

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 6

OSREDNJA TEMA:
HUNTIGTONOVA
BOLEZEN

Preliminary Programme

FIP World Congress
of Pharmacy
and Pharmaceutical
Sciences 2017



SEOUL 2017
FIP WORLD CONGRESS
10-14 September

Medicines and beyond!
The soul of pharmacy

77th International Congress of FIP

10 – 14
September 2017
Seoul,
Republic of Korea

 #FIPcongress





ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočevar Glavač

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

IZDAJATELJSKI SVET:
Cvetka Bačar Bole
Darja Frankič
Janez Ilaš
Smilja Milošev Tuševljak
Aleš Obreza
Nina Pisk
Sonja Rupret

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
Fotografija na naslovnici: Shutterstock
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

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

UVODNIK

Nulla res tam necessaria est quam medicina. Nič ni tako nujno kot zdravilo.

V prenesenem pomenu smo priča latinskemu pregovoru, ko molče spremljamo potek stavke zdravnikov, obenem pa kot farmacevti ne povzdignemo svojega glasu. Še več, proglašajo nas kot krivce za pomanjkanje finančnih sredstev zdravstvene blagajne. Prevečkrat je namreč v zadnjem času prst drugih uperjen v farmacijo in nas, farmacevte. Mi pa molčimo. In še tam, kjer bi lahko tvorno sodelovali, delujemo vsak za svojimi okopi. V mislih imam seveda nastajajoči Zakon o lekarniški dejavnosti, ki se že kar predolgo pripravlja, pri snovanju pa je močno čutiti moč lokalne politike. Ali res mora politika vedno nadvladati stroko? Politika bi se morala pri sprejemanju ključnih odločitev na stroko naslanjati. Seveda v kolikor je stroka vidna in ima moč v odločanju, pogajanjih in sprejemanju. Pokažimo, da smo gospodarji zdravil, na vseh področjih in nivojih.

V zadnji letošnji številki predstavljamo nekoliko manj znano, redko genetsko motnjo: Huntingtonovo bolezen. Etiologijo in potek bolezni opisuje v prvem članku klinični nevrolog doc. dr. Jan Kopal, nov eksperimentalni pristop zdravljenja pa predstavlja gensko zdravljenje, kar je tematika drugega članka avtorjev Damjana Avsca in Ines Flegar. O skrivnostnem zdravilu Decoctum Pollini, ki je bil znan širše v Evropi, tudi izven slovenskih meja, piše prof. dr. Aleš Krbavčič. Dr. Jan Schmidt in izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič govorita o novi tematiki s področja regulatorne toksikologije, o genotoksičnih nečistotah. Kateri zdravilni učinkovine za zdravljenje ran so v uporabi, opisuje izr. prof. dr. Marko Anderluh. Izjemno aktualna tematika v zadnjem letu je potencialna imunogenost bioloških zdravil s področja zaviralcev dejavnika tumorske nekroze, o čemer pišejo kolegi, ki se ukvarjajo z revmatološkimi obolenji.

Zopet ponujamo obilo zanimivega, strokovnega branja v prednovoletnem času, ko si lažje najdemo nekaj uric izven običajnega hitenja, ki je stalnica stresnega življenja, v katerega smo hote ali nehote potisnjeni. Vzemimo si torej nekaj časa in v miru preberimo tokratno številko Farmacevtskega vestnika.

V imenu uredništva vsem želim mirno, uspešno in radostno prihajajoče leto. Če bomo hoteli in zmogli, si bomo trenutke miru in sreče ustvarili predvsem sami, podarimo pa jih lahko tudi drugim, ki so nam blizu.

Prof. dr. Borut Štrukelj



VSEBINA / CONTENT

STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

- 369** Jan Kobal
Clinical neurology of Huntington's disease: a practical approach
Klinična nevrologija Huntingtonove bolezni: praktični pristop
- 374** Damjan Avsec, Ines Flegar
Gensko zdravljenje Huntingtonove bolezni
Gene therapy for Huntington's disease
- 380** Aleš Krbavčič
Doktor Janez Krizostom Pollini, ljubljanski mestni zdravnik, in njegovo tajno antivenerično zdravilo Decoctum Pollini
Doctor Joannes Chrisostom Pollini, a municipal physician of Ljubljana, and his antivenereal medicament Decoctum Pollini

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 386** Jan Schmidt, Lucija Peterlin Mašič
Implementacija smernice ICH M7 in vrednotenje genotoksičnih nečistot
Implementation of the ICH M7 guideline and evaluation of genotoxic impurities
- 397** Marko Anderluh
Pregled učinkovin v zdravljenju ran
An overview of drugs in the treatment of wounds
- 405** Manca Ogrič, Sonja Praprotnik, Snežna Sodin-Šemrl, Saša Čučnik
Imunogenost zaviralcev dejavnika tumorske nekroze alfa: nevarnost ali priložnost na področju zdravljenja vnetnih revmatičnih bolezni?
Immunogenicity of tumour necrosis factor alpha inhibitors: danger or opportunity in the treatment of inflammatory rheumatic diseases?

DRUŠTVENE VESTI – ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

- 413** Izpopolnjevalni tečaj iz klasične homeopatije
- 415** Predstavitev knjige Ravni zdravja
- 416** Osebne vesti
- 418** Letno kazalo

CLINICAL NEUROLOGY OF HUNTINGTON'S DISEASE: A PRACTICAL APPROACH

KLINIČNA NEVROLOGIJA HUNTINGTONOVE BOLEZNI: PRAKTIČNI PRISTOP

AVTOR / AUTHOR:
dr. Jan Kopal, dr. med.

*Department of Clinical Neurology,
University Medical Centre Ljubljana,
Zaloška 2, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
jan.kopal@gmail.com

1 INTRODUCTION

The core features of Huntington's disease (HD) clinically as well as genetically were outlined by George Huntington in 1872. In his paper, he summarized clinical features that are recognized as relevant and important even today: the hered-

ABSTRACT

Huntington's disease is a hereditary degenerative disorder outlined by progressive manifestation of movement disorder, cognitive decline, and psychiatric disorder. Since the identification of Huntington's disease mutation recognition of presymptomatic gene carriers as well as different clinical manifestations of the disease were enabled. Despite the identification of a pathologic gene's product, the mutant protein huntingtin, the therapy of Huntington's disease on clinical grounds remains symptomatic since no efficient disease modifying therapy prepared for clinical practice has been demonstrated so far.

KEY WORDS:

clinical approach, Huntington's disease, therapy

POVZETEK

Huntingtonova bolezen je dedno degenerativno obolenje, za katerega so značilni napredujoča ekstrapiramidna motnja gibanja, kognitivni upad in psihiatrični simptomi. Po identifikaciji genske mutacije za Huntingtonovo bolezen lahko kliniki opazujemo različne klinične manifestacije bolezni in spremembe že pri presimptomatskih nosilcih bolezenskega gena. Kljub temu, da so odkrili tudi patološki genski produkt, mutirani protein huntingtin, ostaja zdravljenje Huntingtonove bolezni simptomatsko, saj še nobena do sedaj uporabljena terapija ni uspešno spremenila kliničnega poteka bolezni.

KLJUČNE BESEDE:

Huntingtonova bolezen, klinični pristop, terapija

itary nature of the disease and usual onset in adulthood, the pronounced dyskinetic syndrome, the psychiatric disorder and cognitive decline, and above all the inexorably progressive course of the disease (1). In the past century, the identification of a HD gene on the 4th chromosome has enabled clinicians to recognize different manifestations of HD (2). Due to highly sensitive and specific genetic test, the diagnosis of HD is no longer based on characteristic clinical features which could only be confirmed neuropathologically. A definite diagnosis confirmed by a highly reliable laboratory test can nowadays be performed during the patient's lifetime. The pathologic gene product, the mutant huntingtin protein, was identified soon after the HD gene finding (3). Near the begin-



ning of the huntingtin protein, which has a molecular mass approximately 350 kDa, a glutamine tract is sited and expansion of the glutamine tract encoded by the expanded Cytosine-Adenine-Guanine (CAG) codon is considered to be the primary cause of Huntington disease symptoms (4). CAG repeat length codes for 8 to 35 glutamines in normal population and its expansion may explain most of the clinical variability in HD (5). Genetic factors were investigated that might play a role in the age of onset and presentation of the disease. CAG repeats have a strong effect on the disease onset, however, no independent relationship to the rate of progression has been found (6). Additional genetic factors that might play a role in the age of onset and disease presentation have not been identified unambiguously. A within-family variability, however, seems to be smaller than a between-family variability (7). The disease symptoms and signs change as the disease progresses and the age of onset and duration of the disease have an essential impact on that.

2 ONSET AND EARLY HD

HD may start at any age, since the age of onset described ranges from 2 years till the mid-80s (2). In Slovenia, this range is from 4 to 78 years (8). There is a broad consent among the clinicians that clinical diagnosis of HD can only be made with certainty in the presence of a specific motor disorder although cognitive problems accompanied or followed by mild motor abnormalities may as a rule appear before that (1). Affective disorders, behavioral disorders, and in some cases even delusions and hallucinations may precede the onset of motor symptoms of HD (9). Long-term longitudinal studies give us the best insight into development of early signs and symptoms. The study of Venezuelan kindred by Penney et al. demonstrated that patients pass through an onset period representing a transitional zone from the presymptomatic to early symptomatic phase. There is an insidious deterioration of intellectual functions, appearance of mild personality disorder, and minor motor abnormalities, e.g. restlessness and motor impersistence, abnormal eye movements, impaired rapid alternating hand movements, inappropriate movements during emotional stress, and mild dysarthria. A clear appearance of extrapyramidal signs (chorea, dystonia, hypokinesia, rigidity) already marks the disease progression, not the beginning. Minor abnormalities may precede the obvious extrapyramidal signs by at least 3 years (10).

3 MID-PHASE HD

This phase is dominated by motor abnormalities, such as progressive dyskinetic motor symptoms accompanied by progressive impairment of skilled movements. Chorea is the major motor sign which gave origin to the old name 'Huntington's chorea', but that might be avoided as 'part for the whole' name for the disease due to diversity of symptoms presented by the patients.

Choreatic movements are continuously present during the patient's alert time. They cannot be voluntarily suppressed and worsen during stressful situations, such as medical examination. Chorea is common in the facial area, usually pronounced in the perioral area and in the form of grimacing, forehead wrinkling, and lifting of eyebrows. The neck is also frequently involved causing forward and backward twisting and rotation of the head. Regarding the limbs, chorea usually involves upper extremities more severely presented as twisting, flexion, and extension movements, while legs may be crossed and uncrossed and the toes flexed and extended. Although chorea is most dramatically present in these patients, disturbances of voluntary movements are more highly correlated with functional disability (10). Dystonia, including shoulder rotation, fist clenching, foot inversion, and trunk posturing worsen during the course of the disease (11). In fact, these movement disorders easily merge into one another. Therefore, it is probably best to observe the patient for a period of time and assess whether a more prolonged period of involuntary movements represents chorea and/or dystonia (1). Bradykinesia and rigidity starts to intervene as patients approach the final stage of the illness, but impairment of voluntary motor function starts early in the disease course and clumsiness may increase with deterioration of functional capacity (12).

4 ADVANCED OR LATE HD

From the clinician's point of view, the advanced stage HD is characterized by hypokinesia, bradykinesia, rigidity, and loss of independence. Although remnants of chorea may still be visible, dystonia prevails. Severe dysarthria and im-

paired swallowing are common, therefore, feeding through nasogastric tube or percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) may be necessary. Patients spend most of their time in chair or bed and are transferred to a nursing home. By the rule, the patients use multiple psychotropic medication, e.g. benzodiazepines, neuroleptics, and antidepressant medication (1). Incontinence is common in men and women in the advanced stage of the disease reaching up to 43% when bedridden patients were excluded (13). Weight loss that may be prominent during the disease symptoms development could partly be overcome by improved attention to caloric intake (14).

5 JUVENILE AND LATE ONSET HD

In about 10% of HD patients, clinical disease has onset before the age of 20 and a small percent of them show first signs before the age of 10, the youngest patient known developed disease signs at the age of 2. According to inverse correlation between the age of onset and CAG repeat length number, juvenile patients have long repeats typically exceeding 50 CAGs with the longest repeat size described approximately 250 CAGs (2, 15). In Slovenia, the longest CAG repeat number observed in a recently diagnosed juvenile HD case was 106 and the disease started at about the age of 4 (Kobal J, unpublished data). Cognitive decline and therefore decline in school performance are typically followed by bradikinesia and rigidity, clumsiness, frequent falls, and dysarthria. Epileptic seizures are also by far more frequent compared to Huntington and general adult population (1). In 3 juvenile cases diagnosed in Slovenia so far aside to previously described, myoclonus was prominent in 2, in 1 case presenting 106 CAG repeats in the form of myoclonic epilepsy (Kobal J, unpublished data).

Late onset disease might be milder than classic adult onset HD. Chorea and gait disturbance and tendency to fall are common, while cognitive decline and psychiatric symptoms may be less pronounced. In a recent retrospective observational study, 34 patients were described aged 60 to 79 years at the disease onset. Their CAG repeat number was 38 to 44 and a significantly negative correlation was found between the age at onset and number of CAGs (16). In one of our cases diagnosed at the age of 78, we found 35 CAG repeats, the disease presented itself by behavioral

disturbance and bizarre gait, only about 1 to 2 years later some chorea and perioral dyskinesia were observed (8). Probably the fastest approach in doubtful cases is to perform genetic test for HD due to its high reliability and continue the rest of the diagnostic procedures afterwards.

6 THERAPEUTIC APPROACH TO HD

HD is a genetically inherited neurodegenerative disorder that affects children, adults, and elderly people and lasts over many years. Therefore, therapeutic approach, which so far is symptomatic, must be specifically customized for the individual patient. Pharmacological as well as supportive non-pharmacological interventions might be necessary. These include: coordinative and supporting activity from the neurologist in charge to make appropriate appointments, genetic counseling is necessary for patient and family about genetic risks and reproductive options, and predictive testing may be provided to presymptomatic individuals, e.g. family members. Cognitive testing as well as supportive psychological counseling to the patient and his family members may be necessary. Social services may provide financial, legal, occupational, and accommodation advices. When a patient is beginning to lose independence, social service may assist with disability, guardianship and alternative procedures, help identifying resources for long-term care either in home or institutional. Nursing support, occupational, physical, and speech/swallowing therapy may be necessary in mid-stage and advanced HD. Dietary counseling may be necessary about weight maintenance feeding strategies and eventually PEG placement. Volunteers from lay organization such as regional HD society may help by sharing their experience to patients and family members. Slovenian HD society was established in 1999 and works in collaboration to European HD society.

In onset and early HD patients, cognitive decline, affective, and behavioral disorders usually are those that require most attention from the attending neurologist and the rest of the HD team. Psychotic symptoms might also occur. Since no effective therapy has been found to counteract cognitive decline, pharmacological interventions are oriented towards coping affective and behavioral disorder. Antidepressant and anxiolytic drugs are used frequently,



but antipsychotic medication might also be necessary (17). There were also attempts to influence cellular mechanisms and modify the course of disease using antidepressive and dopamine-depleting drugs (18, 19), however, according to references as well as our experience with limited success.

During mid-stage HD, movement disorder is usually prevalent and a wide range arrhythmic dyskinesia can be seen in patients ranging from high-amplitude movements resembling ballistic, dystonic postures to choreatic and almost tic-like movements. The nature of involuntary movements however does not have any proven therapeutic relevance (20). Dopamine depleting drugs are the only approved for the treatment of movement disorder in HD (19, 21). Neuroleptics however also ameliorate chorea and calm the agitated and/or aggressive patient in mid-HD stage. A wide variety of antidepressants combined to antidopaminergic drugs are currently used for symptomatic treatment of movement disorder and mood disorders (22). Recently, however, the use of antidopaminergic drugs in HD has been disputed due to possibility of faster progress of functional disability in such patients, but further investigation is necessary (23). Therefore, dopamine depleting drugs, such as tetrabenazine and alternatives, might be the drugs of choice for HD patients with prevalent dyskinetic symptoms.

In advanced e.g. late HD patients, the main goal of management is to reduce pain and suffering, to provide good nursing care which may reduce medical complications (20). Chorea may be less pronounced, therefore, dopamine-depleting drugs may be reduced or abandoned, but dementia increases and may become severe. Drugs used to cope with psychiatric issues of HD, such as irritability, depression, anxiety, apathy, are found useful (24). According to our experience, rivastigmine also may ameliorate rigidity and improve behavior, but an effect on cognitive dysfunction has not been proven (25, 26). Combination of tetrabenazine and clonazepam may ameliorate impulsive involuntary movements and lorazepam in addition to clonazepam may provide sedation in case of aggressive behavior (27).

Juvenile and late onset HD represent special situations that may be treated symptomatically similar to THE adult onset HD. The prevalence of juvenile HD varies in different studies from 1 to 15% with a pooled proportion of about 5% in meta-analyses (28). Rigidity and dystonia are more

and chorea less common. In addition, epileptic seizures (in up to 25% of the patients) may represent a serious problem. One of our recent juvenile cases presented with a progressive myoclonic epilepsy and cognitive decline and epilepsy has been successfully treated by introduction of levetiracetam (Kobal J, unpublished data). In another one, rigidity was temporarily ameliorated by amantadine and dystonia improved after clonazepam (8). In late onset HD clinical course may however vary considerably from mild to moderate and severe course (16) and so does the therapeutic approach. One of our female patients has been diagnosed at the age of 78 presenting gait dystonia and mild chorea. She had 39 CAG repeats and her relatives remembered her due to 'funny' behavior for the last 3 or 4 years. Her movement disorder improved after clonazepam (8).

7 CONCLUSION

Despite of the progress on clinical and genetic grounds, the therapy of HD patients remains symptomatic and supportive. Inspired by that, clinicians should try to prescribe symptomatic therapy which may not speed up the progress of the disease, such as dopamine depleting drugs, anxiolytics, and antidepressants. Further therapeutic trials are ongoing and may give us some favorable results in the near future.

8 REFERENCES

1. Kremer B. *Clinical neurology of Huntington disease. Diversity in unity, unity in diversity*. In: Bates G, Harper P, Jones L. *Huntington's disease*. Oxford university press; 2002: 28-61.
2. *Huntington's disease collaborative research group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable in Huntington's disease chromosomes*. *Cell* 1993; 72: 971-983.
3. Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N et al. *Characterization and localization of the Huntington disease gene product*. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2069-2073.
4. Saudou F, Humbert S. *The biology of huntingtin*. *Neuron* 2016; 89: 910-926.
5. Duyao M, Ambrose C, Myers R et al. *Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease*. *Nat Genet* 1993; 4: 387-392.

6. Ravina B, Romer M, Constantinescu R et al. The relationship between CAG repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord* 2008; 23: 1223-1227.
7. Tsuang D, Almqvist EW, Lipe H et al. Familial aggregation of psychotic symptoms in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 1955-1999.
8. Peterlin B, Kobal J, Teran N et al. Epidemiology of Huntington's disease in Slovenia. *Acta Neurol Scand* 2009; 119: 371-375.
9. Craufurd D, Snowden J. Neuropsychological and neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. In: Bates G, Harper P, Jones L. *Huntington's disease*. Oxford university press; 2002: 62-94.
10. Penney JB Jr, Young AB, Shoulson I et al. Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Mov Disord* 1990; 5: 93-99.
11. Shoulson I. Care of patients and families with Huntington's disease. In: Marsden CD, Fahn S. *Movement disorders*. London, Butterworth; 1982: 277-290.
12. Young AB, Shoulson I, Penney JB et al. Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline. *Neurology* 1986; 36: 244-249.
13. Kolenc M, Moharić M, Kobal J et al. Bladder dysfunction in presymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *J Neurol* 2014; 261: 2360-2369.
14. Kirkwood SC, Su JL, Conneally P, Foroud T. Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 273-278.
15. Lehman RK, Nance M. Family history in juvenile Huntington disease: do the signs point to "yes" or "very doubtful"? *Neurology* 2013; 80: 976-977.
16. Lipe H, Bird T. Late onset Huntington disease: clinical and genetic characteristics of 34 cases. *J Neurol Sci* 2009; 276(1-2): 159-162.
17. Pla P, Orvoen S, Saudou F et al. Mood disorders in Huntington's disease: from behavior to cellular and molecular mechanisms. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 135.
18. Jamwal S, Kumar P. Antidepressants for neuroprotection in Huntington's disease: A review. *Eur J Pharmacol* 2015; 769: 33-42.
19. Jankovic J. Dopamine depleters in the treatment of hyperkinetic movement disorders. *Expert Opin Pharmacother* 2016, v tisku.
20. Nance MA, Westphal B. Comprehensive care in Huntington's disease. In: Bates G, Harper P, Jones L. *Huntington's disease*. Oxford university press; 2002: 475-500.
21. Ondo WG, Tintner R, Thomas M et al. Tetrabenazine treatment for Huntington's disease-associated chorea. *Clin Neuropharmacol* 2002; 25: 300-302.
22. Venuto CS, McGary A, Ma Q et al. Pharmacologic approaches to the treatment of Huntington's disease. *Mov Disord* 2012; 27(1): 31-41.
23. Tedroff J, Waters S, Barker RA et al.; EHDN Registry Study Group. Antidopaminergic Medication is associated with more rapidly progressive Huntington's disease. *J Huntingtons Dis* 2015; 4: 131-140.
24. Frank S. Treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics* 2014; 11: 153-160.
25. Rot U, Kobal J, Sever A et al. Rivastigmine in the treatment of Huntington's disease. *Eur J Neurol* 2002; 9: 689-690.
26. Sešok S, Bolle N, Kobal J et al. Cognitive function in early clinical phase huntington disease after rivastigmine treatment. *Psychiatr Danub* 2014; 26: 239-248.
27. Maddocks I, Brew B, Waddy H, Williams I. *Palliative Neurology*. Cambridge University Press, New York 2006: 186-190.
28. Quarrell O, O'Donovan KL, Bandmann O et al. The prevalence of juvenile Huntington's Disease: A review of the literature and meta-analysis. *PLoS Curr* 2012; 4:e4f8606b742ef3.



ZDRAVILO KOVALTRY®

Kovaltry®
rekombinatni faktor VIII (oktokog alfa)



► Dokazano učinkovito že pri odmerjanju
2X na teden!

► Na listi **B*** in **P100*** od **22. 8. 2016²**

KOVALTRY 250/500/1000/2000/3000 i.e. prašek in vehikel za raztopino za injiciranje

Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten povzetek značilnosti zdravila!

▼ Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti. Tako bodo hitreje na voljo nove informacije o njegovi varnosti. Zdravstvene delavce naprošamo, da poročajo o katerikoli v nobi domnevnem neželenu učinku zdravila.

Kakovostna in količinska sestava: Zdravilna učinkovina: rekombinantni koagulacijski faktor VIII (oktokog alfa). Ena viala vsebuje nominalno 250/500/1000/2000/3000 i.e. humanega koagulacijskega faktorja VIII. Pomožne snovi: Prašek: saharoza, histidin, glicin, natrijev klorid, kalcijev klorid, polisorbitat 80. Vehikel: voda za injiciranje. **Terapevtske indikacije:** Zdravljenje in preprečevanje krvavitve pri bolnikih s hemofilijo A (pirorojeno pomanjkanje faktorja VIII). Zdravilo Kovaltry se lahko uporablja za vse starostne skupine. **Odmerjanje in način uporabe:** Zdravljenje mora potekati pod nadzorom zdravnika, ki ima izkušnje z zdravljenjem hemofilije. Odmerjanje zdravila in trajanje nadomestnega zdravljenja sta odvisna od stopnje pomanjkanja faktorja VIII, mesta in obsega krvavitve in od kliničnega stanja bolnika. Ena mednarodna enota (i.e.) aktivnosti faktorja VIII ustreza količini faktorja VIII v enem ml normalne humane plazme. **Kontraindikacije:** Znana preobčutljivost za zdravilno učinkovino ali katerokoli pomožno snov. Znane alergijske reakcije na beljakovine miši ali hrčkov. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Tako kot pri vseh intravenskih zdravilih beljakovinskega izvora se lahko pojavijo preobčutljivostne reakcije alergijskega tipa. Nastanek nevtralizirajočih protiteles (inhibitorjev) proti faktorju VIII je znan zaplet pri zdravljenju bolnikov s hemofilijo A. Pri hemofilikih z dejavniki tveganja za srčnožilne bolezni ali s srčnožilnimi boleznimi, katerim se je strjevanje krvi normaliziralo z zdravljenjem s faktorjem VIII, obstaja enako tveganje za nastanek srčnožilnih bolezni, kot pri bolnikih, ki nimajo hemofilije. Če je potreben centralni venski kateter (CVK), je treba upoštevati možnost lokalnih okužb, bakteriemije in tromboze na mestu kateterizacije. **Nosečnost in dojenje:** Faktor VIII se sme med nosečnostjo in dojenjem uporabljati le, če je jasno indicirano. **Neželeni učinki:** *Pogosti:* limfadenopatija, palpitanje, sinusna tahikardija, bolečina v trebuhu, dispneja, pireksija, neprijeten občutek v prsnem košu, reakcije na mestu injiciranja (vključuje ekstremitacije na mestu injiciranja, hematom, bolečino na mestu infundiranja, pruritus, oteklino), glavobol, omotica, nespečnost, pruritus, izpuščaj (izpuščaj, eritematozni izpuščaj, srbeč izpuščaj), alergijski dermatitis. *Občasni:* preobčutljivost, disgeuzija, urtikarija, pordelost. **Način izdajanja zdravila:** Izdaja zdravila je le na recept. **Imetnik dovoljenja za promet:** Bayer AG, D-13342 Berlin, Germany **Za nadaljnje informacije o zdravilu Kovaltry, se lahko obrnete na:** Bayer d.o.o., Bravničarjeva 13, 1000 Ljubljana **Verzija:** EU/1 (02/2016)

Vir: 1. Kavakli K in sod. Prophylaxis vs. on-demand treatment with BAY 81-8973, a full-length plasma protein-free recombinant factor VIII product: results from a randomized trial (Leopold III). *J Thromb Haemost* 2015; 13: 360-369. **2.** <http://www.zzzs.si/zzzs/info/egradiva.nsf/A1CDE0432E8F258C12579F700386AF2>

Samo za strokovno javnost.

L.SI.MKT.10.2016.1212

GENSKO ZDRAVLJENJE HUNTINGTONOVE BOLEZNI

GENE THERAPY FOR HUNTINGTON'S DISEASE

AVTOR / AUTHOR:

Damjan Avsec
Ines Flegar

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
damjan.avsec@hotmail.com

1 UVOD

Huntingtonova bolezen je redka neozdravljiva neurodegenerativna dedna bolezen, ki prizadene 5 do 10 ljudi na 100.000. Deduje se avtosomno dominantno in se začne izražati pri ljudeh med 30. in 50. letom starosti. Za značilno simptomatiko je zadolžena mutacija v genu za protein huntingtin (*HTT*), ki se nahaja na kromosomskem lokusu 4p16.3. Zaradi ekspanzije ponovitev trojčka nukleotidov CAG na 5'-koncu *HTT* nastaja mutiran *HTT* (mHTT), ki tvori inkluzijska telesa in povzroča okvare nevronov v striatumu (1).

POVZETEK

Huntingtonova bolezen je redka neozdravljiva neurodegenerativna bolezen centralnega živčevja, ki jo povzroča mutacija v genu za huntingtin (*HTT*). Trenutno nimamo zdravila, ki bi ozdravilo ali upočasnilo potek bolezni, zato je zdravljenje večinoma simptomatsko. Gensko zdravljenje predstavlja nov pristop, ki cilja vzrok za nastanek te bolezni. Preučujejo vnos nevroprotektivnih genov ter tehnologije utišanja genov in urejanja genoma v upanju, da bodo ti pristopi upočasnili napredovanje bolezni. Članek se osredotoča na principe teh novih pristopov in podaja trenutno stanje razvoja genskega zdravljenja pri Huntingtonovi bolezni.

KLJUČNE BESEDE:

CRISPR/Cas9, Huntingtonova bolezen, gensko zdravljenje, proteini z domeno cinkovega prsta, protismiselni oligonukleotid, RNA-interferenca

ABSTRACT

Huntington's disease is a rare, incurable neurodegenerative disease of the central nervous system caused by the mutation in the *HTT* gene. Currently, there is no treatment that can cure or slow the course of Huntington's disease, so the treatment is aimed at ameliorating symptoms. Gene therapy is a promising new approach that targets the cause of Huntington's disease. Insertion of neuroprotective genes, gene silencing, and genome editing technologies are being investigated in the hope of proving effective in stopping progression of the disease. The article focuses on principles of this new approaches and presents the current state of development of gene therapy for Huntington's disease.

KEY WORDS:

antisense oligonucleotide, CRISPR/Cas9, gene therapy, Huntington's disease, RNA interference, zinc finger proteins

Zdravljenje Huntingtonove bolezni poteka simptomatsko, pri čemer uporabljamo antipsihotike, antidepresive in te-trabenazin, ki je namenjen zdravljenju horeje (2). Ker je HD za razliko od drugih neurodegenerativnih bolezni monogenska bolezen, se v zadnjih letih kot nova možnost zdravljenja ponuja gensko zdravljenje.

2 KAJ JE GENSKO ZDRAVLJENJE?

Pri genskem zdravljenju gre v osnovi za vnos terapevtskega gena v organizem z uporabo primerne vektorja. Ta je lahko virusni ali nevirusni, pri čemer so na primeru Huntingtonove bolezni najbolj proučevali adenoasociacijske virusne (AAV) vektorje. AAV je nepatogen virus z nizko imunogenostjo, ki za okužbo celic in razmnoževanje potrebuje pomoč adenovirusa. Sposoben se je počasi, a z večjo specifičnostjo, vgraditi na kromosomski lokus 19q13.4, kar omogoča dolgotrajno izražanje terapevtskega gena (3).

Glavna ovira genskega zdravljenja Huntingtonove bolezni je težavna dostava terapevtskih genov v možgane. Kot možnosti za dostavo se ponujajo intratekalna in intraventrikularna injekcija, vnos s pomočjo črpalke in uporaba virusnih vektorjev, ki ciljajo možgane (3). Kot možni dostavni sistem lahko omenimo še vsaditev enkapsuliranih celic z vstavljenim terapevtskim genom (4).

3 VNOS NEVROPROTEKTIVNIH GENOV

Večina terapevtskih genov, vnesenih s pomočjo AAV, deluje nevroprotektivno in tako zmanjša simptome bolezni. Dokazali so, da je v možganih bolnikov s Huntingtonovo boleznijo pomanjkanje možganskega nevrotrofičnega dejavnika (BDNF), kar je najverjetneje posledica transkripcijske disregulacije in zmanjšane aksonskega transporta. Zato vnos gena za BDNF, ki omogoča preživetje, rast in plastičnost nevronov striatuma, predstavlja eno od možnosti za zmanjšanje degeneracije striatalnih nevronov in upočasnitev napredovanja bolezni (3, 5). Podobno nevroprotektivno vlogo imata še gena za nevrotrofični dejavnik celic glije (GDNF) in neurturin; slednji pri intrastriatalni dostavi deluje zaščitno tudi na kortikalne nevrone, katerih spremembe se pri HD kažejo v kognitivnih in psihičnih motnjah (3).

Med nevrotrofičnimi dejavniki je po raziskavah na celičnih linijah in živalskih modelih največji obet predstavljal ciliarni nevrotrofični dejavnik (CNTF), ki spada med citokine in vodi diferenciacijo celic v astrocite. Bil je prvi trofični dejav-

nik, ki je vstopil v fazo I kliničnega testiranja. CNTF so vgradili v ledvične celice mladiča hrčka (BHK), ki so jih nato enkapsulirali in vstavili v desni lateralni ventrikel. Rezultati klinične raziskave niso bili dovolj dobri, da bi nadaljevali s testiranjem, so pa dokazali prednost takšnega dostavnega sistema pred sistemsko aplikacijo (4).

Najverjetneje so razlog za manjšo učinkovitost nevrotrofičnih dejavnikov pri simptomatskih pacientih s Huntingtonovo boleznijo toksični učinki mHTT, ki po dosegu določene koncentracije mHTT v nevronih postanejo ireverzibilni (3).

4 UTIŠANJE GENOV

Za razliko od drugih nevrodegenerativnih bolezni pri Huntingtonovi bolezni dobro poznamo vzrok, zato lahko s pristopi, ki zavrejo izražanje mHTT na transkripcijskem ali posttranskripcijskem nivoju, upočasnimo ali preprečimo nastop bolezni (5). Med bolj obetavnimi so naslednji pristopi.

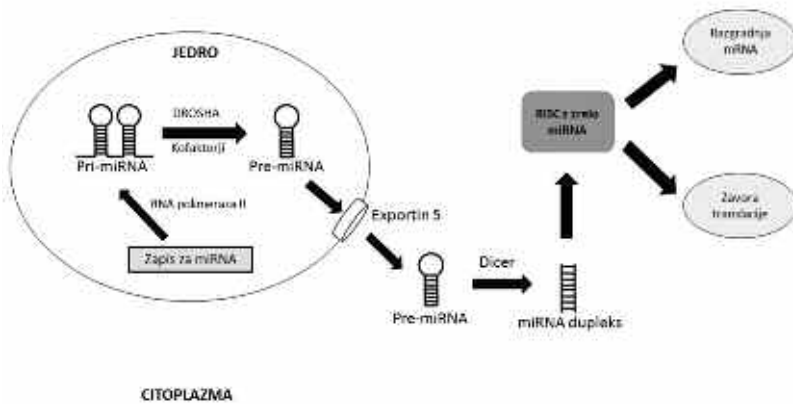
4.1 RNA-INTERFERENCA

RNA-interferenca (RNAi) je evolucijsko ohranjen mehanizem uravnavanja izražanja genov na posttranskripcijskem nivoju. Ko se določen gen prepíše, nastane informacijska RNA (mRNA), ki se prevede v proteinsko zaporedje. Količino mRNA v celicah uravnavajo endogene mikro RNA (miRNA), ki odvisno od stopnje komplementarnosti bodisi fizično zavirajo translacijo bodisi inducirajo razgradnjo mRNA v z RNA-induciranim kompleksu za utišanje genov (RISC) (6).

Po prepisu gena za mikro RNA se sprva tvori primarna miRNA (pri-miRNA), ki zaradi komplementarnosti znotraj transkripta tvori strukturo lasnice. V jedru pod vplivom encima DROSHA in kofaktorjev nastane manjša prekurzorska miRNA (pre-miRNA), ki se preko exportina-5 prenese v citoplazmo. Tam encim DICER prereže lasnico in nastane duplex miRNA. Praviloma je le ena od verig kompleksa miRNA funkcionalna (drugo razgradijo nukleaze) in na osnovi komplementarnosti v kompleksu RISC prepozna in veže tarčne mRNA, kar povzroči njihovo razgradnjo ali (pogosteje) ustavi translacijo (slika 1) (6).

Terapevtska RNA-interferenca deluje na posttranskripcijskem nivoju in zmanjša nastajanje mHTT. Ta pristop vključuje kratke molekule RNA: kratko interferenčno RNA





Slika 1: Biogeneza miRNA in njena funkcija.
Figure 1: Biogenesis and function of miRNA.

(siRNA), kratko lasnično RNA (shRNA) in miRNA (3). V splošnem gre za izkoriščanje endogenega sistema za procesiranje miRNA, s katerim aktiviramo terapevtsko RNAi.

Terapevtske molekule RNAi lahko dobimo z *in vitro* sintezo dvoverižne RNA, kot je to značilno za siRNA, in z ektopičnim izražanjem shRNA ali miRNA v celicah po vnosu ustreznih genov z virusnimi ali plazmidnimi vektorji (6). Sintezo ustvarjena siRNA je v osnovi enaka zrelemu dupleksu miRNA in se lahko po vstopu v celice takoj vgradi v kompleks RISC, medtem ko se morata shRNA in miRNA najprej prepisati iz vnesene DNA, nato pa še predelati v istem sistemu kot endogena miRNA. Za vnos shRNA ali miRNA je uporaben vektor AAV, medtem ko lahko siRNA vnesemo z liposomi. Z vektorjem AAV vnesena shRNA izkazuje dolgotrajnejši učinek. Pri sintezni molekuli siRNA največjo oviro predstavlja težaven vstop v celice in hitro odstranjevanje. Vendar pa lahko sintezne siRNA kemijsko modificiramo, jih konjugiramo s holesterolom in tako izboljšamo celični privzem in njihovo stabilnost (6, 7). Poleg tega je lahko časovno omejeno delovanje siRNA prednost, saj je možno spreminjanje ali prenehanje z zdravljenjem (7).

Čeprav RNAi predstavlja velik potencial za zdravljenje Huntingtonove bolezni, je prav nepoznavanje vseh molekularnih poti, v katere se vpletajo vnesene inhibitorne RNA, razlog za previdnost. Vemo, da je za preprečitev nastopa Huntingtonove bolezni potrebna konstantna zavora translacije mRNA, ki nosi zapis za mHTT. To lahko dosežemo z vektorjem AAV, ki transgen integrira v genom, vendar pa se moramo zavedati, da vnesenega transgena kasneje ne moremo odstraniti. Zagotoviti je treba čim večjo komplementarnost inhibitorne RNA s tarčno mRNA, da zmanjšamo možnosti nespecifičnih učinkov (tj. vezavo na druge

tarče (*off-target effects*)) in drugih učinkov, ki so posledica vmešavanja v endogeni sistem miRNA (6).

Ker je največ bolnikov s Huntingtonovo boleznijo prav heterozigotov, je treba premisliti, ali je smiselno zavirati obe alelni različici, saj so ugotovili, da pogojno izbitje gena za divji tip huntingtina povzroči nevrodegeneracijo (5). Za doseganje specifičnosti terapevtskega je izkoriščanje povečanja ponovitev CAG malo verjetno. Pri specifičnem ciljanju je treba poiskati polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP), ki so značilni le za mutirano različico *HTT* in se pojavljajo v kodirajočih segmentih gena, kar je zamudno in drago, poleg tega pa je strategija uporabe siRNA ali miRNA, ki ne razlikujejo med aleli *HTT* (t. i. pristop alelni nespecifične RNAi), bolj proučevana (6, 8). Obenem obstajajo študije, ki na modelih Huntingtonove bolezni pri uporabi alelni nespecifične RNAi kažejo izboljšanje vedenja, kljub znižanju divjega tipa huntingtina (9). Prve inhibitorne molekule RNA v kliničnih raziskavah bodo zato najverjetneje nespecifične (6). Z uporabo siRNA bi sicer lahko dosegli visoko selektivnost, vendar je vprašanje, ali bi našli dovolj SNP z dovolj veliko razširjenostjo pri bolnikih s Huntingtonovo boleznijo, da bi bil terapevtik uporaben za večino bolnikov. Verjetno bi bilo potrebno ustvariti nabor alelni specifičnih siRNA, iz katerega bi nato na osnovi genotipizacije bolnika izbrali zanj najbolj ustrezno različico siRNA (8).

4.2 PROTISMISELNI OLIGONUKLEOTIDI

Protismiselni oligonukleotidi (ASO) so v povprečju 20 nukleotidov dolge molekule, ki se prav tako kot siRNA vežejo na komplementarno zaporedje na mRNA *HTT*, kar fizično zavira translacijo mRNA v huntingtin in inducira razgradnjo mRNA z RNazo H (10, 11). Za razliko od RNAi, protismiselni oligonukleotidi za aktivacijo ne potrebujejo endogenega si-

stema za procesiranje miRNA. Za oligonukleotidna zaporedja je značilno, da so občutljiva na razgradnjo z eksonukleazami, zato pri načrtovanju protismiselnih oligonukleotidov pogosto spremenimo fosfodiestrsko vez v fosforotioatno, modificiramo heterocikle purinskih ali pirimidinskih baz in sladkorno-fosfatno verigo (11).

Protismiselne oligonukleotide lahko načrtujemo tako, da dosežemo alelna specifičnost. Za izvedbo tega poiščemo heterozigotne SNP, ki so pogosti in prisotni v mutirani različici gena in njegovem transkriptu pri širokem naboru bolnikov s Huntingtonovo boleznijo. Če je bolnik za izbran SNP homozigot, potem s protismiselnimi oligonukleotidom, načrtovanim za ta SNP, ne moremo doseči specifičnosti. Tehnologija protismiselnih oligonukleotidov ima to prednost pred RNAi, da lahko specifičnost dosežemo tudi z uporabo SNP v intronih, saj se protismiselni oligonukleotidi vežejo tudi na pre-mRNA, kar inducira njeno razgradnjo z RNazo H (12).

Protismiselni oligonukleotidi izkazujejo velik potencial na področju nevrodegenerativnih bolezni, vendar jih je prav tako kot terapevtike na osnovi RNAi potrebno dostaviti z intratekalno ali intrastriatalno injekcijo (10). Trenutno je IONIS-HTRRx, alelna nespecifični kemijsko modificiran protismiselni oligonukleotid, v fazi I/II kliničnega testiranja (13, 14).

4.3 PROTEINI Z DOMENAMI CINKOVIH PRSTOV

Kot zanimiv način zniževanja izražanja mHTT se ponujajo proteini z domenami cinkovih prstov, ki jih lahko načrtujemo tako, da prepoznavajo različna zaporedja v DNA. Od prej omenjenih terapevtskih strategij z RNAi in protismiselnimi oligonukleotidi se razlikujejo v tem, da delujejo na transkripcijskem nivoju in tako ponujajo drugačen pristop k utišanju *mHTT*.

Na mišjem modelu HD R6/2 so dokazali, da proteini z domenami cinkovih prstov, ki se vežejo na ponovitve CAG, izkazujejo določeno selektivnost za *HTT* z večjim številom ponovitev trojčkov nukleotidov CAG. Z nadaljnjimi poskusi so ugotovili, da se proteini z domenami cinkovih prstov ne vežejo na druge gene, ki vsebujejo relativno visoko število ponovitev CAG (15). Proteini z domenami cinkovih prstov tako predstavljajo možnost za zdravljenje Huntingtonove bolezni, vendar so trenutno raziskave v tej smeri na predkliničnem nivoju. Tako kot pri terapevtski shRNA in miRNA bi bilo tudi za proteine z domenami cinkovih prstov potrebno vgraditi gensko informacijo v obliko vektorja AAV, kon-

čni produkt pa dostaviti v možgane z uporabo intrastriatalne injekcije.

5 UREJANJE GENOMA

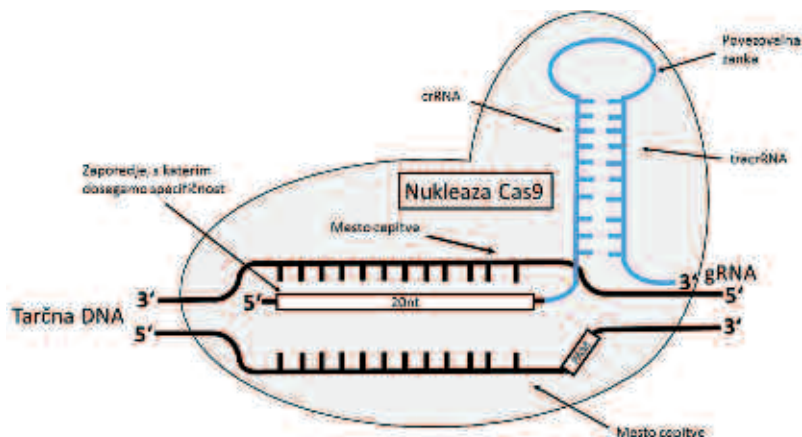
Urejanje genoma ima največji terapevtski potencial pri nekaterih rakavih boleznih in monogenih boleznih, kot je to Huntingtonova bolezen. Za razliko od tehnologij utišanja genov lahko z uporabo naprednih in prefinjenih tehnologij, kot sta nukleaze z motivi cinkovih prstov (ZFN) in CRISPR/Cas9, dosežemo izrez gena, kar trajno zavre njegovo izražanje. Poleg tega lahko na mesto prereza vstavimo nov gen, vendar za zdravljenje Huntingtonove bolezni bolj proučujejo izrez mutiranega *HTT*, ki ga z večjo specifičnostjo omogoča tehnologija CRISPR/Cas9.

5.1 CRISPR/CAS9

CRISPR/Cas je imunski sistem bakterij, ki skrbi za obrambo pred tujimi nukleinskimi kisljinami, kot so virusni genomi. CRISPR so skupki urejeno porazdeljenih kratkih palindromskih zaporedij v bakterijskem genomu, kamor se po vdoru vgradi tuja nukleinska kisljina, ki se nato prepíše in predela v CRISPR RNA (crRNA). CrRNA skupaj s trans-aktivirajočo crRNA (tracrRNA) tvori kompleks s CRISPR-povezanimi (Cas) proteini, kar predstavlja aktiven sistem. Ko enaka tuja nukleinska kisljina ponovno vdre v bakterijsko celico, se tvori heterodupleks DNA-RNA, kar vodi v razgradnjo tuje DNA s sistemom CRISPR/Cas. Eksperimentalno so ugotovili, da lahko ta trikomponentni sistem poenostavimo z združitvijo tracrRNA in crRNA v vodilno RNA (gRNA), znotraj katere približno 20 nukleotidov dolgo zaporedje določa specifičnost (slika 2). Za najbolj uporabno se je med nukleazami Cas izkazala Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes*, ki za delovanje potrebuje zaporedje 5'-NGG-3' (t.i. PAM) neposredno za tarčnim mestom (16).

Z uporabo sistema CRISPR/Cas9, ki prereže znotraj izbranega gena, lahko specifično in trajno zavremo izražanje mHTT, kar predstavlja prednost pred protismiselnimi oligonukleotidi in siRNA. Ker ima takšen pristop za posledico trajno prekinitve transkripcije gena, je treba zagotoviti visoko alelna specifičnost za mutiran *HTT*, kar lahko dosežemo z izbiro tistih heterozigotnih SNP, ki se nahajajo v območju PAM. Za cepitev s Cas9 se mora za tarčnim zaporedjem nahajati zaporedje PAM 5'-NGG-3', kar pomeni, da mo-





Slika 2: Urejanje genoma s tehnologijo CRISPR/Cas9.

Figure 2: Genome editing using CRISPR/Cas9 technology.

ramo v mutiranem alelu imeti NGG, v normalnem pa takšen trojček nukleotidov, ki ne vsebuje gvaninskega nukleotida na drugem ali tretjem mestu (17). Takšen način doseganja specifičnosti se je na celičnih linijah izkazal za uspešnega, vendar je malo verjetno, da bi z izbranimi SNP zajeli celotno populacijo bolnikov s Huntingtonovo boleznijo.

Čeprav za vnos sistema CRISPR/Cas9 v celice največkrat uporabljamo plazmide, takšen sistem ni primeren za vnos *in vivo*. Najboljši vektorji za *in vivo* vnos genov so virusni vektorji, med katerimi je terapevtsko najbolj uporaben vektor AAV. Slabost takega vektorja je predvsem omejena količina genskega materiala, ki ga lahko vanj vgradimo. Nukleaza Cas9 bakterije *S. pyogenes* ima približno 4,2 kb veliko cDNA, vektor AAV pa ima kapaciteto, manjšo od 4,8 kb, poleg tega moramo v isti vektor vgraditi še zaporedje za gRNA. Možna je zamenjava Cas9 z manjšim ortologom, kot je npr. Cas9 bakterije *Staphylococcus aureus*, ali pa uporaba drugih virusnih vektorjev z večjo kapaciteto, ki pa so terapevtsko manj primerni (16).

Tehnologija CRISPR/Cas9 bo pri Huntingtonovi bolezni med vsemi omenjenimi tehnologijami predstavljala najbolj celovito in trajno rešitev, a morda ne najbolj varno. Zato bo pred uporabo na človeku treba narediti obsežne predklinične raziskave, ki bodo opredelile primernost nadaljevanja v klinično testiranje.

6 PERSONALIZIRANA GENSKA TERAPIJA

Z napredkom na področju genskega zdravljenja se pogosto omenja personalizacija genskega zdravljenja. Ljudje se

med seboj razlikujemo v SNP. Pri uporabi terapevtikov, ki se z visoko specifičnostjo vežejo na tarčna nukleotidna zaporedja, se tako lahko zgodi, da izbran terapevtik za nekoga ni najbolj optimalen. Pri CRISPR/Cas9, ki dosega alelna specifičnost z uporabo SNP v PAM, lahko že en drugačen nukleotid v zaporedju PAM pomeni neučinkovitost ali neselektivnost (17). Poleg tega so tudi terapevtiki na osnovi utišanja genov (RNAi, ASO), ki selektivnost dosegajo z upoštevanjem pogostih SNP, pri manjšini bolnikov neuporabni.

Za posameznika s Huntingtonovo boleznijo bi bilo potrebno izvesti genotipizacijo, da ugotovimo, kateri izmed terapevtikov bi bil zanj najbolj primeren, vendar pričakovati, da bi za vsakega posameznika izdelali poseben terapevtik, ni realno. Vsako zdravilo mora skozi draga klinična testiranja, poleg tega pa so navadno prav genska zdravila tista, ki imajo najmanjšo ciljno populacijo.

7 SKLEPI

Genska terapija glede na dosedanje simptomatsko zdravljenje predstavlja revolucionaren pristop k zdravljenju Huntingtonove bolezni, saj se prvič ponuja možnost preprečitve nastanka bolezni. Kljub velikemu napredku na tem področju je na pot genskega zdravljenja potrebno stopati počasi. Prvič imamo v rokah orodja, s katerimi lahko poljubno preurejamo genom, ob čemer se pojavljajo številna etična vprašanja, ki jih ne smemo zanemariti. Poleg tega zadnje čase prednosti, ki jih ponujajo napredni načini zdravljenja,

v ozadje potiskajo spoznanja, da ne poznamo vseh molekularnih mehanizmov, v katere se s takšnimi pristopi vpletamo. Zato je ključnega pomena, da pred uporabo genškega zdravljenja na bolnikih s Huntingtonovo boleznijo preteče dovolj časa, da poleg učinkovitosti dobro ovrednotimo tudi vidik varnosti.

8 LITERATURA

1. Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 40.
2. Videnovic A. Treatment of Huntington Disease. *Curr Treat Options Neurol* 2013; 15(4): 424-438.
3. Ramaswamy S, Kordower JH. Gene therapy for Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2012; 48: 243-254.
4. Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 968-975.
5. Wild EJ, Tabrizi SJ. Targets for future clinical trials in Huntington's disease: What's in the pipeline? *Mov Disord* 2014; 29: 1434-1445.
6. Harper SQ. Progress and challenges in RNA interference therapy for Huntington disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 933-938.
7. DiFiglia M, SenaEsteves M, Chase K et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17204-17209.
8. Lombardi MS, Jaspers L, Spronkmans C et al. A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference. *Exp Neurol* 2009; 217(2): 312-319.
9. Boudreau RL, McBride JL, Martins I et al. Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 2009; 17(6): 1053-1063.
10. Burgunder JM. Orphan drugs in development for Huntington's disease: challenges and progress. *Orphan Drugs Res Rev* 2015; 5: 1-9.
11. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 259-293.
12. Skotte NH, Southwell AL, Ostergaard ME et al. Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: providing a therapeutic option for all Huntington disease patients. *PLoS One* 2014; 9(9): e107434.
13. Glorioso JC, Cohen JB, Carlisle DL et al. Moving toward a gene therapy for Huntington's disease. *Gene Therapy* 2015; 22(12): 931-933.
14. *ClinicalTrials.gov*. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of IONIS-HTRRx in Patients With Early Manifest Huntington's Disease. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02519036>. Dostop: 30-10-2016.
15. GarrigaCanut M, Agustín-Pavón C, Herrmann F et al. Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: E3136-E3145.
16. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther* 2016; 24(3): 430-446.
17. Shin JW, Kim KH, Chao MJ et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw286>. Dostop: 30-10-2016.



DOKTOR JANEZ KRIZOSTOM POLLINI, LJUBLJANSKI MESTNI ZDRAVNIK, IN NJEGOVO TAJNO ANTIVENERIČNO ZDRAVILO DECOCTUM POLLINI

DOCTOR JOANNES CHRISOSTOM
POLLINI, A MUNICIPAL PHYSICIAN
OF LJUBLJANA, AND HIS
ANTIVENEREAL MEDICAMENT
DECOCTUM POLLINI

AVTOR / AUTHOR:

Prof. dr. Aleš Krbavčič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

1 LJUBLJANSKI ZDRAVNIK JANEZ KRIZOSTOM POLLINI

O ljubljanskem mestnem zdravniku Janezu Krizostomu (Zlatoustu) Polliniju (Radovljica 1712 – Ljubljana 1786) je v članku o Pollinijevem rodu pisal dr. F. K. Lukman v Kroniki slovenskih mest (1). V tem delu izvemo, da so Pollinija

POVZETEK

Prispevek predstavlja kratek življenjepis ljubljanskega zdravnika Janeza Krizostoma Pollinija (1712–1786) in podrobno razlago njegovega tudi v Evropi znane zdravila za venerične in druge hude bolezni, Pollinijevega dekokta. Zdravilo uvrščamo med antivenerične oziroma čistilne dekokte iz lesnih drog (sasafraza, santalovca in gvajakovca), antimona in/ali živega srebra. Takšne dekokte so v farmakopeje uvrščali celo v času po odkritju salvarsana. Posebnost sestavin Pollinijevega zdravila je prevretek luščin oreha (*Juglans regia*), za katere Joseph Ferdinand Friedrich, avtor na Dunaju leta 1798 izdane monografije *Pollinijev dekokt*, zatrjuje, da se je s poskusi prepričal o pomembnosti te sestavine. Pomen zdravil za venerične bolezni odraža tudi prisotnost enega od teh dekoktov, Zittmannovega dekokta, v nemški farmakopeji DAB 6 iz leta 1958.

KLJUČNE BESEDE:

antivenerični dekokt, J. K. Pollini (1712–1786), luščine orehov, *Juglans regia*.

ABSTRACT

The municipal physician of Ljubljana Joannes Christostom Pollini (1712–1786) used a secret antivenereal decoction similar to at that time popular decoctions containing overseas lignaceous drugs (sassafras, guaiacum, and China nodosa) combined with stibium and mercury. Pollini's recipe is based on the readily available domestic walnut (*Juglans regia*) shells. Pollini's decoct was after his death available to public by Joseph Ferdinand Friedrich through his monograph *Das Pollinische Decoet* published in Vienna in 1789. The author reports his experiments confirming the efficacy of a decoction of walnut shells as the active ingredient. Although the antivenereal decoctions lost their fame after introduction of salvarsan, one of them, *Decoetum Zittmani*, persisted in DAB 6 in 1958.

KEY WORDS:

antivenereal decoction, J. C. Pollini (1712–1786), *Juglans regia*, walnut shells.

zlasti zaradi zaslug za zdravniško delo povzdignili v viteški stan s predikatom »plemeniti«. Cesarica Marija Terezija je diplomu podpisala 13. februarja 1779.

Iz utemeljitve njegovih zaslug je mogoče razbrati, da je bil Pollini najmanj od leta 1738 mestni zdravnik v Ljubljani. O njegovem študiju ni podatkov, izvemo le, da je dosegel doktorat in da je bilo njegovo zdravniško delo znano preko kranjskih meja. Slovesa svojega predhodnika dr. Marka Gerbca sicer ni dosegel (dr. Gerbec je umrl v Ljubljani leta 1717), zato Pollini ni bil njegov neposredni naslednik. Pollinijev neposredni predhodnik je bil zdravnik Werthenpreiss.

Pollini je v svoji dolgi zdravniški službi poskušal reševati takratne neobvladljive bolezni. Cenili so ga tudi v takrat edini kranjski naravoslovni ustanovi, to je bila Družba za poljedelske in uporabne umetnosti, katere član je bil od leta 1776, in v zdravniškem kolegiju mesta. K poslovnim in družbenim uspešnostim mu je pomagalo tudi sorodstvo z znanimi plemiškimi rodbinami, kot so Codelliji, Zoisi in Attemsi, tako da je imel plačila sposobne paciente. Leta 1739 mu je delo mestnega zdravnika prineslo 200 florinov letne plače. Poleg tega je bila v delokrogu mestnega zdravnika tudi oskrba kaznjencev, kar pa ni bilo posebno donosno delo. Pollini je zdravil zapornike v kaznilnici na Žabjeku. O njegovi človečnosti priča podatek, da je v svoji oporoki kaznilnici na Žabjeku zapustil 150 florinov.

2 POIZVEDBE O POLLINIJEVEM ZDRAVILU

Pollini je svojemu najmlajšemu sinu iz drugega zakona (ta sin je preživel vse njegove otroke) poleg nepremičnin v Ljubljani zapustil tudi recept za »*skrivno antivenerično zdravilo Pollinijev dekokt*,« kot poroča Henrik Costa (2). Costa navaja, da je o tem zdravilu pisal dunajski zdravnik Joseph Ferdinand Friedrich. Ta naj bi na Dunaju leta 1798 objavil že drugo izdajo knjige z naslovom *Pollinijev dekokt in čistilno delovanje lupin laških orehov pri veneričnih in drugih težkih boleznih* (neposreden prevod iz nemščine, op. a.). Lukman je želel navedbo preveriti in se je o knjigi pozanimal v Nacionalni (prej dvorni) knjižnici na Dunaju. Sporočili so mu, da takšne knjige v knjižnici nimajo.

Lukmanu je postala zgodba zanimiva, ker je pater Marko Pohlin v delu *Bibliotheca Carnioliae 43* navedel dva Pollinijeva teksta. Prvi naj bi bil v rokopisu *Examinatio omnium per Carniolam existentium thermarum, acidularum et sanitati conducentium aquarum*. »O tem delu ni sledu,« pravi

Lukman. Drugo, obsežnejše delo naj bi po Pohlinozem poročilo izšlo kot druga izdaja leta 1748 v Frankfurtu in naj bi imelo naslov *Neu-vermehrte heilsame Dreckapotheke*. O letu prvega natisa Pohlin ni poročal. Zato se je Lukman obrnil na *Auskunftsbiro der Deutschen Bibliotheken* v Berlinu in od tam dobil pojasnilo, da gre za delo, ki je prvič izšlo v Frankfurtu leta 1699 in da je bilo potem še večkrat ponatisnjeno, nazadnje kot *curiosum* leta 1906 v Berlinu. Pohlin je napačno sklepal o tem avtorstvu, ker je ime ljubljanskega zdravnika pisal »Paullini«, namesto pravilno »Pollini«, in je zato mislil, da je istoveten zdravniku škofov v Münstru, Christianu Francu Paulliniju, ki je res napisal citirano delo. Izvod te nenavadne farmakoterapije je mogoče občudovati v knjižni zbirki Lavičkovega farmacevtskega muzeja v Leku na Verovškovi cesti v Ljubljani.

Iz uspešne rodbine Pollinijev se je po letu 1700 Andrej Pavel Pollini preselil na Kranjsko in je od leta 1704 do 1727 z ženo Ivano, rojeno Codelli, imel štirinajst otrok. Njun šesti otrok je bil 27. januarja leta 1712 rojeni deček, krščen z imenom Janez Krizostom Jurij (Joannes Chrisostom Georg). Za razumevanje tega prispevka moramo posebej omeniti tudi najmlajšega sina Janeza Krizostoma, to je bil Franc Pavlanski Pollini (1762–1846).

Tako napačni zapis rodbinskega imena Pollini kot tudi različno zapisana krstna imena so povzročili pri nekaterih avtorjih domnevo, da sta obstajala dva ali celo trije zdravniki tega imena. Zaplete je natančno razložil že Lukman (1), v novejšem času pa glasbeni zgodovinar dr. Ivan Klemenčič s svojo raziskavo *Rodbina Pollinijev in ljubljanska leta Franca Pollinija* (3). Za glasbeno zgodovino je najmlajši sin Janeza Pollinija zanimiv, ker je bil za tisti čas izredno uspešen pevec, igravec, violinist, pianist in skladatelj z nastopi na Dunaju, v Ljubljani in več italijanskih mestih. Zato je zgodovinar Klemenčič tudi predstavil odkritje tega glasbenega posebnega na mednarodnem simpoziju *Off-Mozart* leta 1992 v Zagrebu (3).

Za namen tega prispevka pa je najmlajši sin Janeza Pollinija, Franc Pavlanski Pollini, zanimiv kot dedič in distributor Pollinijevega dekokta, takrat zelo iskanega zdravila. Verjetno je imel odjemalce med svojimi številnimi znanci v umetniških in plemiških krogih, na Dunaju je bil na primer med študenti glasbe pri Mozartu in Zingarelliju. V nekaterih italijanskih dokumentih Franca Pollinija celo imenujejo *medicus*, kar pa zagotovo ni bil. Poznal je dunajskega zdravnika Josepha Ferdinanda Friedricha, ki mu je za zdravilo napisal strokovno razpravo *Pollinijev dekokt* in jo objavil na Dunaju pri založniku

Franzu Josephu Rotzerju celo v ponatisu. To je odkril zgodovinar Klemenčič in s tem potrdil pravilnost navedbe v Costovem delu iz leta 1863 (2). Costa je trdil tudi, da je pravi recept dobil od Pollinijevih sorodnikov in da se razlikuje od objave v Friedrichovem besedilu. Pri trženju zdravila je Francu Pavlanskemu Polliniju pomagala uradno dovoljena objava, da mu je oče zapustil »ein bewährtes arcanum antivenericum«, torej preizkušeno antivenerično zdravilo.

3 FRIEDRICH IZDA MONOGRAFIJO O POLLINIJEVEM DEKOKTU

Friedrichovo delo *Pollinijev dekokt (Das Pollinische Decoct, und die reinigende Wirkungen der welschen Nusschalen wider die Lustseuche und mehrere schwere Krankheiten)* je izšlo leta 1794 na Dunaju in je danes dostopno v Avstrijski nacionalni knjižnici (Österreichische National Bibliothek) (slika 1).

»Splošni dobrobiti iz prave ljubezni do bližnjega posveča sestavljalec,« je v uvodu zapisal Friedrich. O avtorju dekokta piše: »V vsej Evropi vsaj po imenu zelo znani ljubljanski zdravnik gospod Pollini, naslednik doktorja Wertenpreissa, ki je to sredstvo s seboj prinesel iz Španije, je z njim mnogim pomagal pri neozdravljivih boleznih. Njegovi sorodniki so dekokt dali pripraviti v javnih lekarnah, torej recepture niso skrivali. Znano zdravilo so mnogi zdravniki imenovali s svojim imenom«, torej kot da je njihovo. V nadaljevanju navaja izdelavo zdravila in opisuje svoje izkušnje pri zdravljenju »veneričnih bolezni in drugih ulceroznih sprememb tudi pri zanemarjenih stanjih«. Zadnji del obsega podroben opis drevesa in plodov ter običajno rabo v prehrani, zdravilstvu in obrti, ki ga je sestavil ljubiteljski botanik, topniški stotnik Joseph von Brandenburg. Friedrich tudi zatrjuje, da sta »sestava in izdelava zdravila natanko takšni, kakršni je imel Pollini, ki mu je Wertehenpreiss tajno zdravilo zaupal na smrtni postelji.« (4).

Antisifilitični dekokti so bili zelo iskana zdravila še v 19. stoletju. Glavne sestavine so bile Radix Sassaparillae (posušene korenine južnoameriških vrst rodu *Smilax*), China nodosa oz. Tubera chinae (podzemni deli gomoljaste ali grčaste kine, *Smilax china*, iz južnih predelov Kitajske) ter tri t. i. lesne droge, ki so jih prinašali iz prekomorskih dežel, Lignum Sassafras (olesenele korenine drevesa *Sassafras albidum* syn. *Sassafras officinalis*, Lauraceae), Lignum santali (beli santalovec, *Santalum album*, Santalaceae), Lignum



Slika 1: Naslovna stran Pollinijevega dekokta.

Figure 1: Cover page of the Decoctum Pollini.

Guajaci (les gvajakovca, *Guaiacum officinale*, Zygophyllaceae, verjetno najbolj znani les za domnevno uspešno zdravljenje sifilisa). Sočasno so dekoktirali tudi anorganske sestavine, predvsem antimonov sulfid ter živo srebro in njegove spojine.

Izstopata dva predpisa, *Decoctum d'Arnaud* in *Decoctum Pollini*, in sicer po sestavini antimonitu (mineral antimonit ali antimonova svetlica, Sb_2S_3) ter po laških orehih (*Juglans regia*, nuces).

Friedrich navaja za Pollinijev dekokt naslednji postopek: Rad. Sassaparillae

Rad. Chinae nodosa
Lapidis pumicis in petia ligati
Antimonii crudi aaaa uncia semis
Corticis nucum Jugl. unciam decem
Coq. in vase clauso in mensuri 2 abus dies
ad dimidiam consumptione

Enostavnejši postopek navaja v nemščini (4):
Rad. Sassaparillae, Rad. Chinae nodosae. Die inneren harten Nusschalen, aaa ein Lot Spiesglanz und Sand in Sakrl im obigem Absud eine halbe Stunde kochen, herausnehmen und die Flüssigkeit bis auf Hälfte einkochen.

V receptih je Friedrich predpostavljal takrat splošno navodilo za dekokcijo lesnih drog, tj. na en utežni del trdnih sestavin uporabimo dva utežna dela vode in uparimo na polovico.

4 POSEBNOST POLLINIJEVEGA DEKOKTA: OREHOVE LUŠČINE

Friedrich je bil začuden, da so v Pollinijevem predpisu orehove lupine in ne zeleni mesnati ovoj plodov (*putamen viride*), kar je bilo običajno. Vendar je v svojem delu večkrat poudaril, da se je s številnimi poskusi prepričal, da je dekokt orehovih luščin bistvenega pomena za učinkovanje zdravila. Celo *Decoctum neapolitanicum*, ki ni vseboval dekokta orehovih luščin in ni dobro deloval, je uspel z dodatkom le tega izboljšati (4).

Po postopku je treba vrečko z antimonovim sulfidom in zdrobljenim plovcem (ki poveča dostop vode do sulfida) odstraniti že po pol ure, z uparivanjem pa nato omogočiti odstranjevanje arzenovih spojin (4).

Martin Ehrmann, ki je svoj *Handbuch der pharmazeutischen Waaren- und Präparatenkunde* pisal z dvajsetletno distanco, navaja pri opisu droge *Juglans* (zvezek 2, str. 223) naslednji postopek:

Orehove luščine so glavna sestavina t. i. Pollinijevega dekokta, ki ga pripravimo iz naslednjih sestavin:

Orehove luščine 4 unče

Chinae nodosae, korenine 1 unča

Sassaparillae, korenine ½ unče

Antimonov sulfid* ½ unče

Plovec ½ unče

*Antimonov sulfid = antimonova svetlica



Slika 2: Bakrorez oreha (*Juglans regia*).

Figure 2: Copperplate engraving of walnut (*Juglans regia*).

Sestavine kuhamo v 4 funtih vode, tako da masa izhlapi na polovico. »Nenavadno je, da za pripravo Pollinijevega dekokta uporabijo suhe luščine namesto zelene semenske ovojnice (*putamen viride*),« je komentiral tudi Ehrmann (5).

5 NAVAJANJE ANTIVENERIČNIH DEKOKTOV DO LETA 1958

Preskušanje dekoktov prekomorskih lesnih drog (sasafrasa, santalovca, gvajakovca) je pokazalo, da so diuretiki, laksativni in ekspektorativni učinki povezani z jemanjem velikih odmerkov



dekoktov, tako da je diurezo mogoče pripisati veliki količini popite vode, specifičnega delovanja pa niso odkrili.

Že v dvajsetih letih 19. stoletja je zanimanje za antisifilitične dekokte uplahnilo, vendar so jih v praksi še dolgo uporabljali. Ljubljanski mestni zdravnik Fran Viljem Lipič v svoji *Topografiji mesta Ljubljane* omenja zdravljenje sifilisa takole: »Primarni sifilis (lues) zato lahko pri strogi dieti v večini primerov toliko bolje ozdravimo z majhno količino merkurialnih preparatov. Z zlatovimi preparati nisem poskušal zdraviti, čistilnim dekoktom, če ne vsebujejo panaceje proti tej nadlogi, pa ne zaupam preveč.« (6). Sklepamo lahko, da je Lipič antisifilitične dekokte dobro poznal, vendar jih tudi v svojem delu *Bolezni Ljubljančanov* ni omenjal. Opombo o panaceji v dekoktih pa najdemo v delu njegovega asistenta dr. Frančiška Koestla na medicinsko-kliničnem inštitutu v Padovi (7). Koestl nobenega antisifilitičnega dekokta ne našteva posebej, vendar ima v monografiji droge Nux juglans naslednje navodilo (7):

Putaminum viridium decoctum, pro usu interno, ad unciam semis ordinabatur in syphillide:

Rec. Putamin. Nuc. jugland. virid. *Unciam semis*

Consc. coq. c. s. aq. c. p. 1/2 h

Col. librae unius adde:

Syr. simpl. *unc. duas*

D. S. Pro potu

Lipič je torej v svoji klinični praksi predpisoval posamezne sestavine nekdanjih antisifilitičnih dekoktov, vendar je sestavine ločeval. Predpisoval je tudi dekokta Lignum Guajaci in Radix Sarsaparillae. Pri orehu je predpisoval zunanjo zeleno lupino, verjetno je s premislekom izbral bolj priznani del droge. Domnevamo lahko, da sta oba avtorja sestavo Pollinijevega dekokta poznala, saj sta navajala pri Radix Sarsaparillae recept za prav tako večkomponentni *Decocotum Zittmanni* (7). Ta dekokt imamo še v nemški farmakopeji DAB 6 in njenem Dopolnilu, torej leta 1958.

Decocotum Zittmanni

Sarsaparillae 100, Aq. 2400, Sacch. 6, Alumen 6, Hydrargyrum chloratum mite 4, Hydrargyri oxydum rubrum 1, Anisi fruct. 2, Foeniculi fruct. 4, Sennae fol. 24, Liquiritiae radix 12.

Sarsaparillo digeriramo z vodo 24 ur, dodamo saharozo, galun in v laneno vrečko zavezane živosrebrove spojine ter v pokriti posodi segrevamo na vodni kopeli 3 ure. Dodamo preostale sestavine in segrevamo še 15 min. Ohlajeno iztisnemo, sedimentiramo, dekantiramo in dopolnimo z vodo do 2500 volumskih delov.

V poenostavljeni Lipič/Koestlovi recepturi za uporabo zelenih delov plodu oreha je morda že opaziti vpliv novega razmišljanja o zdravilnih učinkovinah, saj so takrat poznali že številne izolirane za zdravljenje uporabne alkaloidne.

6 SKLEP

Kakor je znano, se je uspešno zdravljenje sifilisa začelo šele s sintezo organoarzenovih spojin, zlasti s salvarsanom (Paul Erlich, Alfred Bertheim, 1907), dokler niso pomembno področje infekcij s treponemo in gonokoki rešili z uvedbo penicilina (Alexander Fleming, Ernest Boris Chain, Howard Florey, 1942).

Današnje poznavanje delovanja polifenolov, juglona (5-hidroksi-1,4-naftokinona), plumbagina (5-hidroksi-2-metil-1,4-naftokinona) in drugih sestavin zelenih listov in zelenega osemenja plodov oreha ter drugih spojin z reduktivnim učinkom zlasti v celičnih kulturah temelji na od koncentracije odvisnem zmanjšanju viabilnosti keratinocitov v celični kulturi (8). Za juglon so dokazali tudi kancerogeno in antibiotično delovanje (9). Sestavine plodov oreha so proučevali tudi na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, vendar ne vključujejo sestavin luščin (10), so pa drugi raziskovalci poročali o sestavinah produktov pirolize luščin (11).

Ali so morda razgradni produkti iz polimerne mreže lignina po dolgotrajnem segrevanju v vodi morda le prispevali k zdravilnim učinkom Pollinijevega dekokta? Ljubljanski zdravnik Janez Krizostom Pollini je imel originalno zamisel za modifikacijo recepture, ki jo je povzel po predlogu svojega predhodnika, zdravnika Werthenpreissa. Pri tem je z zgodovinskega vidika pomembno, da je drage in nespecifično učinkovite prekomorske lesne droge zamenjal z orehovimi luščinami. Morda je skrivnostna receptura povezana s podatkom, da je Pollini nekaj časa bival tudi v Španiji.

7 LITERATURA

1. Lukman FK. *Kronika slovenskih mest. MOL Ljubljana; 1940: 32-34.*
2. Costa H. *Mittheilungen des Historischen Vereins für Krain 1863.*

3. Klemenčič V. Franc (Francesco) Pollini's Ancestors and His Early Career in Ljubljana. In: *Off-Mozart. Musical Culture and the »Kleinmeister« of Central Europe 1750-1820. Proceedings of the Musicological Symposium*, 1992: 139-152.
4. Friedrich JF. *Österreichische Nationalbibliothek. Das Pollinische Dekokt gegen die Lustseuche und mehrere andere schwere Krankheiten*. Wien, 1798.
5. Ehrmann M. *Handbuch der pharmazeutischen Waaren- und Präparatenkunde*. Wien, 1820.
6. Lipič FV. *Topografija c.-kr. Deželnega mesta Ljubljane*. Ljubljana, 1834. *Ponatis izvirnika in prevod v slovenščino*. Ljubljana, 2003: 270.
7. Koestl F. *Observationes et experientiae circa remedia eorumque formulas in Instituto medico clinico Pataviano a Prof. Lippich directo, praescribi solita*. Viennae, 1843: 150, 170.
8. Johnson Inbaraj J, Chignell CF. Cytotoxic action of Juglone and Plumbagin: A Mechanistic Study Using HaCa T Keratinocytes. *Chem Res Toxicol* 2004; 17(1): 55-62.
9. Van Duuren BL, Segal A, Tseng S-S et al. Structure and tumor-promoting activity of analogues of anthralin (1,8-dihydroxy-9-anthrone). *J Med chem* 1978; 21(1): 26-31.
10. Colarič M, Verbenič R, Solar A et al. Plumbic acid, Syringaldehyde and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia*. *L. J. Agric Food chem* 2005, 53(16). 6390-96.
11. Mathias EV, Halkar UP. Separation and characterization of lignin compounds from the walnut (*Juglans regia*) shell oil using preparative TLC, GC-MS and 1H-NMR. *J Anal Appl Pyrolysis* 2004; 71: 515-524.



ELECTROLAB

APARATI ZA TESTIRANJE FARMACEVTSKIH IZDELKOV

Neprekosljivo razmerje cena / kvaliteta

3-letna garancija

*programska oprema v skladu z 21 CFR Part 11



Aparat za pripravo disolucijskega medija z integrirano DO sondo



DONAU LAB Ljubljana
Member of LPPgroup

Donau Lab d.o.o., Ljubljana
Tbilisjska 85
SI-1000 Ljubljana
www.donaulab.si
office-si@donaulab.com

IMPLEMENTACIJA SMERNICE ICH M7 IN VREDNOTENJE GENOTOKSIČNIH NEČISTOT

IMPLEMENTATION OF THE ICH M7 GUIDELINE AND EVALUATION OF GENOTOXIC IMPURITIES

AVTOR / AUTHOR:

asist. dr. Jan Schmidt, mag. farm.¹

izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.²

¹ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta,
Taborska 8, 2000 Maribor

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko
tehnologijo, Smetanova 17, 2000 Maribor,

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
jan.schmidt@um.si

POVZETEK

Prisotnost genotoksičnih nečistot v zdravilnih učinkovinah in končnih farmacevtskih izdelkih predstavlja potencialno tveganje za končne uporabnike, predvsem zaradi toksičnih učinkov na genetski material posameznika. Direktno genotoksične spojine zaradi svoje reaktivnosti povzročajo poškodbe DNA in so potencialno mutagene, medtem ko indirektno genotoksične spojine prek posrednih mehanizmov rušijo integriteto DNA. Področje nečistot ureja več različnih smernic na nivoju mednarodne konference o harmonizaciji (ICH), pred kratkim pa je v veljavo vstopila nova smernica ICH M7, ki natančneje opredeljuje postopke presoje in nadzora genotoksičnih nečistot v farmacevtskih izdelkih. Glavna novost smernice je predpisana uporaba dveh različnih računalniških pristopov napovedovanja toksičnosti v osrednjih procesih razvrščanja genotoksičnih nečistot v razrede z namenom zmanjšati število eksperimentalnih študij *in vitro* (npr. Amesov test). V preglednem članku predstavljamo novosti, ki jih prinaša smernica ICH M7, predvsem z vidika različnih razredov genotoksičnih nečistot, načina njihovega vrednotenja ter metod *in silico*, *in vitro* ter *in vivo* za določanje mutagenosti.

KLJUČNE BESEDE:

genotoksične nečistote, (Q)SAR metode, mutagenost, ICH M7, Amesov test

ABSTRACT

The presence of genotoxic impurities in drug substances and pharmaceutical drug products represents a potential threat for users, especially due to the toxic effects on the genetic material of individuals. Direct genotoxic compounds due to their reactivity, cause DNA damage and are potentially mutagenic. Indirect genotoxic compounds disrupt the DNA integrity through indirect mechanisms not comprising reactions with the DNA. Impurities are regulated by several guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH). A new ICH M7 guideline, recently entered into force, precisely defines the assessment and control of genotoxic impurities in pharmaceuticals. The main new feature of this guideline is implementation of two different computational approaches for the prediction

of genotoxicity as a main part of decision-making process for classification of genotoxic impurities in order to reduce the number of experimental *in vitro* studies (e.g. Ames assay). This review represents the new ICH M7 guideline, especially regarding different classes of genotoxic impurities, the approaches to their evaluation, and *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of mutagens.

KEY WORDS:

genotoxic impurities, (Q)SAR methods, mutagenicity, ICH M7, Ames assay

1 UVOD

Sintezne učinkovine in posledično tudi končna zdravila predstavljajo določeno tveganje zaradi vsebnosti različnih nečistot. Področje nečistot urejajo smernice, ki so usklajene na nivoju mednarodne konference o harmonizaciji (ICH). Smernica ICH Q3A(R2): *Impurities in New Drug Substances* opredeljuje navedbo, identifikacijo in kvalifikacijo organskih nečistot v novih zdravilnih učinkovinah, pridobljenih s kemično sintezo, smernica ICH Q3B(R2): *Impurities in New Drug Products* opredeljuje razpadne ali reakcijske produkte učinkovin v novih končnih zdravilih, smernica ICH Q3C(R5) predpisuje mejne vrednosti *ostankov topil* v farmacevtskih izdelkih ter podaja zahteve za njihovo vrednotenje v učinkovinah, pomožnih snoveh in farmacevtskih izdelkih (1, 2, 3). Smernica ICH Q3D uvaja mednarodna pravila za *kvantitativno in kvalitativno kontrolo nad kovinskimi nečistotami* (4).

Vsem smernicam je skupna paradigma, da je potrebno vsakršno tveganje zmanjšati na najnižji možen nivo. V skladu z navedenimi smernicami ICH lahko nečistote razdelimo na: *organske* (izhodne spojine, reaktantni, stranski produkti sinteze), *anorganske* (ostanki kovin, ki so večinoma posledica uporabe katalizatorjev) ter *ostanke topil*. Vedno večjo pozornost namenjamo določanju in kontroli **genotoksičnih nečistot**, saj lahko predstavljajo tveganje za povečan razvoj rakavih bolezni. Za nadzor nad genotoksičnimi nečistotami je potrebno poskrbeti že v zgodnjih fazah razvoja novega zdravila, npr. že v začetku načrtovanja sintezne poti, izbiri spojin vodnic itd.

2 OSNOVNA RAZDELITEV MEHANIZMOV DELOVANJA GENOTOKSIČNIH SPOJIN

Med genotoksične spojine uvrščamo reaktivne ali potencialno reaktivne kemijske spojine, ki lahko same ali šele po metabolični bioaktivaciji zaradi svoje reaktivnosti povzročijo poškodbe DNA. Zaradi alkiliranja nukleinskih baz v strukturi DNA lahko prihaja do nastanka spremenjenih nukleinskih baz ali pa celo nastanka apurinskih in apirimidinskih mest, kar vodi v nastanek napačnih baznih parov, prihaja pa lahko tudi do replikacijskih oz. transkripcijskih blokad v primeru večjih alkinih substituentov. Bifunkcionalni alkilanti povzročajo tudi prečna premreženja DNA. Nekatere spojine se lahko zaradi planarnosti vrinejo med bazne pare v strukturi DNA in z interkalacijo povzročijo spremembe v strukturi DNA. V naštetih primerih govorimo o t. i. **direktnih genotoksičnih spojinah**. Med **indirektne genotoksične spojine** uvrščamo kolhicin, ki zavira nastanek delitvenega vretena, zaviralce encimov topoizomeraz ter različne reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, ki delujejo indirektno na integriteto DNA (5). Na podoben način lahko razdelimo mehanizem delovanja genotoksičnih nečistot.

Že v uvodu naj opozorimo, da pojma genotoksičnost in mutagenost mnogokrat uporabljamo kot sinonima, čeprav med njima obstaja bistvena razlika. Končni učinek genotoksičnega delovanja namreč ni nujno mutacija oz. mutageno delovanje (5). Za lažje razumevanje smernic in predpisov naj dodamo še pojasnilo, da indirektno genotoksične spojine, ki niso mutagene, praviloma imajo *prag delovanja* in kot takšne večinoma ne predstavljajo tveganja za rakave bolezni pri ljudeh, saj so kot nečistote prisotne v dovolj majhnih količinah (5, 6).

V članku bomo izpostavili temeljne principe ter novosti regulative genotoksičnih nečistot, ki jih vpeljuje nova smernica – **ICH M7 z naslovom »Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk«** ter dodatek k navedeni smernici – ICH M7(R1) (*Addendum to ICH M7*) (7, 8). ICH M7 dopolnjuje že obstoječe smernice ICH Q3A(R2), Q3B(R2) in ICH M3(R2) ter natančno opredeljuje določanje in nadzor nad DNA reaktivnimi (mutagenimi) nečistotami v novih zdravilih z namenom zmanjšati potencialno tveganje za rakave bolezni (6). **Smernica ICH M7 obravnava predvsem direktne genotoksične nečistote** oz. DNA reaktivne spojine, ki lahko povzročijo ne-



posredne poškodbe DNA v zelo majhnih koncentracijah. Govorimo o mutagenih spojinah, ki potencialno povzročajo rakave bolezni. Detektiramo jih s pomočjo bakterijskega testa reverzних mutacij (t. i. Amesov test).

3 REGULATORNI VIDIK

Pred izidom ICH M7 so neposredno področje genotoksičnih nečistot urejali različne smernice in priporočila Evropske agencije za zdravila (EMA) ter Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) (9, 10, 11). Smernica ICH M7 dejansko prvič predstavlja enoten dokument, ki formalno ureja področje genotoksičnih nečistot v farmacevtskih izdelkih. Opisuje proces, pri katerem so dejanske in potencialne nečistote ali razgradni produkti v učinkovini in končnem zdravilu identificirani, ter ponazarja način izvedbe ocene tveganja. Ključna pridobitev smernice ICH M7 je implementacija dveh različnih računalniških (*in silico*) metod za napovedovanje toksičnosti v celovit sistem regulatornega odločanja. V regulatornem smislu odločanja so posledično *in vitro* metode v novi smernici pravzaprav enakovredne računalniškemu modelom (kvantitativnega) odnosa med strukturo in delovanjem ((Q)SAR). To je vsekakor pomemben mejnik sprejetja modelov QSAR v regulatorno ter industrijsko prakso.

Skladno z obstoječimi smernicami ICH Q3A(R2), Q3B(R2), Q3C(R5) ter Q3D so lahko potencialni viri nečistot izhodne spojine, stranski produkti, intermedijati, razgradni produkti, reagenti, ligandi, katalizatorji, topila ter drugi materiali, ki

na kakršen koli način prihajajo v stik z učinkovino ali farmacevtsko obliko.

3.1 NEČISTOTE V NOVIH UČINKOVINAH IN SMERNICA ICH Q3A

Smernica ICH Q3A(R2) navaja, da morajo proizvajalci narediti povzetek dejanskih in potencialnih nečistot, ki nastajajo med sintezo, čiščenjem in shranjevanjem učinkovin (1). Kot je razvidno iz spodnje preglednice, so za nove učinkovine vpeljane tri različne vrste pragov, ki zahtevajo **navedbo, identifikacijo in kvalifikacijo organskih nečistot**. Pragovi so odvisni od dnevnega odmerka učinkovine. Zaužitje večjega odmerka pomeni tudi večji vnos količine nečistot in s tem posledično večje tveganje za bolnika (preglednica 1) (1, 2, 3).

3.2 RAZGRADNI PRODUKTI V NOVIH ZDRAVILIH IN SMERNICA ICH Q3B

Komplementarna z vidika vsebine je smernica ICH Q3B(R2), saj opredeljuje le nečistote v novih zdravilih, ki so opredeljene kot razgradni produkti učinkovine ali reakcijski produkti učinkovine s pomožnimi snovmi in/ali stično ovojino (smernica za navedeno uporablja izraz razgradni produkti) (2). V to skupino ne uvršča nečistot, katerih vir so pomožne snovi ali ki so posledica sproščanja iz vsebnika. Pomembno je poudariti tudi tiste skupine zdravil (različni kriteriji), ki jih smernica ne vključuje: zdravila v razvoju (npr. klinične študije), biološka zdravila, peptidi, oligonukleotidi, radiofarmacevtiki, produkti fermentacije in polsintezni derivati iz rastlinskih virov ter surovi produkti živalskega ali rastlinskega izvora. S farmacevtsko-tehnološkega vidika ni obravnave polimorfnih oblik učinkovin in enantiomernih nečistot (7, 8). Količine dnevno zaužitega

Preglednica 1. Pragovi navedbe, identifikacije in kvalifikacije organskih nečistot v novih zdravilnih učinkovinah (1, 3).

Table 1. Reporting, identification and qualification thresholds for impurities in new drug substances (1, 3).

Največji dnevni odmerek zdravilne učinkovine ^a	Prag navedbe ^{b,c}	Prag identifikacije ^c	Prag kvalifikacije ^c
≤ 2 g/dan	0,05 %	0,10 % ali dnevni vnos 1,0 mg (glede na to, kateri je manjši)	0,15 % ali dnevni vnos 1,0 mg (glede na to, kateri je manjši)
> 2 g/dan	0,03 %	0,05 %	0,05 %

^a Količina dnevno zaužite zdravilne učinkovine.

^b Višji pragovi poročanja morajo biti znanstveno utemeljeni.

^c Ustrezne so lahko tudi manjše vrednosti pragov v primeru, da gre za nečistote z neobičajno visoko toksičnostjo (izraz vključuje genotoksične nečistote).

Preglednica 2. Pragovi navedbe, identifikacije in kvalifikacije za razgradne produkte v novih zdravilih (2, 3).
Table 2. Reporting, identification and qualification thresholds for degradation products in new drug products (2, 3).

Največji dnevni odmerek zdravilne učinkovine ^a	Prag navedbe ^{b,c}	Prag identifikacije ^{b,c}	Prag kvalifikacije ^{b,c}
≤ 1 g	0,1 %		
> 1 g	0,05 %		
≤ 1 mg		1,0 % ali 5 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)	
1–10 mg		0,5 % ali 20 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)	
> 10 mg–2 g		0,2 % ali 2 mg TDI (glede na to, kateri je manjši)	
> 2 g		0,10 %	0,15 %
≤ 10 mg			1,0 % ali 50 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)
10–100 mg			0,5 % ali 200 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)
> 100 mg–2 g			0,2 % ali 3 mg TDI (glede na to, kateri je manjši)

^a Količina dnevno zaužite zdravilne učinkovine.

^b Višji pragovi poročanja morajo biti znanstveno utemeljeni.

^c Pragovi za razgradne produkte so izraženi kot odstotek zdravilne učinkovine ali kot celotni dnevni vnos (TDI, *total daily intake*) razgradnega produkta. Ustrezne so lahko tudi manjše vrednosti pragov, če gre za razgradni produkt z neobičajno visoko toksičnostjo.

zdravila so veliko bolj razčlenjene kot dnevni odmerki za učinkovino (preglednica 2). Vpeljane so tri različne vrste pragov, ki zahtevajo **navedbo, identifikacijo in kvalifikacijo razgradnih produktov**.

4 GENOTOKSIČNE NEČISTOTE V NOVIH UČINKOVINAH

Skladno s smernico ICH Q3A je potrebno dejanske nečistote identificirati, kadar so vrednosti pragov prekoračene (1). V tem delu obstajajo določene izjeme, pri katerih je potrebna identifikacija, tudi kadar identifikacijski prag ni presežen. Smernica namreč določa, da je v primeru nečistot, za katere predvidevamo neobičajno močan, toksičen

ali signifikanten farmakološki učinek pri količinah pod pragom identifikacije, potrebno razviti analizne metode za njihovo identifikacijo (5). Naj na tem mestu še enkrat izpostavimo, da definicija med drugim vključuje tudi genotoksične nečistote. Iz smernice ICH Q3A izhaja tudi dejstvo, da so za nečistote v učinkovinah, ki presegajo prag kvalifikacije 0,15 %, potrebna genotoksična testiranja (točkovne mutacije, test kromosomskih aberacij) in po potrebi tudi splošna toksikološka testiranja na živalih (1).

Potencialne nečistote v novi učinkovini so lahko predvsem izhodne spojine, reagenti, stranski produkti in intermedijati, ki jih uporabljajo v celotnem postopku kemične sinteze zdravilne učinkovine. Potrebna je tudi analiza tveganja prenosa teh nečistot v končno učinkovino (npr. izhodne spojine, ki jih uvajamo v poznih sinteznih stopnjah, predstavljajo višjo stopnjo tveganja). **Vse dejanske nečistote in potencialne ne-**



čistote, katerih strukturo poznamo, morajo biti ustrezno ovrednotene z vidika mutagenega potenciala (1, 7).

Vedno pomembnejšo vlogo z vidika testiranja nečistot v novih učinkovinah predstavlja **strategija načrtovanja sintezne poti**. Temelj predstavlja predvsem tveganje ter segment vstopa genotoksične nečistote v sintezno pot glede na bližino končne sintezne stopnje nove učinkovine. Vpeljava genotoksičnih nečistot v zgodnjih stopnjah sinteze predstavlja manjše tveganje za njihovo prisotnost v končni učinkovini, medtem ko njihova vpeljava v poznejših stopnjah s toksikološkega vidika predstavlja kritičen indikator, ki zahteva natančnejšo proučitev tveganja (12, 13, 14).

4.1 IZBRANI PRIMER UVEDBE GENOTOKSIČNE NEČISTOTE V ZADNJO SINTEZNO STOPNJO UČINKOVINE

Za genotoksično nečistoto, ki se uvede v zadnjo stopnjo sinteze, je v večini primerov potrebna specifikacija na osnovi toksikološke presoje. Za primer prikažimo učinkovino, ki jo izoliramo v obliki soli z metansulfonsko kislino. Kadar končna stopnja sinteze vključuje uporabo alkohola, obstaja velika verjetnost tvorbe genotoksičnih estrov z metansulfonsko kislino (npr. nastanek metil mezilata pri uporabi metanola). V takih primerih moramo dokazati, da med sinteznim procesom v primeru tvorbe takšnega estra le-tega ustrezno odstranimo (skladno s postopkom Evropske farmakopeje za soli sulfonskih kislin) (12). Na ta način se izognemo rutinskemu testiranju.

Iz prakse je poznan primer, ki sega v pomlad 2007. Na trg so lansirali zdravilo z učinkovino nelfinavirjev mezilat, kontaminirano z genotoksično nečistoto, estrom etil metansulfonatom. Pacienti so poročali o neprijetnem vonju tablet, pojavili so se tudi prvi primeri slabosti in bruhanja pri pacientih iz Španije. Junija 2007 je sledil odpoklic zdravila na globalni ravni, saj so regulatorne agencije odkrile do 1000-krat prekoračene količine etil metansulfonata od dovoljenih toksikoloških specifikacij (12, 15, 16).

5 PODROČJE UPORABE SMERNICE ICH M7

Področje uporabe obsega nove učinkovine in nova zdravila med procesi kliničnega razvoja in pridobivanja dovoljenja

za promet z novim zdravilom (originatorska zdravila). Zajema tudi del regulatornih procesov po pridobitvi dovoljenja za promet z novim zdravilom (spremembe že obstoječega dovoljenja za promet), pa tudi pridobitev novih dovoljenj za promet z zdravili, ki vsebujejo učinkovine, prisotne v predhodno že registriranih zdravilih (generiki) (7). V obravnavo ICH M7 niso vključena biološka/biotehnološka zdravila, peptidi, oligonukleotidi, radiofarmaceutiki, produkti fermentacije, zdravila rastlinskega izvora ter surovi produkti živalskega ali rastlinskega izvora. Smernica tudi ne zajema učinkovin in zdravil za zdravljenje napredovalih oblik raka ter učinkovin za druga indikacijska področja, ki so genotoksične pri terapevtskih koncentracijah in za katere lahko pričakujemo, da so povezana s povečanim tveganjem za pojav raka. V tem primeru namreč mutagene nečistote ne bi imele znatnega vpliva na tveganje za pojav raka. Smernica tudi ne predvideva ocene nevarnosti za pomožne snovi, arome, barvila itd. Izjemoma lahko principe ocene nevarnosti, ki jih opisuje smernica, uporabljamo za nečistote v pomožnih snoveh, ki se uporabljajo prvič v določenem zdravilu in so pridobljene s kemično sintezo (7, 8).

6 OCENA NEVARNOSTI (HAZARD ASSESSMENT) GENOTOKSIČNIH NEČISTOT

Smernica ICH M7 podaja priporočila glede genotoksičnih nečistot v novih učinkovinah in končnih zdravilih med njihovim kliničnim testiranjem in med procesom registracije novega zdravila ter sprememb dovoljenja za promet z zdravili, ki so že na trgu (7). Ocena mutagenega potenciala je namreč potrebna pri spremembah sintezne poti učinkovin (nove nečistote ali zvišanje kriterijev sprejemljivosti za obstoječe nečistote), spremembah v formulaciji zdravila, sestavi ali proizvodnem procesu (novi razgradni produkti ali zvišani kriteriji sprejemljivosti za obstoječe razgradne produkte) ter spremembah v indikaciji ali režimu odmerjanja, ki znatno vplivajo na sprejemljivo raven tveganja za pojav raka. Smernica se osredotoča na DNA reaktivne spojine, ki lahko reagirajo z DNA v majhnih koncentracijah, kar vodi v mutacije in tveganje za razvoj karcinomov (7, 8). Podaja načine identifikacije, kategorizacije, kvalifikacije in kontrole genotoksičnih nečistot in na ta način zapolnjuje regulatorno vrzel na tem področju, sočasno pa dopolnjuje smernici ICH Q3A in ICH Q3B (1, 2).

Ocena nevarnosti vključuje začetno analizo dejanskih in potencialnih nečistot s pomočjo pregleda podatkovnih

zbirk in literature v zvezi s podatki o njihovi karcinogenosti in bakterijski mutagenosti. Na podlagi tega sledi klasifikacija v enega izmed razredov 1, 2 ali 5. Če teh podatkov ni na voljo, je potrebno določiti odnos med strukturo in delovanjem (SAR), ki se osredotoča predvsem na napovedovanje bakterijske mutagenosti. Slednje nam omogoča razvrstitev nečistot v razrede 3, 4 ali 5 (7, 8).

V skladu s smernico ICH M7 lahko nečistote glede na mutageni in karcinogeni potencial razvrstimo v pet razredov:

Razred 1: nečistote z znanim mutagenim in karcinogenim delovanjem;

Razred 2: nečistote z dokazanim mutagenim delovanjem, vendar z neznanim karcinogenim potencialom. To pomeni pozitiven bakterijski test mutagenosti ali pa so na voljo kateri koli drugi relevantni podatki o mutagenosti, ki nakazujejo reaktivnost z DNA ali učinke, kot je sprožanje genskih mutacij (npr. pozitivni izsledki *in vivo* študij genskih mutacij); brez podatkov o karcinogenosti na glodalcih;

Razred 3: nečistote s tvegano kemijsko strukturo (*alerting structure*), ki ni strukturno podobna zdravilni učinkovini; podatkov o mutagenem delovanju ni;

Razred 4: nečistote s tvegano kemijsko strukturo (*alerting structure*), ki je enaka tvegani strukturi v zdravilni učinkovini ali spojinah, ki so strukturno sorodne zdravilni učinkovini (npr. intermediati), vendar z negativnim izidom testiranja v bakterijskem testu mutagenosti;

Razred 5: nečistote brez tvegane kemijske strukture ali s tvegano kemijsko strukturo z ustrežno količino podatkov, ki potrjujejo odsotnost mutagenih ali karcinogenih učinkov (7, 8).

Skladno z ICH M7 ocena nevarnosti dejanskih in potencialnih nečistot v prvi fazi zajema predvsem preverjanje informacij o karcinogenosti in mutagenosti v odprtih, komercialnih ali lastniških podatkovnih bazah ter drugi literaturi z namenom razvrstitve v enega izmed razredov 1, 2 ali 5. Dodatek ICH M7(R1) pomembno dopolnjuje smernico predvsem v smislu karakterizacije tveganja in upoštevanja mejnih vrednosti za posamezne razrede nečistot (8).

7 KARAKTERIZACIJA TVEGANJA

Smernica ICH M7 v poglavju Karakterizacija tveganja (*risk characterization*) predvideva izračun sprejemljive izpostavljenosti (*acceptable intakes*) za nečistote razredov 1, 2 in 3.

7.1 SPREJEMLJIVA IZPOSTAVLJENOST NA OSNOVI ZA SPOJINO SPECIFIČNE OCENE TVEGANJA (COMPOUND-SPECIFIC RISK ASSESSMENT)

7.1.1 Vrednotenje mutagenih nečistot z dokazanim karcinogenim delovanjem (razred 1)

Za znane mutagene karcinogene, ki so brez praga delovanja (npr. dimetil karbamoil klorid, hidrazin), se predvideva izračun za *spojino specifične sprejemljive izpostavljenosti (AI, ang. compound-specific acceptable intake)*. AI izračunamo na osnovi karcinogenosti posamezne nečistote in linearne ekstrapolacije, obstajajo pa tudi drugi pristopi npr. z uporabo *odmerka, ki povzroči nastanek tumorja pri polovici preskusnih živali (TD₅₀, tumorigenic dose rate 50)*, pridobljenega iz študij karcinogenosti na glodalcih. Smernica ICH M7 navaja kot primer izračun AI za etilen oksid.

7.1.2 Mutagene nečistote z dokazanim pragom delovanja

Pri tovrstnih nečistotah obstaja mehanizem delovanja, ki vodi do nelinearnega odziva v odvisnosti od odmerka z dejanskim pragom. V zadnjem času ugotavljamo za vse večje število spojin, ki so DNA reaktivne, prag delovanja. Njihov direkten toksičen učinek na DNA je namreč največkrat odvisen od hitrih fizioloških detoksifikacijskih procesov in/ali od popravljalnih mehanizmov DNA. Primer DNA reaktivne nečistote s pragom delovanja je etil metan sulfonat (*in vitro* ter *in vivo* mutagen), kjer izračunamo *dovoljeno dnevno izpostavljenost (PDE, permissible daily exposure)* na podlagi *odmerka, pri katerem ni učinka (NOEL, no observed effects level)*, in z upoštevanjem varnostnih faktorjev (7, 8). Dodatek ICH M7(R) vsebuje tudi preglednico z različnimi spojinami, za katere so že podane mejne vrednosti (AI ali PDE) (8).

Izračune AI lahko tudi prilagajamo za krajša obdobja uporabe nekega zdravila (tj. krajša uporaba od celotne življenjske dobe), kjer odčitamo vrednosti (preglednica 4), ki so izpeljane za različne dolžine trajanja zdravljenja z zdravilom, ali pa izberemo 0,5 % dnevnega odmerka (glede na to, katera vrednost je manjša) (7).

7.2 VREDNOTENJE NEČISTOT RAZREDOV 2 IN 3

Pri nečistotah razredov 2 in 3 upoštevamo mejne vrednosti *praga toksikološkega tveganja (TTC, threshold of toxic-*



Preglednica 4. Sprejemljiva izpostavljenost za posamezno nečistoto (7).

Table 4. Acceptable intakes for an individual impurity (7).

Trajanje zdravljenja	≤ 1 mesec	> 1–12 mesecev	> 1–10 let	> 10 let – doživljenjsko
Dnevni vnos (µg/dan)	120	20	10	1,5

logical concern). Koncept TTC opredeljuje odmerek 1,5 mg nečistote/dan kot sprejemljivi vnos mutagenih nečistot pri človeku. Navedeni dnevni vnos predstavlja namreč zanemarljivo tveganje za razvoj raka pri posamezniku (manjše od 1 proti 100.000) pri doživljenjski izpostavljenosti. Ta pristop uporabljamo v primeru mutagenih nečistot v farmacevtskih izdelkih za dolgotrajno zdravljenje (> 10 let) in kjer ni na voljo podatkov o karcinogenosti. Izjemo predstavljajo mutageni karcinogeni z visoko jakostjo aktivnosti (*cohort of concern*), kot so aflatoksinom podobne spojine ter spojine z N-nitroso skupino in alkil-azoksi fragmenti, saj lahko teoretično pomenijo tveganje za razvoj raka tudi pri vrednostih, ki so manjše od TTC, zato so v tem primeru dovoljeni vnosi pod vrednostjo TTC (7). V določenih okoliščinah prihaja do izraza tudi izpostavljenost nečistoti, ki je *krajša od celotnega življenjskega obdobja (LTL, less-than-lifetime)* ali pa poteka režim odmerjanja zdravila v daljših večdnevnikih intervalih (npr. enkrat tedensko). V teh primerih so za krajše izpostavitve sprejemljivi večji odmerki (princip LTL), zato nas zanima celotno število odmernih dnevov, kar odčitamo s pomočjo preglednice 4 (7). ICH M7 predvideva ločeno preglednico v primerih, kadar obstajajo vsaj tri vrste nečistot razreda 2 oz. 3 ali večje število, saj v teh primerih ugotavljamo celotno število mutagenih nečistot (7).

7.3 VREDNOTENJE NEČISTOT RAZREDOV 4 IN 5

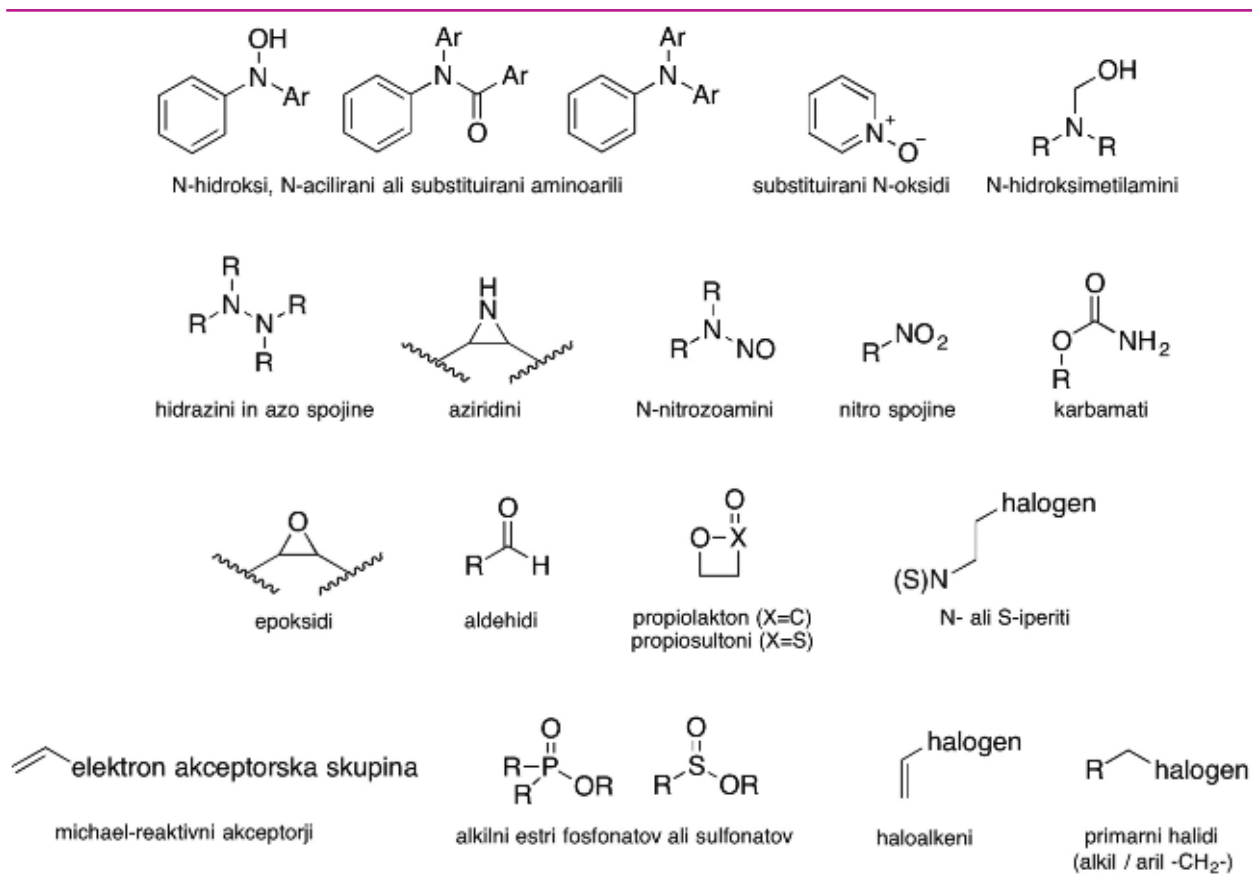
Smernica ICH M7 obravnava nečistote razredov 4 in 5 kot nemutagene nečistote, vendar s pomembno razliko. V razred 5 namreč uvršča nečistote brez tvegane kemijske strukture ali pa le-te vsebujejo tvegano strukturo, kjer pa je na podlagi vseh razpoložljivih podatkov dokazana odsotnost mutagenega ali karcinogenega delovanja (7). Nečistote razreda 4 vsebujejo tvegan strukturni fragment, ki je že zastopan v zdravilni učinkovini ali strukturno sorodnih spojinah (npr. v procesnih intermediatih), vendar so rezultati testov mutagenosti teh struktur dokazano negativni. V tej skupini nečistot tvegan strukturni fragment največkrat pomeni potencialno genotoksično strukturo v enakem položaju in kemijskem okolju glede na že potrjeno nemutageno delovanje zdravilne učinkovine ali sorodne spojine z enakim strukturnim fragmentom. Pri tem gre v praksi običajno za

različne serije spojin, ki imajo največkrat različne substituentne, vezane na centralno ogrodje s tvegano kemijsko strukturo (npr. serija različno substituiranih kinon-iminov), ki pa je nemutagena, ali pa gre za analoge, kjer je tvegana kemijska struktura (npr. aromatska amino skupina) vezana na položaj, ki deaktivira njeno mutageno delovanje (npr. trifluorometilne skupine v meta položaju glede na amin). Nečistote razredov 4 in 5 običajno vrednotimo in nadziramo pri mejnih vrednostih, ki so skladne s smernicama ICH Q3A in ICH Q3B (1, 2).

8 UPORABA RAČUNALNIŠKIH (Q)SAR METOD PRI KLASIFIKACIJI GENOTOKSIČNIH NEČISTOT

Če za določeno nečistoto podatkov za mutagenost in/ali karcinogenost ni na razpolago, smernica ICH Q7 priporoča izvedbo analize (Q)SAR s pomočjo ustreznega modela za napovedovanje bakterijske mutagenosti z namenom razvrstitve v enega izmed razredov 3, 4 ali 5. Smernica predlaga izvedbo z vsaj dvema komplementarnima metodama: (1) metodo z uporabo ekspertnih podatkovnih baz (npr. programska oprema Nexus DEREK), kjer vrednotimo podstrukture, za katere je dokazano, da interagirajo z DNA, ter (2) statistično metodo, ki temelji na eksperimentalnih zbirkah podatkov (npr. programska oprema CASE Ultra, uporaba Ames *Salmonella* modula) (5). Pogoji je tudi, da so računalniški programi z obema metodologijama ustrezno validirani v skladu s kriteriji Organizacije za ekonomsko sodelovanje in razvoj (OECD). Nekateri tvegani strukturni fragmenti oz. toksikoformne skupine, ki so vpletene v reakcije z DNA in so zastopane tudi v različnih programih za napovedovanje toksičnosti (tj. mutagenosti), prikazuje slika 1 (17, 18, 19, 20).

Trenutno obstoječi pristopi (Q)SAR imajo tudi številne slabosti. Rezultati napovedovanj toksičnosti v določenih primerih ne dajejo enoznačnih sklepov (npr. pozitiven/negativen rezultat napovedovanja mutagenosti), ampak dajejo



Slika 1. Nekateri primeri tveganih strukturnih fragmentov (18).
 Figure 1. Some examples of alerting substructures (18).

nevtralne oz. nedoločne rezultate. Razlogov je lahko več, npr. sistem ne vsebuje ustreznega testnega nabora struktur, zato primerjava s poljubno nečistoto ni možna. Včasih je za potrditev pozitivnega ali negativnega rezultata na voljo premalo dokazov ali pa so ti neustrezni. Za določene vrste spojin pa napovedi niso možne (npr. koordinacijske spojine) (21). Številni strokovnjaki iz farmacevtske industrije izpostavljajo problematiko velikega števila napačno pozitivnih rezultatov pri uporabi metod (Q)SAR (21, 22). Eden od takšnih primerov so napačno pozitivni rezultati za monoalkil sulfatne estre v modelih(Q)SAR, ki uporabljajo statistično metodo. Navedene spojine imajo pri fiziološkem pH negativen naboj in so veliko manj elektrofilne kot njihovi alkilirajoči analogi: alkilsulfonatni estri in dialkil sulfati. V Amesovem testu imajo monoalkil sulfatni estri prav tako negativen naboj in ne spadajo med alkilirajoče spojine z izjemo znanih mutagenov, kot so sulfati poliaromatskih ogljikovodikov (nastanek benzilnega karbokationa) (21, 22). Potrditev odsotnosti tveganih strukturnih fragmentov s pomočjo obeh

metod zadošča za sklep, da je nečistota brez mutagenega delovanja (razvrstitev v razred 5), v tem primeru tudi nadaljnja *in vitro* testiranja niso več potrebna. Kadar so v nečistoti prisotna strukturna tveganja, nečistoto razvrstimo v razred 3 (7, 8, 21, 22).

9 KLASIFIKACIJA NEČISTOT S POMOČJO PREISKAV *IN VITRO* TER *IN VIVO*

Sledijo lahko ustrezni kontrolni ukrepi ali pa izvedba *in vitro* bakterijskega testa mutagenosti (Amesov test) na posamezni nečistoti. Izvedba Amesovega testa s strani proizvajalca kot tudi način preverbe podatkov o mutagenosti v podatkovnih zbirkah in literaturi morata biti ustrezna. Podatkovne zbirke morajo omogočiti vpogled v informacije in okoliščine izvedbe tega testa, saj lahko v razred 5 ali razred

2 uvrstimo samo tiste nečistote, kjer je ustrezno izveden *in vitro* Amesov test pokazal negativen oziroma pozitiven rezultat. Za Amesov test je namreč predpisana skladnost s farmacevtsko regulativo, tj. smernico ICH S2(R1), postopki OECD 471 ter pogoji dobre laboratorijske prakse (DLP) (23, 24, 25). Nekateri izmed pogojev so npr. izvedba na vsaj petih različnih sevih bakterij, od tega na štirih sevih *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537/TA97a/TA97, TA98 in TA100) kot tudi sevi *Escherichia coli* WP ali *Salmonella typhimurium* TA102 (21, 22, 26, 27). Tudi sam Amesov test ima nekaj pomanjkljivosti, kot so npr. napačni pozitivni rezultati pri določenih kombinacijah kislinskih ali sulfonil halogenidov, prisotnih v testnih materialih in topilu DMSO (21, 22). Vsa odstopanja od predpisane izvedbe so dovoljena le v izjemnih primerih in morajo biti ustrezno utemeljena.

Vsak negativen rezultat *in vitro* testa preglasuje kakršno koli prisotno strukturno tveganje, zato v nadaljevanju niso potrebna dodatna testiranja. Takšno nečistoto zato razvrstimo v razred 5. Prav tako v primeru negativnega rezultata ustrezno izvedene študije karcinogenosti na glodalcih nečistoto razvrstimo v razred 5 oz. v razred 1, kadar je rezultat takšne študije pozitiven. Opozoriti velja na določene izjeme, kjer je spojina pozitivna v študiji karcinogenosti na glodalcih, medtem ko je negativna v Amesovem testu. Gre predvsem za karcinogene z indirektnim genotoksičnim učinkom, ki delujejo kot proliferatorji (21). V primeru pozitivnega izida Amesovega testa (potrditev *in vitro* mutagena) se zahteva nadaljnje vrednotenje in/ali kontrola (28). Kadar nečistote ni mogoče zmanjšati pod spodnjo mejo, je priporočljivo testiranje nečistote s pomočjo *in vivo* testov genetskih mutacij, katerih izbira mora biti znanstveno utemeljena, predvsem pa mora izhajati iz poznavanja mehanizma delovanja nečistote in tarčnega tkiva (7). Če rezultati *in vivo* ne dokažejo mutagenenega delovanja, je ta izid prevladujoč glede na *in vitro* izsledke, zato nečistoto uvrstimo med nemutagene (7).

Seznam testov *in vivo*, ki jih omenja ICH M7 in s katerimi v nadaljevanju proučujemo *in vitro* mutagene, prikazuje preglednica 5 (7). S pomočjo rezultatov, ki jih dobimo na podlagi *in vivo* testov lahko, če je to smiselno, podpremo tudi postavitev novih mejnih vrednosti za prisotne nečistote. Npr. če za določen genotoksin dokažemo delovanje s pragom v sklopu *in vivo* testiranj (npr. mikronukleusni test na podganah), zanj v nadaljevanju izračunamo novo vrednost – PDE. Nečistoto, ki vsebuje tvegan strukturni fragment, ki je enak tvegani strukturi v zdravilni učinkovini ali strukturno

sorodnih spojinah, za katere je dokazano nemutageno delovanje (tj. negativni izid testiranja mutagenosti), obravnavamo kot nemutageno in jo uvrstimo v razred 4 (7, 8, 26, 27).

10 DRUGA POGlavJA V SMERNICI ICH M7

Smernica poleg že obravnavanih področij zajema poglavje *Izjem in fleksibilnostnih pristopov*, kjer so opisane ustrezne utemeljitve zvečanja AI v primerih izpostavitve nečistotam iz drugih virov, kot je npr. hrana, v primerih hudih bolezni in zmanjšane pričakovane življenjske dobe ter pri nečistotah z visoko jakostjo aktivnosti. Sledita še poglavje *Kontrola*, ki zahteva ustrezno kontrolno strategijo nad materiali, opremo, prostori, proizvodnimi procesi itd. Poglavje *Dokumentacija* pa pojasnjuje primere uporabe vsebin smernice pri oddaji vlog za klinična testiranja ter vlog za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom v obliki **skupnega tehničnega dokumenta (CTD, common technical document)** (7, 8).

11 SKLEP

Določitev in kontrola genotoksičnih nečistot v razvoju učinkovin sta zelo zahtevni nalogi, predvsem zaradi množice različnih sinteznih postopkov, možnih stopenj vstopa genotoksičnih nečistot v proces in množice novih spojin ter posledično nečistot, ki pri tem nastajajo. Zaradi naraščajočega števila novih spojin je pomen smernice ICH M7 za področje nadzora genotoksičnih nečistot še toliko bolj pomemben. Predpisana uporaba dveh komplementarnih metod za napovedovanje toksičnosti v regulatorno odločanje je novost, ki jo bodo morali implementirati tako farmacevtska industrija kot regulatorne agencije. Predvsem je v ospredju želja po natančnem, a hitrejšem računalniško podprtem odkrivanju množic kemijskih struktur z genotoksičnim potencialom. Odsotnost genotoksičnih nečistot in/ali njihova prisotnost pod mejnimi vrednostmi v farmacevtskih izdelkih zmanjšuje tveganje za paciente, predvsem pa zagotavlja varno uporabo zdravil. V prihodnosti pričakujemo še večje zaostritve pri postavitvi dovoljenih mejnih vrednosti za genotoksične nečistote, predvsem pa vzporeden razvoj popolnejših metod za napovedovanje toksičnosti.

Preglednica 5. Vrste testiranj *in vivo*, s katerimi potrdimo mutagene *in vitro*, ter posamezne značilnosti (7, 26, 27).

Table 5. Types of *in vivo* assays to confirm the *in vitro* mutagens and their characteristics (7, 26, 27).

Vrsta <i>in vivo</i> testa	Utemeljitev uporabe
<p>Transgenski mutacijski testi Nekatere znane izvedbe na glodalcih: <i>Muta mouse</i>, <i>Big Blue</i>, <i>LacZ plasmid mouse</i>, <i>gpt delta rodents</i> (26).</p>	Za vse vrste mutagenov.
<p>Pig-a mutacijski test <i>in vivo</i> Princip: gen <i>pig-a</i> je edini gen, ki je vključen v sintezo glikofosfatidil inozitolnega (GPI) sidra na kromosomu X. Test izvedemo na podganah, ki jih izpostavimo določenemu mutagenu, ter nato v njihovi krvi merimo frekvenco mutacij s pomočjo specifičnih protiteles (27).</p>	Za mutagene, ki ne potrebujejo predhodne metabolične bioaktivacije (pozitivni Amesov test brez frakcije S9). V primeru indirektno delujočih mutagenov (potrebujejo metabolično bioaktivacijo) je potrebno prikazati ustrezno izpostavitvev metabolitom.
<p>Mikronukleusni test (mikrojedrni test) <i>in vivo</i> (OECD 474) Princip: živali izpostavimo mutagenu, odvzamemo vzorec kostnega mozga ali krvi ter iščemo nastanek mikrojedrer (lomi kromosomov) (29).</p>	Za mutagene, ki ne potrebujejo predhodne metabolične bioaktivacije (pozitivni Amesov test brez frakcije S9), ter spojine, ki so klastogene. V primeru indirektno delujočih mutagenov (potrebujejo metabolično bioaktivacijo) je potrebno prikazati ustrezno izpostavitvev metabolitom.
<p>Test nenačrtne sinteze DNA (UDS test, <i>unscheduled DNA synthesis test</i>), izveden na podganjih jetrih (OECD 486) Princip: gre za indikatorski test, kjer merimo sintezo DNA na mestu genotoksične poškodbe, ki je spodbujena s strani DNA popravljajnih encimov – detekcija s tritijem označenega timidina (³H-TdR), ki se vgrajuje v DNA (26, 30).</p>	Predviden za mutagene, ki potrebujejo predhodno metabolično bioaktivacijo. Ostali kriteriji: aktivni jetrni metabolit je znan. Dodatni pogoj: metabolit mora nastati v testirani živalski vrsti, večja občutljivost za popravljajne mehanizme NER (<i>nucleotide excision repair</i>) – predvsem posledica DNA aduktov.
<p>Kometni test Princip: gre za gelsko elektroforezo posamezne celice, kjer detektiramo eno- in dvovertižne prelome DNA ter na alkalije labilna mesta (posledice neposrednih poškodb DNA ali vmesna stopnja popravljajnih mehanizmov).</p>	Za izvedbo je potrebna dodatna utemeljitev, predvsem v smislu od kemikalije odvisnega načina delovanja. Potrebna je tudi utemeljitev izbire tkiva/organa.
Ostali	Z ustrezno utemeljitvijo.

12 LITERATURA

1. ICH Q3A(R2), 2006. *Impurities in New Drug Substances*.
2. ICH Q3B(R2), 2006. *Impurities in New Drug Products*.
3. ICH Q3C(R5), 2011. *Impurities: Guideline for residual solvents*.
4. ICH Q3D, 2014. *Guideline for Elemental Impurities*.
5. Lee H. *Pharmaceutical Industry Practices on Genotoxic Impurities*. CRC Press, 2014: 1-505.

6. Jacobson-Kram D, McGovern T. *Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products*. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(1): 38-42.
7. ICH M7, 2015a. *ICH M7 – assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk*.
8. ICH M7, 2015b. *Addendum to ICH M7: assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk: application of the principles of the ICH M7 guideline to calculation of compound-specific acceptable intakes M7 (R1)*.
9. EMA, 2006. *Guideline on the limits of genotoxic impurities*. CPMP/SWP/5199/02. EMEA/CHMP/QWP/251344/2006.

10. EMA, 2010. Question & Answers on the »Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities«. CHMP/SWP/431994/2007.
11. FDA, 2008. Draft guidance for industry e genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches.
12. Pierson DA, Olsen BA, Robbins DK et al. Approaches to Assessment, Testing Decisions, and Analytical Determination of Genotoxic Impurities in Drug Substances. *Org Process Res Dev* 2009; 13(2): 285–291.
13. Raman NV, Prasad AV, Ratnakar Reddy K. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: A pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55(4): 662-667.
14. Bercu JP, Dobo KL, Gocke E et al. Overview of genotoxic impurities in pharmaceutical development. *Int J Toxicol* 2009; 28(6): 468-478.
15. Müller L, Gocke E, Lavé T et al. Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept--a comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity. *Toxicol Lett* 2009; 190(3): 317-329.
16. Walker VE, Casciano DA, Tweats DJ. The Viracept-EMS case: impact and outlook. *Toxicol Lett* 2009; 190(3): 333-339.
17. Looker AR, Ryan MP, Neubert-Langille BJ et al. Risk assessment of potentially genotoxic impurities within the framework of quality by design. *Org Process Res Dev* 2010; 14(4): 1032–1036.
18. Robinson DI. Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: A Review and Perspective. *Org Process Res Dev* 2010, 14(4): 946–959.
19. Elder DP, Harvey JS. Is there a Real Case for Cumulative Control of Structurally Related Genotoxic Impurities? *Org Process Res Dev* 2010, 14(4): 1037–1045.
20. Snodin DJ. Genotoxic Impurities: From Structural Alerts to Qualification. *Org Process Res Dev* 2010, 14(4): 960–976.
21. Amberg A, Beilke L, Bercu J et al. Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016; 77: 13-24.
22. Barber C, Amberg A, Custer L et al. Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015; 73(1): 367-377.
23. OECD, 1997. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
24. ICH S2(R1), 2011. Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use.
25. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdserieson-principlesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>. Dostop: 04-07-2016
26. Lambert IB, Singer TM, Boucher SE et al. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res* 2005; 590(1-3): 1-280.
27. Dobrovolsky VN, Miura D, Heflich RH et al. The in vivo Pig-a gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51(8-9): 825-835.
28. Araya S, Lovsin-Barle E, Glowienke S. Mutagenicity assessment strategy for pharmaceutical intermediates to aid limit setting for occupational exposure. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015; 73(2): 515-20.
29. OECD, 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
30. OECD, 1997. Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

PREGLED UČINKOVIN V ZDRAVLJENJU RAN

AN OVERVIEW OF DRUGS IN THE TREATMENT OF WOUNDS

AVTOR / AUTHOR:

izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

marko.anderluh@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Fiziološke procese ob celjenju rane delimo v štiri osnovne faze, to so hemostaza, vnetna reakcija, proliferacija – tvorba novega tkiva, znana tudi kot granulacija in kontrakcija, in remodeliranje tkiva (1, 2, 3). V proces celjenja so vključeni celični in izvencelični dejavniki, ki vplivajo na pravilen potek celjenja.

Takoj po poškodbi se sprožijo dejavniki hemostaze ter povzročijo lokalno vazokonstrikcijo in strjevanje krvi, tako da preprečujejo izgubo krvi ob hkratni tvorbi matriksa za celično migracijo. Aktivirani trombociti izločajo v neposredno okolico rane specifične citokine in rastne dejavnike, kot so trombocitni rastni dejavnik ali PDGF (*platelet-derived growth factor*),

POVZETEK

V prispevku predstavljamo sistematičen pregled zdravilnih učinkovin, ki jih uporabljamo v oskrbi ran. Namen prispevka je pojasniti delovanje zdravilnih učinkovin na različne faze celjenja ran in predstaviti aktualne informacije o tistih, ki so trenutno registrirane v Republiki Sloveniji. S tem želimo zdravstvenim delavcem olajšati izbor najustreznejšega zdravljenja v oskrbi ran, ki naj ne temelji le na poznavanju smernic zdravljenja, temveč tudi na poznavanju mehanizmov delovanja uporabljenih zdravilnih učinkovin.

KLJUČNE BESEDE:

zdravljenje ran; anatomsko-terapevtsko-kemična klasifikacija zdravil; zdravljenje, ki temelji na znanju

ABSTRACT

The article provides a systematic overview of drugs used in the treatment of wounds. Its purpose is not to give treatment guidelines for specific types of wounds, but rather to review mechanisms of drug action according to the individual phases of wound healing and to present current information on active ingredients that are currently registered or are available in the Republic of Slovenia. In this way, health professionals may select appropriate knowledge-based therapies in the process of wound care.

KEY WORDS:

wound care; Anatomical Therapeutic Chemical Classification System; knowledge-based therapy

transformirajoči rastni dejavnik beta ali TGF- β (*transforming growth factor beta*) in transformirajoči rastni dejavnik alfa ali TGF- α (*transforming growth factor alpha*). Slednji privlačijo fibroblaste, endoteljske celice in celice imunskega odziva, ki sprožijo vnetje in proces celjenja. Vnetna reakcija lahko traja največ 7 dni, pri čemer imajo odločilno vlogo fagociti, kot so nevtrofilci in makrofagi. Ti skrbijo za zaščito rane pred vdirajočimi bakterijami in za odstranjevanje nekrotičnega tkiva ter sproščajo različne rastne dejavnike in citokine. Ob vnetnem procesu sočasno poteka faza proliferacije, med katero fibroblasti, endoteljske celice in keratinociti tvorijo vezivno tkivo, sprožijo rast novih krvnih žil (angiogenezo) in epitelizacijo. V fazi remodeliranja tkiva se začasni matriks počasi nadomešča z vlakni kolagena (1, 2, 4).

Celjenje ran poteka večinoma spontano, brez potrebe po farmakološkem ukrepanju, zato temu naravnemu procesu ne namenjamo večje pozornosti. Vendar pa je farmakoterapija v primeru obsežnejših ran, ran z veliko verjetnostjo okužb ali že okuženih ran, kroničnih ran in ran, pri katerih je velika verjetnost močnega brazgotinjenja, ustrezen pri-stop tako v smislu dopolnitve oskrbe rane kot tudi samostojnega zdravljenja. Učinkovine, ki jih uporabljamo v farmakoterapiji ran, smo v nadaljevanju razdelili glede na njihovo vpletenost v posamezno fazo celjenja:

- antitrombotiki in vazodilatatorji (vplivajo na hemostazo),
- protivnetne učinkovine in analgetiki (vplivajo na vnetno reakcijo),
- protimikrobne učinkovine (vplivajo na vnetno reakcijo),
- učinkovine za pospeševanje celjenja ran (vplivajo na proliferacijo),
- učinkovine, ki delujejo na fazo remodelacije (velikokrat spadajo v prejšnjo skupino).

Omenjene učinkovine lahko razdelimo tudi po anatomsko-terapevtsko-kemični (ATC) klasifikaciji zdravil, kjer najdemo zdravila za oskrbo ran in razjed pod oznako D03, vendar pod to razvrstitev spadajo le zdravila za oskrbo brazgotin (D03A) in encimi (D03B) (5). V farmakoterapiji in oskrbi ran uporabljamo še antitrombotike (B01A), periferne vazodilatatorje (C04A), antibiotike in kemoterapevtike za uporabo v dermatologiji (D06), antiseptike in dezinficiense (D08) ter kortikosteroide za sistemsko zdravljenje (H02) (6, 7). Zato v nadaljevanju poleg ozkega pojmovanja po ATC-klasifikaciji podajamo še pregled zdravilnih učinkovin po literaturi, vključno s podatki o zdravilnih učinkovinah in snoveh, katerih uporaba je med oskrbo rane kontraindicirana.

2 ANTITROMBOTIKI IN VAZODILATORJI

Učinkovine, ki vplivajo na agregacijo trombocitov, koagulacijo krvi in pospešujejo ali zavirajo krvni pretok z neposrednim učinkom na vazodilatacijo, lahko bodisi zmanjšajo zaplete in pospešijo celjenje ran bodisi negativno vplivajo na ta proces (8). Povzetek učinkov te skupine podaja preglednica 1.

2.1 ANTIKOAGULANTI

Antikoagulantni (antagonisti vitamina K – kumarini, heparini) preprečujejo tvorbo fibrina in posledično krvnega strdka

ter motijo normalen proces celjenja ran. Poleg podaljšanja celjenja ran lahko v nekaterih primerih povzročijo nekrozo tkiva (npr. varfarin), daljša raba heparina lahko povzroči trombocitopenijo, zato njihovo uporabo v oskrbi ran odsvetujemo (6, 9). Ker pa novejša raziskava kažejo, da zastoj venskega krvnega pretoka povzroča poškodbo žilnega endotelija in nalaganje fibrina, bi antikoagulantni v tem primeru lahko delovali ugodno, zato je v posebnih primerih dobro razmisliti o smotrnosti njihove uporabe (8).

2.2 ZAVIRALCI AGREGACIJE TROMBOCITOV

Zaviralci agregacije trombocitov preprečujejo tvorbo krvnih strdkov, zato moramo omejiti ali preprečiti njihovo rabo v predoperativni pripravi bolnikov in ob čezmernih krvavitvah. Vendar pa imajo zaviralci ciklooksigenaz lahko ugodne učinke pri celjenju ran, saj zmanjšajo čezmerno vnetje, občutek bolečine in poškodbe tkiv (zaradi zaviranja tvorbe strdkov), poleg tega tudi dokazano zmanjšajo natezno napetost ran (8). Iloprost spada po klasifikaciji ATC med B01AC – zaviralce agregacije trombocitov brez heparina, a je po mehanizmu delovanja tudi vazodilatator s številnimi učinki. Tako zavira agregacijo in adhezijo trombocitov, razširja arteriole in venule, stimulira fibrinolizo in deluje protivnetno. Uporabljamo ga v farmakoterapiji intermitentne klavdikacije in ishemije okončin (6). Apliciran intravensko iloprost ugodno vpliva na celjenje arterijskih in vaskularnih razjed ter razjed, ki so posledica Raynaudove bolezni (6, 8).

2.3 HEMOREOLOŠKE UČINKOVINE

Pentoksifilin je metilksantinski derivat in ga primarno uporabljamo v zdravljenju mišičnih bolečin zaradi periferne arterijske bolezni oz. v zdravljenju intermitentne klavdikacije (10). Po klasifikaciji ATC spada med C04A – periferne vazodilatatorje, C04AD – derivate purina. V tem primeru ga obravnavamo ločeno, saj ne deluje le vazodilatorjsko, temveč tudi protivnetno z zaviranjem izločanja dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α), zmanjša agregacijo trombocitov, poveča fleksibilnost membrane eritrocitov in stimulira fibrinolizo. S tem poveča periferno mikrocirkulacijo in zmanjša viskoznost krvi, zato njegovo uporabo priporočamo v zdravljenju razjed, ki nastanejo kot posledica žilnih bolezni (6, 8, 11).

2.4 PERIFERNI VAZODILATORJI/VAZOKONSTRIKTORJI

Peroralno uporabne vazodilatatorje, kot sta nifedipin in iloprost, lahko uporabljamo v zdravljenju Raynaudovega sin-

Preglednica 1: Zdravilne učinkovine z delovanjem na žilni sistem v zdravljenju ran (6, 8).

Table 1: Vascular agents in wound healing (6, 8).

Farmakološki razredi	Mehanizem delovanja	Učinek na zdravljenje ran (+/-)
Antikoagulanti (kumarini, heparin)	<ul style="list-style-type: none"> • indirektni antikoagulanti zavirajo biosintezo koagulacijskih dejavnikov • direktni antikoagulanti zavirajo encimsko delovanje koagulacijskih dejavnikov 	+ zmanjšanje nalaganja fibrina ter zato poškodb in vnetja – podaljšanje celjenja ran zaradi zaviranja tvorbe fibrina in strdkov ter potencialne trombocitopenije
Zaviralci agregacije trombocitov: nesteroidne protivnetne učinkovine, iloprost	<ul style="list-style-type: none"> • zaviranje agregacije trombocitov: zaviranje biosinteze prostaglandinov • iloprost – sintezni analog prostaciklina z antiagregacijskim delovanjem 	+ zmanjšanje vnetja in analgezija + zmanjšanje tkivne poškodbe + iloprost poveča periferno perfuzijo – povečanje tveganja za krvavitve
Hemoreološke učinkovine (pentoksifilin)	<ul style="list-style-type: none"> • povečanje perfuzije tkiv zaradi zmanjšane viskoznosti krvi 	+ pospešitev celjenja ran in razjed
Vazodilatatorji: zaviralci kalcijevih kanalčkov, gliceriltrinitrat	<ul style="list-style-type: none"> • povečanje perfuzije zaradi širjenja krvnih žil 	+ pospešitev celjenja ran
Vazokonstriktorji: nikotin, (psevdo)efedrin, agonisti adrenergičnih receptorjev alfa 1	<ul style="list-style-type: none"> • zmanjšanje perfuzije zaradi zožanja krvnih žil 	– povečanje nekroze razjed – upočasnitev in nepopolno celjenje ran

droma in razjed, ki nastanejo kot posledica žilnih bolezni (6, 8). Gliceriltrinitrat in njegov terapevtski analog izosorbiddinitrat sta donorja dušikovega(II) oksida, ki povzročata močno vazodilatacijo, zato ju v dermalni farmacevtski obliki uspešno uporabljamo v zdravljenju ran z ishemijsko etiologijo (6). Nasprotno delujoče učinkovine, vazokonstriktorji, kot so npr. nikotin, ergotamin, adrenalin, efedrin in kokain, pa lahko z zaviranjem mikrocirkulacije povzročijo hipoksijo tkiv in upočasnijo celjenje ran (6). Zato v času celjenja ran zelo odsvetujemo kajenje in uporabo omenjenih učinkovin (6, 8).

3 PROTIVNETNE UČINKOVINE IN ANALGETIKI

Steroidne protivnetne učinkovine delimo po klasifikaciji ATC glede na način njihove uporabe na H02 – kortikosteroide za sistemsko zdravljenje (H02AB – glukokortikoidi) in D07 – kortikosteroide – dermatike. Kortikosteroidi za sistemsko

zdravljenje so sestavni del zdravljenja razjed, ki nastanejo kot posledica vnetja vezivnega tkiva, npr. pri revmatoidnem artritisu, sklerodermi in vnetju krvnih žil (6, 12). Njihovi dolgotrajni uporabi se moramo izogniti, saj imajo številne neželene učinke v vseh fazah celjenja ran (6, 8). Tako npr. steroidna atrofija povzroči tudi tanjšanje epidermisa in tvorbo strij (13). Zaradi vsega naštetega so kortikosteroidi, še posebej dermalni, kontraindicirani v oskrbi ran, pri čemer pa je zelo pomembna jakost njihovega delovanja. Medtem ko ima dermalni hidrokortizon (1 %) le šibek neželeni učinek na celjenje ran, imajo fluorirani kortikosteroidi bistveno močnejše delovanje (14). Tako npr. triamcinolon acetomid v 0,1-odstotnem mazilu lahko zavre reepitelizacijo za kar 60 % (15).

Nesteroidne protivnetne učinkovine delujejo kot neselektivni zaviralci ciklooksigenaz ali selektivni zaviralci ciklooksigenaze tipa 2. Neselektivni zaviralci ciklooksigenaz imajo omejeno uporabnost zaradi svojega antiagregacijskega delovanja, zato v primeru sočasnega zdravljenja bolečine raje posežemo po drugih učinkovinah. Selektivni zaviralci ciklooksigenaze tipa 2 (koksibi) delujejo protibolečinsko in



protivnetno ter pri tem ne zavirajo agregacije trombocitov. Predvsem protibolečinski učinek lahko dosežemo tudi z učinkovinami, katerih mehanizem ne temelji na zaviranju ciklooksigenaz, npr. s pirazoloni (propifenazon, natrijev metamizolat), anilidi (paracetamol), v primeru izrazito močnih bolečin pa z opioidnimi analgetiki.

4 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Protimikrobne učinkovine v zdravljenju ran delimo na antiseptike (klasifikacija ATC: D08 – antiseptiki in dezinficijensi) ter antibiotike in kemoterapevtike (klasifikacija ATC: D06 – antibiotiki in kemoterapevtiki za uporabo v dermatologiji). Povzetek njihovih učinkov navajamo v preglednici 2.

4.1 ANTISEPTIKI

Antiseptiki imajo razmeroma neselektiven in na kemijski strukturi temelječ mehanizem delovanja, zato razmeroma enostavno delujejo tudi na človeške keratinocite in fibroblaste ter tako povečajo tkivno toksičnost in nekrozo v rani ter njeni okolici (8). Sicer se zdi njihova uporaba v zdravljenju ran primerna, ne glede na to, da v literaturi

najdemo dokaze o tem, da je njihov vpliv na celjenje ran zanemarljiv (7). Med antiseptiki za dermalno uporabo najpogosteje omenjajo povidon-jod, benzalkonijev klorid, klorheksidin in vodikov peroksid. Glede na jakost protimikrobnega delovanja je povidon-jod močnejši od vodikovega peroksida, saj nekatere bakterije izločajo katalazo, ki razgrajuje vodikov peroksid. Ta naj bi po eni strani zmanjšal proliferacijo fibroblastov in s tem neugodno vplival na celjenje ran, po drugi strani pa navajajo, da s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti spodbuja celično migracijo in proces celjenja (7). Ker je veliko študij z nasprotujočimi si rezultati, nekateri avtorji priporočajo spiranje ran le s fiziološko raztopino, z utemeljitvijo, da to zagotavlja fiziološko in zato nedražično in netoksično okolje za celice in tkiva (8). Posebej želimo izpostaviti kadeksomer-jod (po klasifikaciji ATC D03AX01), ki je spremenjen škrob z 0,9 % joda (16). Kadeksomer-jod v dermalnih oblikah dokazano pospešuje celjenje ran zaradi dvojnega mehanizma delovanja: najprej absorbira eksudat ran (čiščenje), nato pa se sprosti jod, ki deluje baktericidno (17).

4.2 ANTIBIOTIKI IN KEMOTERAPEVTIKI

Dermalne antibiotike se v oskrbi ran pogosto uporabljali brez kritičnega pomisleka in upoštevanja morebitnih neželenih učinkov. Novejše smernice priporočajo njihovo uporabo le na okuženih ranah. Pri njihovem izboru se

Preglednica 2: Učinki protimikrobnih učinkovin na celjenje ran (8).

Table 2: Effects of antimicrobial drugs on wound healing (8).

Farmakološki razredi	Mehanizem delovanja	Učinek na zdravljenje ran (+/-)
Antiseptiki	<ul style="list-style-type: none"> • neposredno mikrobicidno ali statično delovanje • neselektivno kemično delovanje 	+/- ni bistvenih prednosti pri celjenju ran – povečanje tkivne toksičnosti in možnosti nekroz, zato podaljšano vnetje – zaviranje reepitelizacije in tkivnega remodeliranja
Antibiotiki in kemoterapevtiki	<ul style="list-style-type: none"> • bakteriostatično ali baktericidno delovanje • selektivna toksičnost 	+ odstranjevanje dejavnikov (čezmernega) vnetja + delovanje širokospektralnih antibiotikov zaželeno + odstranjevanje patogenov – odstranjevanje naravne flore – možnost kontaktnega dermatitisa – možnost razvoja rezistence

lahko držimo empiričnega pravila, ki pravi, naj učinkovin, ki jih ne smemo uporabljati na očesni sluznici, ne apliciramo na rano (18). V literaturi zasledimo zelo heterogene rezultate o učinkovitosti antibiotikov v zdravljenju ran. Navajajo celo, da lahko njihov učinek pogosto pripišemo uporabljeni mazilni podlagi (8, 19). Če to morda res velja za starejše antibiotike in kemoterapevtike, kot sta npr. gentamicin in metronidazol, pa v literaturi najdemo indikacije za uporabo novejših antibiotikov, kot so retapamulin, fusidna kislina in malo starejši mupirocin (20, 21, 21). Mupirocin je v obliki mazila indiciran za dermalno zdravljenje primarnih in sekundarnih bakterijskih okužb kože, odrgnin, ureznin, pikov žuželk in drugih manjših ran ter opeklin. Uporabljamo ga tudi za preprečevanje bakterijskih okužb manjših ran, ureznin in drugih omejenih poškodb kože (20). Retapamulin je indiciran za zdravljenje bakterijskih okužb na manjših predelih kože, npr. impetiga, okuženih vreznin, odrgnin ali vbodnih ran (21). Tudi za nekatere dermalne antibiotike, kot so neomicin, polimiksin B, neosporin in srebrov sulfadiazinat, je dokazano, da pospešujejo reepitalizacijo (8, 22).

Sistemske uporabni antibiotiki so prav tako primerni za zdravljenje okuženih ran bodisi samostojno bodisi v kombinaciji z dermalnimi antibiotiki. Cefalosporina cefaleksin in cefazolin ali ciprofloksacin lahko uporabljamo v sistemskem zdravljenju okuženih akutnih ran, nekateri antibiotiki, npr. tetraciklin in eritromicin, pa delujejo tudi protivnetno (8). Kljub vsemu je (povečana) uporaba posameznega antibiotika vedno povezana s povečanim tveganjem za razvoj rezistence na antibiotike in to velja tudi za topikalne antibiotike (23). Zato naj bo vsaka uporaba tovrstnih učinkovin preiščena in smotrna.

4.3 SREBROV SULFADIAZINAT

Srebrov sulfadiazinat je kombinacija kemoterapevtika sulfadiazina in srebrovih ionov. Njegov učinek temelji na sinergizmu protimikrobnega učinka obeh sestavin. Srebrov sulfadiazinat uporabljamo v obliki 1-odstotne kreme kot širokospektralni antibiotik za zdravljenje opeklin (24). Po stiku s človeškimi tekočinami srebrov sulfadiazinat v okolico počasi sprošča srebrove ione, ki zagotavljajo širokospektralni učinek, ob tem pa sulfadiazin kot kemoterapevtik povečuje protibakterijsko učinkovitost. Zdravilo deluje tudi proti na meticilin odpornemu sevu bakterije *Staphylococcus aureus* (6). Avtorji novejših raziskav, s katerimi so vrednotili učinke srebrovega sulfadiazinata, pogosto navajajo nasprotno ugotovitve, zato ni enotnega pogleda na njegovo učinkovitost pri celjenju ran (25, 26, 27).

5 UČINKOVINE ZA POSPEŠEVANJE CELJENJA RAN

Učinkovine za pospeševanje celjenja ran delujejo predvsem v fazi celične proliferacije, poleg tega pa tudi v času remodelacije tkiva. Gre za kemijsko in farmakološko zelo heterogeno skupino zdravilnih učinkovin, ki z različnimi mehanizmi pospešujejo celjenje ran. Njihove učinke povzemamo v preglednici 3.

5.1 RETINOIDI

Retinoidi so derivati vitamina A. Gre za mešanico sorodnih spojin, retinola, retinala in retinojske kisline, z ugodnim učinkom na celjenje ran, ki je posledica njihovega delovanja na angiogenezo, sintezo kolagena in epitelizacijo (8). Pomanjkanje vitamina A upočasnjuje reepitelizacijo in tvorbo kolagena, kar uspešno preprečimo z dermalno aplikacijo retinoida tretinoina (28). Dopolnjevanje prehrane z vitaminom A lahko izniči negativne učinke kortikosteroidov v zgodnji fazi celjenja ran (8). Kljub temu moramo biti pri uporabi retinoidov previdni, saj imajo lahko tako dermalno kot sistemsko uporabljani retinoidi popolnoma paradoksalno nasprotno učinke. Po dermabrazivnih ali drugih operativnih posegih namreč lahko upočasnijo reepitelizacijo in celjenje ran (8).

5.2 DEKSPANTENOL

Dekspantenol se v kožnih celicah hitro pretvori v pantotensko kislino (vitamin B5), zato je njen biološki prekurzor, ki učinkuje enako kot vitamin B5, pri čemer pa se lažje in hitreje absorbira. Pantotenska kislina je del koencima A in zato nenadomestljiva pri tvorbi in obnovi kože in sluznic (29). Poleg tega je deksipantenol tudi vlažilo, ki vlaži roženo plast ter ohranja elastičnost in voljnost kože. Aktivira proliferacijo fibroblastov, pospešuje reepitelizacijo pri celjenju ran ter deluje protivnetno, kar so dokazali v eksperimentalnem modelu z UV-svetlobo povzročene eritema (30).

5.3 HIALURONSKA KISLINA

Hialuronska kislina je polimer, sestavljen iz enot glukuronske kisline in *N*-acetilglukozamina, ter je naravna sestavina zunajceličnega matriksa. Deluje kot promotor vnetja v njegovi zgodnji fazi, saj stimulira fibroblaste, ki posledično izločajo proinflammatory citokina TNF- α in IL-8, ter pospešuje celično infiltracijo v okolico rane (31). Hialuronska kislina ima pri raz-



Preglednica 3: Učinki spojin za pospeševanje celjenja ran (8).

Table 3: Effects of wound healing promoting substances (8).

Farmakološki razred	Mehanizem delovanja	Učinek na zdravljenje ran
Retinoidi za topikalno uporabo (tretinoin)	<ul style="list-style-type: none"> • zmanjšanje proizvodnje keratina • zmanjšanje proizvodnje dezmosomov • angiogeneza • stimulacija sinteze kolagena • inhibicija izražanja metaloproteinaz 	+ pospešitev reepitelizacije +/- pospešitev deskvamacije epitelija kože – upočasnitev reepitelizacije pri podaljšani postoperativni rabi – povečanje količine tkivnega kolagena
Peroralno uporabni retinoidi (alitretinoin, izotretinoin, vitamin A)	<ul style="list-style-type: none"> • obsežna tvorba granulacijskega tkiva • upočasnitev reepitelizacije in tvorbe kolagena (točen mehanizem še ni znan) 	+ nujno potrebni za ohranjanje normalne funkcije epiderme + izničenje negativnih učinkov kortikosteroidov na celjenje ran – podaljšanje celjenja ran po dermabraziji (npr. zaradi tetovaž) ali laserskem odstranjevanju epiderme
Dekspantenol	<ul style="list-style-type: none"> • aktivacija proliferacije fibroblastov 	+ pospešitev reepitelizacije + protivnetno delovanje + vlažilo
Hialuronska kislina	<ul style="list-style-type: none"> • stimulacija zgodnje faze vnetja • negativna modulacija vnetja v pozni fazi • antioksidativni učinek • tvorba zunajceličnega matriksa bazalnih keratinocitov 	+ pospešitev reepitelizacije + spodbujanje in zaviranje vnetja v odvisnosti od faze vnetja + pospešitev remodelacije
Rastni dejavniki (predvsem trombocitni)	<ul style="list-style-type: none"> • spodbujanje celične rasti, proliferacije in diferenciacije 	+ spodbujanje angiogeneze + povečanje tvorbe granulacijskega tkiva + razgradnja odsluženega kolagena
Enoksolon	<ul style="list-style-type: none"> • zaviranje encimov 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaze in δ-13-prostaglandin dehidrogenaze, ki presnavljata PGE-2 in PGF-2α 	+ aktivacija proliferacije celic + protimikrobno delovanje

voju vnetja paradoksalno nasprotno vlogo, saj stimulira zgodnje faze vnetja, nato deluje kot njegov negativen modulator in tako pripomore k stabilizaciji granulacijskega tkiva. Poleg tega deluje antioksidativno, kar dodatno pojasni njen protivnetni učinek (32). V najpoznejši fazi celjenja rane, to je med remodeliranjem tkiva, hialuronska kislina tvori zunajcelični matriks bazalnih keratinocitov in deluje kot pozitiven dejavnik njihove proliferacije. Zaradi tega je hialuron-

ska kislina pogosto sestavina dermalnih pripravkov za oskrbo ran.

5.4 RASTNI DEJAVNIKI

Rastni dejavniki, ki jih izločajo aktivirani trombociti, imunske celice in fibroblasti, spodbujajo celično rast, proliferacijo in diferenciacijo ter ključno uravnavajo več vrst celic in procesov pri celjenju ran (33). V zdravljenju ran so upo-

rabni naslednji rastni dejavniki: epidermalni rastni dejavnik (EGF), transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β), trombocitni rastni dejavnik (PDGF) in vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF) (33). V Republiki Sloveniji je trenutno registriran bekaplermin, trombocitni rastni dejavnik BB (34). Pri celjenju ran ima več vlog, saj stimulira angiogenezo, povečuje tvorbo granulacijskega tkiva ter med remodelacijo s spodbujanjem metaloproteinaz pomaga pri razgradnji odsluženega kolagena (34). Registrirano zdravilo je gel z 0,01 % učinkovine, ki ga uporabljamo v zdravljenju diabetičnih ran.

5.5 ENOKSOLON

Enoksolon ali gliciretinska kislina je pentaciklični triterpenoid iz golostebelnega sladkega korena (*Glycyrrhiza glabra*). Ima številne zdravilne učinke, njegovo delovanje na celjenje ran pa pripisujejo zaviranju encimov, in sicer 15-hidroksi-prostaglandin-dehidrogenaze in δ -13-prostaglandin-dehidrogenaze, ki presnavljata prostaglandina PGE-2 in PGF-2 α (35). Prostaglandin PGE-2 je močan aktivator proliferacije celic, kar velja tudi za proliferativno fazo celjenja ran. Enoksolon deluje še protimikrobno, kar pripomore k njegovemu celovitemu učinku pri oskrbi ran (36). Zaradi ugodnih lastnosti gliciretinsko kislino pogosto uporabljajo tudi v kozmetičnih izdelkih ter za dermalno zdravljenje atopijskega dermatitisa in oskrbo manjših ran (37).

6 FAZA REMODELACIJE – UČINKOVINE Z DELOVANJEM PROTI FIBROZI

V fazi remodelacije je možno čezmerno brazgotinjenje. To je pogosto povezano z ostanki nekrotičnega tkiva in oblog, ki nastanejo na zaceljeni rani. Zato se priporoča čiščenje ran (38). Ena nežnejših metod čiščenja ran je dermalna uporaba hidrolitičnih encimov, npr. kolagenaze, pridobljene iz seva *Clostridium histolyticum* (klostridiopeptidaza A). Kolagenaza razgradi in odstrani nekrotično tkivo ter tako pospešuje proces celjenja rane. Nekrotično tkivo je pritrjeno na površino rane s snopi naravnega kolagena, zato ga lahko odstranimo le encimsko, s kolagenazami. Pri tem je ključno, da tovrstni encimi ne razgradijo oz. poškodujejo zdravega tkiva, torej nepoškodovanega epitelija, granulacijskega in maščobnega tkiva ali celo mišic. Kolagenaze poleg tega spodbujajo delovanje celic, ki sodelujejo pri celjenju ran, fibroblastov, endotelijskih celic, monocitov in keratinocitov ter spodbujajo angiogenezo (39).

7 SKLEP

V članku predstavljamo sistematičen pregled zdravnih učinkovin v oskrbi ran s poudarkom na opisu njihovih pozitivnih in negativnih učinkov na celjenje ran. Številne učinkovine imajo uveljavljene indikacije v zdravljenju ran. Opozoriti želimo na občasno razhajanje med paradigmi predvsem v laičnem zdravljenju ran in novejšimi dognanji. Primer tovrstnega razhajanja je uporaba antiseptikov in antibiotikov, ki se zdi nesporno smotrna, vendar večina smernic odsvetuje njihovo uporabo, razen v primeru okuženih ran. Omeniti velja tudi zanimivo dejstvo, da je glede uporabe srebrnega sulfadiazinata celo mnenje strokovne javnosti deljeno. Še en tak primer so antikoagulanti, katerih uporaba na prvi pogled ni smotrna zaradi povečane nagnjenosti h krvavitvam, po drugi strani pa lahko delujejo ugodno zaradi omogočanja venskega pretoka v prizadetem tkivu. Upamo, da bodo nova spoznanja in navedena priporočila pripomogla k smotnejši uporabi zdravil v zdravljenju ran.

8 LITERATURA

1. Janis J, Harrison B. 2014. Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plast Reconstr Surg* 2014; 133(3): 199e-207e.
2. Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE et al. The effects of drugs on wound healing – part I. *Int J Dermatol* 2000; 39(4): 250-257.
3. Orsted HL, Keast D, Forest-Lalande L et al. Basic Principles of Wound Healing. *Wound Care Canada* 2011; 9(2): 4-12.
4. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care* 2015; 4(9): 560-583.
5. Klasifikacija ATC 2015: http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/ATC_2015.pdf. Dostop: 16. 5. 2016.
6. Enoch S, Grey YE, Harding KG. ABC of wound healing. Non-surgical and drug treatments. *Brit Med J* 2006; 332: 900-903.
7. Janis J, Harrison B. Wound Healing: Part II. Clinical Applications. *Plast Reconstr Surg* 2014; 133(3): 383e-392e.
8. Karukonda SR, Flynn TC, Boh EE et al. The effects of drugs on wound healing – part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. *Int J Dermatol* 2000; 39(4): 321-333.
9. Reed BR, Clark RAF. Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge II. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 914-941.
10. Salhiyyah K, Senanayake E, Abdel-Hadi M et al. Pentoxifylline for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 1(1). CD005262.
11. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P et al. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005; 174(2): 589-584.



12. Jenseen JA, Goodson WH, Hopf HW. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg* 1991; 126: 1131-1134.
13. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005; 353(16): 1711-1723.
14. Zitelli JA. Wound healing by first and second intention. In: Roenigk RK, Roenigk HH. *Dermatologic Surgery Principles and Practice*. New York, Marcel Dekker, 1996: 101-30.
15. Eaglstein WH, Mertz PM. New methods for assessing epidermal wound healing: the effects of triamcinolone acetonide and polyethylene film occlusion. *J Invest Dermatol* 1978; 71: 382-384.
16. Ormiston MC, Seymour MT, Venn GE et al. Controlled trial of Iodosorb in chronic venous ulcers. *Brit Med J* 1985; 291: 308-310.
17. Drosou A, Falabella A, Kirsner RS. Antiseptics on Wounds: An area of controversy. *Wounds* 2003; 15(5): 149-166.
18. Lawrence WT. Clinical management of non-healing wounds. In: Cohen IK, Diegelman RF, Lindbald WT. *Wound healing: Biochemical and Clinical Aspects*. Philadelphia W.B. Saunders, 1992: 541.
19. Smack DP, Harrington AC, Dunn C et al. Infection and allergy incidence in ambulatory surgery patients using white petrolatum vs bacitracin ointment: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 1996; 276: 972-977.
20. Centralna baza zdravil. SMPC Betrimon. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/D31F1E64C62DF469C12579C2003F4A7F/\\$File/s-015750.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/D31F1E64C62DF469C12579C2003F4A7F/$File/s-015750.pdf). Dostop: 16. 5. 2016.
21. EMA. SMPC Altargo. http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000757/WC500024409.pdf. Dostop: 16. 5. 2016.
22. Falanga V, Zitelli JA, Eaglstein WH. Periodic synopsis of wound healing. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 559-562.
23. Moodabe K, Bryant K. 2006. Topical antibiotics - more harm than good? *Focus*. 1: <http://web.archive.org/web/20070716134428/http://www.nzcgp.org.nz/news/nzfp/Oct2000/moodabe.htm>. Dostop: 16. 5. 2016.
24. Jakopin Ž, Anderluh M. Srebrovi pripravki in medicinski pripomočki s srebrom – (ne)varna alternativa protimikrobnim sredstvom? In: Zvonar Pobirk A et al. *Znanstveno-kritičen pogled na komplementarno in alternativno medicino*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2015: 50-59.
25. Storm-Versloot NM, Vos CG, Ubbink DT et al. Topical silver for preventing wound infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 3. CD006478.
26. Castellano JJ, Shafii SM, Ko F et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J* 2007; 4: 114-122.
27. Jurjus A, Atiyeh BS, Abdallah IM et al. Pharmacological modulation of wound healing in experimental burns. *Burns* 2007; 33(7): 892-907.
28. Mandy SH. Tretinoin in Preoperative and postoperative management of dermabrasion. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15(4): 878-879.
29. Centralna baza zdravil. SMPC Bepanthen 50 mg/g krema. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7F1383150F3A2F0FC12579C2003F60E9/\\$File/s-0402.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7F1383150F3A2F0FC12579C2003F60E9/$File/s-0402.pdf). Dostop: 11. 12. 2015.
30. Ebner F, Heller A, Rippke F et al. Topical Use of Dexpanthenol in Skin Disorders. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3(6): 427-433.
31. Chen W.Y, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 1999; 7(2): 79-89.
32. Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU et al. Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol* 1988; 90(3): 412-414.
33. Mestnik A. *Rastni dejavniki v kozmetiki: poznavanje in uporaba v laični in strokovni javnosti*. 2014. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
34. Nagai MK, Embil JM. Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert. Opin Biol Ther* 2002; 2(2): 211-218.
35. Kočevar N. *Glycyrrhiza glabra*. Sladki koren. *Farm vestn* 2008; 59: 179-182.
36. Tanideh, N, Rokhsari P, Mehrabani D et al. The Healing Effect of Licorice on Pseudomonas aeruginosa Infected Burn Wounds in Experimental Rat Model. *World J Plast Surg* 2014; 3(2): 99-106.
37. Eucerin. <http://www.eucerin.si/nasa-istrazivanja/baza-sastojaka/G/Glycyrrhethinic%20Acid>. Dostop: 16. 5. 2016.
38. Pu K-MT, Sava P, Gonzalez AL. Microvascular Targets for Anti-Fibrotic Therapeutics. *Yale J Biol Med* 2013; 86(4): 537-554.
39. Onesti MG, Fioramonti P, Fino P et al. Effect of enzymatic debridement with two different collagenases versus mechanical debridement on chronic hard-to-heal wounds. *Int Wound J* 2015. doi: 10.1111/iwj.12421. Dostop na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iwj.12421/epdf>.

IMUNOGENOST ZAVIRALCEV DEJAVNIKA TUMORSKE NEKROZE ALFA: NEVARNOST ALI PRILOŽNOST NA PODROČJU ZDRAVLJENJA VNETNIH REVMATIČNIH BOLEZNI?

IMMUNOGENICITY OF TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA INHIBITORS: DANGER OR OPPORTUNITY IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES?

AVTORJI / AUTHORS:

Ogrič Manca, mag. lab. biomed.¹

izr. prof. dr. Praprotnik Sonja, dr. med.¹

izr. prof. dr. Sodin-Šemrl Snežna, univ. dipl. biol.^{1,2}

doc. dr. Čučnik Saša, univ. dipl. biol., spec. med. biokem.^{1,3}

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinični oddelek za revmatologijo,
Vodnikova 62, 1000 Ljubljana

² Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko,
naravoslovje in informacijske tehnologije,
Titov trg 4, 6000 Koper

³ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
sasa.cucnik@kclj.si

POVZETEK

Področje vnetnih revmatskih bolezni je ena od najhitreje se razvijajočih medicinskih strok. Skupna lastnost vseh bolezni, vključenih v to skupino, je neustrezen odziv imunskega sistema na telesu lastne antigene. Doktrina zdravljenja vnetnih revmatskih bolezni se je v zadnjih letih povsem spremenila, predvsem na račun razvoja sodobnih tarčnih bioloških zdravil. Njihov glavni namen je ciljno zaviranje aktivnosti kompetentnih celic oz. njihovih proizvodov – citokinov, ki so pomembni v patogenezi vnetnih revmatskih bolezni. Pri zdravljenju vnetnih revmatskih bolezni uporabljamo zaviralce dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α), interleukinov IL-1 in IL-6 ter molekul CD20⁺ celic B. Med njimi najpogosteje uporabljamo zaviralce TNF- α . Glavni težavi delovanja zaviralcev TNF- α sta primarna rezistenca in sekundarna odpoved. Slednja je posledica nastanka protiteles proti učinkovini, ki preprečujejo učinkovitost zdravljenja in so vzrok za nastanek neželenih učinkov.

KLJUČNE BESEDE:

biološka zdravila, imunogenost, protitelesa proti biološki učinkovini, vnetne revmatske bolezni

ABSTRACT

Inflammatory rheumatic diseases represent one of the fastest growing medical fields. The common feature of diseases, included in this group, is an inadequate immune system response to self-antigens. The treatment doctrine in the field of inflammatory rheumatic diseases has completely changed in recent years, mainly due to development of modern biological target drugs. Their main purpose is a targeted inhibition of competent cells and their products – cytokines, which play important roles in the pathogenesis of inflammatory rheumatic diseases. Biological drugs used for inflammatory rheumatic disease treatment are TNF- α , IL-1, IL-6, and CD20⁺ B-cell inhibitors. Among them, TNF- α inhibitors are the most frequently used anti-inflammatory biological drugs. The two main problems related to their use are primary and secondary treatment failures. A secondary failure is a consequence of



the presence of recipients' antibodies developed against biological drugs which cause ineffective treatment and various adverse effects.

KEY WORDS:

anti-drug antibodies, biologics, immunogenicity, inflammatory rheumatic diseases

1 VNETHNE REVMATIčNE BOLEZNI

Vnetne revmatične bolezni zajemajo širok spekter bolezenskih stanj, npr. revmatoidni artritis, spondiloartritis, vezivnotkivne bolezni in vaskulitične sindrome, ki predstavljajo veliko breme za bolnike. Skupna značilnost vseh teh bolezni je neustrezen odziv imunskega sistema na telesu lastne antigene, posledica česar so pojav in vzdrževanje vnetja ter nastanek trajnih okvar tkiv in organov (1, 2).

Revmatoidni artritis je kronična sistemska vnetna bolezen avtoimunske narave, ki prizadene predvsem sklepe in za katero trikrat pogosteje zbole vajo ženske. Njegova prevalenca je približno 1 %. Natančnih vzrokov za nastanek revmatoidnega artritisa še ne poznamo, najverjetneje je vpletenih več dejavnikov, npr. genetska predispozicija (navzočnost antigena poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II, HLA-DR4), spolni hormoni, številni zunanji etiološki dejavniki (okužbe z virusi, bakterijami in drugimi mikroorganizmi) ter slabe življenjske navade (kajenje). Bolezensko dogajanje je vezano na vnetje sklepnih ovojnic z eksudacijo, infiltracijo vnetnih imunskih celic in bohotenje granulacijskega tkiva.

Sum na revmatoidni artritis postavimo na osnovi klinične slike ter nespecifičnih laboratorijskih kazalnikov vnetja, kot sta sedimentacija eritrocitov ter C-reaktivni protein. Klinični znak bolezni je simetrična prizadetost sklepov, ki jo lahko kasneje spremljajo tudi okvare notranjih organov in tkiv (revmatična pljuča, spremembe na srcu in očeh, nevrološka prizadetost, amiloidoza, vaskulitis ...). Potrditveno testiranje ob sumu na revmatoidni artritis vključuje določanje specifičnih protiteles v serumu, in sicer revmatoidnega faktorja (RF; protitelesa proti regiji Fc imunoglobulinov G) ter protiteles proti citruliniranemu peptidu (ACPA). Pri bolnikih, ki imajo prisoten revmatoidni faktor (80 % bolnikov), govorimo o serološko pozitivnem revmatoidnem artritisu. ACPA, ki se pojavljajo pri

60 do 70 % bolnikov, so visokospecifična za revmatoidni artritis in napovedujejo težji potek bolezni. Poleg klinične slike in laboratorijskih preiskav, so za postavitve diagnoze pomembne tudi slikovne preiskave ter ultrazvok sklepov (1, 3).

V skupino spondiloartritov uvrščamo ankilozirajoči spondilitis, psoriatični, enteropatični in reaktivni artritis ter nediiferenciran spondiloartritis. Vsem je skupna klinična slika, ki temelji na odsotnosti revmatoidnega faktorja, rentgensko opaznih sprememb ter genetskem ozadju. Etiologija bolezni ni poznana, prisotnost antigena poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda I, HLA-B27, pa je za sedaj najpomembnejši dedni dejavnik, ki dokazano vpliva na razvoj bolezni. V bolezensko dogajanje je vpleteno vnetje narastišč kit in mišičnih tetiv ter priležne kostnine, kar privede do dveh različnih kliničnih slik, in sicer vnetne hrbtna bolečina (aksialni artritis) ali prizadetosti sklepov spodnjih okončin (periferni artritis). Pri postavitvi diagnoze pa nam, razen ugotavljanja prisotnosti antigena HLA-B27, drugi laboratorijski izvidi niso v veliko pomoč (1, 3).

Med vnetne revmatične bolezni uvrščamo tudi sistemske vezivnotkivne bolezni (sistemski lupus eritematosus, anti-fosfolipidni sindrom, Sjögrenov sindrom, sistemska skleroza, polimiozitis in dermatomiozitis) ter vaskulitične sindrome (gigantocelični arteritis, nodozni poliartritis, vaskulitisi malega žilja ...) (1).

2 PRIPOROčILA ZA ZDRAVLJENJE VNETHIH REVMATIčNIH BOLEZNI

Cilj sodobnega zdravljenja vnetnih revmatičnih bolezni je njihova remisija, s čimer upočasnimo in preprečimo napredovanje okvar in ohranimo ali izboljšamo funkcije tkiv. Remisijo dosežemo z zgodnjo uvedbo sodobnega terapevtskega pristopa ter s prilagajanjem zdravljenja ocenjeni aktivnosti bolezni (1, 3). Trenutno je na voljo veliko različnih zdravil, pri čemer pa zaradi razlik v njihovi učinkovitosti in varnosti, ostaja izbira zdravljenja še vedno velik izziv za zdravnike (4). Za zdravljenje vnetnih revmatičnih bolezni uporabljamo:

- nesteroidne antirevmatike;
- glukokortikoide;
- temeljna zdravila – metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, ciklosporin in antimalarike;
- biološka zdravila (preglednica 1) (1, 3, 5).

Preglednica 1: Biološka zdravila za zdravljenje vnetnih revmatičnih bolezni (1); mAb – monoklonsko protitelo, TNF- α – dejavnik tumorske nekroze alfa.

Table 1: Biological drugs used for the treatment of inflammatory rheumatic diseases (1); mAb – monoclonal antibody, TNF- α – tumour necrosis factor alpha.

Vrsta biološkega zdravila	Zdravilo	Struktura
Zaviralci TNF-α	Etanercept	Rekombinantni fuzijski protein človeškega receptorja za TNF- α in strukturnega dela Fc človeške molekule IgG1
	Infliksimab	Himerno mišje/človeško mAb
	Adalimumab	Človeško mAb
	Golimumab	Človeško mAb
	Certolizumab pegol	Rekombinantno izdelan fragment Fab človeške molekule IgG1 z vstavljenimi variabilnimi deli mišjega mAb proti TNF- α , kovalentno povezan z dvema molekulama polietilenglikola
Zaviralci IL-6	Tocilizumab	Humanizirano mišje mAb, usmerjeno proti IL-6R
B-celični zaviralci	Rituksimab	Himerno mišje/človeško mAb, usmerjeno proti molekulam CD20
Zaviralci T-celične kostimulacije	Abatacept	Strukturna enota Fc težke verige človeškega IgG1, povezana z izvencelično domeno inhibitorne molekule CTLA-4

Registrirane indikacije za zdravljenje z biološkimi zdravili so: revmatoidni artritis, ankilozirajoči spondilitis, psoriatični artritis, enteropatski artritis, sistemski lupus eritematozus, od nedavnega pa tudi pozitivni vaskulitisi malega žilja (ANCA). Izjemoma lahko tovrstna zdravila uporabljamo tudi za indikacije, za katere niso registrirana, npr. pri neodzivnih oblikah bolezni na temeljna zdravila (vse druge vnetne revmatične bolezni) (2).

3 ZAVIRALCI DELOVANJA TNF- α

Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) ima pomembno vlogo v patogenezi vnetnih bolezni in je najpomembnejši citokin, ki spodbuja vnetje. Bolniki z vnetnimi revmatičnimi boleznimi imajo v sklepnih tekočinah velike koncentracije TNF- α . Zaviralci TNF- α so večinoma monoklonska protitelesa, ki se s fragmentom Fab vežejo na topni in membransko vezani TNF- α , ki je izražen na številnih imunskih celicah. Zaviralci TNF- α z neposredno vezavo na topni TNF- α blokirajo njegovo delovanje in zavrejo njegovo interakcijo s

specifičnimi receptorji (TNFRSF1A/p55 in TNFRSF1B/p75) ter s tem inducirajo apoptozo vnetnih mononuklearnih imunskih celic. Vežava zaviralcev TNF- α na membransko vezani TNF- α povzroči spodbujanje s protitelesi (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) in s komplementom posredovano citotoksičnost (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*). V številne imunske funkcije je vpleten tudi konstantni del Fc, ki preko vezave na receptor za Fc na številnih imunskih celicah inducira signaliziranje, ki vodi v apoptozo. Zaviralci TNF- α zmanjšajo tako lokalno kot sistemsko delovanje TNF- α , rezultat tega pa je zmanjšanje oz. kontrola vnetja ter remisija bolezni (6-9).

4 IMUNOGENOST ZAVIRALCEV TNF- α

Zdravljenje z zaviralci delovanja TNF- α predstavlja velik izziv za zdravnike, saj, poleg neželenih učinkov, naletimo tudi na njihovo neučinkovitost pri približno 50 % bolnikov. Poglavitna problema pri uporabi bioloških zdravil proti TNF- α sta njihova



Preglednica 2: Dejavniki, ki vplivajo na imunogenost bioloških zdravil (12, 14).

Table 2: Factors affecting immunogenicity of biological drugs (12, 14).

Povezani z zdravljenjem	Povezani z zdravilom	Povezani z bolnikom
Odmerek in trajanje zdravljenja Način dajanja zdravila Menjava zdravil Sočasna izpostavljenost drugim zdravilom	Sekvenčne modifikacije humanega proteina Glikozilacija ali druge posttranslacijske modifikacije Kontaminanti oziroma s produktom povezane nečistote Razmere shranjevanja in rokovanja	Genetska predispozicija Spremljajoče bolezni Imunski status

primarna rezistenca in sekundarna odpoved (10). Na primarno rezistenco sumimo pri bolnikih, ki ne kažejo izboljšanja kliničnih znakov oziroma simptomov med začetnim zdravljenjem. V različnih raziskavah so dokazali, da tretjina bolnikov, zdravljenih z zaviralci TNF- α , razvije primarno rezistenco (2). Sekundarna odpoved nastane po tem, ko je že opazen začetni odziv na zdravljenje. Glavni vzrok za njen nastanek je imunogenost bioloških zdravil, ki predstavlja neželeni učinek, in se lahko pojavi kljub temu, da za njihovo izdelavo uporabimo izključno človeško nukleotidno oz. aminokislinsko zaporedje. Najverjetneje se lahko med izdelavo, formulacijo, transportom ali shranjevanjem tovrstnih zdravil poruši nativna oblika proteinov, kar povzroči njihovo imunogenost. Zato začnejo v prejemniku nastajati specifična protitelesa proti učinkovini (ADA, *anti-drug antibody*), ki izničijo delovanje biološkega zdravila (11). Tvorba specifičnih protiteles vodi v zmanjšanje učinkovitosti zdravila in v izgubo odziva na zdravljenje, kar se zgodi kar pri 50 % pacientov. Pri tem pa govorimo le o oceni pojavnosti, saj prisotnosti specifičnih protiteles ne določamo rutinsko pri vsakem neuspešnem zdravljenju oz. pojavu neželenih učinkov. Na imunogenost bioloških zdravil vplivajo različni dejavniki, predstavljeni v preglednici 2 (12). Sočasno jemanje temeljnih zdravil zmanjša imunogenost bioloških zdravil, mehanizmov tega vpliva pa ne poznamo (13).

5 NEVARNOST – NEŽELENI UČINKI

Za zaviralce TNF- α so na začetku menili, da skoraj nimajo resnih neželenih učinkov, ki pa so se začeli pojavljati ob pogostejši uporabi. Najpogostejši neželeni učinki se pojavljajo lokalno na mestu vboda ali infuzije. Zaviralci TNF- α povečajo tveganje za okužbe, predvsem za pojav tuberkuloze. Pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, ki se zdravijo z

zaviralci TNF- α , opažajo pogostejši razvoj nemelanomskega kožnega raka. Pri bolnikih lahko pride tudi do poslabšanja prej že umirjene multiple skleroze. Med zdravljenjem se lahko tvorijo številna protitelesa, ki pa niso usmerjena samo proti zaviralcem TNF- α . Pogosta so avtoprotitelesa, npr. proti jedrnim antigenom (ANA, *anti-nuclear antibodies*) in proti dvoverižni DNA, katerih pomen še ni pojasnjen (3).

Večina neželenih učinkov je posledica tvorbe imunskih kompleksov med biološko učinkovino in specifičnimi protitelesi proti učinkovini. Nastajajo lahko manjši imunski kompleksi, med eno molekulo biološke učinkovine in eno molekulo specifičnega protitelesa, kot tudi večji, sestavljeni iz več povezanih molekul bioloških učinkovin in več molekul specifičnih protiteles. Imunski kompleksi vplivajo tako na mehanizme pridobljene kot prirojene imunosti (15).

Primarno vlogo v nastanku neželenih učinkov imunskih kompleksov imajo receptorji Fc γ , ki so izražani na številnih celicah v hematopoetskem sistemu. Imunski kompleksi se vežejo na nizkoafinitetne receptorje ter sprožijo tvorbo številnih topnih vnetnih mediatorjev in kemotaktičnih kemokinov. Slednji sprožijo aktivacijo endotelija in poškodbe tkiv. Prav tako je pomembna tudi aktivacija komplemента po klasični poti, preko vezave C1q na domeno CH2 molekule IgG, kar sproži vrsto encimskih in proteolitičnih reakcij (15).

6 PRILOŽNOST – KLINIČNI POMEN UGOTAVLJANJA KONCENTRACIJ ZAVIRALCEV TNF- α TER PROTITELES PROTI NJIM V KRVI

Z znanimi koncentracijami biološke učinkovine in specifičnih protiteles proti učinkovini v krvi bolnika lahko s prilagoditvijo

zdravljenja že na začetku povečamo terapevtsko varnost, učinkovitost in racionalnost. Koncentracije biološke učinkovine zelo nihajo tako med posamezniki kot tudi pri posameznikih v različnih obdobjih. Pojavnost specifičnih protiteles se glede na ugotovitve različnih raziskav zelo razlikuje, kar je najverjetneje posledica razlik v testiranih populacijah bolnikov. Do razlik prihaja tudi na račun različnih detekcijskih metod, ki jih uporabljamo za ugotavljanje specifičnih protiteles, saj imamo opraviti s pomakanjem standardiziranih metod. Razlike v koncentracijah biološke učinkovine in specifičnih protiteles pa niso samo posledica odmerka zdravila ali intervala njegovega odmerjanja, ampak tudi lastnosti samih bolnikov (spol, starost, teža, aktivnost bolezni, pridružene bolezni, podporna zdravila in stanje imunskega sistema). Zato moramo za ugotavljanje omejenih koncentracij uporabljati le metode, ki so dovolj natančne in zanesljive, saj na osnovi njihovih rezultatov bolnikom prilagajamo zdravljenje (10, 16, 17).

Informacije o koncentracijah bioloških učinkovin in specifičnih protiteles lahko zdravniku pomagajo v naslednjih primerih:

- **Bolnik z majhnimi koncentracijami biološke učinkovine, brez prisotnosti specifičnih protiteles.** Razlog za tako stanje je lahko spremenjena farmakokinetika zaradi zmanjšane biološke uporabnosti (npr. lokalno injiciranje) in/ali zmanjšan razpolovni čas v krvi (npr. velika poraba učinkovine pri visoki aktivnosti bolezni). Zdravnik lahko pri takem bolniku na začetku zdravljenja poveča odmerek biološkega zdravila ali skrajša interval odmerjanja (10, 18).
- **Bolnik z zadostnimi količinami biološke učinkovine, brez prisotnosti specifičnih protiteles.** V primerih, kjer ni opaznega zmanjšanja aktivnosti bolezni, povečan odmerek ali skrajšan interval odmerjanja ne bi učinkovala. Predvidevajo, da TNF- α v tem primeru ne igra ključne vloge v patogenezi bolezni, saj gre najverjetneje za primarno rezistenco na zdravilo. Zamenjava zdravila znotraj skupine zaviralcev TNF- α ne bi učinkovala, zato priporočajo zamenjavo skupine protinetnih bioloških zdravil. Kadar pa gre za bolnika z zmanjšano aktivnostjo bolezni, dobi zdravnik na ta način informacijo o njegovem učinkovitem zdravljenju (10, 18).
- **Bolnik z majhnimi koncentracijami biološke učinkovine, s prisotnimi specifičnimi protitelesi.** Specifična protitelesa v krvi z vezavo na biološko učinkovino preprečijo, da bi ta vstopila v kri (lokalno injiciranje) in/ali

njen vstop v vnetišče in/ali njeno vezavo na TNF- α . Zdravnik lahko v primeru, ko ni izboljšanja aktivnosti bolezni, bolniku zamenja zdravilo znotraj skupine zaviralcev TNF- α (18).

- **Bolnik z velikimi koncentracijami biološke učinkovine in specifičnih protiteles.** V takšnem primeru je potrebno preveriti pravilnost določitve biološke učinkovine in specifičnih protiteles v laboratoriju (18).

Nekateri zdravniki zagovarjajo izključno ugotavljanje koncentracije biološke učinkovine, in sicer zato, ker so specifična protitelesa pravzaprav pokazatelj njenih subterapevtskih ali nedoločljivih koncentracij v krvi bolnika. Obstajajo pa seveda še drugi razlogi za nizke ravni biološke učinkovine, npr. nepravilno shranjevanje bioloških zdravil ali njihovo časovno neustrezno injiciranje, ko si jih bolniki aplicirajo sami. V drugem primeru je težava v časovno neustreznih odvzemih vzorca krvi. Kadar imamo informacijo o majhnih koncentracijah učinkovine, povečamo odmerek zdravila, vendar pa se, ko so prisotna specifična protitelesa, njegova koncentracija v krvi ne zvečuje, zato zdravljenje postane neučinkovito, poleg tega pa se posledično poveča tudi možnost pojavljanja neželenih učinkov (10).

Ugotavljanje koncentracij bioloških učinkovin in specifičnih protiteles v krvi predstavlja velik izziv za laboratorijsko medicino. V ta namen lahko uporabimo širok spekter metod. Najpogosteje uporabljamo za detekcijo biološke učinkovine različne encimsko imunske in funkcijske metode (RGA, *reporter gene assay*), medtem ko za detekcijo specifičnih protiteles poleg teh metod uporabljamo še radioimunsko metodo in t. i. *antigen binding test*. Metode se med seboj razlikujejo glede na občutljivost ter specifičnost, kar je vzrok za pogosto neprimerljivost rezultatov. Največja težava metoda, ki jih uporabljamo za zaznavanje in določanje specifičnih protiteles, je nezmožnost njihove detekcije ob sočasni prisotnosti učinkovine v krvnem vzorcu. Protitelesa se namreč vežejo na molekule biološke učinkovine, pri čemer se tvorijo imunski kompleksi, rezultat testiranja pa je napačen, saj podaja le koncentracijo prostih specifičnih protiteles in ne vseh, ki so dejansko prisotna. V takih primerih lahko uporabimo različne metode, s pomočjo katerih lahko v vzorcih pred analizo razbijemo imunske komplekse. Razbitje kompleksov lahko temelji na temperaturni ali kislinski ločbi (19-25).

Poleg prisotnosti specifičnih protiteles pa nas zanima tudi, ali gre za nevtralizacijska specifična protitelesa. Protitelesa



so lahko specifična za različne epitope molekule in jih razvrstimo v dve skupini, nevtralizacijska in nenevtralizacijska. Nevtralizacijska protitelesa se vežejo na aktivno mesto domene Fab zaviralca TNF- α in s tem nevtralizirajo učinek zdravila (antiidiotipska protitelesa). Lahko pa se vežejo na druge dele fragmenta Fab, ki niso vpleteni v vezavo TNF- α in jih z vezavo ne nevtralizirajo, imajo pa vpliv na očistek zaviralca TNF- α (antialotipska protitelesa) in prav tako vplivajo na izid zdravljenja. Edina metoda, s katero določimo nevtralizacijska protitelesa, je funkcijska metoda RGA (19, 20). Najprimernejši čas za odvzem krvnih vzorcev za ugotavljanje nivojev specifičnih protiteles je v obdobju minimalne koncentracije učinkovine v stacionarni fazi zdravljenja, to pa je vedno pred injiciranjem vsakega naslednjega odmerka zdravila. Takrat je koncentracija biološke učinkovine v krvi najmanjša, s tem pa je najmanjša tudi verjetnost za nastanek imunskih kompleksov s prisotnimi specifičnimi protitelesi (26).

7 BIOLOŠKO PODOBNA ZDRAVILA

Na področju bioloških zdravil ne govorimo o generičnih, ampak o biološko podobnih zdravilih. Zaradi njihove kompleksne sestave in zahtevnega načina proizvodnje je nemogoče izdelati povsem identično biološko zdravilo. Med postopkom registracije morajo zato proizvajalci biološko podobnemu zdravilu dokazati primerljivost in varnost (14). V skupini bioloških zdravil zaviralcev TNF- α je že v uporabi infliksimabu biološko podobno zdravilo. Oba imata dokazano primerljivo učinkovitost in imunogenost (27, 28).

8 SKLEP

Pri več kot polovici bolnikov, ki jih zdravimo z zaviralci TNF- α , zdravljenje ni učinkovito. Del teh bolnikov se na zdravljenje dejansko ne odziva, del pa jih razvije sekundarno odpornost. Zato je pred zdravniki velik izziv, kako določiti optimalen način zdravljenja z biološkimi zdravili, v kombinaciji z drugimi zdravili. Bolniku prijazna medicina pomeni posamezniku prilagojeno zdravljenje, katerega cilj je določitev najustreznejšega zdravljenja za vsakega bol-

nika. Tak pristop se na področju bioloških zaviralcev delovanja TNF- α še ni uveljavil. Presenetljivo je dejstvo, da še vedno ni smernic, kako ravnati s skoraj polovico bolnikov, pri katerih tovrstno zdravljenje ni učinkovito. Trenutno se pri zdravljenju zanašamo na spremembe v klinični sliki poteka bolezni oziroma aktivnosti bolezni ter na pojav neželenih učinkov. Tak pristop, ki temelji na odnosu »preskušanje/odziv«, pa še zdaleč ni racionalen. Še pomembnejša kot racionalnost je v tem primeru nastajanje ireverzibilnih poškodb tkiv pri tistih bolnikih, ki še čakajo na ustrezno in učinkovito zdravljenje (16). Z ugotavljanjem koncentracij bioloških učinkovin ter specifičnih protiteles bi nedvomno pridobili zelo koristne informacije. Zato je pred strokovnjaki laboratorijske medicine zahtevna naloga vpeljave natančnih in zanesljivih metod, ki bi zagotavljale pravilne rezultate, na osnovi katerih bi nato lahko pri vsakemu bolniku kar najbolj prilagodili zdravljenje z biološkimi zdravili in s tem dosegli največjo možno učinkovitost in varnost. Tako bi preprečili pojav neželenih učinkov, primarnih in sekundarnih neodzivnosti ter omogočili zaznavanje specifičnih protiteles še pred pojavom morebitnih kliničnih zapletov.

9 LITERATURA

1. Tomšič M, Praprotnik S. Revmatске bolezni. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. *Interna Medicina. Slovensko medicinsko društvo*; 2011: 1395-1527.
2. Furst DE, Keystone EC, Braun J et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2011. *Ann Rheum Dis* 2012; 71 Suppl 2: i2-45.
3. Tomšič M, Praprotnik S. *Revmatološki priročnik za družinske zdravnike*. 4th ed. Ljubljana: Revma.net; 2012.
4. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC et al. *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update*. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(3): 492-509.
5. Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP et al. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(1): 3-5.
6. Anderson DL. A new age in Rheumatoid Arthritis Treatment. *Am J Nurs* 2004; 104(2): 60-68.
7. Obermajer N, Premzl A, Kos J. Terapevtska monoklonska protitelesa. In: Štrukelj B, Kos J. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 532-578.
8. Grell M, Douni E, Wajant H et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; 83(5): 793-802.
9. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; 117(2): 244-279.

10. Bendtzen K. Immunogenicity of Anti-TNF-alpha Biotherapies: I. Individualized Medicine Based on Immunopharmacological Evidence. *Front Immunol* 2015; 6: 152.
11. Descotes J, Gouraud A. Clinical immunotoxicity of therapeutic proteins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4(12): 1537-1549.
12. Jani M, Barton A, Warren RB et al. The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(2): 213-222.
13. Krieckaert CL, Bartelds GM, Lems WF et al. The effect of immunomodulators on the immunogenicity of TNF-blocking therapeutic monoclonal antibodies: a review. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(5): 217.
14. Štrukelj B. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. In: Štrukelj B, Kos J. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 4-24.
15. Krishna M, Nadler SG. Immunogenicity to Biotherapeutics - The Role of Anti-drug Immune Complexes. *Front Immunol* 2016; 7: 21.
16. Bendtzen K. Anti-TNF-alpha biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine. *Immunotherapy* 2012; 4(11): 1167-1179.
17. Bendtzen K. Immunogenicity of Anti-TNF-alpha Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. *Front Immunol* 2015; 6.
18. Bendtzen K, Ainsworth M, Steenholdt C et al. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44(7): 774-781.
19. Keiserman M, Codreanu C, Handa R et al. The effect of antidrug antibodies on the sustainable efficacy of biologic therapies in rheumatoid arthritis: practical consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10(8): 1049-1057.
20. Lallemand C, Kavrochorianou N, Steenholdt C et al. Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNFalpha antagonists. *J Immunol Methods* 2011; 373(1-2): 229-239.
21. Wang SL, Hauenstein S, Ohrmund L et al. Monitoring of adalimumab and antibodies-to-adalimumab levels in patient serum by the homogeneous mobility shift assay. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 78-79: 39-44.
22. Pouw MF, Krieckaert CL, Nurmohamed MT et al. Key findings towards optimising adalimumab treatment: the concentration-effect curve. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(3): 513-518.
23. van Schouwenburg PA, Bartelds GM, Hart MH et al. A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals "hidden" immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods* 2010; 362(1-2): 82-88.
24. Desvignes C, Edupuganti SR, Darrouzain F et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure adalimumab concentration. *Bioanalysis* 2015; 7(10): 1253-1260.
25. Radstake TR, Svenson M, Eijsbouts AM et al. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(11): 1739-1745.
26. Hart MH, de Vrieze H, Wouters D et al. Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *J Immunol Methods* 2011; 372(1-2): 196-203.
27. Lambert J, Wyand M, Lassen C et al. Bioavailability, safety and immunogenicity of biosimilar infliximab (BOW015) compared to reference infliximab. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016; 54(4): 315-322.
28. Yoo DH, Racewicz A, Brzezicki J et al. A phase III randomized study to evaluate the efficacy and safety of CT-P13 compared with reference infliximab in patients with active rheumatoid arthritis: 54-week results from the PLANETRA study. *Arthritis Res Ther* 2015; 18(1): 82.



FARMA^{pro}

**Spletno izobraževanje
za farmacevtske strokovne
delavce v lekarni.**

Nov način
pridobivanja
strokovnega znanja.

Dostopnost
24 ur na dan,
7 dni v tednu (24/7).

Možnost uporabe tudi
na pametnem telefonu
ali tabličnem računalniku.

www.farmapro.si

Spletno izobraževanje FarmaPro je namenjeno *strokovni zdravstveni javnosti*.



DRUŠTVENE VESTI

ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

IZPOPOLNJEVALNI TEČAJ IZ KLASIČNE HOMEOPATIJE V ORGANIZACIJI MEDNARODNE AKADEMIJE ZA KLASIČNO HOMEOPATIJO

Lidija Blažič, mag. farm., Urška Hočevar, mag. farm.,
Katarina Lucija Glas, dr. med.

Na otoku Alonissos v grških Sporadih v organizaciji **Mednarodne akademije za klasično homeopatijo** (IACH, *International academy of classical homeopathy*) že od leta 1995 potekajo izobraževanja za homeopate s celega sveta, tako za začetnike kot tudi za tiste, ki homeopatijo že dobro poznajo in bi radi poglobili svoje znanje o sistematičnem homeopatskem zdravljenju najtežjih primerov.

Akademijo za klasično homeopatijo vodi prof. George Vit-houlkas, ki svoje bogato znanje in izkušnje že 55 let posreduje svojim učencem preko številnih predavanj, člankov in knjig, ki so bile prevedene v 33 jezikov, tudi v slovenščino. Utemeljil je pionirsko teorijo ravni zdravja, ki razloži razvoj bolezni in potek zdravljenja glede na bolnikovo predispozicijo. Za svoje dolgoletno delo in izjemen doprinos na področju homeopatije je prof. Vit-houlkas prejel tudi prestižno priznanje, alternativno Nobelovo nagrado.

V 21 letih je pod okriljem IACH homeopatsko znanje izpopolnjevalo in izmenjalo več kot 15.000 homeopatov iz 62 držav, od tega več kot 1000 farmacevtov in več kot 12.000 zdravnikov.

Tudi letos smo se enega izmed izobraževanj, **izpopolnjevalnega seminarja iz klasične homeopatije**, ki je potekal od 30. maja do 8. junija, udeležile predstavnice Slo-



venije, Lidija Blažič, Urška Hočevar in Katarina Lucija Glas. Skupaj nas je bilo 157 slušateljev iz 32 držav Evrope, Južne in Severne Amerike, Azije in Avstralije.

Intenzivni program seminarja je obsegal dva sklopa. Prvi sklop je zajemal praktični prikaz strokovne obravnave bolnikov, ki pridejo na prvi pregled, ter bolnikov, ki so prišli na kontrolo po več mesecih ali letih zdravljenja.

Predstavili so obravnavo 33 bolnikov vseh starosti z različnimi bolezenskimi težavami. Široka paleta obravnavanih diagnoz je zajemala **kazuistiko z gastrointestinalnega področja** (kronična diareja, gastritis), **kardiovaskularnega področja** (hipertenzija, kronična odpoved ledvic, gangrena), **področja osteomuskularnih obolenj** (fibromialgija, osteoartritis, revmatoidni artritis, psoriatični artritis, bolečine v vratu), **področja ORL** (paraliza obraznega živca), **področja kožnih obolenj** (alergija, melanom, kožni izpuščaji) in **s področja pediatrije** (nočna enureza).

Drugi sklop je obsegal predavanja iz Organona medicine, iz teorije ravni zdravja, teorije obravnave bolnika na prvem pregledu in kontrolnih pregledih, teorije diferencialne diagnoze zdravil ter iz primerjalne materije medike.

Delo na seminarjih je potekalo interaktivno. Obravnavo vsakega primera in teorije je spremljala živahna razprava z



izmenjavo mnenj, ki je osvetlila različne poglede na simptome obravnavanega bolnika, tako fizične kot tudi mentalno-emocionalne.

Posebej zanimiv je bil primer 12-letnega bolnika, ki je že vrsto let trpel zaradi kronične diareje in dosedanje zdravljenje ni bilo uspešno. Predstavil ga je indijski homeopat dr. Atul Jaggi. Na prvem obisku je bolnik poročal o tri leta trajajoči kronični diareji, s 6 do 10 odvajanj neformiranega blata na dan, vsaj petkrat na teden.

Na podlagi skrbno izbranih simptomov z različno težo je po hierarhizaciji simptomov in po repertorizaciji z računalniškim programom Vithoulkas Compass bolnik prejel Carcininum v potenci C200 ter naslednji dan še en odmerek istega zdravila v potenci 1M. Pri izbiri je bila upoštevana tudi družinska anamneza z astmo in karcinomom želodca. Poročila o številu odvajanj in formiranem/neformiranem blatu je bolnik redno vsakodnevno posredoval zdravniku homeopatu. En dan po odmerku 1M se je število odvajanj neformiranega blata povzpelo na 15, kar je bil na videz slab znak, ki pa je po teoriji homeopatije kazal, da je bolnik odreagiral na zdravilo. Reakcija je trajala en dan. Deset dni kasneje sta bili zadnji dve odvajanj že formirani. V času prvega kontrolnega pregleda, 53 dni po prvem odmerku, se je število odvajanj zopet povečalo na 15 odvajanj dnevno, kar se na prvi pogled ni zdelo najbolje, vendar so bile informacije pacienta in njegovih svojcev v prid dejstvu, da zdravilo še vedno deluje. Homeopat se je odločil, da bo z naslednjim odmerkom zdravila še počakal zaradi:

- izboljšanja mentalno-emocionalnih simptomov (otrok se je začel igrati s svojimi vrstniki, torej se je spet začel obnašati primerno svoji starosti in ni bil več tako hitro užaljen);
- fizični simptomi so bili sicer še vedno prisotni, a so se že začele pojavljati nekatere spremembe. Največji pomen je homeopat pripisal podatku, da je fant kljub številnim odvajanjem blata prvič po vseh dotedanjih zdravljenjih sredi dneva odvajal lepo formirano blato.

Trend izboljšanja se je nato nadaljeval in dva dni zatem se je število odvajanj pričelo zmanjševati. Bolnik je vedno pogosteje odvajal formirano blato. 66 dni po začetnem odmerku je bilo pri vseh odvajanjih blato formirano. Do maja 2016, ko je potekal naš seminar, to je 6 mesecev po zadnjem pregledu, odvaja bolnik samo še formirano blato in diareje ni več.

Obravnavani primer jasno kaže, kako je pri homeopatskem zdravljenju kroničnih bolnikov pomembna potrpežljivost. Življenjski sili je treba dati čas, da po spodbudi, ki jo prejme z odmerkom ustreznega homeopatskega zdravila, organizem nežno in varno pripelje do izboljšanja brez vmesnih motenj. Tudi ta primer potrjuje dejstvo, da zdravljenje ne poteka vedno linearno. Prikazano je bilo skrbno dokumentirano spremljanje bolnikovih simptomov in razvoj poteka zdravljenja v celoti. Dokler je učinek zdravila trajal, se zdravnik homeopat ni vpletal v proces zdravljenja, saj bi lahko s prezgodnjimi ponovitvami in menjavami zdravil zdravljenje upočasnil ali pa bi spremenil simptomatiko in tok bolezni, s tem pa zavrl optimalni potek zdravljenja.

Eden od parametrov, ki določa potencial okrevanja je tudi podatek, koliko je pri bolniku zdravje že načeto oziroma na kateri ravni zdravja se nahaja. Teorijo ravni zdravja je prof. Vithoulkas opisal v knjigi Ravni zdravja (*Levels of Health*).

Že dvajset let poteka v več kot 75 državah tudi spletno izobraževanje IACH (*E-learning program*), ki je doslej pridobilo akreditacijo na petih medicinskih fakultetah. Bralce vabimo, da si ogledajo brezplačni poskusni program, ki je na voljo na spletni strani IACH s podnapisi v slovenščini.

Seminarji v organizaciji Akademije za klasično homeopatijo omogočajo in zagotavljajo okolje za povezovanje in izmenjavo znanj strokovnjakov s področja homeopatije in drugih ved z vsega sveta. Nenehna izmenjava mnenj je res izjemna priložnost za sklepanje novih prijateljstev in nadgradnjo teoretičnega in praktičnega znanja vsakega homeopata.

PREDSTAVITEV KNJIGE RAVNI ZDRAVJA

Lidija Blažič, mag. farm.

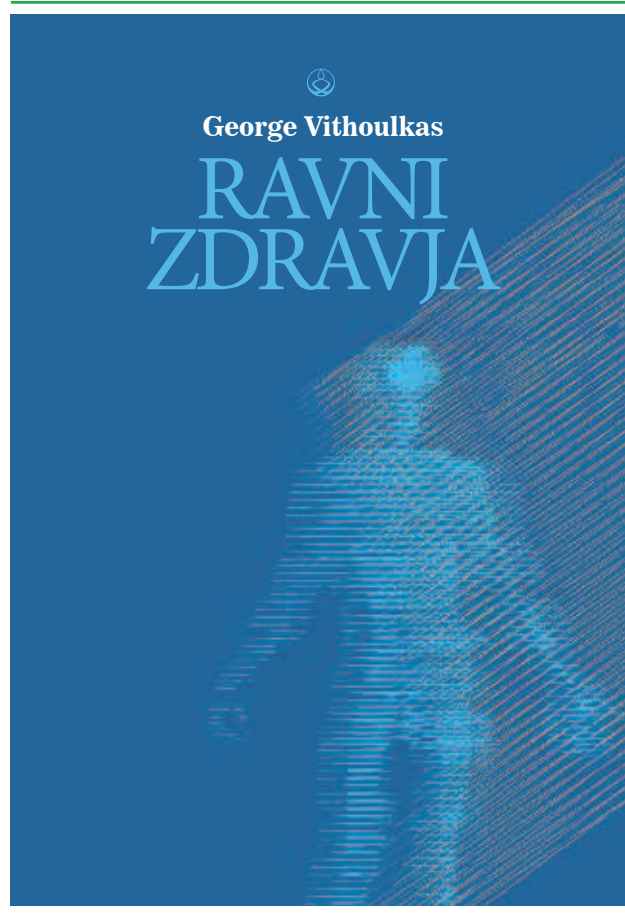
Priročnik Ravni zdravja je pomemben prispevek k homeopatiji in medicini. V njem avtor, profesor George Vithoulkas, podaja in opisuje pravila, ki nam povedo, ali se po homeopatskem zdravljenju splošno stanje pacienta izboljšuje ali pa so se morda izboljšali samo nekateri od simptomov in gre v bistvu za odiranje bolezni na bolj ključna področja organizma.

V prvem delu avtor opredeli energijski sistem organizma. Vsa vprašanja glede zdravja in bolezni se nanašajo na to, ali ima organizem za vzdrževanje naravnega ravnovesja (homeostaze) na voljo dovolj energije. Energijski sistem, dober ali slab je osnova, s katero se organizem rodi. Boljši kot je energijski sistem, močnejši je obrambni mehanizem in posledično bolj zdrav je človek. V homeopatskem smislu to pomeni, da je slika simptomov jasna in stabilna ter da je prognoza zdravljenja dobra. In obratno, iskanje pravega homeopatskega zdravila je tem zahtevnejše, čim bolj je obrambni mehanizem oslavljen in s tem ogrožen. Slika simptomov je v takšnih primerih manj jasna in tudi prognoza zdravljenja je slabša.

Raven zdravja se tekom življenja lahko do določene mere spreminja. Z različnim življenjskim slogom, reakcijami na stres in načini zdravljenja energijski sistem lahko izčrpavamo ali krepimo in temu ustrezno se zvišuje ali znižuje tudi raven zdravja, vendar le v okviru prirojenih bolnikovih danosti.

Z razvrstitvijo ljudi na različne ravni zdravja lažje razumemo splošno zdravstveno stanje pacienta, bolj natančno določimo prognozo in potek zdravljenja, izberemo ustrezno potenco in frekvenco ponavljanja odmerkov homeopatskega zdravila ter spremljamo potek zdravljenja.

Zaradi preglednosti in lažjega razumevanja je avtor glede na dedno predispozicijo in vitalnost predvidel dvanajst ravnih zdravja. Na prvi ravni so najbolj zdravi ljudje, ki se morda prehladijo enkrat na deset let, na ravni 12 pa so zelo bolni ljudje, ki jih je bolezen že pripeljala blizu konca življenja. Vsi ostali so umeščeni vmes, odvisno od različnih dejavnikov, ki jih avtor podrobneje razloži.



V drugem delu Vithoulkas razlaga, kako določiti prognozo in pričakovano življenjsko dobo bolnika, kako izbrati ustrezno potenco homeopatskega zdravila in kdaj ponoviti odmerek. Podrobneje opiše 22 različnih možnih reakcij bolnika na homeopatsko zdravilo. Reakcija bolnika na pravilno predpisano homeopatsko zdravilo je namreč eden izmed najpomembnejših podatkov, ki nam največ pove o ravni bolnikovega zdravja. Kot zanimivost omenimo, da le 3 do 5 % vseh bolnikov iz t. i. razvitih držav sodi v tri najvišje ravni zdravja. Verjetno je to davek stresnega načina življenja, slabe prehrane, prepogoste uporabe zdravil, ki delujejo supresivno, in še česa.

Knjiga Ravni zdravja je nepogrešljiv priročnik za vse, ki predpisujejo ali svetujejo uporabo homeopatskih zdravil. Vsak homeopat mora v vsaki točki zdravljenja prepoznavati raven zdravja in v katero smer poteka zdravljenje ter ustrezno ukrepati v dobro pacienta, saj je njegova najvišja in edina naloga obnovec bolnikovega zdravja.



V SPOMIN MARKU DOLŽANU – magistru farmacije (1951-2016)



V sončnem aprilskem dnevu smo se na ljubljanskih Žalah poslovili od našega dragega kolega, sodelavca in prijatelja Marka Dolžana. Vest o njegovi smrti je vse, ki smo ga poznali, presenetila in globoko pretresla. Vedeli smo za njegovo hudo bolezen, ki se ji je Marko pogumno, odločno in optimistično zoperstavil. Upali in verjeli smo, da bo zmagal tudi v najtežji bitki svojega življenja. Žal, vse je bilo zaman.

Marko je bil rojen leta 1951. Po zaključku študija farmacije se je v letu 1978 zaposlil v tovarni Lek v Ljubljani. V obratu tabletarne je reševal tehnološko in drugo problematiko ter sodeloval pri uvajanju novih izdelkov in tehnologij v proizvodnjo. Zaradi izjemnega smisla za organizacijo in občutka za komunikacijo je hitro napredoval na odgovornejša vodstvena delovna mesta. Leta 1980 je postal vodja proizvodnega obrata Tabletarne, med leti 1982 do 1987 pa je bil pomočnik direktorja in direktor TOZD- a Farmacije, največje in najpomembnejše enote Leka.

V letu 1987 si je kot pomočnik direktorja Zunanje-trgovinskega sektorja našel nove izzive na področju marketinga in prodaje. Tudi v tej vlogi se je odlično znašel in uspel. Znal je pridobiti zaupanje kupcev, postal cenjen pri strankah in poslovnih partnerjih.

Leta 1991 se je Marko z družino preselil na Poljsko. Kot direktor predstavništva Leka v Varšavi in kasneje kot predsednik upravnega odbora Lek Polska je vse posle zelo uspešno vodil in razvijal 14 let. Oblikoval je marketinško in prodajno ekipo več kot 300 sodelavcev. V letu 2001 je Lek na njegovo pobudo prevzel farmacevtsko podjetje Argon SA v Lodžu in dve leti kasneje v Strykoku pri Lodžu odprl drugo, sodobno Lekovo tovarno. Za svoje izjemno delo je prejel več Lekovih nagrad in priznanj.

Po razhodu z Lekom v letu 2005 se je odločil za pot samostojnega podjetnika in investitorja. Z bivšima sodelav-

cema iz Leka je začel razvijati dejavnost prehranskih dopolnil. Leta 2005 so ustanovili podjetji Farmicom v Sloveniji in Sensilab na Poljskem. Marko je postal prvi predsednik uprave Sensilaba. Začrtal je smernice razvoja družbe. Sensilab je leta 2008 prevzel lastništvo farmacevtske tovarne Polfa Lodž na Poljskem in zgradil novo farmacevtsko tovarno z 250 zaposlenimi, ki predstavlja temelj za nadaljnjo rast poslovanja. Leto kasneje je bila odprta razvojna enota v Sloveniji, ki omogoča tudi proizvodnjo v manjšem obsegu.

Marko je bil ustanovitelj in predsednik Društva slovensko-poljskega prijateljstva Triglav-Rysy. Kot priznanje za aktivni prispevek k slovensko-poljskemu sodelovanju in krepitev bilateralnega gospodarskega sodelovanja je prejel dve visoki poljski državni odlikovanji. V letu 2001 je bil odlikovan z Viteškim križem za zasluge Republike Poljske, maja 2011 pa s Komandorskim križem Republike Poljske. V tem letu je prejel tudi nagrado Republike Slovenije za družbeno odgovornost HORUS 2011 v kategoriji »Podjetnik s slovenskimi koreninami, ki deluje v zamejstvu oz. po svetu«.

Upokojil se je v letu 2013. Bolezen, o kateri ni rad govoril, je že načela njegovo zdravje. Kljub temu je živel polno življenje. Sodelavcem doma in na Poljskem je ostal na razpolago in jim s svojim bogatim znanjem in izkušnjami rad pomagal, kadar je bilo to potrebno.

Kljub dolgoletnemu napornemu in odgovornemu vodstvenemu delu je Marko vseskozi ostal skromen in preprost človek. Bil je vedrega in odprtega značaja. Znal je prisluhniti vsakomur, se z njim pogovoriti in poveseliti. Sodelavci so ga spoštovali, mu zaupali in sledili.

Tudi na nas, prijatelje iz mladih let, ni nikoli pozabil. Vedno, ko se je vračal domov v Slovenijo, si je kljub številnim obveznostim vzel čas tudi za naša druženja in družinska srečanja. Najbolj smo uživali in se veselili ob igranju tenisa in kasneje, ko smo ob vrčkih piva v krogu svojih družin živahno komentirali potek teniških dvobojev in različne aktualne dogodke.

Marka smo vsi imeli radi. Prezgodnja smrt je njega in nas prikrajšala za mnogo prijetnih uric, ki bi jih še lahko preživeli skupaj. Naš »Žemlja«, kot smo ga klicali prijatelji iz rane mladosti, bo za vedno ostal v naših srcih.

Počivaj v miru, dragi prijatelj!

Jure Borštnar

Dragi bralci Farmacevtskega vestnika, dragi avtorji in recenzenti,

ob koncu leta se Vam v imenu celotnega uredništva iskreno zahvaljujem za vse skupne urice, v katerih smo soustvarjali osrednje glasilo slovenske farmacije – tiste najboljše delovne, ki smo jih preživeli med oblikovanjem strokovnih vsebin, kot tudi vse ostale, ki smo jih kot bralci namenili Farmacevtskemu vestniku. Ob tej priložnosti želim k pisanju povabiti in spodbuditi še širši krog bralcev, veseli bomo vseh aktualnih prispevkov in zanimivih vsebin, ki bodo širili naša obzorja.

Naj na koncu zapišem še preprosto, a čarobno željo, da bo leto, ki prihaja, polno veselih dni in ljudi, ki vam prinašajo zadovoljstvo in srečo. Vse najlepše v 2017!

doc. dr. Nina Kočevar Glavač, glavna urednica Farmacevtskega vestnika

Recenzenti:

asist. dr. Alenka Horvat Ledinek • doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk • prof. dr. Aleš Mrhar • Ana Banović
dr. Andrijana Tivadar • doc. dr. Barbara Salobir • prof. dr. Borut Štrukelj • mag. Boštjan Guštin
dr. Boštjan Martinc • izr. prof. dr. Damjan Janeš • dr. Damjana Zupančič Božič • Demetrij Petrica • dr. Igor Legen
doc. dr. Igor Locatelli • Janez Toni • prof. dr. Janja Marc • prof. dr. Julijana Kristl • doc. dr. Jurij Trontelj
Karmen Bončina • mag. Klemen Grabljevec • izr. prof. dr. Leja Dolenc Grošelj • doc. dr. Lovro Žiberna
Maja Ebert Moltara • Maja Jošt • mag. Maja Petre • prof. dr. Marija Bogataj • prof. dr. Marija Sollner Dolenc
dr. Marjeta Tomažič • izr. prof. dr. Marko Anderluh • dr. Matej Pavli • izr. prof. dr. Matjaž Jeras
asist. mag. Mateja Lopuh • asist. dr. Matevž Luštrik • mag. Matjaž Tuš • Mija Tršinar • doc. dr. Mirjam Gosenca
prof. dr. Mirjana Gašperlin • izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos • prof. dr. Mojca Kržan • dr. Nanča Čebren Lipovec
asist. dr. Nejc Horvat • prim. doc. dr. Nevenka Krčevski Škvarč • doc. dr. Nina Kočevar Glavač
mag. Nina Pisk • doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar • doc. dr. Petra Kocbek • doc. dr. Polonca Ferk
izr. prof. dr. Rok Dreu • dr. Rok Šibanc • dr. Simon Kukec • Simona Mitrovič • prim. mag. Slavica Lahajnar Čavlovič
Tanja Tomšič • doc. dr. Tomaž Bratkovič • izr. prof. dr. Tomaž Vovk • prof. dr. Vladka Čurin-Šerbec
dr. Zoran Lavrič • doc. dr. Žiga Jakopin

RAZPIS ZA PODELITEV DRUŠTVENIH PRIZNANJ V LETU 2017

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj objavlja razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2017. Podružnice in sekcije prijavijo kandidate skladno z določili Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj najkasneje do **31. januarja 2017.**

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 presejal svoje obveznosti, ki izhajajo iz opisa del in nalog delovnega mesta, ki ga zaseda. Predlogi morajo biti pripravljene na obrazcih, ki so sestavni del Pravilnika. 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 tajništvo Slovenskega farmacevtskega društva **najkasneje do 31. januarja 2017.**

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

STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

Ali sledimo spremembam v farmakovigilančni zakonodaji? / <i>Are we up to date with changes in pharmacovigilance legislation?</i> (Plečnik M, Istenič KZ)	3
Farmakovigilančne inšpekcije / <i>Pharmacovigilance inspections</i> (Plečnik M, Istenič KZ)	8
Lekarniški račun Domenica Amadorija za grofa Wolfganga Engelberta Auersperga, izstavljen 1670 v Ljubljani / <i>The apothecaries bill by Domenico Amadori issued for count Wolfgang Engelbert Auersperg in 1670 in Ljubljana</i> (Krbavčič A)	12
Sledi profesorice dr. Saše Baumgartner v farmaciji (Kristl J)	215
Uveljavljanje slovenske farmacevtsko-tehnološke terminologije / <i>Enforcement of Slovenian pharmaceutical-technological terminology</i> (Gašperlin M, Šmid Korbar J)	221
Majhne skrivnosti sodobnega celjenja ran / <i>Tiny secrets of modern wound healing</i> (Rošic Danko R)	227
Clinical neurology of Huntington's disease: a practical approach / <i>Klinična nevrologija Huntingtonove bolezni: praktični pristop</i> (Kobal J)	369
Gensko zdravljenje Huntingtonove bolezni / <i>Gene therapy for Huntington's disease</i> (Avsec D, Flegar I)	374
Doktor Janez Krizostom Pollini, ljubljanski mestni zdravnik, in njegovo tajno antivenerično zdravilo Decoctum Pollini / <i>Doctor Joannes Chrisostom Pollini, a municipal physician of Ljubljana, and his antivenereal medicament Decoctum Pollini</i> (Krbavčič A)	380

ORIGINALNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

Nadzor kakovosti filtriranih eritrocitnih pripravkov v obdobju 2010–2014 / <i>Quality control of filtered red blood cell components in the period 2010–2014</i> (Perbil Lazič K, Šega M, Lokar L)	19
Implementacija avtomatiziranega testnega sistema testiranja pirogenosti v bolnišnični proizvodnji parenteralnih raztopin / <i>The implementation of the automatic test system for pyrogenicity testing in hospital parenteral production</i> (Tršan M, Srčič S)	25
Kratek opis nevromodulatornega zdravljenja vztrajajoče bolečine po operaciji ledvene hrbtenice / <i>Neuromodulatory Treatment of Failed Back Surgery Syndrome in Brief</i> (Velnar T, Zaletel M, Strojnik T)	38
Uporaba protibolečinskih zdravil, ki so dostopna brez recepta v lekarni, med odraslo populacijo v Sloveniji / <i>Use of over-the-counter analgesics among the adult Slovenian population</i> (Banovič A, Pisk N, Rijavec N, Gjerek J)	340

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

Zgodovina uporabe konoplje in kanabinoidov / <i>History of cannabis and cannabinoids use</i> (Kočevar Glavač N)	63
--	----



Potencialni učinki kanabinoidov / <i>Potential effects of cannabinoids</i> (Štrukelj B)	69
Uporaba kanabinoidov pri bolečini / <i>Cannabinoids in Pain Management</i> (Požlep G, Vintar N)	74
Uporabo kanabinoidov v onkologiji / <i>The role of cannabinoids in oncology</i> (Červek JA, Červek M)	80
Magistralni pripravki s kanabinoidi z vidika tehnologije / <i>Extemporaneous preparations with cannabinoids in terms of technology</i> (Mitrovič S)	87
Regulatorni vidik predpisovanja kanabinoidov / <i>Prescribing of cannabinoids – a regulatory view</i> (Čufar A)	91
Konflikt med znanstveno utemeljeno uporabo konoplje v medicinske namene in politično ideologijo / <i>The conflict between use of cannabis for medical purposes and political ideology</i> (Nolimal D)	97
Visceralna debelost: prijemališče zdravljenja metaboličnega sindroma / <i>Visceral adiposity: target for the manegement of the metabolic syndrome</i> (Jensterle Sever M, Janež A)	105
Novosti v zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 / <i>Novelties in Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes</i> (Martinc B)	117
Molekularni mehanizmi nastanka debelosti s poudarkom na vlogi sistema renin-angiotenzin-aldosteron / <i>Molecular mechanisms of obesity with emphasis on the role of the renin-angiotensin-aldosterone system</i> (Černe D)	127
Novosti v zdravljenju hiperholesterolemije in arterijske hipertenzije / <i>Recent advances in the treatment of dyslipidaemia and arterial hypertension</i> (Hanžel J, Šabovič M)	134
Vloga farmacevta pri optimizaciji terapije z antihipertenzivi / <i>The role of a pharmacist in optimizing antihypertensive drug therapy</i> (Koder B)	141
Priložnosti in izzivi vezani na novo skupino zdravil (PCSK9) za zniževanje LDL holesterola / <i>The PCSK9 inhibitors - a novel therapeutic target for hypercholesterolemia: Opportunities and challenges</i> (Locatelli I, Janžič, Marđetko N, Janežič, Detiček A, Kos M)	151
Optimizacija zdravljenja z nekaterimi zdravili v sklopu metaboličnega sindroma / <i>Optimization of the treatment with certain medications in metabolic syndrome</i> (Jošt M)	159
Nefarmakološki ukrepi v preventivi metaboličnega sindroma / <i>Non-pharmacological interventions in the prevention of metabolic syndrome</i> (Kozjek Rotovnik N)	167
Multipla skleroza / <i>Multiple sclerosis</i> (Šega Jazbec S)	174
Mišične distrofije / <i>Muscular dystrophies</i> (Zidar J)	179
Pljučna hipertenzija / <i>Pulmonary hypertension</i> (Marčun R)	186
Celiakija in laktozna intoleranca / <i>Celiac disease and lactose intolerance</i> (Lunder M)	193
Razpoložljivost zdravil za zdravljenje redkih bolezni v Sloveniji / <i>Availability of medicines for rare diseases in Slovenia</i> (Detiček A, Čačilo T, Janžič A, Locatelli I, Kos M)	200
Pomen razvoja alternativnih metod za testiranje sproščanja zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem / <i>The Importance of developing the alternative methods for testing the drug dissolution from extended release formulations</i> (Hribar M, Bogataj M, Klančar U)	235
Vpliv motilitete želodca na prehod farmacevtskih oblik / <i>Influence of gastric motility on the transit of dosage forms</i> (Krese A, Mrhar A, Bogataj M)	242
Pomen magnetnoresonančnih metod pri raziskavah ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem & / <i>Role of magnetic resonance methods in the research of the matrix tablets with controlled release</i> (Mikac U, Sepe A, Kristl J)	249



Hidrofilne ogrodne tablete s prirejenim sproščanjem na osnovi izbranih naravnih polimerov / <i>Hydrophilic matrix tablets with controlled release based on selected natural polymers</i> (Pavli M, Kogej K, Vrečer F)	257
Fizikalne lastnosti polimerov v farmaciji – ali jih poznamo? / <i>Physical properties of polymers used in pharmacy – do we really know them?</i> (Draksler P, Lamešič D, Janković B)	265
S funkcionalnostjo povezane lastnosti hipromeloze kot tvorilca hidrofilnih ogrodnih tablet / <i>Functionality-related characteristics of hypromellose used as a matrix forming agent</i> (Devjak Novak S, Košir D, Vrečer F)	273
Pomen stisljivosti zmesi za tabletiranje za učinkovite industrijske procese / <i>Importance of tableting mixture compression behaviour for efficient manufacturing processes</i> (Šantl M, Vrečer F)	281
Peroralni pulzirajoči dostavni sistemi / <i>Oral pulsatile therapeutic systems</i> (Planinšek O)	289
Nanosuspenzije – aktualni nanotehnološki pristop za izdelavo farmacevtskih oblik s težko topnimi učinkovinami? / <i>Nanosuspensions – an up-to-date nanotechnological-based approach for formulation of dosage forms with poorly soluble drugs?</i> (Kocbek P)	296
Nanozdravila za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni / <i>Nanomedicines for local treatment of periodontal disease</i> (Zupančič Š, Kocbek P, Petelin M, Kristl J)	303
Polielektrolitni kompleksi kot osnova za načrtovanje novih nanodelcev in nanooblog / <i>Polyelectrolyte complexes as a platform for development of novel nanoparticles and nanocoatings</i> (Mirtič J, Kogej K, Gašperlin M, Lapanje A, Kristl J)	310
Nevropatska bolečina / <i>Neuropathic pain</i> (Vintar N)	321
Zdravila za zdravljenje nevropatske bolečine / <i>The pharmacological treatment of neuropathic pain</i> (Urbanc M, Locatelli I)	325
Balonske samokrčljive črpalke za podkožno aplikacijo zdravil / <i>Elastomeric pumps for subcutaneous drug administration</i> (Tavčar P)	333
Implementacija smernice ICH M7 in vrednotenje genotoksičnih nečistot / <i>Implementation of the ICH M7 guideline and evaluation of genotoxic impurities</i> (Schmidt J, Peterlin Mašič L)	386
Pregled učinkovin v zdravljenju ran / <i>An overview of drugs in the treatment of wounds</i> (Anderluh M)	397
Imunogenost zaviralcev dejavnika tumorske nekroze alfa: nevarnost ali priložnost na področju zdravljenja vnetnih revmatičnih bolezni? / <i>Immunogenicity of tumour necrosis factor alpha inhibitors: danger or opportunity in the treatment of inflammatory rheumatic diseases?</i> (Ogrič M, Praprotnik S, Sodin-Šemrl S, Čučnik S)	405

KRATKI ZNANSTVENI ČLANKI – SHORT SCIENTIFIC ARTICLES

Lajšanje bolečine z magistralnimi pripravki za dermalno uporabo (Gabrovšek P)	349
Zdravljenje bolečine onkološkega bolnika – primer v zunanji lekarni (Štubljar M)	353

NOVI DOKTORJI ZNANOSTI – NEW DOCTORS OF SCIENCE

44

OSEBNE VESTI – PERSONAL NEWS

Prof. dr. Aleš Krbavčič, 80-letnik	53
V spomin Milošu Kovačiču	55
Moji spomini na Miloša Kovačiča	57
V spomin Alenki Supe	59
In memoriam Marta Hari	366
V spomin Marku Dolžanu	416

DRUŠTVENE VESTI – ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

41. skupščina SFD in Priznanja SFD 2016	357
Izpopolnjevalni tečaj iz klasične homeopatije	415
Letno kazalo	418



INDEX AVTORJEV / INDEX OF AUTHORS

Abazović M	319	Locatelli I	15, 200, 325
Anderluh M	61, 397	Lokar L	19
Avsec D	374	Lovišček L	59
Banović A	340	Lunder M	193
Blažič L	413	Marčun R	186
Bogataj M	235, 242	Mardetko N	151
Borštnar J	416	Martinc B	117
Čačilo T	200	Mikac U	249
Černe D	127	Mirtič J	310
Červek JA	80	Mitrovič S	87
Červek M	80	Mrhar A	242
Čučnik S	405	Nolimal D	97
Čufar A	91	Ogrič M	405
Detiček A	151, 200	Pavli M	257
Devjak Novak S	273	Perbil Lazič K	19
Draksler P	265	Petelin M	303
Dreu R	213	Peterlin Mašič L	386
Flegar I	374	Pisk N	340
Gabrovšek P	349	Planinšek O	289
Gašperlin M	221, 310	Plečnik M	3, 8
Gjerek J	340	Požlep G	74
Glas Kl	413	Praprotnik S	405
Hanžel J	134	Rijavec N	340
Hočevar U	413	Rošic Danko R	227
Hribar M	235	Rustja E	57
Istenič KZ	3,8	Schmidt J	386
Janež A	105	Sepe A	249
Janežič A	151	Sodin-Šemrl S	405
Janković B	265	Srčič S	25
Janžič A	151, 200	Strojnik T	38
Jensterle Sever M	105	Šabovič M	134
Jošt M	159	Šantl M	281
Kerec Kos M	319	Šega Jazbec S	174
Klančar U	235	Šega M	19
Kobal J	369	Šmid Korbar J	221
Kocbek P	296, 303	Štrukelj B	1, 61, 69, 213, 319, 365
Kočevar Glavač N	63, 44	Štubljar M	353
Koder B	141	Tavčar P	333
Kogej K	257, 310	Terčič M	44
Kos M	151, 200	Tršan M	25
Košir D	273	Urbanc M	325
Kozjek F	53, 55	Velnar T	38
Kozjek Rotovnik N	167	Vintar N	321, 74
Krbavčič A12,	380	Vovk To	63
Krese A	242	Vrečer F	257, 273, 281
Kristl J	213, 215, 249, 303, 310	Zaletel M	38
Lamešič D	265	Zidar J	179
Lapanje A	310	Zupančič Š	303
Lešnjak M	366	Zvonar Pobirk A	213





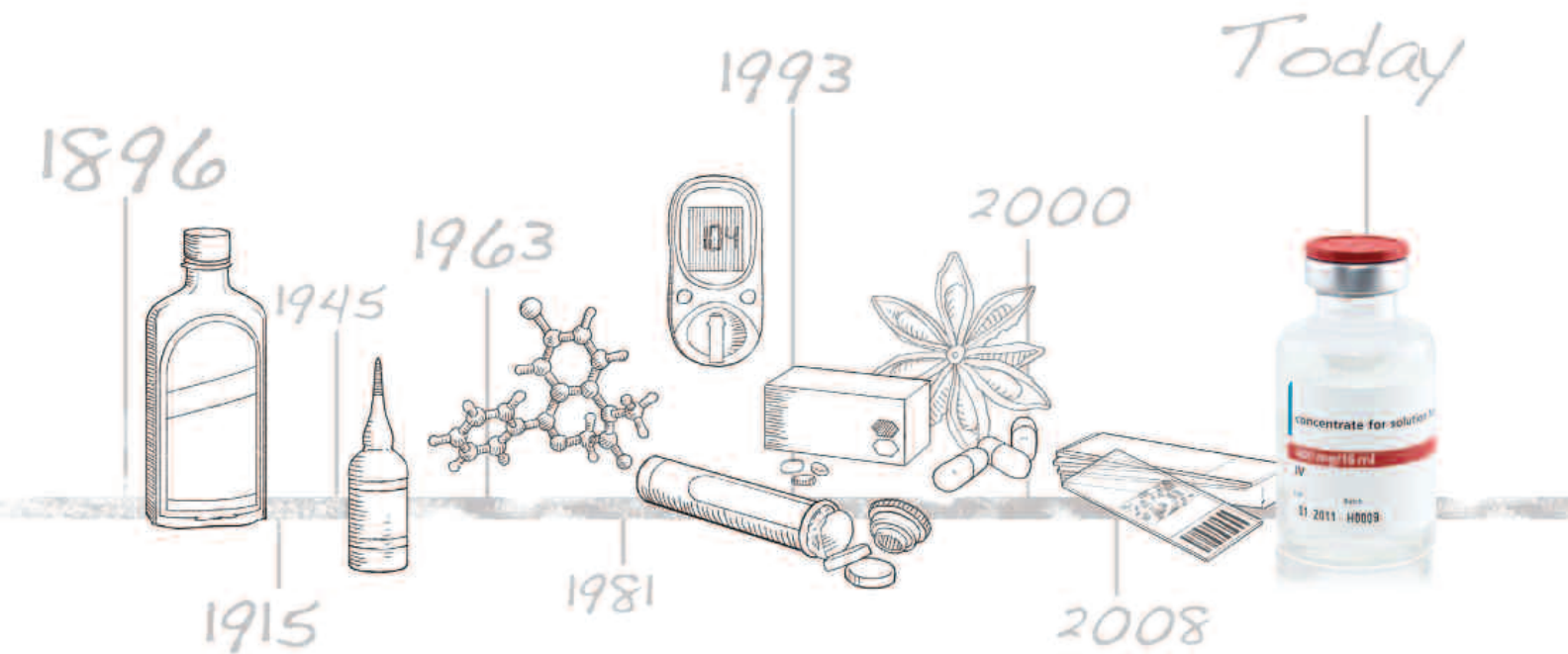
Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovnica 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 prihodnje!

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si





*Za boljše življenje.
Že vse od 1896.*

Tradicija napredka znanosti in
medicine. Včeraj, danes in jutri.

