

# FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 5

OSREDNJA TEMA:  
KRONIČNA LEVKEMIJA





## Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovska hiša za prodajo zdravil z najširšo ponudbo izdelkov za humano in veterinarsko medicino v Sloveniji. Odlikujejo nas hitrost, varnost in zanesljivost. Svoje delo opravljamo srčno in predano. Prav zaradi tega nam zaupajo številne lekarnice in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

Zavedamo se, da nam prihodnost ponuja nešteto izzivov. Premagamo jih lahko z nenehnim izpopolnjevanjem. S kakovostnimi storitvami in s široko izbiro zdravil ter drugih izdelkov bomo zaupanje svojih kupcev opravičevali tudi v prihodnjem.

01 470 98 00 | [www.kemofarmacija.si](http://www.kemofarmacija.si)





ODGOVORNI UREDNIK:  
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:  
Petra Slanc Može

UREDNIŠKI ODBOR:  
Tomaž Bratkovič  
Mitja Kos  
Janja Marc  
Andrijana Tivadar  
Matjaž Tuš  
Tomaž Vovk

IZDAJATELJSKI SVET:  
Cvetka Bačar  
Polonca Fiala  
Janez Ilaš  
Mitja Kos  
Nina Pisk  
Sonja Rupret  
Franc Vrečer

NASLOV UREDNIŠTVA /  
ADDRESS OF THE EDITORIAL OFFICE:  
Slovensko farmacevtsko društvo,  
Dunajska 184a, 1000 Ljubljana  
T.: +386 (01) 569 26 01  
Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:  
02010-0016686585.

Izhaja petkrat letno.  
Letna naročnina je 70 EUR.  
Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM  
Naklada: 3.500 izvodov

Farmacevtski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 5 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

Farmacevtski vestnik is regularly abstracted in: BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

Letnik 2013 sofinancira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz sredstev državnega proračuna iz naslova razpisa za sofinanciranje domačih znanstvenih periodičnih publikacij.

## QUO VADIS SLOVENSKA FARMACIJA?

*Pred slabim desetletjem so bili v časopisju objavljeni rezultati javnega mnenja o ugledu farmacije v Sloveniji, še posebej o ugledu lekarniškega farmacevta. Takrat smo bili ponosni na to, da nas prebivalstvo tako visoko ceni, saj je bil poklic lekarniškega farmacevta med najuglednejšimi. Nato smo bili priče raznim aferam, ki so bile posredno ali neposredno povezane s slovensko farmacijo in se kar ne nehajo. Tako imamo razprtije in nepravilnosti med lekarniškimi zavodi, med lekarnami in veledrogerijami, med zavarovalnicami in predstavništvi farmacevtskih industrij, med pristojnim ministrstvom in lekarniško mrežo, in tako dalje in tako naprej. Zakone in pravilnike beremo vsak po svoje, vrzeli pa »pametni« izkoriščajo sebi v prid. Namesto, da bi skrbeli za večjo kakovost izdelkov, ki so del farmacevtske dejavnosti, so se regulatorno izvršilne institucije ujele v mrežo dvomljivih, stroki škodljivih potez in delovanj. In tako lahko na policah skoraj vseh večjih trgovin s športnimi prehranskimi dodatki najdete prehranska dopolnila ali živila, ki niso v skladu s pravilniki. Potrebujete mogoče prehransko dopolnilo z izvlečkom navadne zobačice (Tribulus terrestris)? Nič lažjega! Pojdite v fitness trgovine ali na spletne strani in našli boste želeno! Kljub temu, da imajo pripravki z omenjeno rastlino oznako Z (zdravilo). In takih primerov je veliko. In kako na nas gleda zdravstvena stroka? Žalostno je, da nas nekateri kolegi zdravniki kljub izredno visoki ravni strokovnih nasvetov, ki jih vedno lahko dobijo od nas, velikokrat obravnavajo le kot orodje za povečevanje njihovih ekonomskih ugodnosti.*

*Kaj naj pomaga prizadevanje stroke, da bi bila farmacija ena od najbolj naprednih, z dokazi podprtih znanstvenih ved, če je tako enostavno izigravati zakone in pravilnike. Seveda bi lahko za vsako trditvijo, ki je zapisana, napisal tudi konkretne institucije z imeni in priimki. Ampak, scenarij poteka dogodkov, ki bi sledili, je znan že vnaprej. Takoj bi postal Farmacevtski vestnik in odgovorni urednik tarča odvetniških pisarn, tožb in šikaniranj. Zato sklanjamo glave, še naprej le nemo opazujemo napenjanje mišic ekonomske močnih institucij, ki so neposredno ali posredno povezane s slovensko farmacijo, ne naredimo pa ničesar!*

*V prihajajočem letu vam v imenu uredništva Farmacevtskega vestnika želim veliko osebnega zadovoljstva, zdravja in predvsem drznosti, da bomo skupaj imeli toliko moči, da farmacevtsko stroko v Sloveniji ponovno uvrstimo med cenjene poklice.*

Prof. dr. Borut Štrukelj



## VSEBINA / CONTENT

### PREGLEDNI TEMATSKI ZNANSTVENI ČLANKI – THEMATIC REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 343 Tadej Pajič, Janja Marc, Irena Preložnik Zupan  
Kronična mieloična levkemija / *Chronic myeloid leukemia*
- 354 Helena Podgornik, Neda Gržinič, Peter Černelč  
Kronična limfatična levkemija / *Chronic lymphocytic leukemia*

### PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 363 Darja Strah, Janez Bernik  
Neinvazivno predporodno presejanje za aneuploidije na osnovi proste plodove DNA - pregled razvoja in priporočila za klinično prakso / *Non-invasive prenatal screening for aneuploidies using cell-free fetal DNA – progress and recommendations for clinical practice*
- 371 Katarina Starkl, Janez Mravljak  
Zdravljenje in preprečevanje malarije / *Antimalarial therapy and prophylaxis*

### ORIGINALNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 380 Damjana Rozman, Klementina Fon Tacer  
Citokrom P450 – oksidoreduktaza (POR) v biosintezi holesterola / *Cytochrome P450 - oxidoreductase (POR) in the biosynthesis of cholesterol*
- 385 Brigita Mavsar Najdenov, Igor Rus, Ivica Avberšek Lužnik  
Pomen ocene albuminurije in proteinurije pri novoodkritih bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 / *The role of albuminuria and proteinuria assessment in newly diagnosed type 2 diabetes patients*

### 392 PREBRALI SMO ZA VAS – SHORT PHARMA NEWS

### 396 NOVI DOKTORJI ZNANOSTI – NEW DOCTORS OF SCIENCE

### 401 IZ DRUŠTVENEGA ŽIVLJENJA – ACTIVITIES OF THE SOCIETY

### 406 LETNO KAZALO - CONTENT

# KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA

## CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

AVTORJI / AUTHORS:

asist. dr. Tadej Pajič, spec. med. biokem.<sup>1</sup>  
prof. dr. Janja Marc, mag. farm.<sup>2</sup>,  
dr. Irena Preložnik Zupan, mag. farm.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni Klinični center, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška cesta 7, Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-pošta: tadej.pajic@kclj.si

## 1 DEFINICIJA, EPIDEMIOLOGIJA IN ETIOLOGIJA BOLEZNI

Kronična mieloična levkemija (KML) je maligna bolezen krvotvorne matične celice, ki jo uvrščamo med mieloproliferativne novotvorbe [1, 2]. Opređeljuje jo motena regulacija nastajanja in nekontrolirana razrast (proliferacija) granulocitov, medtem ko ostaja razvoj (diferenciacija) teh celic dokaj normalen. Pospješenu razmnoževanju teh celic v kostnem mozgu sledi tudi zvečanje števila levkocitov v periferni krvi, kar je prvi laboratorijski znak bolezni. Vsi granulociti nastanejo z dozorevanjem matičnih celic v kostnem mozgu. V proliferacijski oddelek celic prištevamo mieloblaste, promielocite in mielocite, medtem ko druge celice v razvoju granulocitov, metamielocite, paličaste granulocite in segmentirane granulocite (nevtrofilce, eozinofilce, bazo-

### POVZETEK

Kronična mieloična levkemija (KML) je maligna bolezen krvotvorne matične celice, ki jo uvrščamo med mieloproliferativne novotvorbe. Označuje jo (za malignost odgovoren) zliti gen *BCR-ABL1*. KML je bila prva maligna bolezen, pri kateri so prepoznali spremembo, odgovorno za razvoj bolezni na molekularnem nivoju. Pri tej kromosomski spremembi gre za dvojno izmenjavo (recipročno translokacijo) med kromosoma 9 in 22 (t(9;22)(q34.1;q11.2)), pri čemer nastane kromosom Philadelphia (Ph), na katerem se nahaja zliti gen *BCR-ABL1*. Ta gen nosi zapis za tirozin-kinazo BCR-ABL1, ki je vpletena v maligni razrast mutiranih celic pri KML. Ker tirozin-kinaze BCR-ABL1 v zdravih levkocitih ni, je predstavljala dobro terapevtsko tarčo. KML je postala model v raziskovanju in zdravljenju malignih bolezni. Z razvojem tarčnih zdravil, zaviralcev tirozin-kinaze BCR-ABL1, se je strategija zdravljenja KML povsem spremenila, s tem pa tudi kakovost življenja in preživetje bolnikov. Prikazujemo opis in ugotavljanje bolezni, načine zdravljenja in spremljanje uspešnosti zdravljenja ter vlogo farmacevta pri zdravljenju KML.

### KLJUČNE BESEDE:

kronična mieloična levkemija, *BCR-ABL1*, zdravljenje, zaviralec tirozin-kinaze

### ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant myeloproliferative disorder originating from the hemopoietic stem cell. It is caused by the formation of *BCR-ABL1* fusion gene, which is also a specific molecular marker for the disease. CML was the first malignancy to be linked with an alteration on molecular level. The chromosomal abnormality is a result of reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 (t(9;22)(q34.1;q11.2)), resulting in formation of Philadelphia chromosome (Ph), which contains *BCR-ABL1* fusion gene. This gene encodes the BCR-ABL1 tyrosine kinase, involved in malignant transformation and uncontrolled growth of the mutated cells. Because BCR-ABL1 tyrosine kinase is only present in cancer cells and not in healthy cells, it represented a good therapeutic target for treatment of CML. CML has become a model for targeted cancer research and therapy. Development of target drugs, BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors, has



changed the strategy for treatment of CML and improved the quality of life and survival rates of the patients. Here, we describe the disease and review its diagnostics, methods of treatment and monitoring of the therapy, as well as the role of a pharmacist in the treatment of CML.

#### KEY WORDS:

*chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1, treatment, inhibitor of tyrosine kinase*

filce), prištevamo v oddelek dozorevanja. Pri odraslem zdravem človeku najdemo v krvi izključno segmentirane in redke paličaste granulocite [3].

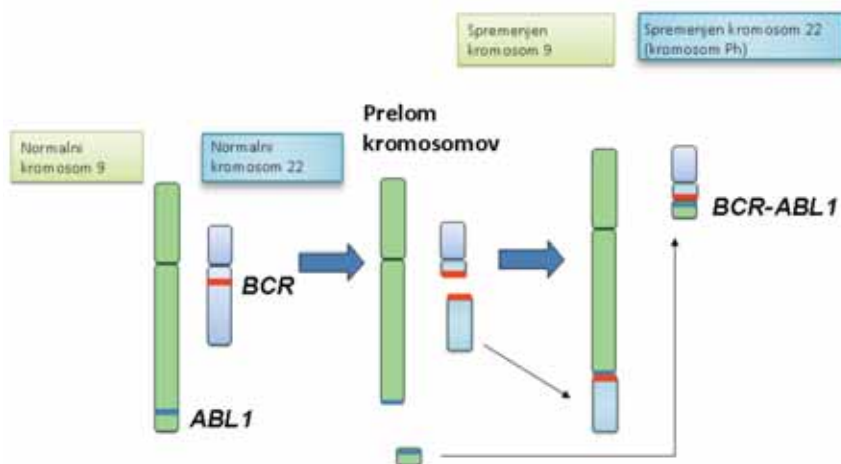
Za KML je značilna kromosomska sprememba, pri kateri z dvojno zamenjavo (recipročna translokacija) kromosomskih delov med kromosomoma 9 (9q34.1) in 22 (22q11.2) nastane dolga kromosom 9 (9+) in skrajšan kromosom 22, imenovan kromosom Philadelphia (Ph) [4]. Ime je dobil po mestu, kjer so ga v šestdesetih letih prejšnjega stoletja odkrili [5]. Kromosomsko spremembo označimo kot  $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ . Posledica te kromosomske spremembe je zlitje dveh genov: gena *BCR* (s kromosoma 22) in gena *ABL1* (s kromosoma 9) na Philadelphia kromosomu (slika 1) [6-8]. Nastali zlitni gen *BCR-ABL1* nosi zapis za tirozin-kinazo (beljakovino BCR-ABL1), ki je odgovorna za razvoj KML. Tirozin-kinaza vzdržuje stalno aktivacijo signalnih poti v celici, kar pospeši proliferacijo matičnih celic, moti dozorevanje in preprečuje apoptozo (celična smrt).

Zaradi tega je KML klonska bolezen in genetsko spremenjene celice preplavijo kostni mozeg. Genetska nestabilnost klona celic lahko vodi do neodzivnosti (rezistenco) na zdravljenje in do napredovanja bolezni, nastanka sekundarne akutne levkemije [9].

#### ALI STE VEDELI?

- Najpomembnejša zgodovinska koraka za poznavanje patogeneze KML in razvoj uspešnega zdravljenja bolezni sta bila odkritje Philadelphia kromosoma leta 1960 in opredelitev kromosomske spremembe kot translokacije med kromosomoma 9 in 22 leta 1973.
- Imatinib, zaviralec tirozin-kinaze BCR-ABL1, je prvo tarčno zdravilo, ki so ga razvili na osnovi poznavanja vzroka bolezni na molekularni ravni.
- Pri bolnikih s KML je ob pojavu bolezni v telesu lahko prisotnih tisoč milijard levkemičnih celic. Zdravljenje z zaviralcem tirozin-kinaze zmanjša število levkemičnih celic na milijon ali manj celic. To je meja, kjer z najboljčutiljivejšo metodo t.j. z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) še zaznamo bolezen.

KML predstavlja 15–20 % vseh levkemij pri odraslih bolnikih. Letna incidenca pa je 1-2 nova bolnika / 100.000 prebivalcev, po naših podatkih v Sloveniji znaša incidenca 0.75 bolnika na sto tisoč prebivalcev [10, 11]. Povprečna starost ob ugotovitvi bolezni znaša 50 do 60 let, v Sloveniji 57 let, čeprav se lahko pojavi v vseh življenjskih obdobjih, tudi v otroštvu [10, 11]. Prevalenca KML v zahodnem svetu v zadnjih



**Slika 1:** Shematski prikaz kromosomske spremembe recipročne translokacije (dvojna zamenjava) med daljšo roko kromosomoma 9 in 22 ( $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ). Nastane dolg kromosom 9 (9+) in skrajšan kromosom 22, imenovan kromosom Philadelphia (Ph), na katerem se nahaja zlitni gen BCR-ABL1.

**Figure 1:** Schematic diagram of a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22 ( $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ), with the resultant formation of the long chromosome 9 (9+) and shortened chromosome 22, named Philadelphia chromosome (Ph chromosome). As a result of the reciprocal translocation, BCR-ABL1 gene is formed on the Ph chromosome.

letih konstantno narašča, verjetno zaradi izjemnega učinka novih zdravil, zaviralcev tirozin-kinaze (TKI), na preživetje. Izpostavitvev ionizirajočemu sevanju je edini poznan dejavnik tveganja za nastanek bolezni [8].

## 2 OPIS BOLEZNI

Klinična slika KML je posledica pretirane razrasti zrelih in dozorevajočih granulocitov, predvsem nevtrofilnih granulocitov, pa tudi eozinofilnih in bazofilnih. Ta razrast malignih celic v kostnem mozgu ovira normalno nastajanje in dozorevanje ostalih krvnih celic, npr. eritrocitov, monocitov, megakariocitov, iz katerih nastanejo trombociti, ter limfocitov. Zaradi motenega razvoja eritrocitov se pojavi anemija in zaradi motenega nastajanja megakariocitov se pojavijo krvavitve. Poleg tega je okrnjena tudi obramba proti tujkom, saj so maligni granulociti slabše oziroma ne-funkcionalni. Brez zdravljenja KML zavzame svoj naravni potek, ki traja 3–5 let in gre skozi tri različna klinična obdobja: kronično obdobje, pospešeno obdobje in blastno preobrazbo. Za *kronično obdobje*, v katerem odkrijemo 85 % bolnikov, je značilno, da običajno poteka brez kliničnih znakov in bolnike večinoma odkrijemo slučajno. To obdobje lahko traja 3-5 let, če se ne zdravi, preide v *pospešeno obdobje* (včasih to obdobje manjka), oziroma v *blastno preobrazbo* – stanje enako akutni levkemiji. Pospešeno obdobje in blastno krizo lahko opredelimo tudi skupaj kot napredovalo fazo bolezni. V tem obdobju zasledimo spremembe v laboratorijskih izvidih torej v krvni sliki z močno povečanim številom levkocitov in prisotnimi malignimi celicami v periferni krvi. Pri bolniku je pogosto prisotna anemija in trombocitopenija ter povečana vranica in posledično bolečina pod levim rebrom. Možne so okužbe. Pri bolniku v napredovali fazi bolezni je potrebno ukrepati takoj in uvesti ustrezno terapijo.

Simptomi ob napredovanju KML so običajno sistemski (splošna utrujenost, izguba teka, hujšanje, znojenje), občutek tiščanja v trebuhu zaradi povečanih organov, redkeje krvavitve zaradi motene funkcije trombocitov. Kar 40–50 % bolnikov je ob odkritju bolezni brez težav, bolezen pa ugotovimo ob slučajnem pregledu krvne slike. Pri več kot polovici bolnikov s kliničnim pregledom ugotovimo močno povečano vranico, redkeje jetra [6-8].

## 3 DIAGNOSTIKA

Za potrditev diagnoze KML napravimo pregled celotne krvne slike ter izvedemo punkcijo (citološki pregled) in biopsijo (histološki pregled) kostnega mozga. Celice in tkiva pregledamo z mikroskopom. Za citogenetske in molekularno-genetske preiskave za dokaz prisotnosti kromosoma Ph in/ali zlitega gena *BCR-ABL1* pa uporabimo metode molekularne biologije.

S pregledom krvne slike ugotovimo, da se močno razraščajo celice bele vrste (levkociti) vseh razvojnih stopenj, občasno je lahko povečano tudi število trombocitov. V začetku je anemija blaga ali je ni, stopnjuje se, ko KML napreduje. Število levkocitov je večinoma  $50 - 200 \times 10^9/L$ , lahko tudi več (pri zdravih ljudeh  $4 - 10 \times 10^9/L$ ) [1, 2, 12].

Histološki in citološki pregled kostnega mozga pokaže veliko gostoto celic, povečan je delež nezrelih celic v granulocitni vrsti (predvsem mielocitov in metamielocitov), več je tudi eozinofilcev in bazofilcev. Eritroblasti (nezreli eritrociti) so maloštevilni. Pri nevtrofilnih granulocitih so opazni znaki motenega dozorevanja jedra, citoplazme in tudi granulacij. V pospešenem obdobju ali blastni preobrazbi pri mikroskopskem pregledu opazimo povečano število levkemičnih blastov v kostnem mozgu, velikokrat tudi v periferni krvi. Pogosteje gre za mieloblastno kot za limfoblastno preobrazbo KML, način zdravljenja je za vsako različen [1, 2].

Prisotnost kromosoma Ph dokažemo s standardno citogenetsko preiskavo (kariotipizacija) na vzorcu kostnega mozga. Rezultat izrazimo kot delež (%) pozitivnih celic (v metafazi) s kromosomom Ph. Zliti gen *BCR-ABL1* dokažemo na osnovi prisotnosti genskega prepisa, torej specifične mRNA za ta zliti gen. Uporabimo metode za analizo mRNA, in sicer verižno reakcijo s polimerazo in obratnim prepisovanjem (RT-PCR), ali pa za analizo DNA, in sicer fluorescenčno hibridizacijo *in situ* (FISH) v vzorcu periferne krvi ali kostnega mozga [2, 13].

## 4 ZDRAVLJENJE KML IN NOVOSTI V ZDRAVLJENJU

Zgodovinski mejniki v zdravljenju KML so potekali skozi zadnjih 100 let. Pravi preskok je povzročilo odkritje kromosoma Ph leta 1960 [5]. S tem odkritjem je postalo proučevanje KML za znanstvenike zelo zanimivo. Če je bilo pred letom 1960 zdravljenje KML predvsem simptomatsko z *obsevanjem vranice* in še prej z *arzenikom*, pa je po letu 1960 zdravljenje z *bussulfanom* prvič učinkoviteje kontroliralo število levkocitov. Okoli leta 1970 se je pojavilo zdravljenje s *hidroksiureo*, ki so jo bolniki boljše prenašali, prvič pa se je tudi preživetje blago podaljšalo. V letih 1975 in kasneje sledijo podatki o *alogenični presaditvi kostnega mozga* kot možnosti ozdravitve bolnikov s KML. V osemdesetih letih so z *interferonom alfa* pri nekaterih bolnikih dosegli popolni citogenetski odgovor in dolgo preživetje. V devetdesetih letih so znanstveniki prvič predlagali uporabo *zaviralcev tirozin-kinaze (angl. Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI)* in substanco (GCP57148B) tudi razvili pri Ciba-Geigy. Danes to substanco imenujemo imatinib. Klinične raziskave je pričel Brian Druker. Temu sledi hitra zgodba o uspehu zdravljenja KML s TKI [14]. Tako so danes na voljo že TKI tretje generacije, pri katerih je rezistenca ob mutacijah v genu *BCR-ABL1* manjša in zato terapija učinkovita pri širšem krogu bolnikov z BCR-ABL1-pozitivno KML (preglednica 1) [15, 16].

### ALI STE VEDELI?

- Nekatero genske spremembe, ki jih odkrijemo pri bolnikih z levkemijo ob pojavu bolezni, nam lahko služijo kot specifičen označevalec malignega kлона. S kvantitativnim PCR spremljamo raven tega označevalca med in po zdravljenju in tako ocenimo učinkovitost zdravljenja. Pravimo, da določimo minimalno preostalo bolezen.
- V Sloveniji imamo Združenje levkemičnih bolnikov in bolnikov z limfomi »L&L«, (limfom.levkemija@gmail.com), ki je bilo ustanovljeno 2007. Združenje je neprofitna organizacija, ki združuje bolnike, njihove sorodnike in prijatelje ter strokovnjake na področju levkemij in limfomov. Slovensko združenje je vključeno v Lymphoma Coalition and Myeloma Euronet in v CML Advocates Network, ki pomaga bolnikom s KML in njihovim svojcem.

### 4.1 ZDRAVLJENJE BOLNIKOV, KI JIH ODKRIJEMO V KRONIČNEM IN NAPREDOVALEM OBDOBJU BOLEZNI

Imatinib 400 mg/dan je bila standardna oblika zdravljenja bolnikov v kroničnem obdobju KML po evropskih priporočilih iz leta 2009 [13]. V letošnjem letu so izšla nova evropska priporočila (2013)[16]. Za bolnike v kroničnem obdobju KML priporočajo enega od treh TKI, ki so dobili dovoljenje evropske (EMA) in ameriške (FDA) agencije za zdravila za to indikacijo. Uporabimo lahko *imatinib* 400 mg/dan, *nilotinib* 300 mg/12 ur ali *dasatinib* 100 mg/dan. Ta tri zdravila lahko uporabimo tudi kot prvo, drugo ali naslednje linije zdravljenja KML. Uporabimo lahko standardne, zgoraj opisane odmerke, ali višje, tudi že ustaljene odmerke. *Bosutinib* 500 mg/dan sta odobrili FDA in EMA za KML-bolnike, ki ne prenašajo predhodnega zdravljenja (intoleranca), ali le-to ni bilo učinkovito (rezistenca). *Ponatinib* 45 mg/dan je odobrila FDA za intolerantne ali rezistentne bolnike na predhodno zdravljenje. *Radotinib* ima enako indikacijo in ga imajo le v Koreji. Na ameriškem tržišču je še *omacetaksin*, ki ni TKI, temveč spada v skupino homoharingtoninov. Priporočila zdravljenja kroničnega obdobja KML so v preglednici 2.

Busulfana ne priporočajo več. Hidroksiureo lahko predpišemo kratek čas pred uvedbo TKI, dokler ne potrdimo diagnoze KML. Skupna uporaba TKI in interferona alfa je možna, vendar poteka le v študijah. Zdravljenje s citostatiki v kroničnem obdobju KML ni priporočljivo, koristno pa je v pospešenem obdobju bolezni in v blastni preobrazbi kot priprava na presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC).

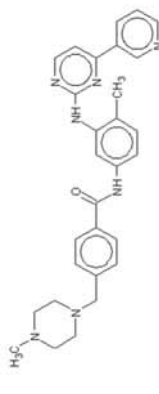
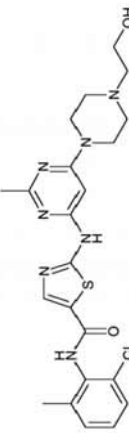
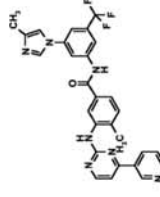
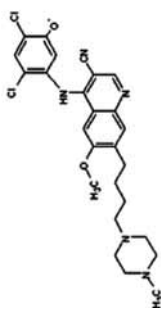
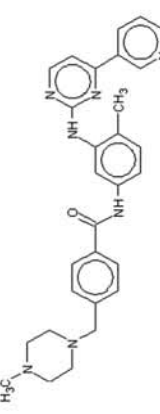
Alogenična PKMC (aloPKMC) še vedno ostaja edini način zdravljenja, s katerim lahko pozdravimo bolezen, in je pomembna za bolnike, ki se slabo odzivajo na zdravljenje s TKI. V zadnjih 14 letih odkar zdravimo s TKI (v Sloveniji 11 let), sodi aloPKMC v tretjo ali četrto linijo zdravljenja, ko odpove tudi druga generacija TKI.

Priporočila so pripravljena na osnovi učinkovitosti zdravil v dosedanjih kliničnih raziskavah. Izbira zdravila (TKI) pa je odvisna še od prenašanja in varnosti zdravila, značilnosti bolnika, njegove starosti in pridruženih bolezni, ki najpomembneje vplivajo na našo odločitev.



Preglednica 1: Kemijske in farmakološke lastnosti zaviralcev tirozin-kinaze BCR-ABL1.

Table 1: Chemical and pharmacologic characteristics of BCR-ABL1 tyrosine-kinase inhibitors.

	$t_{1/2}$	Kemijska struktura	Aktivnost pri prisotni mutaciji			Reference
			T315I	G250E	E255K/V	
Imatinib	18 h		-	-	-	[17, 18]
Dasatinib	3-5 h		-	+/ $\downarrow$	$\downarrow$	[19-22]
Nilotinib	17 h		-	+/ $\downarrow$	-	[23-25]
Bosutinib	32 h		-	+/ $\downarrow$	$\downarrow$	[25-27]
Ponatinib	24 h		+	+/ $\downarrow$	$\downarrow$ /-	[25, 28, 29]

Opomba: + nespremenjena aktivnost;  $\downarrow$  zmanjšana aktivnost; - ni aktiven

Preglednica 2: Priporočila zdravljenja kroničnega obdobja kronične mieločne levkemije (KML) [16].

Table 2: Chronic phase chronic myeloid leukemia (CML), treatment recommendations [16].

Zdravljenje kroničnega obdobja KML
Prvi nivo zdravljenja Imatinib ali nilotinib ali dasatinib HLA tipizacija bolnika in svojcev le v primeru slabe prognoze ob diagnozi
Drugi nivo zdravljenja, neprenašanje prvega TKI Uporabimo drugo obliko TKI
Drugi nivo zdravljenja, neuspeh zdravljenja z imatinibom (prvi nivo) Dasatinib ali nilotinib ali bosutinib ali ponatinib HLA tipizacija bolnika in svojcev
Drugi nivo zdravljenja, neuspeh zdravljenja z nilotinibom (prvi nivo) Dasatinib ali bosutinib ali ponatinib HLA tipizacija bolnika in svojcev, predvidevaj aloPKMC
Drugi nivo zdravljenja, neuspeh zdravljenja z dasatinibom (prvi nivo) Nilotinib ali bosutinib ali ponatinib HLA tipizacija bolnika in svojcev, predvidevaj aloPKMC
Tretji nivo zdravljenja, neuspeh zdravljenja in/ali neprenašanja druge generacije TKI Preostali TKI; predvidevaj aloPKMC
Mutacija T315I, Ponatinib HLA tipizacija bolnika in svojcev, iskanje nesorodnega darovalca, predvidevaj aloPKMC;

HLA – humani levkocitni antigeni; aloPKMC – alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic; TKI – zaviralec tirozin kinaze.

## 4.2 ZDRAVLJENJE BOLNIKOV, KI JIH ODKRIJEMO V NAPREDOVALEM OBDOBJU BOLEZNI

V napredovalem obdobju bolezni se odločamo glede na to, ali so bili bolniki že zdravljeni s TKI ali ne. Novoodkriti bolniki v pospešenem obdobju ali blastni preobrazbi prejmejo enega od treh TKI v povečanem odmerku: imatinib 400 mg/12ur ali nilotinib 400 mg/12ur ali dasatinib 70 mg/12ur ali 140 mg/dan. Takoj so potrebni postopki za iskanje darovalca krvotvornih matičnih celic. AloPKMC priporočamo za vse bolnike v blastni preobrazbi KML, v pospešenem obdobju KML pa za tiste bolnike, ki ne dosežejo optimalnega odgovora na zdravljenje s TKI. Bolniki, ki pa so v pospešenem obdobju bolezni ali blastni preobrazbi kot napredovanje kroničnega obdobja in neodzivnosti na TKI, potrebujejo ponovno analizo eventualnih novonastalih mutacij v kinazni domeni BCR-ABL1. Zdravitve je potrebno s TKI, ki še ni bil uporabljen oziroma glede na občutljivost prisotnih mutacij (preglednica 1 in referenci [15, 16]). V primeru mutacije T315I v tirozin-kinazi BCR-ABL1 je ponatinib edini učinkoviti TKI. S tem zdravljenjem želimo doseči ponovno kronično obdobje bolezni. Pred alogenično PKMC,

ki predstavlja edini način ozdravitve, bolniki z napredovalim obdobjem bolezni pogosto potrebujejo še intenzivno zdravljenje s citostatiki.

## 4.3 ODGOVOR NA ZDRAVLJENJE

Najpomembnejši prognostični dejavnik ob zdravljenju KML s TKI je odgovor na zdravljenje. V predhodnih priporočilih zdravljenja KML 2009 [13] je bila definicija odgovora na zdravljenje omejena na zdravljenje z imatinibom. V vmesnem obdobju so se pojavljale definicije odgovora na drugo generacijo TKI. V najnovejših priporočilih (2013) so opredelili, kakšen naj bo želeni odgovor na prvo raven zdravljenja ne glede na vrsto TKI (preglednica 3), in nato opredelili tudi zelene odgovore na drugi nivo zdravljenja v primeru neodzivnosti na imatinib.

Odgovore so opredelili kot: ustrezen odgovor, neuspeh zdravljenja in opozorila. Ustrezen odgovor omogoča preživetje, ki je primerljivo z ostalo zdravo populacijo. Neuspeh zdravljenja pomeni, da morajo bolniki prejeti drugo obliko zdravljenja, zaradi nevarnosti napredovanja bolezni in smrti. Vmesno področje zajemajo opozorila, ki pomenijo, da

**Preglednica 3.** Definicija odgovora na prvo zdravljenje kronične mieločne levkemije (KML) z zaviralci tirozinske kinaze (TKI). Definicije so iste za bolnika v kroničnem in napredovalem obdobju bolezni [16].

**Table 3.** Definition of the response to inhibitor of tyrosine kinase (TKI) for chronic myeloid leukemia (CML) patients, firstline. The definitions are the same for patients in chronic, advanced and blast phases of the disease [16].

ČAS	USTREZEN ODGOVOR	OPOZORILA	NEUSPEH
Ob diagnozi	-	Visoko rel. tveganje ali Klonske kromosomske nepravilnosti v Ph+ celicah	-
Po 3 mesecih	BCR-ABL1 ≤ 10% in/ali Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% in/ali Ph+ 36-95%	Ni PHO in/ali Ph+ >95%
Po 6 mesecih	BCR-ABL1 < 1% in/ali Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10% in/ali Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 >10% In/ali Ph+ >35%
Po 12 mesecih	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	BCR-ABL1 > 0,1-1%	BCR-ABL1 >1% In/ali Ph+ > 0%
Potem in kadarkoli	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	Dodatne kromosomske nepravilnosti v Ph- celicah (-7, or 7q-)	Izguba PHO Izguba PCitO Potrjena izguba glavnega MoLO Mutacije (npr: T315I) Klonske kromosomske nepravilnosti v Ph+ celicah

PHO-popolni hematološki odgovor, PCitO- popolni citogenetski odgovor, Glavni MoLO-glavni molekularni odgovor

odziv bolezni na zdravljenje ni povsem optimalen, zahteva pogostejše kontrole in menjavo zdravila v primeru prehoda v skupino neuspešnega zdravljenja [16].

#### 4.4 SPREMLJANJE USPEŠNOSTI ZDRAVLJENJA

Uspešnost zdravljenja spremljamo s celotno krvno sliko, standardizirano kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (kvantitativni PCR) in/ali s citogenetsko preiskavo ter preiskavo FISH. Odgovor na zdravljenje ocenimo ob treh, šestih in dvanajstih mesecih od začetka zdravljenja s TKI (preglednica 3). Odgovor na zdravljenje ocenjujemo na treh ravneh: na nivoju še prisotnih kliničnih znakov bolezni (t.i. hematološki odgovor), na nivoju še prisotnih malignih celic s kromosomom Ph (celic Ph+) (t.i. citogenetski odgovor) ter na nivoju (še) prisotnega izražanja zlitega gena *BCR-ABL1* (t.i. molekularni odgovor). Zdravljenje je uspešno, kadar ni več kliničnih znakov in sprememb v krvni sliki, kar se opredeli kot popolni hematološki odgovor, PHO), ko s citogenetsko preiskavo ne ugotovimo več celic Ph+

in kostnem mozgu (popolni citogenetski odgovor) in ko se število kopij gena *BCR-ABL1* zmanjša za več kot 1000-krat od začetne standardne vrednosti, kar opredelimo kot glavni molekularni odgovor (glavni MoLO). Nato učinek zdravljenja s TKI spremljamo s standardiziranim kvantitativnim PCR na tri mesece iz vzorca periferne krvi vse do doseženega stabilnega glavnega MoLO, nato na tri do šest mesecev. Ob kontrolah rutinsko opravimo tudi pregled krvne slike in drugih biokemičnih parametrov za oceno delovanja ledvic, jeter in statusa železa v telesu. V primeru rezistence na zdravljenje s TKI, poslabšanja (nepojasna anemija, levkopenija in trombocitopenija) oz. napredovanja bolezni opravimo še dodatne preiskave, ki pripomorejo k razjasnitvi vzrokov takšnega stanja bolezni. Te preiskave so citogenetska preiskava vzorca kostnega mozga, kjer ugotavljamo, ali so v celicah s kromosomom Ph (Ph+) ali v celicah brez kromosoma Ph (Ph-) prisotne še druge kromosomske spremembe, ugotavljanje pridobljenih mutacij v genu *BCR-ABL1*, ki lahko vplivajo na učinek zdravljenja s TKI, in citološki in histološki pregled kostnega mozga [16].

Najpomembnejša in najboljčutiljivejša preiskava za spremljanje uspešnosti zdravljenja KML je standardizirani kvantitativni PCR, s katerim določimo raven izražanja gena *BCR-ABL1* v levkocitih periferne krvi. Raven izražanja gena *BCR-ABL1* predstavlja razmerje med številom kopij prepisa *BCR-ABL1* in številom kopij prepisa *ABL1*, določenih s kvantitativnim PCR. Razmerje izrazimo kot delež, odstotek (%) na mednarodnem desetiškem logaritmskem merilu (International Scale, IS), kjer 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,0032 % in 0,001 % ustreza zmanjšanju za 1, 2, 3, 4, 4.5 in 5 logaritmov pod začetno standardno vrednostjo, ki so jo določili v raziskavi IRIS [30, 31]. V tej raziskavi je bila začetna standardna vrednost (100 %) določena kot mediana vrednosti razmerja *BCR-ABL1* in referenčnega gena *BCR30* nezdravljenih bolnikov v kroničnem obdobju bolezni. Pomembna ugotovitev te raziskave je, da velika večina bolnikov s KML, zdravljenih z imatinibom, doseže popolni citogenetski odgovor in da imajo bolniki, ki dosežejo glavni MoIO po 18 mesecih zdravljenja z imatinibom, zelo veliko verjetnost, da bolezen v 5 letih ne bo napredovala [32, 33]. Glavni MoIO (0,1 %, angl. Major Molecular Response, MMR) je v raziskavi ustrezal zmanjšanju za 3 desetiške logaritme od začetne standardne vrednosti (100 %). Ti vrednosti sta tudi osnova za mednarodno desetiško logaritmsko merilo [31]. Pravimo, da ima laboratorij standardiziran kvantitativni PCR v realnem času za določanje izražanja ravni gena *BCR-ABL1*, če lahko predstavi rezultate na mednarodnem merilu.

Pri novejših zdravilih, kot sta nilotinib in dasatinib, je delež bolnikov, ki doseže glavni MoIO v krajšem času večji. Tudi delež bolnikov z globljim MoIO odgovorom kot je glavni MoIO, npr. zmanjšanje števila levkemičnih celic za 4 (MoIO 4.0) ali 4.5 logaritma (MoIO 4.5), je večji. Molekularni odgovor 4.5 je že tista stopnja, pri kateri je v laboratoriju težko izmeriti prepis *BCR-ABL1* s kvantitativnim PCR oziroma izračunati, kakšna je občutljivost kvantitativnega PCR, s katero bi lahko zanesljivo določili to stopnjo odgovora [16].

Preiskavo kvantitativni PCR opravimo čimprej, takrat ko znamo pomemben porast ravni izražanja *BCR-ABL1* (npr. porast ravni za 0,5 do 1,0 logaritem; > 5 X). Porast ne pomeni nujno neuspeha zdravljenja, ampak je razlog potrebno raziskati. Možni vzroki so prekinitve ali opustitev jemanja zdravila ali odpornost proti zdravljenju. Čeprav je vzrokov za pojav odpornosti proti zdravljenju s TKI več, sta klonska evolucija in pojav točkovnih mutacij v kinazni domeni beljakovine *BCR-ABL1* najpomembnejša dejavnika, ki sta medsebojno povezana [16, 34]. Drugi vzroki so vpliv na

farmakokinetiko zdravila in aktivacija alternativnih signalnih poti, ki vodijo do rasti celic neodvisno od *BCR-ABL1* [34].

#### 4.4.1 Pojav drugih kromosomskih sprememb pri kronični mieloični levkemiji

Druge kromosomske spremembe v celicah Ph+ ali Ph- lahko ugotovimo ob pojavu bolezni, praviloma pa ko bolezen napreduje. Pri 80 % bolnikov v blastni krizi ugotovimo dodatne kromosomske spremembe. Fenomen je poznan in opisan kot klonska evolucija. Dodatne kromosomske spremembe, kot so trisomija kromosoma 8, trisomija kromosoma Ph [+der(22)t(9;22)(q34;q11)], izokromosom 17 (i(17)(q10)), trisomija 19 in ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11) znotraj klona celic Ph+ vplivajo na potek bolezni, potek bolezni je manj ugoden. Klonalne kromosomske spremembe v celicah Ph- kostnega mozga se lahko pojavijo v 5 do 10 % bolnikov. Najpomembnejše so spremembe kromosoma 7 (monosomija 7 ali delecija dela kromosoma 7 (del(7q)), ker nakazujejo na tveganje za mielodisplazijo in akutno levkemijo, kar je lahko razlog za odločitev za dolgoročno spremljanje zdravljenja bolnika z biopsijo kostnega mozga. Preiskavo FISH večinoma uporabljamo za potrditev popolnega citogenetskega odgovora, kjer je rezultat negativen, ali za opredelitev ali potrditev dodatne kromosomske spremembe v Ph+ ali v Ph-negativnih celicah [16].

#### 4.4.2 Pojav mutacij v genu *BCR-ABL1* pri kronični mieloični levkemiji

Eden izmed vzrokov za pojav odpornosti proti zdravljenju s TKI je pojav točkovnih mutacij v genu *BCR-ABL1*. Klinično pomembne mutacije določimo s klasičnim sekvenciranjem, določitev nukleotidnega zaporedja odseka DNA v *BCR-ABL1*, ki kodira kinazno domeno beljakovine *BCR-ABL1* [15, 16]. Med njimi so nekatere, ki močno vplivajo na odzivnost na zdravljenje s TKI. Takšna mutacija je tudi zamenjava treonina za izolevcin na mestu 315 (T315I) aminokislinskega zaporedja beljakovine *BCR-ABL1*, ki povzroči pojav klona, ki je odporen proti imatinibu, nilotinibu in dasatinibu. Za nilotinib in dasatinib je manj odpornih mutacij kot za imatinib in se med seboj ne pokrivajo, razen mutacije T315I [15, 16, 35].

## 4.5 PRENEHANJE ZDRAVLJENJA IN NOSEČNOST

Velja priporočilo, da bolniki s KML, ki imajo optimalen odgovor na zdravljenje s TKI, neomejeno dolgo nadaljujejo zdravljenje v standardnem odmerku zdravila. Že nekaj let

potekajo kontrolirani poskusi prenehanja zdravljenja pri bolnikih, ki so vzdrževali dlje časa globok molekularni odgovor MoIO 4.5 in več. V Evropi je najbolj znana študija STIM (stop imatinib). 40 % bolnikov je kljub prenehanju jemanja zdravila obdržalo globok molekularni odgovor 1-4 leta. Pri drugih pa so s ponovnim zdravljenjem hitro zopet dosegli želeni odgovor. Vendar pa so podatki še preskopi za priporočila o prenehanju jemanja TKI. Druga možnost je intermitentno zdravljenje z imatinibom. V redkih primerih pri posameznih bolnikih lahko izven študije prenehamo zdravljenje s TKI, če imamo kvalitetno, mesečno laboratorijsko spremljanje bolnika. To je še posebej pomembno za obdobje nosečnosti, saj je zdravljenje s TKI kontraindicirano ob spočetju zarodka in v nosečnosti [13, 16].

## 5 NEŽELENI UČINKI PRI ZDRAVLJENJU KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE Z ZAVIRALCI TIROZIN-KINAZE TER UKREPANJE IN VLOGA FARMACEVTA

Pri zdravljenju s TKI se lahko pojavijo hematološki in nehematološki neželeni učinki (NŽU) (preglednica 4). Slednji so pogostejši in so običajno posledica zavore kostnega mozga.

Najbolj izražen *hematološki NŽU* je *nevtropenija*, torej stanje z znižanim številom nevtrofilnih granulocitov v krvi. Redkeje se pojavita tudi trombocitopenija (zmanjšanje trombocitov) in anemija (zmanjšanje eritrocitov) v krvi. Ker so nevtrofilni granulociti odgovorni predvsem za fagocitozo tujkov in/ali bakterij, je pri tem NŽU povečana nevarnost okužb. Zato je prvi ukrep usmerjen v preprečevanje oziroma izogibanje okužbam oziroma temu, da povečamo odpornost (vitaminski pripravki, ustrezna prehrana z dovolj sadja in zelenjave, gibanje). Nevtropenijo skušamo odpraviti z dodajanjem rastnih dejavnikov, ki pospešijo razvoj novih nevtrofilcev v kostnem mozgu in omogočijo, da se

Preglednica 4: Neželeni učinki zdravljenja z zaviralci tirozin-kinaze (TKI) [36].

Table 4: Adverse events associated with inhibitor of tyrosine kinase (TKI) [36].

	Imatinib 400 mg	Nilotinib 2 x 400mg	Dasatinib 2x70mg
<b>Hematološki</b>			
• Nevtropenija (stopnje 3 ali 4); NG <1 x 10 <sup>9</sup> /L	14-35%	28-37%	46-80%
• Trombocitopenija (stopnje 3 ali 4); Tr <50 x10 <sup>9</sup> /L	8-20%	28-37%	41-81%
• Anemija (stopnje 3 ali 4)	3-7%	8-23%	18-75%
<b>Nehematološki</b>			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Slabost</li> <li>• Driske</li> <li>• Zastoj tekočine (plevralni, perikardialni izliv, edemi, ascites)</li> <li>• Prebavne težave</li> <li>• Mišični krči</li> <li>• Izpuščaji</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zvečana lipaza</li> <li>• Zvišan krvni sladkor</li> <li>• Zvečan bilirubin</li> <li>• Zvečane transaminaze</li> <li>• Izpuščaj</li> <li>• Srbenje kože</li> <li>• Slabost</li> <li>• Glavobol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zastoj tekočine (plevralni, perikardialni izliv, edemi, ascites)</li> <li>• Dušenje</li> <li>• Driske</li> <li>• Glavobol</li> <li>• Utrujenost</li> <li>• Izpuščaj</li> <li>• Bruhanje</li> </ul>

NG-nevtrofilni granulociti, Tr-trombociti.

njihovo število v krvi spet normalizira. Dodajamo granulocitne rastne dejavnike, za zdravljenje anemij pa epoetine vkombinacijski pripravki železa [36].

Nehematološki NŽU pri zdravljenju s TKI so redkejši in zelo različni.

Slabost je pogost nehematološki NŽU in se lahko pojavi pri 50 % bolnikov, zdravljenih z imatinibom. Slabosti lahko močno zmanjšajo sodelovanje bolnikov pri zdravljenju, nekateri celo prenehajo s terapijo, zato je smiselno učinkovito ukrepanje proti slabosti. Slabost je manjša, če bolniki imatinib jemljejo s hrano in tekočino, kar pa ni priporočljivo pri terapiji z nilotinibom, saj ga je potrebno jemati na prazen želodec. Za preprečevanje slabosti običajno dodatno predpišemo antiemetike.

Zadrževanje vode je NŽU, ki je bolj izražen pri zdravljenju z imatinibom kot nilotinibom. Pojavijo se relativno blagi simptomi, kot npr. otekline vek in gležnjevi, vendar so ascites, peritonealni in perikardialni izlivi lahko resni NŽU pri terapiji z dasatinibom in ju zdravimo z diuretiki, včasih pa je potrebno prekiniti terapijo z dasatinibom.

Srčno popuščanje pri zdravljenju z imatinibom ni nič pogostejše kot v ostali populaciji, vendar je na to potrebno bolnika opozoriti. Previdnost pa je potrebna pri terapiji z dasatinibom, ker je lahko povezan s podaljšanjem vala QT pri preiskavi EKG. Priporočljivo je, da pred uvedbo terapije preverimo EKG, nivo kalija in magnezija ter se izogibamo zdravilom, ki prav tako podaljšujejo val QT.

Okužba z varicelo zoster je redka in se uspešno pozdravi z virustatikami (npr. aciklovir), potrebno pa je spremljanje zaradi nevarnosti ponovitve.

Drugi NŽU, ki se lahko pojavijo pri terapiji s TKI, so driske, prebavne motnje, izpuščaji, glavoboli in mišični krči (pri imatinibu). Farmacevt lahko pomaga pri lajšanju teh NŽU z zdravili ali zdravilnimi učinkovinami oziroma prehranskimi dopolnili.

neodzivnih na zdravljenje s TKI ali pa bolezen napreduje kljub zdravljenju s TKI. Na razpolaga so še presaditev krvotvornih matičnih celic, če je bolnik v kondiciji oziroma primerne starosti, in druge oblike raziskovalnega zdravljenja v študijah [11]. Resni NŽU zdravljenja s TKI so redki, vendar je pomembno, da jih prepoznamo in ustrezno ukrepamo. Drugi NŽU, ki se lahko pojavijo pri terapiji s TKI, so driske, prebavne motnje, izpuščaji, glavoboli in mišični krči (pri imatinibu). Farmacevt lahko pomaga pri lajšanju teh NŽU z zdravili ali zdravilnimi učinkovinami oziroma prehranskimi dopolnili.

## 7 LITERATURA

1. Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M and Thiele J. Chronic myelogenous leukemia BCR-ABL1 positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. IARC, 2008: 32-37.
2. Modic M. Mieloproliferativne novotvorbe. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina. Littera Picta, d.o.o., Slovensko medicinsko društvo, 2011: 1312-15.
3. Pretnar J, Mlakar U, Černelč P, Andoljšek, D. Krvne celice. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina. Littera Picta, d.o.o., Slovensko medicinsko društvo, 2011: 1243-50.
4. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-293.
5. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 142: 1497.
6. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia. *Lancet* 2007; 370: 342-50.
7. Sawyers C. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340: 1330-40.
8. Van Etten RA. Clinical manifestations and diagnosis of chronic myelogenous leukemia. In: UpToDate, version 24.7.2013, 2013.
9. Radich J. Chronic Myeloid Leukemia 2010: Where Are We Now and Where Can We Go? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010:122-8. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.122.
10. Preložnik Zupan I, Pajic T, Glaser M, Grmek-Zemljic T, Grat M, Fikfak N. Epidemiološki podatki bolnikov s kronično mieloično levkemijo v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 51-5.
11. Preložnik Zupan I, Pajič T, Glaser M, et al. Uspešnost zdravljenja KML v Sloveniji v obdobju inhibitorjev tirozinske kinaze. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 56-64.
12. Pretnar J, Žontar D, Podgornik H, Pajič T. Laboratorijske preiskave v klinični hematologiji. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina. Littera Picta, d.o.o., Slovensko medicinsko društvo, 2011: 1251-61.
13. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6041-51.

## 6 SKLEP

Z razvojem tarčnih zdravil, zaviralcev tirozin-kinaze, se je strategija zdravljenja KML povsem spremenila, s tem pa tudi kakovost življenja in preživetje bolnikov. Odgovor na zdravljenje nastopi hitro in v večini primerov tudi traja. Bolniki s KML z leti razvijejo stabilne molekularne odgovore, ki jih spremljamo z visoko občutljivim načinom, standardiziranim kvantitativnim PCR. Manjši del bolnikov s KML je

14. Deininger MW. Chronic Myeloid Leukemia: an historical perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progra*, 2008; 2008:418. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.418.
15. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011; 118: 1208-15.
16. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 2013; 122: 872-84.
17. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al., Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190-6.
18. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B. et al., Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117-25.
19. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica* 2007; 92: 401-4.
20. Talpaz M, Shah N P, Kantarjian H, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006; 354: 2531-41.
21. Gruber FX, Ernst T, Porkka K, et al. Dynamics of the emergence of dasatinib and nilotinib resistance in imatinib-resistant CML patients. *Leukemia* 2011; 26: 172-7.
22. McCormack PL and Keam SJ. Dasatinib: a review of its use in the treatment of chronic myeloid leukaemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs* 2011; 71: 1771-95.
23. Hughes T, Saglio G, Branford S, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4204-10.
24. Martens UM. *Small Molecules in Oncology*. In: Schlag PM, Senn, H-J. *Recent Results in Cancer Research*, Springer-Verlag, 2010.
25. Redaelli S, Mologni L, Rostagno R, et al. Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 2012; 87: E125-8. doi: 10.1002/ajh.23338. Epub 2012 Oct 9.
26. Amsberg GK, Schafhausen P. Bosutinib in the management of chronic myelogenous leukemia. *Biologics* 2013; 7: 115-22.
27. Cortes JE, Kantarjian H, Brummendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011; 118: 4567-76.
28. Cassuto O, Dufies M, Jacquet A, et al. All tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myelogenous cells are highly sensitive to ponatinib. *Oncotarget* 2012; 3: 1557-65.
29. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2012; 367: 2075-88.
30. Drucker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic-phase shows sustained responses and high overall survival. *N Eng J Med* 2006; 355: 2404-17.
31. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors - recommendations for 'harmonizing' current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108: 28-37.
32. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3037-42.
33. Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006; 107: 4250-6.
34. Apperley JF. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007; 8: 1018-29.
35. Pajič T, Lamovšek N, Fink M, Zupan Preložnik I, Černelč P. Analiza mutacij v kinazni domeni proteina BCR-ABL1 pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo in z nezadostnim odgovorom na zdravljenje z zaviralcem tirozinske kinaze. *Zdrav Vestn* 2012; 81 supl 2: II-174-9.
36. Krstanoska F, Bricman Umek I, Fikfak N, Čeh M, Preložnik Zupan, I. Resni neželeni učinki zdravljenja kronične mieloične levkemije z zaviralci tirozinske kinaze - prikaz primerov in pregled literature. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 413-21.

# KRONIČNA LIMFATIČNA LEVKEMIJA

## CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

AVTORJI / AUTHORS:

Doc.dr. Helena Podgornik,  
univ.dipl.inž.kem.inž., spec.med.biok.<sup>1</sup>  
Neda Gržinič, mag.farm.<sup>2</sup>  
Prof.dr. Peter Černelč, dr.med.,  
spec.intern.med.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Oddelek za  
hematologijo, Zaloška 7, Ljubljana

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Lekarna,  
Zaloška 7, Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: helena.podgornik@kclj.si

## 1 UVOD

Kronična limfatična levkemija (KLL) je bolezen, pri kateri se v venski krvi, kostnem mozgu, limfatičnem tkivu in vranici kopičijo majhni, nefunkcionalni limfociti B, ki morfološko izgledajo zreli (1, 2). Gre za najpogostejšo levkemijo odraslih zahodnega sveta, ki pa navkljub napredku v razumevanju njenega nastanka in razvoju novih zdravil še vedno ostaja za večino bolnikov neozdravljiva.

## POVZETEK

Kronična limfatična levkemija (KLL) je najpogostejša levkemija pri odraslih, ki jo enostavno prepoznamo zaradi limfocitoze v krvni sliki. Za potrditev diagnoze, predvsem pa oceno prognoze potrebujemo zahtevne preiskave od pretočne citometrije do citogenetike, ki jih izvajajo strokovnjaki v specializiranih laboratorijih. Izsledki teh preiskav so pomembni, ko skupaj z bolnikom izberemo, zdravnik in farmacevt pa vodita, predvsem najbolj zahtevne načine zdravljenja. Večino bolnikov, ki so povprečno starejši od 70 let in imajo več kroničnih bolezni, zdravimo manj intenzivno, skrbno pa moramo upoštevati medsebojne vplive novo predpisanih zdravil za zdravljenje KLL z zdravili, ki jih bolnik že prejema, da zagotovimo uspešno zdravljenje s čim manj neželenimi pojavi.

## ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common hematologic malignancy in adults. Absolute lymphocytosis is indicative for diagnosis of CLL which should be further confirmed by sophisticated diagnostic procedures which are performed by experts in specialized laboratories. Confirmation of diagnosis and determination of important prognostic markers is based on findings obtained by flow cytometry and cytogenetics. These findings are of utmost importance when the most demanding treatment is needed. It is chosen in strong collaboration with patient and latter controlled by physician and pharmacist. In majority of cases which are older than 70 years in average and have different comorbidities, treatment is however, less aggressive. Interferences between drugs intended for CLL treatment with other already prescribed drugs should be taken into account to diminish side effects.

Pojavnost bolezni, ki jo ocenjujejo na 3-5 na 100 000 prebivalcev letno, je odvisna od starosti in spola. Pri moških je 2-krat pogostejša kot pri ženskah. Ker je večina obolelih odkrita naključno, je pojavnost na splošno podcenjena. Nanjo močno vpliva tudi geografski dejavnik, saj je bolezen npr. znatno redkejša v Aziji (3).



KLL se pojavlja v družinah. Sorodniki bolnikov s KLL v prvem kolenu imajo trikrat večjo verjetnost kot splošna populacija, da bodo zboleli za KLL. Med sorodniki bolnikov je pogostejša tudi monoklonska B-celična limfocitoza (MBL). Gre za stanje, ko pri osebi najdemo v krvi manjši klon limfocitov B z imunofenotipskimi značilnostmi celic B, kot pri KLL. MBL je predmet poglobljenih raziskav, ker njena vloga pri razvoju KLL ni jasna, z uporabo vse bolj občutljivih diagnostičnih postopkov pa jo srečujemo vedno pogosteje (3).

Vzrokov za nastanek KLL ne poznamo. Raziskave so izključile povezavo z izpostavljenostjo sevanjem, virusnim okužbam in različnim kemikalijam. Izjema so nekateri herbicidi, ki so povzročili bolezen pri kmetijskih delavcih v ZDA (3, 4). Zanesljivo pa vemo, da začne pojavnost KLL po petdesetem letu starosti strmo naraščati (5). Razlogov za to je več. Zmanjšuje se tvorba limfocitov B, medtem ko se napake signalizacije B-celičnega receptorja množijo. Splošno pa ima na nastanek raka vpliv kopičenje reaktivnih kisikovih spojin, ki povzročajo genomsko nestabilnost, zmanjšanje T-celične imunosti in posledično neučinkovito izločanje malignih celic B, ter krajšanje telomer (6, 7). Povprečna starost ob odkritju je pri moških 70 let, pri ženskah 74 let, medtem ko je povprečna starost ob smrti pri moških 74 let, pri ženskah pa 81 let (3).

#### ALI STE VEDELI?

- Leukemija je skupni izraz za maligne novotvorbe hematopoetskega tkiva, pri katerih najdemo levkemične celice v krvi. Limfomi pa so skupina malignih novotvorb limfocitov B ali T. Glede na vrsto celic je torej KLL maligni limfom, ker pa se limfomske celice izplavljajo v kri, govorimo o levkemiji.
- KLL je najpogostejša levkemija odraslih zahodnega sveta. Največji dejavnik tveganja za KLL je poleg starosti še spol. Vzroka, zakaj je KLL pogostejša pri moških kot pri ženskah, ne poznamo.

KLL so dolgo razumeli kot homogeno bolezen, v zadnjem obdobju pa so raziskave pokazale, da gre za morfološko, imunološko in genetsko heterogeno bolezen, kar se odraža tako na njenem poteku kot pri odzivu na zdravljenje (8). Klinično je lahko KLL dolgo stabilna s pričakovano življenjsko dobo, ki je skoraj primerljiva z normalno, do hitro napredujoče, ki vodi v zgodnjo smrt (3). Tretjina bolnikov preživi dlje od 20 let in sploh ne potrebuje zdravljenja. Pri 3-10% bolnikov bolezen hitro napreduje (Richterjev sindrom), lahko

pa preide v prolimfocitno levkemijo. Bolezen lahko spremljajo zapleti, kot so avtoimunska hemolitična anemija, avtoimunska trombocitopenija in okužbe.

## 2 ZNAČILNOSTI BOLEZNI

Klon limfocitov B se pri KLL razraščča, tako da pogosto predstavljajo tudi do 99% vseh mononuklearnih celic v venski krvi. S tem povzročijo zmanjšanje števila normalnih celic imunskega odziva in so neposreden vzrok imunske pomanjkljivosti pri bolnikih s KLL. V nasprotju z večino malignih celic, se pri KLL deli le 2-5% limfocitov B, medtem ko večina celic miruje v G<sub>0</sub> fazi celičnega cikla. Vendar pa imajo te celice znatno daljšo življenjsko dobo (nekaj mesecev) v primerjavi z normalnimi limfociti B (nekaj dni). Delno gre to pripisati rastnim dejavnikom mikrookolja, v večji meri pa zmanjšani hitrosti apoptoze, ki jo povzroči tako zmanjšana aktivnost pro-apoptotičnih kot povečana aktivnost anti-apoptotičnih dejavnikov. Spremenjeno ravnovesje pro- in anti-apoptotičnih dejavnikov, ki je zdaj tudi osrednja tema raziskav novih terapevtskih učinkovin, je posledica nenormalnih genov in proteinov (9).

Doslej niso določili še nobene genetske preureditve, ki bi bila neposredno odgovorna za nastanek KLL, pač pa so zanj značilne številne različne preureditve. Intersticijska delecija na dolgem kraku kromosoma 13 (40-60% bolnikov) ima za posledico izgubo področja, ki ne kodira zapisa za protein, pač pa za nekatere mikroRNA (miR-15a, miR-16-1), ki preko zaviranja tarčnih genov delujejo kot genski regulatorji. Poveča se izražanje genov za proteina Bcl2 in TCL1. Prvi kot zaviralec apoptoze, drugi pa preko aktivacije proteina NFκB in inaktivacije proteina BAD, sta močna dejavnika podaljšanega preživetja (10). Mehanizem patogeneze pri drugih pogostejših kromosomskih spremembah je soroden, njihova stična točka pa protein p53. Delecija na kromosomu 17 (okrog 10% nezdravljenih bolnikov) vodi v izgubo tumor supresorja *TP53*, posledično pa proteina p53, ki je glavni mediator apoptoze pri okvari DNA, in ključni dejavnik zagotavljanja genomske stabilnosti. Gen *ATM* na kromosomu 11 (11q22) nosi zapis za kinazo, ki fosforilira p53, njegova izguba (10% bolnikov) pa tako vnovič zmanjša apoptozo. Pri trisomiji kromosoma 12 (10-20% bolnikov) je ključna podvojitev gena *MDM2*, ki pospešuje razgradnjo p53 v proteasomih, s čimer negativno uravnava njegovo aktivnost (9).



Pri večini bolnikov s KLL so dokazali spremenjeno aktivnost signalizacijskih proteinov. Medtem ko je zvečana aktivnost anti-apoptotične PI3K (fosfoinotid 3-kinaza), je domala nefunkcionalna pro-apoptotična protein kinaza R. Z receptorjem povezana tirozin kinaza ZAP-70, ki se praviloma izraža na limfocitih B le pri KLL, podaljša njihovo preživetje tako, da okrepi signalizacijo preko površinskih IgM (9, 11).

## 4 NAPOVEDNI DEJAVNIKI PRI KLL

Določitev ustreznih napovednih dejavnikov ni pomembna le za oceno napredovanja bolezni, pač pa je ključna za izbiro ustreznega zdravljenja glede na tveganje posameznega bolnika in biološko ozadje njegove bolezni. Eden od glavnih izzivov pri KLL je določitev optimalnega časa in načina prvega zdravljenja. Zato je opredelitev nekaterih napovednih dejavnikov pomembna ob postavitvi diagnoze, drugih pa pred začetkom določenega zdravljenja.

Potek bolezni se pri bolnikih znotraj posamezne skupine klinično razvojne stopnje Rai-jeve ali Binet-ove razvrstitve, temelječe na povečanih obodnih bezgavkah, vranici in jetrih ter prisotnosti anemije ali trombocitopenije, lahko znatno razlikuje (12). Ti dve lestvici ob prvem pregledu bolnika le orientacijsko napovedujeta potek bolezni, za natančnejšo oceno poteka, predvsem pa izbire zdravljenja, so se v zadnjem desetletju uveljavili številni napovedni dejavniki temelječi na genetskih, fenotipskih in molekularnih značilnostih levkemičnega klona (13).

Podvojitveni čas limfocitov je preprost parameter, ki dobro odraža kinetiko napredovanja bolezni. Krajši od enega leta označuje hitrejši potek bolezni in krajše preživetje (14). Serumna timidin kinaza,  $\beta$ 2-mikroglobulin, in topni CD23 so prav tako povezani s tumorskim bremenom in preživetjem. Med celičnimi označevalci sta napovedno pomembna prisotnost CD38 in ZAP-70. Napovedni dejavnik, v katerega je bilo usmerjeno zelo veliko raziskav, je mutacijski status gena za težko verigo imunoglobulinov IgV<sub>H</sub>. Izražanje ZAP-70 je povezano z nemutiranim statusom IgV<sub>H</sub> pa tudi s preureditvami gena *TP53*. Vsak od teh kazalcev napoveduje neugoden potek bolezni, njihova uporaba pa je še vedno bolj raziskovalna kot rutinska (12).

Zanesljivo največjo težo in najširšo rutinsko uporabo imajo citogenetske preureditve. Napovedno najugodnejša je

osamljena najdba del(13), pri kateri je celokupno preživetje 133 mesecev, medtem ko je pri bolnikih z normalnim kariotipom 111 mesecev. Napovedno vmesna je tako kot normalni kariotip trisomija kromosoma 12 (114 mesecev), medtem ko sta drugi dve preureditvi, ki ju rutinsko tudi v Sloveniji določamo pri vseh bolnikih s KLL, napovedno neugodni. Pri izgubi gena *ATM* (del(11q)) je srednje preživetje 79 mesecev, pri izgubi gena *TP53* (del(17p)) pa le 32 mesecev (1). Delecija gena *ATM* je značilna za t.i. atipično KLL in za bolnike z izrazito limfadenopatijo. Navadno se odzivajo na zdravljenje, vendar se bolezen praviloma hitro ponovi. Bolniki z del(17p) imajo vedno hiter potek bolezni in so neodzivni na zdravljenje s fludarabinom. Določitev del(17p) pred zdravljenjem je zato ključna zaradi specifičnega zdravljenja z nekaterimi monoklonskimi protitelesi (13).

V zadnjem obdobju so raziskave z uporabo sekveniranja naslednje generacije prinesle novo znanje o genetski kompleksnosti in heterogenosti KLL. Izpostaviti gre napovedno zelo neugodne mutacije gena *TP53* brez istočasne izgube homolognega alela (okrog 5% bolnikov) (15). Kot ponavljajoče so se pokazale mutacije, ki vplivajo na aktivacijo signalizacije preko NOTCH in napake izrezovalno-povezovalnega kompleksa (spliceosome) (16). Pri bolnikih s KLL je spremenjen tudi vzorec metilacije DNA, ki je praviloma hipometilirana. Gre torej za možne nove napovedne dejavnike oziroma potencialne tarče zdravljenja katerih napovedni pomen bo potrebno še potrditi.

## 5 UGOTAVLJANJE BOLEZNI

Prvi pogoj za postavitev diagnoze pri KLL je številčna koncentracija limfocitov B v venski krvi večja od  $5 \times 10^9/L$ . Prav zato je KLL edina podvrsta ne-Hodgkinovega limfoma, pri kateri je venska kri ustrezen vzorec za vse preiskave, ki jih opravimo ob postavitvi diagnoze in histopatološki pregled ni nujen (17). Zdravnik se lahko odloči za punkcijo kostnega mozga, da oceni stopnjo infiltracije z limfomskimi celicami. V tem primeru diagnostične preiskave opravimo tudi na vzorcu kostnega mozga.

Krvna slika je preiskava, ki navadno pripelje bolnika v obravnavo k hematologu. Ob postavitvi diagnoze je število limfocitov večje od  $10 \times 10^9/L$ , pogosto presega tudi  $100 \times 10^9/L$ . V diferencialni krvni sliki najdemo morfološko »normalne« zrele limfocite, ki pa so mehansko občutljivi, zato

pri pripravi krvnega razmaza razpadejo v t.i. Gumprechtove sence. Zaradi infiltracije kostnega mozga z limfociti B imajo bolniki ob odkritju bolezni lahko anemijo, ob napredovanju bolezni pa tudi trombocitopenijo. Imunska trombocitopenija se lahko razvije kadarkoli med potekom bolezni.

Ker je določitev številčne koncentracije limfocitov B ključna za postavitve diagnoze, je pretočna citometrija izhodiščna diagnostična preiskava. Pri KLL imajo limfociti B značilen imunofenotip, po katerem se razlikujejo od drugih limfomov B, in sicer CD5+/CD19+/CD20<sup>sibko</sup>/CD23+/FMC7- (3). Diferencialno diagnostično imunofenotipizacija loči KLL od limfoma plaščnih celic ali spleničnega marginalno-celičnega limfoma. Če pri preiskovancu najdemo klon limfocitov B z značilnim imunofenotipom za KLL, njihova koncentracija pa je manjša od  $5 \times 10^9/L$ , govorimo o MBL. S pretočno citometrijo določamo tudi izražanje proteina ZAP-70, ki je tehnično zahtevno in zato zaenkrat tudi še ni standardizirano (8).

Prisotnost citogenetskih preureditev je ena od značilnosti KLL, vrsta in število teh preureditev pa je neodvisni napovedni dejavnik poteka bolezni (1). Čeprav so apoptotične poti pri KLL nenormalne, pa niso okvarjene, zato limfociti B pri KLL zelo hitro odmrejo, če jih gojimo *in vitro* (9). Ta njihova lastnost, po kateri se znatno razlikujejo od večine malignih celic, otežuje standardno citogenetsko preiskavo, ki temelji na analizi metafaznih kromosomov deleče se celice. Odkritje, da dodatek CpG-oligodeoksinukleotida in citokina IL-2 stimulira limfocite B k delitvi *in vitro*, je botroval temu, da se je delež bolnikov, kjer najdemo kromosomske

preureditve s proganjem kromosomov, približal tistemu, kjer jih odkrijemo z molekularno citogenetsko preiskavo fluorescenčno *in situ* hibridizacijo FISH (18). Z uporabo panelov ustreznih DNA-sond, s katerimi določamo prisotnost delecij na dolgem kraku kromosomov 11 ter 13 ter na kratkem kraku kromosoma 17, ter trisomije 12 (del(11q), del(13q), del(17p), +12) odkrijemo kromosomske spremembe pri več kot 80 % bolnikov (19). Slika 1 prikazuje pogostnost teh preureditev pri slovenskih bolnikih s KLL, ki je zelo primerljiva z objavami v literaturi.

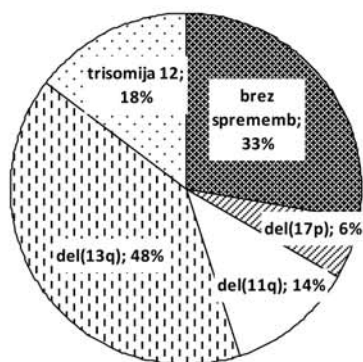
### ALI STE VEDELI?

- Povišana telesna temperatura, nočno potenje in nenamerna izguba telesne teže so sicer nespecifični znaki, so pa zelo značilni za bolnike z limfomi, in jih imenujemo simptomi B. Večina bolnikov s KLL jih splošno sicer nima, zato jo pogosto odkrijemo naključno. Sčasoma pa se poleg teh lahko pojavijo še neboleče povečane bezgavke, utrujenost, izguba apetita ter pogostejše okužbe.
- Večina bolnikov ob postavitvi diagnoze KLL zdravljenja ne potrebuje, 60 % bolnikov pa ga tudi nikoli ne bo.

## 6 ZDRAVLJENJE

Zelo veliko bolnikov ima ob ugotovitvi KLL malo razširjeno bolezen in nima težav. Teh bolnikov ne zdravimo, ampak jih skrbno spremljamo v hematološki ambulanti in pri izbranem družinskem zdravniku (20). V primeru napredovanja bolezni in pojava težav napravimo dodatne citogenetske preiskave za oceno prognoze in izbire najustrežnejšega zdravljenja. Izbira zdravljenja je odvisna od starosti bolnika, njegove fizične zmogljivosti, stopnje razširjenosti bolezni, pridruženih kroničnih bolezni ter opredelitve citogenetskih nepravilnosti.

Bolnikom mlajšim od 60 let brez pridruženih bolezni in z neugodnimi citogenetskimi nepravilnostmi (del(17p), del(11q)), ki napovedujejo hiter potek bolezni, predlagamo program za možnost ozdravitve s kombinacijo intenzivnega zdravljenja s citostatiki in monoklonskim protitelesom ter alogensko presaditvijo krvotvornih matičnih celic (APKMC), ki je edini možen način ozdravitve bolezni (20, 21, 22).



Slika 1: Pojavnost napovedno pomembnih kromosomskih preureditev pri slovenskih bolnikih s KLL (N=444).

Figure 1: Frequency of recurrent chromosomal aberrations in Slovenian CLL patients (N=444).

Citogenetsko ugodne bolnike intenzivno zdravimo s kombinacijo zdravil R-FC (rituksimab, fludarabin, ciklofosamid), citogenetsko neugodne pa z visokimi odmerki glukokortikoidov in alemtuzumabom ali ofatumumabom s ciljem doseči popolno remisijo bolezni pred APKMC.

Starejše bolnike, ki niso kandidati za intenzivno zdravljenje iz več razlogov, pa zdravimo s kombinacijami rituksimab-klorambucil, rituksimab-fludarabin ali rituksimab-bendamustin. Cilj zdravljenja je zmanjšati tumorsko maso in odpraviti težave. Najpogostejši načini zdravljenja so navedeni v Preglednici 1.

## 6.1 ALKILIRAJOČI CITOSTATIKI

Eno prvih zdravil, ki se je začelo uporabljati za zdravljenje KLL, je **klorambucil**. Še vedno se večinoma uporablja le za zdravljenje starejših bolnikov s pridruženimi kroničnimi boleznimi. Učinkovitost zdravljenja povečamo z dodatkom rituksimaba. Pri bolnikih s hudimi anemijami in/ali trombocitopenijami zdravljenju s klorambucilom dodamo še metilprednizolon (20, 21, 24).

Citotoksično delovanje zdravila **ciklofosamid** temelji na delovanju njegovih alkilirajočih presnovkov na DNA. Zdravilo ima tudi močno imunosupresivno delovanje.

**Bendamustin** je alkilirajoči citostatik, ki se uporablja pri bolnikih, kjer fludarabin ni učinkovit. Neposredno pred bendamustinom je zaradi preobčutljivostnih reakcij potrebno dati premedikacijo z analgetikom/antipiretikom, glukokortikosteroidom in antihistaminikom. Ciklofosamid je visoko do srednje, bendamustin pa srednje emetogen citostatik, zato se ob njuni uporabi priporoča uporaba antiemetika (23, 24).

## 6.2 NUKLEOTIDNI ANALOGI

Pri zdravljenju KLL se iz te skupine večinoma uporablja le **fludarabin**, ki je analog adenzina in deluje tako, da zavira sintezo DNA preko zaviranja encima RNA-polimeraza II na zmanjšano sintezo beljakovin. (23, 24).

## 6.3 GLUKOKORTIKOSTEROIDI

Zdravilo **metilprednizolon** se lahko uporablja kot samostojno zdravilo v velikih odmerkih pri zdravljenju odporne oblike KLL ali v nizkih odmerkih v kombinaciji z nekaterimi citostatiki (20, 22).

## 6.4. MONOKLONSKA PROTITELESA

Zdravilo **alemtuzumab** je humanizirano monoklonsko protitelo, ki se veže na antigen CD52, ki je izražen predvsem na površini normalnih in malignih limfocitov B in T v krvi in povzroči lizo teh celic. Z njim zdravimo bolnike, kjer zdravljenje s fludarabinom ni učinkovito ter bolnike z del(17p), katerih preživetje je najkrajše. Zdravljenje z alemtuzumabom zaradi hudih neželenih pojavov in pogostih okužb potrebuje skrben nadzor in dodatno preventivno dajanje protimikrobnih zdravil (23, 24).

**Rituksimab** je himerno mišje/humano monoklonsko protitelo, ki se specifično veže na transmembranski antigen CD20, ki se nahaja tako na nekaterih običajnih limfocitih, kot na malignih celicah B. Vezava rituksimaba na antigen CD20 na limfocitih B povzroči celično apoptozo (23, 24).

**Ofatumumab** je humano monoklonsko protitelo, ki se specifično veže na poseben epitop, ki zajema tako male kot velike zunajcelične zanke molekule CD20 na običajnih limfocitih B ter malignih celicah B. Vezava ofatumumaba povzroči od komplemента odvisno citotoksičnost in posledično lizo tumorskih celic ter od protiteles odvisno citotoksičnost na celicah, ki izražajo CD20. Novejše raziskave kažejo, da deluje tudi na celice odporne na rituksimab (23, 24).

## 6.5 PRESADITEV KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC

**Alogenična PKMC**, ki velja za verjetno edino možnost ozdravitve, se uporablja večinoma le pri mlajših bolnikih z izrazito neugodnimi napovednimi dejavniki (del(17p)) ali neodzivnostjo na večino zdravil za KLL, saj je smrtnost zaradi neželenih učinkov zdravljenja precejšnja. **Nemieloblastivna alogenična PKMC**, pri kateri se uporabljajo nižji odmerki citostatikov, je manj toksična in zato primerna tudi za malo starejše bolnike. Z **avtologno PKMC** lahko povečamo delež uspešnosti zdravljenja in podaljšamo čas do ponovnega nastopa težav, vendar klinične raziskave do sedaj niso potrdile prednosti avtologne PKMC pred standardnim zdravljenjem (20, 22).

## 6.6 NOVOSTI PRI ZDRAVLJENJU KLL

Za zdravljenje KLL še vedno potekajo številne klinične raziskave z uporabo novih, predvsem tarčnih zdravil. Neka-

Preglednica 1: Nekatero najpogostejše uporabljene sheme za zdravljenje kronične limfatične levkemije (20, 22, 23).

Table 1: Some of the most commonly used schemes for the treatment of chronic lymphocytic leukemia (20, 22, 23).

Zdravljenje	Način dajanja	Odmerek zdravila	Število krogov zdravljenja	Interval med zaporednimi krogi zdravljenja
klorambucil (metilprednizolon)	p.o.	10 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-5.dan (32 mg m <sup>2</sup> ; 1.-5.dan)	4-8	28 dni
fludarabin	p.o.	40 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-5.dan	4-8	28 dni
fludarabin	i.v.	25 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-5.dan	4-8	28 dni
fludarabin ciklofosamid	p.o.	40 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-5.dan 150 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-5.dan	4-8	28 dni
fludarabin ciklofosamid	i.v.	25 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-3.dan 250 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-3.dan	4-8	28 dni
fludarabin ciklofosamid rituksimab	i.v.	25 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-3.dan 250 mg/m <sup>2</sup> ; 1.-3.dan 375-500 mg/m <sup>2</sup> ; 1.dan	4-8	28 dni
metilprednizolon	i.v.	1000-1500 mg/dan, 1.-3.dan	3-4	21 dni
alemtuzumab	s.c.	30 mg; trikrat tedensko	≤ 36	2-3 dni
bendamustin	i.v.	100 mg/m <sup>2</sup> ; 1., 2.dan	6	28 dni
ofatumumab	i.v.	300 mg/dan 2000 mg/dan	1 2-12	7 dni (1.-8. krog) 28 dni (9.-12. krog)

tera izmed njih so humano monoklonsko protitelo obinutuzumab (GA101) ter selektivna zaviralca kinaz, idelalisib (GS-1101) in ibrutinib. Zdravila preizkušajo kot samostojno zdravljenje ter v različnih kombinacijah z drugimi zdravili za zdravljenje KLL. Rezultati so zelo vzpodbudni, vendar zdravila še niso na voljo za redno uporabo.

## 7 VLOGA FARMACEVTA PRI ZDRAVLJENJU KLL

V bolnišnični lekarni se farmacevti vključujemo v zdravljenje KLL na več ravneh. Za bolnike pripravimo individualizirane pripravke s parenteralno citostatično učinkovino ali monoklonskim protitelesom, preverimo ustreznost odmerjanja teh zdravil in pregledamo skladnost teh zdravil z zdravili, ki jih bolnik prejema zaradi zdravljenja drugih bolezni (26).

Glavna naloga farmacevtov v javnih lekarnah je predvsem ustrezno svetovanje bolnikom o pravilnem rokovanju z nevarnimi učinkovinami, med katere sodijo citostatiki. Bolnika je potrebno opozoriti tudi na možnost pojava neželenih učinkov zdravljenja s citostatiki in biološkimi zdravili. Največja težava so predvsem okužbe zaradi nevtropenije, zato

morajo biti pozorni na njihove znake. Pozorni morajo biti tudi na znake krvavitve, ki so lahko posledica trombocitopenije (krvavitev v kožo in dlesni, iz telesnih votlin). Če bolnik toži, da se počuti zelo slaboten, ga napotimo k zdravniku, saj je pri bolniku lahko prišlo do anemije. Farmacevt v javni lekarni lahko tudi preveri ustreznost odmerjanja peroralnih zdravil ter možne medsebojne vplive med zdravili.

## 8 NEŽELENI UČINKI IN MEDSEBOJNI VPLIVI ZDRAVIL

### 8.1 NEŽELENI UČINKI CITOSTATIČNIH ZDRAVIL

Neželeni učinki pri zdravljenju s citostatiki so posledica citotoksičnega delovanja na maligne in tudi zdrave hitro delče se celice. Najpogostejši neželeni učinki citostatikov, ki se uporabljajo za zdravljenje KLL, so mielosupresija, težave s kožo ter prebavili, sindrom razpada tumorskih celic, motnje reprodukcije, kronična utrujenost ter nastanek sekun-

darnih malignih obolenj. Neželeni učinki, ki se odražajo na prebavilih so slabost in bruhanje, izguba apetita, mukozitis, driska ter zaprtje. Posledica zaviralnega delovanja citostatikov na kostni mozeg so okvare v dozorevanju krvnih celic, kar lahko povzroči anemijo, trombocitopenijo in nevtropenijo, ki se navadno pojavi med 7. in 14. dnevom po začetku zdravljenja. Zaradi zavrtega imunskega sistema so pogoste tudi hude in številne okužbe (bakterijske, virusne, glivične). Neželeni učinki citostatikov na kožo so zelo različni in sicer od izpuščajev, alopecije, do zelo resnih, kot sta Stevens-Johnsonov sindrom in toksična epidermalna nekroliza. Večina citostatičnih učinkovin ima mutageno, kancerogeno, genotoksično in teratogeno delovanje, zato je z zdravlili potrebno rokovati previdno ter v času zdravljenja in nekaj mesecev po njem uporabljati učinkovito zaščito pred zanositvijo. Matere, ki prejemajo citostatična zdravila, ne smejo dojeti (21, 23, 25, 27).

Poleg splošnih neželenih učinkov se pri zdravljenju s citostatičnimi zdravili za zdravljenje KLL kažejo še nekateri drugi neželeni učinki. **Klorambucil** lahko povzroča tudi okvare jeter, bolezni živčevja, sterilni cistitis, intersticijsko pljučno fibrozo ter pljučnico. Pri zdravljenju s **ciklofosfamidom** so pogoste okvare sečil, preobčutljivostne reakcije, povišana telesna temperatura, jetrne okvare, konvulzije, bolezni dihal, zadrževanje tekočin v telesu, srčno-žilni zapleti ter težave z očmi. Neželeni učinki zdravila **bendamustin** so lahko tudi preobčutljivostne reakcije (tudi resne anafilaktične), srčno-žilni zapleti, bolečine v mišicah, mrzlica, povišana telesna temperatura in zadrževanje tekočine v telesu. Med zdravljenjem s **fludarabinom** lahko pride do življenjsko pomembnih avtoimunskih pojavov in sicer do avtoimunske hemolitične anemije, avtoimunske trombocitopenije in trombocitopenične purpure. Ostali pogosti neželeni učinki, ki se pojavljajo pri zdravljenju s fludarabinom so še kašelj, edemi ter okvare nevrološkega sistema (periferna nevropatija, encefalopatija) (23, 25, 27).

## 8.2 NEŽELENI UČINKI MONOKLONSKIH PROTITELES

Najpogostejši neželeni učinki, ki se lahko pojavijo med zdravljenjem z **monoklonskimi protitelesi** so infuzijske reakcije, ki se kažejo s hipotenzijo, hipertenzijo, mrzlico, tahikardijo, kašljem, zvišano telesno temperaturo, glavobolom, težkim dihanjem, kožnim izpuščajem, utrujenostjo in lahko tudi z anafilaktično reakcijo. Te reakcije se lahko pojavijo kljub premedikaciji z analgetiki/antipiretiki, antihista-

miniki in kortikosteroidi. V večji meri se pojavljajo pri začetnih odmerkih in redkeje pri podkožni aplikaciji. Ob zdravljenju z monoklonskimi protitelesi se pogosto pojavlja tudi nevtropenija in številne okužbe, ki se lahko pojavijo tudi do enega leta po končanem zdravljenju. Pogoste so tudi okužbe in reaktivacija virusa hepatitis B pri rituksimabu in ofatumumabu, tuberkuloze pri rituksimabu ter citomegalovirusa pri alemtuzumabu. Zdravljenje spremljajo tudi gastrointestinalne težave, kot so slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu, zapora črevesja ter srčno-žilni zapleti (aritmija, tromboembolizmi). Pri zdravljenju z monoklonskimi protitelesi lahko pride tudi do sindroma razpada tumorskih celic (22, 23, 25, 27).

## 8.3 MEDSEBOJNI VPLIVI MED ZDRAVILI

Nekatera citostatična in biološka zdravila za zdravljenje KLL (klorambucil, ciklofosfamid, fludarabin, alemtuzumab, rituksimab, ofatumumab) ter metilprednizolon, ki imajo tudi imunosupresivno delovanje in vstopajo v kar nekaj interakcij z zdravili. Ta zdravila lahko povečajo toksične učinke ter zmanjšajo terapevtsko delovanje živih cepiv in tudi povečajo verjetnost sistemskih virusnih okužb. Povečajo lahko delovanje in neželene učinke, predvsem zaviranje kostnega mozga in povečane možnosti okužb pri sočasnem zdravljenju s klopazinom, leflunomidom ter natalizumabom. Imunosupresivi lahko zmanjšajo terapevtski učinek BCG, zato je njuna sočasna uporaba kontraindicirana. Pripravki s škrlatnim ameriškim slamnikom, lahko zaradi svojega delovanja zavirajo terapevtsko delovanje imunosupresivov, zato se njihova sočasna uporaba odsvetuje. Sočasna topikalna uporaba takrolimusa ali pimekrolimusa z imunosupresivi lahko privede do večjega pojava neželenih/toksičnih učinkov imunosupresivov (23, 24, 25).

Pri sočasni uporabi sukcinilholina in ciklofosfamida lahko pride do povečane koncentracije tega mišičnega relaksanta, zato je potrebno odmerek tega zdravila pri bolniku, ki je prejel ciklofosfamid v roku 10 dni ali prej, zmanjšati ali pa uporabiti drugo terapijo. Sočasna terapija z zdraviloma tiotepa ter etanercept lahko povzroči povečane koncentracije ciklofosfamida v serumu ter večje možnosti za njegove toksične učinke.

Sočasna uporaba klopazina in bendamustina je kontraindicirana, saj lahko bendamustin poveča možnost neželenih in toksičnih učinkov klopazina, predvsem pojav agranulocitoze. Bendamustin se daje previdno v primeru sočasne

aplikacije inhibitorjev (ciprofloksacin, norfloksacin, metoksalen, primakin) ali induktorjev CYP1A2 (fenobarbital, karbamazepin, primidon, rifampicin). Inhibitorji tega encima lahko povzročijo povišanje serumske koncentracije bendamustina ter večje izražanje neželenih učinkov. Njegovi induktorji pa, zaradi nezadostne koncentracije bendamustina v serumu, lahko povzročijo zmanjšanje njegovega delovanja, zaradi še nejasnega mehanizma delovanja, pa lahko tudi povečajo njegove neželene učinke.

Sočasni uporabi monoklonskih protiteles ter antihipertenzivov se je bolje izogibati, saj le-ti lahko povečajo hipotenzivni učinek monoklonskih protiteles (23, 24, 25, 28).

## 9 SPREMLJAJOČE IN PODPORNO ZDRAVLJENJE, KI JO LAHKO PREJME BOLNIK V LEKARNI

Za zdravljenje in preprečevanje slabosti in bruhanja pri zdravljenju KLL povzročene s citostatiki uporabljamo antiemetike, predvsem antagoniste serotoninских receptorjev (ondansetron, granisetron, tropisetron, palonosetron), v kombinaciji z glukokortikoidi in antagonistom nevrokininskih receptorjev, zdravilom aprepitant (27).

Za zdravljenje driske se uporablja loperamid, peroralna rehidracijska tekočina ter svetuje ustrezna prehrana. V primeru, da po nekaj dneh ni izboljšanja ali se pojavi še telesna temperatura, bolnika napotimo k zdravniku. Pri zaprtju svetujemo blaga odvajala ter pomen pravilne prehrane (27, 29).

Klinično pomembne anemije, zdravimo z rekombinantnimi eritropoetini, epoetini, ki jim je pogosto potrebno dodajati še železove pripravke. Okužbe preprečujemo in zdravimo z različnimi antibiotiki ter antimikotiki (npr. sulfametoksazol / trimetoprim za preprečevanje okužbe s *P. jiroveci*, azoli za preprečevanje aspergiloz). Pri nekaterih bolnikih z nevtropenijo je upravičena tudi uporaba ravnih dejavnikov za granulocite (filgrastim), ki skrajšajo trajanje nevtropenij. Za zdravljenje avtoimunske trombocitopenije in hemolitične anemije se uporablja metilprednizolon (20, 22, 23, 27).

Bolniki z rakom, zaradi narave bolezni ter samega zdravljenja, pogosto potrebujejo tudi zdravljenje z anksiolitiki in an-

tidepresivi. Različne bolečine, povezane s samo boleznijo ali neželenimi učinki zdravil, zdravimo s paracetamolom, nesteroidnimi antirevmatiki ali opiodi. Zadrževanje vode v telesu zdravimo z diuretiki (27, 29).

Glede na kronično jemanje zdravil za zdravljenje raka je pomembno, da tako bolnik, zdravnik, negovalno osebje in tudi farmacevt neželene učinke poznamo, da jih lahko preprečimo ter v primeru pojava pravočasno ugotovimo in pravilno zdravimo (27).

## 10 SKLEPI

Tako kot za uspešno zdravljenje vsake novotvorbe ali celo popolno ozdravitev, je tudi pri KLL potrebno upoštevati vse vidike sodelujočih strokovnjakov od natančne diagnoze do prognoze in zdravljenja. Način zdravljenja izberemo po predhodnem pogovoru z bolnikom, ki mu predstavimo prednosti in slabosti posameznih različno intenzivnih načinov zdravljenja in skupaj izberemo najboljši način. Vse opisano pa samo po sebi ne zagotavlja uspešnega zdravljenja, če skupaj s farmaceutom ne upoštevamo odmerjanja, priprave, načina dajanja, premedikacije in medsebojnih vplivov novo predpisanih zdravil za zdravljenje KLL z zdravili, ki jih bolnik že prejema, saj je povprečno star več kot 70 let in ima več kroničnih bolezni. Ne nazadnje, s centralno pripravo zdravil v bolnišnični lekarni, predvsem parenteralnih raztopin, lahko zmanjšamo stroške učinkovitega intenzivnega zdravljenja tudi do 30 %.

## 11 LITERATURA

1. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343(26):1910-6.
2. Watson L, Wyld P, Catovsky D. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur J Haematol* 2008; 81(4): 253-8.
3. Dighiero G, Hamblin T.J. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; 371 (9617): 1017-29.
4. Brandt L. Environmental factors and leukaemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1985; 2(1):7-10.
5. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333(16): 1052-7.







# NEINVAZIVNO PREDPORODNO PRESEJANJE ZA ANEUPLOIDIJE NA OSNOVI PROSTE PLODOVE DNA - PREGLED RAZVOJA IN PRIPOROČILA ZA KLINIČNO PRAKSO

## NON-INVASIVE PRENATAL SCREENING FOR ANEUPLOI- DIES USING CELL-FREE FETAL DNA – PROGRESS AND RECOMMENDATIONS FOR CLINICAL PRACTICE

AVTORJI / AUTHORS:

Darija Strah, dr. med, specialistka  
ginekologije in porodništva<sup>1</sup>  
Janez Bernik, univ. dipl. bth<sup>2</sup>

*Ustanova*

<sup>1</sup> Diagnostični center Strah, Slamnikarska 3a, 1230 Ljubljana

<sup>2</sup> Doktorski študent Biomedicine, Univerza v Ljubljani,  
Kongresni trg 12, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: darija@strah.si

### POVZETEK

Odkritje in potrditev prisotnosti proste plodove DNA v krvnem obtoku nosečnice v letu 1997 predstavlja odločilen mejnik za raziskave na področju neinvazivnega predporodnega testiranja (NIPT). Delež proste plodove DNA v povprečju znaša 10-20 %, čeprav močno variira in je odvisen od različnih dejavnikov. V preteklem desetletju so razvili različne metode za ugotavljanje kromosomskih aneuploidij na osnovi proste plodove DNA. Kot najustreznejša, najbolj zanesljiva in tudi najpogosteje uporabljena se je uveljavila tako imenovana metoda masovnega paralelnega sekvenciranja. V kliničnih študijah se je pokazalo, da je metoda masovnega paralelnega sekvenciranja, vključno z njenimi variacijami, primerna za visoko zanesljivo presejanje najpogostejših kromosomskih aneuploidij v prvem trimesečju nosečnosti. Mnenja posameznih združenj so si podobna glede indikacij za NIPT, mnenja, kdo lahko svetuje pred in po testu, pa so si različna. Strokovnjaki so si edini, da NIPT trenutno predstavlja izjemno zanesljiv *presejalni* test, pri katerem mora biti vsak pozitiven izvid potrjen z eno od klasičnih oblik invazivne *diagnostične* preiskave.

### KLJUČNE BESEDE:

*neinvazivno predporodno presejanje, prosta plodova DNA, Downov sindrom, aneuploidije, masovno paralelno sekvenciranje*

### POVZETEK

The discovery of cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma in 1997 represents a key breakthrough to the further progress that has been made in the field of non-invasive prenatal testing (NIPT). On average 10-20 % of cffDNA is present in the maternal plasma; however this proportion varies strongly and it depends on different factors. In the last decade, several methods for detecting chromosomal aneuploidies in early pregnancy have been developed and amongst them massively parallel sequencing (MPS) has been indicated as the most accurate, appropriate and the most commonly used. Clinical studies have shown that the method of massive parallel sequencing together with its variations is suitable for highly reliable screening of the most common chromosomal aneuploidies in the



first trimester of pregnancy. Several medical associations published their opinion and guidelines for the implementation of NIPT in clinical practice. Their statements are consistent in the aspect of the indications when NIPT should be advised to the pregnant women while there are some uncertainties regarding pre- and post- testing counseling to be answered. The experts agree that NIPT method represents highly accurate advanced *screening* test, therefore in case of positive results patients should undergo one of the conventional invasive *diagnostic* procedures.

**KEY WORDS:**

*non-invasive prenatal testing, cell-free fetal DNA, Down syndrome, aneuploidies, massively parallel sequencing*

## 1 UVOD

Presejalni testi za odkrivanje aneuploidij v prvem trimesečju nosečnosti predstavljajo uveljavljeno klinično prakso predporodne oskrbe nosečnic že skoraj 20 let (1). Testi upoštevajo različne kriterije: starost nosečnice, ultrazvočno merjenje debeline nihalne svetline (NS) ploda in drugih kromosomskih označevalcev v prvem trimesečju ter stanje hormonskih označevalcev v prvem in drugem trimesečju. Napovedano visoko tveganje za aneuploidije potrdimo ali ovržemo bodisi z biopsijo horionskih resic v prvem ali amniocentezo v drugem trimesečju. Glede na mednarodne podatke, s presejanjem nihalne svetline in dvojnega hormonskega testa odkrijemo približno 90 % plodov z Downovim sindromom (DS), ob lažno pozitivni stopnji (FPR) 5 % (2). Primerljive rezultate dosegamo tudi v Sloveniji, kjer z merjenjem debeline NS in oceno nosne kosti odkrijemo 85 % plodov z DS ob 2,8 % FPR (3). Vendar glede na prevalenco DS še vedno večina nosečnic opravi invazivno diagnostično preiskavo, pri kateri tvega neželjeno prekinitve nosečnosti, izkaže pa se, da gre za lažno pozitivni izvid presejalnega testa (3). Zato strokovna javnost spremlja razvoj novih metod neinvazivnega predporodnega testiranja (NIPT) za aneuploidije na osnovi proste plodove DNA.

## 2 PROSTA PLODOVA DNA

Kljub začetni nejasnosti glede natančnega celičnega izvora proste plodove DNA v krvnem obtoku nosečnice (4) je nedavna raziskava pokazala, da slednja izhaja iz citotrofoblasta, notranje plasti trofoblasta (5). Iz venske krvi nosečnice jo je moč izolirati od 7. gestacijskega tedna dalje (6). Njen delež znaša v povprečju 10-20 %, čeprav močno variira od 3-40 % (7,8,9), kar je odvisno od različnih dejavnikov, kot je gestacijski teden, telesna teža nosečnice in morebitni zapleti v nosečnosti (7,10,11). Njen razpolovni čas znaša od 4-30 minut, zato je v nekaj urah po porodu v krvnem obtoku matere ne zaznamo več (12). Fragmenti proste celične DNA ploda so zelo majhni, povprečne dolžine 150 baznih parov (bp) in le redko presegajo 300 bp (13,14). Možnosti neinvazivnega odkrivanja aneuploidij pri plodu so bile prvič nakazane leta 1969, ko so potrdili prisotnost plodovih celic v krvnem obtoku nosečnic (15). Leta 1997 so z analizo kromosoma Y ugotovili, da se v krvnem obtoku nosečnic poleg plodovih celic nahaja tudi prosta plodova DNA (6), ki je v primerjavi s plodovimi celicami prisotna v veliko večji meri in je zato primernejša za analizo.

Po letu 1997 je prišlo do opaznega porasta raziskav na področju določanja krvne skupine, spola in prisotnosti ali odsotnosti antigena D (RhD+ ali RhD-) ploda s pomočjo proste plodove DNA (16, 20). Možnost predporodnega odkrivanja aneuploidij je zaživela z razvojem sekvenciranja nove generacije.

## 3 PREGLED METOD PREDPORODNEGA DOLOČANJA KROMOSOMSKIH ANEUPLOIDIJ NA OSNOVI PROSTE PLODOVE DNA

Prosto DNA iz krvne plazme matere izoliramo s klasičnimi metodami izolacije DNA. Nadaljnja analiza z izoliranim dednim materialom je odvisna od posamezne metode določevanja prisotnosti kromosomskih aneuploidij. Do danes so bile na področju neinvazivnih tehnik predporodnega odkrivanja aneuploidij uporabljene različne metode, ki bodisi te-

meljijo na analizi DNA, vključno z imunoprecipitacijo metiliranih regij DNA (MeDiP) (21), profilom polimorfizmov posameznega nukleotida kromosoma 21 (22), bodisi na analizi RNA, vključno z analizo polimorfizma posameznega nukleotida (SNP) v genu *PLAC4* z masno spektrometrijo (23) oziroma analizo več SNP-jev znotraj gena *PLAC4* prek reverzne transkripcije in od ligacije odvisnega hkratnega pomnoževanja sond (RT-MLPA) (24). Prav tako so bile uporabljene metode, ki temeljijo na analizi profila serumskih proteinskih označevalcev (25). Z razvojem sekvenciranja nove generacije in posledičnim padcem cene sekvenciranja se je kot najustreznejša, najbolj zanesljiva in tudi najpogostejše uporabljena uveljavila tako imenovana metoda masovnega paralelnega sekvenciranja (angl. *massively parallel sequencing*, MPS).

### 3.1 MASOVNO PARALELNO SEKVENCIRANJE

S to metodo lahko danes rutinsko določimo zaporedje milijonov ali celo milijard fragmentov DNA (26). Določanje zaporedja poteka istočasno ob klonsko namnoženih fragmentih DNA v mnogih prostorsko ločenih celicah. Rezultat takega postopka so številna zaporedja krajših fragmentov DNA, pri čemer se isti fragment DNA prebere večkrat. To poimenujemo s terminom »pokritost«. Zaznavanje stopnje pokritosti je osnovni princip določanja kromosomskih nepravilnosti (27, 28). V primeru trisomije 21 gre pričakovati, da bo pokritost fragmentov, ki izhajajo iz kromosoma 21, v primerjavi s fragmenti iz ostalih kromosomov, statistično značilno večja. Povedano drugače, kadar fragment DNA iz kromosoma 21 preberemo statistično značilno večkrat kot običajno, lahko z izredno veliko zanesljivostjo določimo prisotnost trisomije 21 kromosoma. Enak princip velja tudi za ostale aneuploidije.

### 3.2 NAKLJUČNA IN TARČNA METODA MPS

Pri metodi MPS ločimo dva osnovna pristopa. Najpogostejše uporabljen pristop je tako imenovana naključna (angl. *shotgun*) metoda MPS (MPSS), ki je podrobneje opisana v raziskavi Ehricha s sod. (27). Fragmente DNA sekvenciramo po celotnem genomu, torej naključno, ne glede na to, kateremu kromosomu fragmenti DNA pripadajo. Sparks s sod. opiše razvoj tarčne (angl. *target*) metode MPS, ki so jo poimenovali DANSR (angl. *digital analysis of selected regions*) (29). Njena prednost je, da z njo analiziramo le frag-

mente DNA, ki pripadajo izbranim kromosomom. Posledično je moč doseči večjo pokritost posameznega fragmenta, oziroma lahko istočasno analiziramo več vzorcev. Različica tarčne metode MPS je analiza le polimorfnihih mest genoma (30), kar jim je omogočilo, da so pridobili ogromen nabor fragmentov DNA, ki so pripadali le plodu.

## 4 PREGLED RAZISKAV

Do danes so bile z uporabo metode sekvenciranja DNA izvedene številne raziskave, v katerih so z metodo MPS analizirali uspešnost odkrivanja različnih oblik aneuploidij, najpogostejše trisomij kromosoma 21 (T21) (9,27,31), T21 in T18 (32,33,34,35,36,37), T18 in T13 (38), T13 (39), analizo vseh treh trisomij (40), oziroma so se osredotočali tako na analizo najpogostejših treh trisomij, kot tudi na analizo aneuploidij spolnih kromosomov (30,41,42,43). Večina raziskav je bila izvedenih na vzorcu nosečnic z visokim tveganjem (9,27,30-43). Nicolaides in sod. so kot prvi potrdili primernost metode tudi na vzorcu nosečnic z nizkim tveganjem (44).

Značilnosti najpomembnejših raziskav na področju neinvazivnega odkrivanja aneuploidij so podrobneje predstavljene v Tabeli 1.

## 5 SEDANJE OMEJITVE NIPT PRI DOLOČEVANJU ANEUPLOIDIJ

Tehnike NIPT v sedanjem razponu lahko z visoko občutljivostjo in majhno stopnjo lažno pozitivnih izvidov določijo T21, T18 in T13, vendar ne smemo pozabiti, da je večina študij opravljena na vzorcu nosečnic z visokim tveganjem in enoplodno nosečnostjo. Prav tako je malo podatkov glede odkrivanja mozaičnih oblik trisomij, čeprav je potencial in visoka specifičnost metode NIPT tudi tu že pokazana (42).

Trenutne metode NIPT omogočajo uspešno analizo vzorcev, če je delež proste plodove DNA v krvnem obtoku matere višji od 4 %. V nedavno objavljeni študiji so pokazali, da ima pomemben vpliv na delež proste plodove DNA teža



Tabela 1: Pregled najpomembnejših raziskav na področju predporodnega odkrivanja aneuploidij na osnovi proste plodove DNA in tehnologije MPS  
 Table 1: List of important publications in the field of non-invasive prenatal testing, based on free-fetal DNA and MPS technology.

Raziskava	Vzorec in število nosečnic	Aneuploidija	Občutljivost	Specifičnost
Ehrich, 2011 (27)	Nosečnice z visokim tveganjem, 490 nosečnic	T21	100 %	99,7 %
Chiu, 2011 (9)	Nosečnice z visokim tveganjem, 753 nosečnic	T21	100 %	97,9 %
Palomaki, 2011(31)	Nosečnice z visokim tveganjem, 4664 nosečnic	T21	98,5 %	99,8 %
Palomaki, 2012 (38)	Nosečnice z visokim tveganjem, 4664 nosečnic	T18 T13	100 % 91,7 %	99,7 % 99,1 %
Bianchi, 2012(42)	Nosečnice z visokim tveganjem, 2882 nosečnic	T21 T18 T13 monosomija X	100 % 97,2 % 78,6 % 93,8 %	100 % 100 % 100 % 99,8 %
Sparks, 2012 (37)	Nosečnice z visokim tveganjem, 250 nosečnic	T21 T18	100 % 100 %	99,2 % 99,2 %
Ashoor, 2012 (35)	Nosečnice z visokim tveganjem, 300 nosečnic	T21 T18	100 % 98 %	100 % 100 %
Nicolaidis, 2012 (44)	Nosečnice z nizkim tveganjem, 2049 nosečnic	T21 T18	100 % 100 %	*FPR: < 1 % *FPR: < 1 %
Dan, 2012 (36)	Nosečnice z visokim tveganjem, 11 105 nosečnic	T21 in T18	100 %	99,96 %
Jiang, 2012 (41)	Nosečnice z visokim tveganjem, 903 nosečnice	T21, T18 in T13 X, XXY, XYY	100 % 85,7 %	99,9 % 99,9 %
Ashoor, 2013 (39)	Nosečnice z visokim tveganjem, 2002 nosečnic	T13	80 %	99,95 %
Norton, 2012 (60)	Nosečnice z visokim tveganjem, 3228 nosečnic	T21 T18	100 % 97,4 %	FPR: 0,03 % FPR: 0,07 %

\*FPR: lažno-pozitivni izvid (raziskava je bila izvedena na vzorcu nosečnic z nizkim tveganjem); T21: trisomija 21; T18: trisomija 18; T13: trisomija 13

nosečnice. V povprečju pri nosečnicah s težo 60 kg lahko pričakujemo manj kot 1 % primerov z deležem proste plodove DNA, manjšim od 4 %. Pri nosečnicah s težo 160 kg pa lahko pričakujemo, da bo delež proste plodove DNA prenizek v več kot 50 % primerov (11).

Do sedaj imamo nekaj podatkov o testiranju NIPT pri dvoali večplodni nosečnosti, še posebno pri diskordantnosti. Canick s sod. poroča, da so uspešno odkrili 7 nosečnosti s T21 in eno nosečnost s T13, prav tako so pravilno določili vseh 17 evplodnih dvoplodnih nosečnosti (45). Teoretično lahko prisotnost DNA evplodnega zarodka razredči aneuploidno DNA prizadetega zarodka v vzorcu in tako oteži oceno pravega stanja. Testiranje ni primerno za nepravilne oblike dvoplodne nosečnosti kot je npr. vanishing twin.

## 6 PRIPOROČILA ZA IZVAJANJE NIPT

V zadnjem času se v vseh strokovnih člankih, v katerih so objavljeni izsledki kliničnih študij, uporabljajo izrazi: NIPT (angl. *non-invasive prenatal testing*), NIPS (angl. *non-invasive prenatal screening*) in NIDT (angl. *non-invasive DNA testing*). NIPT je torej izjemno zanesljiv presejalni test, v strokovni literaturi imenovan »*advanced screening test*« za odkrivanje trisomije 21., 18. in 13. kromosoma (46). Zato moramo vsak pozitiven izvid NIPT potrditi z eno od klasičnih oblik invazivne diagnostične metode (44).

Združenje ACOG (*The American College of Obstetricians and Gynecologists, The Society for Maternal - Fetal Medicine Publications Committee*) je decembra 2012 sprejelo priporočila za presejanje z NIPT (47). V mnenju so navedene indikacije, ob katerih je priporočljivo testiranje NIPT:

- starost matere 35 let in več ob porodu,
- ultrazvočni izvid ploda, ki nakazuje možnost aneuploidije,
- anamneza predhodne nosečnosti z dokazano aneuploidijo,
- pozitivni presejalni test bodisi zgodnje morfologije z nuhalno svetlino in/ali dvojnega hormonskega testa, sekvenčnega, integriranega presejalnega testa ali četvernega hormonskega testa,
- uravnotežena Robertsonova translokacija pri starših s povišanim tveganjem za trisomijo 21 ali 13.

V okviru predtestnega svetovanja je treba poudariti, da gre za izredno zanesljiv presejalni test in da je namenjen le odkrivanju najpogostejših treh kromosomskih trisomij. Pozitivnemu testu NIPT sledi priporočilo za genetski posvet in invazivna diagnostična preiskava. Negativni izvid ne izključi nosečnosti s kasnejšimi možnimi zapleti. Test ni zamenjava za še vedno najbolj zanesljivi metodi kot sta amniocenteza in biopsija horionskih resic. Strokovnjaki so si enotni, da ostane sprejeto presejanje za DS v obsegu, kot ga izvajamo do sedaj (47). V primeru ultrazvočno vidnih sumljivih znakov za aneuploidije naj se kot prva ponudi klasična invazivna diagnostika.

Podobno mnenje je sprejelo tudi združenje ISPD (*International Society of Prenatal Diagnosis*). Testiranje NIPT je ob ustreznem genetskem svetovanju primeren presejalni test za nosečnice s povišanim tveganjem za trisomijo 21. Pozitiven rezultat testiranja NIPT je potrebno potrditi z invazivno diagnostično preiskavo (48).

Združenje NSGC (*National Society of Genetic Counselors*) prav tako ugotavlja, da je NIPT testiranje primerno za nosečnice s povišanim tveganjem za kromosomske nepravilnosti. Testiranje NIPT naj bo nosečnicam ponujeno v sklopu privolitve po pojasnilu in z ustreznim genetskim svetovanjem. V primeru pozitivnega testa mora biti pacientka napotena na potrditev z invazivno diagnostično metodo (49).

V Sloveniji priporočil za izvajanje NIPT kot uradno sprejetih smernic še nimamo.

Mnenja posameznih združenj so si podobna glede indikacij za NIPT, mnenja, kdo lahko svetuje pred testom in po njem, so si različna. ACOG priporoča predtestno svetovanje, ki ne sme potekati kot del rutinskega vodenja nosečnosti, temveč kot posvet s podpisano privolitvijo po pojasnilu, opravi ga ginekolog porodničar (47). V primeru pozitivnega NIPT se nosečnico napoti na genetsko svetovanje. NSGC priporoča posvet genetskega svetovalca (49) pred in po testu. EuroGentest Network of Excellence definira pojem strokovnjaka s primernimi znanji, ki sme opraviti genetski posvet. Običajno je to specialist genetski svetovalec (klinični genetik, genetski svetovalec ali medicinska sestra z znanji genetskega svetovanja). Svetovanje lahko opravlja tudi strokovnjak druge stroke z osvojenim znanjem svetovanja, kot je npr. specialist ginekologije in porodništva v primerih predtestnega svetovanja pri tveganju za aneuploidije zaradi povečane starosti nosečnice (50). Do NIPT so se opredelili tudi v Ameriškem združenju za medicinsko genetiko in genomiko (ACMG – *American College of Medical Genetics and Genomics*). Njihovo stališče je, da naj predtestno in potestno svetovanje opravlja ginekolog porodničar (*prenatal/obstetric care provider*), usposobljen strokovnjak (*prenatal designee*) oziroma genetski svetovalec. Predtestno svetovanje naj bo sestavni del NIPT, medtem ko naj se potestno svetovanje opravi v primeru pozitivnega NIPT (51).

## 7 POMEN NIPT ZA SEDANJE KLINIČNO DELO

V vsem času od uvedbe presejanja za kromosomske nepravilnosti je bilo odkrivanje DS največjega pomena. Presejanje na sprejeti način se je izkazalo uspešno tudi za odkrivanje drugih klinično pomembnih aneuploidij pri nosečnicah z visokim tveganjem; z invazivnimi preiskavami je bilo odkritih tudi veliko klinično pomembnih mikroduplicacij ali delecij in z njimi povezanih genetskih sindromov (2). Pomemben pomislek, kadar razmišljamo o uvedbi NIPT kot primarnem presejanju za DS, je, da ne bomo odkrili vrste drugih klinično pomembnih nepravilnosti, kot je npr. Turnerjev sindrom ali triploidija. Veliko kromosomskih nepravilnosti se pri uveljavljenem presejanju ultrazvočne zgodnje morfologije z merjenjem nuhalne svetline in dvojnimi hormonskimi testom v 11. do 14. tednu nosečnosti kaže podobno, bodisi s povečano nuhalno svetlino ali podobnimi biokemičnimi lastnostmi (2). Zato je priporočeno, da ostane



ultrazvočno presejanje v 1. trimesečju z dvojnimi hormonskim testom v obsegu, kot ga izvajamo sedaj. NIPT pravzaprav predstavlja komplementarno metodo dosedanjemu presejanju in nikakor ne zamenjave. Ne smemo pozabiti, da je ultrazvočno presejanje tudi diagnostično za nekatere večje strukturne nepravilnosti ploda in nekatere od njih, kot je npr. holoprosencefalija, moramo dodatno ovrednotiti z invazivno preiskavo (39). Invazivna diagnostična preiskava se priporoči tudi, kadar je NIPT za trisomijo 21 in 18 negativen, ultrazvočno pa zasledimo povišano NS ploda in strukturne defekte, omfalokelo, holoprosencefalijo, razširjen sečni mehur ali diafragmalno hernijo (2, 52, 53, 54, 55, 56, 57).

Uveljavljeno presejanje za DS v 1. trimesečju poleg ocene zgodnje morfologije in stanja ploda napoveduje tudi možnost nastanka preeklampsije in oceno prezgodnjega poroda (58). Vsekakor je cena NIPT v primerjavi z ustaljenim presejanjem zelo omejujoč dejavnik, vendar pričakujejo, da se bodo stroški za preiskavo v nekaj letih znatno znižali (46). Drugi omejujoči dejavnik je čas, ki ga potrebujemo, da dobimo izvid. Rezultati NIPT so trenutno znani v 10 dneh. Zaradi tehničnih omejitev pri približno 5 % analiz izvida ni mogoče zagotoviti in lahko se zgodi, da nosečnica ultrazvočnega presejanja v 1. trimesečju ne uspe več opraviti (59). Pogoja za vključitev NIPT v ustaljene presejalne predporodne programe sta zmanjšanje stroškov preiskave z izpopolnjevanjem tarčnih metod MPS in skrajšanje časa, potrebnega za pridobitev izvida (59).

## 8 ZAKLJUČEK

Rezultati do sedaj izvedenih raziskav s področja NIPT na osnovi proste plodove DNA so izjemno obetavni. Največ dokazov o primernosti metode imamo za določevanje trisomije 21, vedno več podatkov je na voljo tudi za trisomiji kromosomov 13 in 18, kjer zaradi majhne prevalence slednjih obstaja nekoliko več omejitev. Novejše raziskave vključujejo vedno večje skupine preiskovank, kjer opisane vrednosti glede občutljivosti in specifičnosti predstavljajo nov mejnik presejanja za tri najpogostejše aneuploidije z visoko stopnjo odkrivanja.

Zaenkrat se ne smemo prenahtati, saj NIPT ne izkazuje diagnostičnih vrednosti. Ne moremo ga enačiti z diagnosti-

čnim testom in kot tak NIPT ne predstavlja zamenjave za ustaljeni diagnostični preiskavi kot sta amniocenteza in biopsija horionskih resic. Predstavljal naj bi novo komplementarno metodo presejanja ob ustaljenem načinu odkrivanja aneuploidij v 1. trimesečju nosečnosti na osnovi ultrazvočne in hormonske preiskave. Gre za izjemno zanesljiv presejalni test, katerega pozitivne rezultate je potrebno potrditi z eno od invazivnih preiskav.

## 9 LITERATURA

1. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, et al. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in the first trimester of pregnancy. *BMJ*. 1992; 304: 867-869.
2. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011; 1: 7-15.
3. Strah DM, Pohar Perme M, Geršak K. Ultrazvočno presejanje za kromosomopatije v prvem trimesečju nosečnosti pri 13049 naključno izbranih nosečnicah. *Med Razgl*. 2011; 50: S 2: 87-92.
4. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*. 2005; 11 (1): 59-67.
5. Faas BH, de Ligt J, Janssen I, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12 Suppl 1: S19-26.
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350: 485-487.
7. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 768-775.
8. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008; 54: 1664-1672.
9. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011; 11, 342: c7401.
10. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem*. 2002; 48 (2): 353-354.
11. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-3 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013; 41 (1): 26-32.
12. Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999; 64 (1): 218-224.
13. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*. 2004; 50: 1002-1011.

14. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem.* 2010; 56: 1279–1286.
15. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet.* 1969; 1: 1119–1122.
16. Honda H, Miharū N, Ohashi Y, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum. Genet.* 2002; 110: 75–79.
17. Lo, YM, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl JMed.* 1998; 339: 1734–1738.
18. Finning, K, Martin P, Summers J, et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008; 336: 816–818.
19. Daniels G, Finning K, Martin P, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009; 29: 101–107.
20. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol.* 2006; 13: 53–57.
21. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsalki E, et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med.* 2011; 17 (4): 510–513.
22. Ghanta S, Mitchell ME, Ames M, et al. Non-invasive prenatal detection of trisomy 21 using tandem single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2010; 5 (10): e13184.
23. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007; 13 (2): 218–223.
24. Deng YH, Yin AH, He Q, et al Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49 (4): 641–646.
25. Narasimhan K, Lin SL, Tong T, et al. Maternal serum protein profile and immune response protein subunits as markers for non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21, 18, and 13. *Prenat Diagn.* 2013; 33 (3): 223–231.
26. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods.* 2008; 5 (1): 16–18.
27. Ehrich M, Decui C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204 (3): 205.e1–11.
28. Strah D, Prosta plodova DNK in klinična uporabnost pri določevanju kromosomskih aneuploidij pri plodu. *ISIS.* 2013; 22 (1): 61–64.
29. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (1): 3–9.
30. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (13): 1233–41.
31. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011; 13 (11): 913–920.
32. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011 11; 342: c7401.
33. Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem.* 2011; 57 (7): 1042–1049.
34. Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207 (2): 137.e1–8.
35. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, et al. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206 (4): 322.e1–5.
36. Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (13): 1225–1232.
37. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, et al. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206 (4): 319.e1–9.
38. Palomaki GE, Decui C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med.* 2012; 14 (3): 296–305.
39. Ashoor G, Syngelaki A, Wang E, Struble C, Oliphant A, Song K, Nicolaides KH. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41 (1):21–5.
40. Lau TK, Chen F, Pan X, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25 (8): 1370–374.
41. Jiang F, Ren J, Chen F, et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC Med Genomics.* 2012; 5: 57.
42. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012; 119 (5): 890–901.
43. Liang D, Lv W, Wang H, et al. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn.* 2013. doi: 10.1002/pd.4033.
44. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207 (5): 374.e1–6.
45. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (8): 730–734.
46. Chitty LS, Hill M, White H, Wright D, Morris S. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy– ready for prime time? *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206: 269–275.
47. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 545. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2012; 120: 1532–1534.
48. Benn P, Borrell A, Cuckle H, et al. Prenatal Detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (1): 1–2.
49. Devers PL, Cronister A, Ormond KE, et al. Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis:the Position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2013.



50. EuroGentest Network of Excellence. Recommendations for genetic counselling related to genetic testing. <http://www.eurogentest.org/>. dostopano: 21-3-2013
51. The Noninvasive Prenatal Screening Work Group of the American College of Medical Genetics and Genomics, et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genet Med*. 2013. doi: 10.1038/gim.2013.29.
52. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191: 45-67.
53. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, et al. UK multicenter project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation: Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet*. 1998; 352: 343-346.
54. Kagan KO, Avgidou K, Molina FS, et al. Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. *Obstet Gynecol*. 2006; 107: 6-10.
55. Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, et al. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. *BMJ*. 2006; 332 :452-455.
56. Pergament E, Alamillo C, Sak K, et al. Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn*. 2011; 31: 307-310.
57. Leung TY, Vogel I, Lau TK, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011; 38: 314-319.
58. Nicolaides KH. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn*. 2011; 31: 3-6.
59. Hui L. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: charting the course from clinical validity to clinical utility. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013; 41: 2-6.
60. Norton ME, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 207(2): 137.e1-137.e8





# ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE MALARIJE

## ANTIMALARIAL THERAPY AND PROPHYLAXIS

AVTORJA / AUTHORS:

Katarina Starkl, mag. farm.<sup>1</sup>,  
doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: janez.mravljak@ffa.uni-lj.si

## 1 PROBLEMATIKA

Malaria se je razvila v naših primatskih prednikih in se potem prenesla na ljudi, ki so jo s selitvami širili po vsem svetu. Prvi opisi malarije oz. zanjo značilne ponavljajoče se zvišane temperature segajo na Kitajsko v 3. tisočletje pred našim štetjem (1). Do sredine 19. stoletja se je malaria razširila na raven endemije, kar pomeni, da je na območjih z malarijo živelo približno 90 odstotkov svetovnega prebivalstva. Pred drugo svetovno vojno je bila malaria zaradi odkritja načina prenosa okužbe, nadzora komarjev in širšega dostopa do zdravljenja izkoreninjena iz večjega dela Zahodne Evrope (2). Kljub napredku pri omejevanju bolezni je še danes svetovni zdravstveni problem (3). Leta 2010 je bilo po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije 216

### POVZETEK

Kljub temu da je bilo veliko truda vloženega v izkoreninjenje malarije, ostaja svetovni zdravstveni problem, predvsem v državah tretjega sveta. Malarijo povzroča parazitska pražival iz rodu *Plasmodium*, prenaša pa se s pikom okuženega komarja iz rodu *Anopheles*. Do danes je bilo razvitih veliko antimalarikov, vendar je vsak od njih zaradi odpornosti na nekaterih geografskih območjih neučinkovit. S problemom malarije se spoprijemajo tudi turisti, ki se odpravljajo na območja, kjer se pojavlja malaria. Kemoprofilaksa je še vedno edini način preventive, saj učinkovitega cepiva proti malariji še ni.

### KLJUČNE BESEDE:

*malaria, antimalarik, oksidativni stres*

### POVZETEK

Even though there has been a lot of effort put into elimination of malaria, it still remains a world health issue, especially in the third world countries. Malaria is caused by parasites protozoa of the genus *Plasmodium* and is transmitted by the bite of infected mosquito of the genus *Anopheles*. Many antimalarials have been found to treat malaria but all of them eventually have lost their efficacy in particular geographic regions due to resistance. Tourists visiting areas with malaria are also facing the risk of infection. Chemoprophylaxis is still the only prevention since there is no vaccine against malaria yet.

### KEY WORDS:

*malaria, antimalarial, oxidative stress*

milijonov primerov okužb z malarijo (81 % v afriški regiji) in 655 tisoč smrtnih žrtev (91 % v afriški regiji). Glavne žrtve so otroci, mlajši od petih let (86 %). Incidenca malarije se je od leta 2000 znižala za 17 %, smrtnost zaradi nje pa za 26 % (4). Svetovni cilj v boju z malarijo do konca leta 2015 je 75-odstotno znižanje incidence v primerjavi z letom 2000 in popolno izničenje števila smrtnih žrtev (4). Leta 2012 je bila približno polovica držav, kjer se malaria še pojavlja, na dobri poti, da bi dosegla ta cilj (5). Glavna ovira pri boju z malarijo je prilagodljivost plazmodija, ki hitro razvije odpornost na protiparazitne učinkovine (6).

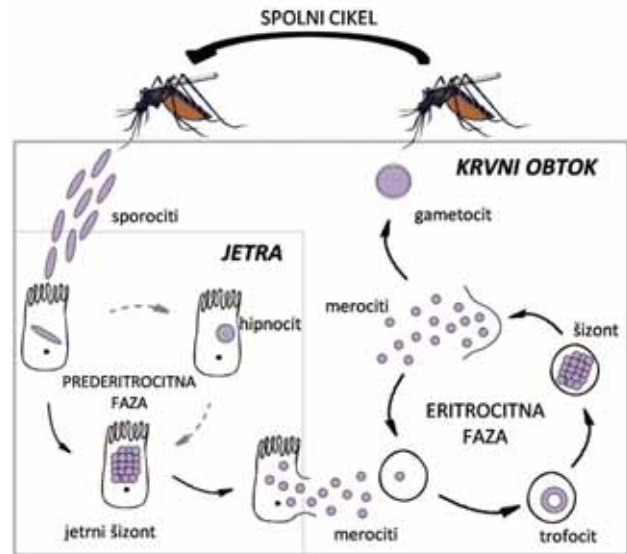


Zaradi nezanimanja farmacevtske industrije so večino dosedanjih antimalarikov (klorokin, meflokin, primakin, halo-fantrin) razvili vladni in vojaški raziskovalni programi, nekatere so odkrili pri naključnem iskanju učinkovitosti naravnih produktov (artemisinin), ali pa so antimalarijsko aktivnost odkrili kot novo indikacijo pri že registriranih zdravilih (atovakon, tetraciklini, sulfonamidi) (7). Zadnje čase so se v iskanje novih antimalarikov aktivno vključile nekatere organizacije, najpomembnejša med njimi je *Medicines for malaria venture*, in farmacevtska podjetja, kar spodbuja razvoj novih antimalarikov. Idealno novo zdravilo proti malariji bi bilo varno, odporno proti multirezistentnim sevom, primerno za otroke in nosečnice, zaradi boljše vodljivosti pacientov pa učinkovito v čim manj odmerkih in stalo bi manj kot 1 dolar na zdravljenje, da bi bilo tudi cenovno dostopno ljudem na najbolj ogroženih območjih (8).

## 2 POTEK OKUŽBE

### 2.1 RAZVOJNI KROG PLAZMODIJA

Razvojni krog plazmodija (**Slika 1**) je sestavljen iz spolnega cikla, ki poteka v samici komarja vrste *Anopheles*, in nespolnega cikla, ki poteka v ljudeh. Življenjski krogi različnih plazmodijevih vrst so si podobni. S pikom okuženega komarja se v krvni obtok sprostijo sporociti. V pol ure izginejo iz obtoka in vstopijo v jetrne celice, kjer poteče prederitrocitna faza razvoja. Po inkubacijski dobi (od 10 do 14 dni) se jetrne celice razpočijo, merociti se sprostijo nazaj v krvni obtok, kjer okužijo rdeče krvničke in tvorijo parazite, imenovane trofociti. Trofociti se pospešeno množijo v rdečih krvničkih, kar zajema eritrocitno fazo razvoja, ki je odgovorna za klinične znake malarije. Po mitotski delitvi trofocitnega jedra nastane šizont, ki se naprej množi, da nastanejo številni merociti. Ko se eritrocit razpoči, se merociti sprostijo v krvni obtok, kjer lahko okužijo nove eritrocite, in tako se ponovi eritrocitna faza. Iz nekaterih merocitov se razvijejo moški in ženski gametociti, ki okužijo komarja; s tem se plazmodijev razvojni krog sklene, malarija pa širi. Sporociti nekaterih plazmodijevih vrst (*P. vivax* in *P. ovale*) lahko v hepatocitih tvorijo spečo obliko parazita (hipnocit), ki povzroča ponovne izbruhe še leta po prvotni okužbi (9).



Slika 1: Razvojni krog plazmodija (10)

Figure 1: The life cycle of *Plasmodium* parasite (10).

### 2.2 OBLIKE MALARIJE

Malarijo pri človeku povzročajo štiri vrste plazmodija, in sicer *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* (9). Malarija, ki jo povzroča *P. falciparum*, je najbolj smrtonosna in prevladuje v Afriki. Malarija *P. vivax* je manj nevarna, a bolj razširjena. Ostali dve vrsti sta redki (5).

Simptomi malarije so zvišana telesna temperatura, mrzlica, glavobol, čezmerno potenje, vrtoglavica, slabost, ponavljajoče se bruhanje, splošne konvulzije in v hudih oblikah tudi koma (9, 11). Pojavijo se od 7 do 9 dni po okužbi. Najnevarnejša okužba je okužba s *P. falciparum* (9), ki povzroči visoko stopnjo parazitemije, težko anemijo, cerebralno malarijo, celo odpoved ledvic, pljučni edem in smrt. Vzrok za večjo patogenost *P. falciparum* je njegova sposobnost okužbe rdečih krvničk vseh starosti, kar povzroči velik porast parazitozne in hudo anemijo. Ostale vrste lahko okužijo le nezrele eritrocite (retikulocite) ali stare eritrocite, ki jim membrana začne slabeti in so tik pred iztekom 120-dnevnega življenjskega obdobja. Ti eritrociti skupaj predstavljajo le manjši delež vseh rdečih krvničk. *P. falciparum* povzroči tudi zlepljenje okuženih eritrocitov in prilepljanje teh skupkov na endotelijske celice malih žil, kar ustavi pretok krvi. Poleg tega sproži tudi škodljiv čezmeren imunski odziv. *P. vivax*, *P. ovale* in *P. malariae* povzročajo nizko stopnjo parazitemije, blago anemijo, redko tudi razpočenje vranice in nefrotski sindrom (12).

Za malarijo značilni ponavljajoči se izbruhi zvišane telesne temperature so rezultat sočasnega razpočenja eritrocitov, iz katerih se sprostijo meroцитi. Ponovni izbruhi bolezni se pojavljajo pri tistih oblikah plazmodija, ki imajo izveneritrocitni cikel, saj lahko speča oblika parazita v jetrih po nekaj tednih ali mesecih povzroči ponovno okužbo. *P. falciparum* ne povzroča ponovnih izbruhov, njegov eritrocitni cikel pa traja 48 ur, zato povzroča t. i. maligno terciarno malarijo; *terciarno* zato, ker se zvišana telesna temperatura ponovi vsak tretji dan, ter *maligno*, ker je najnevarnejša oblika malarije in lahko smrtna. *P. vivax* povzroča benigno terciarno malarijo; *benigno*, ker je milejša oblika in redko smrtna. Ponovni izbruhi bolezni se lahko pojavijo še leta po prvotni okužbi, tako kot tudi po okužbi s *P. ovale*. Slednji povzroča redko obliko terciarne malarije. *P. malariae* ima 72-urni cikel in povzroča kvartarno malarijo, brez ponovnih izbruhov (9).

## 3 REGISTRIRANI ANTIMALARIKI

Klorokin je zdravilo prvega izbora za zdravljenje malarije, ki jo povzroča *P. vivax*. V območjih, kjer se je pojavila odpornost na klorokin, se ta oblika malarije zdravi z artemisinin-skim kombiniranim zdravljenjem (ACT – angl. *artemisinin combination therapy*), v katerem je poleg artemisinina ali njegovega derivata še antimalarik z drugim mehanizmom delovanja. Od leta 2001 je ACT tudi zdravilo prvega izbora za zdravljenje nezapletene malarije, ki jo povzroča *P. falciparum*. Najpogostejši kombinaciji ACT-ja sta artesunat-meflokin, ki je manj učinkovit v območjih z rezistenco na meflokin, in artemeter-lumefantrin (6).

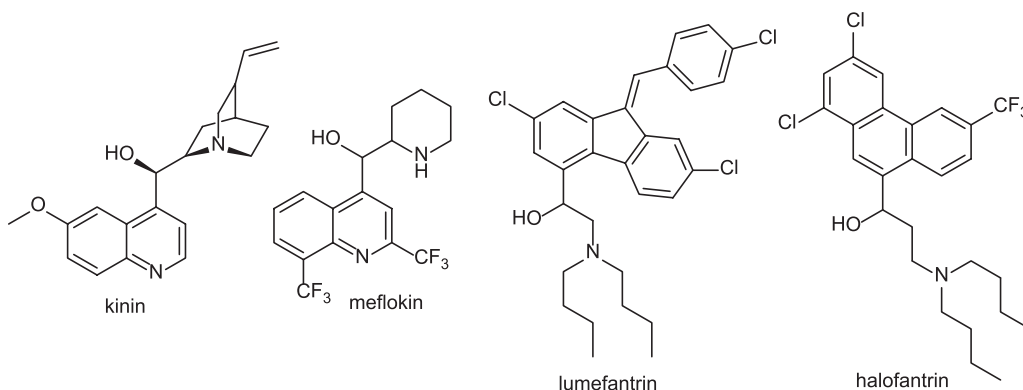
### 3.1 KINOLINI

Plazmodij sintetizira proteine iz aminokislin, ki jih pridobi z razgradnjo gostiteljevega hemoglobina v parazitovi prehrambni vakuoli. Pri tem se sprosti hem, ki bi v parazitu lahko sprožil oksidativni stres, saj ga zaradi odsotnosti encima hem oksigenaze ne more razgraditi po enakem principu kot vretenčarji. V parazitu se je zato razvila alternativna pot razstrupljanja hema, ki vodi do nastanka kristalov, imenovanih hemozoin (malarijski pigment). Kinolini povzročijo smrt parazita, tako da preprečijo kristalizacijo hema v hemozoin (7).

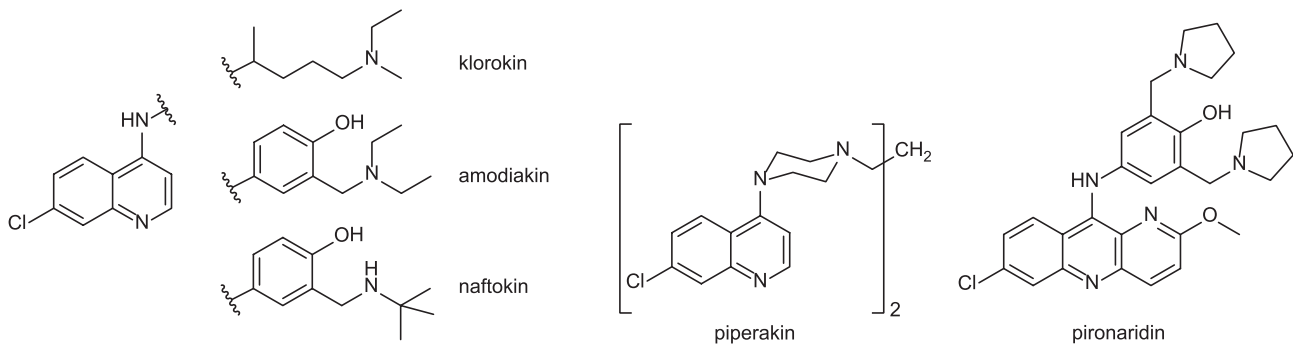
Med kinolini z delovanjem na proces razstrupljanja hema sta dve strukturno različni skupini: aminoalkoholi (kinin, meflokin, halofantrin, lumefantrin) (**Slika 2**) in 4-aminokinolini (klorokin, amodiakin, piperakin, naftokin, pironaridin) (**Slika 3**). Kinin, prvi znani antimalarik, so začeli uporabljati v 17. stoletju (13). V tridesetih letih 20. stoletja ga je zamenjal klorokin, ki je najpomembnejši in najpogosteje uporabljeni antimalarik do danes (14). S širitvijo odpornosti na klorokin se je začel pospešen razvoj novih aminokinolinov in aminoalkoholov, npr. meflokin, amodiakin, halofantrin. Danes je odpornost na posamezne kinoline zelo razširjena (7). 8-Aminokinolini (**Slika 4**), med njimi je najpomembnejši primakin, delujejo na izveneritrocitne oblike plazmodija (gametociti *P. falciparum*, hipnociti *P. vivax*) (7).

### 3.2 ARTEMISININ IN NJEGOVI DERIVATI

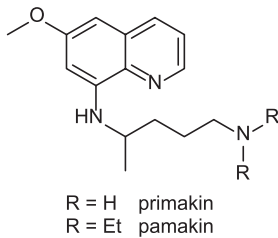
V kitajski tradicionalni medicini se enoletni pelin (*Artemisia annua*) uporablja že več kot dve tisočletji, sprva za zdravljenje hemoroidov, od 16. stoletja dalje pa tudi kot antipiretik. V sedemdesetih letih 20. stoletja so odkrili njegovo antimalarijsko aktivnost. Za delovanje je odgovoren arte-



**Slika 2:** Strukture aminoalkoholov: kinin, meflokin, lumefantrin in halofantrin  
**Figure 2:** Structures of aminoalcohols: quinine, mefloquine, lumefantrine and halofantrine.



Slika 3: Strukture 4-aminokinolinov: klorokin, amodiakin, naftokin, piperakin in pironaridin  
 Figure 3: Structures of 4-aminoquinolines: chloroquine, amodiaquine, napthoquine, piperaqueine and pyronaridine.



Slika 4: Strukturi 8-aminokinolinov: primakin in pamakin  
 Figure 4: Structures of 8-aminoquinolines: primaquine and pamaquine.

misinin z endoperoksidno skupino, ki po bioaktivaciji z železovimi ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ) tvori ogljikove radikale. Drugače kot druge oksidativne učinkovine, ki povzročajo neselektivne poškodbe v celicah, naj bi artemisinini radikali delovali bolj specifično. Raziskovalci predvidevajo, da naj bi alkilirali proteine, ne pa tudi DNA (7).

Slaba topnost artemisinina tako v hidrofilnih kot v fiziološko sprejemljivih lipofilnih topilih je omogočala le peroralno aplikacijo, ki je sicer praktična, vendar pogosto ni izvedljiva pri bolnikih s hudo obliko malarije. To je spodbudilo razvoj polsinteznih derivatov, ki se lahko dajejo peroralno, parenteralno ali rektalno. Najpomembnejši med njimi so lipofilni (artemeter, arteeter) in hidrofilni (artesunat in artelinska kislina) derivati ter dihidroartemisinin, ki je tudi razgradni produkt prej omenjenih derivatov (Slika 5) (15). V primerjavi z artemisininom imata artemeter in arteeter močnejšo antimalarijsko aktivnost in boljše farmakokinetične lastnosti. Artemeter je najširše uporabljen derivat v zdravljenju, in sicer v obliki intramuskularnih injekcij ali kot kombinacija z lumefantrinom. Artesunat in artelinska kislina se uporabljata intravensko pri bolnikih s hujšimi oblikami malarije. Artesunat je navadno kombiniran z meflokinom ali amodiakinom. Artelinska kislina ima med vsemi derivati najboljši farmakokinetični profil (najdaljši razpolovni čas in doseg največje

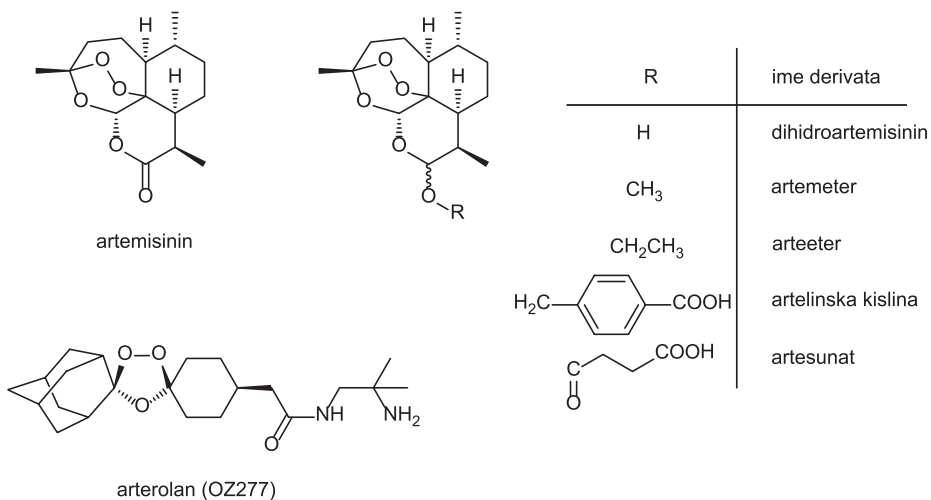
plazemske koncentracije) (16). Nizka kupna moč ljudi na malarijsko najbolj ogroženih območjih je spodbudila razvoj antimalarijskih sinteznih peroksidov z enostavnejšo strukturo, saj je njihovo pridobivanje občutno cenejše od izolacije artemisinina iz naravnih virov. Kombinacija arterolana in piperakina je uspešno sklenila tretjo fazo kliničnih raziskav, tako da je prva kombinacija s sinteznim peroksidom. Leta 2012 je bila odobrena v Indiji (17).

### 3.3 ZAVIRALCI SINTEZE FOLATA

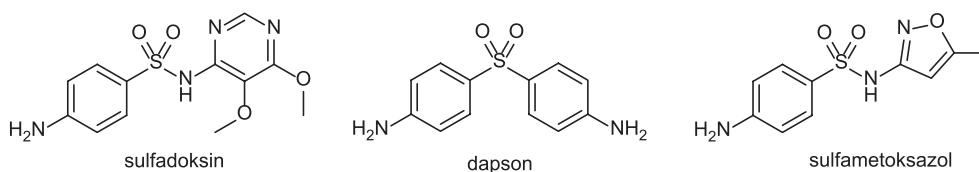
V nasprotju s človekom so plazmodiji in ostali mikroorganizmi sposobni *de novo* sinteze folatnih kofaktorjev, ki sodelujejo v procesih prenosa enot C1. Sintezo tetrahidrofolata prek dihidropteroata in dihidrofolata katalizirajo za parazite specifični encimi, med drugim tudi dihidropteroat sintetaza (DHPS) in dihidrofolat reduktaza (DHFR), ki sta že uveljavljeni antibakterijski in antimalarijski tarči. Za doseg sinergističnega delovanja in manjše možnosti pojava odpornosti se pri zdravljenju malarije uporablja kombinacija zaviralca DHPS (sulfadoksin, dapson) (Slika 6) z zaviralcem DHFR (pirimetamin, progvanil in klorprogvanil) (Slika 7). Najpogostejša je kombinacija sulfadoksina in pirimetamina, vendar pa je odpornost vedno pogostejša (18). V tretji fazi kliničnih raziskav je tudi kombinacija sulfametoksazola in trimetoprima, ki naj bi bila preventivna zaščita (17).

### 3.4 INHIBICIJA TRANSPORTA ELEKTRONOV

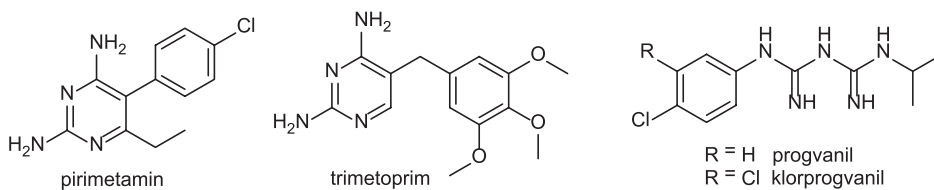
Atovakon (Slika 8) je eden prvih antimalarikov, ki so bili razviti z racionalnim načrtovanjem zdravil (19). Po strukturi je analog koencima Q v dihalni verigi in poleg izgube mito-



Slika 5: Strukture artemisina, njegovih derivatov in arterolana  
Figure 5: Structures of artemisinin, artemisinin derivatives and arterolane.



Slika 6: Strukture zaviralcev dihidropteroat sintetaze  
Figure 6: Structures of dihydropteroat synthetase inhibitors.

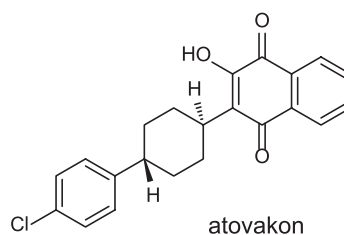


Slika 7: Strukture zaviralcev dihidrofolat reduktaze  
Figure 7: Structures of dihydrofolate reductase inhibitors.

hondrijskega membranskega potenciala zavira tudi biosintezo pirimidina. Zaradi hitrega pojava odpornosti na atovakon ga je treba kombinirati z drugimi antimalariki (20).

### 3.5 TARČE ANTIBIOTIKOV V PLAZMODIJU

Tudi nekateri antibiotiki imajo antimalarijsko delovanje. Tetraciklini (doksiciklin, tetraciklin), ki se uporabljajo samostojno za preventivno zdravljenje malarije, se pri zdravljenju kombinirajo z drugim hitreje delujočim antimalarikom. Rifampicin in makrolidi (azitromicin, klindamicin) pa so trenutno še v kombinacijah z drugimi antimalariki v procesu kliničnih preskušanj (21). Pri bakterijah omenjeni antibiotiki zavirajo sintezo proteinov v ribosomih – rifampicin prepreči njihovo transkripcijo, makrolidi in tetraciklini pa njihovo translacijo (13). Pri plazmodiju prav tako zavirajo sintezo pro-



Slika 8: Struktura atovakona  
Figure 8: Structure of atovaquone.

teinov, molekulske tarče pa so še predmet raziskovanja, saj so plazmodijske ribosomske komponente, ki so podobne bakterijskim, v apikoplastu in mitohondriju (22).

## 4 ANTIMALARIKI V KLINIČNIH RAZISKAVAH

Metilensko modro (**Slika 9**) je bila prva sintezna spojina, ki se je začela uporabljati v zdravljenju. Dandanes jo še vedno uporabljamo za zdravljenje methemoglobinemije. Do odkritja klorokina se je metilensko modro uporabljalo tudi v antimalarijskem zdravljenju. Po odkritju klorokina je njegova uporaba pri zdravljenju malarije povsem zamrla, verjetno tudi zaradi neškodljivega, a motečega stranskega učinka – zelenega oz. modrega seča in modrikastih beločnic. Metilensko modro doseže antimalarijsko delovanje s kompetitivno inhibicijo parazitov glutation reduktaze, kar povzroči oksidativni stres (23). V drugi fazi kliničnih raziskav so pokazali, da ima kombinacija metilensko modrega z artesunatom učinkovito gametocidno delovanje (24). Kombinacije metilensko modrega s kinolini ali artemisinini so tako še predmet kliničnih raziskav (25).

Velik uspeh med potencialnimi novimi antimalariki so spiroindoloni, ki so v samo petih letih prešli od odkritja do kliničnih raziskav. Antimalarijsko delovanje dosežejo z znižanjem sinteze proteinov. Najobetavnejši kandidat, NITD609 (**Slika 9**), je trenutno v drugi fazi kliničnih raziskav (17).

Sevuparin je heparinski derivat z manjšo antikoagulacijsko aktivnostjo, ki preprečuje zlepljenje eritrocitov in s tem hudo obliko malarije (26). Trenutno je kombinacija sevuparin-ato-

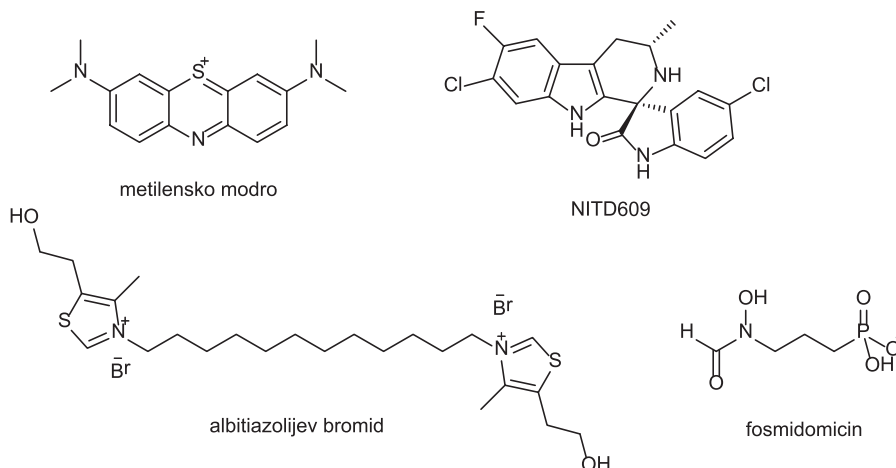
vakon-progvanil v drugi fazi kliničnih raziskav (clinicaltrials.gov: NCT01442168).

Albitiazolijev bromid (SAR97276) (**Slika 9**) je bistiazolna sol, ki je mimetik holina in zavira plazmodijevo *de novo* biosintezo fosfatidilholina na več stopnjah. Albitiazolijev bromid je v obliki intramuskularnih injekcij v drugi fazi kliničnih raziskav (27).

Fosmidomicin (**Slika 9**) je encimski zaviralec v od mevalonata neodvisni izoprenoidni biosintezi v apikoplastu (28). Kombinacija fosmidomicina s klindamicinom je prav tako v drugi fazi kliničnih raziskav (29).

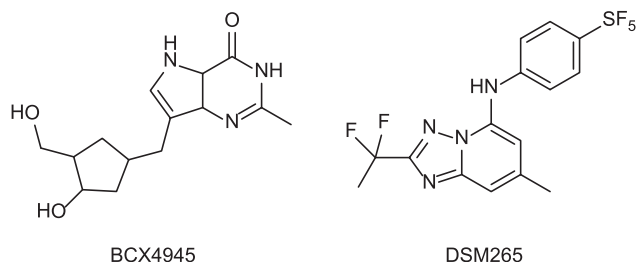
## 5 POTENCIALNE NOVE TARČE V PLAZMODIJEVIH METABOLNIH POTEH

V plazmodijevih metabolnih procesih je udeleženih veliko encimov in njihovih substratov, prenašalcev, receptorjev, ostalih proteinov in lipidov, ki so možne tarče za nove antimalarijske učinkovine. Razvoj učinkovine, ki deluje na drugo tarčo v metabolni poti, za katero že imamo antimalarik, lahko s kombiniranim zdravljenjem povzroči sinergistično delovanje in počasnejši razvoj odpornosti. Za iskanje novih antimalarikov so primernejše tarče, ki niso homologne s pripadajočimi človeškimi, saj omogočajo boljšo selektivnost.



**Slika 9:** Strukture antimalarijskih učinkovin, ki so v kliničnih raziskavah

**Figure 9:** Structures of the antimalarial agents that are in clinical trials.



*Slika 10: Strukturi antimalarijskih učinkovin, ki sta v predkliničnih raziskavah*

*Figure 10: Structures of the antimalarial agents that are in preclinical trials.*

Kljub temu da se v zdravljenju že vrsto let uporabljajo anti-malariki, ki zavirajo razstrupljanje hemoglobina, ponuja proces razgradnje hemoglobina še več drugih potencialnih tarč. Zaviranje peptidaz, ki razgrajujejo globinske verige do aminokislin, iz katerih potem parazit sintetizira svoje proteine, povzroči smrt parazita (30).

Potencialne nove tarče je mogoče iskati v biosintezni poteh dušikovih spojin. Predklinične raziskave je uspešno sklenil imunicilin (BCX4945) (**Slika 10**), ki inhibira parazitovo sintezo purinskih baz in posledično onemogoča nastanek kofaktorjev, nukleotidov in nukleinskih kislin (31). Tudi triazolopirimidinski derivat DSM265 (**Slika 10**), encimski zaviralec v *de novo* pirimidinski biosintezi, je v fazi predkliničnih raziskav. Parazit je za inhibicijo te poti posebej občutljiv, saj za razliko od ostalih organizmov nima alternativne poti za pridobivanje pirimidinskih nukleozidov (32).

Proteinske kinaze so zadnje čase glavna tarča pri iskanju novih učinkovin. Za več kot 10 različnih plazmodijevih proteinskih kinaz so pokazali, da so bistvene v procesih vseh parazitovih razvojnih stadijev in da z inhibitorji lahko povzročimo smrt parazita (33).

## 6 PREVENTIVNO ZDRAVLJENJE

Države z visoko verjetnostjo okužbe so tudi turistično zanimive, saj jih letno obišče približno 125 milijonov turistov, med katerimi se jih z malarijo okuži okrog 10.000. Turisti so izpostavljeni zvečanemu tveganju, saj nimajo razvite naravne odpornosti, pogosto po vrnitvi domov sledi pozna ali celo napačna diagnoza. V nevarnosti so predvsem no-

sečnice, otroci in ostareli. Zaradi širjenja odpornosti sta kemoprofilaksa in zdravljenje vedno bolj otežena (34). Pred odhodom na območje z malarijo je treba preveriti, katera kemoprofilaksa je ustrezna zaradi morebitne prisotnosti odpornosti; na primer z zemljevidom na spletni strani organizacije *Centres for Disease Control and Prevention* (CDC Malaria Map Application, <http://cdc-malaria.ncsa.uiuc.edu/>).

Najcenejša oblika kemoprofilakse je doksiciklin v dnevnem odmerku po 100 mg. Jemati ga je treba začeti dan ali dva pred prihodom na območje z malarijo in nadaljevati z dnevnimi odmerki še 4 tedne po odhodu. Doksiciklina ne smejo jemati otroci, nosečnice in doječe matere. Poleg tega povzroči še fotosenzitivnost, kar je lahko vzrok čezmernim sončnim opeklinam, če je posameznik izpostavljen sončni svetlobi (35).

Druga možnost je meflokin v odmerku po 250 mg enkrat na teden. Jemati ga je treba začeti najmanj en teden pred prihodom na območje z malarijo in nato še 4 tedne po odhodu z okuženega območja. Uporaba meflokina se odsvetuje med dojenjem in nosečnostjo, še posebno v prvem trimesečju. Uporaba meflokina je povezana s pogostimi neželenimi učinki, na primer psihiatrične motnje (nenormalne sanje, nespečnost, tesnoba, depresija), glavoboli, vrtoglavica in slabost (36).

Kemoprofilaksa z najmanj izrazitimi neželenimi učinki, a najvišjo ceno, je kombinacija atovakona (250 mg) in progvanila (100 mg). Odmerki so dnevni, jemati jih je treba začeti dan ali dva pred prihodom in nadaljevati še 7 dni po odhodu z območja z malarijo (37).

Antimalariki, ki se uporabljajo za kemoprofilakso, se v drugačnih režimih odmerjanja uporabljajo tudi za zdravljenje malarije. Če popotnik kljub kemoprofilaksi zbolí za malarijo, je potrebno zdravljenje z drugim antimalarikom kot za profilakso, na katerega se na tistem območju še ni razvila odpornost (34).

Malarijo lahko preprečimo tudi na nefarmakološke načine, in sicer z izogibanjem pikom komarjev, predvsem ponoči, ko so komarji najbolj aktivni. Zato je treba nositi obleko iz dovolj debelega materiala, ki pokrije čim večjo površino kože. Kožo, vsaj izpostavljene dele, je treba zaščititi z repelenti (najpogosteje se uporablja DEET, *N,N*-diethyl-3-methylbenzamid), ki jih je treba ob potenju nanašati na od 3 do 4 ure. Med spanjem je zaželeno tudi uporaba mrež proti



komarjem in hlapnih insekticidov ali insekticidnih pršil, ki jih pred spanjem razpršimo po sobi (34).

Med popotniki so znane tudi »naravne« metode za preprečevanje pikov komarjev. Prehranski nadomestki, npr. prehrana, bogata s česnom, in povečan vnos vitamina B<sub>1</sub>, so pri nekaterih popotnikih bolje sprejeti kot kemoprofilaksa, vendar za omenjeno žal ni nobenega dokaza, da bi bili učinkoviti. Kljub temu da naj bi vitamin B<sub>1</sub> učinkoval kot repelent, so raziskave te trditve zavrnille (38).

## 7 SKLEP

Odkar se je povečalo zanimanje za razvoj antimalarikov in posledično tudi financiranje, je dogajanje na tem področju zelo zanimivo. Medtem sta se izboljšala tudi poznavanje plazmodijskega genoma in razumevanje mehanizmov delovanja že uveljavljenih antimalarikov. To je olajšalo odkrivanje potencialnih (novih) tarč in učinkovin, ki bi delovale nanje. Trenutno so v predkliničnih in kliničnih raziskavah številne nove strukturno drugačne antimalarijske učinkovine z delovanjem na različne tarče, ki niso le strukturno podobni analogi že poznanih molekul po principu *tudi jaz* (angl. *me too*). To obeta zdravljenju malarije svetlo prihodnost, kar je precej redko mogoče trditi za bolezn, razširjene predvsem v najrevnejših predelih sveta.

## 8 LITERATURA

- Cox FEG. *History of Human Parasitology*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4): 595-612.
- Mendis K, et al. *From malaria control to eradication: The WHO perspective*. *Trop Med Int Health* 2009; 14(7): 802-809.
- Nájera JA, et al. *Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969)*. *PLoS Medicine* 2011; 8(1): e1000412.
- World Malaria Report 2011*. World Health Organization, 2011.
- World Malaria Report 2012*. World Health Organization, 2012.
- Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010*. World Health Organization, 2010.
- Rosenthal PJ. *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*. Humana Press, New Jersey, 2001.
- Fidock DA, et al. *Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening*. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(6): 509-520.
- Rang HP, Dale MM. *Rang and Dale's pharmacology*. 6. izdaja, Elsevier/Churchill Livingstone, Edinburgh, 2008.
- Hill AVS. *Vaccines against malaria*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*: 2011; 366: 2806-2814.
- Trampuz A, et al. *Clinical review: Severe malaria*. *Crit Care* 2003; 7(4): 315 - 323.
- Kumar V, et al. *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*. 8. izdaja, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2010.
- Foye WO, et al. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008.
- Bray PG, et al. *Quinolines and Artemisinin: Chemistry, Biology and History*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 295: 3-38.
- Golenser J, et al. *Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins*. *Int J Parasitol* 2006; 36(14): 1427-1441.
- Opsenica, et al. *Antimalarial peroxides*. *J Serb Chem Soc* 2009; 74(11): 1155-1193.
- Anthony MP, et al. *The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria*. *Malar J* 2012; 11:316.
- Yuthavong Y, et al. *Folate metabolism as a source of molecular targets for antimalarials*. *Future Microbiol* 2006; 1(1): 113-125.
- Müller IB and Hyde JE. *Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance*. *Future Microbiol* 2010; 5(12): 1857-1873.
- Kessl JJ, et al. *Cytochrome b Mutations That Modify the Ubiquinol-binding Pocket of the Cytochrome bc1 Complex and Confer Anti-malarial Drug Resistance in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2005; 280(17): 17142-17148.
- Avery MA, et al. *The Fight Against Drug-Resistant Malaria: Novel Plasmodial Targets and Antimalarial Drugs*. *Curr Med Chem* 2008; 15(2): 161-171.
- Goodman CD, et al. *The effects of anti-bacterials on the malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 152(2): 181-191.
- Buchholz K, et al. *Interactions of Methylene Blue with Human Disulfide Reductases and Their Orthologues from Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1): 183-191.
- Coulibaly B, et al. *Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial*. *PLoS One* 2009; 4(5): e5318-e5318.
- Zoungrana A, et al. *Safety and Efficacy of Methylene Blue Combined with Artesunate or Amodiaquine for Uncomplicated Falciparum Malaria: A Randomized Controlled Trial from Burkina Faso*. *PLoS ONE* 2008; 3(2): e1630.
- Leitgeb AM, et al. *Low anticoagulant heparin disrupts Plasmodium falciparum rosettes in fresh clinical isolates*. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(3): 390-396.
- Wein S, et al. *Transport and pharmacodynamics of albitiazolium, an antimalarial drug candidate*. *Br J Pharmacol* 2012; 166(8): 2263-2276.
- Jomaa H, et al. *Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs*. *Science* 1999; 285(5433): 1573-1576.
- Bormann S, et al. *Fosmidomycin-Clindamycin for Plasmodium falciparum Infections in African Children*. *J Infect Dis* 2004; 189(5): 901-908.
- Alam A, et al. *Novel antimalarial drug targets: hope for new antimalarial drugs*. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2009; 2(5): 469-489.
- Cassera MB, et al. *Plasmodium falciparum Parasites Are Killed by a Transition State Analogue of Purine Nucleoside Phosphorylase in a Primate Animal Model*. *PLoS ONE* 2011; 6(11): e26916.



32. Coteron JM, et al. Structure-Guided Lead Optimization of Triazolopyrimidine-Ring Substituents Identifies Potent Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Clinical Candidate Potential. *J Med Chem* 2011; 54(15): 5540-5561.
33. Doerig C, et al. Malaria: Targeting parasite and host cell kinomes. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804(3): 604-612.
34. *International Travel and Health 2010: Situation As on 1 January 2010*. World Health Organization, 2010.
35. SmPC zdravila Doxycycline: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/26378/SPC>. Dostop: 25.7.2013.
36. SmPC zdravila Lariam: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/1701>. Dostop: 25.7.2013.
37. SmPC zdravila Malarone: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/756>. Dostop: 25.7.2013.
38. Croft AM. Malaria: prevention in travellers. *Clin Evid (Online)* 2010; 07: 903-933.

Visokokalorična tekoča prehrana,  
prilagojena onkološkemu bolniku.

Rp/  
Supportan 200 ml 4x  
Da scat. orig No. XV  
(quindecim)  
Ds. 2x/dan 200 ml  
Repetatur 2x (duos)



... ko gre zares, ko potrebujete pomoč,  
podporo, suport, potrebujete ...

**Supportan**<sup>®</sup>

# CITOKROM P450 – OKSIDOREDUKTAZA (POR) V BIOSINTEZI HOLESTEROLA

## CYTOCHROME P450 - OXIDOREDUCTASE (POR) IN THE BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL

AVTORJA / AUTHORS:

prof. dr. Damjana Rozman

asist. dr. Klementina Fon Tacer, dr.vet.med.

*Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za biokemijo, Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe, Zaloška 4, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: klementina.fon-tacer@mf.uni-lj.si

## 1 UVOD

Holesterol je pomemben gradnik membran živalskih celic, potreben tudi za nemoteno delovanje živčnega sistema in razvoj moških spolnih celic. Poleg strukturne vloge ima holesterol pomembno vlogo kot izhodna spojina v biosintezi številnih biološko aktivnih molekul, kot so žolčne kisline in steroidni hormoni. Nenazadnje pa je holesterol ključen tudi

## POVZETEK

Holesterol ima številne fiziološke vloge v organizmu sesalcev in je ključen za razvoj zarodka. Genetske napake v biosintezi holesterola so vzrok različnih prirojenih napak. Patogeneza prirojenih napak je posledica tako pomanjkanja holesterola kot tudi škodljivih učinkov sterolnih intermediatov, ki se kopičijo. Lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaza (CYP51) katalizira prvi korak poznega dela biosinteze holesterola. Za svoje delovanje potrebuje donorja elektronov, citokrom P450-oksido-reduktazo (POR). Pri nekaterih pacientih s sindromom podobnim Antley-Bixler-ju so ugotovili mutacije v genu *POR*. Poleg tega so podobne teratogene simptome opazili pri otrocih žensk, ki so med nosečnostjo uživale azole, močne inhibitorje glivnih CYP51, ki se uporabljajo pri zdravljenju sistemskih mikoz. Ugotovitvi nakazujeta, da pride do razvojnih motenj zaradi napak v biosintezi holesterola na ravni CYP51. Z našim delom smo želeli ugotoviti vpliv citokrom P450-oksido-reduktaze na biosintetsko pot holesterola v jetrih.

Z analizo HPLC smo določili sterolni profil (količino holesterola, lanosterola, 7-dehidroholesterola, lanosterola, FF-MAS in T-MAS) v jetrih miši, ki imajo tkivno-specifično izničen gen *POR* v jetrih. Ugotovili smo, da izničenje *Por* povzroči kopičenje lanosterola v jetrih, kjer je normalno lanosterola in ostalih sterolnih intermediatov razen holesterola zelo malo ali so celo pod mejo detekcije. Mutirane miši imajo v primerjavi s kontrolnimi živalmi 35-krat več lanosterola (397  $\mu$ g/g proti 11  $\mu$ g/g). Kljub velikemu kopičenju lanosterola se količina celokupnega holesterola v jetrih ni bistveno spremenila, ostali steroli pa so bili pod mejo detekcije v obeh skupinah. Naši rezultati kažejo, da je *POR* obvezni in nezamenljivi donor elektronov predvsem pri CYP51 posredovani reakciji. Brez *POR* se pretvorba lanosterola in najverjetneje tudi sinteza holesterola *de novo* ustavi. Kljub temu se količina holesterola v jetrih ne spremeni, saj homeostatski mehanizmi omogočijo uravnavanje koncentracije holesterola v jetrih s prevzemom LDL iz prehrane

## KLJUČNE BESEDE:

*holesterol, citokromi P450, CYP51, lanosterol, Antley-Bixler-jev sindrom*

## ABSTRACT

Cholesterol has several important physiological functions in mammals and is also indispensable during embryogenesis. Genetic defects of the cholesterol biosynthetic pathway lead to different inborn errors. The phenotypic abnormalities are caused by cholesterol deficiency and accumulation of intermediate sterols. Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) catalyses the first step following cyclization of squalene in cholesterol biosynthesis. CYP51 requires cytochrome P450 oxidoreductase (POR) that is the obligate electron donor for the reaction. Some patients with Antley-Bixler syndrome have mutations in the POR gene. A similar phenotype was also observed after early *in utero* exposure to azoles, which are inhibitors of fungal CYP51 used to treat systemic mycoses. The reason in both cases might be the inhibition of cholesterol biosynthesis on the level of CYP51. The aim of our work was to determine the effect of cytochrome P450-oxidoreductase on cholesterol biosynthesis in liver.

We used HPLC analysis to profile sterols (cholesterol, lanosterol, 7-dehydrocholesterol, lathosterol, FF-MAS and T-MAS) in the liver of wild mice and liver specific *Por* knock-out mice. We show that *Por* deletion caused strong accumulation of lanosterol. We observed 35-fold induction compared to wild type (397  $\mu$ g/g vs. 11  $\mu$ g/g).

Despite the buildup of lanosterol, the amount of total liver cholesterol did not change. Our results confirm POR as an obligate and unchangeable electron donor for CYP51 mediated reaction. POR deficiency inhibits lanosterol conversion to FF-MAS as well as cholesterol biosynthesis *de novo*. Homeostatic mechanisms are able to regulate cholesterol level, most probably through uptake of exogenous cholesterol from diet.

### KEY WORDS:

*cholesterol, cytochromes P450, CYP51, lanosterol, Antley-Bixler syndrome*

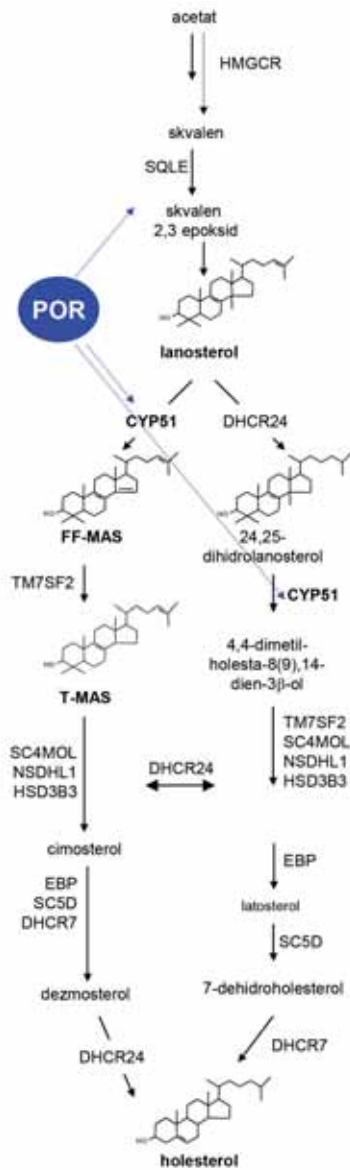
pri delovanju proteina Hedgehog (Hh) (1), ki uravnava embrionalni razvoj (2).

Molekula holesterola nastane v seriji več kot 30 reakcij in vseh 27 ogljikovih atomov holesterola izvira iz molekule acetyl-CoA z 2 ogljikovima atomoma. Lanosterol je prvi ciklični intermediat v biosintetski poti (3), ki se v seriji demetilacij, redukcij in oksidacij pretvori v holesterol (Slika 1) (4). Po lanosterolu pa se biosintezna pot loči na dve možni veji z intermediami, ki imajo nasičeno (5) ali nenasičeno (6)  $\Delta$ 24-vez (Slika 1).

Intermediati pred-lanosterolnega dela zalagajo celico s številnimi biološko pomembnimi molekulami, kot sta koencim Q10 in hem A (7). Tudi intermedii poznega dela imajo potencialne svoje biološke vloge. Dva sterola so izolirali iz spolnih žlez sesalcev in vplivata na razvoj in kvaliteto jajčnih celic (8, 9), iz 7-dehidroholesterola pa nastane vitamin D. Poleg tega so z nedavnimi raziskavami pokazali, da so pravzaprav sterolni intermedii tisti, ki so ključni za patologijo genetskih obolenj biosinteze holesterola (10). Le-ti se kopičijo in povzročijo napake pri fuziji obraznih struktur (10) in razvoja las (11).

V po-lanosterolnem delu biosintetske poti je opisanih šest prirojenih napak, ki so posledica mutacij v holesterogenih genih (12) in imajo določene skupne fenotipske značilnosti. Antley-Bixler-jev sindrom (ABS) nastane kot posledica mutacij v različnih genih, največkrat v receptorju fibroblastnih rastnih faktorjev 2 (FGFR2). Fenotip podoben ABS so opazili tudi pri otrocih, ki so bili v maternici izpostavljeni flukonazolu, antimikotiku in inhibitorju lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaze (CYP51) (13). Azoli se pogosto uporabljajo v kmetijstvu in tudi za zdravljenje živali in ljudi. Njihovo delovanje temelji na inhibiciji glivnega CYP51 (14). CYP51 katalizira demetilacijo lanosterola v biosintezni poti sterolov (15). Tako so pozornost pri pacientih z ABS usmerili tudi na CYP51 in sintezo holesterola (16, 17). V fibroblastih nekaterih pacientov, tistih brez mutacij v *FGFR2*, so ugotovili povečano količino lanosterola. Kopičenje lanosterola, ki je substrat encima CYP51, kaže na neaktivnost encima (18). Vendar pri pacientih mutacij v samem *CYP51* niso našli (19), kasneje pa so odkrili, da je pri teh pacientih okvarjen gen za citokrom P450-oksido-reduktazo (POR) (20, 21). Protein POR je donor elektronov v številnih oksidoreduktivnih reakcijah, predvsem kataliziranih s citokromi P450. V biosintezi holesterola sta to 14 $\alpha$ -demetilacija lanosterola s CYP51 in monooksigenacija skvalena s svalen-monooksigenazo (SQLE) (14).





Slika 1: Shema biosinteze holesterola. Kratice encimov predstavljajo simbol UniGene. HMGCR- HMG-CoA-reduktaza; LBR- lamin B receptor; TM7SF2- 14-dehidroholesterol-reduktaza; SC4MOL- sterol C4-metil-oksidaža; NSDHL- 3-β-hidroksi-Δ5-steroid-dehidrogenaza, HSD3B3- 3β-ketosteroid-reduktaza, EBP- sterol-8,7 izomeraza; SC5D- sterol-C5 desaturaza; DHCR7- 7-dehidroholesterol-reduktaza, POR- citokrom P450-oksido-reduktaza. FF-MAS- mejozo aktivirajoči sterol iz folikularne tekočine, 4,4-dimetil-5α-cholesta-8,14,24-triene-3β-ol; T-MAS- mejozo aktivirajoči sterol iz mod.

Figure 1: Schematic representation of post-squalene part of cholesterol biosynthesis. Abbreviations of enzyme names correspond to UniGene Symbols. HMGCR- HMG-CoA reductase; LBR- lamin B receptor; TM7SF2- 14-dehydrocholesterol reductase; SC4MOL- sterol C4-methyl oxidase, NSDHL- 3-β-hydroxy-Δ5-steroid dehydrogenase, HSD3B3- 3β-keto-steroid reductase, EBP- sterol 8, 7 isomerase; SC5D- sterol- C5 desaturase; DHCR7- 7-dehydrocholesterol reductase. FF-MAS- follicular fluid meiosis activating sterol, 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8,14,24-triene-3β-ol; T-MAS- testis meiosis activating sterol, 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8,24-diene-3β-ol.

Da bi preučili vpliv *POR* na metabolizem holesterola, smo analizirali sterolni profil v jetrih miši z izničnim genom *Por*.

## 2 MATERIALI IN METODE

Jetra miši divjega seva in L-PORKO (miši z izničnim genom *Por* v jetrih) smo dobili iz laboratorija prof. dr. Ro-

landa Wolfa (University of Dundee) (pet v vsaki skupini). Analizo sterolov smo izvedli po že opisanem postopku (22) z manjšimi spremembami. Iz zamrznjenih in posušenih jeter (*angl. freeze-dried*) smo ekstrahirali lipide v ekstrakcijski tekočini (75% n-heptan : 25% izopropanol (v/v)). Organsko fazo smo posušili in ekstrahirane lipide umilili z enourno inkubacijo v raztopini 10% KOH v 80% etanolu pri 60°C. Po alkalni hidrolizi smo pH uravnali z 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ponovno izvedli ekstrakcijo, kot je opisana zgoraj. Organsko fazo smo posušili, raztopili v mobilni fazi za analizo HPLC z normalno fazo in izvedli ločitev na koloni ChromSpherSi, 5 μm,

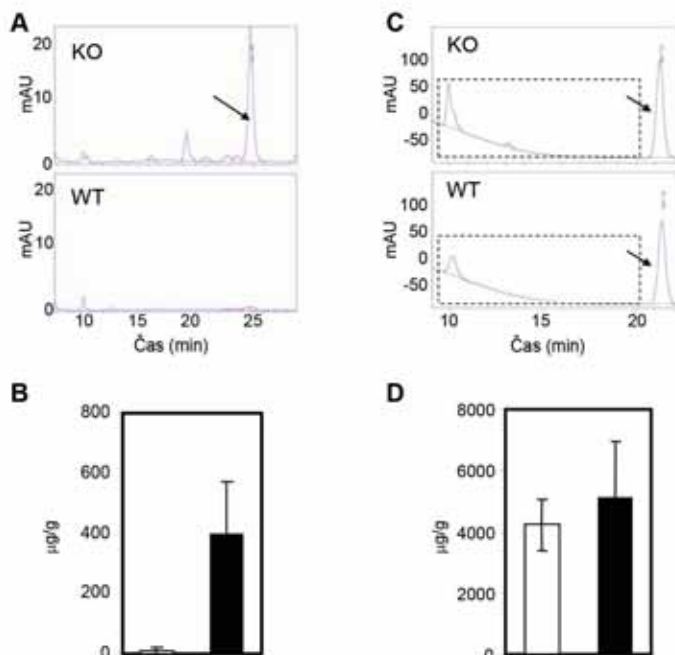
250x4.6 mm (Varian) z mobilno fazo 99,5% n-heptan (J.T.Baker):0,5% izopropanol (J.T.Baker) (v/v) s pretokom 1,00 mL/min. Količino holesterola smo določili na osnovi kromatograma analize z normalno fazo pri 200 nm. Ker se lanosterol in T-MAS na normalni fazi ne ločita, smo frakcijo z intermediati (8-20 minut) polovili, posušili, raztopili v acetonitrilu in jih analizirali s pomočjo separacije na reverzni fazi na koloni C8-LiChrospher RP-8, 5  $\mu$ m, 250x4,6 mm (Varian) z mobilno fazo (v/v) 93% acetonitril (Fischer Scientific):7% vode s pretokom 1,00 mL/min. Na osnovi retencijskih časov (RT) standardov smo lahko določili lanosterol (Sigma L5768; RT 24,5 min na reverzni fazi in holesterol (Steraloids C6760; RT 21,3 min na normalni fazi), medtem ko so bili 7-dehidroholesterol (Steraloids C3000), latosterol (Steraloids C7400-000) in T-MAS in FF-MAS (laboratorijski standardi (22) pod mejo detekcije.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Želeli smo preučiti vlogo citokrom P450-oksido-reduktaze (POR) na biosintezo holesterola v jetrih. Citokrom P450-oksido-reduktaza (POR) namreč sodeluje kot donor elek-

tronov pri dveh reakcijah v biosintezni poti, pri mono-oksigenaciji skvalena s skvalen-epoksidazo in pri  $14\alpha$ -demetilaciji lanosterola s CYP51 (Slika 1). Razvita sta bila dva modela miši z izničnim genom *Por* specifično v jetrih (L-PORKO) (23, 24). V jetrih miši divjega seva in L-PORKO (23) smo analizirali sterolni profil. Določili smo količino holesterola in lanosterola (Slika 2), medtem ko je bila količina 7-dehidroholesterola, latosterola, FF-MAS in T-MAS pod mejo detekcije. Količina lanosterola je v jetrih miši L-PORKO 35-krat povečana ( $397,48 \pm 138,87 \mu\text{g/g}$  vs.  $11,55 \pm 5,17 \mu\text{g/g}$ ; Slika 2A in B). Lanosterol je substrat za CYP51-posredovano reakcijo. Njegovo kopičenje kaže na to, da je CYP51 neaktiven in da je za CYP51 POR nezamenljiv donor elektronov. Mono-oksigenacija skvalena je v biosintezni poti pred CYP51 (Slika 1) in očitno poteče kljub odsotnosti POR. Skvalen-mono-oksigenaza ima verjetno alternativni vir elektronov, kot na primer citokrom  $b_5$ /NADH-reduktazo (25).

Kljub velikemu kopičenju lanosterola, ki kaže na to, da je sinteza holesterola na ravni CYP51 močno inhibirana ali celo ustavljena, se količina celokupnega holesterola v jetrih ni bistveno spremenila ( $4233,54 \pm 837,14 \mu\text{g/g}$  vs.  $5104,10 \pm 1869,77 \mu\text{g/g}$ ; Slika 2C in D). Ko količina holesterola pade, transkripcijski faktor SREBP2 namreč aktivira tako biosintezno pot kot tudi prevzem holesterola iz plazme



**Slika 2:** Količina lanosterola in holesterola v jetrih miši z izničnim genom *Por*. Reprezentativni kromatogrami lanosterola (puščica) po analizi HPLC z reverzno fazo (A) in holesterola (puščica) z normalno fazo (C). Na osnovi kromatogramov smo določili količino lanosterola (B) in holesterola (D) v jetrih miši divjega seva (beli stolpci) in miši z izničnim genom *Por* (črni stolpci). Rezultati predstavljajo srednjo vrednost in standardno deviacijo petih živali.

**Figure 2:** Lanosterol and cholesterol amount in the liver of wild type and liver specific *Por* knock-out mice. Representative reverse phase (A) and straight phase (C) HPLC chromatograms of lanosterol (A) and cholesterol (C) analysis. Quantification of lanosterol (B) and cholesterol (D) in the liver of wild type (white bars) and liver specific *Por* knock-out (black bars) mice. Results represent mean  $\pm$  SD of 5 animals.

preko z receptorjem LDL posredovane endocitoze (26). V jetrih miši L-PORKO je povišano izražanje holesterogenih genov, vendar to ne zadostuje za sintezo holesterola (24). Povečan pa je tudi prevzem lipoproteinov LDL, kar kaže znižana raven serumskega holesterola za 65% pri miših L-PORKO (23).

## 4 SKLEP

Z našo analizo smo pokazali, da je encim citokrom P450-reduktaza nujen pri  $14\alpha$ -demetilaciji lanosterola v biosintezni poti holesterola. Posledica napak v genu *Por* oziroma eksperimentalno izničenje gena je neaktivnost encima POR in posledična inhibicija CYP51 in akumulacija lanosterola. Metilirani steroli pa ne morejo funkcionalno zamenjati holesterola (5), kar je skupaj s pomanjkanjem holesterola ključno pri patogenezi ABS in teratogenem delovanju azolov. Kljub temu, da je biosintetska pot prekinjena, pa je količina holesterola nespremenjena, najverjetneje zaradi homeostatskih mehanizmov, ki omogočajo uravnavanje količine holesterola na ravni prevzema holesterola iz LDL delcev.

## 5 LITERATURA

1. Incardona JP, Eaton S. Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 193-203.
2. Bijlsma MF, Spek CA, Peppelenbosch MP. Hedgehog: an unusual signal transducer. *Bioessays* 2004; 26: 387-394.
3. Waterham HR, Wanders RJ. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 340-356.
4. Liscum L. Cholesterol biosynthesis. In: Vance DE, Vance JE, eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier 2002; 409-431.
5. Bloch KE. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* 1983; 14: 47-92.
6. Kandutsch AA, Russell AE. Preputial Gland Tumor Sterols. *J Biol Chem* 1960; 235: 2256-2261.
7. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430.
8. Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 1995; 374: 559-562.
9. Bokal EV, Fon Tacer K, Vrbnjak M, et al. Follicular sterol composition in gonadotrophin stimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 249: 92-98.
10. Engelking LJ, Evers BM, Richardson JA, et al. Severe facial clefting in *Insig*-deficient mouse embryos caused by sterol accumulation and reversed by lovastatin. *J Clin Invest* 2006; 116: 2356-2365.
11. Evers BM, Farooqi MS, Shelton JM, et al. Hair Growth Defects in *Insig*-Deficient Mice Caused by Cholesterol Precursor Accumulation and Reversed by Simvastatin. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5):1237-48.
12. Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lip Res* 2011; 52 6-34.
13. Horvat S, Mcwhir J, Rozman D. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metabolism Reviews* 2011; 43: 69-90.
14. Rozman, D, Monostory K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 127: 19-40.
15. Strömstedt M, Rozman D, Waterman MR. The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Arch Biochem Biophys* 1996; 329: 73-81.
16. Aleck KA, Bartley DL. Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: report of an additional patient. *Am J Med Genet* 1997; 72: 253-256.
17. Reardon W, Smith A, Honour JW, et al. Evidence for digenic inheritance in some cases of Antley-Bixler syndrome? *J Med Genet* 2000; 37: 26-32.
18. Keber R, Motaln H, Wagner KD, et al. Mouse knockout of the cholesterologenic cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) resembles Antley-Bixler syndrome. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 29086-97.
19. Kelley RI, Kratz LE, Glaser RL et al. Abnormal sterol metabolism in a patient with Antley-Bixler syndrome and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet* 2002; 110: 95-102.
20. Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 228-230.
21. Fukami M, Horikawa R, Nagai T, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 414-426.
22. Baltzen M, Byskov AG. Quantitation of meiosis activating sterols in human follicular fluid using HPLC and photodiode array detection. *Biomed. Chromatogr* 1999; 13: 382-388.
23. Henderson CJ, Otto DM, Carrie D, et al. Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 2003; 278: 13480-13486.
24. Gu J, Weng Y, Zhang QY, et al. Liver-specific deletion of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene: impact on plasma cholesterol homeostasis and the function and regulation of microsomal cytochrome P450 and heme oxygenase. *J Biol Chem* 2003; 278: 25895-25901.
25. Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, et al. Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Letters* 1999; 462: 283-288.
26. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89: 331-340.

# POMEN OCENE ALBUMINURIJE IN PROTEINURIJE PRI NOVOODKRITIH BOLNIKI S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 2

## THE ROLE OF ALBUMINURIA AND PROTEINURIA ASSESSMENT IN NEWLY DIAGNOSED TYPE 2 DIABETES PATIENTS

AVTORJI / AUTHORS:

Brigita Mavsar-Najdenov, mag. farm.,  
spec. klinične farmacije<sup>1</sup>

prim. Igor Rus, dr. med. spec. interne medicine<sup>2</sup>

doc. dr. Ivica Avberšek Lužnik, mag. farm. spec.  
klinične biokemije<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Splošna bolnišnica Jesenice, Lekarna

<sup>2</sup> Splošna bolnišnica Jesenice, Center za hemodializo  
in CAPD

<sup>3</sup> Splošna bolnišnica Jesenice, Oddelek za  
laboratorijsko diagnostiko

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: brigita.mavsar-najdenov@sb-je.si

### POVZETEK

Ocenjena skupna prevalenca sladkorne bolezni v Sloveniji je podobna kot v razvitem svetu in se giblje med 4 in 6 %. Za zgodnje odkrivanje ledvične bolezni pri novoodkritih bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 (SBT2) uporabljamo kazalce ledvičnega delovanja (ocena glomerulne filtracije (oGF)) in kazalce okvare ledvic (albuminurija (ACR) in proteinurija (PCR)). Namen naše raziskave je bil ugotoviti prevalence znižane oGF in bolezenske albuminurije ter bolezenske proteinurije pri novoodkritih bolnikih s SBT2. V raziskavo smo vključili 85 bolnikov s SBT2. Vsem bolnikom smo izmerili oGF, ACR in PCR. Ugotovili smo, da ima med 85 bolniki s SBT2 17 bolnikov znižano oGF, 27 bolnikov pa bolezensko albuminurijo. Med 58 bolniki brez albuminurije so trije bolniki z bolezensko proteinurijo. Med 68 bolniki z normalno oGF pa je kar 22 bolnikov z bolezensko albuminurijo oz. 18 bolnikov z bolezensko proteinurijo.

Navedeni rezultati so pokazali, da so tudi v skupini bolnikov brez bolezenske albuminurije in v skupini bolnikov z normalno oGF, bolniki, ki imajo zaradi bolezenske proteinurije večje tveganje za razvoj srčno žilnih bolezni in bolezni ledvic. Pri teh bolnikih lahko s pravočasno in selektivno uvedeno terapijo zmanjšamo tveganje za nastanek srčno žilnih bolezni in bolezni ledvic.

### KLJUČNE BESEDE:

*sladkorna bolezen tipa 2, glomerulna filtracija, albuminurija, proteinurija*

### POVZETEK

The estimated prevalence of diabetes in Slovenia is similar to most countries of the developed world, ranging between 4 and 6%. Markers of renal function (glomerular filtration rate (GFR)) and markers of renal damage (albuminuria (ACR) and proteinuria (PCR)) are used for the early detection of renal disease in newly diagnosed type 2 diabetes patients. The aim of our study was to assess the prevalence of reduced GFR and increased ACR and PCR in newly diagnosed type 2 diabetes patients. 85 newly diagnosed type 2 diabetes patients were included in the study. We measured GFR, ACR and PCR in all of them. We found that in 85 type 2 diabetes pa-



tients 17 patients had reduced GFR, while 27 of them had pathological albuminuria. In 58 patients that did not have albuminuria, we found 3 patients with pathological proteinuria. In 68 patients with normal GFR, 22 had pathological albuminuria and 18 had pathological proteinuria.

The reported results show that a proportion of patients with no albuminuria and normal GFR have a higher risk of developing cardiovascular and renal disease due to pathological proteinuria. In these patients we can introduce measures early in the course of disease to reduce their risk of cardiovascular and renal morbidity.

#### KEY WORDS:

*type 2 diabetes, albuminuria, proteinuria, glomerular filtration rate*

## 1 UVOD

Sladkorna bolezen (SB) je obsežen zdravstveni problem, ki bolnike izpostavi povečanemu tveganju za nastanek srčno žilnih bolezni in bolezni ledvic. Je med najpogostejšimi vzroki za napredovanje ledvične bolezni do končne odpovedi ledvic, ki zahteva nadomestno zdravljenje. Bolniki s končno odpovedjo ledvic imajo dokazano značilno višjo smrtnost, obolevnost in nižjo kakovost življenja (1). Pri odkrivanju bolnikov s kronično ledvično boleznijo (KLB) in nadaljni opredelitvi KLB kot diabetične ledvične bolezni (DLB) ali kot kronične ledvične bolezni druge etiologije uporabljamo kazalce ledvičnega delovanja in bolezni ledvic. Najpogosteje uporabljeni kazalec ledvičnega delovanja je ocena glomerulne filtracije (oGF). Za oceno in spremljanje napredujoče bolezni ledvic pa sta uporabna kazalca albuminurija in proteinurija (2). Pri bolnikih s SB je merjenje albuminurije pomembno za zgodnje odkrivanje DLB, medtem ko je prisotnost proteinurije pomemben dejavnik tveganja za napredovanje DLB. Albuminurija je bolj občutljiv kazalec za odkrivanje KLB od proteinurije, kar potrjuje tudi študija Atkins s sod., ki navaja, da 67,5% nediabetikov z albuminurijo nima proteinurije in da samo 8% nediabetikov s proteinurijo nima albuminurije (3). Proteinurija (več kot 0,150 g/dan) je kazalec ledvične bolezni in predstavlja po-

memben dejavnik tveganja za napredovanje DLB (4). Tveganje za srčno-žilne zaplete se dodatno veča z naraščanjem izločanja proteinov v urinu in zniževanjem oGF. Albuminurija je kazalec KLB, srčno-žilnih bolezni in povečane umrljivosti, ne glede na prisotnost sladkorne bolezni (5). Dokazano je, da se tako pri diabetični, kakor tudi nediabetični ledvični bolezni delovanje ledvic pri večji vrednosti proteinurije hitreje slabša. (6) Bolniki s sladkorno boleznijo tipa 2 (SBT2) in z okvarjenim delovanjem ledvic imajo v primerjavi z bolniki s SBT2 brez okvarjenega delovanja ledvic, povečano tveganje za smrtnost. Kot vzrok za povečano smrtnost izstopajo zapleti in bolezni na srčno žilnem sistemu (7). Pri bolnikih s SBT2 so dokazali, da predstavlja kombinacija albuminurije z zmanjšano oGF, pomemben dejavnik tveganja za napredovanje ledvične okvare in srčnožilnih bolezni (8). Nekatere raziskave kažejo, da imajo bolniki s proteinurijo in normalno oGF slabše klinične izide od bolnikov brez proteinurije, vendar z zmanjšano oGF (9); druge pa, da imajo bolniki z zmanjšano oGF brez proteinurije povečano tveganje za splošno umrljivost od bolnikov z albuminurijo brez zmanjšane oGF (10). Čeprav običajno nastopi albuminurija pred znižanjem oGF, so pri bolnikih s SBT1 in s SBT2, ugotovili primere progresivnega zniževanja oGF brez povečanja albuminurije (11). Albuminurija in znižana oGF odražata različne patobiokemične mehanizme pri poškodbi ledvic (12). Povečano izločanje albumina v urinu (bolezenska albuminurija) in zmanjšanje glomerulne filtracije sta dokazana dejavnika tveganja za progresivno ledvično bolezen in srčnožilne bolezni. Zgodnje odkrivanje kronične ledvične bolezni (KLB) omogoča uvedbo terapevtskih intervencij v zgodnji fazi, ko so še učinkovite pri zaustavljanju ali preprečevanju napredovanja ledvične bolezni do odpovedi ledvičnega delovanja ter pridruženih zapletov. Za zgodnje odkrivanje KLB pri bolnikih z večjim tveganjem, kamor uvrščamo tudi bolnike s SBT2, mednarodne in slovenske smernice priporočajo uporabo presejalnih testov za oceno albuminurije, proteinurije in glomerulne filtracije (12,13,14). Zaradi vpliva stanja hidracije na koncentracijo različnih beljakovin v urinu, laboratorij vrednosti za albuminurijo podaja kot količnik U-albumin/kreatinin (ACR) in vrednosti za proteinurijo kot količnik U-beljakovine/kreatinin (PCR), oboje v g/mol. Spodnja meja bolezenske albuminurije je v različnih državah različna. V naši državi je za bolezensko albuminurijo priporočena vrednost ACR več kot 3g /mol. O bolezenski proteinuriji pa govorimo, ko je vrednost PCR več kot 20 g/mol in ocena dnevne proteinurije več kot 0,150 g/dan (6,15). Za oGF je priporočena enačba MDRD (Modification



of Diet in Renal Disease), pri čemer je znižana vrednost opredeljena pod 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

Na podlagi teh ugotovitev smo želeli proučiti populacijo bolnikov z novoodkrito SBT2, ki so bili obravnavani v ambulanti za diabetes Splošne bolnišnice Jesenice. Želeli smo ugotoviti prevalenco ledvične bolezni ter različne vrste ledvičnih okvar pri bolnikih s SBT2.

## 2 MATERIALI IN METODE

V raziskavo smo vključili bolnike z novo odkrito SBT2, ki so bili v obdobju od 01.01.2012 do 30.06.2013 obravnavani v ambulanti za diabetes Splošne bolnišnice Jesenice. Izključili smo nosečnice in bolnike z okužbami, poškodbami, sistemskimi boleznimi, onkološkimi boleznimi ter bolnike, ki se zdravijo s kortikosteroidi in/ali imunosupresivi. Skupno smo zajeli 85 bolnikov, od tega je bilo 42 žensk in 43 moških. Povprečna starost vključenih bolnikov je znašala 61,7 let. V raziskavi smo uporabili laboratorijske rezultate preiskav, ki so bile izvedene v sklopu redne obravnave bolnikov v ambulanti za diabetes Splošne bolnišnice Jesenice. V obdobju od januarja 2012 do junija 2013 je bilo v ambulanti obravnavanih 113 novoodkritih bolnikov s SBT2 (diagnoza jim je bila določena na primarni ravni zdravstvenega varstva, kjer so bili uvedeni prvi ukrepi za zmanjšanje glukoze v krvi). Vključili smo samo tiste bolnike s SBT2, ki so imeli v sklopu ambulantnega pregleda v Splošni bolnišnici Jesenice opravljene laboratorijske preiskave za oceno glikemije (koncentracija glukoze v plazmi (P-Glukoz), glikirani hemoglobin v krvi (HbA1c)), za oceno delovanja ledvic (koncentracija kreatinina v plazmi (P-Kreatinin), oGF po MDRD), in za oceno proteinov v urinu (ACR, PCR in ocena dnevne proteinurije (oDP)). Analize so bile opravljene na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Jesenice na analizatorjih Siemens Expand Dimension.

Uporabili smo sledeče diagnostične kriterije: bolezenska albuminurija pri vrednosti ACR nad 3,0 g albumina na mol izločenega kreatinina, bolezenska proteinurija pri PCR nad 20,0 g proteinov na mol izločenega kreatinina in ocena ledvične funkcije je znižana pri oGF pod 60ml/min. Za oceno dnevne proteinurije (oDP) v skladu s priporočili patološke opredelimo vrednosti nad 0,150 mg/dan (12,13,14). Kon-

centracijo albumina smo določili v srednjem curku drugega jutranjega vzorca urina. Oceno glomerulne filtracije smo izračunali na podlagi določitve plazemskega kreatinina s standardizirano laboratorijsko metodo s pomočjo enačbe MDRD. Po tej enačbi izračunana oGF velja v območju starosti od 18 do 75 let. V naši skupini preiskovancev je bilo 7 bolnikov starejših od 75 let. Pri teh bolnikih smo uporabili za izračun oGF korekcijski faktor (16).

Preiskovance smo razdelili v dva para skupin. Prvi par glede na vrednosti albuminurije in sicer v skupino 1 bolnike z normalno vrednostjo in v skupino 2 bolnike z bolezensko albuminurijo. Ker je pri novoodkritih bolnikih s SBT2 zelo pogosto že znižana funkcija ledvic, smo preiskovance razdelili še na drugi par glede na vrednost oGF in sicer v skupino 1 bolnike z normalno vrednostjo oGF in v skupino 2 bolnike z znižano vrednostjo oGF.

Iskali smo statistično pomembne razlike med obema paroma skupin bolnikov, glede na izmerjene parametre (P-Glukoz, HbA1c, P-Kreatinin, ACR, PCR oDP in oGF).

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko Splošne bolnišnice Jesenice, ki je ugotovila, da sta načrt in izpeljava usklajena z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah Svetovnega zdravniškega združenja in z določili Konvencije sveta Evrope za varstvo človekovih pravic in dostojanstva človeškega bitja v zvezi z uporabo biologije in medicine. Prav tako so v načrtu in izvedbi upoštevana načela Kodeksa medicinske deontologije Slovenije, kakor tudi navodila državne komisije za medicinsko etiko.

Za statistično analizo podatkov smo uporabili programski paket SPSS Software Statistical Package, version 15.0, SPSS Inc., Chichago, Illinois, USA. Rezultate biokemičnih meritev smo izrazili kot povprečno vrednost s standardno deviacijo ( $\bar{x} \pm SD$ ) in kot mediano z območjem (min – max) pri parametrih, katerih porazdelitev ni bila normalna. Za testiranje normalnosti porazdelitve podatkov smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Parametre, ki se med skupinami niso porazdeljevali normalno, smo primerjali s Kruskal-Wallisovim testom. Rezultate smo opredelili kot statistično značilne pri stopnji tveganja  $p < 0,05$ .



## 3 REZULTATI

Laboratorijske parametre za oceno glikemije, ledvične funkcije in/ali okvare smo izmerili 85 bolnikom s SBT2. Preiskovanci so bili v povprečju stari 61,7 let. Mediana plazemskih koncentracij glukoze je znašala 7,7 mmol/L, HbA1c pa 7,8%. Koncentracije kreatinina so se gibale v območju od 55 do 149 mmol/L. Kazalci ocene delovanja ledvic in ledvične okvare (ACR, PCR, oDP in oGF) so bili razpršeni v širokem intervalu meritev. Osnovne demografske podatke bolnikov prikazujemo v preglednici 1.

Na podlagi določenih vrednosti albuminurije smo v skupino 1 uvrstili bolnike z normalno vrednostjo albuminurije (N=58) in v skupino 2 bolnike z bolezensko albuminurijo (N=27). Izvedli smo primerjavo merjenih parametrov med skupinama. Skupini bolnikov 1 in 2 se po medianah starosti, plazemskih koncentracijah glukoze in HbA1c ter kreatinina in oGF, nista značilno razlikovali. Statistično značilne razlike med skupinama pa smo ugotovili pri parametrih albuminurije (ACR) in proteinurije (oDP in PCR). Pri pregledu rezultatov pri posameznih bolnikih v skupini 1 smo ugotovili, da je kljub odsotnosti albuminurije prisotna bolezenska proteinurija pri treh bolnikih, ki jih je v tej skupini potrebno še posebej natančno obravnavati. Rezultate prikazujemo v preglednici 2.

**Preglednica 1:** Demografske značilnosti in laboratorijski parametri 85 bolnikov z novoodkrto sladkorno boleznijo tipa 2

**Table 1:** Demographic and laboratory parameters of 85 newly diagnosed type 2 diabetes patients.

Parameter	
starost (leta)	61,7 ± 10,8
spol (moški/ženske)	43/42
P-Glukoza (mmol/L)	7,7 (3,5 – 20,1)
HbA1c (%)	7,8 (5,3 – 14,1)
P-Kreatinin (μmol/L)	80 (55 – 149)
ACR (g/mol kreatinina)	1,57 (0,29 – 39,01)
PCR (g/mol kreatinina)	13,2 (2,3 – 170,1)
oDP (g/dan)	0,114 (0,021 – 1,497)
oGF (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	71,8 (30,4 – 115,0)

oGF - ocena glomerulne filtracije, oDP – ocena dnevne proteinurije, PCR – razmerje proteini na kreatinin, ACR- razmerje albumini na kreatinin

Na podlagi določene oGF smo v skupino 1 uvrstili 68 bolnikov z normalno oGF in v skupino 2 17 bolnikov z znižano oGF. Izvedli smo primerjavo merjenih parametrov med skupinama. Ugotovili smo, da se skupini po starosti značilno razlikujeta. Bolniki z znižano oGF so starejši v primerjavi z bolniki z normalno oGF ( $p < 0,001$ ). Plazemske koncentracije kreatinina so v tej skupini pričakovano višje. Mediane vrednosti za ACR, PCR in oDP pa se med skupinama ne razlikujejo značilno. Pri pregledu rezultatov pri posameznih bolnikih pa smo ugotovili, da skupina z normalno oGF vključuje kar 22 pacientov z bolezensko albuminurijo (med temi jih bilo 18 z bolezensko proteinurijo). Ti pacienti potrebujejo selektivno in poglobljeno obravnavo. Rezultate prikazujemo v preglednici 3.

## 4 RAZPRAVA

V raziskavo smo vključili 85 bolnikov z diagnozo SBT2, ki so bili prvič po odkritju sladkorne bolezni obravnavani pri diabetologu v Splošni bolnišnici Jesenice. Vsem bolnikom smo izmerili laboratorijske parametre za oceno glikemije in delovanja ledvic. Ugotovili smo, da ima med 85 bolniki s SBT2 27 bolnikov bolezensko albuminurijo, 17 bolnikov pa znižano oGF. Med 57 bolniki brez albuminurije imajo trije bolniki bolezensko proteinurijo. Med 68 bolniki z normalno oGF pa je kar 22 bolnikov z bolezensko albuminurijo oz. 18 bolnikov z bolezensko proteinurijo.

Albuminurija in znižana filtracijska sposobnost ledvic sta neodvisna dejavnika za razvoj koronarne srčne bolezni pri bolnikih s SBT2. Med preiskovanimi bolniki jih je imelo 31,7 % bolezensko albuminurijo in 20 % znižano oGF. Glede na izsledke tuje raziskave (17), ki na velikem vzorcu pacientov s SBT2 (N= 66069) navaja 24 % prevalenco mikro in makroalbuminurije in 17,2 % prevalenco znižane oGF ( $< 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>), smo mi odkrili višjo pojavnost bolezenske albuminurije in zmanjšanega delovanja ledvic. Prevalenca albuminurije in zmanjšanega delovanja ledvic se v drugih študijah (18, 19) giblje od 15 do 61 %. V raziskavah so proučevali različne starostne skupine bolnikov s SBT2, ki so se razlikovali po rasi, lipidnem statusu in drugih dejavnih tveganja za razvoj SBT2. Mi smo v raziskavo vključili samo 85 bolnikov, ki smo jih s pomočjo enkratne meritve biokemičnih kazalcev razdelili po diagnostičnih kriterijih za oceno albuminurije in delovanja ledvic. Namen

**Preglednica 2:** Laboratorijski parametri bolnikov z novoodkrto sladkorno boleznijo tipa 2 v skupini 1 brez in v skupini 2 z bolezensko albuminurijo

**Table 2:** Laboratory parameters in newly diagnosed type 2 diabetes patients in group 1 with normoalbuminuria and in group 2 with pathological albuminuria.

Parameter	Skupina 1	Skupina 2	p
število bolnikov	58	27	
starost (leta)	60 (32 – 79)	65 (40 – 84)	0,106
P-Glukoza (mmol/L)	7,4 (3,5 – 20,1)	7,7 (4,3 – 17,2)	0,585
HbA1c (%)	7,8 (5,3 – 13,3)	7,9 (6,0 – 14,1)	0,231
P-Kreatinin (μmol/L)	81 (57 – 149)	78 (55 – 120)	0,146
ACR (g/mol kreatinina)	1,14 (0,29 – 2,78)	10,1 (3,1 – 39,0)	0,000
PCR (g/mol kreatinina)	10,8 (2,3 – 26,9)	30,2 (9,5 – 170,1)	0,000
oDP (g/dan)	0,09 (0,021 – 0,236)	0,27 (0,084 – 1,479)	0,000
oGF (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	70,2 (30,4 – 104,6)	74 (37,2 – 115)	0,745

Skupina 1: 58 bolnikov brez albuminurije

Skupina 2: 27 bolniki z albuminurijo

oGF - ocena glomerulne filtracije, oDP – ocena dnevne proteinurije,

PCR – razmerje proteini na kreatinin, ACR- razmerje albumini na kreatinin

**Preglednica 3:** Laboratorijski parametri bolnikov z novoodkrto sladkorno boleznijo tipa 2 v skupini 1 z normalno in v skupini 2 z znižano oGF

**Table 3:** Laboratory parameters in newly diagnosed type 2 diabetes patients in group 1 with normal and in group 2 with decreased eGFR

Parameter	Skupina 1	Skupina 2	p
število bolnikov	68	17	
starost (leta)	59 (32 – 79)	70 (44 – 84)	0,001
P-Glukoza (mmol/L)	7,6 (3,5 – 20,1)	8,9 (5,8 – 15,4)	0,257
HbA1c (%)	7,8 (5,3 – 14,1)	8,2 (6,0 – 10,6)	0,520
P-Kreatinin (μmol/L)	77 (55 – 109)	95 (81 – 149)	0,000
ACR (g/mol kreatinina)	1,36 (0,29 – 29,26)	1,96 (1,11 – 39,01)	0,105
PCR (g/mol kreatinina)	13,1 (2,3 – 170,1)	15,4 (3,4 – 78,5)	0,733
oDP (g/dan)	0,114 (0,021 – 1,479)	0,135 (0,030 – 0,691)	0,649
oGF (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	77 (60,1 – 115)	52,6 (30,4 – 59,7)	0,000

Skupina 1: 68 bolnikov z normalno vrednostjo GF

Skupina 2: 17 bolnikov z zmanjšano vrednostjo GF

oGF - ocena glomerulne filtracije, oDP – ocena proteinurije,

PCR – razmerje proteini na kreatinin, ACR- razmerje albumini na kreatinin

naše raziskave je bil usmerjen izključno na pridobitev podatkov o številu bolnikov z albuminurijo in brez albuminurije. Stopnja albuminurije zvišuje tveganje za kardiovaskularne bolezni. Albuminurija je v visoki povezavi z glikemijo in je pogostejša pri moških ter starejših bolnikih, s slabo urejeno sladkorno boleznijo. Pri teh so pogostejše dokazane mikrovaskularne spremembe na koronarkah (17). Naši bolniki spadajo med starejšo populacijo, zato so v večji nevarnosti za razvoj mikrovaskularnih okvar. Če pripomoremo k hitrejšemu odkrivanju bolnikov s SBT2 z več-

jim tveganjem, lahko s pravočasnimi in usmerjenimi terapevtskimi pristopi zmanjšamo tveganje za zaplete in posledno zmanjšamo stroške zdravljenja, ki bi sledilo možnim srčno žilnim dogodkom.

Še posebej smo želeli odkriti tiste paciente s SBT2, ki imajo ob normalni vrednosti albuminurije že bolezensko proteinurijo. Našli smo tri takšne paciente, ki zaradi drugačne vrste okvare ledvic potrebujejo individualno terapevtsko in diagnostično obravnavo.

Zanimali so nas tudi bolniki, ki ob ugotovljeni bolezenski albuminuriji še niso imeli znižane oGF. Ti bolniki imajo po podatkih iz epidemioloških študij visoko tveganje za razvoj koronarne srčne bolezni. Tveganje za razvoj koronarne srčne bolezni narašča s padanjem oGF. Zavedamo se, da je oGF lahko netočno izmerjena. Zaradi metodoloških in analitičnih dejavnikov je lahko precenjena ali podcenjena in predstavlja omejitev za natančno opredelitev delovanja ledvic. Kljub navedenim omejitvam menimo, da lahko z razvrstitvijo bolnikov s SBT2 glede na vrsto bolezni ledvic, odkrijemo tiste, ki potrebujejo drugačne pristope pri spremljanju in terapiji ter v zgodnji stopnji obravnave vplivamo na zmanjšanje tveganja za razvoj srčno žilnih bolezni. Merjenje proteinov v urinu je klinično pomembno zato, ker nudi informacije o diagnozi, prognozi in tveganju za razvoj in napredovanje ledvične bolezni, sladkorne bolezni in srčno žilnih bolezni. Kljub temu pa stroka še vedno ne more dati točnega odgovora na vprašanja, v katerih kliničnih situacijah meriti samo albuminurijo oz. proteinurijo ali pa oba kazalca. (3). Zaradi teh dejstev menimo, da je pri novoodkritih bolnikih s SBT2 smiselno meriti v zgodnji fazi obravnave teh bolnikov oba kazalca.

Omejitve pri naši raziskavi predstavlja nizko število vključenih bolnikov s SBT2 in na analitični ravni izvedene le enkratne meritve albuminurije, proteinurije, oDP in oGF, kar pomeni odstotek od priporočil v stroki.

## 5 SKLEP

Pri skupini 85 novoodkritih bolnikov s SBT2 smo dokazali bolezensko albuminurijo pri 27 in znižano oGF pri 17 bolnikih. Med 58 bolniki brez albuminurije so imeli trije bolniki bolezensko proteinurijo. Za pravočasno uvajanje ustrezne terapije za preprečevanje nastanka in napredovanja srčno žilnih bolezni ter bolezni ledvic je zgodnje odkrivanje teh bolnikov še posebej pomembno.

Med 68 bolniki z normalno oGF je imelo 22 bolnikov bolezensko albuminurijo in 18 bolnikov bolezensko proteinurijo. Pri normalni oGF je že lahko prisotna okvara ledvic, zato je zaradi pravočasnega uvajanja terapije tudi pri teh bolnikih pomembno, da jih z laboratorijskimi testi odkrijemo čimprej.

Kljub nekaterim omejitvam raziskave, je bila prevalenca bolezenske albuminurije in znižane vrednosti oGF pri naših bolnikih primerljiva z izsledki podobnih tujih raziskav.

Zaključimo lahko z ugotovitvijo, da uporaba ustreznih biokemičnih kazalcev pri obravnavi novoodkritih bolnikov s SBT2 v ambulantah za diabetes omogoča odkrivanje bolnikov z okvarjenim delovanjem ledvic in tistih z znižano oGF, ki imajo večje tveganje za razvoj srčno žilnih bolezni in bolezni ledvic. Z uvedbo ustreznih intervencij na področju farmakoterapije in spremljanja bolnikov v zgodnji fazi SBT2 lahko zmanjšamo možnosti za pojav in napredovanje teh bolezni.

## 6 LITERATURA

1. American Diabetes Association: *Nephropathy in Diabetes (Position Statement)*. *Diabetes Care*. 2004; 27 (Suppl. 1): S79 – S83
2. Johnson DW, Jones GR, Mathew TH et al. *Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement*. *Med J Aust*. 2012; 197(4): 224-225
3. Atkins RC, Briganti EM, Zimmet PZ, Chadban SJ. *Association between albuminuria and proteinuria in the general population: The AusDiab Study*. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 2170-2174
4. Palmer BF. *Proteinuria as a therapeutic target in patients with chronic renal disease*. *Am J Nephrol*. 2007; 27: 287-293
5. Guh JY. *Proteinuria versus albuminuria in chronic kidney disease*. *Nephrology*. 2010; 15(2): 53-56
6. Lindič J, Flisar Ž, Kršnik M et al. *Presejalne metode za kronično ledvično bolezen: ocena proteinurije in albuminurije*. *ISIS*. april 2009: 42-46
7. Nag S, Bilous R, Kelly W et al. *All-cause and cardiovascular mortality in diabetic subjects increases significantly with reduced estimated glomerular filtration rate (eGFR): 10 years' data from South Tees Diabetes Mortality study*. *Diabet Med*. 2007; 24: 10-7
8. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE et al. *Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes*. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(8): 1813-1821
9. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A et al. *Relation between kidney function, proteinuria and adverse outcomes*. *JAMA* 2010; 303(5): 423-429
10. Foster MC, Hwang SJ, Larson MG et al. *Cross-classification of microalbuminuria and reduced glomerular filtration rate*. *Arch Intern Med*. 2007; 167(13): 1386-1392
11. Molitch MD, Steffes M, Sun W et al. *Epidemiology of diabetes interventions and complications study group*. *Diabetes care*. 2010; 33: 1536-1543
12. *KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease*. *Am J Kidney Dis*. 2007; 49(2 Suppl 2): S12-154

13. *Kidney Disease Improving Global Outcomes. Official Journal of the International Society of Nephrology - KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*  
[http://www.kdigo.org/clinical\\_practice\\_guidelines/pdf/CKD/KDIGO\\_2012\\_CKD\\_GL.pdf](http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf). dostop: 09.09.2013
14. Zdrženje endokrinologov Slovenije, Diabetes forum in Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Slovenske smernice za zdravstveno oskrbo bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2. Ljubljana 2008: 93-100
15. Lindič J, Krsnik M. Chronic kidney disease screening-estimation of proteinuria. invited lecture 3. 5th Slovenian congress of nephrology. 2012: 38-39
16. Bernstein LH, Zions MY, Salman AH, Zarich S, Rucinski J, Seamonds B, Berger S, Lesley DY, Fleischman W, Heitner JF. Effect of renal function loss on NT-proBNP level variations. *Clinical Biochemistry* 42; 2009: 1091-1098
17. Svensson MK, Cederholm J, Eliasson B et al. Albuminuria and renal function as predictors of cardiovascular events and mortality in a general population of patients with type 2 diabetes: A nationwide observational study from the Swedish National Diabetes Register. *Diabetes and Vascular Disease Research*. September 3, 2013 1479164113500798
18. Rodriguez-Poncelas A, Quesada Sabate M, Coll de Tuero G et al. Prevalence of occult chronic kidney disease and associated variables in a population of patients with type 2 diabetes. *Med Clin (Barc)*. 2010; 134:239-245
19. Yokoyama H, Sone H, Oishi M et al. Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes; the Japan Diabetes Clinical Data Management study (JDDM15). *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24: 1212-1219

Z neskončno skrbjo.  
In neustrašnim delom.  
**Spreminjamo življenja.**

biogen idec®

**AVONEX**  
(interferon beta-1a)

**TYSABRI**  
(natalizumab)

**fampyra 10 mg**  
aktivna sestavina: fampiridin

Biogen Idec d.o.o. | Ameriška ulica 8 | 1000 Ljubljana  
Tel.: +386(0)1 511 02 90 | Fax.: +386(0)1 511 02 99 | [www.biogenidec.si](http://www.biogenidec.si)

Samo za strokovno javnost.



# PREBRALI SMO ZA VAS SHORT PHARMA NEWS

UREDILA:

prof. dr. Borut Štrukelj  
Lidija Gerzej, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

## BOLNIKI Z RAKOM PROSTATE POGOSTEJE ZBOLJO ZA MELANOMOM

Skupina raziskovalcev iz zveznega instituta za preiskovanje raka v ZDA (National Cancer Institute) je v znanstveni reviji Journal of Clinical Oncology objavila obširno študijo na osnovi skoraj tridesetletnega spremljanja bolnikov z rakom prostate in sočasno pojavnostjo drugih vrst raka. Združili so rezultate dveh študij, kjer so v prvi študiji od leta 1986 spremljali več kot 42.000 bolnikov z rakom prostate in pojavnostjo melanoma, v drugi študiji pa so od leta 1982 z enakimi kriteriji analizirali več kot 18.000 bolnikov z rakom prostate. V obeh študijah skupaj so zabeležili več kot 700 primerov pojava melanoma, kar je približno 2 x več od primerljive populacije, ki ni zbolela za rakom prostate.

Dvakrat večjo verjetnost, da bo bolnik, ki ima raka prostate, zbolel za melanomom, razlagajo z visoko vsebnostjo androgenih hormonov, saj so obenem opazili tudi večjo pojavnost aknavosti, ki je posledica povečane aktivnosti androgenih hormonov. Po zdravljenju raka na prostati se je tudi aknavost bistveno zmanjšala. Obenem raziskovalci ugotavljajo, da pri bolnikih z rakom prostate ni večje verjetnosti, da bi zboleli še za kako drugo obliko raka, primer-

jalno z ostalo populacijo. Na osnovi obeh obširnih raziskav sklepajo, da je pojav melanoma povezan tudi z vsebnostjo in delovanjem androgenih hormonov.

*Vir: Wen-Qing Li, Abrar A. Quershi, Jing Ma e tal. Personal History of Prostate Cancer and Increased Risk of Incident Melanoma in the United States. Journal of Clinical Oncology on line, 2. november 2013*

## KLARITROMICIN IN ZAVIRALCI KALCIJEVIH KANALČKOV SO LAHKO USODNA KOMBINACIJA

V najnovejši izdaji prestižne znanstvene revije JAMA so raziskovalci Univerze v Ontariju, skupaj s skupino znanstvenikov iz londonskega znanstvenega centra LHSC objavili izsledke, kjer ugotavljajo verjetno povezanost med številnimi hospitalizacijami in smrtnimi primeri zaradi sočasne uporabe klaritromicina in zaviralcev kalcijevih kanalčkov. Že dolgo je znano, da sta klaritromicin in eritromicin (ne pa azitromicin) močna zaviralca citokromskih encimov, predvsem CYP 3A4. Ker so zaviralci kalcijevih kanalčkov (amlodipin, felodipin, verapamil, nifedipin, diltiazem in drugi) podvrženi metabolizmu encimske skupine CYP 3A4, lahko naraste koncentracija zaviralcev kalcijevih kanalčkov v krvi celo na vrednosti, ki so do petkrat višje od maksimalne dovoljene koncentracije, kar vodi do močnih neželenih učinkov s hipotenzijo in celo smrtjo. V retrospektivni pregled so vključili 96.226 bolnikov s povprečno starostjo 76 let, ki so poleg stalnega zdravljenja z zaviralci kalcijevih kanalčkov zaradi akutnega vnetja prejeli klaritromicin in 94.083 bolnikov (povprečna starost: 76 let), ki so prejeli azitromicin v letih od 2004 do 2012. V več kot 50 odstotkih je bil izmed zaviralcev kalcijevih kanalčkov predpisan amlodipin. Zaradi sočasne uporabe klaritromicina in zaviralcev kalcijevih kanalčkov je bilo 420 bolnikov hospitaliziranih zaradi akutne odpovedi ledvic kot posledica močne hipotenzije, v času akutnega zdravljenja s klaritromicinom pa so zabeležili 984 (1,02 %) smrtnih primerov. Pri uporabi azitromicina in sočasnem jemanju zaviralcev kalcijevih kanalčkov je bilo zaradi akutne odpovedi ledvic hospitaliziranih 208 bolnikov in v času sočasnega zdravljenja zabeleženih 555 smrtnih primerov (0,59 %). Raziskovalci opozarjajo, da kljub znani neželeni interakciji med klaritromicinom ali eritromicinom in zaviralci kalcijevih kanalčkov, ki lahko vodijo do močne

hipotenzije, akutne odpovedi ledvic in smrti, zdravniki še vedno predpisujejo nevarno sočasno terapijo.

Vir: Sonja Gandhi, Jamie L. Fleet, David G. Bailey et al : Calcium-Channel Blocker-Clarithromycin Drug Interactions and Acute Kidney Injury. JAMA on line, 9. november 2013.

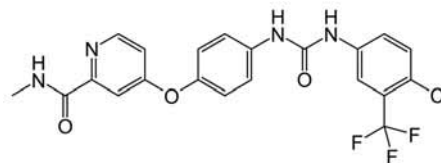
## ROSIGLITAZON VAREN, SAJ NE POVEČUJE VERJETNOSTI ZA SRČNI NAPAD

Novembra je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) izdala sklep o novih spoznanjih glede neželenih učinkov rosiglitazona na srčnožilni splet, kar je bilo ugotovljeno v klinični študiji z imenom RECORD (Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes and Regulation of Glycemia in Diabetes). Tako raziskovalci ugotavljajo, da je rosiglitazon varnejša zdravilna učinkovina glede neželenih učinkov na srce in ožilje, kot je bilo leta 2007 ugotovljeno v metaanalizi na osnovi prvih kliničnih študij. V študiji RECORD tako ugotavljajo, da bolniki, ki prejemajo rosiglitazon, niso podvrženi nič večji verjetnosti nenadnih srčnih dogodkov ali smrti, v primerjavi z bolniki, ki prejemajo druge peroralne antidiabetike. Kot pravi dr. Janet Woodcock, direktorica centra za vrednotenje in razvoj zdravil pri FDA, bo agencija v najkrajšem času spremenila navodila za predpisovanje in uporabo rosiglitazona in umaknila nekatera opozorila glede povečanih neželenih učinkov na srce in ožilje. Spomnimo, Evropska agencija za zdravila (EMA) je ravno zaradi omenjenega srčnožilnega tveganja pred tremi leti predlagala začasni odvzem dovoljenj za promet z zdravili, ki vsebujejo rosiglitazon. V EU je ukinitvev dovoljenj za promet za ta zdravila zaenkrat še vedno v veljavi, pričakujemo pa, da bo na osnovi vloge imetnika dovoljenja za promet tudi EMA kmalu obravnavala ponovno vključitev rosiglitazona v terapijo

VIR: FDA, Sporočilo za javnost, 25. november 2013  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000268/human\\_med\\_000662.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000268/human_med_000662.jsp&mid=WC0b01ac058001d124); dostop 3. december 2013

## FDA ODOBRILO UPORABO SORAFENIBA ZA ZDRAVLJENJE NAPREDOVANEGA RAKA ŠČITNICE

Sorafenib (slika 1) je nizkomolekularni, sintezni zaviralec tirozinskih in Raf kinaz, posredno pa se z uporabo sorafeniba upočasnjuje tudi intracelularna MAP kinazna kaskadna prožitev. V EU je sorafenib indiciran za zdravljenje bolnikov s karcinomom jeter in za bolnike z napredovalim karcinomom ledvičnih celic, pri katerih je bilo predhodno zdravljenje z interferonom alfa ali interlevkinom-2 neuspešno ali za katere je ocenjeno, da tako zdravljenje za njih ni primerno.



Slika 1: Molekula sorafeniba

V tretji fazi kliničnega testiranja pa je tudi kombinacija sorafeniba in temsirolimusa v zdravljenju glioblastomov. Neželeni učinki sorafeniba so predvsem kožni izpuščaji z močnim srbenjem, povišan krvni tlak in driska, v manjši meri pa beležijo tudi zmerno eritrocitozo.

22. novembra 2013 je FDA odobrila indikacijo sorafeniba pri napredovanem metastatskem raku ščitnice. Zvezni urad za raka (National Cancer Institute) ocenjuje, da bo v letu 2013 samo v ZDA 60.000 bolnikov diagnosticiranih z rakom ščitnice in približno 2000 jih bo v tem letu umrlo. Varnost in učinkovitost sorafeniba so ugotavljali v klinični študiji, v katero je bilo vključenih 417 bolnikov, ki se niso odzivali na zdravljenje z radioaktivnim pripravkom joda. Sorafenib je podaljšal fazo preživetja, ko rakave celice niso napredovale. V skupini, ki je bila zdravljena s sorafenibom, je bila faza latence dolga enajst mesecev, pri bolnikih, ki niso prejeli sorafeniba, pa le 6 mesecev. Imetnik dovoljenja za promet je že vložil vlogo za odobritev sorafeniba za omenjeno indikacijo tudi v EU. V kolikor bo EMA zdravilo potrdila tudi za zdravljenje metastatskega raka ščitnice, bo sorafenib za to indikacijo na voljo v prvi polovici leta 2014.

Vir: FDA, Sporočilo za javnost, 22. november 2013

## KORISTI UPORABE KOMBINIRANIH HORMONSKIH KONTRACEPTIVOV ŠE VEDNO ODTEHTAJO NJIHOVA TVEGANJA

Koristi uporabe kombiniranih hormonskih kontraceptivov pri preprečevanju neželenih nosečnosti so še vedno večje od tveganja za razvoj venske tromboembolije. Takšen je zaključek Odbora za oceno tveganja na področju farmakovigilance (PRAC) v okviru Evropske agencije za zdravila po pregledu podatkov o varnosti zdravil iz te skupine. Tveganje za razvoj tega zapleta je pri uporabi hormonskih kontraceptivov sicer malo višje, kakor pri populacij žensk, ki teh zdravil ne jemljejo in niso noseče. Tveganje je tudi odvisno od tipa progesterona v zdravilu. Zato PRAC zdravnikom priporoča, da ob predpisovanju kombiniranih hormonskih kontraceptivov upoštevajo tveganja, ki se skozi čas spreminjajo, uporabnice pa bolje poučijo o možnem tveganju za razvoj venske tromboembolije ter jih opozorijo na znake in simptome tega zapleta. Med uporabnice z višjim tveganjem sodijo uporabnice s prekomerno težo, kadiilke, ženske z višjo starostjo, ženske z migrenami, ženske, ki so rodile v preteklih tednih, in tiste, ki imajo vensko tromboembolijo v družinski anamnezi. Uporabnice je treba seznaniti, da morajo v primeru simptomov in znakov venske tromboembolije, ki vključujejo bolečino ali oteklino noge, nenadno nepojasnjeno zasoplost, hitro dihanje ali kašelj, bolečine v prsnem košu, šibkost ali omrtvičenost obraza, roke ali noge, takoj poiskati zdravniško pomoč.

Tveganje za vensko tromboembolijo je najmanjše pri kontraceptivih, ki vsebujejo progesterone levonorgestrel, norgestimat in noretisteron, in sicer 5-7 primerov na 10.000. Pri progesteronih etonogestrel in norelgestromin je bilo ocenjeno tveganje na 6-12 primerov na 10.000, pri gestodenu, dezogestrelu in drospirenonu pa 9-12 primerov. Za kontraceptive, ki vsebujejo klormadinon, dienogest in norgestrol, pa se še načrtujejo in izvajajo dodatne raziskave, saj je podatkov za primerjavo tveganj z ostalimi kontraceptivi še premalo. Pri ženskah, ki ne uporabljajo kombiniranih hormonskih kontraceptivov in niso noseče, je pojavnost venske tromboembolije 2 primera na 10.000 žensk.

Vir: EMA, Sporočilo za javnost, 22. november 2013

## NAVZDOL OBRNjen ČRN TRIKOTNIK (▼) – NOVA OZNAKA NA ZDRAVILIH ZA SPODBUJANJE POROČANJA NEŽELENIH UČINKOV

Na nekaterih zdravilih se od letošnje jeseni v navodilih za uporabo in povzetkih glavnih značilnosti zdravila pojavlja nova oznaka - navzdol obrnjen črn trikotnik. S to oznako bodo odslej opremljena vsa zdravila, ki sodijo v t.i. skupine zdravil, ki se še posebej pozorno spremljajo. Gre za enega od ukrepov nove evropske zakonodaje na področju farmakovigilance. V skupini zdravil, ki bodo imela oznako in napis "▼ - Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti", so predvsem novejša zdravila. Sem se tako uvrščajo zdravila, ki so dovoljenje za promet pridobila v letu 2011 in kasneje. Omenjeno oznako bodo nosila tudi zdravila, za katera zaradi specifičnih razlogov v obdobju pred pridobitvijo dovoljenja za promet ni bilo mogoče zbrati dovolj podatkov o varnosti oziroma zdravila, pri katerih se je proizvajalec zavezal, da bo izvedel še dodatne klinične raziskave za pridobitev dodatnih podatkov o dolgotrajnem jemanju ali za detekcijo redkega neželenega učinka. Nova oznaka nika- kor ne pomeni, da ta zdravila niso varna. Namen oznake je spodbuditi zdravstvene delavce ter uporabnike zdravil, da pri teh zdravilih še bolj dosledno poročajo neželene učinke zdravil, kadar do njih pride. Vsa zdravila se po dajanju na trg EU pozorno spremlja, ta, označena s črnim trikotnikom, pa se bo spremljalo še bolj natančno. Podatki, pridobljeni iz spontanega poročanja, iz okolja, kjer zdravilo jemlje večja in predvsem bolj raznolika populacija kot med kliničnimi raziskavami, so namreč zelo pomembni in prispevajo k popolnejši sliki razmerja varnosti in učinkovitosti posameznega zdravila. Ob morebitnih novih podatkih se nato lahko posodobijo navodila za uporabo z namenom varnejše in učinkovite uporabe zdravila. V Sloveniji zdravstveni delavci neželene učinke poročajo Centru za zastrupitve, ki deluje na UKC Ljubljana oziroma Agenciji za zdravila in imetniku dovoljenja za promet. Poimenski seznam zdravil, ki se še posebej pozorno spremljajo, bo Evropska agencija za zdravila mesečno posodabljala in objavljala na svoji spletni strani.

Vir: EMA, Sporočilo za javnost, 1- oktober 2013





## ZDRAVILA V KOŠ IN RAJE SAMO K TELOVADBI?

Metaepidemiološka raziskava, objavljena v ugledni britanski reviji *British Medical Journal*, je pokazala, da ima lahko telesna vadba podoben vpliv na zmanjšanje umrljivosti v sekundarni preventivi pri koronarni bolezni srca ter pri preprečevanju sladkorne bolezni kot zdravljenje z zdravili. Pri bolnikih, ki okreva po možganski kapi, pa se telesna vadba kaže celo bolj učinkovita kot zdravila. Ugotovitve temeljijo na metaanalizah 305 kontroliranih raziskav zdravljenj in/ali telesne vadbe, ki so vključevale 339.274 udeležencev. Poleg vpliva zdravil so nekatere raziskave vključevale različne vrste vadb glede na skupino vključenih bolnikov, kardiorespiratorno vadbo pri bolnikih s koronarno boleznijo srca, telesna dejavnost pa je bila del večkomponentne spremembe življenjskega sloga za preprečevanje sladkorne bolezni pri bolnikih z moteno toleranco za glukozo. Bolniki po možganski kapi so bili vključeni v vadb, ki je vključevala kombinacijo vaj za moč in kardiorespiratornih vadb za zmanjšanje njihove invalidnosti, odvisnosti ter smrtnosti. Bolniki s srčnim popuščanjem so bili vključeni v aerobne vadb in vadb vzdržljivosti. Raziskovalci so ugotovili, da telovadba pri koronarni srčni bolezni zmanjšuje tveganje za smrt v enaki meri kot statini, blokatorji receptorjev beta, inhibitorji ACE in antitrombotiki. Pri bolnikih v stanju pre-diabetesa jasnega vpliva na zmanjšanje umrljivosti niso pokazali niti inhibitorji alfa-glukozidaze, tiazolidioni, inhibitorji ACE, glinidi, niti telesna vadba. Le-ta pa je bila signifikantno bolj učinkovita pri zmanjševanju umrljivosti pri bolnikih po možganski kapi, pri preprečevanju druge kapi pa je bila bolj učinkovita kot antikoagulantni in antitrombotiki. Pri bolnikih s srčnim popuščanjem pa so se najboljše odrezali diuretiki v primerjavi s telesno vadbo, zaviralci ACE ali blokatorji receptorjev angiotenzina.

Pomenljivo je tudi dejstvo, da je bilo v zgornjo analizo 305 raziskav vključenih zgolj 57 raziskav s 14.716 udeleženci, ki so bile posvečene preučevanju učinkov telesne vadbe, kar nakazuje na dejstvo, da se raziskovalci morda preveč osredotočajo na raziskovanje učinkov farmakološke obravnave in podcenjujejo ali celo ignorirajo ugodne učinke, ki jih kaže telesna vadba na zdravje. Avtorji raziskav upajo, da bodo te ugotovitve v prihodnosti spodbudile več dobro zasnovanih primerjalnih raziskav potenciala telesne vadbe kot možnosti zdravljenja na različnih terapevtskih področjih. Pa ne samo vadb, temveč tudi drugih sprememb življenj-

skega sloga, kot so prehrana, prenehanje kajenja in psihosocialne intervencije.

### Viri:

1. H- Naci, J. P. A Ioannidis: *Comparative effectiveness of exercise and drug interventions on mortality outcomes: metaepidemiological study*; *BMJ* 2013;347:f5577
2. M. Mitka: *Exercise May Match Medication in Reducing Mortality Associated With Cardiovascular Disease, Diabetes*; *JAMA*. 2013;310(19):2026-2027

*Zdaj pa izkoristite sporočilo te zadnje novičke in zaprite Farmaceutski vestnik, saj ste že pri koncu, ter posvetite naslednjih 45 minut, da razgibate svoje telo. Kako? Na vam najljubši način.*



# NOVI DOKTORJI ZNANOSTI

## NEW DOCTORS OF SCIENCE

UREDILA:

asis. dr. Janja Zupan, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

dr. ANJA PIŠLAR, mag. farm.

### URAVNAVANJE NEVROTROFIČNE AKTIVNOSTI Y-ENOLAZE S PROTEOLITIČNIMI ENCIMI IN POMEN PRI NEVRODEGENERATIVNIH BOLEZNIH

Mentor: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Somentorica: doc. dr. Nataša Obermajer, mag. farm.

Anja Pišlar je v okviru doktorskega dela preučevala delovanje gama enolaze v nevronskih celicah v odvisnosti od delovanja cisteinske karboksipeptidaze katepsina X. Gama enolaza izkazuje glikolitično aktivnost, v zadnjem času pa je bilo ugotovljeno, da je tudi pomemben nevroprotektivni dejavnik in da vzpodbuja tvorbo nevritov, ki so ključni za delovanje živčnega sistema. Nevrotrofično delovanje izkazuje C-konec molekule, ta pa je lahko tarča katepsina X, ki s proteolizno cepitvijo izniči nevrotrofično delovanje gama enolaze. Anja Pišlar je raziskala molekularne mehanizme te regulacije. Odkrila je, da proteolitska cepitev C konca prepreči vezavo gama enolaze na prenašalni protein gama sintrofin. Na ta način gama enolaza ne preide iz ci-

toplazme na plazemsko membrano in ne ojača signalnih poti, ki jih preko Trk receptorja sprožajo nevrotrofični rastni dejavniki. Nevroprotektivno vlogo gama enolaze je dokazala tudi na in vivo mišjem modelu Alzheimerjeve bolezni, kjer celice mikroglije v okolici amiloidnih plakov izločajo veliko količino gama enolaze, ki lahko zaščiti še žive nevronske celice pred toksičnim delovanjem amiloid beta peptida, katepsin X pa to zaščitno delovanje izniči. Patološko delovanje katepsina X je dokazala tudi na celičnem modelu Parkinsonove bolezni, kjer je ta encim pomemben v apoptozi dopaminergičnih nevronov. Poznan mehanizem nevrotrofičnega delovanja gama enolaze in pa vloga katepsina X v neurodegenerativnih procesih omogoča uporabo aktivnih peptidov, ki posnemajo C konec gama enolaze in pa inhibitorjev katepsina X pri zaščiti nevronov, to pa predstavlja nov korak v razvoju učinkovin za zdravljenje neurodegenerativnih bolezni. Dr. Anja Pišlar je rezultate doktorskega dela do sedaj objavila v štirih člankih v revijah z dejavnikom vpliva, tudi v reviji, ki je prva na področju, kar nekaj člankov pa je še v različnih fazah objavljanja.

dr. ROMANA ROŠIČ, mag. farm.

### NAČRTOVANJE, IZDELAVA IN VREDNOTENJE BIOKOMPATIBILNIH NANOVLAKEN Z METODO ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Somentorica: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Disertacija Romane Rošič predstavlja aktualne vsebine s področja nanoznanosti oz. nanotehnologije, natančneje biokompatibilnih nanovlačen, ki zaradi svoje sestave in strukturne zgradbe posnemajo osnovne gradnike izvenceličnega ogrodja tkiv in so tako potencialno primerna za razvoj dostavnih sistemov učinkovin, tkivnih nadomestkov in oblog za rane. Izdelava nanovlačen zahteva izviren postopek priprave, ki je specifičen za vsak polimer posebej, kot kažejo tudi dosedanji izsledki in dosežki v znanstveni literaturi. Za potrebe raziskovalnega dela je dr. Romana Rošič na UL FFA uvedla napravo in postopek za elektrostatsko



sukanje in sicer tako nadzor procesa kot mehanizem nastanka in si tako postavila platformo za lažjo izbiro materialov. Pri delu je uporabljala sodobne metode fizikalnega vrednotenja raztopin in nanovlaken, kot so različne metode vrednotenja reoloških lastnosti polimernih raztopin (rotacijski in oscilacijski testi, reološke meritve na mejnih površinah, kapilarni in vibracijski viskozimetri), določanje specifične električne prevodnosti, površinske napetosti in gostote raztopin, ozkokotno rentgensko sipanje, vrstični elektronski mikroskop, infrardeča spektroskopija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, statistične in korelacijske metode. Raziskovalno je največ delala v laboratorijih UL FFA, specifične instrumente je koristila na FKKT, napravo za ozkokotno rentgensko sipanje in SEM pa na Kemijskem inštitutu.

Doktorandka je v celoti uspela raziskati in potrditi hipoteze:

- izbira izhodnih polimernih raztopin in procesnih parametrov elektrostatskega sukanja je ključna za uspešno izdelavo nanovlaken,
- izbor polimera in njegove lastnosti vplivajo na morfologijo nastalih nanovlaken,
- izdelana nanovlakna predstavljajo ustrezno oporo celicam za rast v kroničnih ranah in vzdržujejo vlažno mikrookolje,
- v nanovlakna lahko vgradimo različne zdravilne učinkovine in tako izdelamo učinkovit dostavni sistem.

Izbrano raziskovalno področje in dobljeni odlični rezultati so zanimivi za širšo raziskovalno skupnost doma in v tujini. Raziskave je dobro načrtovala in opredelila hipoteze in cilje celovito in tehnično natančno izvedla raziskovalno delo, objektivno analizirala in interpretirala podatke in s tem dobila inovativne ugotovitve.

Disertacija predstavlja izviren in pomemben znanstveni prispevek k proučevanju tehnološkega postopka za izdelavo nanovlaken in vrednotenja lastnosti polimernih raztopin za uspešno izvedbo elektrostatskega sukanja. Poleg tega so njeni rezultati neposredno uporabni za gospodarstvo in podajajo smernice za uspešnejši in hitrejši začetek dela na področju izdelave nanovlaken.

Zaenkrat so se kot najodmevnejši izkazali rezultati objavljeni v reviji *European Polymer Journal* (2012, 48: 1374-1384). Predstavljajo namreč izjemne izsledke, ki kažejo, da so polimerne raztopine primerne za elektrostatsko sukanje le takrat, kadar tvorijo prevodne nestrukturirane disperzije, ki izkazujejo bistveno večjo stopnjo plastičnosti kot elastičnosti tako v notranjosti raztopine kot na mejni površini. Doktorandka je kot prva dokazala, da interfacialne reološke

lastnosti, v primerjavi z »bulk« reološkimi lastnostmi, izkazujejo bistveno boljše napovedno vrednost za uspešno izvedbo elektrostatskega sukanja. Objava rezultatov je dosegla izjemno odmevnost, saj se je članek že takoj po objavi (julij-september 2012) uvrstil na 7. mesto med najbolj iskanimi članki v reviji *European Polymer Journal* in ostal na elitnem seznamu tudi v naslednjih dveh trimesečjih (vir *Sciencedirect Top 25*). Zanimivost in perspektivnost objavljenih rezultatov potrjuje tudi dejstvo, da je bil članek objavljen k objavi na spletni strani *Advances in Engineering* ([www.advancesinengineering.com](http://www.advancesinengineering.com)), saj je uredniški odbor ocenil, da so izsledki raziskave izrednega pomena za področje inženirstva in inovativnih tehnologij. Dr. Romana Rošic ima v Cobiss bazi podatkov bibliografskih enot 7 znanstvenih člankov in sicer 6 v revijah s faktorjem vpliva, od tega 3 v A1 skupini. Rezultate je predstavila tudi na številnih mednarodnih znanstvenih srečanjih in 2 podiplomskih seminarjih za študente (Lyon, francija, Saarbrücken, Nemčija). Odmevnost raziskovalnega dela, izražena s številom citatov v Scopus, je 14 (10. 6. 2013).

**dr. MARTINA HRAST, mag. farm.**

## NAČRTOVANJE IN SINTEZA INHIBITORJEV LIGAZ MUR IN D-ALANIL-D-ALANIN LIGAZE

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Dr. Martina Hrast je zaključila doktorsko disertacijo z naslovom Načrtovanje in sinteza inhibitorjev ligaz Mur in D-alanil-D-alanin ligaze. Prekomerna in nepravilna uporaba protibakterijskih učinkovin je privedla do razvoja številnih rezistentnih oblik bakterijskih sevov, ki predstavljajo vedno večji globalni zdravstveni problem. V zadnjih letih zato poteka intenzivno iskanje novih protibakterijskih učinkovin z novimi, do sedaj neizkoriščenimi mehanizmi delovanja. Ena od pomembnejših tarč za razvoj protibakterijskih učinkovin je bakterijska celična stena oziroma encimi, ki sodelujejo v njeni biosintezi. Martina Hrast se je v svoji doktorski disertaciji osredotočila predvsem na encime, ki katalizirajo znotrajcelične stopnje biosinteze celične stene – ligaze Mur (MurC-MurF) in d-alanin-d-alanin ligazo (Ddl). Kandidatka je v okviru doktorata razvila dve večji seriji biološko aktivnih spojin. S pomočjo sofisticiranih računalniških metod, ki zajemajo kombinacijo virtualnega rešetanja in molekulske di-



namike, je razvila začetno serijo zaviralcev DdIB. Nekatere spojine zadetki iz te serije so ji služili kot izhodišče za načrtovanje in sintezo serije sorodnih spojin z izboljšanimi lastnostmi. Te spojine so imele zaviralno delovanje na DdIB v mikromolarnem koncentracijskem območju, nekatere med njimi pa tudi *in vitro* protibakterijsko delovanje. Druga serija spojin, ki jih je razvila doktorandka, so derivati cianotiofena, ki delujejo kot zaviralci MurF. Pri tej seriji je potrebno izpostaviti, da gre za zaviralce ligaze MurF iz različnih bakterijskih sevov (MurF iz *S. pneumoniae*, *E. coli* in *S. aureus*), kar do sedaj v literaturi še ni bilo opisano. V okviru sodelovanja z Inštitutom za strukturno biologijo iz Grenobla (Francija) je doktorandka uspela pridobiti kristale MurF iz *S. pneumoniae* v kompleksu z inhibitorjem in uspešno razrešiti kristalno strukturo do resolucije 1,9 Å. Na ta način je neposredno dokazala način vezave inhibitorja v aktivno mesto encima. Poleg omenjenega imajo nekateri zaviralci MurF iz tega razreda tudi *in vitro* protibakterijsko delovanje.

**dr. ZORAN HAM, mag. farm.**

## RAZISKAVE IN PRIPRAVA NOVIH TRDNIH OBLIK ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Mentor: prof. dr. Uroš Urleb, mag. farm.

Polimorfizem učinkovin je zelo pomemben za biološko uporabnost in zagotavljanje učinkovitosti, varnosti in kakovosti zdravil. Proces kristalizacije ima na koncu sintezne poti ključno vlogo pri kontroli kristalne oblike, distribucije velikosti delcev, oblike in morfologije kristalov in kristalitev. Kandidat je pripravil nove trdne oblike več zdravilnih učinkovin, definiral sintezne postopke in ključne parametre, ki vplivajo na njihovo pripravo in jih ovrednotil z različnimi fizikalno kemijskimi tehnikami. Za določitev kristalnih oblik vseh zdravilnih učinkovin je uporabili rentgensko praškovo difrakcijo. Termodinamske lastnosti trdnih oblik učinkovin je ovrednotil z diferenčno dinamično kalorimetrijo, z infrardečo in Ramansko spektroskopijo je pokazal razlike med trdnimi oblikami na molekularnem nivoju, z elektronsko mikroskopijo, dinamično sorpcijo vlage in določitvijo velikosti delcev je za različne učinkovine natančno določil morfološke značilnosti delcev in pokazal, da so nove trdne oblike učinkovin fizikalno stabilne in primerne za vgradnjo v kon-

čne farmacevtske oblike. Potrdil je, da na osnovi novih kristalnih struktur dobimo natančnejši vpogled v lastnosti spojine v trdnem stanju in v kemizem specifične spojine. Rezultate dela s področja teme doktorske disertacije je dr. Zoran Ham objavil v dveh znanstvenih člankih, pri katerih je prvi avtor, rezultati raziskav so opisani tudi v dveh podelejenih mednarodnih patentih.

**dr. UROŠ TRSTENJAK, mag. farm.**

## NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH INHIBITORJEV FAKTORJA XA IN ANTAGONISTOV GPIIb/IIIa KOT POTENCIALNIH DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Somentor: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

V okviru doktorskega dela je Uroš Trstenjak načrtoval, sintetiziral in biološko ovrednotil prve nizkomolekularne potencialne antitrombotične učinkovine z direktnim inhibitorynim delovanjem na faktor Xa in antagonističnim delovanjem na fibrinogeni receptor s Ki oziroma IC<sub>50</sub> vrednostmi v mikromolarnem območju. Spojini z najbolj uravnoteženo aktivnostjo na obeh tarčah sta izkazovali Ki (fXa) = 25.6 μM in IC<sub>50</sub> (GPIIb/IIIa) = 35.0 μM ter Ki (fXa) = 37.0 μM in IC<sub>50</sub> (GPIIb/IIIa) = 25.8 μM. Pripravil je tudi strukturno povsem nove submikromolarne antagoniste fibrinogenega receptorja z 1,2,4-oksadiazol-5(4H)-onskim obročem. Primerjava enantiomernih parov aktivnih spojin je pokazala, da so (R)-enantiomeri kot antagonisti fibrinogenega receptorja učinkovitejši od (S)-enantiomerov. Z zamenjavo morfolin-3-ona z 2-etoksikarbonilpiperidinom je selektivni direktni inhibitor faktorja Xa rivaroksaban pretvoril v dualni inhibitor faktorja Xa in trombina z razmeroma uravnoteženo nanomolarno aktivnostjo na obeh tarčah, dualno aktivnost pa je smiselno razložil s sidranjem v aktivni mesti obeh encimov. Dr. Uroš Trstenjak je v disertaciji razvil tudi sintezni poti za pripravo metil *N*-(4-nitrofenil)-3-oksomorpholin-2-karboksilata in izomernega etil *N*-(4-nitrofenil)-2-oksomorpholin-3-karboksilata, pri čemer je bila v obeh primerih

ključni korak z rodijevim(II) acetatom katalizirana reakcija intermolekularne vstavitve karbenskega intermedata v O-H oziroma N-H vez. Na podlagi izoliranega stranskega produkta pri sintezi omenjenih spojin je uspešno razvili še sintezno pot za pripravo novih cikličnih aminokislin z N,O-acetalnim strukturnim motivom, pomembnih za pripravo peptidomimetikov. Doktorska disertacija Uroša Trstenjaka, ki je napisana v obliki poglavij, poleg dveh objavljenih odmevnih preglednih člankov s področja disertacije vsebuje tri objavljene oz. v objavo sprejete originalne znanstvene članke v uglednih mednarodnih znanstvenih revijah in dva rokopisa člankov poslana v objavo v mednarodne znanstvene časopise.

---

**dr. UROŠ KLANČAR, mag. farm.**  
**RAZVOJ FIZIOLOŠKO  
RELEVANTNIH METOD  
PRESKUSA RAZTAPLJANJA  
HIDROFILNIH OGRODNIH  
TABLET Z UPORABO  
FARMAKOPEJSKIH NAPRAV  
TER NJIHOVIH MODIFIKACIJ**

Mentorica: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Somentor: viš. razv. sod. dr. Igor Legen, mag. farm.

Doktorska disertacija Uroša Klančarja sodi na področje farmaceutске tehnologije in je primer dobrega sodelovanja med Univerzo in gospodarstvom. Glavni cilj naloge je bil s pomočjo različnih farmakopejskih naprav za preskuse sproščanja ter njihovih modifikacij ponazarjati različne vplive prebavnega trakta na hidrofilne ogrodne tablete s podaljšanim časom sproščanja zdravilne učinkovine. Tablete je preskušal v različnih *in vitro* preskusih, dobljene rezultate pa je primerjal z *in vivo* podatki izvedenih farmakokinetičnih študij bioekvivalence. Kandidat je v svojem delu postavil 4 hipoteze, na katere je odgovoril z raziskavami, objavljenimi v dveh znanstvenih člankih ter enem, ki je poslan v objavo.

V prvi študiji objavljeni v reviji s faktorjem vpliva nad 5 je kandidat na primeru ogrodnih tablet na osnovi hidroksipro-

pilmetil celuloze predstavil razvoj fiziološko relevantne in diskriminatorne metode preskusa sproščanja modelne učinkovine s slabšo topnostjo. Ugotovil je, da je mehanizem sproščanja pretežno erozijsko nadzorovan, zato na profil sproščanja v tem primeru vplivajo predvsem mehanske obremenitve v okolici tablete. V ta namen je razvil novo *in vitro* metodo, kjer je združil uporabo plastičnih kroglic z napravo 3 po USP. *In vivo* relevantnost nove metode je potrdil tudi z uporabo koncepta *in vitro* - *in vivo* korelacije, kjer je dokazal najvišjo stopnjo korelacije A. Svojo inovacijo ima zaščiteno tudi z mednarodnim podeljenim patentom.

Dr. Uroš Klančar se je tudi v drugi študiji ukvarjal s pospevanjem mehanskih obremenitev na tableto pri potovanju skozi prebavni trakt in z načrtovanjem robustnih tablet. Pri tem je robustnost ogrodnih tablet povezal z intrinzično viskoznostjo uporabljenega polimera ter jo koreliral z mehansko občutljivostjo. Slednjo je vrednotil med samim preskusom sproščanja tako, da je ob določenem času tablete dodatno obremenil s steklenimi kroglicami in s tem ponazoril prehod tablete iz želodca v dvanajstnik, za kar so značilne močne mehanske obremenitve. Tudi rezultati te raziskave so že objavljeni v reviji s faktorjem vpliva.

Doktorand Uroš Klančar ima v Cobiss bazi podatkov bibliografskih enot 2 izvirna znanstvena članka, eden je poslan v objavo, poleg tega ima objavljena 2 pregledna in en strokovni članek. Svoj originalni in inovativni pristop k delu pa kandidat dokazuje tudi kot soavtor dveh že podeljenih mednarodnih patentov in treh patentnih prijav.

---

**dr. ANA TORKAR, mag. farm.**  
**RAZVOJ SELEKTIVNIH  
INHIBITORJEV KATEPSINA L**

Mentor: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Somentorica: prof. dr. Tamara Lah Turnšek, univ. dipl. kem.

Ana Torkar je v okviru doktorskega dela pripravila nove selektivne inhibitorje katepsina L in iz njih izpeljane fluorescenčne sonde za določanje njegove encimske aktivnosti. Katepsin L se povečano izraža v nekaterih vrstah tumorjev, njegova vloga pri napredovanju raka pa še ni pojasnjena. Na podlagi že znanih struktur katepsinskih inhibitorjev in vezavnih mest je dr. Ana Torkar sintetizirala knjižnico 50 peptidamidnih molekul s sistematično spremenjenimi ve-



zalnimi mesti. Spojine, ki so izkazovale najboljšo selektivnost za katepsin L, je testirala na celičnih modelih glioblastoma in dokazovala vlogo katepsina L v celični apoptozi. Ugotovila je, da inhibitorji katepsina L povečajo celično apoptozo predvsem v prisotnosti arzenijevega trioksida ali drugih kemoterapevtikov, ki se uporabljajo pri zdravljenju raka. Z vstavitvijo fluorescenčne strukture na ogrodje inhibitorjev je pripravila sonde, primerne za detekcijo aktivne oblike katepsin L in vivo. Taka orodja so lahko zelo uporabna za opazovanje velikosti in invazivnih robov tumorjev, še posebej med njihovo kirurško odstranitvijo.

Dr. Ana Torkar je rezultate doktorskega dela do sedaj objavila v štirih člankih v revijah z dejavnikom vpliva, ter kot referate na mednarodnih znanstvenih srečanjih.

**dr. PETER NADRAH, mag. farm.**

## FUNKCIONALIZACIJA POROZNIH SILIKATNIH DELCEV ZA NADZOROVANO SPROŠČANJE UČINKOVIN

Mentor: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Somentor: prof. dr. Miran Gaberšček, univ. dipl. kem.

Dr. Peter Nadrah je v svojem doktorskem delu razvijal dostavne sisteme za nadzorovano sproščanje modelnih zdravilnih učinkovin v telesu. Osnovo sistemov so tvorili mezoporozni silikatni nanodelci funkcionalizirani z organskimi spojinami, ki omogočajo sproščanje modelnih učinkovin le v prisotnosti sprožitvenega dejavnika. V teh sistemih je učinkovina sorbirana v porah silikatnih delcev, njeno sproščanje pa uravnavajo molekularna vrata oz. zapiralne molekule, ki so vezane na zunanjo površino silikatnih delcev.

Kandidat je kot molekularna vrata najprej uporabil dendrimere različnih velikosti za nadzor sproščanja dveh modelnih učinkovin: dinatrijeve soli fluoresceina in karboksifluoresceina. Rezultati so pokazali, da je nadzor sproščanja mogoče doseči, če dendrimere na silikatne delce vežemo z disulfidnimi vezmi, ki se cepijo v prisotnosti reducenta kot sprožitvenega dejavnika. Poleg tega je ugotovil, da delci z manjšimi dendrimeri omogočajo sproščanje bistveno večje množine modelne učinkovine v primerjavi z večjimi dendrimeri.

V nadaljevanju je pripravil sisteme, kjer sta silikat in zapiralna molekula povezana z disulfidno vezjo. S tem je potrdil hipotezo, da je mogoče z uporabo različnih substituentov ob disulfidni vezi doseči različne kinetike sproščanja modelne učinkovine in hkrati doseči sproščanje le v prisotnosti sprožitvenega dejavnika ditiotreitola.

Razvil je tudi konjugate med mezoporoznimi delci in modelno učinkovino, ki je na silikatne delce vezana kovalentno in se sprošča ob prisotnosti endogenega reducenta glutathiona.

Dr. Peter Nadrah je razvil tudi nov sistem na osnovi mezoporoznih silikatov, ki omogoča vizualizacijo nastopa sprožitvenega dejavnika. Delci postanejo fluorescenčni ob dodatku reducenta kot dejavnika. To pri raziskovanju opisanih terapevtskih sistemov omogoča enostavno spremljanje nastopa dejavnika, ki lahko hkrati sproži tudi sproščanje učinkovine.

Rezultate svojega dela je objavil v štirih člankih v mednarodno priznanih revijah s faktorjem vpliva.

# IZ DRUŠTVENEGA ŽIVLJENJA ACTIVITIES OF THE SOCIETY

UREDILE:

Asist. Maja Jošt, mag.farm., spec.<sup>1</sup>

Simona Mitrovič, mag.farm., spec.<sup>2</sup>

Tajda Miharija Gala, mag.farm., spec.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

<sup>2</sup> Lekarna Univerzitetni klinični center Ljubljana

## POROČILO S 43. GENERALNE SKUPŠČINE EAHP – IZVEDENI IN NAČRTOVANI PROJEKTI NA PODROČJU BOLNIŠNIČNE FARMACIJE V DRŽAVAH ČLANICAH EAHP V LETIH 2012/2013 IN 2013/2014

Na generalni skupščini (GS) EAHP letos junija v Atenah smo v dveh dneh zelo polnega programa obravnavali predstavitev različnih aktivnosti, ki so potekale v okviru EAHP v letu 2013 ter se seznanili z načrti za leto 2014.

**Splošni del ali delovanje EAHP na področju »politike«**  
Predstavitev predsednika Roberta Frontinija je zajemala politične aktivnosti, ki sta jih izvedla z lobistom Richardom

Priceom na področju priznavanja specializacije iz bolnišnične farmacije in uvedbe črtnih kod na posamezno enoto zdravila (single unit), ki se uporabljajo v naprednejših bolnišnicah. Njuno delo je bilo poleg tega usmerjeno tudi v sodelovanje s sorodnimi organizacijami: EMA (sodelovanje bolnišničnih farmacevtov na področju kliničnih študij), EDQM (področje ponarejenih zdravil), EPSA (vključevanje študentov v delo EAHP), Europharm Forum (sodelovanje bolnišničnih farmacevtov in farmacevtov javnih in zasebnih lekarn), PGEU (skupna izjava o bodoči vlogi farmacevtov zlasti v kliniki). Predsednik je predstavil tudi dva projekta, in sicer »Survey EAHP 2010«; raziskavo o stanju bolnišnične farmacije v državah članicah, ki se je zaključila z objavo 5 člankov in brošuro. Drugi projekt »European Summit on Hospital Pharmacy«, katerega načrtovanje se je začelo v letih 2012/2013, bo izveden v maju 2014. Na tem srečanju bo ob sodelovanju združenj zdravnikov, medicinskih sester in bolnikov oblikovan jasen okvir razvoja bolnišnične farmacije v Evropi, ki bo temeljil na t.i. Baselskih izjavah iz leta 2008 (*FIP Basel statement*) in t.i. *PPMI modelu*, ki ga je leta 2010 sprejelo Ameriško združenje farmacevtov v zdravstvenem sistemu (*ASHP Dallas Summit*).

V nadaljevanju so nam svoje delo v preteklem letu predstavili še vodja administrativnega osebja in finančni direktor EAHP, predvsem glede organizacije kongresov, akademij in ostalih srečanj, strokovnega glasila EJHP, kot tudi glede vodenja računovodstva in finančnega poročila za preteklo leto ter predvidenih stroškov in prihodkov za leto 2013/2014. Svoj pogled na finančno poročilo sta predstavila tudi dva delegata, ki sta opravila svoje delo kot notranja revizorja.

## NOVOSTI V POSAMEZNIH DRŽAVAH V PRETEKLEM LETU

Sledila je kratka, a zelo zanimiva predstavitev dosežkov bolnišnične farmacije v posameznih državah članicah v preteklem letu. Svoja poročila so predstavile vse države, ki so se udeležile GS, to je 29 držav od skupno 32 članic EAHP. Delovanje bolnišničnih farmacevtov poteka na zelo različnih nivojih, od prizadevanj za priznanje, da je bolnišnični farmacevt enakopraven poklic v zdravstvu (zdravstveni delavec), do sodelovanja pri zakonskih podlagah na področjih zdravil in medicinskih pripomočkov. V večini držav so bolnišnični farmacevti organizirali različne oblike strokovnih izobraževanj, kot so npr. simpoziji, e-izobraže-



vanje. Teme, s katerimi so se spopadli v različnih državah, so bile tudi:

- Opozarjanje na težave glede pomanjkanja zdravil
- Prenove študijskih programov (zlasti na področju specializacije) in predmetnikov dodiplomskega študija
- Sodelovanje pri nacionalnih projektih za zagotavljanje varnosti bolnikov, predvsem na področju onkologije, uporabe zdravil pri starejših bolnikih, uporabe zdravil s podobnim videzom in/ali imenom,...
- Uporaba črtnih kod ob postelji bolnika z vidka razvoja sistemov za zmanjševanje napak, povezanih z zdravili, kot tudi z vidika preprečevanja uporabe ponarejenih zdravil
- Postavitev kazalnikov kakovosti v sklopu farmacevtske skrbi
- Ureditev delovanja bolnišničnih farmacevtov v sklopu akreditacij bolnišnic.

V nekaterih državah (Velika Britanija, Nizozemska, Irska, Švica ...) neodvisno od modela specializacije iz bolnišnične farmacije, ki ga predlaga EAHP, pripravljajo nadgradnjo izobraževanja farmacevtov dodiplomsko in podiplomsko, predvsem z namenom povečanja kliničnih spretnosti ob zaključku izobraževanja. V Veliki Britaniji so farmacevti izpostavili tudi pomembnost vključevanja farmacevtskih tehnikov v procese v bolnišnicah in dekriminiziranja napak, povezanih z zdravili.

## SODELOVANJE PRI SKUPNIH PROJEKTIH ALI ZGOLJ ZAVEDANJE IZZIVOV?

V nadaljevanju GS so bile podrobneje predstavljene aktivnosti na področju priznavanja **specializacije iz bolnišnične farmacije**. Farmacevti predstavljajo enega od 7 poklicev (poleg zdravnikov, osebja zdravstvene nege, zobozdravnikov, babic, arhitektov in veterinarjev), ki so trenutno »avtomatsko« priznani v vseh državah EU. Vendar pa so le pri dveh poklicih (zdravniki, zobozdravniki) priznane tudi posamezne specialnosti (npr. kardiologija). EAHP si je pri Evropskem parlamentu prizadeval za dopolnilo direktive, ki bi omogočala priznanje specializacije iz bolnišnične farmacije med državami članicami in v oktobru so bili sprejeti predlagani amandmaji. Osnova za specializacijo iz bolnišnične farmacije bo predstavljal t.i. common training framework, ki ga bo EAHP zasnoval in predlagal na osnovi dosedanjih podatkov o že obstoječih specializacijah v državah članicah in raziskovalnem projektu Pharmine iz leta 2011. K sodelovanju pri oblikovanju tega modela, ki

se bo začelo predvidoma konec leta 2013, so povabljene vse države članice.

Zelo pereč problem v vseh državah članicah je tudi  **uvedba črtnih kod na posamezno enoto zdravila**, ker industrija običajno ne kaže interesov za tovrstne spremembe. Pogovori potekajo med EAHP in EFPIA in EGA (evropski združenji proizvajalcev originatorskih in generičnih zdravil). EAHP je pobudnik sestanka med uporabniki (bolnišničnimi farmacevti), nacionalnimi agencijami in ministrstvi za zdravje ter predstavniki industrije, ki je bil v oktobru v Univerzitetni bolnišnici Leuven v Belgiji, kjer je bila predstavljena uporaba črtnih kod ob postelji pacienta.

Dotaknili smo se tudi aktivnosti na področju reševanja problema **globalnega pomanjkanja zdravil**, ki lahko nastane iz različnih razlogov (motnje v verigi preskrbe, proizvodnji, dostopnosti,...) ter **vpliva oblikovanja cen in povračila stroškov s strani zavarovalnic** na pomanjkanje zdravil. S pomanjkanjem zdravil so povezane tudi težave s t.i. paralelnim uvozom in izvozom zdravil predvsem pri zdravilih za redke bolezni.

Zanimiva je bila tudi izmenjava mnenj, ki je sledila predsednikovi predstavitvi **nove izjave EAHP glede medicinskih pripomočkov**. Ob predlogu, da EAHP podpre zahtevo po centralni avtorizaciji za medicinske pripomočke z visokim tveganjem, so nekateri delegati izrazili skrb glede primerne znanja in izobraževanja v zvezi z medicinskimi pripomočki. Predsednik je opozoril na različno stanje v državah članicah, saj so glede na raziskavo EAHP (Survey EAHP 2010) medicinski pripomočki v nekaterih državah (Francija, Italija) ena





od ključnih kompetenc bolnišničnih farmacevtov. Delegat iz Velike Britanije je utemeljil kompetenco za medicinske pripomočke z dejstvom, da so nekatere tekočine za intravenosko uporabo, ki so uvrščene med medicinske pripomočke, že v domeni številnih bolnišničnih farmacevtov.

Predstavljena je bila tudi **izjava o varčevalnih ukrepih**, pri kateri pa so delegati opozorili, da jo bo potrebno še dopolniti, še zlasti z vidika dobrobiti bolnikov, na katero varčevalni ukrepi lahko vplivajo v veliki meri.

GS se je nadaljevala z razpravo o **Direktivi o ponarejenih zdravilih**. V razvoju sta namreč dva ločena sistema za preverjanje verodostojnosti zdravil. Glavno vprašanje je bilo, kje naj poteka verifikacija zdravil v bolnišnicah (ob prevzemu v bolnišnični lekarni, ob odprtju pakiranja v bolnišnični lekarni, ob izdaji iz bolnišnične lekarne, ob aplikaciji ob postelji bolnika). Sistemi v razvoju so bolj osredotočeni na javne lekarne, kjer verifikacija poteka ob izdaji zdravil pacientu. Tovrstni sistemi so bili že vpeljeni v Turčiji, kjer pristnost zdravil preverjajo ob vstopu v bolnišnično lekarno, kar pa z vidika bolnišničnih farmacevtov pomeni zamuden proces (2 farmacevta v večjih bolnišnicah za polni delovni čas).

Seznani smo se tudi z napredkom **revije EJHP**, s pripravi na **izobraževalne teme** kongresov ter možnostmi za **pridobivanje izkušenj v posameznih bolnišnicah za študente**.

Naslednji dan smo, razdeljeni v več skupin, v sklopu delavnic predstavljeno tematiko obravnavali še podrobneje ter nato ugotovitve in predloge kratko predstavili preostalim delegatom.

Predstavili sta se tudi dve novi državi, članici EU, kandidatki za članstvo v EAHP, Malta in Romunija. Predstavitev je ponovno pokazala, da so med državami članicami precejšnje razlike glede stanja bolnišnične farmacije.

## KAJ PA BONTON?

Kar me je kot novinko na tovrstnih srečanjih pozitivno presenetilo izven strokovnih vsebin programa, je bila sama organizacija in potek GS. GS je potekala izjemno točno - vodila jo je slovenska predstavica v odboru, podpredsednica EAHP Tajda Miharija Gala.

Ker posamezni delegati predstavljajo svojo državo, tudi pri udeležencih ni bilo nobenega zamujanja ali izostajanja, izhodov na kratke ali dolge telefonske seanse, ali še celo te-

lefoniranja med programom, čemur smo čedalje pogosteje priča na izobraževanjih in sestankih. Večina delegatov zelo tekoče komunicira v angleščini, tudi delegati iz pregovorno šibkejših romansko govorečih držav niso prav nič zaostajali, prav nasprotno. Predstavitve so bile obvezno znotraj dovoljenih časovnih okvirov, diskusija pa, kljub različni razvitosti bolnišnične in klinične farmacije med državami, na enakopravnem nivoju, ne glede na položaj ali izkušnost delegatov. To pa je pravzaprav pogoj in dobra osnova za sodelovanje ter izmenjavo mnenj in idej.

## ZA KONEC...POZITIVNE STVARI, KI SE JIH LAHKO NAUČIMO

Predvsem zaradi vključenosti industrije kot sponzorjev in seveda velike ciljne publike, ki jo EAHP kongresi naslavljajo, tovrstna izobraževanja tudi izdatno finančno prispevajo k uspešnemu poslovanju organizacije. Pri tem se je sicer težko izogniti pomislekom glede (ne)odvisnosti predstavljanih tem, kar je bilo izpostavljeno tudi na GS. Vendar EAHP uspeva zadržati neodvisnost z doslednim upoštevanjem Kodeksa etike EAHP, to je z neodvisno izbiro tematike posameznih seminarjev in predavanj ter predavateljev. Pozitivna pa je že tudi sama misel, da je v gospodarsko težkih časih organizacija izobraževanj lahko finančno uspešna. Redni bralci EJHP (s trenutno majhnim faktorjem vpliva) opažamo, da se je s spremembo založnika (sedaj Skupina British Medical Journals, od januarja 2012) in novim urednikom (prejšnjim direktorjem UK Cochrane centra), dvignila kakovost prispevkov, ki sledijo aktualnim temam. Slovenska bolnišnična farmacija je bila že trikrat predstavljena v EJHP Country Focus, kjer smo sodelovali s prispevki o razvoju in aktivnostih bolnišnične in klinične farmacije v različnih slovenskih bolnišnicah. Še vedno pa ostaja vprašanje in opomnik vsem nam slovenskim farmacevtom, zakaj svojega dela, ki je po kakovosti nedvomno primerljivo z delom farmacevtov v ostalih državah članicah, ne zmoremo kronati tudi z objavo strokovnih in znanstvenih člankov v EJHP, ki bo sčasoma pridobil tudi na faktorju vpliva. EAHP je aktivna na številnih področjih, tako kot organizacija, kot tudi posamezne članice. V Sloveniji se srečujemo s podobnimi težavami in izzivi kot ostale članice. Žal pa možnosti izmenjave izkušenj ne izkoristimo in (ne samo v Sloveniji) izumljamo marsikaj od začetka, z izgovorom, da je naš položaj nekaj posebnega. Predstavitev delovanj posameznih držav je koristno zlasti z vidika izmenjave mnenj in sodelovanja - npr. pri zdravilih s podobnim imenom in videzom, dopolnjevanjem kompetenc,...



Tovrstna srečanja in priprava poročil je nedvomno koristna tako med državami, kot tudi med bolnišnicami (farmacevti) znotraj ene države. Vsakokrat, ko moramo pripraviti poročilo, kaj smo v preteklem letu naredili in se seznanjamo,

kako produktivni so bili kolegi iz drugih držav, si lahko ob pravem odmerku samokritike in samozavesti postavimo nove temelje za svojo strokovno rast in napredek.

## RAZPIS ZA PODELITEV DRUŠTVENIH PRIZNANJ V LETU 2014

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj objavlja razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2014. Podružnice in sekcije prijavijo kandidate skladno z določili Pravidnika o podeljevanju društvenih priznanj najkasneje do **31. januarja 2014**.

Za utemeljitev uspešnosti kandidata mora predlagatelj navesti pozitivne spremembe v delovnem okolju, ki so posledica kandidatovih aktivnosti. Iz predloga mora biti razvidno, kako je kandidat v smislu kvalitete in kvantitete presegel svoje obveznosti, ki izhajajo iz opisa del in nalog delovnega mesta, ki ga zaseda. Predlogi morajo biti pripravljene na obrazcih, ki so sestavni del Pravidnika.

Predlog za podelitev društvenih priznanj mora predlagatelj poslati skupaj s prilogami v enem izvodu v elektronski obliki na naslov: **info@sfd.si** in v enem izvodu v tiskani obliki tajništvu Slovenskega farmacevtskega društva **najkasneje do 31. januarja 2014**.

Elektronsko oddane prijave, posredovane po elektronski pošti, morajo biti popolnoma enake kot pisne, poslane z navadno pošto.

## *Spoštovani bralci, avtorji in recenzenti!*

V imenu uredništva Farmaceutskega vestnika se vam želim tudi ob koncu leta 2013 zahvaliti za sodelovanje. V letošnjem letu je Farmaceutski vestnik ubral novo pot oziroma smo obrnili nov list. Uredniški odbor vsekakor upa, da vam je Farmaceutski vestnik v novi prenovi všeč tako oblikovno kot tudi seveda vsebinsko. Trudimo se po najboljših močeh izbirati zanimive teme, ki so v današnjem prostoru aktualne. Naj izkoristim tudi priložnost in povabim Vas, da se opogumite in tudi sami pošljete prispevke in s tem prispevate zanimive vsebine v naš/vaš Farmaceutski vestnik. Prispevki naj ne bodo za nas le črke in slike na papirju, oziroma nabirek točk za katere se potegujemo, ampak naj predstavljajo obogatitev/gojitev našega strokovnega jezika, kot tudi orodje za prenos znanja. Bodite aktivni! Upajte si! Veseli bomo vaših razmišljanj ter vsebin.

Na koncu pa še želja, ki velja ob času, ko se leto spet obrne -  
V prihajajočem letu vam želimo veliko zdravja, osebnih uspehov in novih izzivov.

Z lepimi željami, Petra Slanc Može – glavna urednica

### Recenzenti:

mag. Miroslava Abazović, mag. farm., spec. • doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.  
prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. • asist. Nejc Horvat, mag. farm.  
dr. Žiga Jakopin • izr. prof. dr. Janja Marc, mag. farm.  
doc. dr. Matjaž Jeras, mag. farm. • doc. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm.  
doc. dr. Mitja Kos, dr. med., spec. • prim. Mojca Kos Golja, dr. med.  
doc. dr. Nataša Kuželički, mag. farm. • dr. Gašper Marc, mag. farm.  
dr. Petra Slanc Može, mag. farm. • Tomi Laptoš, mag. farm.  
dr. Igor Locatelli, mag. farm. • prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.  
prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm. • dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.  
doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm. • asist. dr. Nataša Toplak, dr. med.  
dr. Simon Žakelj, mag. farm.



**PREGLEDNI in ORIGINALNI  
ZNAKSTVENI ČLANKI**

Arterijska hipertenzija; primerjava sartanov in zaviralcev ACE (Vukan V)	3	Farmacevtske kognitivne storitve osnovane na pregledu zdravil (Kos M)	151
Kronično srčno popuščanje - vidik farmacevta (Trobec K)	11	Farmacevtske kognitivne storitve - Pogled farmacevta v lekarni (Pisk N, Ilešič I)	156
Atrijska fibrilacija in antitrombotiki (Dobravc Verbič M)	18	Farmacevtske kognitivne storitve pri zdravljenju z zdravili - Pogled farmacevta na kliničnem oddelku bolnišnice (Petre M)	161
Predstavitev novih raziskav in odobrenih indikacij pri novih peroralnih antikoagulantih (Petre M)	25	Farmacevtske kognitivne storitev pri zdravljenju z zdravili - Pogled farmacevta svetovalca v ambulantni (Premuš Marušič A)	165
Časovni potek resnih neželenih učinkov verapamila (Locatelli I)	33	Klinični primeri bolnikov z astmo v bolnišnični praksi (Knez L)	169
Predpisovanje zdravil za srčnožilne bolezni v Sloveniji (Fürst J, Samaluk V)	39	Klinični primeri bolnikov z astmo v bolnišnični praksi; težave pri vodljivosti bolnikov (Toni J)	174
Farmacevtska skrb pri hipertenziji; vloga kliničnega farmacevta v zunanji lekarni (Milovanovič M)	44	Astma - klinični primeri iz lekarniške prakse (Balaban M, Okretič Likovič N)	178
Farmacevt in merilniki krvnega tlaka (Farič Tuš V)	51	Nastanek, razvoj in diagnostika Alzheimerjeve bolezni (Emeršič A, Pirtošek Z)	191
Biološki označevalci in njihova uporaba pri razvoju in zagotavljanju varnosti zdravil / (Fic A, Peterlin Mašič L, Sollner Dolenc M)	57	Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni (Emeršič A, Pirtošek Z, Štampelj M, Štrukelj B)	202
Sodobna uporaba zdravilnih rastlin v Evropski uniji (Janeš D)	91	Socialno in ekonomsko breme Alzheimerjeve bolezni (Pirtošek Z)	208
Regulativa izdelkov iz zdravilnih rastlin (Razinger B)	94	Peptidni agonisti receptorja za glukagonu podobni peptid-1 ter njihova uporaba pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 in debelosti (Deželak M, Bavec A)	211
Zdravilne rastline in vpliv regulatornih zahtev na javno zdravje – izziv ali priložnost (Kočevar Nared J)	103	Zaviralci ureaze (Frlan R)	218
Klinične raziskave v fitoterapiji (Kočevar Glavač N, Stojilkovski K)	112	Teoretične osnove <sup>13</sup> C dihalnih testov (Suhadolc K., Sešek Briški A., Osredkar J)	227
Glukozamin - kritičen pogled z vidika delovanja in biološke uporabnosti (Kerec Kos M)	118	Samozdravljenje akutne driske pri otroku (Madjar M)	236
Astma - osnovne značilnosti bolezni in temelji zdravljenja (Morgan T)	124	Vnetne revmatične bolezni (Ješe R, Tomšič M)	267
Sodobna sintezna zdravila za zdravljenje astme (Kikelj D)	129	Zdravila za zdravljenje revmatičnih bolezni (Abazović M)	272
Sodobna biološka in rastlinska zdravila za zdravljenje astme (Berlec A)	137	Interakcije zdravil za zdravljenje revmatičnih bolezni (Roškar R)	281
Stroškovna učinkovitost zdravil za zdravljenje astme (Locatelli I, Trček J, Kos M)	143	Podobna biološka zdravila – vidik stroke, bolnika in plačnika (Laptoš T)	286
Pljučne bolezni in cigarete: ali trošarina pokrije zdravljenje? (Štrukelj B)	146	Uporaba bioloških zdravil v revmatologiji (Rotar Ž)	293
		Zdravljenje revmatičnih bolezni pri otrocih in mladostnikih (Koren B)	299



Zavzetost za zdravljenje z zdravili – zakaj je tako nizka in kaj lahko storimo? (Antolič R)	304
Fizioterapija pri bolnikih z revmatičnimi boleznimi (Vinšek H)	309
Problematika pri izdaji zdravil na obnovljive recepte (Pisk N, Banović A)	314
Kronična mieloična levkemija (Pajič T, Marc J, Preložnik Zupan I)	343
Kronična limfatična levkemija (Podgornik H, Gržinič N, Černelč P)	354
Neinvazivno predporodno presejanje za aneuploidije na osnovi proste plodove DNA - pregled razvoja in priporočila za klinično prakso (Strah D, Bernik J)	363
Zdravljenje in preprečevanje malarije (Starkl K, Mravljak J)	371
Citokrom P450 – oksidoreduktaza (POR) v biosintezi holesterola (Rozman D, Fon Tacer K)	380
Pomen ocene albuminurije in proteinurije pri novoodkritih bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 (Mavsar Najdenov B, Rus I, Avberšek Lužnik I)	385

## STROKOVNI ČLANKI

Posebnosti pri zaviralcih adrenergičnih receptorjev $\beta$ (Jošt M)	64
S klozapinom povzročena agranulocitoza (Štuhec M)	66
Samoprilagajanje srčnožilne terapije (Jagodic Vilfan AH)	68
Brezšivna skrb pri srčnožilnih bolnikih (Pehan S)	71
Obravnava revmatičnega bolnika ob uvedeni biološki terapiji – klinična primera iz lekarniške prakse (Ogulin D)	323
Nefarmakološki ukrepi pri revmatičnih težavah (Abram T)	328
Klinični primeri revmatičnih bolnikov v specialistični ambulantni obravnavi: potek bolezni in izzivi pri svetovanju (Laptoš T)	331
PREBRALI SMO ZA VAS (Štrukelj B, Gerzej L)	74, 246, 335, 392
NOVI DOKTORJI ZNANOSTI (Zupan J)	78, 250, 396
IZ DRUŠTVENEGA ŽIVLJENJA	256, 401
PREDSTAVITEV KNJIGE	187
OSEBNE VESTI	262

## FARMACEVTSKI VESTNIK Vol 64, 2013 – Content

### REVIEW AND ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

Arterial hypertension; comparison of ACE inhibitors and sartans (Vukan V)	3
Chronic heart failure - a pharmacist's view (Trobec K)	11
Atrial fibrillation and antithrombotic therapy (Dobravc Verbič M)	18
Latest clinical trials and approved indications of new oral anticoagulants (Petre M)	25
Time course of serious adverse effects of verapamil (Locatelli I)	33
Prescribing of cardiovascular drugs in Slovenia (Fürst J, Samaluk V)	39
Pharmaceutical care in hypertension management; role of clinical pharmacist in community pharmacy (Milovanović M)	44

Pharmacist and non-invasive blood pressure monitoring devices (Farič Tuš V)	51
Biomarkers and their use in drug safety assessment (Fic A, Peterlin Mašič L, Sollner Dolenc M)	57
Modern use of medicinal herbs in EU (Janeš D)	91
Regulation of products derived from medicinal herbs (Razinger B)	94
Impact of regulatory requirements for herbals to public health – Challenge or opportunity (Kočevar Nared J)	103
Clinical trials in phytotherapy (Kočevar Glavač N, Stojilkovski K)	112
Glucosamine – a critical review of its efficacy and bioavailability (Kerec Kos M)	118
Astma - osnovne značilnosti bolezni in temelji zdravljenja (Morgan T)	124



Modern synthetic drugs for treatment of asthma (Kikelj D)	129	Similar biological medicinal products – a healthcare professional, a patient, and a healthcare payer perspective (Laptoš T)	286
Modern biological and plant drugs for the treatment of asthma (Berlec A)	137	Use of biologic disease modifying drugs in rheumatology (Rotar Ž)	293
Cost-effectiveness of drugs for asthma treatment (Locatelli I, Trček J, Kos M)	143	Treatment of rheumatic diseases in childhood and adolescence (Koren B)	299
Lung diseases and smoking: does excise duty cover all health expences? (Štrukelj B)	146	Medication interest – why is it so low and what can we do about it? (Antolič R)	304
Pharmaceutical cognitive services based on medication review (Kos M)	151	Physiotherapy in patients with rheumatic diseases (Vinšek H)	309
Pharmaceutical cognitive services from the community pharmacist's perspective (Pisk N, Ilešič I)	156	Problems in dispensing medicines prescribed on the repeat prescriptions (Pisk N, Banovič A)	314
Pharmaceutical cognitive services in pharmacotherapy - Pharmacist's perspective at a hospital ward (Petre M)	161	Chronic myeloid leukemia (Pajič T, Marc J, Preložnik Zupan I)	343
Pharmaceutical cognitive services in pharmacotherapy – Pharmacist's consultant perspective at an ambulance (Premuš Marušič A)	165	Chronic lymphocytic leukemia (Podgornik H, Gržinič N, Černelč P)	354
Asthma patients in a hospital setting – case reports (Knez L)	169	Non-invasive prenatal screening for aneuploidies using cell-free fetal DNA – progress and recommendations for clinical practice (Strah D, Bernik J)	363
Asthma patients in a hospital settings – case report of a patient with poor compliance (Toni J)	174	Antimalarial therapy and prophylaxis (Starkl K, Mravljak J)	371
Asthma: clinical cases in pharmacy practice (Toni J)	178	Cytochrome P450 - oxidoreductase (POR) in the biosynthesis of cholesterol (Rozman D, Fon Tacer K)	380
Etiopathogenesis and diagnostics of Alzheimer disease (Emeršič A, Pirtošek Z)	191	The role of albuminuria and proteinuria assessment in newly diagnosed type 2 diabetes patients (Mavsar Najdenov B, Rus I, Avberšek Lužnik I)	385
Treatment of Alzheimer's disease (Emeršič A, Pirtošek Z, Štampelj M, Štrukelj B)	202	<b>PROFESSIONAL ARTICLES</b>	
Alzheimer disease: social and economic burden (Pirtošek Z)	208	Considerations regarding the use of $\beta$ blockers (Jošt M)	64
Glucagon like peptide-1 receptor agonists and their application in treatment of diabetes mellitus type 2 and obesity (Deželak M, Bavec A)	211	Clozapine-induced agranulocytosis (Štuhec M)	66
Urease inhibitors (Frlan R)	218	Medication self-adjustment in cardiovascular treatment (Jagodic Vilfan AH)	68
Theoretical basics <sup>13</sup> C breath test (Suhadolc K., Sešek Briški A., Osredkar J)	227	Seamless care in cardiovascular patients (Pehan S)	71
Self-medication of acute diarrhoea in children (Madjar M)	236	Rheumatic patients treatment after the introduction of biological therapy - clinical cases in pharmacy practice (Ogulin D)	323
Inflammatory rheumatic diseases (Ješe R, Tomšič M)	267	Non-pharmacological treatment in rheumatic disorders (Abram T)	328
Drugs for the treatment of rheumatic diseases (Abazović M)	272		
Interactions between drugs for treatment of rheumatic diseases (Roškar R)	281		

Rheumatic patient in out-patient hospital setting – clinical case: Disease progress and counselling challenges (Laptoš T)	331
SHORT PHARMA NEWS (Štrukelj B, Gerzej L)	74, 246, 335, 392

NEW DOCTORS OF SCIENCE (Zupan J)	78, 250, 396
ACTIVITIES OF THE SOCIETY	256, 401
NEW BOOKS	187
PERSONAL NEWS	262

## AVTORSKO KAZALO / INDEX OF AUTHORS

### Vol 64, 2013 – Content

Abazović M	272	Kikelj D	129	Premuš Marušič A	165
Abram T	328	Knez L	169	Razinger B	94
Antolič R	304	Kočevar Glavač N	112	Roškar R	281
Avberšek Lužnik I	385	Kočevar Nared J	103	Rotar Ž	293
Balaban M	178	Koren B	299	Rozman D	380
Banović A	314	Kos M	143	Rus I	385
Bavec A	211	Kos M	151	Samaluk V	39
Berlec A	137	Laptoš T	286, 331	Sešek Briški A	227
Bernik J	363	Locatelli I	33, 143	Sollner Dolenc M	57
Černelč P	354	Madjar M	236	Starkl K	371
Deželak M	211	Marc J	343	Stojilkovski K	112
Dobravc Verbič M	18	Mavsar Najdenov B	385	Strah D	363
Emeršič A	191, 202	Milovanovič M	44	Suhadolc K	227
Farič Tuš V	51	Morgan T	124	Štampelj M	202
Fic A	57	Mravljak J	371	Štrukelj B	74, 146, 202, 246, 335, 392
Fon Tacer K	380	Ogulin D	323	Štuhec M	66
Frlan R	218	Okretič Likovič N	178	Tomšič M	267
Fürst J	39	Osredkar J	227	Toni J	174
Gerzej L	246, 335, 392	Pajič T	343	Trček J	143
Gržinič N	354	Pehan S	71	Trobec K	11
Ilešič I	156	Peterlin Mašič L	57	Vinšek H	309
Jagodica Vilfan AH	68	Petre M	25, 161	Vukan V	3
Janeš D	91	Pirtošek Z	191, 202, 208	Zupan J	78, 250, 396
Ješe R	267	Pisk N	156, 314		
Jošt M	64	Podgornik H	354		
Kerec Kos M	118	Preložnik Zupan I	343		







# Pantoprazol Teva



*Potegnite pravo potezo!*

gastrorezistentne  
tablete

28x20mg

28x40mg

14x40mg

TEVA

živeti  
življenje

Imejte nadzor  
nad ravnovesjem  
beljakovin in energije



# Strokovne prireditve SFD v letu 2014

Četrtek, 13. februar 2014, Hotel Mons, Ljubljana  
4. simpozij Sekcije kliničnih farmacevtov  
ZDRAVILA V PSIHIATRIJI

Četrtek – sobota, 15. - 17. maj 2014, GH Bernardin, Portorož  
Simpozij ob 39. skupščini SFD

Petek – sobota, 30. - 31. maj 2014, Rogla na Pohorju  
Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnikov ob občnem zboru

Četrtek – sobota, 18. – 20. september 2014, Portorož, GH Bernardin  
Centralnoevropski simpozij iz farmacevtske tehnologije - 10CESPT 2014

Sreda, 8. oktober 2014, hotel Mons, Ljubljana  
12. simpozij Sekcije farmacevtov javnih lekarn

10. DAN SLOVENSКИH LEKARN - ZDRAVILA IN LEDVICA  
26. september 2014



Pionirska znanost zagotavlja življenjsko pomembna zdravila

## Zapis življenja oblikujemo

### *v življenjsko pomembna zdravila*

V družbi Amgen smo prepričani, da so odgovori na najbolj pereča medicinska vprašanja zapisani v besedah naše DNA. Smo pionirji na področju biotehnologije in svoje globoko razumevanje govornice teh besed uporabljamo za ustvarjanje življenjsko pomembnih zdravil – zdravil, namenjenih neizpolnjenim potrebam bolnikov z resnimi boleznimi za dramatično izboljšanje njihovega življenja.

Za več informacij o družbi Amgen, o naši pionirski znanosti in o naših zdravilih obiščite [www.amgen.si](http://www.amgen.si).

