliceret jordbund, hvorfor koncentrationen af det stof, man undersøger ikke bliver repræsentativ. Der er to løsninger på dette problem. Enten analyserer man mange hundrede prøver, hvilket er meget kostbart, eller man kan udvikle en skæbnemodellering på grundlag af det undersøgte stofs fysiske-kemiske egenskaber og jordbundens beskaffenhed. En god skæbnemodellering gør det muligt at klare sig med et begrænset antal måleresultater, måske 15-30 stykker, til validering af skæbnemodellen. Sidstnævnte metode er gængs praksis i f.eks. Miljøstyrelsen ved miljøvurdering af industrikemikalier.

Forskningsgruppen på Danmarks Farmaceutiske Højskole, der beskæftiger sig med dette område, har baggrund i enten den analytiske eller miljøkemiske forskningsgruppe, og råder derfor over forskere, som tilsammen dækker alle tre ovenstående discipliner. Flere af dem er uddannede farmaceuter. Vi har derfor mulighed for at bidrage til og påvirke dette nye forskningsfelt, således at farmaceuten også opfylder samfundets krav om at sandsynliggøre, at de produkter, vi fremstiller, ikke ender som morgendagens miljøproblemer.



Cand.pharm. Hans Christian Holten Lützhøft er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.polyt. Marie-Louise Løke er ph.d.-studerende 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.

På sporet af antibiotika i miljøet

Antibiotika anvendes i store mængder til dyr såvel som til mennesker, men vi kender i dag meget lidt til stoffernes skæbne i miljøet og i hvor stort omfang tilstedeværelse af antibiotikarester i vand og jord bidrager til udvikling af resistente bakterier. Nye analysemetoder skal belyse antibiotikas skæbne i miljøet.

Af Jette Tjørnelund, Marie-Louise Loke, Bent Halling-Sørensen og Steen Honoré Hansen

Der er en stor offentlig interesse omkring forekomsten af antibiotikarester i fødevarer og risikoen for udvikling af resistente bakterier. Derimod har udledninger af antibiotika og andre lægemiddelstoffer til miljøet kun haft ringe bevågenhed - på trods af, at lægemidler og deres omdannelsesprodukter havner i vore omgivelser.

I Tyskland, England, Italien og Schweiz er der således fundet over 60 lægemiddelstoffer i miljøet, heriblandt seks antibiotika. Samtidig har man påvist otte lægemiddelstoffer i grundvandet, hvoraf de to var antibiotika. Imidlertid ved vi stadig for lidt om antibiotikas tilstedeværelse og skæbne i

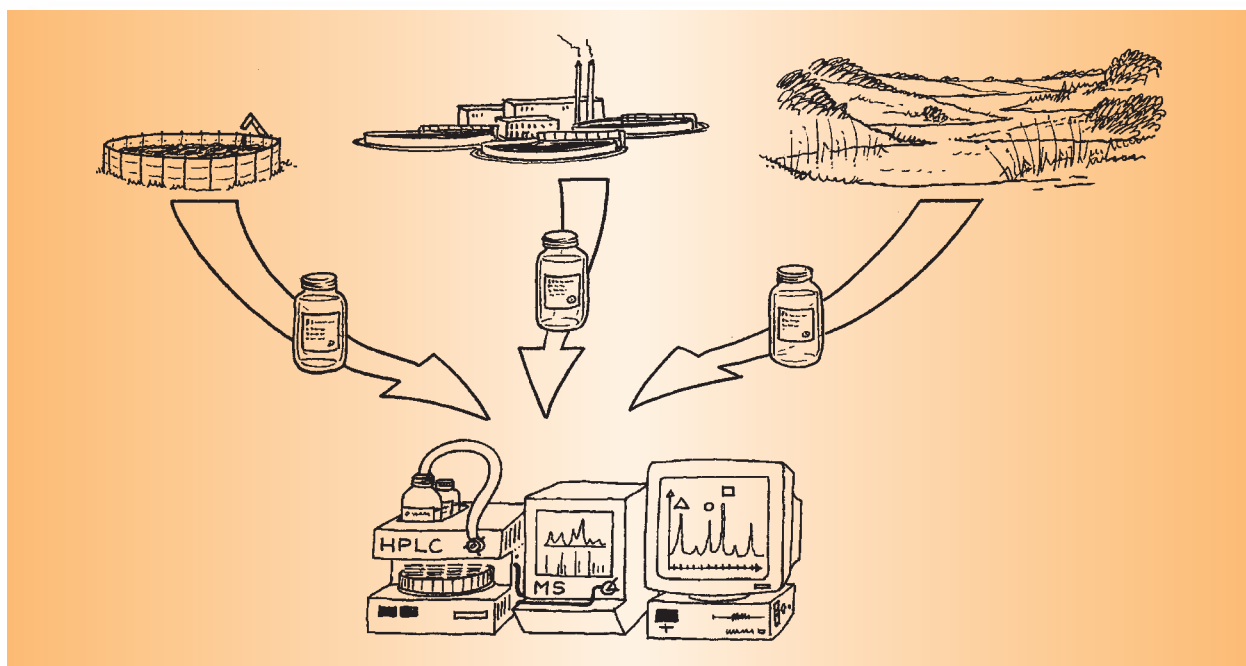
miljøet. En sådan viden vil bl.a. kunne anvendes til at vælge det mest miljøvenlige antibiotikum til behandling af en given infektion og opklare, om forureningen med lægemidler medfører udvikling af resistente sygdomsfremkaldende bakterier i vore omgivelser.

I dag ved vi meget lidt om, hvor hurtigt antibiotika nedbrydes i miljøet og i givet fald til hvad. Den viden kan man kun opnå, hvis man udvikler nye analytisk kemiske metoder.

Fokus på to antibiotika

I 1998 blev det samlede danske forbrug af antibiotika anslået til ca. 150 tons. Cirka 60 tons anvendes som antimikrobielle vækstoffremmere i forbindelse med svineproduktionen. Omkring 60 tons antibiotika anvendes til sygdomsbekæmpelse i landbruget, mens de resterende 30 tons bruges til at behandle mennesker.

Hvad sker der med lægemidler i miljøet? Hvordan omsættes og nedbrydes stofferne? Det undersøges i prøver fra gylletanke, rensningsanlæg og vandmiljøer.



Som led i et projekt under Det Strategiske Miljøforskningsprogram SMP II undersøges skæbnen af en række antibiotika i miljøet. Vi har især sat fokus på tylosin og oxytetracyklin; to veterinære lægemiddelstoffer, der bruges i store mængder.

Tylosin A er et af de mest anvendte antibiotika i landbruget, og i 1998 var forbruget på 13 tons. Stoffet benyttes både som vækstfremmer og til at behandle syge dyr. Tylosin er virksomt overfor grampositive bakterier, enkelte gramnegative bakterier og mykoplasmainfektioner. Stoffet slår bakterierne ihjel ved at hæmme deres evne til at danne proteiner. Bakterierne kan udvikle resistens overfor stoffet ved brug af meget lave koncentrationer, og der er krydsresistens til erythromycin, som er meget anvendt i human medicin. Tylosin udskilles delvist uomdannet i gyllen.

Oxytetracyklin tilhører gruppen af tetracykliner, og i 1998 blev 12,1 tons af stoffet anvendt til veterinært brug. Oxytetracyklin er aktivt overfor såvel grampositive som gramnegative bakterier. Stoffet dræber bakterierne ved at gribe ind i deres proteinsyntese. Der ses ofte resistensudvikling overfor stoffet, og resistensen holder sig ofte længere end for andre antibiotika. Oxytetracyklin anvendes både veterinært og humant. Det udskilles uomdannet primært med afføringen, idet kun en fjerdedel af stoffet udskilles via nyrener.

Hvad skal man lede efter?

De fleste lægemiddelstoffer bliver i en vis udstrækning omdannet, inden de udskilles af organismen. Organismens omdannelsesprodukter er som regel mindre farmakologisk aktive end selve lægemiddelstoffet, men der findes en række eksempler på, at medicinresterne er farmakologisk aktive eller ansvarlige for en toksisk virkning.

Graden af omdannelse og arten af omdannelsesprodukterne afhænger dels af selve lægemiddelstoffet, dels af hvilken dyreart der indtager lægemidlet. Derfor er man nødt til at vide, i hvilken udstrækning stoffet omdannes og til hvad. Ydermere må man kende nedbrydningsmønstret i miljøet for at kunne følge stoffets skæbne. For de veterinære lægemiddelstoffers vedkommende er det også vigtigt at kende nedbrydningsforholdene under forskellige forhold i gylletanke, i jorden og i overfladevand. Hvis stoffet også anvendes til humant brug, skal man kende nedbrydningen i rensningsanlæg.

Stofferne er vandopløselige

Antibiotika og deres nedbrydningsprodukter er ofte meget vandopløselige set i forhold til de stoffer, man normalt analyserer for i miljøprøver. Det er derfor naturligt at benytte de erfaringer, man har fra analyse af lægemiddelstoffer og deres omdannelsesprodukter i plasma, urin og afføring.

For at kunne bestemme lave koncentrationer af antibiotika i miljøprøver er det nødvendigt at benytte metoder, der kan adskille det, man ønsker at måle, fra de andre komponenter i prøven samt at benytte en meget følsom detektionsteknik.

Højtryksvæskerkromatografi (HPLC) er ofte første valg ved analyse af meget vandopløselige stoffer. Kromatografien adskiller stofferne, som derpå detekteres, f.eks. via deres udsendelse eller absorption af lys. Hvis man også ønsker at bestemme stoffets identitet, benyttes massespektrometri, hvor stofferne sorteres efter deres molekylvægt.

Uanset hvor avanceret en analyseteknik, der anvendes, er behandlingen af prøven inden selve analysen dog helt afgørende for analyseresultatet. Prøven skal bringes på en form, der passer til analysemetoden og i øvrigt behandles således, at man ikke fejlagtigt finder indhold af antibiotika i en prøve, hvor det ikke er tilstede. Især dette trin i analysearbejdet er meget forskningskrævende.

Analyse af antibiotika i prøver fra miljøet

Til analyse af nedbrydningen af tylosin og oxytetracyklin i miljøet, benytter vi laboratoriemodeller, der afspejler forholdene i overfladevand, rensningsanlæg og gylletanke.

Tylosins halveringstid er for den primære nedbrydning vurderet til under to dage i gylletankene under iltfrie forhold. Det er således ikke sandsynligt, at man vil kunne påvise tylosin i autentiske gylleprøver eller på marken, selv efter en omfattende opkoncentrering af prøven, medmindre binding til partikler i gyllen hindrer nedbrydning i gylletanken.

Igangværende forsøg tyder på, at oxytetracyklin nedbrydes noget langsommere end tylosin både i slamreaktorer, gyllereaktorer og overfladevand. Der er således en begrundet mistanke om, at stoffet spredes med gylle eller slam til marken. Ud fra tetracyklinernes egenskaber ville man forvente at kunne finde stofferne bundet til jord og sedimenter, men næppe at kunne finde det i vandmiljøet.

Næste trin i projektet er at udvikle metoder til analyse af autentiske jordprøver og gylleprøver. Det er en stor analytisk-kemisk udfordring, da det er meget vanskeligt at detektere lave koncentrationer af antibiotika i gylle, blandt andet fordi der er problemer med at udtrække stærkt bundne stoffer fra jordprøver og sedimentprøver. Derfor skal der forskes i nye prøveoprensningemetoder, som skal kombineres med avancerede analyseteknikker.

Analyse af antibiotika og andre lægemiddelstoffer i miljøet er et helt nyt forskningsområde på internationalt plan. Der ligger et stort arbejde forude med at identificere nedbrydningsprodukter og udvikle analysemetoder, så man med sikkerhed kan måle, om antibiotika og deres nedbrydningsprodukter er til stede i miljøet og i givet fald i hvilken koncentration.



Lic.pharm. Jette Tjørnelund er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi og deltager i Centeret for Bæredygtig Arealanvendelse.



Cand.polyt. Marie-Louise Loke er ph.d.-studerende ved Centeret for Bæredygtig Arealanvendelse, Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Lic.pharm. Bent Halling-Sørensen er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi og deltager i Centeret for Bæredygtig Arealanvendelse.



Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi og deltager i Centeret for Bæredygtig Arealanvendelse.

Specifikke stoffer belyser Alzheimers sygdom

Alzheimers sygdom er nært forbundet med flere forskellige typer af receptorer i hjernen, der anvender glutaminsyre som signalstof. For at forstå de enkelte receptortypers betydning i Alzheimers sygdom har man brug for kemiske forbindelser, som udelukkende påvirker én type af receptorerne.

Af Tine Bryan Stensbøl, Tommy Nørskov Johansen og Jan Egebjerg

I den normalt fungerende hjerne findes en hårfin balance mellem stimulerende og hæmmende signaler. Forskydninger i denne balance forårsager sygdomstilstande som f.eks. Alzheimers sygdom, en demenslignende sygdom med dødeligt udfald. Hvorfor og hvordan ubalancen opstår, er stadig uafklaret, men vi ved, at forhøjede mængder af signalstoffet glutaminsyre medvirker til, at hjernecellerne gradvist henfalder og dør.

Glutaminsyre aktiverer mange forskellige receptortyper, og anses for at være hjernens vigtigste stimulerende signalstof. Billedligt talt kan glutaminsyre opfattes som en hovednøgle til alle dørene i et højhus, hvor dørene symboliserer de forskellige receptortyper.

Kemiske forbindelser, der selektivt påvirker én enkelt type af receptorerne, er uundværlige i jagten på lægemidler, som kan forebygge, helbrede eller behandle Alzheimers sygdom. Det skyldes, at sådanne stoffer kan bruges til at kortlægge de enkelte receptortypers rolle i sygdomsprocessen. Kortlægningen giver et bedre udgangspunkt for at designe læge-

middelstoffer, som specifikt påvirker netop de relevante typer af receptorer.

De receptorer, der aktiveres af glutaminsyre, inddeles i to hovedgrupper, som kaldes ionotrope og metabotrope. De ionotrope receptorer, inddeles videre i undergrupper. To af disse undergrupper kaldes AMPA-receptorer og kainsyre-receptorer, fordi de fortrinsvis aktiveres af stofferne AMPA og kainsyre.

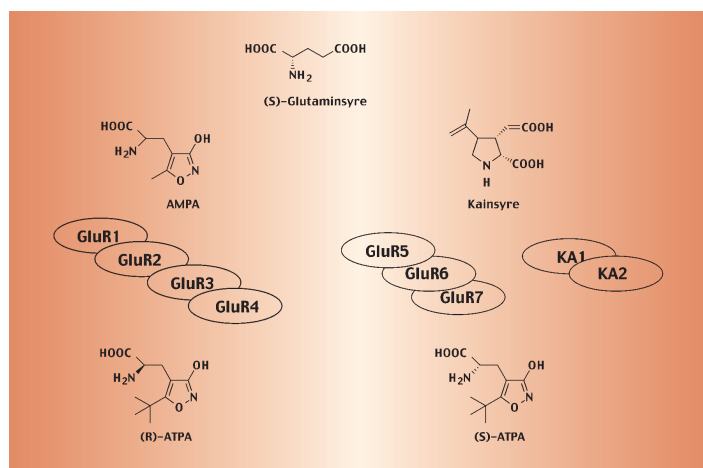
I den neuromedicinalkemiske gruppe på Danmarks Farmaceutiske Højskole har vi i flere år arbejdet med at identificere stoffer, der selektivt aktiverer enten AMPA- eller kainsyre-receptorer; altså at finde nøgler der udelukkende åbner én enkelt dør i højhuset. Målet er dels at identificere nøgler, der kan låse dørene op, dels at finde nøgler, der passer ind i nøglehullet og plomberer det, så det er svært eller umuligt at få en virksom nøgle ind i låsen. Begge typer af stoffer er vigtige værktøj i afklaringen af de enkelte receptors betydning i udviklingen af bl.a. Alzheimers sygdom og på længere sigt som led i udviklingen af nye og bedre lægemidler.

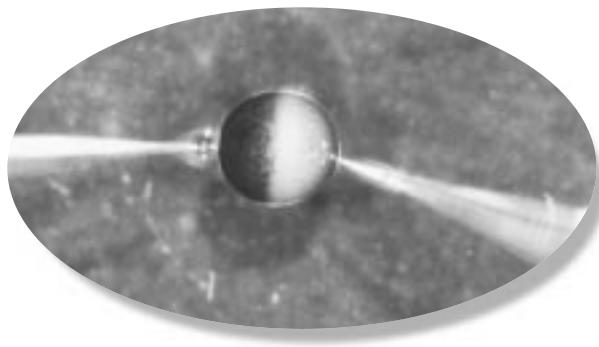
Spejlbilledformer og selektivitet

For 15 år siden blev stoffet APTA syntetiseret som et led i en serie af stoffer, hvor målet var at modificere AMPA's kemiske struktur og undersøge, hvordan ændringerne påvirkede stoffernes effekt. APTA kunne i modsætning til moderstoffet AMPA trænge over blodhjernebarrieren, men var tilsyneladende væsentligt mindre potent end AMPA. Imidlertid blev APTA betragtet som et centralt stof, fordi den faldende potens i forhold til moderstoffet tydede på, at den store kemiske gruppe, der er tilstede i APTA, gør det svært for stoffet at passe ind i AMPA receptoren. Det gav en vigtig information om receptoren, og om hvorledes nye stoffer skulle designes.

APTA er ligesom glutaminsyre et stof, som eksisterer i to spejlbilledformer, der er fysisk og kemisk ens, men rumligt forskellige som højre og venstre hånd. De to spejlbilledformer af APTA kaldes henholdsvis (R)-APTA og (S)-APTA. Det viser sig ofte, at kun den ene af to spejlbilledformer har den ønskede virkning, hvorimod den anden enten er uden virkning eller forårsager uønskede bivirkninger. Man kan igen

Den kemiske struktur af signalstoffet glutaminsyre samt angivelse af strukturen for de selektive stoffer, AMPA, kainsyre, (S)-APTA og (R)-APTA. De receptorer, der aktiveres af glutaminsyre opbygges af underenheder. Underenheder af typen GluR1-4 opbygger AMPA-receptorer, hvorimod underenheder af typen GluR5-7 og KA1-2 danner kainsyre-receptorer.





Et frøæg er delt i en lys og en mørk del. Ved at injicere arvemasse, der specifikt koder for en receptorundertype i frøæg opnår man, at receptoren efter nogle dage udtrykkes på frøæggets overflade. Når en opløsning af et stimulerende stof ledes hen over frøægget, aktiveres receptoren. Ved hjælp af elektroder, placeret i frøægget, kan man måle de ionstrømme, der opstår som følge af aktiveringen. Stigende koncentrationer af et stimulerende stof vil føre til større udslag, indtil et maximum nås.

sammenligne med en nøgle; et spejlbillede af nøglen kan ikke åbne låsen i en dør.

I hjernen findes udelukkende den ene af de to spejlbilledformer af ATPA for at karakterisere de to formers individuelle egenskaber. Her har en relativt ny metode inden for højtryksvæskekromatografi (HPLC) gjort det muligt at adskille visse stoffer ud fra deres rumlige egenskaber. De to spejlbilledformer af ATPA blev fremstillet i et højt udbytte og med høj renhed. I hver af de to spejlbilledformer var der således mindre end 0,1 procent af den anden spejlbilledform til stede efter adskillelsen.

Vi har længe været interesseret i at opnå rene spejlbilledformer af ATPA for at karakterisere de to formers individuelle egenskaber. Her har en relativt ny metode inden for højtryksvæskekromatografi (HPLC) gjort det muligt at adskille visse stoffer ud fra deres rumlige egenskaber. De to spejlbilledformer af ATPA blev fremstillet i et højt udbytte og med høj renhed. I hver af de to spejlbilledformer var der således mindre end 0,1 procent af den anden spejlbilledform til stede efter adskillelsen.

Test på enkelte receptortyper

Til at karakterisere de biologiske egenskaber af ATPA's spejlbilledformer har vi i tæt samarbejde med Institut for Molekylær og Strukturel Biologi ved Århus Universitet benyttet os af en metode, der gør det muligt udelukkende at teste på én receptorundertype fremfor det væld af receptorer, man finder i det normale hjernevæv. Metoden går ud på at indføre receptorerne i frøæg ved hjælp af genteknologi.

Forsøgene med henholdsvis AMPA- og kainsyre-receptorer viste meget overraskende, at (S)-ATPA selektivt og meget

potent aktiverer den undertype af kainsyre-receptorerne, som opbygges af byggestenen GluR5. På AMPA-receptorerne er (S)-ATPA derimod 10-100 gange mindre potent. Denne selektivitet gør (S)-ATPA til et overordentlig vigtigt værktøj i fremtidig forskning.

Den anden spejlbilledform, (R)-ATPA, viste sig derimod at være uden virkning på kainsyre-receptorerne. Derimod har stoffet en blokerende virkning på AMPA-receptorerne. (R)-ATPA passer med andre ord i receptoren, med er ikke i stand til at stimulere den.

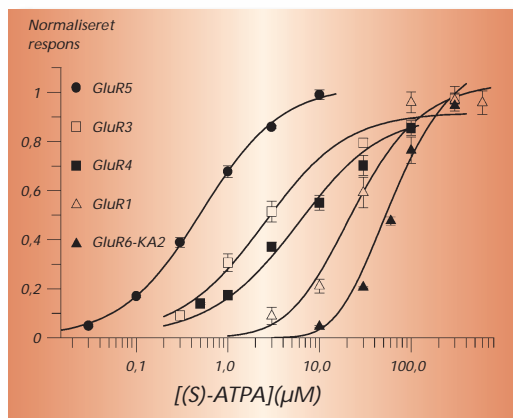
I et andet testsystem, en såkaldt hjerneslivemodel, har vi undersøgt stoffets virkninger i levende væv; et stykke af hjernebarken fra en rotte. De receptorer, man her undersøger, er således receptorer, der eksisterer i hjernen. I modsætning til forsøg med klonede receptorer i frøæg, hvor receptorsammensætningen er kendt, testes der i dette system på ukendte receptorkombinationer.

Ved forsøgene havde (S)-ATPA som forventet en stimulerende virkning på AMPA-receptorerne, der er dobbelt så stærk som den oprindelige blanding af de to spejlbilledformer. (R)-ATPA udviser derimod ingen stimulerende virkning, men hæmmer i stedet AMPA-receptorerne, nøjagtigt som det var tilfældet i forsøgene med frøæg.

I en model med levende væv ses ikke umiddelbart den kainsyreselektivitet, som vi fandt i forsøgene med frøægge. Det skyldes efter al sandsynlighed, at den særligt følsomme udgave af kainsyre-receptorerne kun findes i begrænset omfang i hjernebarken.

Ved at adskille de to spejlbilledformer af ATPA, der oprindeligt blev opfattet som et stof, der stimulerede AMPA-receptorerne svagt, er vi nu i besiddelse af et stof, der selektivt og potent aktiverer en specifik undertype af kainsyre-receptorer. Vi har på denne måde ved hjælp af et velkendt stof opnået et værktøj, der forhåbentlig kan skabe ny indsigt i baggrunden for Alzheimers sygdom og samtidigt bringe os et stykke videre af den snørklede vej mod lægemidler, der virker mod den invaliderende og dødelige sygdom.

Dosis-respons kurver af (S)-ATPA's virkning på selektive receptorer for AMPA og kainsyre udtrykt i frøæg. Den koncentration, som opnås ved den halve maksimale effekt, kaldes EC_{50} -værdien og anvendes som udtryk for potensen af et givent stof. Jo lavere denne værdi er jo mere potent er stoffet.



Ph.d. Tine Bryan Stensbøl er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



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



Ph.d. Jan Egebjerg er lektor ved Institut for molekylær og strukturel biologi ved Århus universitet

AMPA-receptorer - et mål for lægemidler mod Alzheimers sygdom

En gruppe receptorer for hjernens vigtigste stimulerende signalstof, AMPA-receptorerne, spiller en fundamental rolle for evnen til indlæring og hukommelse samt for bl.a. Alzheimers sygdom. Derfor må man selektivt kunne regulere signalstoffets aktivering af disse receptorer.

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

Opfattelsen af hjernen som en sort kasse, hvor forskellige input kan bearbejdes på mere eller mindre forudsigelig vis, hører fortiden til. I dag har man en langt mere nuanceret opfattelse af det uhyre komplekse samspil mellem hjernens 100 milliarder nerveceller.

Denne indsigt er et resultat af halvtreds års forskning. Det er bl.a. blevet klart, at signaloverførslen mellem nerveceller sker via signalstoffer, der udløser en nerveimpuls ved at binde sig til receptorproteiner på celleoverfladen.

Det vigtigste stimulerende signalstof i hjernen er glutaminsyre. Hvis der opstår ubalance i glutaminsyresystemet, hvorved der frigives for store mængder af signalstoffet, sker der en overstimulering af nervecellerne, som fører til henfald og celledød. Denne fremadskridende proces har stor betydning for udviklingen af visse sygdomme i centralnervesystemet, fordi henfaldet af nerveceller kan føre til f.eks. Alzheimers sygdom eller Huntingtons chorea.

Indlæring og hukommelse

Op gennem 1970'erne viste farmakologiske undersøgelser med en række naturstoffer, at der findes flere forskellige typer af receptorer, som aktiveres af glutaminsyre, som derigennem udøver sin stimulerende effekt.

Derfor inddeler man i dag glutaminsyre-receptorerne i undergrupper, hvor bl.a. AMPA-receptorerne spiller en helt central rolle, fordi disse receptorer synes at have en funda-

mental betydning for evnen til indlæring og hukommelse. Ønsker man at modvirke en fremadskridende senilitet, er det af stor betydning, at man selektivt kan regulere funktionen af AMPA-receptorerne.

Siden den neuromedicinalkemiske gruppe på Danmarks Farmaceutiske Højskole i begyndelsen af 1980'erne syntetiserede AMPA ved at modificere strukturen af stoffet ibotensyre fra rød fluesvamp og derigennem definerede eksistensen af AMPA-receptorerne, har der frem til i dag været en intensiv forskning i udvikling af nye stoffer, som ligner AMPA.

Udviklingsarbejdet har primært bestået i design og syntese af AMPA-analoger, der kan belyse sammenhængen mellem molekylernes struktur og deres biologiske aktivitet. Nogle af de principper, som anvendes, er f.eks. at syntetisere nye stoffer, hvor afstanden mellem de funktionelle grupper i molekylet varieres på systematisk vis, hvor der indføres nye kemiske grupper med andre egenskaber, eller hvor stoffets struktur fastlåses i en bestemt konformation. Her igennem opnår man indsigt i, hvilke kriterier, der stilles til stoffer, som henholdsvis kan aktivere eller blokere receptoren.

Aktivering og blokering

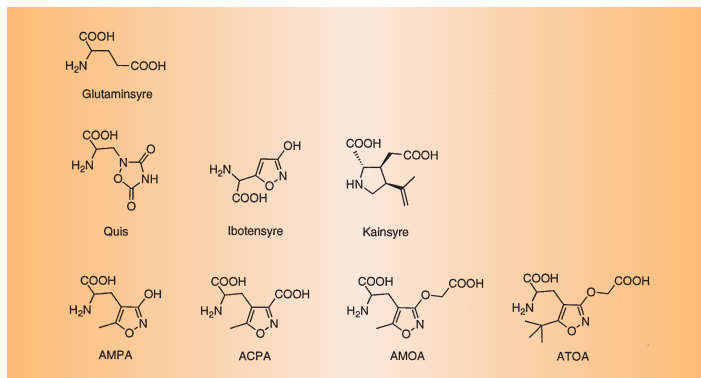
Gennem 1980'erne og 1990'erne har vi fremstillet en række modificerede analoger af AMPA, og her indtager ACPA, AMOA og ATOA særstillingen ud fra sammenhængen mellem deres struktur og deres biologiske aktivitet.

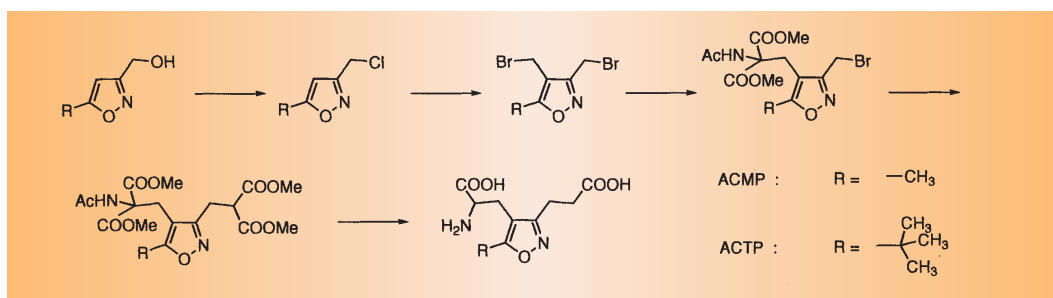
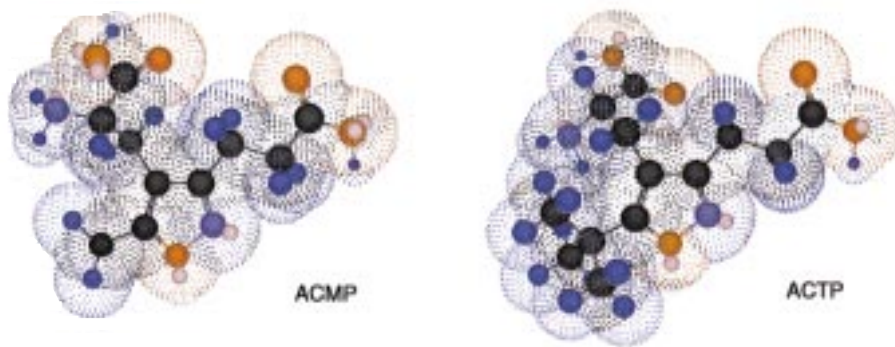
Strukturændringen i ACPA er baseret på udskiftning af en kemisk gruppe med en anden, hvorved man opnår at forlænge afstanden mellem de funktionelle grupper. Afstandsforøgelsen har vist sig at føre til et mere potent stof med hensyn til aktivering af AMPA-receptoren.

Imodsætning til ACPA blokerer AMOA- og ATOA-receptorerne. Her er der i realiteten tale om en yderligere forlængelse af afstanden mellem de funktionelle grupper. Forbindelsen ATOA er yderligere modificeret ved udskiftning af en funktionel gruppe i molekylets centrale ringstruktur. Denne ændring fører til, at ATOA virker kraftigere end AMOA med hensyn til at blokere AMPA-receptorerne.

Med udgangspunkt i henholdsvis ACPA- og AMOA-strukturerne, har vi gennem syntese af en række nye analoger forsøgt at belyse, hvilke strukturelle forhold, der er afgørende for at opnå henholdsvis en aktiverende og en blokerende effekt. Der er primært anvendt to modifikationsformer, den

Øverst til venstre ses strukturen af glutaminsyre, som er hjernens vigtigste stimulerende signalstof. Naturstofferne Quis, Ibotensyre og Kainsyre blev oprindeligt anvendt som modelstoffer for design og syntese af nye forbindelser. Gennem 80'erne har det primært været AMPA, som har fungeret som modelstof, mens det i dag hovedsagelig er ACPA og AMOA, der danner grundlaget for design af nye stoffer.





Skemaet viser syntesen af henholdsvis ACMP og ACTP. Molekylet opbygges gradvist gennem en række transformationer, hvor delfragmenter sammensættes til det endelige stof. Den rumlige struktur af ACMP og ACTP illustrerer størrelsesforskellen mellem en methylgruppe og en tertiær butylgruppe i isoxazolens 5-position.

ene er en ændring af afstanden mellem de funktionelle grupper, mens den anden går ud på at ændre orienteringen af den centrale ringstruktur i molekylet.

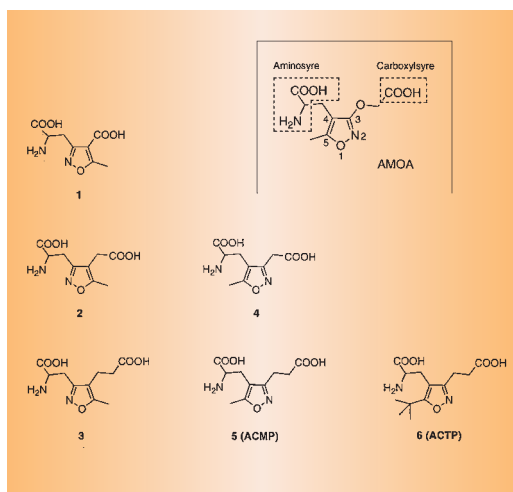
Af de nye stoffer blokerer forbindelsen ACMP AMPA-receptorerne, og stoffet er 4-5 gange mere potent end AMOA, mens ACTP har en lavere aktivitet end både ACMP og ATOA. Resten af de nye forbindelser var inaktive overfor AMPA-receptorerne.

Strukturelle krav til stofferne

De designede stoffer har vist, at orienteringen af den centrale ringstruktur har en central betydning for stoffets aktivitet. Afstanden mellem især to grupper, α -aminosyrefunktionen og carboxylsyren, er afgørende for, om stofferne er aktive-rende, blokerende eller inaktive.

Forsøgene har vist, at der ikke findes en simpel sammenhæng mellem struktur og aktivitet. Derfor kan man ikke på enkel vis forudsige aktiviteten af et stof, hvor man har indbygget strukturelementer fra flere forskellige stoffer, selv om hvert enkelt strukturelement i princippet burde føre til stigende aktivitet.

Vi forsøger nu at finde en sammenhæng mellem de enkelte strukturelementers betydning for aktiviteten, ved at designe nye stoffer, hvor carboxylsyresidekæden i ACMP og ACTP er tvunget ind i en bestemt konformation.



Figuren viser seks nye stoffer, der er designet med udgangspunkt i strukturerne af ACPA og AMOA. Forbindelserne 1-3 er alle uden effekt på AMPA-receptorerne. 1 er en modificeret form af ACPA, hvor orienteringen af isoxazolringen er ændret. 2 og 3 har fået modificeret afstanden mellem α -aminosyrefunktionen og den terminale carboxylsyregruppe. I forbindelsen 4 er afstanden mellem carboxylsyregruppen og isoxazolringen ændret ved at indføre en methylengruppe i ACPA-strukturen. Carboxylsyregruppen befinder sig i en mellemafstand mellem den aktiverende struktur (ACPA) og den blokerende struktur (AMOA). Denne forbindelse er også inaktiv overfor AMPA-receptorerne. Inaktiviteten indebærer, at der er et dødt afstandsområde mellem de to grupper, hvor forbindelserne ikke kan binde sig til receptorerne. 5 (ACMP) minder strukturelt om AMOA, men har fået udskiftet iltatomet i isoxazolringens 3. position med en methylengruppe. ACMP er 4-5 gange mere potent end AMOA med hensyn til at blokere AMPA-receptorerne. I 6 (ACTP) er både iltatomet og methylgruppen udskiftet med henholdsvis en methylen-gruppe og en tertiær butylgruppe. ACTP stimulerer AMPA-receptorerne, men ikke nær så kraftigt som ACMP og ATOA.



Civilingenør ph.d.
Frank A. Sløk er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Ulf Madsen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



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



AMPA-receptorer og celledød

Mange sygdomme i hjernen skyldes, at nerveceller dør. En undertype af nervecellernes receptorer for signalstoffet glutaminsyre, AMPA-receptorerne, spiller bl.a. en rolle for nervedød ved epilepsi og blodpropper. Studier af receptorerne kan øge forståelsen af sygdomsprocesserne og identificere mål for nye lægemidler.

Af Jette Bisgaard Jensen og Arne Schousboe

Glutaminsyre er hjernens vigtigste stimulerende signalstof og spiller en vigtig rolle i mange fysiologiske processer såsom udvikling af nerveceller, indlæringsprocesser og hukommelse. Imidlertid kan glutaminsyre også være yderst skadelig for nervecellerne. Hvis koncentrationen af signalstoffet bliver for høj omkring en nervecelle, kan cellen tage skade og eventuelt dø.

Den celledød, der ses efter sygdomstilstande som epilepsi og blodpropper, menes at være forårsaget af en overaktivering af receptorerne for glutaminsyre. Derfor er det et vigtigt terapeutisk mål for udvikling af nye lægemidler at kunne hindre celledøden. Det kan f.eks. opnås ved brug af stoffer, der blokerer receptorerne. En anden mulighed er at standse de processer, som foregår inde i cellerne, når receptorerne er blevet aktiveret.

Flere receptorer for glutaminsyre

Receptorer er betegnelsen for specifikke proteiner i celledemembranen, som signalstofferne binder sig til. Ved binding af et signalstof til receptoren, sker der nogle ændringer inde i cellerne, som afhænger af receptorens art.

I hjernen findes der flere forskellige typer receptorer for glutaminsyre, og tre af dem har fået navn efter stoffer, som aktiverer dem. Receptorerne kaldes for NMDA-, AMPA- og kainsyrereceptorer. Ved udviklingen af nye lægemidler til behandling af nervedød forårsaget af glutaminsyre, er det vigtigt at kende de enkelte receptorens indflydelse på nervecellernes henfald og mekanismerne bag nervedøden.

De tre nævnte typer receptorer danner alle ionkanaler, som gør det muligt for positivt ladede atomer at trænge ind i cellen. Når receptorerne aktiveres af deres replektive signalstof eller af glutaminsyre, sker der en øget indstrømning af ioner gennem ionkanalen.

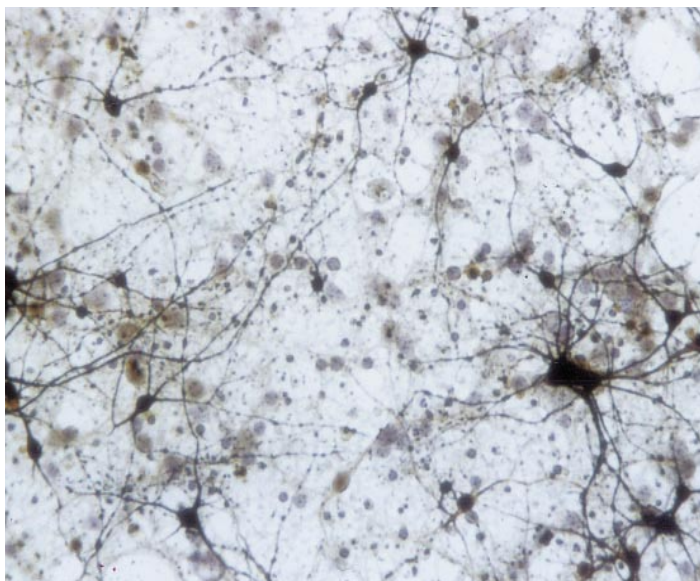
Arten af de indstrømmende ioner afhænger af receptortypen. Kalciumioner er specielt interessante, fordi de spiller en rolle for celledøden i hjernen ved neurodegenerative sygdomme. Kalcium har let ved at trænge gennem NMDA-receptorerne, mens AMPA- og kainsyrereceptorerne kun er gennemtrængelige for kalcium under særlige omstændigheder. AMPA-receptorer er hovedsagelig gennemtrængelige for natrium-ioner.

AMPA-receptorer er ionkanaler

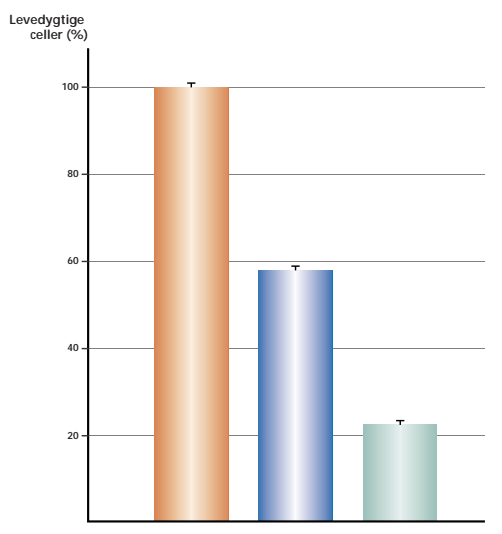
I et nyt studie har vi undersøgt AMPA-receptorens evne til at fremkalde celledød. Når receptoren aktiveres af glutaminsyre eller AMPA, vil kanalen åbnes, og natrium vil strømme igennem kanalen, så længe den er åben. AMPA-receptorer kan dog også i særlige tilfælde lade kalciumioner strømme igennem receptorkanalen. Dette sker, når sammensætningen af receptoren er af en bestemt karakter.

Når AMPA-receptorerne dannes i celledemembranen, sættes de sammen af fire underenheder. Disse fire underenheder, som kaldes GluR1, GluR2, GluR3 og GluR4, samles i forskellige komplekser med fire eller fem i hver, hvorved receptorstrukturen og ionkanalen dannes.

Hvis GluR1, GluR3 og GluR4 samles i en AMPA-receptor, vil ionkanalen være gennemtrængelig for kalcium. Men hvis



Denne figur viser en koboltfarvning af en 12 dage gammel cellekultur. Nervecellerne er blevet stimuleret i 20 min med en buffer indeholdende kobolt og 25 μM AMPA plus 50 μM cyclothiazid. Herefter er cellerne blevet farvet med en svovlforbindelse og efterfølgende er farvningen forstærket med sølv. De sorte nerveceller har optaget kobolt og har derfor AMPA-receptorer, som er gennemtrængelige for kalcium.



Figuren illustrerer den toksiske effekt af AMPA ved påvirkning af en 12 dage gammel cellekultur. Giftvirkningen er udtrykt som procent levedygtige celler i forhold til ubehandlede celler (rød søjle), som er 100%. Cellernes evne til at omsætte MTT til formazan blev brugt som mål for levedygtighed. Cellekulturen blev udsat for påvirkning med 500 µM AMPA (blå søjle) og 25 µM AMPA plus 50 µM cyclothiazid (grøn søjle).

GluR2 indgår i receptorkomplekset, kan receptoren ikke længere lede kalcium gennem ionkanalen og ind i cellen. Det indebærer, at kun natrium kan strømme gennem disse typer af AMPA-receptorer.

Ved undersøgelser af AMPA-receptorers sammensætning i den intakte hjerne, har man fundet, at de fleste AMPA-receptorer indeholder GluR2. Det vil sige, at flertallet af AMPA-receptorerne i hjernen ikke eller kun i ringe grad er gennemtrængelige for kalcium.

Giftvirkninger på nerveceller

Undersøgelser af stoffers giftvirkninger på nerveceller kan med fordel foretages på dyrkede nerveceller fra eksempelvis mus. Under de korrekte betingelser kan cellekulturen give svar på teststoffernes virkning, deres rolle i celledød, deres evne til at øge koncentrationen af kalcium i cellen og meget andet.

Vi har undersøgt AMPA's toksiske effekt på nerveceller dyrket i kultur. Påvirkningen af AMPA nedsætter procentdelen af levedygtige celler sammenlignet med de ubehandlede celler. Ved påvirkning af cellerne med AMPA i seks timer mister omkring 40 procent af cellerne deres levedygtighed, mens ubehandlede celler alle overlever. AMPA udøver således en giftvirkning på cellerne.

Mange receptorer har en evne til at desensibilisere, hvilket vil sige, at receptoren lynhurtigt inaktiveres efter, at signalstoffet har bundet sig til receptoren. Denne inaktivering af receptoren er vedvarende, selv om signalstoffet stadig er tilgængeligt. AMPA har netop denne evne til at inaktivere AMPA-receptorer, og hvis dette ikke var tilfældet, ville stoffets toksiske effekt være langt kraftigere. Derfor har desensibiliseringen stor betydning for AMPA's evne til at fremkalde celledød.

Receptorens nedsatte følsomhed ved vedvarende kontakt med AMPA er beskyttende for cellekulturen, således at færre celler bliver skadet. Det ses, hvis man reducerer desensibiliseringen af receptorerne, hvilket kan gøres ved at tilsætte stoffet cyclothiazid til cellekulturen sammen med

AMPA. Cyclothiazid hæmmer AMPA's evne til at inaktivere receptorerne ved vedvarende påvirkning. Derfor bliver flere receptorer ved med at være aktive, hvorved AMPA's giftvirkning på receptorerne øges. Resultatet er, at andelen af levedygtige celler falder sammenlignet med den påvirkning AMPA alene udøver på cellerne.

Under normale tilstande i hjernen beskytter den hurtige desensibilisering af AMPA-receptorerne mod skadevirkninger af AMPA og glutaminsyre. Men under sygdomstilstande, hvor desensibiliseringen måske er ophævet, vil AMPA-receptorerne kunne udøve en betydelig skade på nervecellerne.

Kalcium er gift for nerveceller

Undersøgelser af mekanismerne bag forgiftning af nerveceller sætter normalt fokus på kalciumioner. Denne ion spiller nemlig vigtig rolle for den celledød, som skyldes en overstimulering af glutaminsyre receptorerne.

Når nervecellerne stimuleres med glutaminsyre stiger mængden af frie kalciumioner inde i cellerne. Hvis den intracellulære koncentration af kalcium vedbliver med at være forhøjet gennem kortere eller længere tid, aktiveres forskellige skadelige stoffer inde i cellen. F.eks. øges dannelsen af frie radikaler, som derefter ødelægger cellens struktur, hvorved cellen dør.

Da kalcium spiller så stor en rolle for celledød, er det væsentligt at undersøge, hvorvidt kalcium har betydning for den celledød, der er observeret efter aktivering af AMPA-receptorerne. En øget indstrømning af kalciumioner under aktivering af disse receptorer kan for eksempel øge den resulterende celledød. Det vil sige, at nerveceller, der har AMPA-receptorer indeholdende GluR2 i receptorkomplekset, kunne tænkes at være mere modstandsdygtige over for en påvirkning fra AMPA og glutaminsyre, fordi kalcium ikke eller næsten ikke kommer ind i cellen.

Spørgsmålet kan undersøges ved hjælp af koboltfarvning. Denne metode er designet således, at kun AMPA-receptorer, der er gennemtrængelige for kalcium, kan optage kobolt gennem receptorkanalen. Den kobolt, som ophobes i cellerne kan efterfølgende farves med en svovlforbindelse og forstærkes med en sølvfarvning. Nerveceller, som har optaget kobolt, indeholder AMPA-receptorer, der er gennemtrængelige for kalcium.

Disse nerveceller er sandsynligvis mere udsatte ved en blodpropper eller under epileptiske anfald, fordi kalcium vil strømme ind i cellerne, når receptorerne aktiveres. Dette studie har dog vist, at kun omkring en femtedel af nervecellerne i kulturen har AMPA-receptorer, der er gennemtrængelige for kalcium. Resultaterne af nærværende studie synes således at pege på, at desensibilisering er vigtigere end kalciumgennemtrængelighed for den AMPA-receptor medierede celledød.



Ph.d. Jette Blsgaard Jensen er videnskabelig medarbejder ved H. Lundbeck A/S



Dr.scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi, Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Antistoffer finder specifikke receptorer

Hjernens receptorer for signalstoffet glutaminsyre indgår i vigtige funktioner som indlæring og hukommelse, og fejlfunktioner kan føre til alvorlige sygdomme som f.eks. Alzheimers sygdom, Parkinsons syge og epilepsi. Der findes et stort antal undertyper af receptorerne, som nu kan identificeres ved hjælp af antistoffer.

Af Lene K. Jespersen og Jan Engberg

Hos mennesker og alle højerestående dyr indgår nervecellerne receptorer for signalstoffet glutaminsyre i flere af hjernens vigtige funktioner, f.eks. indlæring og hukommelse. Det er derfor ikke uventet, at en lang række studier har vist, at neurologiske sygdomme ofte skyldes, at receptorerne for glutaminsyre ikke fungerer, som de skal.

Betegnelsen glutaminsyre-receptorer omfatter en stor gruppe receptorer, som alle benytter glutaminsyre som signalstof. Receptorerne for glutaminsyre kan opdeles i forskellige undergrupper, som afviger fra hinanden ved deres strukturelle opbygning og ved deres egenskaber.

De såkaldte ionotrope glutaminsyre-receptorer er involveret i transport af positive ioner over nervecellernes membraner. Receptorerne er opbygget af et antal individuelle proteiner, kaldet underenheder, som danner en slags kanal i cellemembranen. Når receptorerne aktiveres af glutaminsyre, åbnes kanalen, og ionerne kan nu strømme ind i nervecellen, som derved aktiveres.

De ionotrope glutaminsyre-receptorer er opbygget af fire forskellige underenheder, som kaldes GluR A-D. Nogle glutaminsyre-receptorer kan bestå af GluR A alene, mens andre kan bestå af forskellige typer underenheder. Transporten af positive ioner og den deraf følgende fysiologiske effekt er kritisk afhængig af receptorens sammensætning af underen-

heder. Derfor er det af stor betydning for indsigten i hjernens funktion at opklare, hvordan receptorerne for glutaminsyre er sammensat i de forskellige områder af hjernen. Det kan give en ledetråd for udviklingen af lægemidler til afhjælpning af en række neurologiske sygdomme.

Reagenser skelner mellem undertyper

På den baggrund satte vi os for at fremstille reagenser, som kan skelne mellem de forskellige undertyper af glutaminsyre-receptorer. Vi valgte at fremstille antistoffer mod receptorerne, fordi antistoffer er meget effektive til at genkende specifikke molekyler. Dette forhold har sin baggrund i, at vores immunforsvar kan danne antistoffer imod praktisk taget alle slags indtrængende fremmedlegemer.

Antistoffer produceres ved at immunisere forsøgsdyr, som regel mus. Men metoden er ikke problemfri. Især er det svært at isolere netop de celler i immunforsvaret, som producerer et antistof med den ønskede specificitet. For at komme omkring dette problem valgte vi at anvende en ny teknologi, som på relativt kort tid har opnået en stor gennemslagskraft inden for både akademiske og kommercielt orienterede projekter.

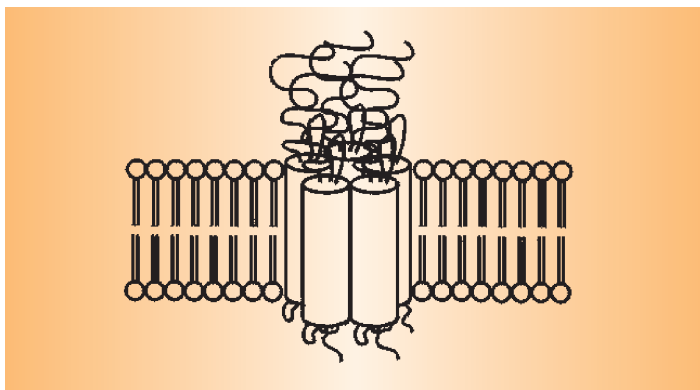
Antistoffer på viruspartikler

Teknologien er baseret på såkaldte fager; en gruppe virus, der inficerer bakterier. Fag-display-metoden gør det muligt at undersøge et meget stort antal antistoffer på relativt kort tid.

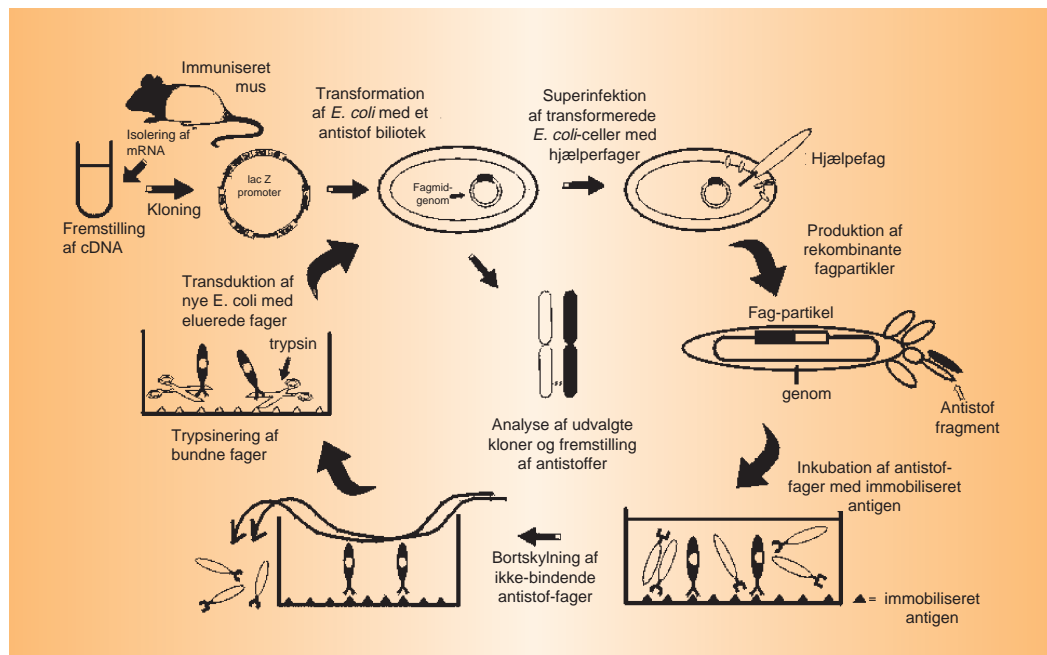
Princippet i metoden er, at musens totale repertoire af antistoffer - i alt 100 millioner forskellige specificiteter - efter en del manipulationer bliver præsenteret som antistoffer på overfladen af viruspartikler, således at hver enkelt viruspartikel præsenterer ét bestemt antistof. Ved at underkaste partiklerne en oprensning under anvendelse af glutaminsyre-receptorer med en kendt sammensætning af underenheder, kan man isolere de antistoffer, som binder sig til de forskellige undertyper af receptorerne.

Derpå kan man ved yderligere genteknologiske manipulationer fremstille store mængder af det ønskede antistof. Kort fortalt bruges fagerne til at inficere *E.coli*-bakterier, som så fungerer som antistoffabrikker.

Normalt anbringes det molekyle, som antistofferne skal genkende, på overfladen af et fast stof. Det forudsætter imidlertid, at man er i stand til at isolere det pågældende molekyle i ren form, samt at molekylet kan tåle at blive fast-



Tegningen viser en glutaminsyre-receptor. Det gennemgående vandrette lag illustrerer cellemembranen, og de fem tøndeformede strukturer er de underenheder, som opbygger receptoren. På underenhederne er der påhæftet trådformede proteindomæner.



Princippet i fag-display-metoden. I eksemplet er anvendt en immuniseret mus til isolering af antistoffers kodende sekvenser (mRNA). Messenger-RNA fra milten omdannes til cDNA-molekyler, hvorpå antistof-generne indføres i bakterieceller. Ved efterfølgende infektion af bakteriecellerne med en hjælperfag, dannes nye fagpartikler, som præsenterer antistoffer på deres overflade. De ønskede fagpartikler isoleres og oprenses nu ved hjælp af antigenet. Når en specifikt bindende fagpartikel er karakteriseret, overføres de antistofkodende gener fra denne til andre vektorer, som er specielt udviklet til at producere store mængder antistoffer.

gjort til en plastikoverflade uden at miste sin biologiske funktion. Dette kan ikke lade sig gøre med mange receptorer, fordi deres korrekte struktur og dermed funktion er betinget af, at de findes indlejret i en cellemembran eller i en kunstig membran med tilsvarede egenskaber.

Vi valgte derfor at isolere underenhederne af receptorerne for glutaminsyre i en membranbunden form. Dette blev opnået ved at indbygge de forskellige underenheder af receptorerne i kunstige membraner, som kaldes liposomer.

Mus blev dernæst immuniseret med liposomer, som indeholdt funktionelle underenheder af receptorerne. Fra musene blev der nu fremstillet antistofbiblioteker, som blev udtrykt på overfladen af fager. Derpå blev antistofferne oprenset ved hjælp af den samme type liposomer, som blev anvendt ved immuniseringen. På den måde fandt vi de antistoffer, som binder sig til glutaminsyre-receptorerne.

Karakterisering af antistofferne

De isolerede antistoffer blev dernæst analyseret for at præcisere deres specificitet. Baggrunden for disse analyser er, at antistofferne ifølge deres natur kun genkender et begrænset område på overfladen af receptorernes underenheder. Det vil derfor nedsætte et antistofs værdi som genkendelsesreagens, hvis dette område forekommer i flere receptortyper.

Vi analyserede derfor specificiteten af antistofferne overfor en udvalgt underenhed i glutaminsyre-receptorerne, GluRD. Undersøgelsen viste, at nogle antistoffer havde absolut specificitet overfor netop denne underenhed, mens andre genkendte såvel GluRD som andre underenheder i glutaminsyre-receptorerne. Disse resultater var præcist som forventet, fordi GluRD både indeholder proteinområder, der er specifikke for GluRD, og områder, der også findes i andre af receptorernes underenheder.

Næste trin var at dokumentere, at de isolerede antistoffer havde den forventede specificitet overfor ekstrakter fra hjernevæv. Disse resultater er specielt vigtige, fordi de viste, at antistofferne genkender relevant og funktionelt biologisk materiale og ikke blot receptorliposomer, som fremstilles i laboratoriet.

Vores strategi og resultater har således bragt os i besiddelse af reagenser, som specifikt genkender vigtige receptorer i hjernens normale virkemåde. Anvendelsen af genteknologiske metoder, især fag-display teknologien, har her demonstreret sin nytteværdi ved at gøre det muligt at fremstille antistoffer mod svært tilgængelige receptorer i cellemembranerne. Det omtalte projekt er udført i samarbejde med Dr. Kari Keinänenens laboratorium i Helsinki, Finland.



Ph.d. Lene K. Jespersen er tidligere ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



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



Glutaminsyre pumpen regulerer hjernens aktivitet

Glutaminsyre er det hyppigst forekommende stimulerende signalstof i hjernen. Stoffets exciterende effekt bringes til ophør ved, at glutaminsyre fjernes fra væsvæsken af proteiner i cellemembranen, såkaldte transportører. Ved hjælp af mikrodialyseteknikken har vi bestemt kapaciteten og følsomheden af en af disse transportører.

Af Torben Bruhn, Thomas Christensen, Arne Schousboe og Nils Henrik Diemer

Nervecellerne i hjernen kommunikerer med hinanden ved hjælp af synapsen. En synapse er et kontaktpunkt mellem to nerveceller, hvor de udveksler informationer med hinanden. Synapsen består af specialiserede områder af cellemembranen, som sidder i udløbere på de to kommunikerende nerveceller. Udløberne er kun adskilt fra hinanden af et ganske snævert rum, den synaptiske kløft.

Udvekslingen af signaler foregår ved, at signalstoffer frigøres fra nerveenden, krydser over synapsekløften og påvirker receptorer, som sidder i cellemembranen på den modtagende nervecelle. Herefter skal signaleringen standses. Det sker ved, at signalstoffet spaltes enzymatisk eller genoptages - enten af den nervecelle, der frigjorde det, eller af en anden celletype, astrocytten, hvis udløbere omgiver synapsen. Signaleringen kan endvidere stoppes ved, at receptorens følsomhed for signalmolekylet falder.

Signalstoffer kan enten stimulere eller hæmme en modtagende nervecelle, og der er normalt en fin balance mellem stimulation og hæmning i hjernen - ellers løber signalprocesserne løbsk som ved et epileptisk anfald, eller den går mere eller mindre i stå som hos personer i coma, svær alkoholforgiftning, morfinforgiftning osv.

Blandt de stimulerende signalstoffer er glutaminsyre det

mest udbredte, og stoffet anvendes næsten overalt i hjernen. Glutaminsyres aktivering af nervecellerne kan standses på to af de nævnte måder. Enten nedsættes receptorens følsomhed for signalstoffet, eller glutaminsyre genoptages i astrocytterne. Afhængig af hvilken hjerneregion, der er tale om, dominerer den ene eller den anden proces i afslutningen på stimulationen.

Vi har undersøgt hjernedelen hippocampus i rotter. Her synes fjernelse af glutaminsyre fra synapsekløften at afslutte signaleringen.

Målinger på den levende hjerne

Der kendes nu mindst fire forskellige transportører, som fjerner glutaminsyre fra synapsekløften. Transportørerne findes både på nerveceller og på astrocytter.

Deres evne til at optage glutaminsyre kan dels undersøges på dyrkede celler, dels på forsøgsdyrs intakte hjerner eller på isoleret hjernevæv. Man vil foretrække dyrkede celler, når de enkelte transportørers basale egenskaber skal undersøges, men når transportørernes funktion skal undersøges i sygdomsmodeller, er det en stor fordel at kunne tage forsøgsdyr til hjælp.

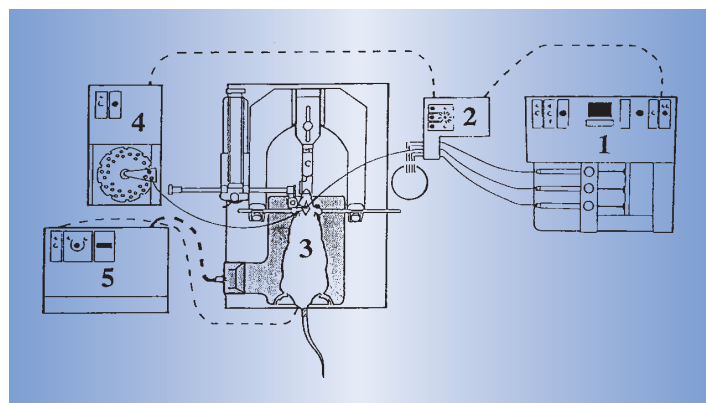
Koncentrationen af glutaminsyre i cellevæsken kan måles på levende dyr med den såkaldte mikrodialyseteknik, hvor en tynd fiber placeres i den hjerneregion, man ønsker at undersøge. Fiberen er en dobbeltløbet kanylen, hvis yderste spids består af en membran, der er gennemtrængelig for mindre molekyler.

Inde i kanylen er der to tynde rør, et indløbsrør og et udløbsrør, således at kanylespidsen med den gennemtrængelige membran kan gennemskylls langsomt. Herved opstår der en stofudveksling mellem hjernevæsken og væsken inde i kanylen på den anden side af membranen. Den væske, der opsamles fra mikrodialysefibrerens udløbsrør, afspejler derfor hjernevæskens sammensætning og kan analyseres for sit indhold af mindre molekyler.

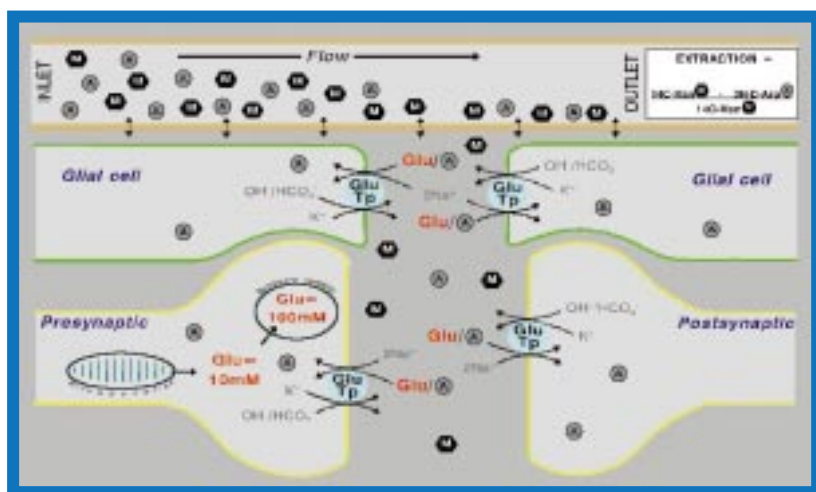
Område involveret i epilepsi og iskæmi

Med denne metode har vi undersøgt koncentrationen af glutaminsyre i hippocampus på rotter. Regionen er interessant, idet der ved epilepsi og efter kortvarig standsning af hjernens blodtilførsel, hjerneiskæmi, hyppigt forekommer nervecelledød her, som ser ud til at skyldes overstimulering med glutaminsyre.

Ved hjerneiskæmi viste vores undersøgelser en stor stigning i glutaminsyrekoncentrationen. Derimod fandt vi i en epilepsimodel ingen ændring af glutaminsyreniveauet, hvil-



Skema over mikrodialyseopstilling. 1. Injektionspumpe 2. Væskeomskifter 3. Rotte med mikrodialysefiber 4. Automatisk prøveopsamler 5. Højtryksvæskeskromatograf (HPLC).

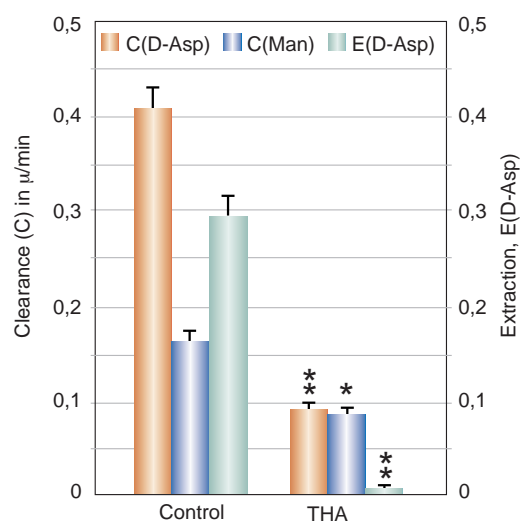


Figuren skitserer princippet i mikrodialysen. Den blå ramme viser væsvæsken. Øverst ses mikrodialyserets indløb (tv) og udløb (th). Strømmen gennem væsvæsken måles ved hjælp af markøren (M), som hverken optages af nerveceller eller astrocytter, hvorfor mængden i udløbsrøret svarer til den mængde, som strømmer ind i væsvæsken fra indløbsrøret. Det radioaktive sporstof (A) optages i astrocytten og nervecellens synapser på samme måde som signalstoffet glutaminsyre (Glu), hvilket sker gennem transportørerne i cellemembranen (Tp). Forskellen mellem mængden af markøren og sporstoffet måles i udløbsrøret. Differencen viser, hvor meget af sporstoffet - og dermed glutaminsyre - cellerne genoptager.

ket var ejendommeligt, fordi den øgede aktivitet burde resultere i en øget frigørelse af glutaminsyre. Hvis man imidlertid tænker sig, at der også sker en øget genoptagelse af glutaminsyre i nerveender og astrocytter, så må det konkluderes, at mikrodialysemetoden i dens simple udformning ikke kan måle strømmen af glutaminsyre - hvor meget vand, der løber gennem åen - men kun niveauet, svarende til vandstanden.

Sporstof viser genoptagelsen

Fiberens membran kan også bruges til at sende stoffer ind i væsvæsken, herunder radioaktive sporstoffer. Vi begyndte undersøgelser med et sådant sporstof, tritium-mærket D-asparaginsyre. Molekylet har omtrent samme størrelse som glutaminsyre og transporteres ligesom signalstoffet rundt i



væsvæsken uden at blive nedbrudt i cellernes stofskifte.

Ideen var at tilsætte sporstoffet til dialysefibrers indløbsvæske og så registrere i udløbsvæsken, hvor meget af sporstoffet, der var forsvundet - og på den måde måle strømmen i åen. Den mængde, som forsvinder, afhænger af to forhold, rumfanget af væsvæsken, der omgiver mikrodialysefibreren, og optagelsen af sporstoffet i cellerne.

For at kunne beregne den mængde af sporstof, som kommer ud i væsvæsken, er det nødvendigt at bruge et markørstof. Markørstoffet optages ikke af cellerne, og derfor svarer mængden i udløbsrøret til den mængde, der strømmer ind i væsvæsken. Situationen er anderledes for det glutaminsyrelignende sporstof, som genoptages, når signalprocessen standses. Ved at måle mængderne af både markørstoffet og sporstoffet i udløbsrøret kan man således beregne, hvor meget glutaminsyre, der genoptages i cellerne efter endt arbejde.

Som markør anvendte vi mannitol. Markøren blev nu mærket med kulstof-14, hvorved vi kunne skelne mellem markøren og det tritiummærkede sporstof. Herefter kunne vi beregne den mængde sporstof, der blev optaget i rottens nerveceller.

Nærbillede af transportøren

Forsøgene strakte sig over en time, hvor hjernecellerne omkring vores mikrodialysefiber blev udsat for forskellige koncentrationer af sporstoffet, hvor den højeste var tusind gange større end den mindste. På den baggrund kunne vi bestemme genoptagelsen af sporstoffet ved forskellige koncentrationer.

Som tidligere nævnt findes der flere forskellige transportører for glutaminsyre, og den målte genoptagelse kunne derfor repræsentere summen af deres optagelse af sporstoffet. Imidlertid ville det være værdifuldt, hvis man kunne bestemme følsomheden og kapaciteten af de enkelte glutaminsyretransportører. For nylig har det vist sig, at man selektivt kan blokere funktionen af en af disse transportører, som sidder på astrocytter, med stoffet dihydrokainsyre.

Da vi blokerede for denne transportør, som kaldes GLT-1, faldt genoptagelsen af sporstoffet til værdier nær nul. Den genoptagelse, vi ser i hippocampus, stammer således under normale omstændigheder fra GLT-1 transportørens funktion.

Ud fra vore eksperimenter kan vi konkludere, at det er lykkedes at videreudvikle mikrodialyseteknikken, således at transportørfunktionen kan bestemmes. Metoden er nu klar til brug til undersøgelser af sygdomstilstande i hjernen.

Resultater fra mikrodialyseforsøg, som viser udløbsmængden af asparaginsyre, der fungerer som en analog for glutaminsyre, samt mannitol udtrykt som ekstraktion. Søjlerne til højre viser, at ekstraktionen kan elimineres ved hjælp af en uspecifik hæmmer af glutaminsyretransportørerne, THA.



Cand.med. Torben Bruhn er forskningslektor ved Neuropatologisk Laboratorium, Institut for Molekylær Patologi, Københavns Universitet.



Cand.med. Thomas Christensen er forskningslektor ved Neuropatologisk Laboratorium, Institut for Molekylær Patologi, Københavns Universitet.



Dr.scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi, Danmarks Farmaceutiske Højskole.



Dr.med. Nils Henrik Diemer er professor ved Neuropatologisk Laboratorium, Institut for Molekylær Patologi, Københavns Universitet.

Acetylcholin - et terapeutisk koncept under forandring

Hos patienter med Alzheimers sygdom dør de nerveceller, som anvender acetylcholin som signalstof. Derfor har man søgt at udvikle lægemiddelstoffer, som er målrettet mod en vigtig type af nervecellernes receptorer for acetylcholin. Resultaterne er skuffende, men forskningen har afdækket nye terapeutiske muligheder, bl.a. indenfor skizofreni.

Af Henrik Pedersen, Hans Bräuner-Osborne,
Karla Frydenvang og Povl Krosgaard-Larsen

Demenssygdomme af Alzheimer-typen er karakteriseret ved et fremadskridende henfald af hjerneceller, der anvender acetylcholin som signalstof. Når nervedøden når et vist niveau, begynder Alzheimer-patienterne at opleve indlærings- og hukommelsesproblemer, og disse symptomer udvikler sig gradvist til vidtgående tab af deres intellektuelle evner.

Imidlertid foreligger der nu stærke indicier for, at andre faktorer også spiller en rolle i udviklingen af Alzheimers sygdom. Det gælder specielt udfældningen af proteinansamlinger i hjernen, som skyldes en abnorm omsætning af amyloid precursor-proteinet, samt fejlfunktioner i et andet af hjernens proteinsystemer, apolipoprotein E. Der er blevet påvist et samspil mellem acetylcholinreceptorerne og omsætningen af amyloid precursor-proteinet, som rummer terapeutiske muligheder.

Design af aktive stoffer

Gennem de sidste to årtier har de muscarine receptorer været i fokus som terapeutiske angrebepunkter i Alzheimers sygdom. Den neuromedicinsk kemiske gruppe på Danmarks Farmaceutiske Højskole spillede fra starten en central rolle

med hensyn til design og udvikling af stoffer, som stimulerer de muscarine receptorer, og som derfor har farmakologisk og potentiel terapeutisk interesse.

Med udgangspunkt i naturstofferne arecolin og norarecolin, som aktiverer receptorerne, men som hurtigt nedbrydes i organismen, designede og syntetiserede vi det stimulerende stof O-Me-THPO ud fra norarecolin.

Derpå analyserede vi sammenhængen mellem struktur og aktivitet af en serie beslægtede stoffer. Undersøgelserne viste, at strukturen af den "øverste del" af disse molekyler var af kritisk betydning for stoffernes evne til at binde sig til de muscarine receptorer. Den "nederste del" af molekylerne, syntes ikke på tilsvarende måde at være i tæt kontakt med receptorerne, men det blev klart, at stoffernes styrke og farmakologiske profil kunne modificeres gennem en tilpasning af strukturen af denne del af molekylerne.

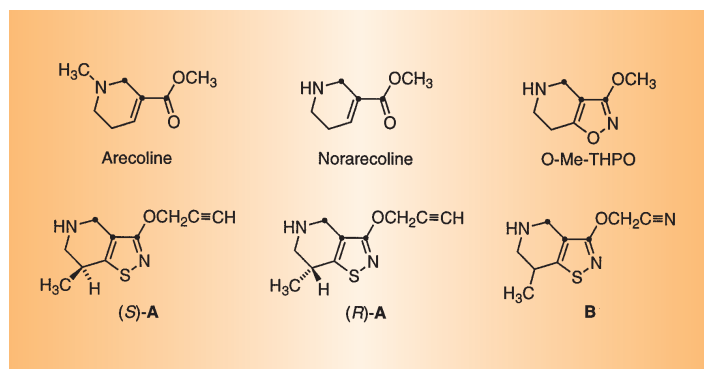
Disse struktur-aktivitets analyser blev gennemført i nært samarbejde med forskere på H. Lundbeck A/S, og indenfor rammerne af dette samarbejde blev et stort antal nye forbindelser syntetiseret og farmakologisk karakteriseret. Resultatet af disse struktur-aktivitets analyser var i god overensstemmelse med tidligere konklusioner vedrørende den relative betydning af molekylernes øverste og nederste del.

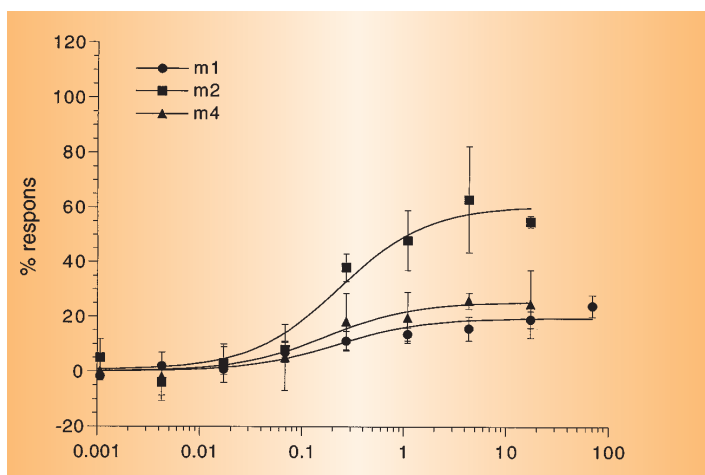
Skuffende resultater med Alzheimer patienter

En væsentlig del af de omfattende "drug design" aktiviteter med henblik på at udvikle stoffer, som med forskellig effektivitet stimulerer de muscarine receptorer, er gennemført i Danmark på firmaerne H. Lundbeck A/S, Novo Nordisk A/S samt på Danmarks Farmaceutiske Højskole. Disse forskningsaktiviteter har ført til udvikling af flere stoffer, som stimulerer receptorerne i begrænset omfang. Sådanne stoffer har terapeutisk interesse, fordi de ikke forrykker den hårfine balance mellem aktiverende og hæmmende signaler i hjernen på ukontrollabel vis.

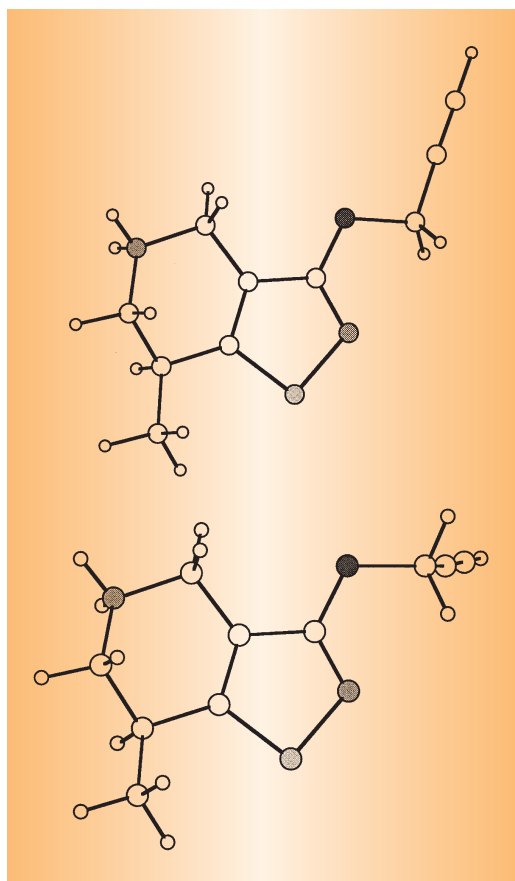
En del af stofferne, bl.a. (S)-A og (R)-A, stimulerer receptorerne på en måde, som vurderes at være optimal for behandling af Alzheimer-patienter, og mange af stofferne har forbedret forsøgsdyrs evne til at lære og huske. Endvidere er der på flere forskningslaboratorier gennemført undersøgelser, der har afsløret, at stoffer, som stimulerer de

Strukturen af forskellige stoffer, som aktiverer de muscarine receptorer for acetylcholin. Stofferne er analoger af norarecolin, et stof fra betelnødden, som har denne effekt. C-atomerne i den "øverste del" af molekylerne, som sammen med sidekæderne i høj grad bestemmer stoffernes farmakologi, er fremhævet. I den "nederste del" af molekylerne A og B er der etableret et center, hvor stofferne kan fremstilles i to spejlbilledformer. For stof A's vedkommende er spejlbilledformerne (S)- og (R)- blevet syntetiseret og karakteriseret farmakologisk.





Dosis-virkningskurver for stof (S)-A's aktivitet på de klonede humane muscarine receptorer m1, m2 og m4. Det fremgår, at (S)-A har større stimulerende effekt på m2 end på m1 og m4. Både (S)- og (R)-A viser en blokerende virkning på m3 og m5.



Figuren viser, at en røntgenkrystallografisk analyse af et salt af (S)-A har afsløret tilstedeværelsen af to forskellige konformationer af stoffet i krystallerne. Denne iagttagelse kan have betydning for forståelsen af stoffets vekselvirkning med de muscarine receptorer.

muscarine receptorer, også påvirker apolipoprotein E og amyloid precursor-proteinsystemerne på en gunstig måde.

I lyset heraf var det overraskende og skuffende, da de første meldinger om stort set negative resultater af kliniske undersøgelser med Alzheimer patienter blev rapporteret. Disse nedslående resultater er siden blevet bekræftet fra forskellig side, og de kliniske forsøg med behandling af Alzheimers sygdom er nu i flere tilfælde indstillet.

Fra et terapeutisk synspunkt har forskningen lidt et alvorligt tilbageslag. Et indlysende logisk koncept, som gennem årene blev yderligere uddybet, har ikke levet op til forventningerne i den altafgørende fase, som er forsøgene på patienter med Alzheimers sygdom. Der rejser sig naturligvis i denne situation et hav af spørgsmål, som forskerne allerede er gået i gang med at forsøge at besvare.

Har man hidtil overset en faktor af betydning for sygdomsprocessen? Man må også mere dybtgående undersøge, om de muscarine receptorer, som man sigtede efter, nu også er så funktionelt intakte i Alzheimer-patienterne, som man formodede på grundlag af dyreforsøg. Forskningsfeltet kan meget vel tage en ny positiv drejning, således at man om nogle år måske kan konkludere, at man "tabte et slag, men vandt krigen".

Stofferne hjalp på psykotiske tilstande

I forbindelse med de kliniske forsøg med Alzheimer-patienter blev det bl.a. observeret, at selv om patienternes indlærings- og hukommelsesdefekter ikke blev signifikant forbedret, så skete der en iøjnefaldende forbedring for de patienter, som samtidig havde psykotiske symptomer.

Observationerne har vakt opsigt, og disse resultater er nu genstand for udforskning i forskningslaboratorierne. Der eksisterer tilsyneladende et tæt samspil mellem to af hjernens signalsystemer, acetylcholin-systemet og dopaminsystemet, som finder sted gennem receptorerne for acetylcholin. Hos patienter med skizofreni er dopaminsystemet overaktivt.

Der er således åbnet en ny og spændende gren af skizofreniforskningen. Fremtiden vil vise, om den vil bane vejen for ny terapeutisk behandling af skizofrenipatienter. Et betydeligt antal stoffer, som stimulerer de muscarine receptorer er allerede kørt i stilling, når vejen i øvrigt bliver banet for kliniske undersøgelser på dette område.



Ph.d. Henrik Pedersen er afdelingsleder ved Spektroskopisk Afdeling, Medicinal-kemisk Forskning, H. Lundbeck A/S.



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



Ph.d. Karla Frydenvang er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



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

Ny indgang til at påvirke hjernens aktivitet

Nervecellernes receptorer for signalstoffet GABA er et mål for lægemidler mod sygdomme som epilepsi, angst, søvnløshed og depression. Ny forskning har vist, hvordan den ene af GABA's to familier af receptorer er opbygget. Det giver muligheder for at skræddersy lægemiddelstoffer, som kan finjustere receptorernes aktivitet.

Af Hans Bräuner-Osborne, Bo Enemark Madsen og Povl Krosgaard-Larsen

Kommunikationen mellem hjernens nerveceller er en hårfin balance mellem stimulerende og hæmmende signaler, som udveksles mellem nervecellerne ved hjælp af signalstoffer. Nogle signalstoffer aktiverer receptorer på modtagercellerne, mens andre dæmper deres aktivitet.

Det overordnede hæmmende signalstof i hjernen og centralnervesystemet er gamma-aminosmørsyre (GABA). Stoffet udøver sin effekt via to forskellige familier af receptorer på nervecellerne, som kaldes GABA_{AIC}- og GABA_B-receptorer. GABA_{AIC}-receptorerne styrer en ion-kanal i cellemembranen, der tillader en hurtig indtrængning af klorid-ioner i nervecellerne, hvilket fører til en hæmning af cellen. Denne effekt er blevet udnyttet terapeutisk i mange år; bl.a. virker benzodiazepiner som Valium og Stesolid på GABA_A-receptorerne ved at forstærke GABA's hæmmende effekt. Det er således gennem aktivering af GABA_A-receptorerne, at man opnår den angstdæmpende og søvndyssende virkning ved indtagelse af Valium og Stesolid.

GABA_B-receptorer tilhører en anden familie af receptorer i cellemembranerne, som aktiverer G-proteiner. G-proteinerne udgør cellernes omstillingsbord, som omsætter ydre sti-

mul til en kaskade af reaktioner inde i nervecellerne. Denne effekt indtræder langsommere end for GABA_A-receptorernes vedkommende, hvorfor man omtaler GABA_B som modulatoriske receptorer. De hæmmer bl.a. udskillelsen af andre signalstoffer såsom det overordnede stimulerende signalstof glutaminsyre.

GABA_B-receptorerne spiller også en terapeutisk rolle. Stoffet baclofen, som markedsføres af Novartis som Lioresal, virker ved at aktivere receptoren. Det fører til, at musklerne afslappes, og lægemidlet kan derfor anvendes til at afhjælpe forskellige former for spasticitet.

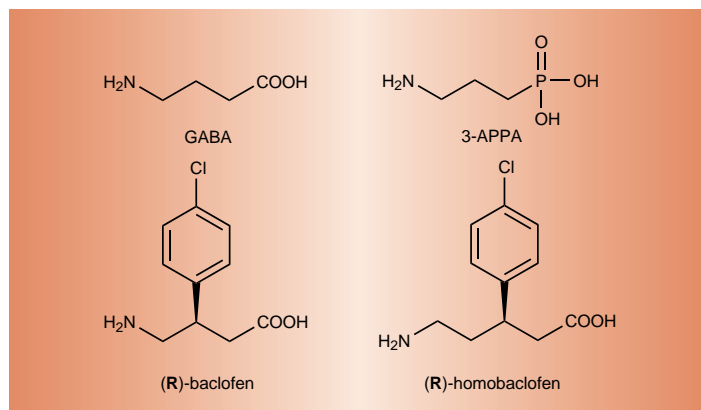
To underenheder i receptoren

Selvom man har kendt til eksistensen af GABA_B-receptoren siden begyndelsen af 1980'erne, blev den først klonet i 1997 gennem screening af gen-biblioteker for binding til et radioaktivt stof, som kobler sig meget effektivt til receptoren. På den måde lykkedes det at identificere de gener, som indeholder opskriften på receptoren, hvorpå receptorerne kan masseproduceres i celler til forsøg.

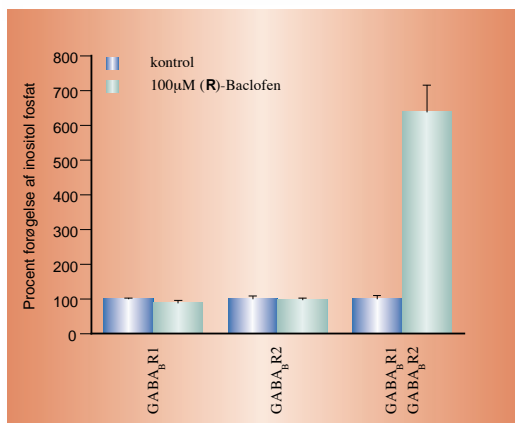
Det første gen man fandt, GABA_BR1, danner en receptor, der som ventet er effektiv til at binde stoffer, som blokerer receptoren. Men det viste sig overraskende, at situationen er anderledes, når det gælder stoffer, der aktiverer receptoren. De bandt sig nemlig meget svagere til GABA_BR1 end forventet, og ydermere havde de meget svært ved at aktivere receptoren. Der manglede altså noget. Et år senere fandt adskillige forskergrupper næsten samtidigt ud af, hvad der manglede: Der findes endnu en underenhed af receptoren, som kaldes GABA_BR2.

GABA_BR2 kan tilsyneladende hverken binde stimulerende eller blokerende stoffer, men når man udtrykker genet sammen med GABA_BR1 får man en receptor, der nu kan binde begge typer stoffer effektivt, ganske som man oprindeligt havde forventet. På trods af at man har klonet flere hundrede forskellige G-protein koblede receptorer, er det første gang, at man har observeret dobbelt-receptorer inden for denne receptorfamilie. Fænomenet er imidlertid velkendt indenfor ion-kanal receptorer såsom GABA_A, der er sammensat af tre typer underenheder.

Selv om man nu havde løst gåden om GABA_B-receptorerne, var det stadig svært at få et robust signal at måle på, når man ville lave farmakologisk testning på de klonede receptorer. De publicerede systemer gav enten for svage signaler, eller var baseret på avancerede teknikker med lavt udbytte. Vi gik derfor i gang med at udvikle et nyt farmakologisk test-system for de klonede GABA_B-receptorer baseret på en tek-



Strukturen af de testede stoffer; GABA, (R)-baclofen, 3-APPA samt (R)-homobaclofen.



Farmakologisk aktivitet på celler, der udtrykker forskellige sammensætninger af GABA_B underenheder og det gensplejsede G-protein Gq-i5. Som det ses, opnås der kun et robust signal, når begge GABA_B underenheder og det gensplejsede G-protein Gq-i5 udtrykkes samtidigt.

nik, vi tidligere havde anvendt på andre receptorer.

Princippet bag teknikken er at tvinge receptoren til at aktivere en anden kaskade af reaktioner i cellen end den, som den normalt vil udløse. GABA_B aktiverer normalt G-proteinet Gi, hvorved cellens indhold af stoffet cyklisk AMP sænkes. Indholdet af cyklisk AMP kan måles, men det er en kostbar metode, som ofte giver et svagt signal. Ved at give cellerne et gen, der koder for et gensplejset G-protein kan man derimod tvinge receptoren til at aktivere dette G-protein frem for Gi.

Når det nye G-protein aktiveres, sættes en anden reaktionskaskade i gang, hvilket resulterer i, at niveauet af stoffet inositol fosfat i cellen øges betragteligt. Dette er billigere at måle på end cyklisk AMP og giver et kraftigt signal.

Finjustering af receptoren

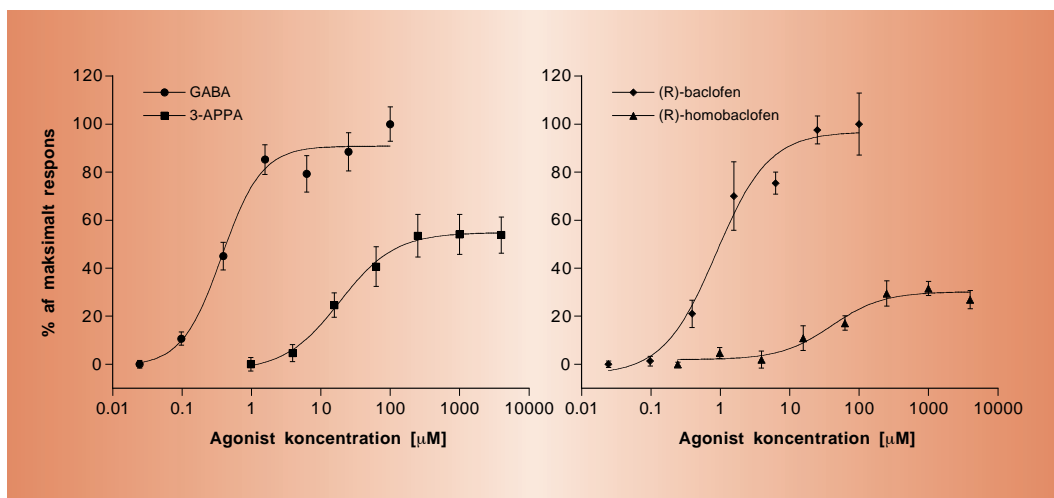
På Institut for Medicinalkemi har vi igennem en længere årrække designet stoffer, som stimulerer GABA_A- og GABA_B-receptorerne. Vi har imidlertid en speciel interesse i at udvikle stoffer, der både stimulerer og blokerer samtidigt, hvilket medfører, at man selv ved høje koncentrationer kun opnår en delvis aktivering af receptoren. Sådanne stoffer menes at

have flere fordele, fordi de kan bruges til at modulere receptoreren fremfor at sætte den på fuld damp eller slukke den helt.

Muligheden for at finjustere receptorens aktivitet vil være nyttigt ved udvikling af lægemiddelstoffer. Man regner således med, at stoffer, som blokerer GABA_B-receptorerne vil kunne anvendes mod bl.a. kognitive defekter og depression, men eftersom stimulerende stoffer afslapper muskler, må man forvente, at blokerende stoffer vil gøre det modsatte og fremprovokere bivirkninger i form af muskelkramper. Her er det sandsynligt, at stoffer, som på én gang stimulerer og blokerer i en vis udstrækning vil have den ønskede effekt på kognition og depression, men samtidigt sikre en vis GABA_B-aktivitet i musklerne og dermed undgå muskelkramperne.

Ved hjælp af vores nyudviklede GABA_B-testsystem har vi nu karakteriseret en del stoffer, hvoraf stofferne 3-APPA og (R)-homobaclofen har den ønskede kombinerede effekt. Desværre er virkningen af begge stoffer relativt svage i forhold til f.eks. GABA, og de vil derfor næppe kunne anvendes terapeutisk. Men de giver vigtig information om kravene til strukturen af stoffer med både stimulerende og blokerende virkning, som kan anvendes til at designe nye og mere potente stoffer med de samme egenskaber.

Farmakologisk karakterisering af stofferne fra figur 1 på celler, der udtrykker GABA_AR1, GABA_BR2 og et gensplejset G-protein. Det ses, at GABA og (R)-baclofen stimulerer receptoren 100 %, mens 3-APPA og (R)-homobaclofen selv i meget høj koncentration kun er i stand til at aktivere receptoren delvist.



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



Stud.med. Bo Enemark Madsen er OSVAL-studerende ved Institut for Medicinalkemi.

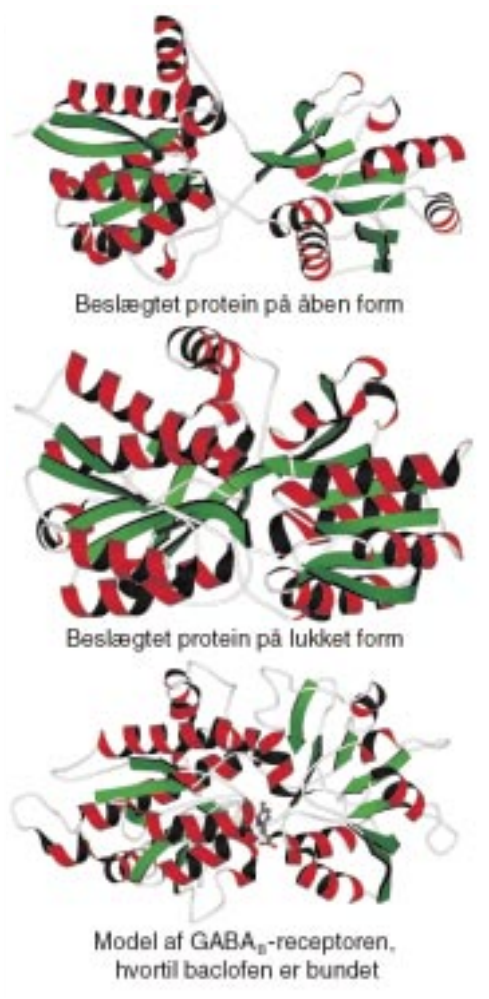


Dr.Pharm. Povl Krogsgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi.

3D-modeller fremmer forståelsen af samspillet mellem receptor og lægemiddelstof

GABA_B receptorerne på hjernens nerveceller er et mål for lægemidler mod bl.a. spasticitet. Moderne computermetoder gør det muligt at modellere den tredimensionelle struktur af den del af receptoren, som binder lægemiddelstoffer.

Af Flemming Steen Jørgensen, Karla Frydenvang, Hans Bräuner-Osborne og Kurt Kristiansen



Realistiske tredimensionelle modeller af organismens makromolekyler kan i dag konstrueres med computermetoder. Modellerne øger forståelsen for, hvordan molekylerne påvirker hinanden og gør det muligt - på rationel vis - at designe nye lægemiddelstoffer.

Tilbage i 1981 opdagede Bowery og medarbejdere, at den kemiske forbindelse baclofen specifikt aktiverede en hidtil ukendt receptor, som blev reguleret af signalstoffet gamma-aminosmørsyre (GABA). Det viste sig hurtigt, at der var tale om en receptor, som ikke havde andet til fælles med den allerede kendte GABA_A-receptor, end at de begge blev aktiveret af det samme signalstof. I de følgende år blev den nye receptor karakteriseret farmakologisk og blev døbt GABA_B-receptoren.

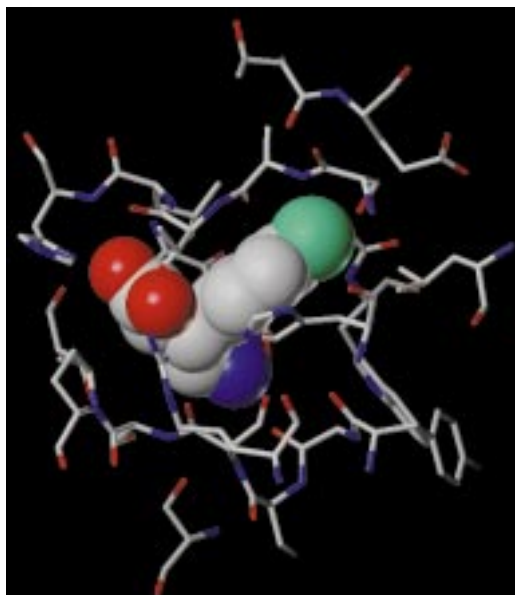
Først i 1997 skete det næste store fremskridt inden for området, idet receptorens aminosyresekvens blev bestemt. Det var nu muligt endtydigt at identificere GABA_B-receptoren som en receptor i cellemembranen, der aktiverer G-proteiner i nervecellerne. G-proteinerne er cellernes omstillingsbord, som omsætter ydre stimuli til interne reaktioner.

GABA_B-receptoren afviger funktionelt fra flertallet af nervecellernes receptorer, og den tredimensionelle struktur af GABA_B-receptoren er fortsat ukendt. Man ved imidlertid, at en stor del af receptoren er placeret udenfor cellemembranen, og man formoder, at signalstoffer og lægemiddelstoffer bindes til denne del af receptoren.

Med denne viden som udgangspunkt besluttede vi i slutningen af 1998 at konstruere en tredimensionel model af GABA_B-receptorens extracellulære del. En sådan model vil gøre det muligt at forklare sammenhængen mellem molekylær struktur og biologisk aktivitet for forbindelser, som stimulerer GABA_B-receptorerne og måske også for forbindelser, som blokerer dem. Dét vil forbedre mulighederne for at designe nye lægemiddelstoffer, som påvirker receptoren.

Baclofen, som oprindeligt blev brugt til at identificere GABA_B-receptoren, bruges i dag som muskelafslappende lægemiddel til behandling af spastiske kramper. GABA_B-receptoren er samtidig et potentielt mål for lægemiddelstoffer til behandling af andre sygdomme i centralnervesystemet, bl.a. depression.

Den tredimensionelle struktur af den del af GABA_B-receptoren, som binder signalstoffer og lægemiddelstoffer. Modellen er baseret på homologibygning, hvor man benytter kendte proteinstrukturer til at forudsige ukendte strukturer. Receptoren kan antage to former, en åben form, hvor bindingstedet er tomt, og en lukket form, når GABA eller baclofen binder til receptoren. Øverst ses den beslægtede proteinstruktur, som er anvendt ved modelleringen af den åbne form. I midten ses den beslægtede proteinstruktur, som er anvendt ved modelleringen af den lukkede form. Nederst vises den færdige model af den del af GABA_B-receptoren, hvortil baclofen bindes. Alpha-helices er farvede røde og beta-sheets grønne.



Modelbygning af proteiner

GABA_B-receptoren er et protein. Proteiner er opbygget af aminosyrer, der er koblet sammen som perler på en snor. Ved sekventering bestemmer man rækkefølgen af aminosyrerne i et protein. I cellerne foldes den lange perlekæde af aminosyrer sammen, og det er den endelige tredimensionelle struktur, som bestemmer proteinets funktion.

Den tredimensionelle struktur af proteiner bestemmes eksperimentelt med NMR-spektroskopi eller røntgenkristallografi. I øjeblikket rapporteres dagligt strukturen af 5-6 nye proteiner, men antallet af proteiner der sekventeres vokser endnu hurtigere. Derfor er der betydelig interesse i at udvikle metoder, som kan forudsige den tredimensionelle struktur af proteiner.

Det er i dag muligt at konstruere nøjagtige tredimensionelle modeller af et protein efter et princip, der kaldes homologbygning. Proteiner, der er evolutionært beslægtede, eller homologe, har med stor sandsynlighed næsten den samme tredimensionelle struktur. Det betyder, at såfremt man kender den tredimensionelle struktur af et eller flere beslægtede proteiner, kan man konstruere en tredimensionel model af det ukendte protein.

Et af de vigtigste trin i homologbygningen er valget af, hvilken tredimensionel struktur modelbygningen skal baseres på. Samtidig må man afklare, hvor stor en del af den udvalgte struktur, der er fælles for de homologe proteiner og hvor stor en del, der skal modificeres i modelleringen af det ukendte protein. Dette kræver, at sekvensen af det ukendte protein sammenlignes med sekvensen og den tredimensionelle struktur af flest mulige homologe proteiner.

Det første skridt i modelbygningen af GABA_B-receptoren var at finde de proteiner, der kunne bruges som udgangspunkt. Det blev hurtigt klart, at vores model skulle baseres på en række aminosyrebindende proteiner, hvis tredimensionelle struktur var bestemt eksperimentelt ved hjælp af røntgenkristallografi. Disse proteiner er involveret i transport af aminosyrer og forefindes i to former, en lukket form, hvor en aminosyre er bundet til proteinet, og en åben form, hvor der ikke er bundet noget til proteinet.

Lægemedelstoffet baclofen, som bruges til at dæmpe muskelkrampe hos spastikere, ses her bundet til GABA_B-receptoren. Baclofen er vist som en rumopfyldende model, mens receptorens aminosyrer er vist som pinde. Atomerne er farvede efter atomtype, dvs. kulstof hvide, nitrogen blå, oxygen røde og chlor grønt.

Fra kendte proteiner til GABA_B-receptoren

Vi valgte at gå ud fra strukturen af et leucin-isoleucin-valin bindende protein, fordi dette protein havde størst sekvenslighed, 22% identitet, med GABA_B-receptoren. Her kender man kun strukturen af den åbne form. Ved at sammenligne og udnytte sekvensvariationen i forskellige aminosyrebindende proteiner og andre receptorer var det muligt at identificere, hvilke områder, der repræsenterede de strukturelt konserverede dele, og som derfor kunne tages direkte fra strukturen af vort udgangsprotein.

For at få en så nøjagtig model som muligt, blev de to halvdele af den bindende del af GABA_B-receptoren modelbygget uafhængigt af hinanden. Baseret på strukturen af et beslægtet protein, der forefindes på den lukkede form, blev de to domæner dernæst placeret i forhold til hinanden. Næste trin i modelbygningen var at placere baclofen i receptoren. Derefter blev modellen af komplekset forfinet ved hjælp af molekylodynamiske simuleringer for at sikre, at strukturen var så realistisk som mulig. Denne proces blev gentaget adskillige gange og den bedste model udvalgt for det videre arbejde.

Baclofen kan opfattes som en analog af GABA med en ekstra aromatisk gruppe. I den endelige model antager GABA-delen af baclofen en udstrakt konformation, mens den aromatiske gruppe er placeret i en lomme mellem de to halvdele af GABA_B-receptoren.

Evaluering af modelberegningen

For at modellen kan bruges i forbindelse med design af nye lægemiddelstoffer, er det et ufravigeligt krav, at den kan forklare eksisterende struktur-aktivitetsdata.

Som udgangspunkt for evalueringen brugte vi (*R*)- og (*S*)-baclofen, der kemisk er helt ens, men som er spejlbilledformer, dvs. de forholder sig til hinanden som en højre hånd til en venstre hånd. De to spejlbilledformer blev nu placeret i receptormodellen ved hjælp af et program, der genererer tusindvis af mulige orienteringer og udvælger de mest sandsynlige ud fra strukturelle kriterier.

Det viste sig - heldigvis - at (*R*)-baclofen bindes bedre til modellen end (*S*)-baclofen, hvilket er i god overensstemmelse med eksperimentelle data.

Med henblik på endeligt at verificere modellen er en række punktmutterede receptorer blevet klonet og testet for binding af baclofen. Her har man primært valgt at mutere de aminosyrer, som har kontakt med baclofen. Foreløbige resultater viser sig at være i god overensstemmelse med modellen. Alt tyder således på, at modellen af GABA_B-receptoren er realistisk, samt at den kan anvendes til design af nye forbindelser.



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



Lic.pharm. Karla Frydenvang er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



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



Dr.scient. Kurt Kristiansen var i 1998-99 tilknyttet Institut for Medicinalkemi som post-doctoral fellow via et DANVIS-stipendium.

Den randomiserede kliniske undersøgelse

Den randomiserede kliniske undersøgelse er en hjørnesten i vurderingen af nye lægemidler. Her anvendes to grupper af patienter. Den ene afprøver det nye lægemiddel, mens den anden får et uvirksomt stof. Hverken læger eller patienter ved, hvem der får hvad. Til sidst anvendes statistik til at bedømme virkningen af medicinen. Metoden har gennem mange år haft såvel tilhængere som kritikere.

Af Søren Troels Christensen, Ebba Holme Hansen og Poul Reinhardt Kruse

Den randomiserede kliniske undersøgelse udgør et selvfølgeligt element i vurderingen af lægemidlers terapeutiske egenskaber. Trods den selvfølgelighed metoden tillægges i dag, er den af nyere dato. Den moderne udgave så først dagens lys i

1948, men grundprincipperne kan spores tilbage til forrige århundrede, hvor forløberen, den "numeriske metode", blev introduceret i Danmark.

Medicinske fagtidsskrifter tilbage i tiden udgør en rig historisk kilde, dels til en forståelse af hvordan og hvornår den randomiserede kliniske undersøgelse er opstået, og dels til indsigt i, hvordan lægemiddelterapien og udforskningen af lægemidlers virkninger har udviklet sig.

Den numeriske metode og kritikken af den

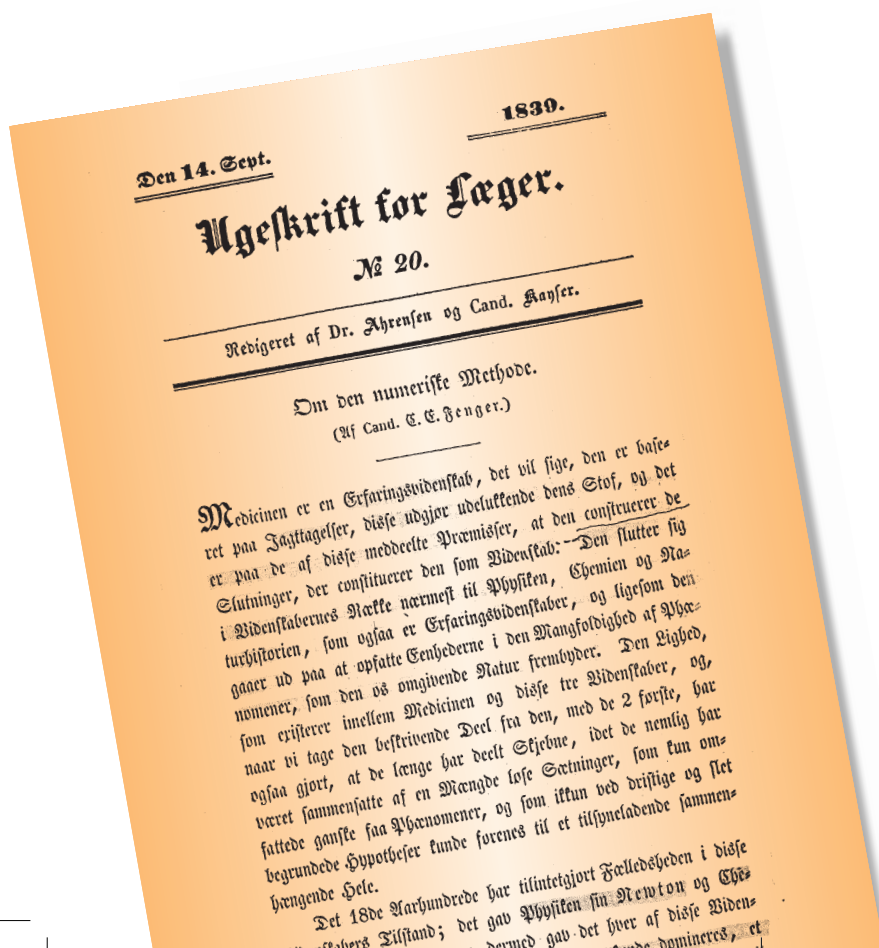
I 1839 præsenterede den danske læge Carl Emil Fenger den numeriske metode i Ugeskrift for Læger. Fenger havde været på studietur i Frankrig og havde der overværet en række forelæsninger over brugen af statistik i klinisk medicin. Budskabet var, at medicinen var en erfaringsvidenskab på linie med fysikken og kemien. Vejen til erkendelse var den direkte observation af mange patienter, kvantificering og simpel statistik.

Fengers entusiasme var stor, og hjemvendt til Danmark plæderede han med iver for den nye metode. Om vurdering af terapi hedder det: "For at komme efter, hvilken Behandlingsmaade med størst Fordeel kunde anvendes, vilde den bedste Maade være, først at skaffe sig Forholdet imellem Helbredede og Døde i de Tilfælde, hvor slet ingen Behandling var anvendt, og da sammenligne dette med Resultatet af hver enkelt Kurmethodes Anvendelse; dernæst at anstille lignende sammenligninger imellem de forskellige Kurmetoder med hensyn til deres Indvirkning paa Sygdommens varighed".

Fengers numeriske metode er ikke fremmed for nutiden. Han fremførte den vigtige pointe, at såfremt man ønsker at vide, hvorvidt et lægemiddel virker eller ej, da må man lave sammenlignende studier mellem tilfælde, hvor terapi har været anvendt, og tilfælde hvor ingen terapi har været anvendt. Ved at gøre et stort antal observationer efterfulgt af en systematisk behandling, kunne man nå til en objektiv vurdering af, hvorvidt et lægemiddel virkede eller ej. Fengers numeriske metode blev imidlertid mødt med hård kritik af samtiden. Regimentskirurg Michael Djørup for i blækkhuset og fremførte en farverig og sønderlemmende kritik. Om den numeriske metode siger Djørup "den indeholder adskilligt Godt og adskilligt Nyt; Kun Skade, at det Gode ikke er nyt og det nye ikke er godt."

Djørups vigtigste kritikpunkt var, at den numeriske metode anlagde et gennemsnitsperspektiv, idet metoden ikke tog højde for det enkelte individ og betydningen af individuelle forskelle i behandlingen af sygdomme.

Første side af Carl Emil Fengers artikel om den "numeriske Methode" i Ugeskrift for Læger, 1839.





Michael Djørup argumenterede for, at lægemidler ikke kunne afprøves gennem forsøg på store patientgrupper. Sygdom var noget individuelt og behandlingen måtte tage udgangspunkt i det konkrete tilfælde.

Farmakologi anno 1839 - behandling af individer

Fengers numeriske metode var nytænkning i 1839 og et angreb rettet mod datidens farmakologi, som med Fengers og nutidens øjne nok synes noget spekulativ. Netop Djørup var talsmand for denne farmakologi.

Djørup argumenterede for, at lægemidler ikke kunne afprøves gennem forsøg på mennesker, hvor store patientgrupper sammenlignes. Argumentet herfor udsprang af Djørups syn på sygdom og terapi. Sygdom var noget individuelt, og behandlingen af sygdom måtte tage udgangspunkt i det konkrete tilfælde, hvorefter en individuel behandling måtte sammensættes. Djørup var således talsmand for, at der ikke eksisterede terapeutiske love med gyldighed hævet over det enkelte individ.

Men hvordan kunne Djørup da nå til erkendelse om lægemidlernes virkninger, såfremt det ikke skulle være muligt at sige noget generelt om virkningerne? Djørups svar var, at når sygdom og terapi var et individuelt anliggende, gik vejen til erkendelse gennem intensive studier af enkelttilfælde. Ved studiet af enkelttilfælde skulle den erfarne kliniker studere sygdomstilfældene i alle deres detaljer og dermed nå til en teoretisk forståelse af sygdommens essens. Herunder skulle psykologiske forhold medinddrages.

Denne form for undersøgelse af lægemidlernes virkninger synes nok noget uklart, al den stund at de metodiske principper var upræcise. Djørups tilgang til studiet af lægemidler, skal imidlertid ses som bestræbelser på at nå en teoretisk forklaring på lægemidlernes virkninger, hvilket lidt løsagtigt kan oversættes til nutidens fokus på mekanismeforklaring. Diskussionen mellem Fenger og Djørup endte uafgjort. Fengers numeriske metode slog ikke igennem, og Djørups farmakologi overlevede ikke længe. Fengers metode skulle dog i længden overleve og videreudvikle sig til nutidens randomiserede kliniske undersøgelse. Denne udvikling kom dog til at strække sig over 100 år.

I den periode blev der gjort flere forsøg på at lancere den numeriske metode. Ikke mindst blev metoden i udviklet form anvendt i forbindelse med den senere Nobelprismodtager Johannes Fibigers studie over serumterapis effekt overfor difteri fra 1898. Fibigers studie var for den tid et enestående stykke metodisk arbejde, men studiets metodiske principper dannede ikke skole for eftertiden. I Ugeskrift for Læger omkring århundredeskiftet kan man læse adskillige artikler, der redegør for lægemidlers virkninger. Hvad der kendetegner disse artikler er, at den terapeutiske dom afsiges på baggrund af den enkelte læges egne erfaringer, der typisk bestod af få behandlede patienter, der er blev fulgt meget nøje, og med meget detaljerede sygdomshistorier.



Carl Emil Fenger mente, at vejen til erkendelse var den direkte observation af mange patienter, kvantificering og simpel statistik.

Den nødvendige afprøvning

I slutningen af forrige århundrede udviklede fysiologien sig kraftigt, og i kølvandet herpå fulgte farmakologien, der udviklede sig til en selvstændig disciplin.

Opkomsten af farmakologien medførte en eksplosiv vækst af nye lægemidler, der fra fabrikanternes side blev rost i høje vendinger. Mange klinikere stillede sig imidlertid skeptiske overfor disse nye lægemidler. Situationen udtrykkes flot af den danske farmakolog H. Jacobæus, der i 1915 skrev følgende i Ugeskrift for Læger: "Vi ved jo alle, hvor megen Svindel der drives med de mange nye Midler, og hvor lidt man kan stole paa de gyldne Løfter... Det bliver derfor en Opgave for den praktiserende Terapeut at adskille den ringe Mængde Hvede og den store Masse Klinte i de næsten taløse nye Midler, der bringes paa Markedet."

Efter anden verdenskrig fik de mange nye lægemidler flere klinikere til at indse, at det var tvingende nødvendigt at afprøve lægemidler efter en metode, der kunne afsige den terapeutiske dom på objektiv vis. Den randomiserede kliniske undersøgelse blev løsningen på problemet, og det første egentlige studie blev gennemført i England i 1948 i forbindelse med afprøvningen af streptomycin til behandling af tuberkulose.

Et spørgsmål om videnskabeligt temperament

Diskussionen mellem de to herrer i forrige århundrede har mere end blot historisk interesse. Diskussionen omhandler ikke mindst spørgsmålet om terapivurdering. Fenger argumenterede for, at lægemidler skulle evalueres for deres terapeutiske egenskaber gennem systematiske principper, som siden deres introduktion har været genstand for omfattende debat.

Ved at betone empiriens betydning foretages samtidig nogle videnskabelige valg og fravalg. Empiri inden for farmaci og lægevidenskaben betyder data, der kan måles og vejes. Hvad der ikke kan måles og vejes, kan ikke gøres til genstand for videnskabelig indsigt. Netop dette spørgsmål har historisk set udgjort et stridspunkt i forbindelse med vurderingen af lægemidler. Ikke alle klinikere har været enige om, at lægemidler og deres terapeutiske egenskaber entydigt kunne studeres gennem systematiske forsøg på mennesker. Djørups frygt og kritik genfindes således i kritikken af nutidens randomiserede kliniske undersøgelse, hvor kritikere frygter, at det enkelte individ vil forsvinde i den statistiske kalkyle.

Studiet af metodens historiske udvikling giver således god indsigt i, hvordan den terapeutiske videnskab har ændret sig gennem tiderne. Den randomiserede kliniske undersøgelses historie er i høj grad et spørgsmål om videnskabeligt temperament, hvor særligt klinikere har haft forskellige opfattelser af, hvad god terapeutisk videnskab består i.



Cand.pharm. Søren Troels Christensen er Ph.D. studerende ved Institut for Samfundsfarmaci.



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



Dr.pharm Poul Reinhardt Kruse er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.



Lægemiddelforskning
udgives af Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Redaktion:
Mette Rasmussen (ansvarshavende),
Jesper Munck, Rolf Haugaard,
Annemette Møller Hansen og
Anne-Mette Nielsen.

Grafisk design og produktion:
ProGrafica as

Foto:
Jesper Munck, Erik Nielsen,
Kristoffer Hansen
Flemming Steen Jørgensen og
Kim Itenov (forside)

