

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 3





Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovska družba 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 lekarne 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!

www.kemofarmacija.si





ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GOSTUJOČA UREDNIKA:
Tomaž Vovk
Marko Anderluh

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočever 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 Plisk
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.

Brez pisnega dovoljenja uredništva Farmacevtskega vestnika so prepovedani reproduciranje, distribuiranje, javna priobčitev, predelava in kakršna koli druga uporaba avtorskega dela ali njegovih delov v kakršnem koli obsegu in postopku kot tudi tiskanje in predelava elektronske oblike.

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

UVODNIK

V zadnjih nekaj mesecih se zopet soočamo s stalnim pomanjkanjem sredstev za vzdržnost javnega zdravstva. Kje dobiti dodatna finančna sredstva za ohranitev vsaj takega nivoja, kot ga trenutno imamo? In seveda bo zopet najlažje usmeriti prst v zdravila in farmacevtsko industrijo. A tudi na področju zdravil bistvenih rezerv več ni. In vendar je rešitev, ki pa je odgovorni na Ministrstvu za finance (!) nočejo sprevideti. Še več, posredno so odgovorni za slabše zdravje slovenskega prebivalstva. Rešitev se skriva v trošarini na tobakne izdelke in alkohol. Skupaj se letno nabere za okoli 550 milijonov evrov trošarinskih sredstev, ki pa poniknejo v splošnem proračunu. Če bi vsaj eno tretjino teh sredstev načrtno namenili za dodatno financiranje zdravstva, bi pokrili večino manjkajočega denarja. A sprevrženost je še večja: medtem ko si Ministrstvo za zdravje z obsežnimi akcijami prizadeva za zmanjševanje kajenja in pitja alkoholnih pijač, pa Ministrstvo za finance ne dovoli zvišanja trošarin, ker se bo posledično manj denarja zaradi zmanjšanja števila kadilcev steklo v državni proračun! Način prerazporeditve dela trošarin v specifični proračun za zdravstvo je pod vodstvom dr. Józsefa Bodrogija uspel na Madžarskem, nekaj podobnega so naredili tudi v Romuniji, torej v dveh državah EU, kjer je bruto družbeni proizvod manjši kot v Sloveniji. Mogoče se pa lahko tudi farmacevti aktivneje vključimo v predlagane aktivnosti?

V tokratni številki Farmacevtskega vestnika si boste lahko prebrali prispevek o uporabi zdravilnih rastlin pri zdravljenju živali. Skupina raziskovalcev pod vodstvom prof. dr. Matjaža Jerasa je ugotavljala vpliv kronične urtikarije na kakovost življenja bolnikov, spoznali bomo alternativne poti zdravljenja raka z zaviralci poli-ADR polimeraze kakor tudi možnost vnosa genskih zdravilnih učinkovin s pomočjo virusnih vektorjev. Kolegica Urška Lučev bo predstavila sodobna zdravila za zdravljenje multiple skleroze, spoznali bomo tudi zaviralce in stabilizatorje interakcij med proteini. Posebej pa velja omeniti še povzetek raziskovalnega dela, ki ga je o uporabi mezenhimskih matičnih celic pripravila v obliki preglednega znanstvenega članka dr. Janja Zupan s sodelavci. Članek temelji na raziskovalnem delu, ki ga je Janja Zupan opravila v času podoktorskega raziskovanja na Univerzi v Aberdeenu in izsledke raziskav objavila skupaj s sodelavci v prestižni znanstveni reviji Nature Communications. V nadaljevanju si boste lahko ogledali utrinke s tradicionalnega simpozija SFD v Portorožu in podelitve letošnjih nagrad.

Verjamem, da vam bo nudil Farmacevtski vestnik v vročih poletnih dnevih prijetno strokovno branje, saj imamo v času počitnic več časa. Izkoristimo ga tudi za dopolnitev našega strokovnega znanja.

*Lepe dopustniške dni želim.
Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Odgovorni urednik*



VSEBINA / CONTENT

STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

- 187 Miha Munda, Lucija Lipičnik Rozman
Uporaba zdravilnih rastlin pri zdravljenju živali
The use of medicinal plants in the treatment of animals

ORIGINALNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 194 Urška Kramberger, Nada Kecelj Leskovec, Matjaž Jeras
Kronična urtikarija in njen vpliv na kakovost življenja bolnikov
Chronic urticaria and its influence on patients' quality of life

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 203 Saša Kenig
Zaviralci poli (adenozin difosfat-riboza) polimeraze pri zdravljenju raka
Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy
- 210 Andreja Šink
Gensko zdravljenje z virusnimi vektorji
Viral vectors in gene therapy
- 216 Urška Lučev
Sodobna zdravila za zdravljenje multiple skleroze in trendi v prihodnosti
Modern medicines for the treatment of multiple sclerosis and future trends
- 224 Kaja Bergant, Andrej Perdih
Zaviralci in stabilizatorji interakcij med proteini
Inhibitors and stabilizers of protein-protein interactions
- 234 Janja Zupan, Klemen Čamernik, Matjaž Jeras, Ariana Barlič, Matej Drobnič, Janja Marc
Mezenhimske matične celice: uporaba in potencial za zdravljenje ter diagnostiko mišično-skeletnih boleznih
Mesenchymal stem cells: applications and potential in treatment and diagnosis of musculoskeletal disorders

DRUŠTVENE VESTI – ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

- 249 42. skupščina SFD
- 251 Podelitev društvenih priznanj v letu 2017
- 262 V spomin Velislavi Zalokar

UPORABA ZDRAVILNIH RASTLIN PRI ZDRAVLJENJU ŽIVALI

THE USE OF MEDICINAL PLANTS IN THE TREATMENT OF ANIMALS

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Miha Munda, dr. vet.med.¹
Lucija Lipičnik Rozman, mag. farm.²

¹ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta
Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo
Taborska 8, 2000 MARIBOR

² Gregorčičeva 21A, 2000 MARIBOR

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: miha.munda@um.si

1 UPORABA ZDRAVILNIH RASTLIN PRI ZDRAVLJENJU ŽIVALI

V pradžini je imel človek sprva malo izbire farmakološke terapije, kadar je zbolel in še pogosteje, kadar se je poškodoval (1). Pri posnemanju narave je lahko v omejenem okviru opazoval, kako so si v primeru bolezni ali poškodbe pomagale divje živali, še več pa je spoznaval kasneje, ko

POVZETEK

Uporaba zdravilnih rastlin je za preprečevanje in zdravljenje bolezni razširjena vse od pradavnine pa do danes. Človek se je z opazovanjem divjih živali učil uporabe zdravilnih rastlin zase in za živali v ujetništvu. Zdravilne rastline so igrale tudi pomembno vlogo pri razvoju sinteznih zdravil in tako so bile osnova za hitrejši razvoj moderne medicine. Danes pri zdravljenju živali lahko uporabljamo različne zdravilne rastline. Čeprav na splošno velja mnenje, da je večina zdravilnih rastlin varnih, če jih uporabljamo v skladu z navodili, so raziskave varnosti in možnosti interakcij potrebne tudi pri živalih.

KLJUČNE BESEDE:

bolezni, učinkovitost, varnost, zdravilne rastline, živali

ABSTRACT

The use of medicinal plants for the prevention and treatment of diseases is increasingly extended. By the observation of wild animals, the prehistoric human learned about the use of medicinal herbs for himself and for animals in captivity. In the past, medicinal herbs were very important for the development of synthetic drugs and were also the starting point for quicker development of modern medicine. Today, different medicinal plants can be used for animal treatment. Although many people believe that medicinal plants are safe for use, more research about safety and possible interactions with others substances are necessary.

KEY WORDS:

animals, diseases, efficiency, medicinal plants, safety

je postal rejec domačih živali. Živali so bile na pašnikih prepuščene same sebi. Po nagonu so izbirale tiste rastline, ki so jim bile najbolj koristne. Ta spoznanja je prvinski človek, sprva eksperimentalno, kasneje pa izkustveno, prenašal nase in tudi na živali v ujetništvu.

Skozi vso zgodovino človeštva, pri vseh živinorejskih kulturah, je bila uporaba zdravilnih rastlin za preprečevanje in zdravljenje bolezni živali precej razvita. Dokazi o izkustvenih koristnih zdravilnih učinkih so vidni v redni uporabi zdravilnih rastlin. Prav tako dokazuje učinkovitost zdravilnih rastlin



kasnejši razvoj modernih sinteznih zdravil, prav z izolacijo kemijskih spojin iz zdravilnih rastlin (2). Kemijske spojine, izolirane iz zdravilnih rastlin, so tako služile kot začetni material za sintezo mnogih pomembnih zdravilnih učinkovin, ki jih uporabljamo danes (3, 4). Mnogo modernih zdravilnih učinkovin pa so sintetizirali ravno na podlagi rezultatov študij mehanizma delovanja kemijskih spojin, izoliranih iz zdravilnih rastlin (5, 6).

Ljudje so rastline v preteklosti povezovali z magičnimi silami, postopoma pa so se naučili odkrivati tudi njihove farmakološke lastnosti (7). Izsledki raziskav sodobnih paleobotanikov, ki proučujejo fosilne ostanke rastlin, potrjujejo izročila ljudske medicine, ki so se prenašala iz roda v rod. Tudi ostanki semen, ohranjeni v starih grobiščih, dokazujejo, kar so o zdravilnih rastlinah svojega časa zapisali antični ter srednjeveški zdravniki, zdravilci in zeliščarji (8).

Živali nagonsko vedo, kdaj v njihovi hrani primanjkuje nekaterih vitaminov in mikro- ter makroelementov, zato se selijo drugam, da bi jih nadomestile. Zlasti izbrano jedo določene rastline oz. njihove dele, kadar so bolne. Labodi s poškodovanimi vratovi na primer pogosto iščejo vrbove liste in vejice, v katerih so snovi (derivati salicilne kisline), ki blažijo bolečine. Jazbeci, ki jih napadejo uši, si izkopljejo luknje pod bezgom (*Sambucus nigra*), ki ima v koreninah kompleksne insekticidne proteinske snovi (9). Z raziskovanjem tega področja se ukvarja zoofarmakognozija. Pasmepsov (npr. sibirski haski), ki so manj genetsko modificirane oz. »bližje volku« (10), torej po svoji naravi bližje divjemu življenju, se v naravnem okolju zelo dobro znajdejo pri izbiri ustreznih zdravilnih rastlin. Zlasti je to izrazito, kadar imajo prebavne motnje in kadar opravljajo »spomladansko čiščenje«. Takrat žvečijo izbrane trave. Zanimivo je, kako pes sredi travnika išče prav posebne vrste trav. Če smo pozorni, vidimo, da neposredno po uživanju nekaterih ostrolistnih trav pes bljuva, po nekaterih drugih travah pa ne – verjetno, da v tem drugem primeru trave prebavi oz. da preidejo črevesni sistem, verjetno za namene izkoriščanja vitaminov, grenčin in vlaknin (11). Mnogokrat gre v tem primeru za čiščenje črevesja, ki je očitno opazno nekaj ur po zaužitju trav, kot mehkejše blato in pred tem »kruljenje« v prebavilih psa.

Podobno je pri drugih živalih, kadar začutijo pomanjkanje bistvene sestavine v hrani. Te živali bodo prehodile velike razdalje, da bi našle slano jezero ali rastline, ki vsebujejo snovi, ki jih pogrešajo (12). Ugotovili so, da ovce najprej jedo koristne vrste trav, v katerih so esencialne snovi. Šele ko te lokacije izčrpajo, se kasneje podajo na druge

pašnike, kjer si potešijo lakoto s travo, v kateri ni vseh potrebnih sestavin. Najbolj nenavaden primer je pogin živine zaradi skrivnostne epidemije, do katere je prišlo na pašnikih v Južni Ameriki. Pogina se je rešila čreda živali, ki je jedla lubje in listje drevesa, v katerega deblo je bil zabiti bakren žebelj. Kasneje so ugotovili, da je epidemijo povzročilo pomanjkanje bakra (12).

Čeprav na splošno velja, da so zdravilne rastline varne, če jih uporabljamo v skladu z navodili, jih je nekaj strupenih in bi se jih morali zavestno izogibati, saj so zlahka dosegljive za uporabo (4). Njihova toksičnost včasih raste sorazmerno z zaužito količino, kar predstavlja stalni problem pri določanju pravilnega odmerjanja ob uporabi za živali, glede na variacije njihove telesne mase (13). Izogibati bi se tudi morali uporabi zdravilnih rastlin in pripravkov, ki jih vsebujejo, ki imajo močno izražene neželene učinke pri zlorabi (4). V tem primeru je visoka možnost zlorabe teh pripravkov zlasti pri osebah, ki bi jih namesto za žival uporabili zase, npr. kot prepovedano drogo. Le malo je raziskav na področju potencialnih neželenih učinkov, ki so povezani s povečano uporabo zdravilnih rastlin oziroma s prevelikim odmerjanjem zdravilnih rastlin (4). Skrb vzbujajoče je dejstvo, da ni nadzora nad kakovostjo pripravkov iz zdravilnih rastlin, ki niso registrirani in se uporabljajo neuradno. Vendar to ni samo težava pri zdravilnih rastlinah za živali, podobno je pri izdelkih za ljudi. Nenadzorovana prodaja, zlasti pa nepopolna navodila za uporabo pripravkov iz zdravilnih rastlin pri živalih povečajo možnost pojavljanja neželenih učinkov. Prav tako je skrb vzbujajoče tudi dejstvo, da vse potencialne interakcije med zdravilnimi rastlinami oziroma med zdravilnimi rastlinami in sintezniimi učinkovinami ter možni neželeni učinki niso dovolj raziskani v občutljivih populacijah ljudi, še manj pri živalih (4).

2 PREGLED NAJPOGOSTEJŠIH ZDRAVILNIH RASTLIN ZA ZDRAVLJENJE ŽIVALI

Obratno kakor pri fazah preizkušanja zdravila za humano uporabo, kjer pripravek najprej preizkusimo na laboratorijskih živalih, kasneje pa na ljudeh, so izkušnje pri zdravljenju živali z zdravilnimi rastlinami revnejše kakor pa pri zdravljenju ljudi z istimi pripravki, zato v večini primerov na začetku zgolj privzamemo, da bo zdravilna rastlina pri živali najverjetneje podobno učinkovala kakor pri človeku. Študij, ki bi to nedvoumno potrdile, je malo, za nekatere rastline pa jih

ni (14). V članku navedeni nameni uporabe večinoma temeljijo na tradicionalnih izkušnjah uporabe pri ljudeh, zato niso popolni, še manj na živalih dokazani oz. znanstveno potrjeni. Opisi uporabe so namenjeni zgolj za laično uporabo. Odmerjanja niso standardizirana, to pri domači uporabi ni mogoče.

Pri zdravljenju živali največkrat posežemo po naslednjih zdravilnih rastlinah (8, 15-28):

Aloe vera, *Aloe barbadensis* (*A. vera*)

Uporabni del je sredica mesnatega lista – parenhim, ki ima videz gela. Liste rastlin, starih dve do tri leta, nabereemo in previdno izrežemo sredico lista. Pri tem pazimo, da ne izcedimo soka iz žleznihih kanalov na robu lista, ki vsebuje dražeče antranoide. Pripravki so namenjeni zlasti negi kože. *Aloe vera* zdravi in celi kožna vnetja, praske in kožne poškodbe, oži razpoke na blazinicah tačk in spodbudi regeneracijo ran. Gel izboljšuje tudi kožni imunski odziv, blaži kožna vnetja ter učinkuje kot antibiotik oz. razkužilo. Izboljša strukturo dlake in kožuha.

Škrlatni ameriški slamnik, *Echinacea purpurea*

Za zdravilno uporabo so primerne korenine, pa tudi zeleni del rastline. Uporabljamo ga v obliki izvlečka (tinkture) ali poparka (zdravilnega čaja). Je razkužilo oz. antiseptik za rane. Preprečuje vnetje in okužbe odprtih ran in pospeši njihovo celjenje. Dobro se obnese pri zdravljenju abscesov in vnetih površinskih ran, ki se slabo celijo. Pri peroralnem vnosu krepi splošno odpornost in učinkuje kot antiseptik in protivnetno sredstvo za sečila.

Navadna arnika, *Arnica montana*

Za zdravilno uporabo so primerna posušena socvetja. Uporabljamo jo v obliki mazila ali gela, ki vsebuje tinkturo, v obliki oljnega izvlečka ali v obliki razredčene tinkture. Blaži bolečine, pospeši celjenje poškodb okončin, predvsem zvinov in izpahov sklepov. Odpravlja modrice. Preprečuje razvoj vnetja in edema. Vsebovani laktoni zavirajo izliv krvi pod kožo in s tem preprečujejo vnetje okoliškega tkiva. Živalim jo dajemo tudi zoper črevesne krče in neješčnost. Notranja uporaba arnike je kontraindicirana, saj je zaradi seskviterpenskiih laktonov lahko smrtno nevarna.

Baldrijan (zdravilna špajka), *Valeriana officinalis*

Za zdravilno uporabo so primerni posušena korenika in pripravki iz nje, zlasti tinkture, ki jih lahko pripravimo tudi z raztapljanjem suhega izvlečka v razredčenem etanolu. Baldrijan učinkuje na centralni živčni sistem blažilno, pomirjevalno, sprošča. Umirja tudi mišične krče.

Bazilika, *Ocimum basilicum*

Uporabni deli so listi in cvetovi, ki vsebujejo eterično olje in čreslovine. Najpogosteje baziliko uporabljamo v obliki poparka, prevretka in mazila. Bazilika blaži krče, zlasti v želodcu in črevesju ter deluje zoper slab zadah živali. Ureja prebavo in spodbuja tek ter deluje zoper vetrove, napenjanje in zaprtje. Zaradi adstringentnih lastnosti učinkuje tudi pri zunanji uporabi (celi rane in vreznine). Za slednji namen uporabljamo alkoholne izvlečke svežih cvetov.

Brusnica, *Vaccinium vitis-idaea*

Zdravilni deli rastline so plodovi, pa tudi listi. Najpogosteje jo uporabljamo v obliki zdravilnega čaja. Arbutin je odgovoren za učinkovanje zoper vnetje ledvičnega meha in za zdravljenje kroničnega katarja mehurja in sečnice. Plodovi odpravljajo neješčnost in učinkujejo zoper drisko. Pospešujejo tudi izločanje seča (preprečujejo zadrževanje bakterij v sečnem mehurju).

Navadna buča, *Cucurbita pepo*

Za zdravilno uporabo so primerna zreła posušena bučna semena vrtné buče ali vzgojenih sort. Semena vsebujejo trigliceride, fitosterole, beljakovine, flavolignane in sladkorje. Tako iz semen pridobivajo tudi olje, ki ga prav tako uporabljamo v zdravstvene namene, npr. za rane (zlasti opekline), saj deluje emolientno. Pripravke uporabljamo v obliki kapsul in tablet s suhim izvlečkom bučnih semen ali njihovega olja. Bučno seme, zaužito kot hrana, v črevesu deluje proti črevesnim zajedalcem (gliste in drugi paraziti). Buče zaradi protivnetnega delovanja uporabljamo tudi za zdravljenje bolezni ledvic, mehurja in sečevoda.

Pravi cimetovec, *Cinnamomum verum*

Za zdravilno uporabo je primerna posušena skorja mladih poganjkov cimetovca, ki poženejo iz prirezane rastline. Najpogosteje jo uporabljamo v obliki zdravilnega čaja. Učinkuje zoper slab zadah (pri ljudeh, manj relevantno pri živalih), napihnenost in vetrove (notranja uporaba). Zunanje čaj uporabljamo za čiščenje ran.

Limonska trava, *Cymbopogon citratus*

Za zdravilno uporabo so primerni mladi listi. Uporabljamo jih sveže ali posušene, v obliki zdravilnega čaja ali eteričnega olja. Eterično olje deluje antiseptično in deodorira, odganja bolhe ter deluje protibakterijsko. Sprošča želodec in črevesje, pomaga proti napenjanju in deluje kot pomirjevalo.



Citronka, *Aloysia triphylla*

Uporabni deli rastline so listi, iz katerih pridobivamo eterično olje, ki ga uporabljamo kot pomirjevalo. Liste uporabljamo tudi v obliki poparka. Citronka tudi umirja krče, deluje zoper prebavne motnje, napenjanje in drisko. Uničuje bakterije in je učinkovita pri zatiranju bolh in mrčesa (kot repelent).

Čajna mirta, *Melaleuca alternifolia*

Uporabni deli čajne mirte so listi, iz katerih pripravljamo zdravilni čaj, še pogosteje pa jih destiliramo za pridobivanje eteričnega olja, ki ga uporabljamo pri kožnih boleznih kot protiglivično in protibakterijsko sredstvo.

Česen, *Allium sativum*

Uporabni del česna je čebula s čebulicami (stroki). Uporabljamo sveže čebulice ali posušene v prahu ter izvlečke in tinkture. Česen ima antiseptični učinek in deluje protivnetno. Odpravlja črevesne zajedavce in uničuje kužne klice. Učinkuje kot razkužilo v prebavilih in dihalih. Velja za naravno sredstvo za odganjanje bolh in ušesnih pršic.

Evkalipt, *Eucalyptus globulus*

Uporabni deli evkalipta so listi. Uporabljamo aromatične liste starejših vej ali eterično olje listov. Iz listov pripravljamo prašek, čaj in tinkturo, iz olja pa sirup, balzam in mazilo. Učinkuje proti žuželkam, odganja bolhe, je repelent. Učinkuje zoper glivične, bakterijske in virusne okužbe kože ter zoper zamašene dihalne poti. Blaži krče, pomiri kašelj.

Navadni gabez, *Symphytum officinale*

Za zdravilno uporabo so primerni sveži ali posušeni listi in korenine in njihovi pripravki. Učinkovine gabeza so allantoin, holin in čreslovine. Na voljo so pripravki v obliki mazil, krem ali gelov. Zunanje jih uporabljamo pri udarninah, nategu, zmečkaninah in zvinih. Spodbuja celjenje kosti, omili kožna vnetja in neguje kožo. Notranje jih uporabljamo pri driski in želodčnih razjedah, vendar moramo opozoriti na možno toksično delovanje zaradi pirolizidinskih alkaloidov.

Glog, *Crataegus* sp.

Uporabni deli so cvetovi, listi in plodovi. Prisotne učinkovine so flavonoidi, oligomerni procianidini, C-glikozidi, triterpeni in biogeni amini. Glogove pripravke uporabljamo v obliki poparka in tinkture, in sicer za krepitev srca, pri težavah s srčnim ritmom, pri omotici in kot pomirjevalo.

Hmelj, *Humulus lupulus*

Za zdravilno uporabo so primerna ženska socvetja. Zunanje uporabljamo pripravke iz hmelja pri ranah, ki se težko celijo,

notranje pa pri zdravljenju težav z živci (pomirjevalni in uspavalni učinek). Pripravke uporabljamo tudi pri spodbujanju delovanja prebavil, grenčine namreč uničujejo bakterije in umirjajo krče. Uporabljamo jih tudi pri vnetju črevesne sluznice in pri boleznih mehurja in ledvic.

Pravi ingver, *Zingiber officinale*

Za zdravilno uporabo je primerna olupljena in posušena korenika. Uporabljamo pripravljena zdravila (kapsule) ali ingverjev prah. Pomiri želodčne težave (živčen, občutljiv želodec; pogosto napenjanje) in preprečuje slab zadah. Pomaga pri vnetju črevesa in lajša mišične krče. Spodbuja imunski sistem. Zaradi ostrega okusa ga je pri živalih težje aplicirati.

Islandski lišaj, *Cetraria Islandica*

Za zdravilno uporabo je primerna cela rastlina. Najpogosteje islandski lišaj uporabljamo v obliki čaja. Blaži kašelj in mehča sluz pri vseh pljučnih boleznih. Učinkuje zoper neješčnost, pri črevesnih boleznih. Uporabljamo ga tudi za posipanje ran.

Navadni komarček, *Foeniculum vulgare*

Za zdravilno uporabo so primerni posušeni plodovi za čaj ali parno kopel. Uporabljamo tudi eterično olje. Blaži krče in spodbuja k izločanju vetrov. Pomaga pri zaprtju. Plodove dodamo k hrani, kadar žival noče jesti. Odpravlja tudi pršice in uši.

Prava kamilica, *Matricaria chamomilla*

Za zdravilno uporabo so primerni sveži ali posušeni cvetni koški kamilice. Uporabljamo jih v obliki čaja, sredstva za izpiranje in grgranje, kopeli in parne kopeli. Blaži in celi srbečico zaradi bolh. Blaži razdražene oči in odpravlja vnetje. Lajša želodčne težave, blaži krče, pomirja želodec, ublaži črevesne krče in odvaja pline. Čisti rane in tvore.

Navadna kumina, *Carum carvi*

Za zdravilno uporabo so primerni plodovi in iz njih pridobljeno eterično olje. Uporabljamo razredčeno eterično olje ali prevretke plodov. Blaži krče in spodbuja k izločanju vetrov; zoper napihnenost. Pomaga tudi pri zadahu.

Kurkuma, *Curcuma longa*

Za zdravilno uporabo so primerne poparjene posušene korenike. Uporabljamo pripravljena zdravila (dražeje, kapsule), razredčeno tinkturo ali čaje. Blaži vnetje in spodbuja celjenje mišic in poškodb sklepov. Zunanja uporaba je za zdravljenje ran.

Navadni lan, *Linum usitatissimum*

Za zdravilno uporabo so primerna posušena zreła semena. Uporabljamo cela, zdrobljena semena, moko ali druge pripravke. Odpravlja zaprtje, zoper trebušne krče in vnetje želodca ali črevesja.

Navadni lapuh, *Tussilago farfara*

Uporabljamo cvetje in liste in jih uporabimo v obliki čaja. Pospeši izkašljevanje, zoper pljučne bolezni. Možno toksično delovanje zaradi pirolizidinskih alkaloidov.

Lučnik, *Verbascum* sp.

Zdravilni deli rastline so cvetovi, listi in korenine. Najpogosteje uporabljamo cvetove in liste v obliki prevretka. Uporabljamo ga za čiščenje zamašenih bronhijev, odpravlja kašelj. Pospeši celjenje ran.

Poljska materina dušica, *Thymus serpyllum*

Zdravilni deli rastline so rastline v cvetju brez korenin. Uporabljamo jo v obliki čaja ali alkoholnega izvlečka. Blaži in celi kožo. Učinkuje proti glivičnim okužbam kože. Uporaba pri prehladu, proti kašlju in črevesnim boleznim, pri želodčnih krčih.

Poprova meta, *Mentha piperita*

Zdravilni deli rastline so listi in cvetoči poganjki, pa tudi eterično olje. Uporabljamo jo v obliki olja poprave mete, čaja, tinkture, raztopine, mazila, vodne kopeli. Blaži kašelj in krče gladke mišičnine. Mehča sluz v dihalih. Odlično deluje pri prebavnih težavah, preprečuje napihnenost in vetrove.

Vrtni ognjič, *Calendula officinalis*

Uporabni deli so posušeni cvetovi. Uporabljamo pripravljena zdravila (mazila), razredčeno tinkturo in prevretke; kot sredstvo za grgranje, obkladke in za čiščenje ran. Blaži bolečine in pospeši celjenje ran, čirov in vnetih oteklin. Blaži in celi srbečico zaradi bolh. Odpravlja vnetje oči in blaži razdražene oči živali.

Dobra misel (origano), *Origanum vulgare*

Zdravilni deli origana so sveži listi in vršički poganjkov. Uporabljamo jih sveže ali v obliki čaja. Deluje protiparazitno in pomaga pri slabem zadahu.

Navadni oves, *Avena sativa*

Uporabni deli so zrna in ovsenica (slama). Oves uporabljamo v obliki čaja ali kot zmleto zrno. Preprečuje zapenko, čisti črevesje, učinkuje proti kašlju ter pomirjujoče deluje na živce.

Pelin, *Artemisia* sp.

Uporabni deli so listi in cvetne glavice. Iz posušene rastline pripravimo čaje, prašek, izvlečke, tinkture in zdravilno vino. Ublaži težave želodca in črevesja.

Navadni peteršilj, *Petroselinum crispum*

Zdravilna je peteršiljeva korenina in plodovi. Plodovi niso samo dobri proti glistam pri psih, zdrobljeni so tudi uspešni pri svinjski rdečici. Pomaga proti napihnenosti in vetrovom. Deluje kot diuretik. Deluje tudi proti zadahu.

Navadni regrat, *Taraxacum officinale*

Uporabni deli so korenina in listi. Pripravimo jih v obliki poparka, izvlečka za pitje in kapsul. Spodbuja žolčnik in celotno prebavo.

Navadni rman, *Achillea millefolium*

Uporabni deli so cvetni koški, nelesnati deli rastline in semena. Uporabljamo jih v obliki tekočega izvlečka, poparka in kopeli. Pomaga ustavljati krvavitve, saj oži pore. Pomirja težave želodca in črevesja, učinkuje zoper napenjanje in krče. Deluje tudi protivnetno.

Navadni rožmarin, *Rosmarinus officinalis*

Uporabni deli so cvetovi in listi, ki jih uporabljamo v obliki poparka ter za pridobivanje eteričnega olja. Učinkuje protivnetno, antiseptično in proti alergijam. Spodbuja celjenje ran. Blaži otekanje, pordelost in bolečine. Odganja bolhe.

Prava sivka, *Lavandula angustifolia*

Uporabni deli so cvetovi in jih uporabljamo v obliki poparka in eteričnega olja. Proti bolham. Uničuje mikrobe in blaži srbenje ter vnetje. Učinkuje zoper glivične okužbe kože.

Toga smetlika, *Euphrasia stricta*

Uporabni deli so nadzemni deli in jo uporabljamo za pripravo prevretkov, tinktur, čajev in losjonov za oči. Pri očesnem katarju, vnetju oči, vneti veznici.

Šentjanževka, *Hypericum perforatum*

Uporabna je cela cvetoča rastlina za pripravo čajev, tinktur in tekočih izvlečkov. Ima antidepresivno učinkovanje

Trpotec, *Plantago* sp.

Uporabni deli so listi in semena. Uporabljamo jih za čaje, pripravljene kot poparke, za tekoče izvlečke in kapsule. Trpotčeva semena so vir vlaknin in nimajo okusa. Pomagajo pri prebavnih težavah. Listi imajo protimikrobno in protivnetno delovanje.

Zelena, *Apium graveolens*

Uporabni deli listi in korenina. Uporabljamo jo lahko tako surovo kot kuhano. Odvaja vodo iz telesa živali.

Navadna zlata rozga, *Solidago virgaurea*

Uporabni deli so nadzemni deli (poganjki, najboljša so stebela z nerazcvetenimi socvetji). Iz posušene zeli pripravljamo čaje oziroma poparke, prevretke, tinkture in sirupe. Odvaja vodo iz telesa. Pomaga pri celjenju ran.

Navadni žajbelj, *Salvia officinalis*

Uporabni deli so listi. Uporabljamo jih v obliki čaja, poparka, kapsul. Imajo antiseptično delovanje. Preprečujejo vnetje ušes.

3 VEČJA ODPSTAPANJA V UČINKOVITOSTI IN NEŽELENIH UČINKIH

Omenjene rastline tako pri živalih kakor pri ljudeh uporabljamo za podobne bolezenske simptome, vendar po izkušnjah niso enako učinkovite pri vseh vrstah živali. Tukaj ponovno navajamo pse, mačke in druge mesojede živali, ki imajo stalno močno želodčno kislino, torej pH v povprečju bistveno nižji, kakor ga imajo druge živali (sploh rastlinojede) in s tem se lahko inaktivirajo mnoge zdravilne učinkovine, ki jih apliciramo per os (29).

Pri uporabi zdravilnih rastlin opazimo, da se delovanje neke zdravilne rastline razlikuje celo od živali do živali iste vrste, kar nakazuje na dejstvo, da so nujne nadaljnje raziskave o varnosti in učinkovitosti zdravilnih rastlin. Takšen primer je vsem dobro znana mačja meta, ki pri človeku deluje zoper prehlad, zoper krče in napenjanje ter splošno pomirjajoče. Nekatere mačke vonj mete močno vznemiri, druge pa se nanjo sploh ne odzivajo.

Splošno znano je, da ne moremo spoznanj učinkovanja zdravilnih učinkovin prenesti neposredno z živali na človeka ali obratno. Živalim lahko določene zeli koristijo, ista rastlina pa je za človeka brez pomena ali celo strupena (30).

Najpomembnejše področje je toksičnost, ki obsega mnogo različnih ravni. Obstajajo velike razlike v odzivnosti živali in še večje razlike v jakosti neželenih učinkov že pri farmacevtskih pripravkih za živali z dovoljenjem

za promet z zdravilom, znotraj ene same vrste živali. Največ tovrstnih variacij v učinkovanju je pri posameznih pasmah psov. Še večje razlike v učinkovanju in neželenih učinkih pa so med različnimi vrstami živali. Zato je nujno vsako zdravilno snov ali učinkovino posebej preizkušati v dolgih postopkih, kar nakazuje na potrebo dodatnih raziskav (31, 32).

4 SKLEP

Vsaka navedena zdravilna rastlina vsebuje več učinkovin, ki imajo vpliv na telo živali. Terapevtski učinek daje rastlini glavna učinkovina kot tudi učinkovine, ki so prisotne v manjši meri in nimajo močno izraženega učinka. Za celoten, končni učinek zdravilne rastline je nujna interakcija vseh komponent.

Pri uporabi zdravilnih rastlin lahko opazimo, da se delovanje posamezne rastline razlikuje od živali do živali, kar nakazuje na dejstvo, da so potrebne nadaljnje raziskave varnosti in učinkovitosti zdravilnih rastlin. Razlike v učinkih in neželenih učinkih so tako znotraj ene vrste (med pasmami) kot tudi od vrste do vrste. V slednjem gre za tako velike razlike, da so za nekatere vrste zaradi vrstno specifičnih metabolnih razlik nekatere zdravilne rastline toksične. Posebej občutljivi so na primer prežvekovalci (govedo, koze, ovce, kamele ...). Pri teh vrstah je pomemben način aplikacije, kjer se je treba izogibati peroralni aplikaciji antibiotikov, ki pomorijo oz. neugodno selekcionirajo esencialno želodčno floro. Z antibiotiki v zvezi, je iz področja sintetičnih zdravil poznano, da npr. kunci težko prenašajo penicilin, nekatere druge vrste antibiotikov pa bolje. Prebavna flora je pri teh vrstah živali preživetvenega pomena, v primeru disbioze (napačna populacija črevesne flore ali spremenjen kemizem), pa lahko povzroči smrt v nekaj urah zaradi napihnjenosti in s tem posledične zadušitve ali rupture želodcev.

Najpogostejši neželeni učinki, ki jih uporaba rastlin (zlasti takšnih z močnimi farmakološkimi učinki) pri živalih lahko povzročijo, so: alergije, poškodbe jeter in splav brejih samic. Primer simptoma zastrupitve pri živali je zastrupitev z borovim oljem. Zastrupitev pri živali povzroči resne poškodbe črevesa in želodca, povzroči oslABLjenost mišic ter lahko vodi v smrt.

5 LITERATURA

1. Offiah NV, Makama S, Elisha IL et al. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the treatment of animal diarrhoea in Plateau State, Nigeria. *BMC Vet Res* 2011; 7: 36.
2. Semenya SS, Maroyi A. Medicinal plants used by the Bapedi traditional healers to treat diarrhoea in the Limpopo Province, South Africa. *J Ethnopharmacol* 2012; 144: 395-401.
3. Minden V, Deloy A, Volkert AM et al. Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations. *AoB Plants* 2017; 9.
4. Matthews HB, Lucier GW, Fisher KD. Medicinal herbs in the United States: research needs. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 773-778.
5. Dewick PM. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons; 2002.
6. Disler M, Ivemeyer S, Hamburger M et al. Ethnoveterinary herbal remedies used by farmers in four north-eastern Swiss cantons (St. Gallen, Thurgau, Appenzell Innerrhoden and Appenzell Ausserrhoden). *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2014; 10: 32.
7. Lans C. Possible similarities between the folk medicine historically used by First Nations and American Indians in North America and the ethnoveterinary knowledge currently used in British Columbia, Canada. *J Ethnopharmacol* 2016; 192: 53-66.
8. Reader's digest. *Naravna zdravila - po izboru zdravnikov*. Mladinska knjiga Založba; 2017.
9. Shahidi-Noghabi S, Van Damme EJM, Smagghe G. Carbohydrate-binding activity of the type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I from elderberry (*Sambucus nigra*) is a determining factor for its insecticidal activity. *Phytochemistry* 2008; 69: 2972-2978.
10. Skoglund P, Ersmark E, Palkopoulou E et al. Ancient Wolf Genome Reveals an Early Divergence of Domestic Dog Ancestors and Admixture into High-Latitude Breeds. *Curr Biol* 2015; 25: 1515-1519.
11. Sunvold GD, Fahey GC, Merchen NR et al. Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. *J Anim Sci* 1995; 73: 1099-1109.
12. Inglis B, West R. *Alternativna medicina*. Mladinska knjiga; 1988.
13. Forenbacher S. *Otrovne biljke i biljna otrovanja životinja*. Školska knjiga dd, Zagreb; 1998.
14. Allen DG, Dana G, Pringle JK, Smith DA. *Handbook of veterinary drugs*. Lippincott-Raven; 1998. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300023425>. Dostop: 31-05-2017.
15. Gruenwald J. *Zelena lekarna*. Mladinska knjiga Založba; 2006.
16. Willfort R. *Zdravilne rastline in njih uporaba*. Založba Obzorja; 2006.
17. Vukovič L, Mueller N. 1001 zdravilo iz narave. Mladinska knjiga; 2005.
18. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ et al. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17 :133.
19. Banumathi B, Vaseeharan B, Ishwarya R et al. Toxicity of herbal extracts used in ethno-veterinary medicine and green-encapsulated ZnO nanoparticles against *Aedes aegypti* and microbial pathogens. *Parasitol Res* 2017; 116: 1637-1651.
20. Ryan JL, Heckler CE, Roscoe JA et al. Ginger (*Zingiber officinale*) reduces acute chemotherapy-induced nausea: a URCC CCOP study of 576 patients. *Support Care Cancer* 2012; 20: 1479-1489.
21. Pillai AK, Sharma KK, Gupta YK et al. Anti-emetic effect of ginger powder versus placebo as an add-on therapy in children and young adults receiving high emetogenic chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56: 234-238.
22. Mancini S, Paci G, Fratini F et al. Improving pork burgers quality using *Zingiber officinale* Roscoe powder (ginger). *Meat Sci* 2017; 129: 161-168.
23. Yao M, Ritchie HE, Brown-Woodman PD. A developmental toxicity-screening test of valerian. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 204-209.
24. White B. Ginger. An Overview. *Am Fam Physician* 2007; 75: 1689-1691.
25. Klein S, Rister R. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. American Botanical Council; 1998.
26. Stogdale L. *Veterinary Herbal Medicine*. *Can Vet J* 2008; 49: 802.
27. DVM SGW, BVMS BFBvs. *Veterinary Herbal Medicine*. Elsevier Canada; 2006.
28. Smith-Schalkwijk MJ. *Veterinary phytotherapy: an overview*. *Can Vet J* 1999; 40: 891-892.
29. Brodie BB. Part VI. Difficulties in extrapolating data on metabolism of drugs from animal to man. *Clin Pharmacol Ther* 1962; 3: 374-380.
30. Xiuha F, Tian W. Antibiosis Effect of Some Chinese Medicinal Herbs to the Major Pathogenic Microorganisms. *Anim Sci Vet Med* 2002.
31. Verma S, Singh SP. Current and future status of herbal medicines. *Vet World* 2008; 2008: 347-350.
32. Shaw D, Graeme L, Pierre D et al. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J Ethnopharmacol* 2012; 140: 513-518.



KRONIČNA URTIKARIJA IN NJEN VPLIV NA KAKOVOST ŽIVLJENJA BOLNIKOV

CHRONIC URTICARIA AND ITS INFLUENCE ON PATIENTS' QUALITY OF LIFE

AVTOR / AUTHOR:

Urška Kramberger, univ. kozm.¹

Doc. dr. Nada Kecelj Leskovec, dr. med., spec.^{2,3}

Izr. prof. Matjaž Jeras, mag. farm.^{1,4}

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² Dermatovenerološka klinika,
Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

³ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁴ Celica, biomedicinski center, d. o. o.,
Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: matjaz.jeras@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Čeprav kronična urtikarija, ki jo pogosto spremlja angioedem, večinoma ne ogroža bolnikovega življenja, pa lahko izrazito poslabša njegovo kakovost. Da bi proučili vplive različnih dejavnikov na kakovost življenja bolnikov, smo pripravili anketne vprašalnike in jih razdelili preiskovancem s KU na Dermatovenerološki kliniki UKC Ljubljana in na Kliniki Golnik. Popolnoma izpolnjene anonimne ankete nam je vrnilo 38 bolnikov (88 %) od 43 povabljenih. Med njimi je bilo pričakovano več žensk, in sicer 33 ali 87 %. Izsledki naše raziskave kažejo, da bolezen izrazito poslabša kakovost življenja bolnikov. Angioedem je bil pogosteje prisoten pri tistih, ki so imeli KU že več kot 5 let. Oboleli iz te skupine so imeli tudi statistično značilno več težav z videzom in samozavestjo. Bolniki s hujšo obliko bolezni so pogosteje poročali o motnjah spanca in težavah v družabnih stikih. Naša raziskava je izpostavila tudi močan vpliv stresa na pojav, trajanje in izrazitost KU.

KLJUČNE BESEDE:

anketni vprašalnik, kakovost življenja, kronična urtikarija,

ABSTRACT

Although chronic urticaria, which is often accompanied by angioedema, is not a life-threatening condition, it can importantly deteriorate patients' quality of life. In order to explore the importance of different factors impacting the quality of life, questionnaires were prepared and distributed to CU patients at the Dermatovenerological Clinic, University Medical Centre Ljubljana and at the Golnik Clinic. We received completely filled in anonymous questionnaires from 38 participants (88%) out of 43 handed out to CU patients. As expected, the majority of them, i.e. 33 (87%), were females. The results of our study show a profound impact of the disease on the impairment of patients' quality of life. Angioedema was more common in those suffering from CU for more than 5 years. In this group of patients, the disease had also significantly more negative impacts on their self-perception and self-confidence. Those affected by more severe forms of CU reported problems with sleeping and their

social life. We also found a distinctive influence of stress on the onset, duration and seriousness of CU.

KEY WORDS:

chronic urticaria, quality of life, questionnaire

1 UVOD

Urtikarija je pogosta bolezenska motnja, ki se tekom življenja lahko pojavi pri 15 do 25 % posameznikov, delimo pa jo na akutno, kronično (KU) in fizikalno (slednja je podvrsta KU), odvisno od trajanja simptomov in sprožilnih dejavnikov (1). Urtikarija je najpogostejše akutna, približno v tretjini primerov pa preide v KU. Pri približno 40 % prizadetih oseb bolezen spremlja tudi angioedem.

1.1 KRONIČNA URTIKARIJA

KU označuje skupino kožnih bolezni, pri katerih se, pretežno vsakodnevno, več kot 6 tednov zapored, pojavljajo značilne kožne spremembe, ki popolnoma izzvenijo po 1 do 24 urah, lahko pa jih spremlja tudi angioedem (1, 2, 3, 4). Imenujemo jih koprivke ali urtike. To so ponavljajoči se, srbeči, rožnati ali rdeči kožni izpuščaji različnih oblik in velikosti, z otekino oz. edemom v zgornji polovici dermisa (slika 1A) (1).

Ključno vlogo v patologiji KU imajo mastociti, ki se ob aktivaciji degranulirajo in izločijo topne vnetne in vazo-

aktivne dejavnike, med katerimi je najpomembnejši histamin (1). KU delimo v dve skupini, in sicer na izzvano oz. fizikalno in spontano. Pri fizikalni urtikariji degranulacijo mastocitov izzove fizikalni dražljaj, pri spontani pa se urtike pojavljajo spontano, navadno iz neznanega vzroka (7, 8). Kronične spontane urtikarije dodatno delimo na avtoimunske in idiopatske. Za prve je značilna razmeroma pogosta prisotnost protiščitničnih protiteles (v približno 27 % primerov) in drugih avtoimunskih stanj, kot sta vitiligo in revmatoidni artritis (1). Nasprotno pa pri bolnikih z idiopatsko obliko bolezni ne spremljajo avtoimunske procese, pač pa do sedaj še nepojasnjena vztrajajoča aktivacija mastocitov (1).

Med bolniki s KU je običajno več žensk, ki na splošno pogosteje zbolejajo za avtoimunskimi boleznimi. Te pa so lahko prav tako eden od vzrokov za pojav KU (9). KU prizadene približno 0,5 do 1 % celotne, pretežno odrasle populacije, pri čemer je lahko posamezna podvrsta bolezni značilnejša za določeno starostno skupino, npr. simptomatski dermatografizem za najstnike in mlajše odrasle (7, 10). Poleg tega pa ima lahko posamezen bolnik več različnih podtipov KU.

1.2 DIAGNOZA IN ZDRAVLJENJE KRONIČNE URTIKARIJE TER NJENA POVEZANOST Z DRUGIMI BOLEZNIMI

KU potrdimo na podlagi temeljite anamneze in zdravniškega pregleda, nadaljnja testiranja (npr. kožni test z avtoimnim serumom (ASST) in test aktivacije bazofilcev) pa so



Slika 1: A – koprivke ali urtike (5; foto: James Heilman, MD); B – dermatografizem (6).
Figure 1: A – hives (5; photo: James Heilman, MD); B – dermatographism (6).



odvisna od podvrste bolezni. Blaženje in zdravljenje KU sta v dobršni meri enaka, ne glede na njene pojavne oblike, izvajamo pa ju:

- z izogibanjem sprožilnim dejavnikom oz. z odstranjevanjem le-teh, kadar je to mogoče;
- z izogibanjem dejavnikom, ki bolezen poslabšajo;
- s simptomatskim zdravljenjem, ki zmanjša sproščanje topnih vnetnih mediatorjev iz mastocitov in posledično tudi njihove učinke.

Dejavniki, ki lahko sprožijo KU, so nekatere zdravilne učinkovine, npr. acetilsalicilna kislina, ibuprofen in naproksen (nesteroidne protivnetne učinkovine), nekateri opiatni analgetiki, antidepressivi, antihipertenzivi (inhibitorji ACE) in antibiotiki. Pogosto kot vzrok za pojav bolezni omenjajo tudi cepiva in nekatere bakterijske (npr. *Helicobacter pylori*), virusne (HBV in HCV), glivične ter parazitske okužbe, čeprav še ni povsem jasno, ali gre res za vzročno povezavo ali pa ti dejavniki, tako kot stres, vplivajo predvsem na poslabšanje bolezni (1). Povzročitelji izzvanih oz. fizikalnih oblik KU pa so lahko: različne vrste pritiska na kožo (slika 1B), praskanje, mraz, vročina, sonce, vibracije, voda in kontaktni alergeni. Sodobno simptomatsko zdravljenje KU temelji na uporabi priporočenih odmerkov antihistaminikov v prvem koraku, njihovih povečanih odmerkov v drugem koraku ter v tretjem koraku na uvajanju biološkega zdravila omalizumab, antagonist levkotriena montelukast ali imunosupresiva ciklosporina. Med sodobne antihistaminike brez neželenih sedativnih učinkov sodijo npr. cetirizin, desloratidin, feksofenadin, levocetirizin, loratidin, rupatidin in bilastin. Njihovi priporočeni odmerki so učinkoviti pri 45 do 60 % bolnikov, pri ostalih pa jih moramo v naslednjem koraku povečati za 2- do 4-krat, kar je uspešno pri približno polovici obolelih (2, 11). Pri bolnikih, ki so kljub povečanim odmerkom še vedno neodzivni, zdravljenje v tretjem koraku nadaljujemo s ciklosporinom, montelukastom ali omalizumabom. Slednji je humanizirano mišje monoklonsko protitelo, ki je v EU registrirano za zdravljenje na antihistaminike odpornih oblik spontane KU (2, 8). Omalizumab se veže na prosta protitelesa IgE, ne reagira pa s tistimi, ki so vezana na površini celic (12, 13). V raziskavi, ki so jo izvedli Son in sod., so z omalizumabom zdravili 16 bolnikov, med katerimi se jih je 14 odzvalo pozitivno, njihovo stanje pa so nato spremljali še 9 do 24 mesecev. Štirje med njimi so ostali asimptomatski več kot devet mesecev po zadnjem prejetem odmerku zdravila, sedem jih je uspešno nadaljevalo z zdravljenjem, pri treh pa so se kljub prejemanju zdravila ponovno pojavili bolezenski simptomi (14). Kortikosteroide uporabljamo le krajši čas in le v primerih, ko pride do hujših zagonov bolezni. Nedavne raziskave so pokazale

izboljšanje bolezenskega stanja pri fizikalni in spontani KU tudi po jemanju vitamina D, ki je vpleten v diferenciacijo, proliferacijo in funkcijske lastnosti mastocitov. Njegovo pomanjkanje povezujejo s povečanim obsegom vnetja, posledično degranulacijo mastocitov in večjo nagnjenostjo k spontani KU (15, 16).

KU lahko spremljajo različne bolezni, vendar povezav med njimi in mehanizmov še niso popolnoma pojasnili. Pri bolnikih s KU se tako pogosto pojavljajo bolezni ščitnice, revmatoidni artritis, Sjörgeenov sindrom, sladkorna bolezen tipa I, sistemski lupus eritematosus, celiakija in nekatere psihološke motnje, npr. različne fobije in socialna anksioznost (17). Prav tako imajo bolniki lahko prisotna avtoprotelesa proti tiroksidni peroksidazi, ki bi bila lahko vpletena v patološki mehanizem (18).

Čeprav KU ni življenjsko ogrožajoča bolezen (razen v zelo redkih primerih), pa lahko predstavlja za obolele veliko fizično in psihično breme (19). Namen naše raziskave je bil, da s pomočjo ankete kar se da celovito proučimo vplive te bolezni na kakovost življenja bolnikov.

2 METODE

Različne vidike in dejavnike, povezane s KU, smo podrobneje proučili na osnovi odgovorov na vprašanja, ki smo jih po predhodni seznanitvi in pridobitvi pristankov v obliki ankete razdelili bolnikom s to boleznijo na Dermatovenerološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in na Kliniki Golnik.

2.1 ANKETNI VPRAŠALNIK

Anketne vprašalnike smo izročili skupno 43 bolnikom s KU, ki so prišli na kontrolni pregled, v celoti izpolnjene ankete pa nam je vrnilo 38 bolnikov (88 %). Anketni vprašalnik je vseboval 14 vprašanj, smiselno urejenih v dva med seboj povezana dela.

2.1.1 SPLOŠNI PODATKI O ANKETIRANCIH IN OCENE AKTIVNOSTI BOLEZNI

Prvi del anketnega vprašalnika smo sestavili tako, da smo lahko iz odgovorov zajeli podatke o osnovnih dejavnikih: spolu, starosti in trajanju bolezni, dotedanjem zdravljenju z zdravili, morebitnem doživetju hudega stresa v času pojava bolezni, izrazitosti simptomov v določenem času dneva, so-pojavljanju drugih bolezni in trenutni aktivnosti bolezni (20).

Preglednica 1: Prirejena ocenjevalna lestvica UAS7, s pomočjo katere smo ugotavljali trenutno aktivnost boleznih anketiranih bolnikov.

Table 1: The adapted UAS7 scoring tool used for the assessment of current disease activity of interviewed patients.

Urtike (v obdobju 24 ur)	Ocena	Srbež (v obdobju 24 ur)	Ocena
Brez	0	Brez	0
Malo (< 20)	1	Blag, nemoteč	1
Srednje veliko (20 do 50)	2	Zmeren, moteč, vendar ne moti dnevnih aktivnosti ali spanja	2
Veliko (> 50, velika področja, ki se zlivajo/angioedem)	3	Močan, moti dnevne aktivnosti in spanec	3

Anketiranci so trenutno aktivnost boleznih ocenili skladno z ocenjevalno lestvico UAS7 (*Urticaria Activity Score 7*), ki smo jo zaradi logističnih razlogov priredili tako, da so bolniki število urtik in srbež ocenili le enkrat v obdobju 24 ur in ne vsak dan tekom enega tedna, kot je to običajno (preglednica 1).

2.1.2 VPLIV BOLEZNI NA KAKOVOST ŽIVLJENJA

Drugi del ankete se je nanašal na vpliv boleznih na kakovost življenja. Priredili smo ga po vzoru vprašalnika CU-Q₂oL (*Chronic Urticaria Quality of Life Questionnaire*), ki so ga

oblikovali Baiardini in sodelavci (19). Navedene trditve smo utežili z lestvico ocen od 1 do 5 (1 – nikoli, 2 – redko, 3 – zmerno, 4 – zelo pogosto, 5 – vedno), glede na individualno presojo bolnika. Trditve smo zasnovali tako, da smo lahko proučevali vpliv boleznih na tista področja (npr. spanec, splošno dobro počutje, videz in samopodoba), ki pomembno vplivajo na kakovost življenja, vrednotili pa smo tudi omejitve, ki jih imajo bolniki pri aktivnostih v prostem času, izbiri kozmetičnih izdelkov ter oblačil in prehrane (preglednica 2) (20). Trditve v vprašalniku, ki so glede na podane samoocene

Preglednica 2: Anketna vprašanja, prirejena glede na vprašalnik CU-Q₂oL (*Chronic Urticaria Quality of Life Questionnaire*), ki so nam služila za vrednotenje vpliva boleznih na kakovost življenja bolnikov.

Table 2: A list of questions adapted from the CU-Q₂oL (*Chronic Urticaria Quality of Life Questionnaire*) and used to assess the influence of disease on patients' quality of life.

Anketna vprašanja o vplivu KU na kakovost življenja
1. Zaradi boleznih je kvaliteta mojega spanca slabša.
2. Ker se ne uspem naspiti, sem čez dan utrujen/-a.
3. Zaradi boleznih imam težave s koncentracijo oz. sem manj zbran/-a pri vsakodnevnih aktivnostih in na delovnem mestu/v šoli.
4. Zaradi izpuščajev mi je neprijetno v družbi.
5. Izjemno moteči so izpuščaji po obrazu.
6. Zaradi boleznih ostajam doma, saj se ne želim kazati v javnosti.
7. Zaradi boleznih moram paziti, kaj jem.
8. Stres poslabša moje simptome.
9. Glede svoje boleznih sem zaskrbljen/-a, živčen/-a.
10. Stranski učinki zdravljenja so moteči.
11. Zaradi boleznih se ne morem ukvarjati s športom, toliko kot bi si želel/-a.
12. Bolezen moti dejavnosti v mojem prostem času.
13. Bolezen slabša moje družbene odnose.
14. Zaradi boleznih imam težave pri izbiri oblačil.
15. Zaradi boleznih imam težave pri uporabi kozmetičnih izdelkov.
16. Otekanje oči
17. Otekanje ustnic

bolnikov kazale močan vpliv na kakovost življenja, smo opredelili glede na mejno, arbitrarno določeno sredino razpona možnih ocen ($\geq 2,5$).

2.2 STATISTIČNA ANALIZA

Za primerjalno statistično analizo dela rezultatov smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyev test, pri čemer smo kot statistično značilno različne upoštevali vrednosti pri $p < 0,05$. Omenjeni test smo izbrali, ker smo medsebojno primerjali majhne, različno velike skupine neodvisnih podatkov v obliki ordinalnih vrednosti (anketne ocene), ki se niso v vseh primerih

Preglednica 3: Porazdelitev anketiranih bolnikov glede na starost in spol.

Table 3: Distribution of participating patients according to their age and gender.

Starost	Ženske	Moški	Skupaj
0 do 19	3	1	4 (10,50 %)
20 do 29	6	2	8 (21,05 %)
30 do 39	8	0	8 (21,05 %)
40 do 49	7	1	8 (21,05 %)
50 do 59	2	0	2 (5,30 %)
≥ 60	7	1	8 (21,05 %)

porazdeljevale normalno (test normalnosti D'Agostino & Pearson). Statistične analize smo izvedli z računalniškim programom GraphPad Prism® v. 6.05 (GraphPad Software, ZDA).

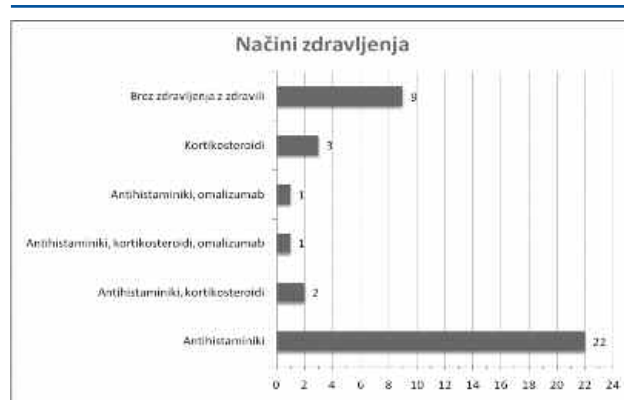
3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 STAROST IN SPOL

Med 38 preiskovanci, ki smo jih obravnavali v naši raziskavi, so pričakovano prevladovali ženske (87 %), kar je skladno s podatki iz literature. Tako so npr. v raziskavi, ki so jo izvedli s podobnim številom bolnikov s KU, dobili primerljive rezultate glede razporeditve obeh spolov (9). Starostne skupine bolnikov, ki smo jih obravnavali, prikazuje preglednica 3.

3.2 TRAJANJE BOLEZNI

Enajst bolnikov (29 %) je navedlo, da njihova bolezen traja 5 let ali več, kar precej odstopa od primerljivih podatkov v literaturi, po katerih naj bi tako dolgo trajala le pri 10 do 15 % bolnikov (9, 10, 21). Pri tem moramo upoštevati dejstvo,



Slika 2: Različni načini zdravljenja preiskovanih bolnikov.

Figure 2: Different types of treatment used in participating patients.

da so bili vsi bolniki s težjim potekom KU, zaradi česar so jih napotili na ambulantno zdravljenje na terciarni nivo.

3.3 ZDRAVLJENJE

29 preiskovancev (76 %) se je pred sodelovanjem v anketi že zdravilo, med njimi večina (26 ali 90 %) z antihistaminiki. Različne kombinacije zdravil, ki so jih prejeli, prikazuje slika 2. Ugotovili smo, da približno tretjina bolnikov (31 %) z zdravljenjem ni bila zadovoljna, kar je verjetno posledica nezadostnega obvladovanja simptomov, to pa seveda lahko poveča subjektivne občutke glede aktivnosti bolezni in zmanjšuje kakovost življenja.

3.4 STRESNI DOGODKI IN POJAV BOLEZNI

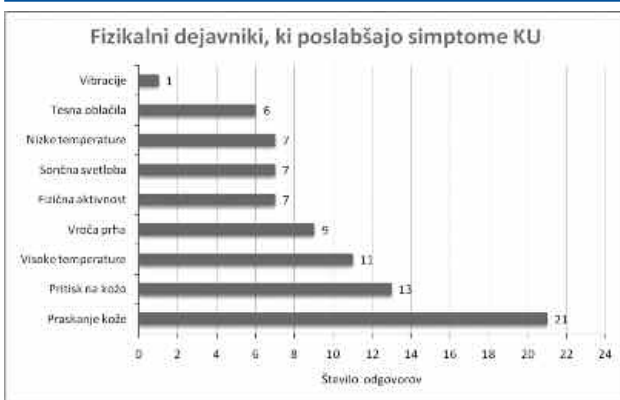
Petnajst bolnikov (40 %) je navedlo, da so v času pojava KU doživeli izrazito stresen dogodek. To pomeni, da bi lahko bila izjemna oblika stresa, npr. smrt bližnjega, porod, huda finančna stiska ali osebni neuspeh, eden od pomembnih sprožilnih dejavnikov bolezni.

3.5 FIZIKALNI DEJAVNIKI, KI POSLABŠAJO SIMPTOME BOLEZNI

Slika 3 prikazuje deleže fizikalnih dejavnikov, za katere so bolniki v anketi navedli, da poslabšujejo simptome njihove bolezni. V teh primerih (večina bolnikov) so imeli preiskovanci fizikalno KU, zato omenjeni dejavniki sočasno predstavljajo tudi vzroke za njihovo bolezen.

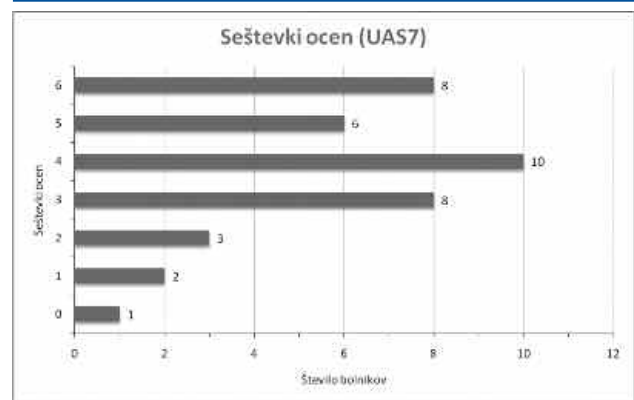
3.6 AKTIVNOST BOLEZNI

Bolniki so aktivnost bolezni ocenjevali na osnovi prirejenega točkovalnika UAS7. Ker celotredensko spremljanje stanja njihove bolezni ni bilo mogoče, so ocenili njeno povprečno aktivnost znotraj obdobja sedmih dni. Največji možni se-



Slika 3: Fizikalni dejavniki, ki po navajanju bolnikov poslabšajo simptome KU.

Figure 3: Physical factors, that aggravate CU according to patients' opinions.



Slika 4: Ocene aktivnosti bolezn, ki so jih sodelujoči bolniki podali na osnovi prirejenega točkovalnika UAS7.

Figure 4: The scores on disease activity, reported by participating patients, according to the adapted UAS7 scoring list.

števek ocen, to je 6, je navedlo 8 bolnikov (21 %), ena od anketiranih bolnic, ki se je zdravila z omalizumabom, pa je poročala o popolni odsotnosti urtik in srbeža (slika 4).

3.7 KAKOVOST ŽIVLJENJA

Podatki, zbrani v preglednici 4 kažejo, da ima KU največji vpliv na kakovost spanca, samopodobo ter predvsem na

Preglednica 4: Področja vplivov KU na kakovost življenja, ocenjena glede na individualno občutje bolnikov. Trditve ki so jim bolniki dodelili največji vpliv na kakovost življenja, so podčrtane, njihove mediane vrednosti ocen pa prikazane v odebeljenem tisku (vrednosti $\geq 2,5$). Navedeno je tudi število podanih ocen za vsako vprašanje (n).

Table 4: Areas related to quality of life influenced by CU that were scored according to individual perception of patients. Statements considered to be the most important regarding their influence on the quality of life are underlined, while their median scores are presented in bold (values ≥ 2.5). Numbers of assigned scores for each statement are also shown (n).

Kakovost življenja (KŽ)	Trditve v vprašalniku	M (n = 38)
Spanec	<u>Zaradi bolezn je kvaliteta mojega spanca slabša.</u>	2,5
	Ker se ne uspem naspiti, sem čez dan utrujen/-a.	2,0
Samopodoba in videz	<u>Zaradi izpuščajev mi je neprijetno v družbi.</u>	3,0
	Izjemno moteči so izpuščaji po obrazu.	1,5
	Zaradi bolezn ostajam doma, saj se ne želim kazati v javnosti.	1,0
Splošno dobro počutje	<u>Zaradi bolezn imam težave s koncentracijo, sem manj zbran/-a pri vsakodnevni aktivnostih in na delovnem mestu/v šoli.</u>	3,0
	<u>Stres poslabša moje simptome.</u>	4,0
	<u>Glede svoje bolezn sem zaskrbljen/-a, živčen/-a.</u>	3,5
Omejitve	Zaradi bolezn moram paziti, kaj jem.	2,0
	Stranski učinki zdravljenja so moteči.	1,0
	Zaradi bolezn se ne morem ukvarjati s športom, toliko, kot bi si želel/-a.	2,0
	Bolezen moti dejavnosti v mojem prostem času.	2,0
	Zaradi bolezn imam težave pri izbiri oblačil.	1,0
	Zaradi bolezn imam težave pri uporabi kozmetičnih izdelkov.	1,0
Prisotnost angioedema	Otekanje oči	1,0
	Otekanje ustnic	1,0

Legenda: KŽ – kakovost življenja

Legend: KŽ – quality of life

splošno dobro počutje in dojemanje zdravja posameznika. Socialna samopodoba je bila sicer pri vseh anketiranih bolnikih poslabšana, vendar ne v takem obsegu, da bi negativno vplivala na njihove družabne odnose. Bolniki so navajali predvsem sram zaradi vidnih simptomov bolezni. Očitno zelo pomemben dejavnik, ki poslabša kakovost življenja, je stres, saj po navedbah anketiranih bolnikov ojača simptome bolezni. Seveda pa lahko povzroča stres tudi sama KU, saj so bolniki zaskrbljeni glede svojega zdravstvenega stanja. Med KU pridruženimi duševnimi stiskami namreč bolniki najpogosteje navajajo prav anksioznost (22).

Glede na podane izjave bolnikov je imela bolezen manjši vpliv na njihove dejavnosti v prostem času, izbiro hrane, kozmetičnih izdelkov in oblačil. Prav tako se je izkazalo, da neželeni učinki zdravljenja ne predstavljajo posebnih obremenitev zanje. Izraženo nezadovoljstvo z zdravljenjem, ki smo ga razbrali iz odgovorov, torej najverjetneje ni posledica spremljajočih neželenih učinkov zdravljenja, temveč nezadostnega obvladovanja simptomov s trenutnim načinom zdravljenja.

3.7.1 TRAJANJE BOLEZNI

Anketirane bolnike s KU smo glede na trajanje bolezni razdelili v dve skupini, in sicer na tiste, ki so bili bolni ≥ 5 let (11 bolnikov), in tiste, pri katerih je bila bolezen prisotna < 5 let (27 bolnikov). Ocene tistih anketnih trditvev, v katerih sta se

skupini statistično značilno razlikovali, prikazuje preglednica 5. Skupina bolnikov z daljšim trajanjem bolezni je poročala o večji prisotnosti angioedema, zato predvidevamo, da sta pri njih prevladovali obliki kronične avtoimunske urtikarije in spontane KU, pri katerih je ta prisoten v večji meri, poleg tega pa je njun potek običajno dolgotrajnejši zaradi še neznanih vzrokov in slabe odzivnosti na zdravljenje.

3.7.2 VPLIV AKTIVNOSTI BOLEZNI IN NJENEGA TRAJANJA NA KAKOVOST ŽIVLJENJA BOLNIKOV

Anketirane bolnike smo razdelili v dve skupini tudi glede na podane ocene o aktivnosti njihove bolezni (točkovanik UAS7). V prvo smo uvrstili tiste s seštevkom ocen ≥ 5 (14 bolnikov), v drugo pa tiste s seštevkom < 5 (24 bolnikov). Za dosežene vrednosti seštevkom ocen ≥ 5 so morali bolniki navesti najvišjo možno oceno glede števila urtik (ocena 3) ali stopnje srbeža (ocena 3). Čeprav smo pričakovali, da se bosta skupini med seboj bistveno razlikovali v povprečnih vrednostih seštevkom ocen vplivov posameznih dejavnikov na kakovost življenja, so bolniki z aktivnejšo KU dosegli statistično značilno večje vrednosti pri zgolj štirih v anketi navedenih trditvah (preglednica 6).

V skupini z večjo aktivnostjo KU je imela bolezen opazno pomembnejši vpliv na kakovost spanca, pri čemer sta bila

Preglednica 5: Statistično značilno različno ocenjene trditve v primerjanih skupinah bolnikov s trajanjem bolezni ≥ 5 let in < 5 let; neparametrični Mann-Whitneyev U test.

Table 5: Statically differently scored statements in compared groups of patients, being affected by CU for ≥ 5 years and those for < 5 years; nonparametric Mann-Whitney U test.

Trditve v vprašalniku	KU ≥ 5 let (n = 11)	KU < 5 let (n = 27)	Mann-Whitney
Izjemno moteči izpuščaji po obrazu	M = 3,00 1. kvartil: 2,00 3. kvartil: 5,00 Σ rangov: 286,00 $\bar{x} = 3,36 \pm 0,47^*$	M = 1,00 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 3,00 Σ rangov: 455,00 $\bar{x} = 2,00 \pm 0,28^*$	U = 77,00 P = 0,012
Otekanje vek	M = 3,00 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 4,00 Σ rangov: 281,00 $\bar{x} = 2,28 \pm 0,47^*$	M = 1,00 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 2,00 Σ rangov: 460,00 $\bar{x} = 1,48 \pm 0,18^*$	U = 82,00 P = 0,015
Otekanje ustnic	M = 3,0 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 4,00 Σ rangov: 285,00 $\bar{x} = 2,54 \pm 0,43^*$	M = 1,0 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 2,00 Σ rangov: 456,00 $\bar{x} = 1,37 \pm 0,14^*$	U = 78,00 P = 0,007

*Legenda: M – mediana ocen; \bar{x} – povprečna vrednost ocen; * – standardna napaka (SN)*

*Legend: M – median value of scores; \bar{x} – mean value of scores; * – standard error of mean (SEM)*

Preglednica 6: Statistično značilno različno ocenjene trditve v primerjalnih skupinah bolnikov z različnima stopnjama aktivnosti KU (vsoti ocen <5 in ≥5); neparametrični Mann-Whitneyev U test.

Table 6: Statically differently scored statements in compared groups of patients with less (sum of scores < 5) and more (sum of scores ≥5) active disease; nonparametric Mann-Whitney U test.

Trditve v vprašalniku	Σ ocen ≥ 5 (n = 14)	Σ ocen < 5 (n = 24)	Mann-Whitney
Zaradi bolezni je kvaliteta mojega spanca slabša.	M = 3,00 1. kvartil: 2,75 3. kvartil: 4,00 Σ rangov: 359,00 $\bar{x} = 3,21 \pm 0,28^*$	M = 2,00 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 3,00 Σ rangov: 382,00 $\bar{x} = 2,08 \pm 0,27^*$	U = 82,00 P = 0,006
Ker se ne uspem naspati, sem čez dan utrujen/-a.	M = 3,0 1. kvartil: 2,75 3. kvartil: 3,25 Σ rangov: 352,00 $\bar{x} = 2,93 \pm 0,29^*$	M = 1,0 1. kvartil: 1,0 3. kvartil: 2,75 Σ rangov: 389,00 $\bar{x} = 1,92 \pm 0,25^*$	U = 89,00 P = 0,011
Izjemno moteči so izpuščaji po obrazu.	M = 3,5 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 5,00 Σ rangov: 345,50 $\bar{x} = 3,21 \pm 0,43^*$	M = 1,0 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 3,00 Σ rangov: 395,50 $\bar{x} = 1,92 \pm 0,28^*$	U = 95,50 P = 0,019
Zaradi bolezni ostajam doma, saj se ne želim kazati v javnosti.	M = 1,50 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 3,25 Σ rangov: 331,00 $\bar{x} = 2,29 \pm 0,41^*$	M = 1,00 1. kvartil: 1,00 3. kvartil: 1,00 Σ rangov: 410,00 $\bar{x} = 1,92 \pm 0,16^*$	U = 110,00 P = 0,031

Legenda: M – mediana ocen, \bar{x} – povprečna vrednost ocen, * – standardna napaka (SN)

Legend: M – median value of scores, \bar{x} – mean value of scores, * – standard error of mean (SEM)

deleža bolnikov, ki so navedli večjo pojavnost simptomov zvečer in ponoči, v obeh primerjalnih skupinah skoraj enaka (43 % v skupini z večjo aktivnostjo in 42 % v skupini z manjšo aktivnostjo bolezni). Večja aktivnost bolezni ima torej, predvsem zaradi hujšega srbeža ponoči, močnejši vpliv na kakovost spanca. Poleg tega domnevamo, da so bili tovrstni bolniki zaradi številnih urtik dodatno bolj obremenjeni tudi s svojim videzom, še posebej če so bile le-te prisotne na obrazu. Prav tako je imelo stanje bolezni v prvi skupini močnejši vpliv na samopodobo posameznega bolnika kot v drugi, saj so bili nekateri preiskovanci s tem celo tako obremenjeni, da so se izogibali socialnim stikom (prva skupina: 6 bolnikov ali 43 %; druga skupina: 2 bolnika ali 8 %). Pri bolnikih z aktivnejšo KU bi torej morali nujno razmisliti o prehodu na naslednjo stopnjo zdravljenja, saj je bila skoraj polovica med njimi (6 bolnikov ali 43 %) nezadovoljna z dotedanjo terapijo, medtem ko je bilo v drugi skupini takih bolnikov bistveno manj (5 ali 21 %).

Ocena aktivnosti KU je torej uporabna predvsem za spremljanje uspešnosti zdravljenja. Ker sta se primerjani skupini bolnikov med seboj statistično značilno razlikovali v manjšem obsegu, kot smo pričakovali, lahko sklepamo, da ima KU pomemben vpliv na kakovost življenja tudi pri tistih, ki so se glede na podane ocene uvrstili v skupino z manjšo aktivnostjo bolezni.

4 SKLEP

Kronična urtikarija lahko predstavlja veliko breme za bolnike, saj izrazito vpliva na kakovost njihovih življenj, še zlasti na: samopodobo zaradi vidnih simptomov bolezni, kakovost spanca in zbranost. Pomemben dejavnik, ki poslabša simp-



tome bolezni, je stres, ki ga vzdržuje in še pogloblja zaskrbljenost bolnikov zaradi njihovega zdravstvenega stanja oziroma počutja. Za zanesljivejše zaključke bi morali anketirati večje število bolnikov, kar pa je časovno zelo zahtevna naloga. Poleg tega bi bilo treba vsakemu bolniku z dodatnimi diagnostičnimi testi določiti točen podtip bolezni (spontana, fizikalna ali avtoimunska KU), saj bi le tako lahko izvedli natančnejše primerjave. Na ta način bi lahko nato ugotavljali, ali in kako posamezen podtip KU vpliva na trajanje in aktivnost bolezni, katere starostne skupine bolnikov so najpogosteje obremenjene s posamezno obliko KU in kakšne so razlike v njihovih vplivih na kakovost življenja obolelih.

5 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo doc. dr. Mihaeli Zidarn, dr. med., s Klinike Golnik za pomoč pri posredovanju anket ter vsem bolnikom, ki so pristali na anonimno anketiranje.

7 LITERATURA

1. Kanani A, Schellemborg R, Warrington R. Urticaria and angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2011; 7(S1): S9, 10 p.
2. Zuberbier T, Aberer W, Asero R et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: The 2013 revision and update. *Allergy* 2014; 69(7): 868-887.
3. Waller GD, Sampson PA, Renwick GA et al. The immune system. *Antihistamines and allergic disease*. In: Waller GD, Sampson AP. *Medical Pharmacology & Therapeutics*. Elsevier Saunders; 2014: 449-456.
4. Schocket LA: Chronic urticaria: Pathophysiology and etiology, or the what and why. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27: 90-95.
5. Wikipedia. Hives. <https://en.wikipedia.org/wiki/Hives#/media/File:EMminor2010.JPG>. Dostop: 7-6-2017.
6. Wikipedia. Dermatographic urticaria. https://en.wikipedia.org/wiki/Dermatographic_urticaria. Dostop: 7-6-2017.
7. Grattan C, Hide M, Greaves MW. Chronic urticaria as an autoimmune disease. In: Hertl M. *Autoimmune Diseases of Skin*. Springer-Verlag; 2011: 349-372.
8. Kaplan AP. Biologic agents in the treatment of urticaria. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012; 12: 288-291.
9. Gaig P, Olona M, Munoz Lejarazu D et al. Epidemiology of urticaria in Spain. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2004; 14(3): 214-220.
10. Planinšek Ručigaj T, Hozjan T, Vučinič Dugonik A et al. Kronična urtikarija. In: Planinšek Ručigaj T. *Kronična urtikarija*. Novartis; 2014: 71. .
11. Kaplan AP. Treatment of Chronic Spontaneous Urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012; 4: 326-331.
12. Greenberger AP. Chronic urticaria: new management options. *World Allergy Organ J* 2014; 7: 31.
13. Metz M, Maurer M. Omalizumab in chronic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 406-411.
14. Song HC, Stern S, Giruparajah M et al. Long-term efficacy of fixed-dose omalizumab for patients with severe chronic spontaneous urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013; 110: 113-117.
15. Movahedi Masoud, Tavakol M, Hirbod-Mobarakeh A et al. Vitamin d deficiency in chronic idiopathic urticaria. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015; 14(2): 222-227.
16. Varney AV, Warner A. The successful use of vitamin d in physical urticaria. *J Allergy Ther* 2014; 5: 200.
17. Confino-Cohen R, Chodick G, Shalev V et al. Chronic urticaria and autoimmunity: Associations found in a large population study. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1307-1313.
18. Altrichter S, Peter H-J, Pisarevskaja D et al. IgE mediated autoallergy against thyroid peroxidase – a novel pathomechanism of chronic spontaneous urticaria. *Plos ONE* 2011;6: e14794.
19. Bairadini I, Pasquali M, Braido F et al. A new tool to evaluate the impact of chronic urticaria quality of life questionnaire (CU-Q2oL). *Allergy* 2005; 60: 1073-1078.
20. Kramberger U. Kronična urtikarija in njen vpliv na kvaliteto življenja. *Chronic urticaria and its impact on quality of life*. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2015.
21. Toubi E, Kessel A, Avshovich N et al. Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: a prospective study of 139 patients. *Allergy* 2004; 59: 869-873.
22. Staubach P, Dechene M, Metz M et al. high prevalence of mental disorders and emotional distress in patients with chronic spontaneous urticaria. *Acta Dermato-Venerologica* 2011; 91: 557-561.

ZAVIRALCI POLI (ADENOZIN DIFOSFAT-RIBOZA) POLIMERAZE PRI ZDRAVLJENJU RAKA

POLY (ADENOSINE DIPHOSPHATE-RIBOSE) POLYMERASE INHIBITORS IN CANCER THERAPY

AVTOR / AUTHOR:

Dr. Saša Kenig, univ. dipl. biokem.

Fakulteta za vede o zdravju

Polje 42, 6310 Izola

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: sasa.kenig@fvz.upr.si

1 REAKCIJA, KI JO KATALIZIRA POLI (ADENOZIN DIFOSFAT- RIBOZA) POLIMERAZA

Poli (adenozin difosfat-riboza) polimeraza ali PARP je skupno ime za družino proteinov, v katero spada 18 encimov. Vsem je skupno to, da katalizirajo reakcijo ADP-ribozilacije, to je dodajanje ADP-riboznih enot na tarčne

POVZETEK

Olaparib, zaviralec poli (ADP-riboza) polimeraze (PARP) je prvo protitumorsko zdravilo, ki deluje po principu t. i. celične sintezne smrtnosti, odobreno za uporabo v kliniki, in sicer za zdravljenje raka jajčnikov za bolnice z mutacijo gena BRCA. Olaparib povzroči smrt celic z mutacijo genov BRCA1 ali BRCA2, ki sta pomembna pri popravljanju poškodb DNA s homologno rekombinacijo. Leta 2016 so odobrili še en zaviralec PARP – rucaparib, v različnih fazah kliničnih raziskav pa jih je še več. Mutacije BRCA so značilne tudi za druge vrste raka, poleg tega pa obstaja še mnogo mutacij ali epigenetskih sprememb, ki imajo za celico podobne posledice – za vse te bi zaviralci PARP lahko bili uporabni. So torej obetavni za široko skupino onkoloških bolnikov, vendar pa je za načrtovanje zdravljenja potrebno tako natančno poznavanje mehanizmov delovanja zaviralcev, skupaj z možnimi načini razvoja odpornosti, kot tudi poznavanje genetskega ozadja bolnika. V prispevku predstavljamo kratek pregled novih spoznanj o tej skupini zdravil in njihovi uporabi.

KLJUČNE BESEDE:

homologna rekombinacija, olaparib, rak, sintezna smrtnost, zaviralci PARP

ABSTRACT

Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitor olaparib is the first clinically approved drug for cancer therapy designed to exploit synthetic lethality. It induces death of cells with mutated BRCA1 or BRCA2, proteins important in DNA damage repair by homologous recombination, and is approved for the treatment of advanced ovarian cancer for patients carrying this mutation. In 2016, another PARP inhibitor (rucaparib) was approved, and several others are in clinical trials. BRCA mutations can also be found in other tumour types. Moreover, there are other mutations or epigenetic modifications that induce similar changes in the cell. For all those, PARP inhibitors are potentially useful, which makes them promising drugs for a broad group of oncological patients. However, thorough understanding of underlying mechanisms of inhibitors' activity and potential drug resistance as well as patients' genetic



background, are essential for proper therapy design. We present a brief overview of recent advances in the use of PARP inhibitors.

KEY WORDS:

cancer, homologous recombination, olaparib, PARP inhibitors, synthetic lethality

proteine, največkrat na glutamat, redkeje aspartat ali lizin (1). Tarčni proteini so lahko histoni, topoizomeraze, DNA-helikaze in nekateri drugi proteini, vezani na molekulo DNA, lahko pa tudi sam PARP (2, 3). Encim lahko doda le eno ADP-ribozno enoto, lahko pa tudi do petsto enot, ki tvorijo dolge razvejene verige. Pri reakciji kot substrat vstopa NAD⁺, ADP-riboza ostane vezana na protein, nikotinamid pa izstopa iz reakcije. Reakcija je reverzibilna; odcepitev ADP-ribozne enote katalizira poli (ADP-riboza) glikohidrolaza PARG (4). Taka posttranslacijska modifikacija spremeni katalizno aktivnost tarčnih proteinov ter njihove interakcije z drugimi proteini, s čimer proteini PARP uravnajo številne celične procese. Predvsem je pomembna vloga pri popravljanju napak na DNA, kjer PARP deluje kot signal za aktivacijo popravljanih mehanizmov DNA, lahko pa tudi aktivira poti celične smrti ali uravnava transkripcijo določenih genov.

2 PROTEINI PARP PRI POPRAVLJANJU POŠKODB DNA

Pri popravljanih mehanizmih DNA sta iz družine proteinov PARP najpomembnejša PARP1 in PARP2; PARP1 opravi okrog 80 do 85 % ADP-ribozilacij v celici, PARP2 med 10 in 15 %, le preostali majhen delež pa drugi proteini iz družine (5). Za zagotavljanje stabilnosti genoma sta iz te družine pomembni tudi tankirazi 1 in 2, ki skrbita za vzdrževanje telomerov in regulacijo mitoze. Drugi sorodni proteini pa imajo vloge, ki niso neposredno povezane z metabolizmom DNA (6).

Proteina PARP1 in PARP2 sta si po strukturi in vlogi skoraj identična, vendar specifičnih nalog enega ali drugega ne poznamo, zato pogosto uporabljamo kar izraz PARP ali PARP1/2. Zgrajena sta iz šestih domen, med njimi so katalizna in avtomodifikacijska domena, domena za vezavo na DNA ter domena, ki jo cepijo kaspaze (7). Domene so med seboj povezane s fleksibilnimi zaporedji. Kadar pro-

tein ni aktiven, je tridimenzionalna organizacija domen podobna »kroglicam na vrvici«, po vezavi na DNA pa se domene natančno uredijo. Najbolje raziskana je vloga pri popravljanju enojnih prelomov DNA, torej prelomov ene verige dvojne vijačnice. Za njihovo popravljanje je v celici odgovoren mehanizem z imenom »popravlanje z izrezovanjem baze« ali BER (*base excision repair*). Pri tem procesu glikozilaze ali endonukleaze odstranijo okvarjeno/napačno bazo, zaradi česar nastane vrzel na eni verigi (enojni prelom). Tu se veže PARP, ki nato privabi protein XRCC1, ta pa za tem veže DNA-polimerazo β in DNA-ligazo III, ki vrzel zapolnita (5). PARP je odgovoren tudi za preoblikovanje kromatina v bližnji okolici poškodbe, s čimer omogoči dostop ključnim popravljanim encimom (8). Encim poli ADP-ribozilira tudi sam sebe, kar je pomembno za vezavo drugih proteinov, ker pa fosfatne skupine poli ADP-riboz nosijo negativen naboj, se poli ADP-riboziliran PARP posledično sprosti z DNA, ko je njegova »naloga« opravljena.

Če pride v celici do dvojnega preloma vijačnice DNA, ima celica na voljo dva osnovna mehanizma, da tako napako odpravi. V večjem delu celičnega cikla poteka le nehomologno zlepljanje, pri katerem se prosta topa konca DNA enostavno povežeta s fosfoestrsko vezjo. S tem se dvojni prelom sicer odpravi, a se hkrati izgubi nekaj baznih parov. Povsem pravilno lahko celica popravi dvojni prelom s homologno rekombinacijo, za kar pa potrebuje homologno regijo na DNA. Ta je na voljo le v fazah celičnega cikla S in G2, ko je DNA v celici podvojena. PARP sicer sodeluje pri nehomolognem zlepljanju, vendar nima ključne vloge, medtem ko homologna rekombinacija poteka učinkoviteje, če PARP ni aktiven (8).

Zaradi pomembne vloge pri mehanizmih popravljanja DNA je PARP postal pomembna tarča za načrtovanje protitumorskih zdravil. Vsi do sedaj znani zaviralci PARP delujejo na proteina PARP1 in PARP2, ne pa na ostale proteine iz družine.

3 MEHANIZEM DELOVANJA ZAVIRALCEV PARP ZA ZDRAVLJENJE RAKA – PRINCIP CELIČNE SINTEZNE SMRTNOSTI

Za celico je ključno, da ostane DNA nepoškodovana in se neokrnjena dedna informacija prenese na hčerinske celice. Zato so mehanizmi popravljanja poškodb DNA kompleksni,

se med seboj dopolnjujejo, prekrivajo in nadomeščajo. Raziskovanje teh mehanizmov v onkologiji je smiselno, ker napake v popravljanih mehanizmih vodijo do kopičenja mutacij in s tem prispevajo k razvoju raka. Po drugi strani pa so tudi za tumorske celice določene poškodbe smrtno, zato so celice glede na učinkovitost popravil različno občutljive na kemoterapijo.

V povsem zdravi celici zaviralci PARP nimajo posebnega učinka, saj se PARP aktivira le, ko je DNA poškodovana. Veliko zanimanje za zaviralce PARP pa sta sprožili vzporedni objavi Farmerja in Bryanta leta 2005 (9, 10), ki sta pokazali, da so rakave celice s homozigotno mutacijo genov BRCA1 ali BRCA2 (*breast cancer type 1, 2*) izjemno občutljive na zaviralce PARP. PARP namreč skrbi za odpravo napak na enojni verigi; te so pogoste, saj lahko nastanejo spontano zaradi običajnega celičnega metabolizma, lahko pa so tudi sprožene z alkilirajočimi sredstvi ali ionizirajočim sevanjem. Za tumorske celice je značilno, da se delijo hitreje in pogo-

steje od zdravih celic, zato je časa za popravilo poškodbe manj. Če taka celica enojnega preloma ne odpravi, replikacijske vilice v fazi celičnega cikla S naletijo nanj, kar vodi do nastanka dvojnega preloma in porušitve replikacijskega aparata. Tako napako bi zdrava celica odpravila s homologno rekombinacijo – če ta poteka nemoteno, celica lahko preživi kljub neaktivnosti PARP. Vendar sta za proces homologne rekombinacije ključna proteina BRCA1 ali BRCA2, prvi deluje kot ogrodje za vezavo ostalih encimov homologne rekombinacije, drugi pa skrbi za pravilno delovanje Rad51, ki je odgovoren za iskanje homologne regije. Ob mutaciji BRCA1/2 homologna rekombinacija ne poteka, celici pa so odvzete vse možnosti, da bi poškodbo odpravila, kar vodi v celično smrt ali senescenco. Homozigotna mutacija BRCA1/2 ($BRCA^{-/-}$) je povečini prisotna le v tumorskih celicah. Je tudi vzrok, da je celica postala tumorska, saj okvare popravljanih mehanizmov DNA vodijo v kopičenje mutacij in s tem zelo povečajo verjetnost trans-

	Zdrave celice	Zdrave celice + zaviralec PARP	$BRCA^{-/-}$ tumorske celice	$BRCA^{-/-}$ tumorske celice + zaviralec PARP
Faza G0/G1	enojni prelom/poškodba baze ↓ PARP ↓ SSBR/BER odpravi večino poškodb	enojni prelom/poškodba baze ↓ PARP X ↓ poškodbe ostanejo	enojni prelom/poškodba baze ↓ PARP ↓ SSBR/BER odpravi večino poškodb	enojni prelom/poškodba baze ↓ PARP X ↓ poškodbe ostanejo
Faza S	redki dvojni prelomi ↓ BRCA ↓ popravilo dvojnega preloma s HR	zaustavitev replikacijskih vilic – dvojni prelom ↓ BRCA ↓ popravilo dvojnega preloma s HR	redki dvojni prelomi ↓ BRCA X ↓ dvojni prelom se ne odpravi	zaustavitev replikacijskih vilic – dvojni prelom ↓ BRCA X ↓ dvojni prelom se ne odpravi
	dvojnih prelomov malo, odpravljeni s HR – CELICA PREŽIVI	dvojnih prelomov veliko, a odpravljeni s HR – CELICA PREŽIVI	genom nestabilen, a CELICA PREŽIVI	dvojnih prelomov veliko, ni možnosti popravila – CELICA ODMRE

Slika 1: Mehanizem delovanja zaviralcev PARP po principu celične sintezne smrtnosti (11). Zelen okvirček prikazuje delujoč protein, rdeč pa nedelujočega; SSBR – popraviljanje enojnih prelomov (single strand break repair), BER – popraviljanje z izrezovanjem baze (base excision repair), HR – homologna rekombinacija.

Figure 1: Mechanism of PARP inhibitor exploiting synthetic lethality. Green box indicates active protein, red box inactive protein; SSBR – single strand break repair, BER – base excision repair, HR – homologous recombination.

formacije. Inhibicija PARP bo torej citotoksična le za tumorske celice in ne za ostale celice v telesu. Tak princip, kjer je okvara enega samega gena ali proteina praktično neškodljiva, postane pa smrtna v kombinaciji z okvaro drugega proteina, imenujemo princip celične sintezne smrtnosti (slika 1).

4 ODOBRITEV OLAPARIBA ZA UPORABO V KLINIKI

Najbolje proučen zaviralec PARP je olaparib, poznan tudi kot AZD2281. Leta 2014 so ga kot prvega odobrili za uporabo, dve leti za tem pa se je na seznam uvrstil še ruparib.

Prvo uspešno klinično raziskavo, na kateri je temeljila odobritev uporabe olapariba, so objavili leta 2009 (12), kjer je bil odziv pri 60 pacientih z rakom jajčnikov, dojke in prostate sicer omejen na 22 bolnikov z mutacijo BRCA, a pri teh zelo dober. Kar 63 % pacientov je doživelo stabilizacijo bolezni za najmanj štiri mesece. V večji raziskavi, kjer je bilo vključenih 298 BRCA^{-/-} pacientov, od tega 193 z rakom na jajčnikih, vse pa so predhodno že zdravili s citostatiki na osnovi platine, se je pri več kot 30 % pacientov z rakom jajčnikov bolezen stabilizirala za vsaj osem mesecev. Na podlagi te in nekaterih primerljivih raziskav je v Združenih državah Amerike agencija FDA odobrila uporabo olapariba (400 mg, dvakrat dnevno) kot monoterapijo za paciente z zarodno mutacijo gena BRCA in napredovalim rakom jajčnikov, ki so predhodno prejeli najmanj tri vrste kemoterapije (13).

Naslednja pomembna klinična raziskava je pokazala na učinkovitost olapariba za vzdrževalno terapijo po koncu zdravljenja raka jajčnikov s platino (14). Pri bolnicah z mutacijo gena BRCA, ki so po kemoterapiji prejemale olaparib, je bil čas, ko bolezen ni napredovala, dvakrat daljši kot pri placebo, kar je omogočilo zamik novega cikla kemoterapije s platino. Evropska agencija za zdravila je tako v začetku leta 2015 izdala dovoljenje za promet za zdravilo olaparib, in sicer za zdravljenje bolnic z mutacijo gena BRCA, pri katerih je prišlo do ponovitve slabo diferenciranega seroznega epiteljskega raka jajčnikov, karcinoma jajcevodov ali primarno peritonealnega karcinoma, občutljivega na platino, in se popolnoma ali delno odzivajo na kemoterapijo s preparati platine (15). Za enako indikacijo je zdravilo v končnem delu postopka tudi za ameriški trg.

5 MOŽNOSTI RAZŠIRITVE UPORABE OLAPARIBA

Trenutno je uporaba olapariba dovoljena le za zdravljenje raka jajčnikov. A popravljani mehanizmi DNA igrajo osrednjo vlogo pri mnogih vrstah raka. Ideja, da bi lahko zaviralce PARP uporabljali pri širši skupini bolnikov poleg že omenjenih, izhaja iz dveh dejstev. Mutacije gena BRCA se pojavljajo tudi pri drugih vrstah raka – pri raku dojke, prostate, melanomu ter raku trebušne slinavke (16). Poleg tega pa BRCA1 in 2 nista edina proteina, potrebna za nemoten potek homologne rekombinacije. Ugotovili so namreč, da so se v nekaterih kliničnih raziskavah na zaviralce PARP odzvali tudi pacienti z normalnim genom BRCA (17), zaradi česar so raziskovalci posumili, da imajo ti pacienti morda kako drugo mutacijo, kjer so posledice podobne. To bi bilo pomembno, saj se mutacija gena BRCA pojavi le pri 5 do 10 % raka dojke in 15 % raka jajčnikov. Predklinične raziskave kažejo, da so poleg celic z mutacijo gena BRCA na zaviralce PARP občutljive tudi celice z epigenetskim utišanjem genov BRCA, EMSy, PTEN in Rad51 ter mutacijami genov ATM in ATR, CHEK1 in CHEK2 ter gena Fanconijeve anemije (18). Obširno sekvenciranje tumorskega genoma je pokazalo, da so take mutacije pogoste pri napredovalih rakah prostate, trebušne slinavke in dojke. Za presejalno testiranje bi bilo torej potrebno pregledati mnoge gene, ki so povezani s homologno rekombinacijo. Ker pa je možnosti ogromno, vsaka izmed možnih mutacij pa se pojavi le redko, bi bilo tako testiranje finančno nevzdržno. Zato so potrebne alternativne rešitve. Namesto detekcije posameznih mutacij lahko na poškodovan mehanizem homologne rekombinacije sklepamo tudi, če je v celici opaziti obsežnejše delecije, translokacije, nesorazmerje telomernih alelov ali izgube heterozigotnosti. Skupno takim poškodbam pravimo genomska brazgotina. Klinična raziskava za oceno, ali je taka značilnost primeren biomarker za občutljivost celic raka jajčnikov na zaviralce PARP, še poteka. Še ena vrsta raka, kjer so opazili genomsko brazgotino, je trojno negativni rak dojke (19), kjer pa se zaviralci PARP žal niso izkazali kot učinkoviti. Težava pri uporabi genomske brazgotine je v tem, da nam sicer pove, ali je bilo v nekem obdobju delovanje homologne rekombinacije okrnjeno. Ne pove pa, ali se je morda zgodila povratna mutacija, ki je mehanizem ponovno vzpostavila. Tako bo za učinkovitejši izbor kandidatov za zdravljenje z zaviralci PARP verjetno potrebno načrtovanje funkcijskega testa, ki bo pokazal učinkovitost delovanja

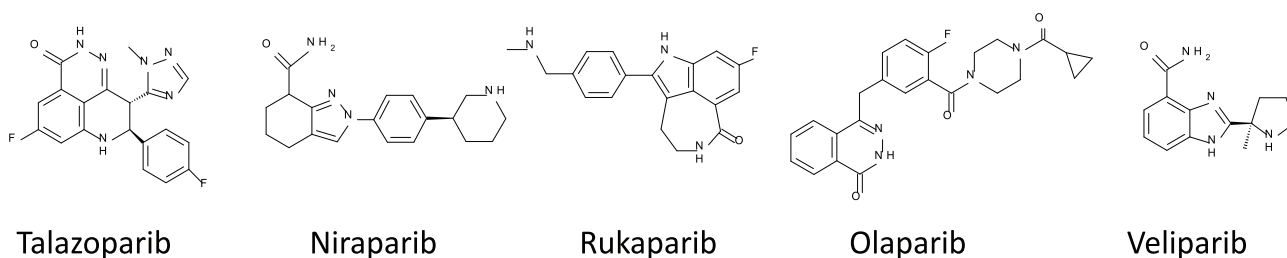
mehanizma homologne rekombinacije v danem trenutku. To bi lahko bil *in vitro* test z lizatom tumorskih celic ali transfekcija tumorskih celic z reporterskim sistemom v primarni kulturi.

6 DRUGI ZAVIRALCI PARP

Trenutno so v različnih fazah kliničnih raziskav poleg olapariba še štiri drugi zaviralci PARP, to so veliparib, niraparib, talazoparib in rukaparib, in sicer kot monoterapevtiki ter v kombinacijah z drugimi zdravili. Vsi se vežejo na vezavno mesto za kofaktor β -NAD⁺ na katalizni domeni PARP1/2 (20). Čeprav je princip sintezne smrtnosti splošno sprejet mehanizem delovanja zaviralcev PARP, pa je pomembno točneje razumeti, kako je delovanje PARP dejansko zavrto. Zaviralci delujejo tako, da ujamejo PARP, ko je ta vezan na molekulo DNA in tak kompleks stabilizirajo, podobno kot je značilno tudi za zaviralce topoizomeraz (21). Zaradi tega so celice, ki ne izražajo proteina PARP, na zaviralce odporne, zaviralci pa so bolj citotoksični kot sama odsotnost PARP. Prav po učinkovitosti stabilizacije kompleksa PARP-DNA se zaviralci med seboj razlikujejo, sorazmerna s to lastnostjo pa je tudi njihova citotoksičnost. Talazoparib je pri tem najučinkovitejši, veliparib pa najmanj, kar je povezano z njuno kemijsko strukturo (slika 2) – veliparib je namreč najmanjši, talazoparib pa najbolj rigiden. Velikost in dva kiralna centra sta ključna za moč vezave in manj nespecifičnih in alosteričnih učinkov (6). Čeprav je talazoparib citotoksičen pri 200-krat manjši koncentraciji kot olaparib, se to ne odraža pri njegovi terapevtski učinkovitosti. Poznavanje sposobnosti ujetja PARP na DNA torej ni dovolj, potrebno bo upoštevati tudi učinke na nepredvidene tarče. Antolin in Mestres sta na primer v svoji nedavni raziskavi

proučila delovanje zaviralcev PARP na 16 celičnih kinaz, katerih ligand je zaviralcem PARP strukturno soroden (22). Ugotovila sta, da rukaparib lahko zavira delovanje kar devetih proučevanih kinaz, veliparib dveh, olaparib pa nobene. Seveda ne gre zanemariti niti dejstva, da ima PARP poleg vloge pri popravljanju DNA še manj poznane ali vseeno pomembne vloge pri transkripciji, apoptozi in imunskem odzivu, ves čas pa raziskovalci odkrivajo še nove podrobnosti o njegovem delovanju.

Vse omenjene inhibitorje že proučujejo v kliničnih raziskavah. Proučevanje več različnih inhibitorjev je pomembno, ker bi lahko bili učinkoviti pri različnih podskupinah bolnikov, pa tudi zato, da bi pri morebitnem razvoju rezistence lahko to prešli z zamenjavo zaviralca. Niraparib je v tretji fazi klinične raziskave, kjer so paciente z napredovalim rakom jajčnikov, občutljivim na citostatike na osnovi platine, razdelili na tiste z genomsko mutacijo gena BRCA, paciente z zaznavno genomsko brazgotino ter paciente brez omenjenih lastnosti, podaljšal preživetje brez napredovanja bolezni v prvih dveh skupinah (23). Zelo podobno pa velja tudi za rukaparib (24). Na podlagi izkazane učinkovitosti rukapariba pri BRCA^{-/-} pacientih v več študijah (25), je FDA leta 2016 odobrila uporabo rukapariba za tiste bolnice z rakom jajčnikov, ki so jih že zdravili z najmanj dvema vrstama zdravljenja. Veliparib lahko prehaja krvno-možgansko pregrado, s čimer se ponuja možnost za uporabo pri zdravljenju možganskih zasevkov. Preliminarni rezultati so v takem primeru pokazali občutno podaljšanje srednjega časa preživetja (26) v primerjavi z napovedanim preživetjem na podlagi objavljene literature. Talazoparib je najnovejši in po podatkih predkliničnih raziskav najmočnejši izmed inhibitorjev, trenutno pa potekajo klinične raziskave za uporabo pri zdravljenju raka dojke. V raziskavi, kjer je bilo vključenih 13 zgodnjih rakov dojke, je talazoparib v dveh mesecih pred operacijo in začetkom kemoterapije, zmanjšal volumen tumorja pri vseh pacientkah (27).



Slika 2: Zaviralci PARP, ki so trenutno v različnih fazah kliničnih raziskav. Od leve proti desni si sledijo po padajoči citotoksičnosti.
Figure 2: PARP inhibitors currently in different phases of clinical trials, in the order from most (left) to least (right) cytotoxic.



7 ZAVIRALCI PARP V KOMBINACIJI Z DRUGIMI ZDRAVILI

V predkliničnih raziskavah so zaviralci PARP močno okrepli delovanje različnih citotoksičnih spojin in radiacije. Olaparib so zato testirali v različnih kombinacijah, npr. s topotekanom, cisplatinom, pegiliranim liposomskim doksorubicinom, karboplatinom in paklitakselom. Vse so bile toksične in niso dovoljevale uporabe olapariba v odmerku, ki bi bil učinkovit (6). Kot učinkovita pa se kaže kombinacija s temozolamidom. To je metilirajoče sredstvo, ki ga uporabljamo za zdravljenje glioblastoma pri pacientih, ki imajo nedelujočo O-6-gvanin-metiltransferazo (MGMT). Kombinacija deluje tako, da temozolamid povzroči poškodbo na DNA, olaparib pa prepreči odpravo poškodbe. Povečanje učinkovitosti temozolamida so pokazali tudi za rukaparib pri melanomu (28). Predlagali so tudi kombinacijo olapariba z imunsko terapijo, predvsem zato, ker imajo celice z okvarjenimi popravljivimi mehanizmi DNA zaradi množice mutacij spremenjene površine in so torej bolj imunogene (29). Kljub temu imunski sistem teh celic ne odstrani, saj je za tumorje znano, da spodbujajo izražanje različnih molekul, ki zavirajo imunski odziv v mikrookolju tumorja. Taka molekula je npr. CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), ta zavira delovanje limfocitov T (30). V raziskavi na živalskih modelih je tako kombinacija velipariba in protitelesa proti CTLA4, s katerim njegovo delovanje izničimo in spodbudimo odziv limfocitov, pri večini preiskovanih živali povsem odstranila tumorje.

8 RAZVOJ ODPORNOSTI PROTI ZAVIRALCEM PARP

Žal celice napredovalih tumorjev s časom razvijejo odpornost tudi proti zaviralcem PARP. Do sedaj poznamo tri mehanizme (18). Zgodi se lahko reverzibilna mutacija gena BRCA, s katero celica ponovno pridobi zmožnost odpravljanja poškodb s homologno rekombinacijo. Lahko pride tudi do povišanega izražanja glikoproteina P in s tem povečanega izčrpavanja spojine iz celice. Tretji način je izguba izražanja proteina 53BP1. To je protein, čigar vezavo na tope konce DNA pri dvojnem prelomu v fazi S regulira BRCA1. Če BRCA1 ni, ostane 53BP1 ves čas vezan in onemogoča procesiranje koncev DNA, ki je nujno za na-

daljnji potek homologne rekombinacije. Če pa ni ne enega ne drugega, lahko homologna rekombinacija spet poteče (31).

9 SKLEP

Ne glede na to, da so zaviralci PARP že v uporabi, ostaja glede njihove uporabe še kup odprtih vprašanj. Nanašajo se predvsem na to, katerim pacientom poleg tistih z mutacijo gena BRCA bi tako zdravlilo lahko pomagalo. Poleg tega je pomembno ugotoviti, kako manj raziskane, a vendar pomembne funkcije PARP vplivajo na potek zdravljenja, saj te seveda lahko prispevajo k razvoju neželenih učinkov in omejujejo največji možni odmerek. Pomembno je tudi proučiti možne mehanizme rezistence in načrtovati, kako bi jih lahko preprečili ali obšli. Tako bodo zaviralci PARP uporabni za čim več pacientov v skladu s sodobno težnjo, da se zdravljenje onkološkega pacienta čim bolj personalizira.

10 LITERATURA

1. Suzuki H, Quesada P, Farina B et al. *In vitro poly(ADP-ribose)ylation of seminal ribonuclease*. *J Biol Chem* 1986; 261(13): 6048-6055.
2. Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. *Poly(ADP-ribose)ylated chromatin domains: access granted*. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 6): 815-825.
3. Ba X, Garg NJ. *Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases*. *Am J Pathol* 2011; 178(3): 946-955.
4. Lin W, Amé JC, Aboul-Ela N et al. *Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. *J Biol Chem* 1997; 272(18): 11895-11901.
5. Schreiber V, Amé J-C, Dollé P et al. *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1*. *J Biol Chem* 2002; 277(25): 23028-23036.
6. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. *Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action*. *Sci Transl Med* 2016; 8(362): 362ps17.
7. Lilyestrom W, van der Woerd MJ, Clark N et al. *Structural and biophysical studies of human PARP-1 in complex with damaged DNA*. *J Mol Biol* 2010; 395(5): 983-994.
8. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F. *The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art*. *Biochem Pharmacol* 2012; 84(2): 137-146.

9. Farmer H, McCabe N, Lord CJ et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434(7035): 917-921.
10. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; 434(7035): 913-917.
11. Aly A, Ganesan S. BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* 2011; 3(1): 66-74.
12. Fong PC, Boss DS, Yap TA et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361(2): 123-134.
13. Kim G, Ison G, McKee AE et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2015; 21(19): 4257-4261.
14. Ledermann J, Harter P, Gourley C et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(15): 1382-1392.
15. AstraZeneca. AstraZeneca shares progress on LYNPARZATM (olaparib) tablets in the US [Internet]. <https://www.astrazeneca-us.com/media/press-releases/2017/astrazeneca-shares-progress-on-lynparza-olaparib-tablets-in-the-us-03282017.html>. Dostop: 22-6-2017.
16. Mersch J, Jackson MA, Park M et al. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* 2015; 121(2): 269-275.
17. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay Het al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 2011; 12(9): 852-861.
18. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 2017; 355(6330): 1152-1158.
19. Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A et al. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Res BCR* 2014; 16(3): 211.
20. Shen Y, Rehman FL, Feng Y et al. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2013; 19(18): 5003-5015.
21. Hartmann JT, Lipp H-P. Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* 2006; 29(3): 209-230.
22. Antolin AA, Mestres J. Linking off-target kinase pharmacology to the differential cellular effects observed among PARP inhibitors. *Oncotarget* 2014; 5(10): 3023-3028.
23. Tellini ML, Timms KM, Reid J et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016; 22(15): 3764-3773.
24. Swisher EM, Lin KK, Oza AM et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18(1): 75-87.
25. Kristeleit R, Shapiro GI, Burris HA et al. A Phase I-II Study of the Oral Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Rucaparib in Patients with Germline BRCA1/2-mutated Ovarian Carcinoma or Other Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2017.
26. Mehta MP, Wang D, Wang F et al. Veliparib in combination with whole brain radiation therapy in patients with brain metastases: results of a phase 1 study. *J Neurooncol* 2015; 122(2): 409-417.
27. Litton JK. Frontline PARP inhibitor shrinks tumors in BRCA-positive breast patients. MD Anderson Cancer Center. <https://www.mdanderson.org/newsroom/2016/10/frontline-parp-inhib.html>. Dostop: 22-6-2017.
28. Plummer R, Lorigan P, Steven N et al. A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotentiation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(5): 1191-1199.
29. Higuchi T, Flies DB, Marjon NA et al. CTLA-4 Blockade Synergizes Therapeutically with PARP Inhibition in BRCA1-Deficient Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(11): 1257-1268.
30. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252-264.
31. Bouwman P, Aly A, Escandell JM et al. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(6): 688-695.



GENSKO ZDRAVLJENJE Z VIRUSNIMI VEKTORJI

VIRAL VECTORS IN GENE THERAPY

AVTOR / AUTHOR:

Andreja Šink, mag. biotehnol.

Odsek za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Kemijski inštitut

Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenija

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andreja.sink@ki.si

1 UVOD

Glavnina aktivnosti na področju razvoja genskega zdravljenja obsega iskanje novih poti za uvajanje genov v somatske (ali zarodne) celice z naslednjimi cilji: (i) popraviti motnjo v delovanju celice z uvedbo nadomestnega funkcionalnega gena, (ii) dodati novo popravilno funkcijo celici z uvedbo novega gena, (iii) ciljanje gostiteljevega genoma in popravilo zaporedja, ki povzroča bolezen, ter (iv) poseganje v mehanizme izražanja proteina, ki povzroča bolezen (1). V zadnjem desetletju je gensko zdravljenje postalo eno najbolj obetavnih in najhitreje razvijajočih se področij medicine. Ima velik potencial pri zdravljenju dednih genskih bolezni, nalezljivih bolezni ter pri zdravljenju raka (2).

Na področju genskega zdravljenja z virusnimi vektorji so dosegli velik napredek, čeprav je bilo v preteklosti opaziti tudi nekaj hušjih neželenih učinkov, ki so zahtevali nadaljnje

POVZETEK

Gensko zdravljenje je v zadnjem desetletju postalo eno najbolj obetavnih in najhitreje razvijajočih se področij medicine. Po svetu izvajajo mnogo raziskav v povezavi z genskim zdravljenjem z virusnimi vektorji, najpogosteje z adenovirusnimi, adenoasociacijskimi, retrovirusnimi ali lentivirusnimi vektorji. Na trgu so trenutno odobrena štiri zdravljenja z virusnimi vektorji: dve zdravljenji genetskih bolezni (alipogentiparvovek in avtologne celice CD34+, transducirane z retrovirusnim vektorjem, ki vsebuje gen za človeško adenozin deaminazo) in dve zdravljenji z onkolitičnimi virusi (talimogenlaherparepvek in adenovirus z vstavljenim tumor supresorskim genom p53). Poleg tega je še precej genskih zdravljenj s pozitivnimi rezultati v zadnjih fazah kliničnih raziskav, s pridobljenim statusom prebojnega zdravila oz. zdravila sirote v EU in ZDA.

KLJUČNE BESEDE:

alipogentiparvovek, gensko zdravljenje, onkolitični virus, virusni vektorji, voretigeneparvovek

ABSTRACT

During the last few decades, gene therapy has become one of the most promising branches of medicine. There are many active clinical studies worldwide focusing on gene transfer by viral vectors. Mostly viruses such as adenovirus, adeno-associated virus, retrovirus or lentivirus are used. Currently, there are four approved gene therapies available on the market: two for the treatment of genetic diseases (alipogene tiparvovec and autologous CD34+ cells transduced with retroviral vector containing human adenosine deaminase gen) and two treatments with oncolytic viruses (talimogene laherparepvec and adenovirus containing tumor-suppressor gene p53). Moreover, many gene therapies with promising results are in final phases of clinical trials with breakthrough therapy and/or orphan product designations obtained in the EU and USA.

KEY WORDS:

alipogene tiparvovec, gene therapy, oncolytic virus, viral vectors, voretigene neparvovec

raziskovanje v smeri večje učinkovitosti, izboljšanja biološke varnosti in premagovanja tehničnih omejitev. Trenutno najpogosteje uporabljeni virusni vektorji so adenovirusni (AV),

adenoasociacijski (AAV), retrovirusni in lentivirusni (LV) vektorji. Razvili so tudi druge vektorje, npr. vektorje na osnovi virusa vakcinije, ošpic, herpesa in bakulovirusa (2, 3).

2 VIRUSNI VEKTORJI IN NJIHOVA UPORABA

Nezaščitene nukleinske kisline (RNA ali DNA) v biološkem okolju niso stabilne dolgo časa. Poleg tega same po sebi niso zmožne prehajati preko membrane v citoplazmo ali jedro, zato največji izziv pri genskem zdravljenju predstavlja dostava terapevtskega gena v celico. Med najučinkovitejše dostavne sisteme v genskem zdravljenju spadajo virusni vektorji. Med evolucijo so virusi pridobili mnogo mehanizmov za vstop v celice, dolgotrajno shranjevanje svojega genetskega materiala znotraj celic in spreminjanje oz. zaviranje zaščitnih mehanizmov gostiteljskega organizma. Za večino virusov obstajajo rekombinantne različice, ki bi lahko bile uporabne kot dostavni sistemi v genskem zdravljenju, dejansko pa razvijajo le omejeno število virusnih vektorjev (2).

2.1 ADENOVIRUSI

2.1.1 Značilnosti vektorjev

AV so bili med prvimi natančno raziskanimi virusi. Za uporabo v genskem zdravljenju so jih predlagali že pred 20 leti (4). So virusi brez ovojnice, genom pa sestavlja približno 35 kb dolga dvoverižna DNA. AV so za uporabo v genskem zdravljenju oslabil; prva generacija vektorjev vsebuje delekcijo gena E1, ki kodira dva virusna proteina E1A in E1B, pomembna za razmnoževanje virusa. Druga generacija vsebuje delekcijo večine zgodnjih genov, poznamo pa tudi seve z delekcijo vseh genov (»*gutless*« vektorji), ki za svoje delovanje potrebujejo še pomožni AV prve generacije (5). Delecija virusnih genov poleg večje varnosti zagotavlja tudi več prostora za vnos eksogene DNA. Tako so vektorji prve generacije zmožni privzeti do 5 kb tuje DNA, vektorji druge generacije do 14 kb in »*gutless*« vektorji do 36 kb. Genom AV se ne integrira v genom gostiteljske celice, zaradi česar veljajo AV za precej varne za uporabo, vendar pa virusni življenjski cikel ne omogoča izražanja transgena daljši čas. Slabost sistema je močno imunogena virusna kapsida, ki tudi pri oslabljenih virusih sproža imunski odziv. Uporaba AV je zato mogoča le, kjer je možna lokalna aplikacija in je imunski odziv zaželen (2).

2.1.2 Uporaba

AV danes uporabljamo le za prehodno izražanje transgena, kar zadostuje za zdravljenje tumorjev s tumorskim cepivom ali za popraviljanje genoma, na primer z dostavo donorske DNA in različnih nukleaz (nukleaza cinkovih prstov (ZFN), efektorska nukleaza podobna transkripcijskim aktivatorjem (TALENs) in RNA-usmerjena nukleaza (RGN)) (3). V cepivih so prisotni virusni vektorji, ki se ne morejo razmnoževati. Antigen se izrazi na površini virusnega plašča ali pa se izrazi kot produkt transgena, vključenega v rekombinantni AV (6). Slabost tega sistema je možna prevlada imunskega odgovora proti virusnim epitopom, ki lahko tako zamaskirajo imunski odziv proti tarčnemu antigenu (7). To je najverjetneje tudi vzrok za neuspešno preizkušanje cepiva proti HIV na ljudeh, medtem ko je na primatih kazalo pozitivne učinke (8).

AV vektorji so uporabni tudi pri zdravljenju raka. Zdravljenje je možno z vnosom funkcionalnega tumor supresorskega gena p53, ki spodbuja celično apoptozo. V kliničnih študijah so po osmih tednih sočasnega zdravljenja z obsevanjem in injicirani rekombinantnih AV pri 64 % pacientov v pozni fazi razvoja tumorja dosegli popolno regresijo in pri 32 % pacientov delno regresijo skvamoznoceličnega karcinoma vratu in glave. Kitajski državni urad za hrano in zdravila (SFDA) je leta 2003 ta pristop priznal kot prvo komercialno dostopno gensko zdravljenje (9).

2.2 RETROVIRUSI IN LENTIVIRUSI

2.2.1 Značilnosti vektorjev

Retrovirusi so RNA-virusi. RNA se med pomnoževanjem virusa prepíše nazaj v dvoverižno DNA, ki se integrira v genom gostiteljske celice. Pred razvojem sistema CRISPR-Cas so retrovirusi predstavljali edini učinkovit način za spreminjanje pacientovega genoma (2). Prve klinične raziskave za gensko zdravljenje z retrovirusi so se pričele v začetku 90. let prejšnjega stoletja in so bile namenjene zdravljenju monogenih bolezni (10). Z retrovirusi gensko zdravljenje največkrat izvajamo *ex vivo*: krvne ali krvotvorne (matične) celice izoliramo iz pacienta, jih gensko spremenimo in nato injiciramo nazaj v telo (11, 12, 13, 14). γ -retrovirus in LV sta podskupini retrovirusov, ki ju največkrat uporabljamo v genskem zdravljenju. Neželena lastnost γ -retrovirusov je, da imajo preferenčno mesto integracije v gostiteljev genom. To pomeni, da je večja verjetnost integracije DNA v aktivno prepisovan genski lokus, kar lahko spremeni izražanje onkogene in tumor supresorskih genov. Neželene učinke genskega zdravljenja, povzročene z insercijsko mutagenozo, imenujemo genotoksičnost. S tega vidika so LV pri-



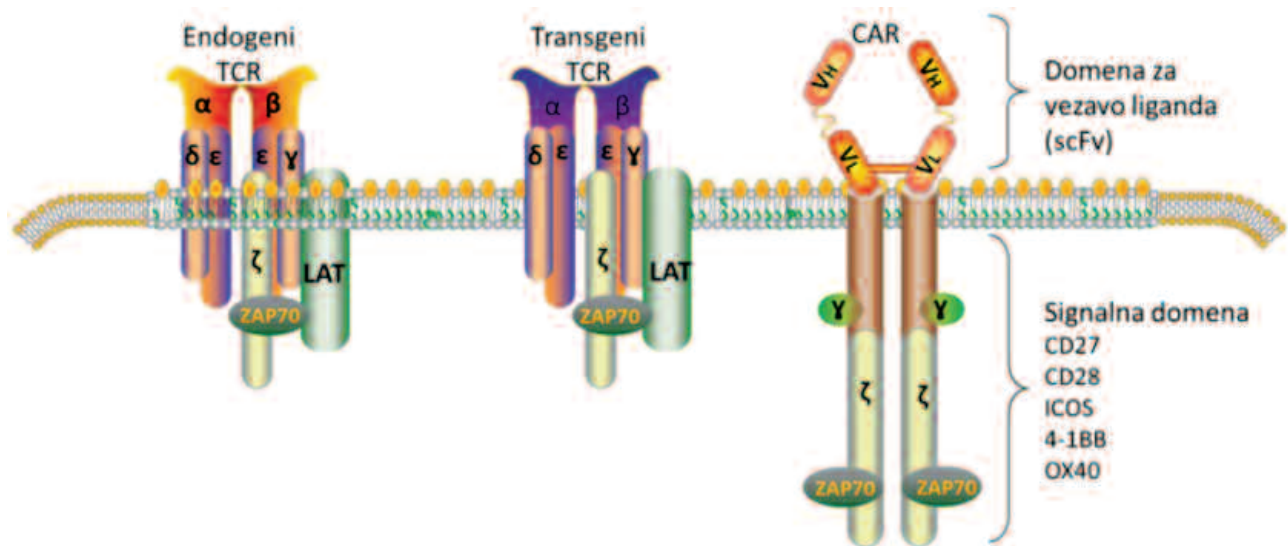
mernejši dostavni sistem, saj nimajo preferenčnega mesta integracije v genom blizu prepisovalnega mesta (15). Poleg tega imajo LV za gensko zdravljenje spremenjene dolge končne ponovitve (LTR) v regijah genoma U3 in U5, kar zmanjša genotoksičnost virusa. V postopku razvoja vektorja so regijo U3 zamenjali s citomegalovirusnim promotorjem, v regijo U5 pa so vstavili poliadenilacijsko mesto govejega gena za rastni hormon. Te spremembe po transdukciji povzročijo samoinaktivacijo virusa (virusu je onemogočeno razmnoževanje v gostiteljski celici, omejena pa je tudi možnost rekombinacije z virusi divjega tipa) (16).

2.2.2 Uporaba

Retrovire in LV za prenos genov *ex vivo* uporabljamo na treh področjih: zdravljenje levkemije, limfomov in tumorjev, zdravljenje infektivnih bolezni ter zdravljenje primarne imunske pomanjkljivosti. Slednja je posledica redkih genetskih napak, od katerih jih do sedaj poznamo najmanj 176, ki vplivajo na delovanje imunskega sistema (17). Gensko zdravljenje razvijajo le za nekatere od njih: za beta talasemijo (zdravljenje z LV vektorjem, ki ima vstavljen gen za človeški beta-globin, je v letu 2015 pridobilo status prebojnega zdravila v ZDA), hudo kombinirano imunsko pomanjkljivost s pomanjkanjem adenozin-deaminaze (ADA-SCID), na kromosom X vezano hudo kombinirano imunsko pomanjkljivost, sindrom Wiskott-Aldrich, kronično granulomatozno bolezen, metakromatsko levkodistrofijo in adrenolevkodi-

strofijo (zdravljenje z LV vektorjem, ki kodira človeško ABCD1 cDNA, je trenutno v fazi II/III v kliničnih raziskavah in ima status zdravila sirote v EU in ZDA) (11, 12, 18, 19, 20, 21, 22). Maja 2016 so v EU odobrili prvo *ex vivo* gensko zdravljenje za zdravljenje ADA-SCID pri otrocih. Gre za izolirane celice CD34+, transducirane z modificiranim γ -retrovirusom, ki v celice vnese funkcionalni gen za adenozin-deaminazo. Pri skoraj vseh tretiranih otrocih kasnejše intervencije zaradi bolezni niso bile več potrebne (12).

Pristopi za zdravljenje raka temeljijo na spreminjanju celic T z genskim inženirstvom. V kliničnih raziskavah se pojavljata dva *ex vivo* pristopa (slika 1). V prvem pristopu gensko spremenjene celice T izražajo T-celične receptorje (TCR) z izpopolnjenimi lastnostmi, ki vodijo v povišano afiniteto do antigenov oziroma novo specifičnost teh celic. V drugem pristopu gensko spremenjene celice T izražajo himerne T-celične receptorje (CAR), ki so specifični za tumorske antigene. Ti receptorji so sestavljeni iz citoplazemskega dela T-celičnega receptorja (CD3 ζ), transmembranske regije koreceptorja CD8 in ekstracelularnega enoverižnega fragmenta variabilnih regij protiteles (scFv), ki prepoznajo specifični antigen na površini rakavih celic. Po vezavi antigena na receptor se aktivira signalna pot, ki sproži sproščanje citotoksičnih snovi, ki pobijejo rakave celice (23). Trenutno sta najbolj obetavni dve klinični raziskavi v fazi II/III s celicami T, ki izražajo CAR: v prvem primeru so celice T spremenili z γ -retrovirusom in v drugem



Slika 1: Shematski prikaz celičnih receptorjev TCR in CAR T; prirejeno po (23).

Figure 1: Schematic representation of TCR and CAR T-cell receptors; adapted from (23).

primeru z LV (13, 14). Prva metoda je v EU in ZDA pridobila status prebojnega zdravila, medtem ko je druga pridobila status prebojnega zdravila v ZDA (24, 25). Čeprav obe obliki zdravljenja pri večjem deležu pacientov vodita v popolno remisijo limfoma, ostaja problem toksičnost spremenjenih celic T in pojav neželenih učinkov zdravljenja, kot sta nevrološka toksičnost in sindrom sproščanja citokinov. V *in vivo* raziskavah LV razvijajo za aplikacije pri zdravljenju mokre (neovaskularne) oblike starostne degeneracije rumene pege, Stargardtove bolezni in Usherjevega sindroma tipa 1B (14). Končana je tudi faza I/II klinične raziskave zdravljenja Parkinsonove bolezni *in vivo* z LV. Zdravilo se je izkazalo kot varno, brez hujših neželenih učinkov, pacienti z napredovalo Parkinsonovo boleznijo pa so kazali izboljšane motorične sposobnosti (26).

2.3 ADENOASOCIACIJSKI VIRUSI

2.3.1 Značilnosti vektorjev

AAV so majhni virusi brez ovojnice, z enoverižno DNA. V naravi lahko AAV okužijo človeka in ostanejo neaktivni v jedrih celic. Dosedanji rekombinantni virusni vektorji na podlagi AAV niso zmožni integracije v gostiteljski genom in torej nimajo genotoksičnega učinka (27). Njihova slabost je nezmožnost pomnoževanja, kar v delečih se celicah tekom delitev vodi v zmanjšanje ravni ekspresije transgena. Zato so najboljša izbira pri transfekciji počasi delečih se celic, npr. miocitov in kardiomiocitov (5). Plašč AAV je manj imunogen kot plašč adenovirusov, zato pri njihovi uporabi ni opaziti močnejšega systemskega imunskega odziva. Zaradi enostavnosti načrtovanja, produkcije ter varnosti so postali AAV eni najbolj obetavnih sistemov za začasno izražanje genov v genskem zdravljenju (2).

2.3.2 Uporaba

Pri prenosu gena *ex vivo* so AAV vektorji precej neučinkoviti, vendar pa obetavni rezultati na različnih področjih zdravljenja dokazujejo, da so dovolj varni in učinkoviti za dostavo gena v *in vivo* razmerah. V preteklih dveh desetletjih so opravili več kliničnih raziskav genskega zdravljenja bolezni centralnega živčnega sistema, retinopatij, dednih bolezni jeter in metabolnih bolezni (28, 29, 30). Poleg tega lahko s pomočjo AAV v krvni obtok uvajamo sekretorne proteine (eritropoietin, rastni hormon in IL-10) in faktorje strjevanja krvi (faktor VIII in faktor IX) (31). Injiciranje heterolognega AAV vektorja v mišično tkivo pa uporabljamo za zdravljenje Beckerjeve in Duchennove mišične distrofije (32, 33). Omenjeni mišični distrofiji sta posledica mutacije na genu DMD, kar povzroči pomanjkanje distrofina v telesu. Zaradi ome-

jene kapacitete AAV vektorja vanj ni možno vstaviti celotnega gena za distrofin. To omejitev so premagali z večjo deležjo zaporedja v centralni domeni distrofina, po kateri protein še vedno ohrani aktivnost (33). V kliničnih raziskavah za zdravljenje Beckerjeve distrofije uporabljajo tudi postopek, kjer v telo namesto gena za distrofin vnesejo gen za folistatin, s čimer so pri pacientih dosegli ponovno povečanje mišične mase (32). Čeprav so se AAV v genskem zdravljenju pojavili dokaj pozno in so jih leta 2011 uporabili le v 10 % kliničnih raziskav, temelji prvo komercialno zdravilo za gensko zdravljenje genetske napake prav na AAV (2). Alipogentiparvovek predstavlja AAV z vstavljenim genom za lipoprotein-lipazo. V EU so izdali dovoljenje za promet pripravka leta 2012 (34).

Pripravek alipogentiparvovek je namenjen odraslim pacientom, ki imajo dedno pomanjkanje encima lipoprotein-lipaza (LPLD) in zato kljub dieti z omejenim vnosom maščob v telo trpijo za hudimi napadi pankreatitisa (34). Bolezen se pojavi kot posledica mutacije gena, ki kodira LPL, ali z mutacijami na drugih genih, ki kodirajo proteine ali encime, ki neposredno vplivajo na aktivnost LPL (35). Strategije v zdravljenju LPLD pred uvedbo alipogentiparvoveka so ciljale predvsem na zmanjšanje ravni trigliceridov in s tem zmanjšanje tveganja za pojav pankreatitisa. Že uveljavljena zdravila za zmanjšanje trigliceridov niso učinkovita pri pacientih z LPLD, poleg tega zaradi kratkega razpolovnega časa LPL (15 min) ni uspešno niti nadomestno encimsko zdravljenje z intravensko aplikacijo encima. Glede na pomanjkanje učinkovitega zdravljenja LPLD je gensko zdravljenje predstavljalo nov pristop pri obvladovanju te bolezni. Za uspešno zdravljenje z alipogentiparvovekom zadostuje že enkratno intramuskularno injiciranje pripravka v nogo pacienta (34). Zaradi rekordno visoke cene (1 milijon dolarjev za zdravljenje enega bolnika) in posledično izredno zahtevnih pogojev odobritve financiranja, pa je bilo od izdanega dovoljenja leta 2012, kljub nadvse uspešnim rezultatom, izvedeno le eno zdravljenje z omenjenim genskim zdravljenjem (36).

Sedaj investitorji gojijo velike upe za gensko zdravljenje z voretigenneparvovekom, s katerim se je nedavno zaključila III. faza kliničnih raziskav. S pozitivnimi rezultati kliničnih raziskav bi lahko postalo drugo odobreno gensko zdravljenje v ZDA. Uporabljamo ga za zdravljenje Leberjeve kongenitalne amavroze tipa 2, ki je posledica mutacije v genu RPE65. Mutacija povzroči dedno avtosomno bolezen, ki se pojavi v prvem letu življenja in povzroči hudo slabovidnost ali slepoto. Voretigenneparvovek omogoča vnos nadomestnega nepoškodovanega gena RPE65 v oko pacienta. Rezultati po III. fazi kliničnih raziskav nakazujejo, da

je zdravljenje uspešno in brez resnih neželenih učinkov. Voretigenneparovok je nedavno v EU in ZDA pridobil status zdravila sirote, poleg tega pa ima v ZDA priznan še status prebojnega zdravila (37).

2.4 HERPES VIRUS

2.4.1 Značilnosti vektorjev

Virus herpesa simpleksa (HSV) vsebuje dolgo linearno dvoverižno DNA. Ikozaedrnno obliko kapside obdaja še ovojnica iz lipidnega dvosloja. Med okužbo se lipidni dvosloj ovojnice zlije z lipidnim dvoslojem gostiteljeve celice in tako virusu omogoči vstop v celico. Največja prednost HSV vektorjev v genskem zdravljenju je visoka kapaciteta virusa, ki dovoljuje vstavljanje daljših zaporedij eksogene DNA. Poleg tega kompleksnost virusnega genoma omogoča dizajniranje več različnih tipov oslabiljenih vektorjev z onkolitično aktivnostjo. HSV vektorji so tudi sposobni ohranjati doživljenjsko latentno fazo v senzoričnih ganglijih, iz katerih se nato dolgo časa izražajo transgeni (38).

2.4.2 Uporaba

Iz HSV virusa izhajajo trije različni HSV vektorji: replikacijsko kompetentni (onkolitični) vektorji, replikacijsko okvarjeni rekombinantni vektorji in amplikon, ki za svoje delovanje potrebuje pomožni virus. Ti vektorji so največkrat namenjeni zdravljenju raka in različnih bolezni živčnega sistema, npr. kronične bolečine (39). Kot najučinkovitejši se je zaenkrat izkazal talimogenlaherparepvek, ki je leta 2015 postal prvi odobreni onkolitični virus v EU in ZDA. Talimogenlaherparepvek je pripravek iz onkolitičnega HSV vektorja z vstavljenim genom za granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (GM-CSF), ki v telesu sproži sistemski protitumorski imunski odziv. Uporabljamo ga za lokalno zdravljenje kožnega in podkožnega melanoma. Pripravek injiciramo neposredno v rakasto tvorbo na dva tedna, najmanj pol leta. Klinično učinkovitost so potrdili pri 26,4 % pacientov z melanomom v III. ali IV. stadiju, pri 16,3 % pacientov pa je ta odziv trajal več kot pol leta (40).

3 SKLEP

Napredek v poznavanju genetskega ozadja bolezni vodi v hiter razvoj orodij za spreminjanje genoma. V letu 2012, zgolj 9 let po dokončanem projektu Človeški genom, so v

Evropi odobrili prvo gensko zdravljenje za humano uporabo. Razvoj sicer še vedno upočasnjujejo nekateri dejavniki, eden izmed glavnih je cena končnih zdravil. Stroški zdravljenja enega samega bolnika z alipogentiparvovekom znašajo rekordnih milijon dolarjev. Eden izmed razlogov, zakaj je gensko zdravljenje tako drago, je ta, da je cena ekstremno dragega razvoja in pridobitve dovoljenja za promet porazdeljena med majhno število potencialnih pacientov. Kljub temu lahko kmalu v prihodnosti na trgu pričakujemo nove vrste genskih zdravljenj, saj so nekatera zdravljenja v zadnjih fazah kliničnih raziskav s pozitivnimi rezultati in brez resnih neželenih učinkov že pridobila status prebojnega zdravila oz. zdravila sirote.

4 LITERATURA

1. Papadopoulos KI, Wattanaarsakit P, Prasongchean W et al. *Gene therapies in clinical trials*. In: Narain R. *Polymers and nanomaterials for gene therapy*. Elsevier; 2016: 231-256.
2. Lukashov AN, Zamyatnin AA Jr. *Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives*. *Biochemistry (Moscow)* 2016; 81(7): 700-708.
3. Merten OW, Gaillet B. *Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches*. *Biochem Eng J* 2016; 108: 98-115.
4. Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S et al. *Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(7): 2581-2584.
5. Giacca M. *Gene therapy*. Springer-Verlag; 2010.
6. Bayer W, Tenbusch M, Lietz R et al. *Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection*. *J Virol* 2010; 84(4): 1967-1976.
7. Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S et al. *The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multi specificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens*. *Mol Ther* 2008; 16(9): 1609-1616.
8. Watkins DI, Burton DR, Kallas EG et al. *Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans*. *Nat Med* 2008; 14(6): 617-621.
9. Pearson S, Jia H, Kandachi K. *China approves first gene therapy*. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1): 3-4.
10. Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. *T-lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years*. *Science* 1995; 270(5235): 457-480.
11. Bluebird bio. *FDA grants Breakthrough therapy designation to LentiGlobin for treatment of beta-thalassemia major*. <http://investor.bluebirdbio.com/>. Dostop: 13-10-2016.
12. GlaxoSmithKline. *Strimvelis™ receives European marketing authorisation to treat very rare disease, ADA-SCID*. <http://www.gsk.com>. Dostop: 12-10-2016.
13. Kite Pharma. *Pipeline*. <http://kitepharma.com>. Dostop: 28-10-2016.

14. Oxford BioMedica. R&D Pipeline. <http://www.oxfordbiomedica.co.uk>. Dostop: 28-10-2016.
15. Cattoglio C, Pellin D, Rizzi E et al. High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 2010; 116(25): 5507-5517.
16. Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 1999; 261(1): 120-132.
17. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol* 2013; 33(1): 1-7.
18. Cavazzana M, Six E, Lagresle-Peyrou C et al. Gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency: where do we stand? *Hum Gene Ther* 2016; 27(2): 108-116.
19. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013; 341(6148): 1233151.
20. Kaufmann KB, Chiriacco M, Siler U et al. Gene therapy for chronic granulomatous disease: current status and future perspectives. *Curr Gene Ther* 2014; 14(6): 447-460.
21. Biffi A, Montini E, Lorioli L et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 2013; 341(6148): 1233158.
22. Bluebird bio. bluebird bio receives U.S. and European Orphan drug designation for novel gene therapy to treat adrenoleukodystrophy. <http://investor.bluebirdbio.com>. Dostop: 13-10-2016.
23. June CH, Maus MV, Plesa G et al. Engineered T cells for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(9): 969-975.
24. Kite Pharma. Kite Pharma announces positive topline KTE-C19 data from ZUMA-1 pivotal trial in patients with aggressive non-hodgkin lymphoma (NHL). <http://ir.kitepharma.com/>. Dostop: 14-10-2016.
25. Novartis. Novartis highlights new CTL019 Phase II data demonstrating 93% complete remission in pediatric patients with r/r ALL. <https://www.novartis.com/>. Dostop: 14-10-2016.
26. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 2014; 383: 1138-1146.
27. Bokhoven M, Stephen SL, Knight S et al. Insertional gene activation by lentiviral and gamma-retroviral vectors. *J Virol* 2009; 83(1): 283-294.
28. Murlidharan G, Samulski RJ, Asokan A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front Mol Neurosci* 2014; 19: 76.
29. Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 2014; 43: 108-128.
30. Piccolo P, Brunetti-Pierri N. Gene therapy for inherited diseases of liver metabolism. *Hum Gene Ther* 2015; 26(4): 1-7.
31. Wang D, Zhong L, Nahid MA et al. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11(3): 345-364.
32. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V et al. A Phase 1/2a follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy. *Molecular Therapy* 2015; 23(1): 192-201.
33. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res* 2010; 316(18): 3087-3092.
34. Wierzbicki AS, Viljoen A. Alipogene tiparovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(1): 7-10.
35. Ferreira V, Petry H, Florence S. Immune responses to AAV-vectors, the Glybera example from bench to bedside. *Front Immunol* 2014; 5(82): 1-15.
36. Regalado A. The world's most expensive medicine is a bust. *MITs Technol Rev* 2016.
37. Spark Therapeutics. Spark Therapeutics announces new positive data from continuation of phase 3 trial of voretigene neparovec. <http://ir.sparktx.com>. Dostop: 13-10-2016.
38. Gene Therapy Net. Herpesvirus viral vectors. <http://www.genetherapy.net.com/viral-vector/herpesviruses.html>. Dostop: 12-06-2017.
39. Manservigi R, Argnani R, Marconi P. HSV Recombinant vectors for gene therapy. *Open Virol J* 2010; 4: 123-156.
40. Greig SL. Talimogene Laherparepvec: first global approval. *Drugs* 2016; 76(1): 147-154.



SODOBNA ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE MULTIPLE SKLEROZE IN TRENDI V PRIHODNOSTI

MODERN MEDICINES FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS AND FUTURE TRENDS

AVTOR / AUTHOR:

Urška Lučev, mag. farm.

*Javni zdravstveni zavod Mariborske lekarne Maribor
Minařkova ulica 6, 2000 Maribor*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: urska.zivko@gmail.com

1 MULTIPLA SKLEROZA

Multipla skleroza je kronična vnetna avtoimunska bolezen centralnega živčnega sistema (1), (2), (3). Zanj je značilno propadanje ovojnic živčnih vlaken (aksonov) zaradi demie-

POVZETEK

Multipla skleroza je kronična vnetna avtoimunska bolezen centralnega živčnega sistema. Aksoni zaradi demielinizacije propadejo in prihaja do odmiranja nevronov. Prizadeta so različna mesta centralnega živčnega sistema in ob različnih časih. Bolezen ves čas spremljajo zagoni (prehodna poslabšanja) in izboljšanja funkcij, pri čemer je izguba funkcije odvisna od mesta, ki je prizadeto. Bolezen vodi v trajno invalidnost bolnika. Farmakološko zdravljenje multiple skleroze obsega blaženje vnetne reakcije med zagoni, preprečevanje napredovanja bolezni in simptomatsko zdravljenje. V prispevku predstavljamo pregled različnih oblik multiple skleroze in načinov zdravljenja, ki so na voljo, ter obetavne terapevtske pristope v razvoju.

KLJUČNE BESEDE:

multipla skleroza, neželeni učinki, zdravljenje

POVZETEK

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory autoimmune disease affecting central nervous system. Axons of nerve cells are damaged due to demyelination, which leads to neuronal death. Neurons are affected in different places in the central nervous system and at different times. Patients experience sequential relapses and improvements of the central nervous system functions, with the loss of function depending on the affected place. Multiple sclerosis can lead to permanent disability. Pharmacological treatment comprises the management of multiple sclerosis relapses, slowing down disease progression and symptomatic treatment. The article represents an overview of different forms of multiple sclerosis and available treatments, as well as discusses new promising experimental treatments.

KLJUČNE BESEDE:

multiple sclerosis, side effects, therapy

linizacije, poškodbe in izgube mielina (1). Demielinizacija je lahko reverzibilna in jo enačimo z aktivnostjo vnetja ter zagoni bolezni, medtem ko je nevrodegeneracija, ki jo spremlja, nepovratna in s časom povzroča napredovanje invalidnosti (2). Prizadeta so različna mesta centralnega živčnega sistema in ob različnih časih. Bolniki ves čas doživljajo zagoni (prehodna poslabšanja) in izboljšanja funkcij central-

nega živčnega sistema, pri čemer je izguba funkcije odvisna od mesta, ki je prizadeto. Remisija bolezni je povezana z zmanjšanjem vnetnega edema in delno z remielinizacijo. Bolezen se pogosteje pojavlja pri ženskah, običajno med 20. in 50. letom starosti (1). Zdravljenje multiple skleroze je tradicionalno osredotočeno na preprečevanje škode, ki jo povzroči vnetje na mielinskih ovojnica. Vsa zdravila, ki so trenutno na voljo za spreminjanje bolezni, so imunomodulatorji. Omejitve tega pristopa so spodbudile raziskave novih potencialnih terapevtskih strategij. Eden izmed obetavnih pristopov je spodbujanje endogenega remielinizacijskega sistema (3).

1.1 ETIOLOGIJA

Podrobne etiologije bolezni zaenkrat še ne poznamo. Gre za vnetni proces proti lastnim molekulam v beli materiji možganov in hrbtenjače. Verjetno so v razvoj bolezni vpleteni genetski, okoljski in infekcijski dejavniki ter avtoimuni mehanizmi. Zaenkrat še niso dokazali povezave med multiplo sklerozo in kakršno koli okužbo. Čeprav se bolezen pogosteje pojavlja znotraj družine, prav tako ni značilnega vzorca dedovanja (1).

1.2 PATOFIZIOLOGIJA

Antigen, ki posnema strukturo mielina, aktivira imunski sistem. Imunski sistem poškoduje oligodendrocite, ki so odgovorni za produkcijo mielina, ter sleče mielinsko ovojnico aksonov. K demielinizaciji in izgubi aksonov prispevajo imunološki mehanizmi, kot so citotoksični limfociti T, aktivirana mikroglia (fagociti in antigen predstavitvene celice v centralnem živčnem sistemu), invazivni makrofagi, naravne celice ubijalke in avtoprotitelesa, ki jih proizvajajo limfociti B (4). Demielinizacija se kaže kot prekinjeno prevajanje signala po aksonu z enim ali več simptomi: zamegljen vid, okorelost mišic, mišična šibkost, tremor, utrujenost, vrtoglavica in okvara kognitivnih funkcij. Delovanje prizadetih področij se lahko povrne s ponovno tvorbo mielina (remielinizacija). Če je poleg mielina okvarjen tudi akson, lahko pride do trajne okvare funkcije tega področja v centralnem živčnem sistemu, saj je sposobnost obnavljanja živčnih celic zelo omejena (3, 5).

Haines in sodelavci so postavili hipotezo, da lahko do poškodbe aksona pride ne samo zaradi demielinizacije, ampak tudi neodvisno. Predstavili so biokemijske, klinične in nevropatološke dokaze ter dokaze slikovne diagnostike, ki podpirajo hipotezo, da je nevrodegeneracija ali direktna posledica demielinizacije ali pa od nje neodvisen sočasni dogodek (6).

1.3 KLINIČNA SLIKA

Bolezen se najpogosteje pojavi med 20. in 45. letom, diagnoze v puberteti in po 60. letu so redke. Klinično glede na različne vzorce bolezni delimo na recidivno-remitentno multiplo sklerozo, primarno progresivno multiplo sklerozo in sekundarno progresivno multiplo sklerozo.

1.3.1 Recidivno-remitentna multipla skleroza

Je najpogostejša oblika (pojavnost je 80 do 90 %). Pojavijo se akutni vnetni napadi, zagoni, ki so povezani z delno invalidnostjo, vmes pa se pojavljajo obdobja brez simptomov (1, 4, 7). Pogosto se razvije v sekundarno progresivno multiplo sklerozo, kjer je prisotna hujša nezmožnost gibanja, obdobja brez simptomov pa so skrajšana ali pa jih sploh ni (3, 7).

1.3.2 Primarna progresivna multipla skleroza

Bolezen se navadno začne pozneje kot recidivno-remitentna oblika in enako pogosto prizadene moške in ženske (1, 2, 3). Je nevnetna oziroma najmanj vnetna patološka oblika multiple skleroze. Pojavi se redkeje (pri 10 do 20 % bolnikov). Značilno je postopno klinično poslabšanje od začetka bolezni (4, 7).

1.3.3 Sekundarna progresivna multipla skleroza

V 80 % nezdravljenih primerov recidivno-remitentna multipla skleroza v nekaj letih preide v sekundarno progresivno. Stanje bolnikov se počasi slabša tudi med zagoni bolezni, točna točka, kdaj ena oblika bolezni preide v drugo, pa ni klinično ali slikovno jasno določena, prehod je običajno postopen (1, 7, 8).

1.4 SIMPTOMI IN ZNAKI

Najpogostejši simptomi multiple skleroze oziroma težave, zaradi katerih bolnik obišče zdravnika, so:

- Senzorične motnje (parestezije, Lhermittov znak – občutek potovanja elektrike navzdol po hrbtu in v noge ob nagibu glave naprej);
- Motorične motnje in motnje ravnotežja (okornost, utrujenost, huda pareza);
- Motnje vida – vnetje vidnega živca;
- Simptomi prizadetosti možganskih živcev (dvojni vid, periferne pareze obraznega živca, nevralgija trigeminusa, vrtoglavica, omotičnost);
- Utrudljivost;
- Redki simptomi v zgodnjem poteku bolezni (simptomi prizadetosti malih možganov, npr. motnje gibanja, težave pri uriniranju, kognitivne motnje in bolečine) (1, 9).

Pri nekaterih bolnikih nastopita samo en ali dva napada z majhnim rezidualnim nevrološkim primanjkljajem in so lahko vrsto let brez simptomov. Poznamo pa tudi ekstremne primere, pri katerih se nevrološki primanjkljaj seštevata in se kot zadnja faza bolezni pojavijo tetrapareza, ataksija, slepota, inkontinenca in demenca. Smrt je posledica ponavljajočih se okužb urinarnega trakta, uremije in bronhopnevmonije (1).

1.5 ZAGON BOLEZNI

Zagon imenujemo nevrološke simptome in znake, ki so značilni za akutne vnetne ali demielinizacijske bolezni centralnega živčnega sistema. Trajati morajo vsaj 24 ur, med posameznimi mora miniti vsaj 30 dni in potekajo brez prisotnosti povišane telesne temperature. Zagon lahko vodi v trajen nevrološki izpad, simptomi se izboljšajo le v zgodnji fazi bolezni. Za preprečevanje frekvence zagonov lahko koristijo čim prejšnja uvedba imunomodulatornih zdravil, ukrepi proti psihosocialnemu stresu in preprečevanje virusnih okužb (6).

2 ZDRAVLJENJE MULTIPLE SKLEROZE

Farmakološko zdravljenje obsega blaženje vnetne reakcije med zagoni, preprečevanje napredovanja bolezni in simptomatsko zdravljenje (10). Čeprav je razvoj delujočih terapij v porastu, zdravila za multiplo sklerozo še niso odkrili in bolniki, ki zbolijo za to boleznijo, še vedno trpijo zaradi kronične napredujoče invalidnosti (11, 12). Trenutno zdravljenje z imunomodulatornimi zdravili je učinkovito za bolnike z recidivno-remitentno obliko, pri primarni progresivni pa ne delujejo (3).

2.1 ZDRAVLJENJE ZAGONA

Zagone zdravimo z infuzijami kortikosteroidov (0,5 do 1 g metilprednizolona dnevno, 3 do 5 dni). S tem blažimo vnetno reakcijo in skrajšamo trajanje zagona (10, 12).

2.2 SIMPTOMATSKO ZDRAVLJENJE

Blažimo ali odpravljamo simptome, kot so spastičnost, bolečine, moteno delovanje sečnega mehurja, težave pri gibanju, depresija in drugi simptomi (9, 12). S tem bolnikom izboljšamo kakovost življenja. To je edina oblika zdravljenja, ki ga imamo na voljo pri bolnikih s primarno progresivno boleznijo. Novi učinkovini za zdravljenje simptomov in za-

pletov pri multipli sklerozi sta fampridin, selektivni antagonist kalcijevih kanalov, ki pri odzivnih bolnikih izboljša motorične sposobnosti, in zmes kanabinoidov nabixsimols, ki jo uporabljamo za zmanjšanje spastičnosti in lajšanje nevropatske bolečine (13).

2.3 IMUNOMODULATORNA ZDRAVILA

Imunomodulatorna zdravila upočasnijo napredovanje bolezni. Zdravila prvega izbora so interferoni beta in glatiramer acetat, s katerimi dosežemo zmanjšanje frekvence zagonov bolezni za približno 30 %, zmanjša se intenzivnost zagonov, število vidnih lezij na MRI se zmanjša za polovico in upočasnijo se napredovanje invalidnosti (3, 10, 12). V letu 2015 sta bili v Sloveniji odobreni dve peroralni učinkovini prvega izbora, teriflunomid in dimetil fumarat. Teriflunomid selektivno in reverzibilno zavira dihidroorotat-dehidrogenazo, ključni mitohondrijski encim v *de novo* sintezi pirimidina, kar vodi k zmanjšanju širjenja aktiviranih limfocitov T in B, ne pride pa do celične smrti (preglednica 1) (14). Dimetil fumarat spodbuja izločanje protivnetnih mediatorjev in zmanjša oksidativne poškodbe ter posledično demielinizacijo živčnih vlaken, kar vodi v večje ohranjanje aksonov in izboljšane motorične funkcije (preglednica 1) (15).

Ko zdravila prvega izbora niso učinkovita ali gre za zelo aktivno multiplo sklerozo, uporabimo zdravila drugega izbora: natalizumab, fingolimod in novejši alemtuzumab (preglednica 1) (12).

Imunomodulatorna zdravila drugega izbora so učinkovita za zdravljenje zelo aktivne recidivno-remitentne oblike pri odraslih bolnikih, kjer je kljub zdravljenju z zdravili prvega izbora potek bolezni zelo aktiven, ali za bolnike s hitro napredujočo in zelo aktivno boleznijo. So učinkovitejša od zdravil prvega izbora, imajo pa več neželenih učinkov. Najpogostejši resni neželeni učinek so okužbe, pri fingolimodu pa tudi vpliv na srčno-žilni sistem (preglednica 1) (16, 17). Zdravljenje z imunomodulatornimi zdravili danes začnemo prej kot pred nekaj leti, saj je iz raziskav razvidno, da so ta zdravila učinkovitejša, če jih bolnik začne uporabljati v zgodnji fazi multiple skleroze. Koncept stopnjevanja zdravljenja vključuje prehod na učinkovitejše učinkovine, kot sta fingolimod in natalizumab (9).

2.4 PRIHODNOST ZDRAVLJENJA

Trenutno uporabljana zdravila delujejo tako, da zmanjšajo aktivnost imunskega sistema ali pa zavrejo vstop celic imunskega sistema v centralni živčni sistem. Tako se zmanjšata frekvenca zagonov in jakost napadov, poškodbe mielinskih ovojnica pa ostanejo nepopravljene. Kronična de-

Preglednica 1: Način aplikacije, način delovanja in neželeni učinki zdravil za zdravljenje multiple skleroze.

Table 1: Route of administration, mode of action and side effects of agents for multiple sclerosis treatment.

UČINKOVINA	NAČIN DELOVANJA	NEŽELENI UČINKI (pogostost)
Interferon beta-1b	Veže se na specifične receptorje na površini celic imunskega sistema in spremeni ekspresijo številnih genov. Sinteza vnetnih citokinov je zavarta, proizvodnja protivnetnih (IL-4, IL-10) pa se poveča, kar izzove humoralni (Th2) imunski odziv (18), (19).	Neželeni učinki na mestu injiciranja (85 %), gripi podobni simptomi (34 %), glavobol (32 %), nespečnost (31 %), mialgija (26 %), slabost, parestezija (16 %), miastenija, povišani jetrni encimi, limfopenija (11 %), depresija (8 %) (18)
Interferon beta-1a		
Glatiramer acetat	Deluje imunomodulatorno na celice prirojenega in pridobljenega imunskega odziva. Sodeluje pri modulaciji antigen predstavitev celic, kot so monociti, dendritične celice, CD4+ T(h) celice, CD8+ T celice. Najnovejše raziskave omenjajo tudi, da vpliva na funkcijo celic B (20).	Reakcije na mestu injiciranja (80 %), distrofija podkožnega mišičja (2 %) (21)
Fingolimod	Je modulator receptorja za sfingozin-1-fosfat (S1P1) na limfocitih. Zavira prehod limfocitov iz limfatičnih tkiv v periferno cirkulacijo in centralni živčni sistem (22).	Nazofaringitis, limfopenija (10 %), levkopenija, zmanjšanje števila limfocitov (6 %), prehodni srčni dogodki (bradikardija), edem makule ter dvig vrednosti jetrnih encimov (23)
Natalizumab	Humanizirano monoklonsko protitelo, ki inhibira migracijo limfocitov preko hematoencefalne bariere tako, da zavre adhezivno molekulo α 4-integrin (24).	Utrujenost (27 %), nazofaringitis (17 %), gripa (13 %), glavobol (5 %), reakcija na mestu injiciranja (4 %) (25)
Dimetilfumarat	Spodbuja izločanje protivnetnih mediatorjev in zmanjša oksidativne poškodbe ter posledično demielinizacijo živčnih vlaken, kar vodi v večje ohranjanje aksonov in izboljšane motorične funkcije (15, 26).	Rdečica (32 %), driska (19 %), slabost (13 %), bolečine v trebuhu, proteinurija (12 %), srbečica (8 %), bruhanje (7 %) (26)
Teriflunomid	Selektivno in reverzibilno zavira dihidroorotat-dehidrogenazo in s tem inhibira sintezo pirimidina. To ima citostatični učinek na proliferacijo aktiviranih limfocitov T in B (14, 27).	Nazofaringitis (26 %), glavobol (19 %), driska (18 %), utrujenost (15 %), povišani jetrni encimi, slabost (14 %), izpadanje in tanjšanje las (13 %), gripa, bolečine v križu (12 %), okužbe urinarnega trakta (10 %), bolečine v rokah in nogah (9 %) (27)
Alemtuzumab	Humanizirano monoklonsko protitelo proti CD52, membranskemu proteinu na zrelih limfocitih in monocitih (28).	Reakcije na mestu injiciranja (90 %), okužbe (70 %), težave s ščitnico (30 %), trombocitopenija (1 %), glomerulonefritis (0,3 %) (28)
Peginterferon beta-1a	Je pegilirana oblika IFN beta 1a. Povečana velikost molekule zmanjša hitrost glomerulne filtracije in podaljša razpolovni čas. Izboljšana je stabilnost in topnost molekule. Imunogenost je zmanjšana (29).	Reakcija na mestu injiciranja (56 %), gripi podobni simptomi (47 %), povišana telesna temperatura (44 %), glavobol (41 %) (29)
Mitoksantron	Inhibira proliferacijo celic T in B, poveča sintezo protiteles in deaktivira makrofage (30).	Slabost in bruhanje (18 do 85 %), izpadanje las (33 do 61 %), amenoreja (8 do 53 %), okužbe urinarnega trakta (6 do 32 %), okužbe zgornjih dihalnih poti (4 do 53 %), levkopenija (10 do 19 %) (31)
Daklizumab	Humanizirano monoklonsko protitelo IgG1 proti podenoti IL-2 receptorja CD25 alfa. Blokira receptor IL-2 in zavre avtokrino IL-2 signalno zanko, s čimer direktno zatire ekspanzijo celic T in tako zmanjša aktivnost bolezni. Pride do ekspanzije naravnih celic ubijalk CD56 in do blokade CD25 na celicah T (32).	Okužbe (nazofaringitis, okužbe zgornjih dihal in urinarnega trakta) (65 %), kožne nepravilnosti (ekcem, kontaktni, seboroični dermatitis, alopecija) (20 %), povišani jetrni testi (4 %) (32)



mielinizacija vodi do degeneracije aksonov in lahko celo do izgube nevronov, kar je tesno povezano s klinično invalidnostjo in potrebo po zdravljenju, ki omogoča preživetje nevronov. Da bi to dosegli, bi morali odkriti načine zdravljenja, ki omogočajo popraviljanje mielina in ščitijo nevrone (11).

2.4.1 Ponesimod

Ponesimod je selektivni modulator receptorja S1P1 (sfin gozin-1-fosfat). Limfocitom preprečuje, da zapustijo timus in druge limfne organe. Trenutno je v 3. fazi kliničnih preizkušanj. Apliciramo ga *per os*, ima krajši čas eliminacije kot fingolimod in manj neželenih učinkov, zlasti na srce (33). Najpogostejši neželeni učinki so utrujenost, bradikardija, dispneja, vrtoglavica in glavobol (17).

2.4.2 Remielinizacija

Remielinizacija je nov pristop k zdravljenju. Sicer poteka endogeno, pri bolnikih z multiplo sklerozo pa včasih ne deluje (3, 11). Nova mielinska ovojnica je tanjša in krajša od nepoškodovane, vendar še zmeraj deluje. Remielinizacija naj bi imela tudi nevroprotektivne lastnosti – preprečevala naj bi sekundarno škodo na aksonih, ki nastane pri multipli sklerozi (3). Ena izmed hipotez za nedelovanje endogene remielinizacije je, da je število odraslih oligodendrocitnih prekurzorskih celic, ki se odzovejo na poškodbo in so sposobne proliferacije in diferenciacije v zrele oligodendrocite, ki mielinizirajo aksone, osiromašeno oziroma da oligodendrocitne prekurzorske celice pri bolnikih z multiplo sklerozo niso sposobne dozoreti v mielin producirajoče oligodendrocite. Če v kateri koli stopnji v tem procesu pride do poškodbe, se remielinizacija ne zgodi (3, 11). Motnje v krvno-možganski barieri, bazalni lamini, redukcija astroglioze (zmanjšanje nenormalno povečanega števila astrocitov zaradi uničenja okoliških nevronov zaradi travme, okužbe, ishemije, avtoimunega odgovora), pa tudi z boleznijo nepovezani dejavniki, kot so starost, spol, vrsta prehrane in genetsko ozadje, vplivajo na učinkovitost remielinizacije. Predlagani mehanizem remielinizacije (povečana sposobnosti remielinizacije endogenih oligodendrocitnih prekurzorskih celic) je modulacija intrinzičnih signalnih poti z oligodendrociti, da bi ustavili zaviranje remielinizacije in spreminjanje zunajceličnega okolja v lezijah multiple skleroze. Če endogene oligodendrocitne prekurzorske celice zaznajo poškodbe in vstopijo v lezije, se tam ne morejo diferencirati, tudi povečanje njihove proliferacije/migracije ne bo bistveno spremenilo kapacitete za remielinizacijo aksonov. Po zaviranju vnetja je tako bistveno spodbujanje preživetja in diferenciacije en-

dogenih odraslih oligodendrocitnih prekurzorskih celic, kar stimulira remielinizacijo v spremenjenem mikrookolju v lezijah multiple skleroze skupaj s podaljšanim preživetjem aksonov, da bodo le-ti lahko učinkovito remielinizirani (preglednica 2) (11).

2.4.3 T celice pomagalk 17 (Th 17)

Th 17 ščitijo pred glivičnimi in bakterijskimi okužbami. Študije so pokazale tudi pomembno vlogo Th17 pri patogenezi avtoimunskih demielinizacijskih bolezni pri miših in ljudeh. Th17 so pretežno odgovorne za prisotno vnetje, ki je značilno za obe progresivni obliki multiple skleroze. Th17 izdelujejo citokine IL-17, ki so odgovorni za regulacijo proteinov tesnih stikov v krvno-možganski barieri, povečajo njeno prepustnost in spodbujajo gibanje topnih vnetnih molekul in drugih imunskih celic v centralnem živčnem sistemu. Predpostavljajo, da IL-17 prav tako sodeluje v procesu remielinizacije, zmanjšajo preživetje in spodbujajo apoptozo oligodendrocitov (37). Mehanizem delovanja ostaja neznan (4).

Th17 izločajo tudi citokine IL-23, GM-CSF, IL-21, ki so jih zaznali v limfocitih, infiltriranih v lezijah bele materije pri multipli sklerozi. GM-CSF so citokini, ki igrajo ključno vlogo pri patogenosti celic Th17 v eksperimentalnem avtoimunskem encefalomielitis. Miši, ki nimajo GM-CSF, so imune na eksperimentalni avtoimunski encefalomielitis. Produkcija GM-CSF je bistvena za sposobnost Th17 za indukcijo eksperimentalnega avtoimunskega encefalomielitisa, pri čemer sodelujejo tudi periferni makrofagi, vnetni monociti in celice T. IL-21, čigar administracija pred indukcijo eksperimentalnega avtoimunskega encefalomielitisa spodbudi vnetni inluks v centralni živčni sistem in vpliva na resnost bolezni, imajo pomembno vlogo pri nastajanju in širjenju Th17. Th17 izločajo tudi citokine IL-22, katerih vloga pri multipli sklerozi še ni povsem znana. Visoke ravni IL-22 in celic, ki izdelujejo IL-22, so zaznali v serumu, cerebrospinalni tekočini in periferni krvi bolnikov z multiplo sklerozo. IL-22 naj bi spodbujali motnje v krvno-možganski barieri *in vitro* in *in vivo*. Potencialna patogena vloga celic Th17 pri multipli sklerozi in drugih avtoimunskih boleznih bi lahko bila povezana z njihovo povečano sposobnostjo preživetja, samoobnavljanja, ustvarjanja učinkovitih potomcev in vstopanja v spominski bazen kot učinkovitejše od celic Th1, pa tudi z njihovim upiranjem aktivaciji inducirane celične smrti. Ob prisotnosti IL-12 celice Th17 proizvajajo tudi IFN- γ . Celice, ki izločajo oba, IL-17 in IFN- γ , imenujemo celice Th1/17, ki lahko skupaj z neklasičnimi celicami Th1 prispevajo k patogenezi bolezni skozi lastnosti, ki so skupne Th1 in Th17. Poleg tega pa so celice, ki proizvajajo IFN- γ obo-

Preglednica 2: Potencialne remielinizacijske in neuroprotektivne terapije pri multipli sklerozi.

Table 2: Potential remyelinating and neuroprotective therapies in multiple sclerosis.

Učinkovina	Predviden mehanizem delovanja	Rezultati raziskav
Amilorid (tarčno delovanje na ASIC-1)	Tarčno delovanje amilorida na ASIC 1 prispeva k znotrajceličnemu kopičenju Na ⁺ in Ca ²⁺ v lezijah (34).	Klinične raziskave kažejo na neuroprotektivne učinke pri možganski atrofiji pri bolnikih s PPMS (34).
Opicinumab (anti-LINGO-1 monoklonsko protitelo)	Poveča diferenciacijo in mielinacijo OPC (35).	Pri bolnikih s prvo epizodo optičnega nevrinitisa se je pokazalo izboljšanje prevajanja živčnega impulza po prizadetem optičnem živcu. Faza 2 kliničnega preizkušanja je zaključena (35).
Benzotropin	Antagonist muskarinskih receptorjev M1/M3 (11).	V eksperimentalnih modelih MS so dokazali, da spodbuja diferenciacijo OPC in poveča remielinizacijo. (11)
Gvanabenz	Agonist adrenergičnih receptorjev α2 (11).	Predklinične raziskave na eksperimentalnem avtoimnskem encefalomyelitisu so pokazale, da ščiti oligodendrocite, poveča njihovo preživetje in ščiti pred izgubo mielina (11).
Lakvinimod	Je kinolonski derivat, ki zmanjša aktivacijo mikroglie in astrocitov. Poveča neuroprotekcijo in ohranjanje mielina (11).	Klinične raziskave kažejo na neuroprotekcijo pri možganski atrofiji (11).
Olesoksim	Zmanjša oksidativni stres, spodbuja dozorevanje oligodendrocitov in sintezo mielina (11).	Pospešuje dozorevanje oligodendrocitov in poveča mielinizacijo <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> , brez da bi vplival na preživetje ali proliferacijo oligodendrocitov. Faza I pri bolnikih z multiplo sklerozo zaključena (11).
Kvetiapin fumarat	Spodbuja proliferacijo in dozorevanje oligodendrocitov, poveča nevtrofične faktorje in zavira aktivirano mikroglia, astrocite in limfocite T (11).	Remielinizacijske in neuroprotektivne lastnosti na eksperimentalni avtoimunski encefalomyelitis (11).
rHlgM22	Veže se na površino oligodendrocita in spodbuja popraviljanje mielina (11).	Predklinične raziskave so pokazale, da bi lahko ščitil oligodendrocite in spodbujal popraviljanje mielina. Faza I kliničnega preizkušanja je pokazala ugoden varnostni profil (11).

gatene z mielin-oligodendrocit-glikoprotein specifičnimi celicami T. Selektivno ciljanje na posamezne citokine Th17, kot sta IL-17 in GM-CSF, z monoklonskimi protitelesi, ni pokazalo učinka, čeprav so dokazali, da so celice Th17 vpletene v patogenezo. To kaže, da se patogenost Th17 opira tudi na druge dejavnike. Za omejevanje vnetja bi bilo zato verjetno učinkovitejše inhibiranje celotnega programa diferenciacije Th17 (4).

3 SKLEP

Multipla skleroza zaenkrat ostaja neozdravljiva bolezen, čeprav je na voljo že veliko zdravil, ki lajšajo simptome in zmanjšajo število zagonov. Potrebujemo pa nove pristope,



Preglednica 3: Terapevtski pristopi s ciljanjem na celice Th17.

Table 3: Therapeutic approaches targeting Th17 cells.

Učinkovina	Funkcionalna vloga	Faza raziskav in dognanja
Sekukinumab	Nevtralizira IL-17A (36)	V 63 % zmanjša nove lezije na MRI v primerjavi s placebom. Zmanjšanje letnih zagonov ni statistično značilno. V uporabi za zdravljenje zmerne do hude psoriaze s plaki (36).
Iksekizumab	Nevtralizira IL-17 (36)	Trenutno v fazi preizkušanja pri psoriazi (36).
Ustekinumab	Nevtralizira podenoto p40, značilno za IL-12 in IL-23. Ker blokira IL-12 in IL-23, zavre oba odgovora, kar lahko pojasni nizko učinkovitost pri multipli sklerozi, če upoštevamo, da motnje odgovora celic Th1 določajo povečano dovzetnost namesto zaščite pred eksperimentalnim avtoimunskim encefalomyelitisom (36).	Ni dokazane učinkovitosti pri zmanjšanju vnetja pri multipli sklerozi (36).
Tildrakizumab Guselkumab AMG 139BI 655066LY3074828	Nevtralizirajo p19 podenoto IL-23. (36)	Trenutno v fazi preizkušanja za zdravljenje avtoimunskih bolezni. Pričakujemo spodbudne rezultate pri zdravljenju multiple skleroze (36).
Digoksin Ursolna kislina	Interferirata s transkripcijskim faktorjem ROR γ t (idealna tarča za manipulacijo odgovora celic Th17). Digoksin zmanjša diferenciacijo celic Th1 pri miših in zmanjša resnost eksperimentalnega avtoimunskega encefalomyelitisa, ursolna kislina ima podoben učinek (36).	Predklinična preizkušanja (36)

ki bodo popravili škodo na aksonih, še zlasti pri progresivni obliki bolezni, pri kateri je trenutno zdravljenje praktično neučinkovito. Obetamo si nove načine zdravljenja, ki bi bolnikom z multipla sklerozo preprečili klasičen potek bolezni, ki trenutno vodi v invalidnost. Eksperimentalni modeli (*in vitro* in *in vivo*) so pokazali, da lahko z ohranjanjem mielina in remielinacijo aksonov povečamo preživetje nevronov. Remielinacija lahko obnovi nevronske funkcije in prepreči morebitno izgubo nevronov ter prepreči invalidnost. Raziskave podenote Th17, citokinov in transkripcijskih faktorjev, ki regulirajo njeno diferenciacijo, nam prinašajo boljše razumevanje vloge celic T pri pridobljeni imunosti. Še zmeraj pa ostaja veliko odprtih vprašanj, zlasti bo treba najti ravnotežje med delovanjem učinkovin in neželenimi učinki.

4 LITERATURA

1. Kumar P, Clark M. *Pocket Essentials of Clinical Medicine*. Elsevier; 2007: 747-750.
2. Magdič J. *Nevrodegeneracija pri multipli sklerozi*. *Med Razg* 2014; 53 Suppl 5: 3- 9.
3. Murphy RP, Murphy KJ, Pickering M. *The development of myelin repair agents for treatment of multiple sclerosis*. *Progress and challenges*. *Bioengineered* 4:3; 2013: 140-146.
4. Volpe E, Battistini L, Borsellino G. *Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis*. *Mediators of Inflammation* 2015.
5. Hankey GJ, Wardlaw JM. *Clinical Neurology*. Manson Publishing; 2008: 340.

6. Haines JD, Inglese M, Casaccia P. Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med* 2011; 78: 231-243.
7. Šega Jazbec S. Multipla skleroza. *Farm Vest* 2016; 67: 174-178.
8. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83(3): 278-286.
9. Baumhackl U, Mayerhofer S. Osebam z MS v pomoč pri skupnih odločitvah za zdravljenje. Novartis Pharma Services; 2013.
10. Ferjančič M. Smernice za rehabilitacijo Bolnikov z multiplo skleroza. *Rehabilitacija* 2014; 13(supl 1): 77-83.
11. Harlow DE, Honce JM, Miravalle AA. Remyelination therapy in multiple sclerosis. *Front. Neurol* 2015; 6: 257.
12. Hojs Fabjan T. Zdravljenje multiple skleroze. *Farm Vest* 2015; 66.
13. Šega Jazbec S. Novosti pri simptomatskem zdravljenju multiple skleroze. *Med Razg.* 2014; 53(Suppl 5): 17-20.
14. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F et al. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* 2014; 74(6): 659-674.
15. Scannevin RH, Chollate S, Jung MY et al. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 341(1): 274-284.
16. Hojs Fabjan T. Imunomodulatorna zdravila drugega izbora. *Med Razg.* 2014; 53(Suppl 5): 21-25.
17. Brossard P, Derendorf H, Xu J et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ponesimod, a selective S1P1 receptor modulator in the first-in-human study. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 76(6): 888-896.
18. Jankovic SM. Injectable interferon beta-1b for the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis. *J Inflamm Res* 2010; 3: 25-31.
19. McGraw CA, Lublin FD. Interferon beta and glatiramer acetate therapy. *Neurotherapeutics* 2013; 10(1): 2-18.
20. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011; 25(5): 401-414.
21. Caporro M, Disanto G, Gobbi C et al. Two decades of subcutaneous glatiramer acetate injection: current role of the standard dose and new high-dose low-frequency glatiramer acetate in relapsing-relapsing multiple sclerosis treatment. *Patient Prefer Adherence* 2014; 8: 1123-1134.
22. Kappos L, Radue EW, O'Connor P et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 387-401.
23. Khatri BO. Fingolimod in the treatment of relapsing-relapsing multiple sclerosis: long-term experience and an update on the clinical evidence. *Ther Adv Neurol Disord* 2016; 9(2): 130-147.
24. Hoepfner R, Faissner S, Salmen A et al. Efficacy and side effects of natalizumab therapy in patients with multiple sclerosis. *J Cent Nerv Syst Dis* 2014; 6: 41-49.
25. Polman C.H., O'Connor P.W., Havrdova E. et al. A Randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 899-910.
26. Gold R, Kappos L, Arnold DL et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1098-1107.
27. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1293-1303.
28. Ruck T, Bittner S, Wiendl H et al. Alemtuzumab in multiple sclerosis: mechanism of action and beyond. *Int J Mol Sci* 2015; 16(7): 16414-16439.
29. Bhargava P, Newsome SD. An update on the evidence base for peginterferon β 1a in the treatment of relapsing-relapsing multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2016; 9(6): 483-490.
30. Chan A, Weillbach FX, Toyka KV et al. Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 2005; 139(1): 152-158.
31. Fox E.J. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clin Ther* 2006; 28(4): 461-474.
32. Lizrova Preiningerova J, Vachova M. Daclizumab high-yield process in the treatment of relapsing-relapsing multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2017; 10(1): 67-75.
33. Ambrosio DD, Freedman MS, Prinz J. Ponesimod, a selective S1P1 receptor modulator: a potential treatment for multiple sclerosis and other immune mediated diseases. *Ther Adv Chronic Dis* 2016; 7(1): 18-33.
34. Arun T, Tomassini V, Sbardella E et al. Targeting ASIC1 in primary progressive multiple sclerosis: evidence of neuroprotection with amiloride. *Brain* 2013; 136(Pt 1): 106-115.
35. Biogen. 215ON201 BIIB033 in acute optic neuritis (AON) (RENEW). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01721161>. Dostop: 25-6-2017.
36. Garnock-Jones KP. Secukinumab: a review in moderate to severe plaque psoriasis. *Am J Clin Dermatol* 2015; 16(4): 323-330.
37. Ruocco G, Rossi S, Motta C et al. T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clinical science* 2015; 129(4): 291-303.



ZAVIRALCI IN STABILIZATORJI INTERAKCIJ MED PROTEINI

INHIBITORS AND STABILIZATORS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

AVTOR / AUTHOR:

Kaja Bergant, mag. farm.

Doc. dr. Andrej Perdih, mag. farm

Kemijski inštitut

Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana, Slovenija

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andrej.perdih@ki.si

1 INTERAKCIJE MED PROTEINI

Proteini se za uspešno opravljanje svojih funkcij pogosto povezujejo z drugimi proteini in pri tem tvorijo široke visokoorganizirane proteinske mreže. Te interakcije med proteini označujemo tudi z izrazom interakcije protein-protein (PPI, *protein-protein interactions*) in opisujejo nekovalentne povezave med dvema ali več proteini (1). PPI predstavljajo obsežen del vseh makromolekulskih interakcij, ki sestavljajo celotni celični interaktom (1). Po zadnjih ocenah je teh interakcij pri človeku okrog 300.000, identificirali pa so že več kot 500 proteinov, ki vstopajo v PPI pri različnih organizmih (2).

POVZETEK

Nekateri proteini za uspešno opravljanje svojih funkcij vstopajo v interakcije z drugimi proteini in pri tem tvorijo široke visokoorganizirane proteinske mreže. Te interakcije med proteini imenujemo tudi interakcije protein-protein (PPI) in so prisotne na vseh nivojih organizacije celic. Večje poznavanje vloge teh interakcij in potreba po novih, varnejših in učinkovitejših zdravilih sta v zadnjem desetletju proteine, ki sodelujejo v PPI, uvrstila v nabor proteinskih tarč skupaj s klasičnimi tarčami iz skupin encimov, receptorjev, ionskih kanalov in z ligandi aktiviranih transkripcijskih dejavnikov. V prispevku najprej obravnavamo načrtovanje in karakterizacijo spojin, ki lahko modulirajo te interakcije. Nato predstavljamo kratek pregled nekaterih zaviralcev PPI, ki so v klinični uporabi ali v kliničnih raziskavah, skupino stabilizatorjev PPI ter uporabo peptidov in njihovih derivatov pri modulaciji PPI.

KLJUČNE BESEDE:

interakcije protein-protein, zaviralci in stabilizatorji PPI, načrtovanje učinkovin

ABSTRACT

In order to perform their functions, some proteins interact with other proteins forming widely organized protein networks important in various regulatory biological processes. Such interactions among two or several protein partners are called protein-protein interactions (PPI) and are present on all levels of cellular organization. The ongoing pressure to supply novel, safer and more effective therapies to the patient has added proteins involved in PPI to the collection of established pharmaceutically relevant protein targets such as enzymes, receptors, ionic channels and ligand-activated transcription factors. In this review, several features of designing compounds that can modulate protein-protein interactions are presented along with a short overview of several inhibitors of PPI either already in the clinical practice or currently in clinical trials. We also discuss an emerging group of molecules that stabilize the PPI as well as survey the utilization of peptides and their analogues in this field.

KEY WORDS:

protein-protein interactions, inhibitors and stabilizers of PPI, drug design

PPI delimo na homooligomerne, kjer interagirata dve identični proteinski molekuli oz. podenoti, in heterooligomerne interakcije, kjer sta proteina različna. Oligomeri v homooligomernih interakcijah so lahko organizirani na izologni ali heterologni način. Izolagna povezava vsebuje enaki površini na obeh monomerih, medtem ko sta površini pri heterologni povezavi različni (3).

Druga pogosta delitev PPI je delitev na obligatorne in neobligatorne PPI. V nasprotju z neobligatornimi protomeri, obligatorni PPI *in vivo* ne obstajajo kot samostojni stabilni monomeri oz. kompleksi. PPI delimo tudi na permanentne, kjer so PPI stabilne, in tranzitivne PPI, ki se pojavijo le ob izpolnjevanju določenih pogojev, kot so: pH, koncentracija, prisotnost spojin (npr. GTP, fosfatni ioni itd.). Identificirali so tudi več PPI, ki se jih tudi ne da enostavno uvrstiti v nobeno izmed naštetih kategorij, saj izkazujejo vmesne lastnosti omenjenih skupin (3).

Za PPI velja, da so glavne medmolekulske sile, ki jih stabilizirajo, predvsem hidrofobne in deloma tudi elektrostatske interakcije (4). Jakost PPI variira od šibkih, ki imajo afinitetne konstante vezave v mikromolarnem območju, do močnih, kjer je jakost vezave lahko tudi v pikomolarnem področju, in je le-ta odvisna tudi od prisotnosti posttranslacijskih modifikacij na proteinih (npr. fosforilacije in metilacije), kofaktorjev in koncentracije drugih potencialnih vezavnih partnerjev in ligandov (4).

Raziskave so pokazale, da so številne PPI ključne pri delovanju mnogih bioloških procesov, kot so: celični metabolizem, transport, prenos signalov znotraj in med celicami ter programirana celična smrt – apoptoza (4, 5). Njihovo poznavanje je torej nujno za poglobljeno razumevanje signalnih in regulatornih biokemijskih poti v celici ter za vpogled v medcelično komunikacijo (6).

PPI imajo zaradi svoje regulatorne in signalne funkcije tudi pomembno vlogo pri številnih patoloških stanjih, kot so npr. rakave bolezni, vnetni procesi, avtoimunske ter druge bolezni, in so v zadnjih letih zaradi večjega poznavanja molekularnega in fiziološkega ozadja postale privlačne tarče razvoja novih učinkovin (6). Z vključitvijo slednjih smo tako pridobili pomembno novo skupino proteinskih tarč, ki dopolnjuje klasične skupine, kot so encimi, receptorji, ionski kanali in z ligandi aktivirani transkripcijski dejavniki (7). Več zdravilnih učinkovin, ki delujejo preko tega mehanizma, so že uvedli v zdravljenje različnih bolezni. Nekatere modulirajo PPI tako, da preprečijo tvorbo PPI, druge pa za terapevtski učinek stabilizirajo nastali proteinski kompleks. Več kot deset takšnih modulatorjev PPI je že v klinični uporabi, še več molekul pa je v različnih stopnjah kliničnih raziskav (7). Sintezna učinkovina tirofiban prepreči agregacijo trombo-

citov preko zaviranja PPI in je tudi prva zdravilna učinkovina, ki so jo razvili iz računalniško načrtovane spojine vodnice (8). Več modulatorjev PPI je iz skupine naravnih spojin, ki so pomemben vir modulatorjev PPI (9). Tako so molekule iz skupine taksanov (npr. paklitaksel in docetaksel) učinkovite protirakave učinkovine, naravno spojino ciklosporin A pa uporabljamo kot imunosupresivno učinkovino.

V prispevku bomo predstavili nekatere pristope pri načrtovanju modulatorjev PPI, predvsem zaviralcev PPI. Obravnavali bomo tudi primere molekul, ki so vstopile v klinična preizkušanja za zdravljenje različnih patoloških stanj. Nadalje se bomo posvetili drugi pomembni skupini molekul – stabilizatorjem PPI, ki prav tako s predstavniki, uvedenimi v zdravljenje, širijo paradigmo modulacije PPI kot uspešnega pristopa pri zdravljenju bolezenskih stanj. Dotaknili se bomo tudi vloge sintezno modificiranih peptidov in njihovih derivatov pri prvih korakih razumevanja modulacije PPI. Bralca, ki bi o področju želel dobil še širšo sliko, želimo napotiti tudi na več obsežnejših pregledov tega področja v angleškem jeziku (5-7, 10-15).

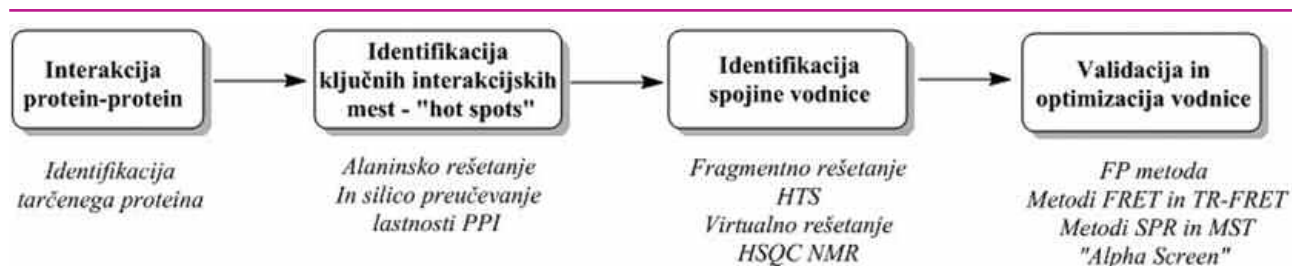
2 NAČRTOVANJE IN OVREDNOTENJE MODULATORJEV INTERAKCIJ MED PROTEINI

Do prvih pomembnih korakov pri razvoju na področju modulatorjev PPI je prišlo v časovnem razdobju 1995–2005. Takrat so ugotovili, da je mogoče PPI učinkovito zavirati z majhnimi organskimi molekulami (7). Strukturno gledano so modulatorji PPI navadno večji in bolj hidrofobni od klasičnih zdravilnih učinkovin, zato velja, da je razvoj modulatorjev PPI zahtevnejši od ciljanja klasičnih farmacevtsko relevantnih tarč. Navkljub tem omejitvam modulatorji PPI v primerjavi z malim molekulami pogosto ponujajo možnost selektivne vezave, saj so površine med proteini bolj raznolike (6, 7). Pomembna prednost pa je tudi manjša dovzetnost teh površin za mutacije in posledične odpornosti proti razvitim učinkovinam (6). Slika 1 prikazuje stopnje pri načrtovanju in ovrednotenju predvsem zaviralcev PPI (5, 6, 13). Tako kot pri načrtovanju molekul, ki interagirajo s klasičnimi farmacevtskimi tarčami, tudi tu večinoma uporabljamo kombinacijo eksperimentalnih in računskih tehnik.

2.1. INTERAKCIJSKA MESTA »HOT SPOTS« ZA NAČRTOVANJE MODULATORJEV PPI

Proteini se povezujejo med seboj z obsežnimi ploskimi površinami in dolgimi kanali z veliko površino, navadno med 1500



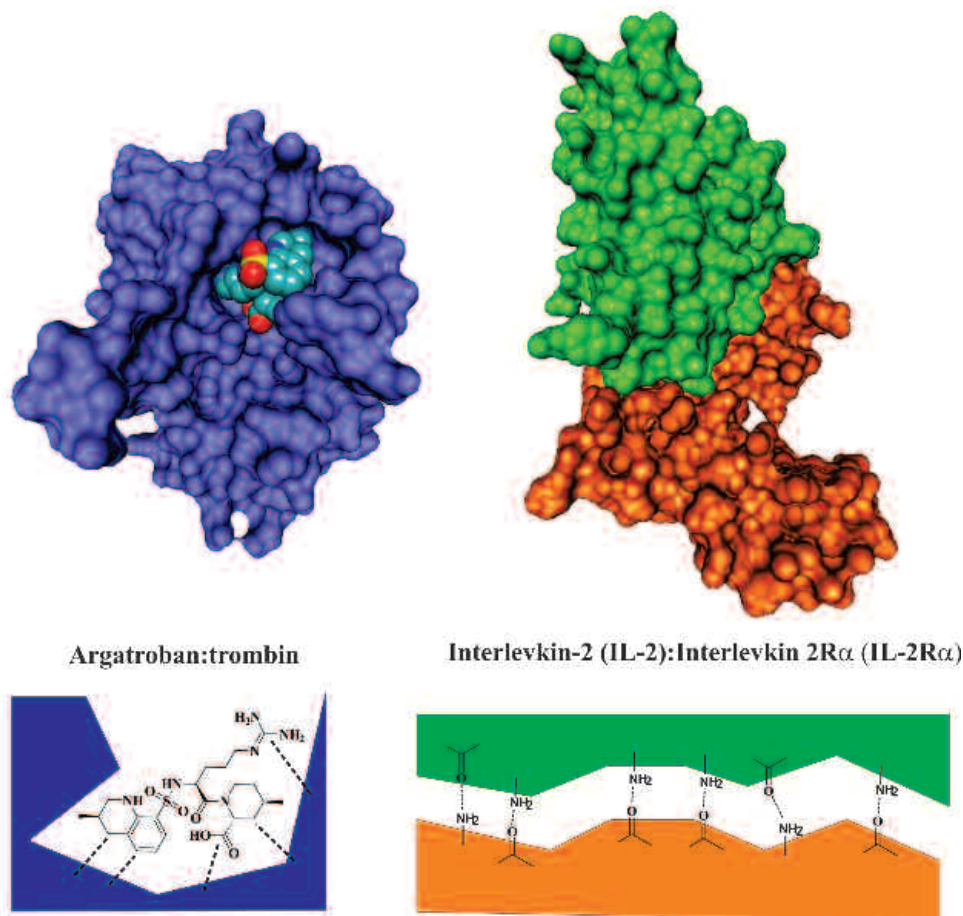


Slika 1: Faze načrtovanja zaviralcev interakcij med proteini in nekatere metode, ki jih uporabljamo v posameznih korakih.

Figure 1: Steps in the design of the inhibitors of protein-protein interactions and overview of some commonly used methods.

in 3000 \AA^2 brez izraženih ali definiranih aktivnih mest (slika 2), ki imajo pri klasičnih tarčah, ki običajno vežejo nizkomo-
lekulske ligande, bistveno manjšo površino (med 300 in 500 \AA^2) (7, 11). Ugotovili so, da ploske interakcijske površine PPI

vsebujejo topološko dobro definirana mesta, kjer je skon-
centrirana večina vezavne energije med dvema proteinoma. Angleški izraz za ta ključna interakcijska področja je »hot spots«, kar lahko prevedemo tudi kot »vroče točke« (slika 2)



Slika 2: Strukturni in shematski prikaz interakcije med proteinsko tarčo (trombin) in ligandom – organsko molekulo argatroban (PDB:1DWC) ter PPI med interleukinom 2 (IL-2) in njegovim receptorjem IL-2Rα (PDB:1Z92).

Figure 2: Structural and shematic represnetation of an interaction between a target protein (thrombin) and a small molecule (argatroban) (pdb:1DWC) and a protein–protein interaction between interleukin 2 (IL-2) and its receptor IL-2Rα (PDB:1Z92).

(4, 5, 10). Poenostavljeno si jih lahko predstavljamo kot nekakšna »aktivna mesta« celotnega področja PPI in predstavljajo okoli 20 do 30 % interakcijske površine, kar znaša med 250 in 900 Å² (7). Teorija področij »hot spots« je pomembna pri načrtovanju modulatorjev, predvsem zaviralcev PPI, saj je ciljnanje na te dele interakcijske površine, kjer se nahajajo ključni aminokislinski preostanki, učinkovit način, da preprečimo tvorbo PPI. Tako načrtovanje spojin, ki bi te interakcije modulirale, strukturno omejimo le na te dele interakcije med proteinoma (11, 12).

Področja »hot spots« lahko odkrijemo s pomočjo alaninskega rešetanja, kjer posamezne aminokislinske ostanke sistematično zamenjamo z alaninom in ovrednotimo razliko v vezavni energiji po vsaki zamenjavi (4). Vse bolj se uveljavljajo tudi *in silico* metode, s katerimi računalniško izvedemo preiskovanje interakcijskih površin med proteini in identificiramo ključna interakcijska področja, hitreje in cenejše kot z *in vitro* eksperimentalnimi tehnikami. Za razumevanje medmolekulske prepoznavne in energetike PPI uporabljamo tudi metode molekulskih simulacij, kot so molekulska dinamika, metadinamika in druge računske metode proučevanja PPI (6, 16).

2.2. IDENTIFIKACIJA SPOJIN VODNIC – FRAGMENTNO REŠETANJE IN REŠETANJE HTS

Najpogostejši eksperimentalni orodji, ki ju uporabljamo pri rešetanju in identifikaciji organskih molekul kot spojin vodnic modulatorjev PPI, sta fragmentno rešetanje in rešetanje visokih zmogljivosti (HTS). NMR spektroskopijo, predvsem tehniko ¹H-¹⁵N HSQC, pogosto uporabljamo pri fragmentnem načrtovanju za potrditev in opredelitev vezave fragmentov na tarčni protein, ki sodeluje v PPI. Tudi tu imajo pomembno vlogo pri izboru spojin računalniške metode, ki omogočajo virtualno rešetanje knjižnic molekul, tako z uporabo znanih ligandov kot z uporabo tarčnega proteina (5, 6).

Pri fragmentnem rešetanju poskušamo identificirati manjše fragmente; navadno molekule z molekulsko maso, manjšo od 200 Da, ki se vežejo na izbrano tarčo in imajo možnost nadaljnje optimizacije. Lahko identificiramo tudi več fragmentov, ki interagirajo na različnih mestih PPI in jih nato povežemo v končno molekulo (slika 3) (16). Na sliki 3 predstavljamo tudi primer fragmentnega načrtovanja zaviralca PPI med antiapoptotičnim proteinom Mcl-1 in BH3 domeno proapoptotičnega proteina, ki bi bil uporaben v protirakavi terapiji. Tu so najprej identificirali vezavo dveh različnih fragmentov v področje »hot spot« proteina Mcl-1 in ju nato združili v spojino vodnico (17). Druga metoda identifikacije

spojin vodnic modulatorjev PPI je rešetanje visokih zmogljivosti (HTS, *high-throughput screening*), kjer eksperimentalno rešetamo knjižnice večjih molekul. Izbrane zadetke nato sintezno optimiziramo do želenih lastnosti (6).

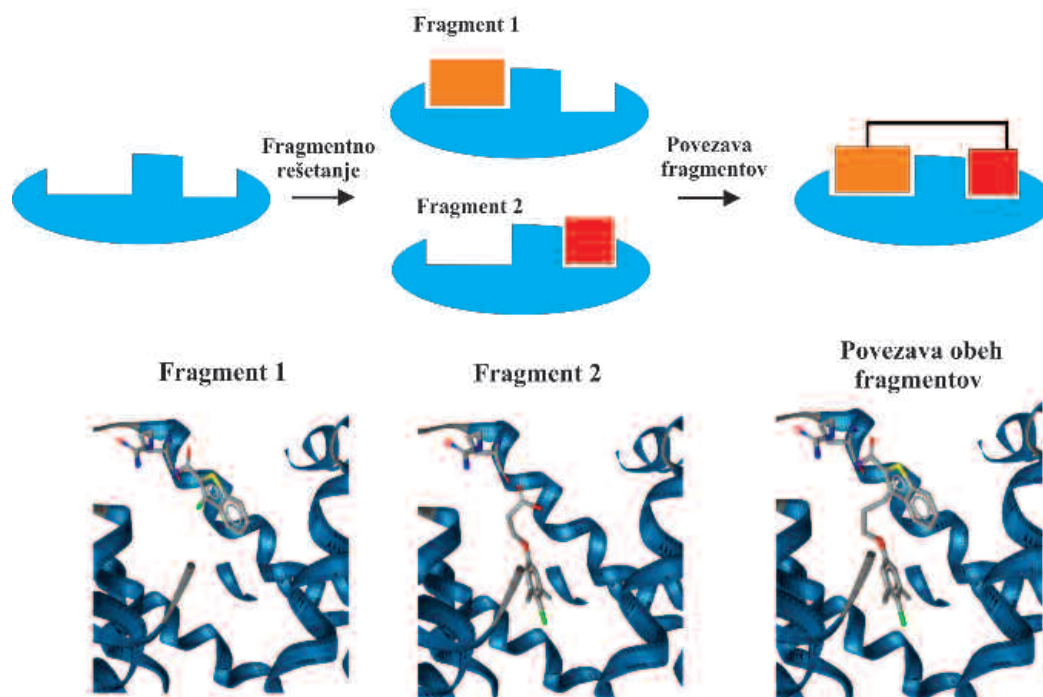
2.3. OVREDNOTENJE MODULACIJE PPI

Pri identifikaciji vezave molekule na tarčni protein moramo ovrednotiti tudi nivo modulacije (npr. zaviranja) PPI. Metodi, ki ju najpogosteje uporabljamo, sta fluorescenčna polarizacija (FP) in metoda prenosa energije z resonanco fluorescencence (FRET) oz. njena časovno odvisna različica, metoda TR-FRET (13).

Pri fluorescenčni polarizaciji (FP) eno izmed molekul PPI označimo s fluoroforjem in nato s pomočjo linearno polarizirane svetlobe njegove elektrone vzbudimo na višji energijski nivo. Označene molekule nato emitirajo absorbirano energijo pri višji valovni dolžini z manjšo energijo. Do tega pojava pride zaradi gibanja in trkov molekul v raztopini med ekscitacijo in emisijo ter prehodov na nižje rotacijske in vibracijske energijske nivoje znotraj ekscitiranega elektronskega nivoja. Večje molekule kot tudi kompleksi (npr. kompleks protein1-protein2 na sliki 4) rotirajo počasneje kot manjše entitete (npr. kompleks protein1-zaviralec), zato se lahko fluorescenčno označene molekule ločijo po velikosti. Tako ovrednotimo nivo vezave zaviralca na tarčni protein, označen s fluoroforjem (13).

Pri metodi FRET označimo oba proteina z različnima fluoroforjema in izkoristimo pojav Försterjevega prenosa resonančne energije (slika 4). Ko dovedemo energijo λE_D , spravimo donorski kromofor 1 v vzbujeno elektronsko stanje. Le-ta preko mehanizma sklopitve dipol-dipol prenese energijo λE_{D-A} na akceptorski fluorofor 2, ki je ravno take intenzitete, da povzroči elektronski prehod le-tega na elektronsko vzbujeno stanje. Akceptorski fluorofor 2 nato seva energijo λE_{MA} preko mehanizma fluorescencence, ki jo detektiramo. Pomembno je izpostaviti, da je učinkovitost pojava FRET obratno sorazmerna z razdaljo med obema fluoroforoma, kar pomeni, da metoda omogoča tudi določanje razdalje med fluoroforoma. To je osnovni princip ovrednotenja PPI, saj se v prisotnosti zaviralca razdalja med fluoroforoma poveča in zato ne opazimo več pojava FRET, ampak le izsevano fluorescenco donorskega fluorofora z energijo λE_{mD} . V praksi uporabljamo modificirano metodo TR-FRET (*time-resolved FRET*), kjer kot donorske fluorofore običajno uporabimo komplekse lantanidnih (Ln³⁺) ionov. Slednji po ekscitaciji sproščajo energijo počasneje in zato lažje ločimo želeno fluorescenco zaradi pojava FRET od ostalih izsevanih fluorescenc (ozadja) in tako izboljšamo občutljivost in selektivnost metode (13).





Slika 3: (Zgoraj) Shematski prikaz metode fragmentnega rešetanja (17), (Spodaj) Primer načrtovanja zaviralca PPI proteina Mcl-1 z metodo fragmentnega načrtovanja (18).

Figure 3: (Above) Overview of the fragment screening method (based on ref. 17), (Below) Example of the fragment-based design of the lead PPI inhibitor compound of the Mcl-1 protein (based on ref. 18).

Poleg omenjenih dveh metod se za evalvacijo vezave ligandov PPI uporabljajo tudi številne druge metode, kot so: encimskoimunski test (ELISA), površinska plazmonska resonanca (SPR), mikrotermoforeza (MST), izotermalna kalorimetrija (ITC), metoda AlphaScreen, mikroskopija na atomsko silo (AFM) itd. (6, 10, 13).

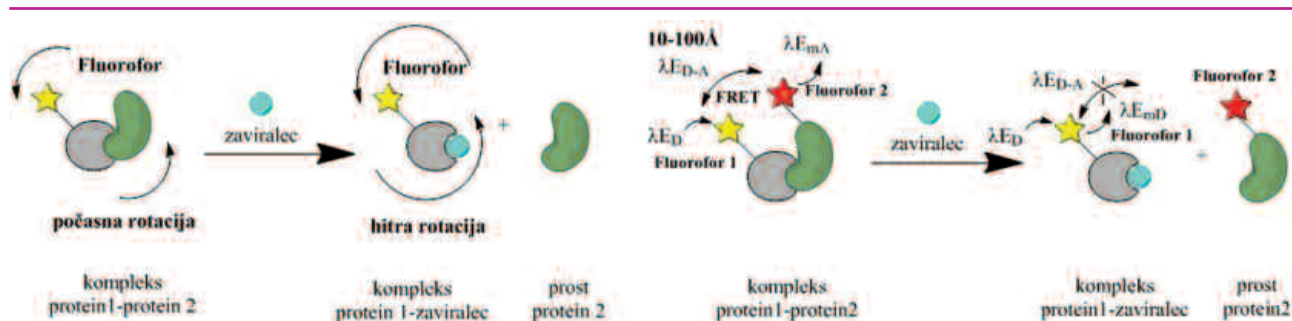
3 ZAVIRALCI INTERAKCIJ MED PROTEINI

Uveljavljena razdelitev zaviralcev PPI upošteva kompleksnost interakcijske površine partnerskega proteina, ki se veže na tarčni protein. Zaviralce PPI delimo v tri skupine: skupino, kjer interakcijsko področje predstavlja linearni peptid, nadalje skupino, kjer interakcijsko področje pred-

stavlja element sekundarne strukture, ter tretjo skupino, kjer interakcijsko področje predstavlja več elementov, ki tvorijo terciarno strukturo (npr. vijačnica alfa in del linearnega peptida) (7).

V prvi skupini na sliki 5 je eden izmed prvih zaviralcev PPI, ki so prišli v klinično uporabo, tirofiban (7, 8). Deluje tako, da prepreči interakcijo fibrinogena z integrinskim receptorjem IIb/IIIa in deluje kot antiagregatorna učinkovina. Načrtovan je bil kot mimetik linearnega tripeptida proteina fibrinogena RGD oz. Arg-Gly-Asp (8).

Veliko molekul, ki delujejo kot inhibitorji PPI, ima protirakavo delovanje, saj PPI regulirajo številne signalne in regulatorne poti v celici, kar lahko izkoristimo tudi v terapevtske namene. Primer je molekula LCL-161, ki je trenutno v drugi fazi kliničnih preizkušanj za zdravljenje multiplega mieloma (19). Mehanizem delovanja te molekule je zaviranje PPI med inhibicijskim apoptotičnim proteinom (IAP) in različnimi proteolitičnimi kaspazami. Tudi bromodomene, »epi-



Slika 4: Shematski prikaz metode fluorescentne polarizacije (FP) in metode prenosa energije z resonanco fluorescence (FRET).
Figure 4: Schematic representation of the fluorescent polarization (FP) method and Förster resonance energy transfer (FRET) method.

genetski bralci«, ki se vežejo na acetilirane lizine histonov in tako aktivirajo različne gene, so pomembne protirakave tarče. Molekula I-BET762, ki inhibira PPI med bromodomeno in acetiliranimi lizini na N-terminalnih koncih histonov, je v kliničnih raziskavah za zdravljenje rakavih bolezni (20). Razvoj inhibitorjev PPI je usmerjen tudi v odkrivanje novih protivirusnih učinkovin. Primer ene izmed teh je molekula v klinični uporabi BI-224436, ki inhibira PPI med HIV integrazo in linearnim peptidom kofaktorja LEDGF/p75 (*lens epithelial derived growth factor*), ki je pomemben za učinkovitejšo integracijo virusne DNA v gostiteljev genom, saj zaščiti HIV integrazo pred proteolizno razgradnjo in stimulira njeno katalitično aktivnost (21, 22).

Pri skupini molekul na sliki 5, kjer interakcijsko področje predstavlja element sekundarne strukture, je molekula ABT-263 (navitoklaks) v kliničnih raziskavah kot potencialna protirakava učinkovina. ABT-263 deluje kot zaviralec PPI med antiapoptotičnimi proteini iz družine Bcl (npr. Bcl-2, Bcl-xL in Bcl-w) in proapoptotičnimi proteini (npr. Bax ali Bid). Antiapoptotični proteini Bcl so močno izraženi v rakavih celicah in zaviranje povzroči apoptozo rakavih celic. Ključni strukturni element PPI med obema skupinama, ki je služil za načrtovanje, je vijačnica alfa (t. i. domena BH3) na proapoptotičnih proteinih (23).

Pomembna tarča je tudi E3 ubikvitin-protein ligaza, znana tudi kot »murine double minute 2« (MDM2), ki je regulator celičnega tumor-supresorskega proteina p53, ki sproži apoptozo. MDM2 je ključen pri razgradnji proteina p53, saj kompleks MDM2/p53 sproži razgradnjo p53 preko ubikvitinske poti in s tem poskrbi za majhno koncentracijo p53 v normalnih celicah. MDM2 je bolj izražena v rakavih celicah, saj se tako rakava celica izogne prehodu v apoptozo. Molekula v kliničnih vrednotenjih RG7388 (idasanutlin) zavre PPI med transkripcijskim faktorjem p53 in MDM2 in izkazuje obetavno protirakavo delovanje. Ključni

strukturni element interakcije med MDM2 in p53, ki so ga uporabili za načrtovanje, je bila vijačnica alfa na proteinu p53 (24).

Primerov molekul, ki oponašajo kompleksnejšo terciarno strukturo proteina, katerega vezavo zavirajo, je manj in so večinoma v začetnih fazah raziskav. Molekula SP4206 (slika 5) deluje tako, da prepreči PPI med interlevkinom 2 (IL-2) z njegovim receptorjem IL-2R α . Poleg vezave v del proteinskega kanala IL-2, ki tvori interakcije z vijačnico alfa molekule IL-2R α , molekula pokrije še nekatere sosednje interakcije med IL-2R α in IL-2 (25). Vrednotijo tudi nove protivirusne spojine za zdravljenje okužb s humanimi papiloma (HPV) virusi, ki preprečijo PPI med helikazo E-2 in transkripcijskim faktorjem E-2 virusa HPV (7) .

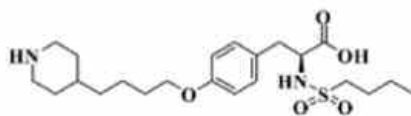
4 STABILIZACIJA INTERAKCIJ MED PROTEINI

Molekule, ki stabilizirajo PPI, omogočajo trajnejšo stabilizacijo homooligomernega ali heterooligomernega kompleksa med proteinskim partnerji. Mehanizem stabilizacije lahko poteka preko direktne vezave molekule med oba proteinska partnerja in tako povečane stabilnosti PPI ali pa preko alosteričnega mehanizma vezave molekule le z enim proteinskim partnerjem, ki prav tako vodi do povečane stabilizacije celotnega kompleksa (13, 14).

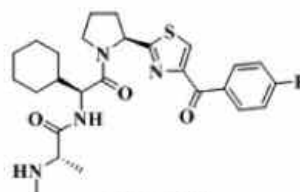
Primeri direktnih stabilizatorjev PPI so imunosupresivne zdravilne učinkovine naravnega izvora: rapamicin, ciklosporin A, FK506, in spojine iz skupine taksanov (npr. paklitaksel in docetaksel), ki so že uvedene v terapijo raka (slika 6). Več stabilizatorjev PPI, predvsem naravnega izvora, uporabljamo tudi kot kemijska orodja za proučevanje re-



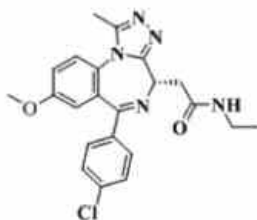
Interakcijski del PPI: Linearni peptid



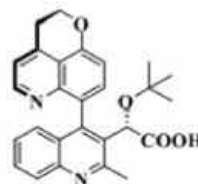
tirofiban⁸
integrinski receptor IIb/IIIa



LCL-161¹⁹
inhibicijski apoptotični protein (IAP)

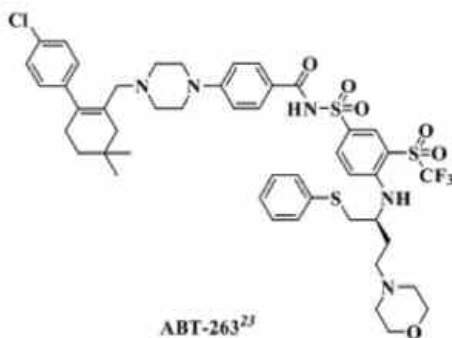


1-BET762 (GSK525762)²⁰
bromodomene (BET)

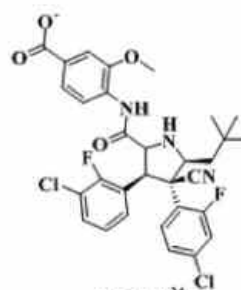


BI 224436²¹
HIV integraza

Interakcijski del PPI: Element sekundarne strukture

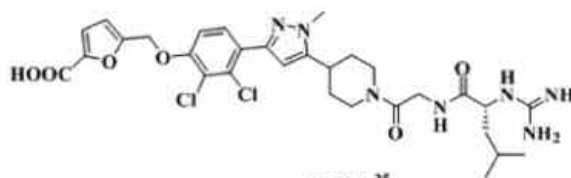


ABT-263²³
proteini družine Bcl-2



RG7388²⁴
protein MDM2

Interakcijski del PPI: Terciarna struktura



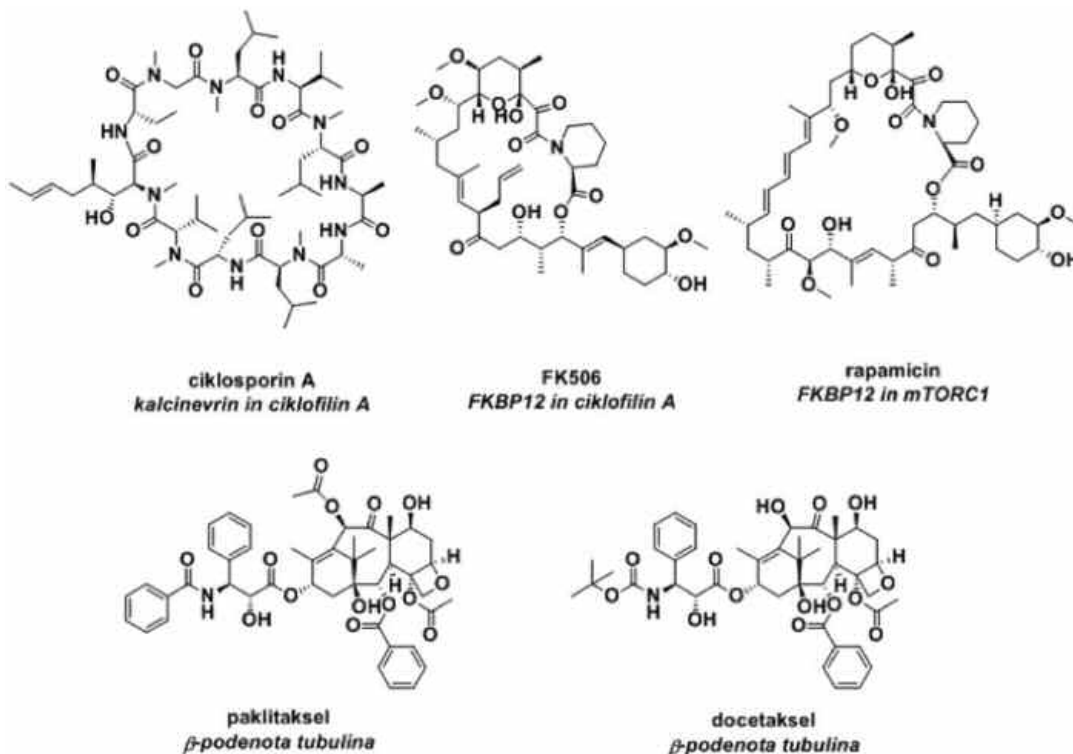
SP4206²⁵
interleukin-2 (IL-2)

Slika 5: Primeri izbranih zaviralcev PPI, razdeljeni glede na kompleksnost interakcijske površine proteina, katerega vezavo zavirajo. Naveden je tudi tarčni protein vsakega predstavljenega zaviralca.

Figure 5: Examples of selected inhibitors of protein-protein interactions classified based on the complexity of the surface of the binding PPI partner. Target protein of each discussed inhibitor is also provided.

gulacijskih in signalnih poti tako v človeških kot rastlinskih celicah, npr. brefeldin A, forskolin, fusikokin A, avksin, jasmonat in inozitol tetrafosfat. Za mnoge navedene učinkovine so šele po uvedbi v terapijo pri natančnejših razi-

skavah ugotovili, da delujejo kot stabilizatorji PPI. Zato je tak pristop k modulaciji PPI še v zgodnejših fazah razvoja in ima še precejšen neizkoriščen terapevtski potencial (13, 14).



Slika 6: Primeri stabilizatorjev PPI v klinični praksi. Navedeni so tudi pripadajoči proteini, ki sodelujejo v posamezni stabilizaciji PPI (13,14).
 Figure 6: Examples of molecules that stabilize protein-protein interactions used in clinical practice. Corresponding proteins involved in each PPI stabilization are also outlined (13,14).

Mehanizem delovanja treh omenjenih imunosupresivnih učinkovin ima veliko podobnosti. Ciklosporin A se veže na protein ciklofilin A, ki je peptidil-proлил izomeraza. Ta kompleks protein-ligand v nadaljevanju tvori stabilni makromolekularni kompleks z regulatornim in katalitičnim delom fosfataze kalcinevrin, ki je odgovorna za stimulacijo imunskega odziva. Zaradi specifične geometrije s ciklosporinom A stabilizirane PPI med kalcinevrinom in ciklofilinom A je sterično blokirano encimsko aktivno mesto kalcinevrina in s tem stimulacija imunskega odziva. Podoben mehanizem delovanja ima FK506, le da se ta najprej veže na receptor za FK506, imenovan FKBP12 oz. tudi *FK506 Binding Protein*, ki je prav tako kot ciklofilin A peptidil-proлил izomeraza, nato pa ta tvori analogen kompleks protein-protein-ligand s kalcinevrinom, kar onemogoči njegovo encimsko aktivnost. Rapamicin se prav tako najprej veže na FKBP12, nato pa tvori stabilno PPI s protein kinazo mTORC1 (*mammalian TOR complex 1*), ki tudi prepreči encimsko aktivnost mTORC1, ključno za imunski odziv (13, 14). Učinkovini paklitaksel in docetaksel uporabljamo pri zdravljenju več rakavih bolezni in sta glavni predstavnici druge

skupine t. i. alosteričnih stabilizatorjev PPI. Glavni mehanizem delovanja je alosterična stabilizacija PPI med α - in β -podenotama tubulina, ki sestavljata citoskelet (mikrotubule) in s tem zaviranje njegove normalne depolimerizacije in razgradnje. Stabilizacija te PPI je posledica vezave omenjenih učinkovin na β -podenoto tubulina. Zato kromosomi niso pravilno pritrjeni na delitveno vreteno in tak sistem ne more preiti pomembne kontrolne regulatorne točke v procesu mitoze celice, kar sproži proces apoptoze (13).

5 UPORABA PEPTIDOV IN DERIVATOV KOT MODULATORJEV PPI

Male organske molekule in spojine naravnega izvora niso edini vir modulatorjev PPI. Zaradi velike in ploske interakcijske površine PPI ter težav pri identifikaciji interakcijskih žepov, predvsem v začetnih stopnjah razvoja, imajo pomembno vlogo tudi konformacijsko omejeni in ciklični pep-



tidi, peptidomemitiki ter tudi protitelesa. Sami nativni krajši peptidi pa ne morejo delovati kot učinkoviti zaviralci PPI zaradi termodinamsko neugodne izgube entropije pri vezavi na tarčo (10).

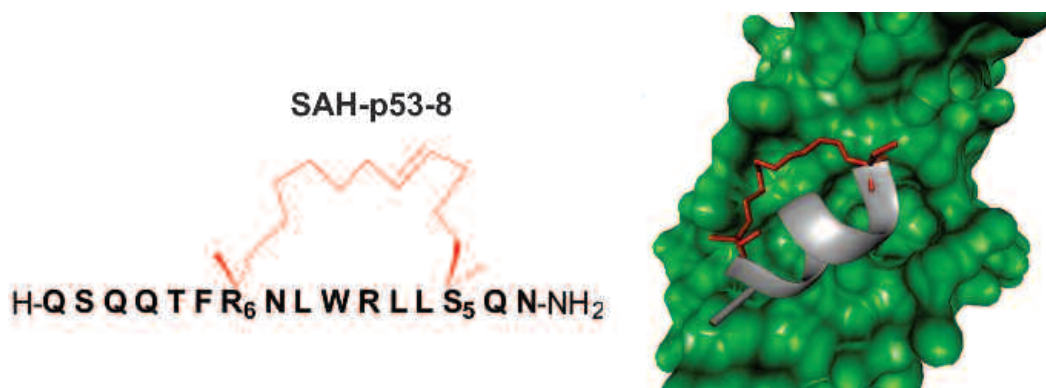
Tako načrtovane peptidne in peptidomimetične molekule so fleksibilnejše in omogočajo preiskovanje in identifikacijo ključnih interakcijskih področji ter so skupaj z alaninskim rešetanjem pomembna stopnja razvoja modulatorjev PPI, predvsem zaviralcev. Njihove slabosti so zlasti slaba biološka uporabnost in potencialna imunogenost. Te lastnosti lahko z različnimi pristopi izboljšamo, vseeno pa so te molekule večinoma le vmesna stopnja razvoja modulatorjev PPI (10).

Konformacijsko omejeni peptidi, ki oponašajo sekundarno strukturo enega izmed proteinov, so pomembni pri študiju PPI. Izmed mnogih pristopov bi izpostavili skupino t. i. »spetih peptidov« (»stapled peptides«). Gre za kratke, večinoma α -helikalne peptide, ki so ključni interakcijski del enega izmed proteinov. Z uvedbo »sponke« krajše, navadno olefinske verige, ki poveže dva aminokislinska preostanka peptida, lahko omejimo konformacijsko mobilnost in izboljšamo vezavo takšnih peptidov na tarčni protein (6, 10). Pogosto identifikacija ugodnega spetega peptida pomaga pri naslednjem koraku, ko poskušamo razviti peptidomimetično molekulo z manj peptidnimi elementi in tako dobiti molekule z boljšo biološko uporabnostjo (6). Slika 7 prikazuje strukturo tako razvitega spetega peptida SAH-p53-8, tj. ključnega dela tumorskega supresorja p53, in njegovo interakcijo s proteinom MDM2, ki je pomemben pri rakavih boleznih (13).

Kot zaviralce PPI uporabljamo tudi protitelesa. Njihove prednosti so visoka specifičnost vezave in stabilnost v človeškem serumu. Zahtevnost njihove izdelave in omejena biološka uporabnost pa omejujejo njihovo terapevtsko uporabnost (5). Primer uporabe protitelesa kot zaviralca PPI je molekula daklizumab, ki jo uporabljamo v klinični praksi za zdravljenje nevrodegenerativne avtoimunske bolezni multiple skleroze. Deluje tako, da zavira PPI med interleukinom 2 (IL-2) in njegovim receptorjem (26).

6 SKLEP

Interakcije med proteini (PPI) so ključni del celične organizacije in signalizacije. Z večjim razumevanjem njihovih povezav predstavljajo nov nabor tarč pri razvoju učinkovin za širok spekter bolezenskih stanj. Zadnje desetletje razvoja modulatorjev PPI je prineslo več novih učinkovin, uvedenih v terapijo, ter še več molekul, ki so sedaj v fazah kliničnih raziskav. Sočasno poteka tudi razvoj novih eksperimentalnih tehnik, ki omogočajo identifikacijo in karakterizacijo PPI. Poleg zaviralcev PPI poteka tudi intenziven razvoj stabilizatorjev PPI ter spojin, ki delujejo preko alosteričnih mehanizmov. Modulatorji PPI obsegajo širok kemijski prostor, ki ga, poleg malih organskih molekul, sestavljajo tudi spojine naravnega izvora, veliko vlogo pri razumevanju in načrtovanju novih molekul imajo tudi konformacijsko omejeni



Slika 7: Struktura načrtovanega spetega peptida (SAH-p53-8), mimitika tumorskega supresorja p53, in njegova vezava na protein MDM2 (PDB:3V3B).

Figure 7: Structure of the designed stapled peptide (SAH-p53-8), mimetic of the tumor suppressor p53, and its binding conformation to MDM2 protein (PDB:3V3B).

peptidi in peptidomimetiki. Vse večje poznavanje interakcija bo v prihodnosti še povečalo nabor tarč iz teh kompleksnih mrež pri identifikaciji terapevtikov nove generacije.

7 LITERATURA

1. De Las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(6): 1-8.
2. Zhang QC, Petrey D, Deng L et al. Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-wide scale. *Nature* 2012; 490(7421): 556-560.
3. Nooren IM, Thornton JM. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 2003; 22(14): 3486-3492.
4. Keskin O, Gursoy A, Ma B et al. Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact? *Chem Rev* 2008; 108(4): 1225-1244.
5. Arkin MR, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(4): 301-317.
6. Laraia L, McKenzie G, Spring DR et al. Overcoming chemical, biological, and computational challenges in the development of inhibitors targeting protein-protein interactions. *Chem Biol* 2015; 22(6): 689-703.
7. Arkin MR, Tang Y, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem Biol* 2014; 21(9): 1102-1114.
8. Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem* 1992; 35(24): 4640-4642.
9. Jukič M, Perdih A, Šolmajer T. Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farm Vestn* 2012; 63(1): 54-63.
10. Nevola L, Giralt E. Modulating protein-protein interactions: the potential of peptides. *Chem Commun* 2015; 51(16): 3302-3315.
11. Wells JA, McClendon CL. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* 2007; 450(7172): 1001-1009.
12. Mullard A. Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(3): 173-175.
13. Milroy LG, Grossmann TN, Hennig S et al. Modulators of protein-protein interactions. *Chem Rev* 2014; 114(9): 4695-4748.
14. Bier D, Thiel P, Briels J et al. Stabilization of protein-protein interactions in chemical biology and drug discovery. *Prog Biophys Mol Biol* 2015; 19(1): 1-10.
15. Fischer G, Rossmann M, Hyvönen M. Alternative modulation of protein-protein interactions by small molecules. *Curr Opin Biotechnol* 2015; 35: 78-85.
16. Rakers C, Bermudez M, Keller BG et al. Computational close up on protein-protein interactions: how to unravel the invisible using molecular dynamics simulations? *WIREs Comput Mol Sci* 2015; 5(5): 345-359.
17. Perdih A, Kotnik M, Oblak M et al. Uporaba orodij računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farm Vestn* 2010; 61(4): 185-260.
18. Friberg A, Vigil D, Zhao B et al. Discovery of potent myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) inhibitors using fragment-based methods and structure-based design. *J Med Chem* 2013; 56(1): 15-30.
19. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP Proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 2013; 9: 1285-1304.
20. Mirguet O, Gosmini R, Toum, J et al. Discovery of epigenetic regulator I-BET762: lead optimization to afford a clinical candidate inhibitor of the BET bromodomains. *J Med Chem* 2013; 56(19): 7501-7515.
21. Fader LD, Malenfant E, Parisien M et al. Discovery of BI 224436, a noncatalytic site integrase inhibitor (NCINI) of HIV-1. *ACS Med Chem Lett* 2014; 5(4): 422-427.
22. Fenwick C, Amad M, Bailey MD et al. Preclinical profile of BI 224436, a novel HIV-1 non-catalytic-site integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(6): 3233-3244.
23. Tse, C, Shoemaker AR, Adickes J et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3421-3428.
24. Ding Q, Zhang Z, Liu JJ et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem* 2013; 56(14): 5979-5983.
25. Thanos CD, DeLano WL, Wells JA. Hot-spot mimicry of a cytokine receptor by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(42): 15422-15427.
26. Waldmann TA, O'Shea J. The Use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(5): 507-512.



MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE: UPORABA IN POTENCIAL ZA ZDRAVLJENJE TER DIAGNOSTIKO MIŠIČNO- SKELETNIH BOLEZNIH

MESENCHYMAL STEM CELLS: APPLICATIONS AND POTENTIAL IN TREATMENT AND DIAGNOSIS OF MUSCULOSKELETAL DISORDERS

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.¹
Asist. Klemen Čamernik, mag. farm.¹
Izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.¹
Dr. Ariana Barlič, univ. dipl. biolog²
Izr. prof. dr. Matej Drobnič, dr. med.,
spec. ortopedske kirurgije³
Prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec.
med. biokem.¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za klinično biokemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² EDUCELL podjetje za celično biologijo, d. o. o.,
Prevale 9, 1236 Trzin

³ Univerzitetni klinični center,
Ortopedska klinika Ljubljana,
Zaloška cesta 9, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: janja.marc@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Mezenhimske matične celice (MSC) so redka in heterogena populacija multipotentnih predhodnikov, prisotnih v številnih tkivih tudi pri odraslem človeku. Pomembne so zaradi svojih imunosupresivnih lastnosti in sposobnosti regeneracije tkiv, kot so kost, hrustanec in skeletne mišice. Zato predstavljajo velik potencial za zdravljenje bolezni in poškodb mišično-skeletnega tkiva. Na tem področju so najbolj raziskane MSC iz kostnega tkiva, skeletnih mišic in sklepne ovojnice. Kljub napredku pri njihovem odkrivanju in klinični uporabi pa še vedno slabo poznamo spremembe v MSC in/ali njihovem mikrookolju, ki bi lahko bile vzrok mišično-skeletnim boleznim, kot so osteoporoza, osteoartrza in sarkopenija. Posledično je potencial MSC v diagnostiki teh patoloških stanj še neizkoriščen. Največje ovire pri napredku na tem področju so preohlapna definicija MSC, njihova tkivna heterogenost ter pomanjkanje specifičnih označevalcev. V prispevku podajamo pregled trenutnega poznavanja vloge MSC v mišično-skeletnem sistemu, njihove uporabe v regenerativni medicini ter njihovega potenciala za diagnostiko bolezni tega pomembnega telesnega sistema.

KLJUČNE BESEDE:

diagnostika, imunosupresija, mezenhimske matične celice (MSC), mišično-skeletni sistem, regeneracija tkiv.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) present a rare and heterogeneous population of multipotent progenitors ubiquitously present in different tissues including those of adults. Due to their immunosuppressive capabilities and potential to regenerate various connective tissues such as bone, cartilage and skeletal muscles, they possess a massive potential for the treatment of various diseases and injuries of musculoskeletal tissues. Within the musculoskeletal system, most well recognized are those from bone tissue, skeletal muscles and joint membrane. Despite the vast progress in their identification and clinical use, changes within MSCs and/or their microenvironment that could potentially initiate musculoskeletal diseases, such as osteoporosis, osteoarthritis and sarcopenia, are still poorly understood. Due to this fact, the potential of MSCs in diagnosing these

conditions is still largely unexploited. The major barriers preventing the progress in this field are loose definition of MSCs, their tissue heterogeneity and lack of specific markers. Here we provide an overview of current knowledge on the role of MSCs in musculoskeletal system, their use in regenerative medicine and their potential in diagnosing disorders of this important body system.

KEY WORDS:

diagnostics, immunosuppression, mesenchymal stem cells (MSCs), musculoskeletal system, tissue regeneration

1 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE V MIŠIČNO-SKELETNEM SISTEMU

Celice, ki sestavljajo naša tkiva in organe, odmirajo vsak dan, zato jih mora organizem nadomestiti. Proces regeneracije tkiv pri odraslih osebah je v fizioloških in patoloških pogojih neposreden rezultat aktivnosti t. i. matičnih celic. Matične celice so široka skupina neusmerjenih in nediferenciranih celic z izjemno sposobnostjo diferenciacije oz. pretvorbe v različne specializirane tkivne celice, tako v prenatalnem kot tudi v postnatalnem obdobju. Glede na izvor jih delimo na dve veliki skupini: embrionalne, ki se nahajajo v blastocisti razvijajočega se zarodka, ter postnatalne (somatske), ki se nahajajo v številnih tkivih odraslih organizmov. V prenatalnem obdobju nastanejo vsa naša tkiva in organi iz matičnih celic v procesu razvoja organov (ontogeneze) iz treh zarodnih plasti (slika 1). Mezenhimske matične/stromalne/progenitorske celice (MSC, mesenchymal stem/stromal/progenitor cells) izvirajo iz mezodermalne zarodne plasti, iz katere se med embrionalnim razvojem razvijejo kostno tkivo, hrustanec, mišice, maščoba in druga vezivna tkiva. Ti mezenhimski predhodniki pa se ohranijo tudi po rojstvu, in sicer v številnih tkivih, v katerih se nahajajo v posebnih anatomskih strukturah, t. i. nišah, v mirujočem, nediferenciranem stanju s počasnim mehanizmom samoobnavljanja. V skeletno-mišičnem sistemu so najbolj raziskane MSC iz kostnega tkiva, sinovijske (sklepne) ovojnice in mišic. Čeprav imajo določene skupne značilnosti (preglednica 1), pa se vedno bolj uveljavlja koncept tkivno specifičnih MSC, ki se med seboj razlikujejo po določenih lastnostih in molekularnih označevalcih (1). Po eni od teorij naj bi bile MSC pravzaprav periciti, torej celice, ki se nahajajo na zunanji strani žilnih

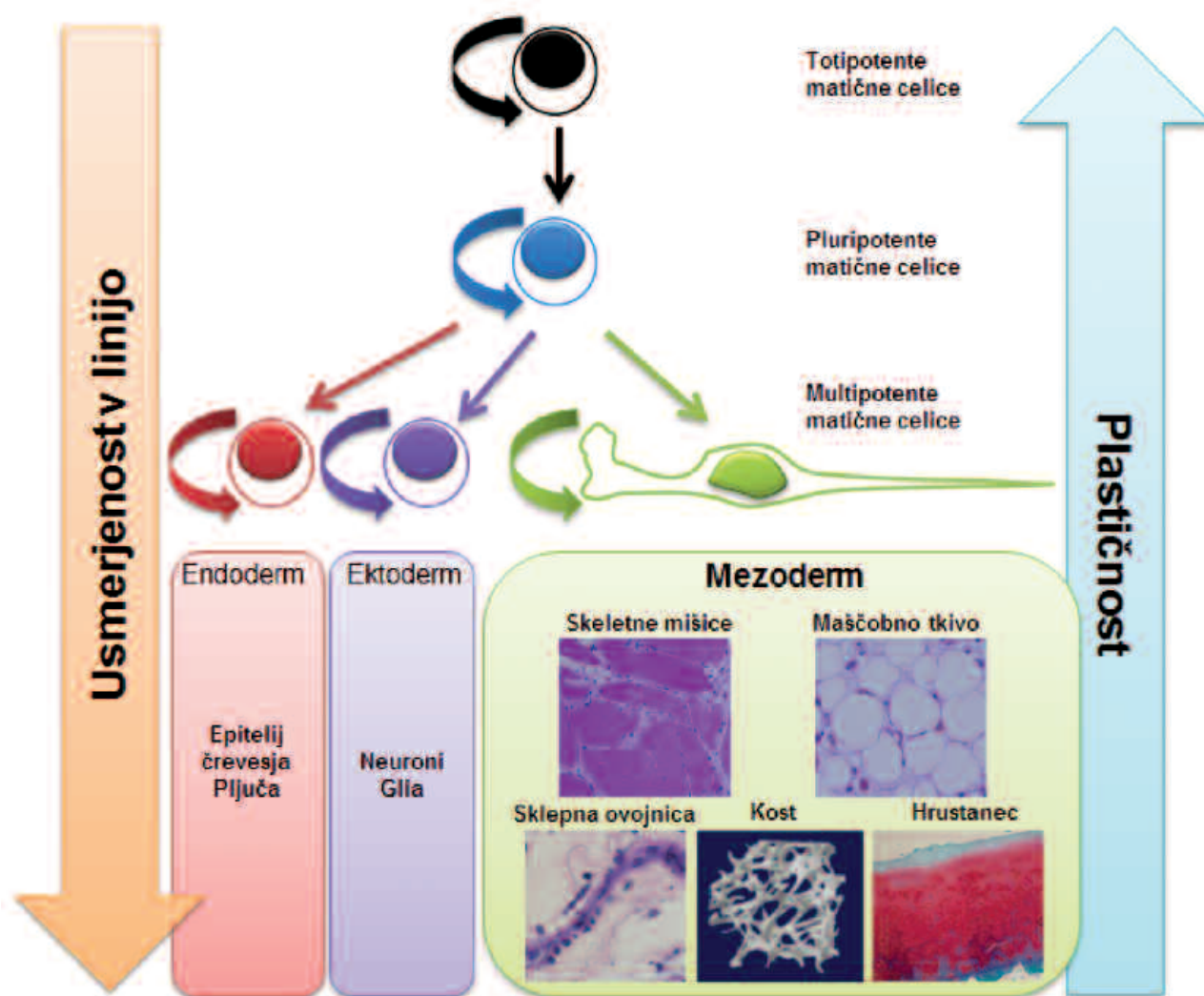
sten in jih zato lahko najdemo v skoraj vseh ožiljenih tkivih (2). Prisotnost matičnih celic v kosteh in skeletnih mišicah je tudi razlog, da imajo ta tkiva neverjetno sposobnost regeneracije. Ob ustreznih stimulatornih signalih, bodisi iz fiziološkega (fizična aktivnost) ali patološkega mikrookolja (zlomi, poškodbe mišic), se namreč aktivirajo, pomnožijo in usmerijo v določeno celično linijo, npr. v kostne (osteoblaste) ali mišične celice (miocite) ter migrirajo na mesto poškodovanega tkiva in ga regenerirajo. V skeletnih mišicah so najpomembnejše satelitske celice, ki so ključne v procesu mišične regeneracije. Hrustanec je slab vir matičnih celic, zato ima tudi veliko slabšo regeneracijsko sposobnost. Kadar lezije hrustanca ne dosežajo pod njim ležeče subhondralne kosti, je obnova tkiva omejena zgolj na povečano presnovno aktivnost zrelih hondrocitov v okolici poškodbe, zato je običajno nepopolna. Kadar pa poškodbe hrustanca segajo do kosti (osteohondralne lezije), se na mestu poškodbe razraste vezivno-hrustančno tkivo, za tvorbo katerega so odgovorne kostne MSC.

Čeprav so MSC odkrili že v drugi polovici prejšnjega stoletja kot celice, ki so sposobne samoobnove in obnove nekaterih drugih vrst celic (3, 4), pa je njihova definicija še vedno precej ohlapna, saj še vedno iščemo njihove specifične molekulske označevalce. Odkrili so številne označevalce zrelih celic, žal pa ne poznamo označevalca, s katerim bi nedvoumno identificirali neusmerjene multipotentne celice, med katere sodijo MSC (5). To je do določene mere razumljivo, saj se MSC zaradi svoje multipotentnosti lahko usmerjajo v različne celične linije. Leta 2006 je Mednarodna zveza za celično terapijo (*International Society for Cellular Therapy*) sprejela minimalne kriterije za definicijo MSC (preglednica 1). Razvoj modernih tehnologij (Cre/loxP, sekvenciranje naslednje generacije, CRISPR-Cas itd.) pa nam omogoča nadaljnje raziskave za njihovo boljše prepoznavanje, s tem pa tudi za njihovo uporabo v regenerativni medicini in celo v diagnostiki bolezni različnih organskih sistemov.

1.1 PREPOZNAVANJE MSC IN NJIHOVIH REGENERACIJSKIH SPOSOBNOSTI IN VITRO

MSC lahko izoliramo iz praktično katerega koli organa odraslega človeka. Pri tem pa moramo biti pozorni in pri vsaki izolaciji dokazati, da gre dejansko za MSC, kajti podobne lastnosti imajo tudi nekatere končne celične linije in predvsem fibroblasti, ki sestavljajo vezivno tkivo številnih organov. Izvirne lastnosti MSC, kot so sposobnost pritrditve na plastično površino gojilnih posod, pretvorbe v celice kosti (osteoblaste), hrustanca (hondrocite) in maščobnega tkiva (adipocite) ter





Slika 1: Hierarhija med matičnimi celicami in njihova vloga v procesu razvoja organov (ontogeneze).
Figure 1: Hierarchy between different stem cell types and their role in organ formation (ontogeny).

sposobnost tvorbe kolonij (CFU-F, colony forming unit fibroblast), so še vedno poglavitna merila, s katerimi jih preverjamo in dokazujemo *in vitro*. Po izolaciji iz tkiva se MSC med gojenjem *in vitro* v nekaj dneh pritrldijo na plastično površino (slika 2), zato je njihova izolacija dokaj enostavna. Zavedati pa se moramo, da pri izolaciji primarnih MSC skoraj vedno dobimo heterogeno kulturo, sestavljeno iz celic različnih razvojnih stopenj MSC in njihovih zrelih oblik, ki se vse nahajajo v izvornem tkivu. V primeru njihove izolacije iz kostnega tkiva so poleg MSC prisotni še osteoblasti, adipociti in njihove različne razvojne stopnje ter hematopoetske matične celice. Iz skeletne mišice pa lahko poleg tkivno specifičnih satelitskih celic sočasno izoliramo tudi druge vrste mišičnih matičnih

celic ter seveda same mišične celice (miocite) na različnih razvojnih stopnjah. Zrele, diferencirane celice se težko delijo in zato med gojenjem hitro odmrejo. Lahko pa se zgodi, da se v teh razmerah tudi zrele celice pretvorijo nazaj v bolj plastične predhodnike. Velik vpliv na to, katere vrste celic bomo izolirali in nato gojili *in vitro*, ima celični gojitveni medij. Uporaba medijev z dodatkom določenih rastnih dejavnikov prispeva k selektivni rasti in preživetju MSC in jih ohranja v multipotentnem stanju. Sortiranje izoliranih celic na osnovi pozitivnih ali negativnih označevalcev MSC pa nam omogoča delo z bolj homogeno in definirano populacijo. Pogosto na ta način izberemo mezenhimsko linijo, ki je negativna za CD45, CD31, CD34 in CD235a in omogoča gojenje homogenih celic brez

Preglednica 1: Celični označevalci in posebne lastnosti na osnovi katerih prepoznavamo MSC *in vitro* (6, 7).

Table 1: Cell markers and special features of MSCs as a basis for their *in vitro* identification (6, 7).

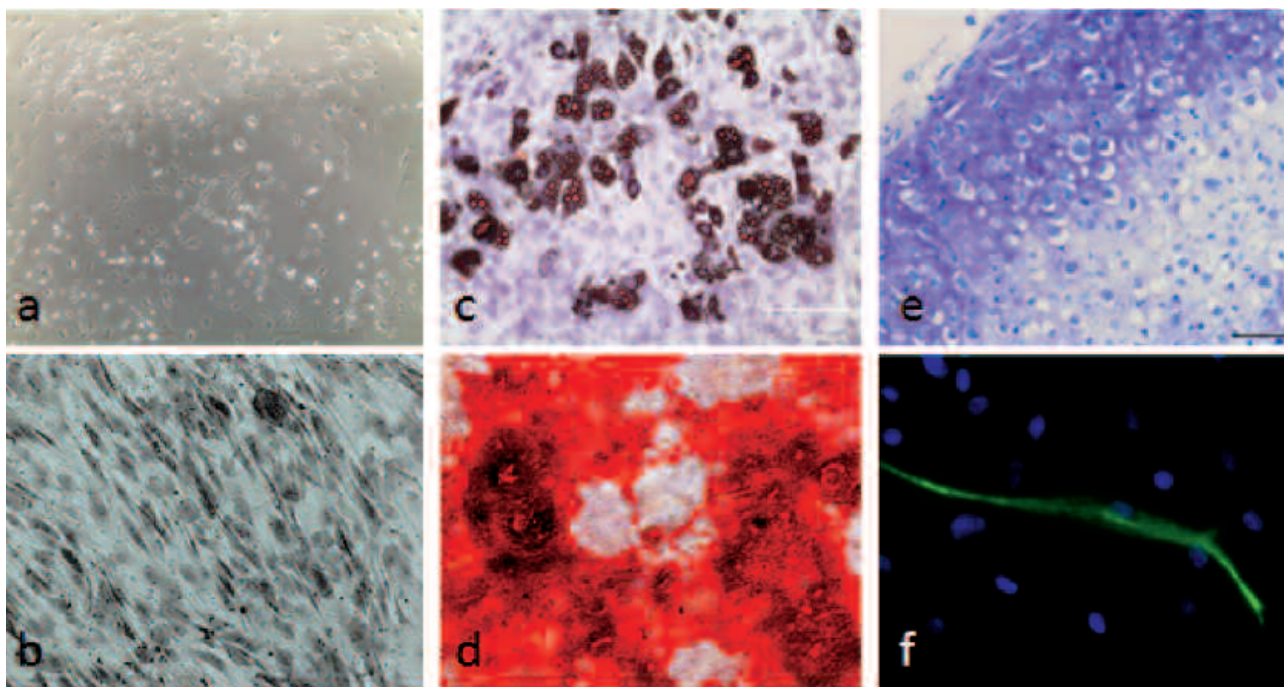
1. Sposobnost pritrditve na plastiko <i>in vitro</i>			
2. Celični označevalci	Negativni označevalci MSC	Pozitivni označevalci MSC	Pozitivni označevalci (samo za MSC iz mišic)
	CD45 (pan levkocitna linija)	CD73 (5' ektonukleotidaza)	Pax („paired box“ protein) 7, 3
	CD34 (zgodnji hematopoetski predhodniki)	CD90 (timusni celični antigen 1, Thy-1)	Myf5, MyoD
	CD14 ali CD11b (monociti/makrofagi)	CD105 (endoglin)	CD56 (neuralna celična adhezijska molekula)
	CD79a ali CD19 (B celična linija)		desmin
	HLA-DR (z interferonom γ stimulirane celice)		sindekan-3,-4
3. Sposobnost pretvorbe v osteoblaste, hondrocite in adipocite, za mišične MSC pa v miocite (dokazano s histološkim barvanjem) <i>in vitro</i>			

prisotnosti levkocitov, eritrocitov in endotelijskih celic. Ker MSC, gojene *in vitro*, izkazujejo fibroblastom podobno morfološko (sliki 2a in b), jih je težko prepoznati samo po videzu, zato moramo njihovo istovetnost potrditi z imunofenotipizacijo, torej z analizo že prej omenjenih označevalcev CD (cluster of differentiation) s pretočno citometrijo. Kot smo omenili, žal ni specifičnega označevalca MSC, zato moramo za njihovo prepoznavanje uporabljati kombinacijo dveh ali več različnih pozitivnih in negativnih označevalcev (preglednica 1). Za glavnega označevalca satelitnih celic iz mišic velja transkripcijski dejavnik Pax7, dokazali pa so še številne druge označevalce teh celic, odvisno od tega, ali se celice nahajajo v aktivnem ali mirujočem stanju. Poleg satelitnih celic so v skeletnih mišicah prisotne tudi druge matične celice, ki izražajo podobne označevalce kot MSC iz kostnega tkiva. Multipotentnost MSC oz. sposobnost njihove pretvorbe v osteoblaste, adipocite in hondrocite *in vitro* preverjamo bodisi z merjenjem izražanja specifičnih genov ali z uporabo specifičnih barvanj značilnih sestavin zunajceličnega matriksa (slike 2c-f). Po uspešni adipogenezi iz MSC nastale adipocite dokažemo s pomočjo barvila *Oil red O*, ki se veže na lipidne kapljice, vidne tudi pod mikroskopom (slika 2c). Po uspešni osteogenezi se iz MSC razvijejo osteoblasti, ki začnejo izločati kalcijev fosfat, na katerega se veže barvilo *Alizarin red S* (slika 2d). Med hondrogenozo nastali hondrociti, ki se nahajajo znotraj

hondrogene pelete, tvorijo glikozaminoglikane, na katere se veže barvilo toluidin modro (slika 2e). Najpomembnejša lastnost mišičnih MSC je sposobnost tvorbe mišičnih vlaken oz. miogeneza. Nastanek mišičnih vlaken dokažemo z uporabo indirektno imunofluorescence za različne označevalce, npr. desmin (slika 2f). Sposobnost tvorbe kolonij v celični kulturi *in vitro* odraža proliferacijsko sposobnost MSC in jo prav tako določamo. Sveže izolirane celice naselimo v gojilne posode v zelo majhni gostoti in po določenem času preštujemo nastale kolonije. MSC imajo izjemno sposobnost podvajanja, saj posamezna MSC, ki preide pet ciklov celične delitve tvori kolonije iz 32 (2⁵) celic. Ker za vse opisane teste multipotentnosti MSC *in vitro* potrebujemo določeno število celic, je njihova velika sposobnost pomnoževanja nedvomno prednost za delo z njimi, obenem pa omogoča tudi možnost avtologne (lastne) in alogenske (sorodnega ali nesorodnega darovalca) presaditve MSC za vrednotenje njihovih učinkov *in vivo*.

1.2 PREPOZNAVANJE MSC IN NJIHOVIH REGENERACIJSKIH SPOSOBNOSTI *IN VIVO*

Živalski modeli predstavljajo nepogrešljiv pristop ne le pri odkrivanju in vrednotenju tkivnih regeneracijskih sposob-



Slika 2: MSC, izolirane iz kosti (a) in skeletne mišice (b), po pritrditvi na plastiko *in vitro*. Adipogena (c), osteogena (d), hondrogena (e) in miogena (f) pretvorba MSC kot dokaz njihove multipotentnosti *in vitro*.

Figure 2: MSCs isolated from bone (a) and skeletal muscle (b) following their *in vitro* adherence to plastic surface. *In vitro* adipogenic (c), osteogenic (d), hondrogenic (e) and miogenic (f) differentiation of MSCs as a proof of their multipotency.

nosti MSC, ampak tudi za odkrivanje vzrokov mišično-skeletnih bolezni. Čeprav je v preteklem desetletju postalo jasno, da je regeneracijska sposobnost tkiv v odraslih organizmih posledica prisotnosti MSC v njih, pa predstavlja največjo težavo mobilizacija teh celic iz niš, v katerih se nahajajo. V tem poglavju predstavljamo najnovejše znanstvene pristope za odkrivanje in ocenjevanje regeneracijskega potenciala MSC z uporabo živalskih modelov.

1.2.1 Dvojno nukleozidno označevanje MSC v živalskih modelih

V tem primeru izkoriščamo lastnosti MSC, da se v tkivih nahajajo v mirujočem stanju z določeno, počasno frekvenco samoobnavljanja, kar pomeni, da so podvržene manjšemu številu celičnih ciklov. *In vivo* jih detektiramo tako, da poizkusni živali za določeno časovno obdobje apliciramo različne nukleozidne analoge, npr. kloro- ali jododeoksiuridin (CldU, IdU itd.), največkrat kar v pitni vodi (8). Po zaužitju jih vse telesne celice vgradijo v lastno DNA, nato pa jih izgubljajo tekom celičnih delitev. Nasprotno pa jih MSC zaradi redkejših delitev ohranijo v svojem genomu. Na poizkusni živali nato izvedemo določen stimulus za aktivacijo MSC, npr. povzročimo poškodbo hrustanca,

kosti ali mišice, in jim začnemo aplicirati še drug nukleozidni analog, npr. IdU, če je bil prvi CldU. MSC bodo IdU zaradi prehoda v intenziven proces aktivacije in pomnoževanja vgradile v svojo DNA, po končanem poizkusu, ko evtanaziramo žival, pa jih bomo opazili kot dvojno pozitivne celice (slika 3a). Ker pa se nukleozidni analogi zadržijo v celici le omejen čas (tekem 5 do 7 ciklov celične delitve), niso primerni za opazovanje in sledenje tistih populacij MSC, ki se delijo hitreje.

1.2.2 Transgeni živalski modeli za identifikacijo MSC *in situ*

Izjemen napredek pri odkrivanju in prepoznavanju MSC je omogočil razvoj transgenih živalskih modelov. Z njihovo uporabo lahko elegantno prostorsko, časovno in kinetično analiziramo MSC, pri čemer spremljamo, kje se te celice nahajajo, kdaj se pomaknejo iz niš in kam migrirajo (9). Pri transgenih živalskih modelih ustvarjamo trajne genetske spremembe v MSC *in situ*. Najbolj poznan način vzpostavitve transgenih živalskih modelov temelji na tehnologiji Cre/loxP, kjer želeno genetsko spremembo ustvarimo s pomočjo encima Cre- rekombinaze. To ima za posledico izražanje reporterskega barvila, najpogosteje fluorescent-

nega, npr. zeleni fluorescenčni protein (GFP), Tomato itd., znotraj specifične celične populacije (slika 3b). Mišje modele Cre/loxP ustvarimo s križanjem dveh mišk, pri čemer genetsko ozadje prve živali spremenimo tako, da preko aktivacije specifičnega promotorja povzroči izražanje gena za Cre-rekombinazo samo v določeni subpopulaciji MSC. Druga žival vsebuje transgen, ki je pod nadzorom v vsaki celici prisotnega promotorja Rosa26. V transgenu je tudi reporterski gen (v nadaljevanju reporter), pred katerim je stop kodon, obdan z mesti loxP, ki jih cepi Cre-rekombinaza. Rezultat križanja teh dveh vrst mišk je torej transgeni model, ki vsebuje oba genetska elementa. To pomeni, da Cre-rekombinaza izreže stop kodon, zato se reporter izrazi samo v specifični podvrsti MSC, ki jo na ta način zaznamo. Ko se v določeni celici aktivira reporter, ga bodo vsebovale tudi vse njene potomke, zato jim bomo lahko sledili tako časovno kot tudi prostorsko (slika 3c).

1.2.3 Živalski modeli za oceno regeneracijskih sposobnosti MSC

Regeneracijske sposobnosti MSC lahko proučujemo na različnih živalskih modelih bolezni in poškodb mišično-skeletnega sistema *in vivo*, ki bolj ali manj uspešno posnemajo stanje pri človeku. Največ pozornosti namenjamo boleznim in poškodbam sklepnega hrustanca zaradi njegove nezadostne intrinzične regeneracijske sposobnosti. Osteoartritoza (OA), ki predstavlja zadnji stadij okvare sklepa, je namreč ogrožen terapevtski in tudi družbeni izziv. Zdravil z vplivom na strukturo hrustanca ne poznamo, trenutno zdravljenje temelji na simptomatskih (ne)medikamentoznih ukrepih, nadaljevalno pa na operativni artroplastiki celotnega sklepa. Na razpolago imamo živalske modele tako za primarne kot tudi za sekundarne oblike OA. Tako kot pri ljudeh je tudi pri živalih primarna OA posledica degenerativnih sprememb v sklepu, ki nastanejo spontano, najpogosteje s starostjo, ali z genetsko modifikacijo. Sekundarna OA pa je povezana z določenim vzrokom ali dejavnikom tveganja, pri čemer je najpogostejša posttravmatska OA. Živalske modele za slednjo najpogosteje ustvarimo z invazivnimi posegi, kjer poškodbo sklepa povzročimo kemijsko (intraartikularne injekcije steroidov, kolagenaze itd.) ali fizikalno (kirurška poškodba hrustanca, disekcija ligamentov, meniskusa itd.). Za proučevanje regeneracijske sposobnosti mišic in učinkovitosti regenerativnih terapij pa mišico najpogosteje poškodujemo z uporabo miotoksinov (kardiotoksin, noteksin), kemijsko z aplikacijo barijevega klorida ali pa z zaporednim zamrzovanjem in odmrzovanjem mišičnega tkiva s tekočim dušikom (10). V ta namen uporabljamo tako male (miši, podgane, zajci, morski prašički)

kot tudi večje (ovce, koze, psi, konji) živali. Miši najpogosteje uporabljamo zaradi možnosti spreminjanja njihovega genetskega materiala, hrustanec konja pa je najbolj podoben človeškemu (11). Najpogosteje proučujemo kolenske sklepe. Regeneracijske sposobnosti MSC lahko proučujemo bodisi s sledenjem endogeni populaciji MSC (transgeni živalski modeli ali dvojno nukleozidno označevanje) ali s transplantacijo sveže izoliranih ali predhodno ustrezno *in vitro* manipuliranih, avtolognih ali alogenskih MSC. Čeprav lahko z živalskimi modeli le do določene mere posnemamo dogajanja pri ljudeh, pa imajo veliko prednost v primerjavi s kliničnimi raziskavami dokazovanja učinkovitosti MSC pri regeneraciji tkiv zaradi možnosti izvedbe randomiziranih poizkusov. Kontrolna skupina živali namreč lahko predstavlja placebo kirurški poseg (*sham surgery*), velikokrat pa za kontrolo uporabimo kar nasprotni, netretirani sklep oz. mišico.

1.3 SUBPOPULACIJE MSC V MIŠIČNO-SKELETNEM SISTEMU

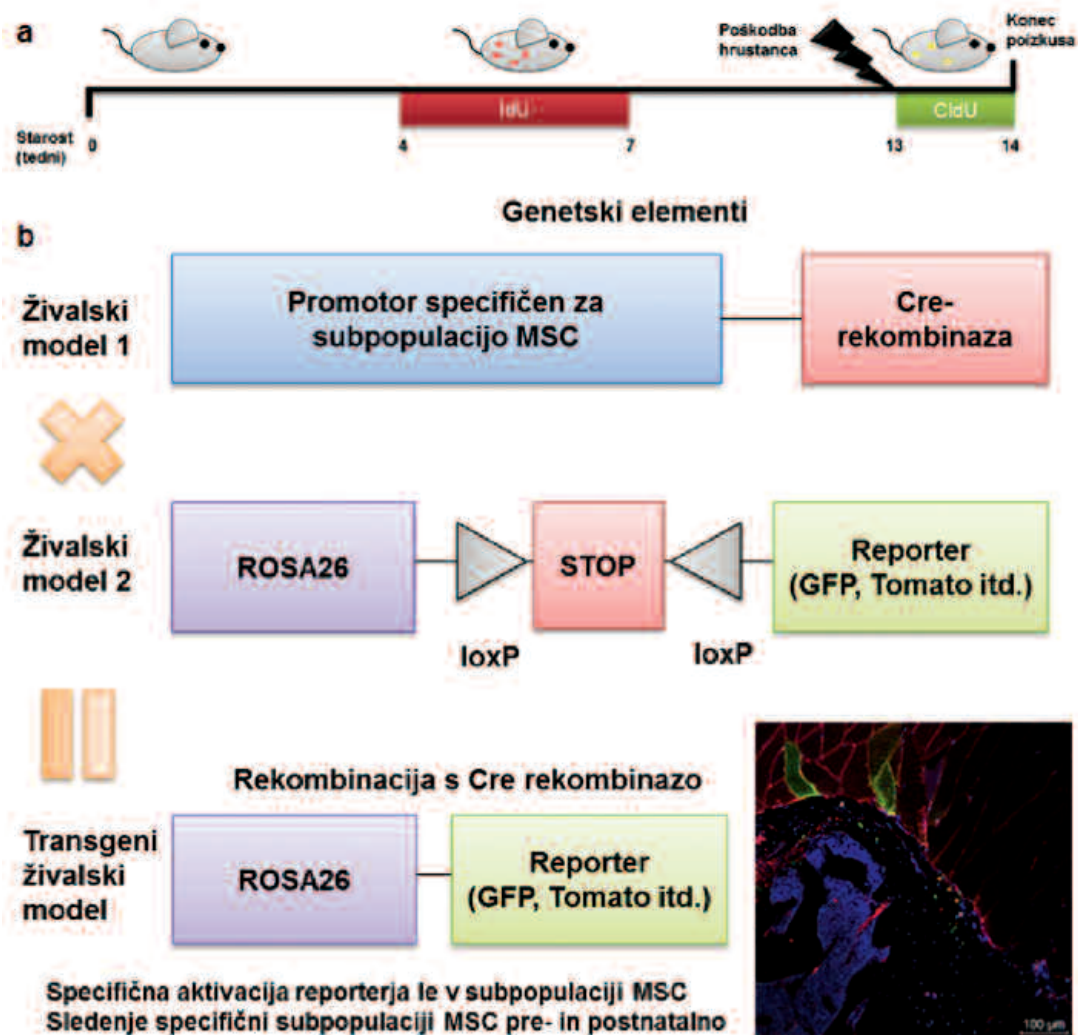
Z uporabo transgenih živalskih modelov so odkrili različne subpopulacije MSC v različnih tkivih mišično-skeletnega sistema, največ v kostnem mozgu, sinovijski ovojnici in skeletnih mišicah, dokazali pa so tudi njihovo vlogo pri regeneraciji različnih sklepnih in mišičnih struktur. V preglednici 2 so zbrane subpopulacije matičnih celic v kostnem tkivu in skeletnih mišicah, ki imajo dokazano pomembne vloge v mišično-skeletnem sistemu. Med seboj se razlikujejo v izražanju nabora molekularnih označevalcev in sposobnosti pretvorbe v različne končno diferencirane celice *in vitro* ali *in vivo*. Translacija teh rezultatov v klinično prakso pa je zaradi pomanjkanja specifičnih označevalcev za te subpopulacije pri človeku velikokrat otežena (12). Pri delu s človeškimi MSC največkrat uporabljamo naslednje molekularne označevalce: CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD54 in CD166.

2 MSC PRI ZDRAVLJENJU MIŠIČNO-SKELETNIH BOLEZNI

2.1 PROTIVNETNO/IMUNOSUPRESIVNO DELOVANJE MSC

Eden od osnovnih pogojev za uspešno in kakovostno regeneracijo tkivnih poškodb je odsotnost vnetja. Zato je sposobnost MSC, da delujejo izrazito protivnetno z zavi-





Slika 3: Različni modeli za prepoznavanje MSC ter oceno njihovih regeneracijskih sposobnosti in vivo. Shematski prikaz dvojnega nukleozidnega označevanja MSC pri poskusni živali (a). Prikaz uporabe genetskih strategij za sledenje MSC v transgenih živalskih modelih, ki jih dobimo s križanjem dveh, genetsko različnih vrst živali (b). Histologija kolenskega sklepa v mišjem transgenem živalskem modelu (c), kjer so s fluorescentnim proteinom GFP (zeleno) označene celice, ki izražajo specifični označevalec MSC, s fluorescentnim označevalcem Tomato (rdeče) pa vse ostale celice, celična jedra so obarvana z barvilom DAPI (modro).

Figure 3: In vivo models of MSCs identification and assessment of their regenerative potential. Schematic representation of double nucleoside labelling in an experimental animal (a). Genetic strategies used for lineage tracing of MSCs in a transgenic animal model, created by cross-breeding of two genetically different strains (b). Histology of transgenic mouse model knee joint (c), showing GFP-labelled cells expressing a specific MSCs marker (green), with the rest of the cells being labelled with Tomato (red), and nuclei with DAPI (blue).

ranjem imunskih odzivov prirojene in pridobljene imunosti, enako pomembna kot njihove regeneracijske sposobnosti. Protivnetno imunomodulatorno delovanje MSC je predmet intenzivnih raziskav ter številnih kliničnih študij, predvsem eksperimentalno zdravljenje akutne bolezni presadka zoper gostitelja po alogenski presaditvi krvotvornih matičnih celic ter Chronove in drugih kroničnih vnetnih bolezni. Čeprav

še ne poznamo vseh mehanizmov njihovega zaviralnega delovanja na provnetne efektorske celice imunskega sistema, pa se je v zadnjih letih na tem področju nabralo kar precej z znanstvenimi dokazi podprtih spoznanj. Danes vemo, da lahko MSC delujejo imunomodulatorno bodisi preko neposrednih medceličnih interakcij ali pa posredno parakrino, z izločanjem različnih topnih imunosupresivnih

Preglednica 2: Subpopulacije MSC z dokazano vlogo v mišično-skeletnem sistemu.

Table 2: Subpopulations of MSCs with proven role in musculoskeletal system.

Subpopulacija	Anatomska lokacija in delež v MSK sistemu	Fenotip	Vloga v MSK sistemu	Objavljeno v
Leptinski receptor	0.3% celic v KM	CD51/PDGFR β /PDGFR α /CD105/Prx-1/Cxcl12+Sca-1+/-	glavni vir osteoblastov in adipocitov v KM odraslega organizma	Zhou Cell Stem Cell 2014 (13)
Nestin	4% CD45- celic v KM	CD45/CD31-	v kostni remodelaciji, pretvorba v osteoblaste in hondrocite	Mendez-Ferrer Nature 2010 (14)
	0.2% CD45/CD235a/CD31-celic v KM odraslega organizma	PDGFR α /CD51/CD105+		Pinho JEM 2013 (15)
mSSC	0.5% v epifiznih ploščah	CD51/CD200+ CD105-	tvorba kosti, hrustanca in veziva tudi izven skeletnega sistema	Chan/Seo/Chen/Lo Cell 2015 (16)
Gremlin1 (antagonist BMP)	0.0025% celic v epifiznih ploščah	CD105+, Sca-1/PDGFR α -	rast kosti, kostna remodelacija in celjenje zlomov (tvorba osteoblastov, hondrocitov in retikularnih celic KM, ne pa tudi adipocitov)	Worthley Cell 2015 (17)
Linija Gdf5	sinovijska ovojnica	CD45/CD31/CD16/CD11b-PDGFR α /Sca1/gp38/CD200/CD73/CD90+	regeneracija hrustanca po poškodbi, sposobnost morfogeneze vseh elementov sklepa	Roelofs/Zupan Nature Comm 2017 (18)
Satelitne celice	med bazalno membrano in sarkolemo v skeletnih mišicah	Pax7+/CD56+/Myf5+	glavni vir celic za regeneracijo skeletnih mišic	Yin Physiol Rev 2013 (19)
PDGFRα+ mišične matične celice	intersticij skeletnih mišic	CD45/CD31-/SM/C-2.6/NG2-PDGFR α +PDGFR β +	akumulacija maščobe v mišicah (sposobnost adipogeneze, ne pa tudi miogeneze)	Uezumi Nature Cell Biol 2010 (20)
NG2	skeletne mišice	NG2/Nestin/PDGFR β /CD146+PDGFR α -	regeneracija mišic v fizioloških in patoloških pogojih	Birbrair Stem Cells Dev 2013 (21)
Periciti NG2/ALP+	na steni mikrovaskulature skeletne mišice	CD45/CD133/CD31/CD34-CD44/CD146/CD13/CD49b/PDGFR β +	regeneracija mišičnih vlaken pri mišični distrofiji	Dellavalle Nature Cell Biol 2007 (22)

Legenda: MSK: mišično-skeletni; KM: kostni mozeg; mSSC: mišje skeletne matične celice; BMP: kostni morfogenezni protein; Gdf5: rastni in diferenciacijski dejavnik 5; Pax7 ali »paired box« protein 7; Myf5: miogeni dejavnik 5; NG2: nevralni/glijalni antigen 2; ALP: alkalna fosfataza; PDGFR α / β : receptor za trombocitni rastni dejavnik α / β .



dejavnikov (23, 24). Njihovo zaviralno delovanje na celice prirojene imunosti, makrofage, dendritične celice (DC), naravne celice ubijalke (NK), naravne T-celice ubijalke (NKT) in mastocite, poteka preko različnih molekulskih mehanizmov. Tako MSC zavirajo polarizacijo makrofagov v njihov vnetni podtip M1, in sicer z izločanjem interleukina 6 (IL-6), granulocitne in makrofagne kolonije vzpodbujajočega dejavnika (GM-CSF) ter prostaglandina E2 (PGE2), pri čemer posledično prevlada protivnetni podtip M2 (proizvodnja in izločanje IL-10) (25). PGE2, ki ga izločajo MSC, prispeva tudi k inhibiciji degranulacije makrofagov in s tem k preprečevanju sproščanja histamina, prav tako pa zavira tudi aktivacijo, diferenciacijo in efektorske funkcije DC (v kombinaciji z IL-6 favorizira nastanek regulatornih/tolerogenih DC, ki izločajo izrazito protivnetni transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β) in celic NK (25). Med topnimi imunosupresivnimi dejavniki, ki jih proizvajajo in izločajo MSC, sta tudi TGF- β in encim indolaminska-2,3-dioksidogenaza (IDO), ki pretvarja triptofan, eno od ključnih aminokislin za ustrezno delovanje celic T, v kinurenin. Tako TGF- β kot tudi IDO močno zavirata efektorske funkcije celic NK (25). Celice NKT, tako kot DC, povezujejo prirojeno in pridobljeno imunost. Pomembne so pri odstranjevanju z virusi okuženih in tumorskih celic. MSC spremenijo njihove fenotipske značilnosti in zavirajo njihovo proliferacijo, proizvodnjo vnetnih citokinov in citotoksično delovanje. To dosežejo bodisi z neposrednimi medceličnimi interakcijami ali pa preko izločanja TGF- β in PGE2 (24). Tarče imunosupresivnih učinkov MSC so tudi efektorske celice pridobljene imunosti, limfociti B in T. Tako MSC zavirajo aktivacijo, proliferacijo in izražanje kemokinskih receptorjev limfocitov B ter preprečujejo njihovo pretvorbo v plazmatke, ki proizvajajo protitelesa. To dosežejo tako z neposrednimi medceličnimi interakcijami (vezava inhibitornih receptorjev PD-1 na limfocitih B z njihovimi ligandi PDL-1 na MSC) kot z izločanjem topnih dejavnikov (galektin-9) (24, 25). Limfocite T delimo na celice CD4+ in CD8+ glede na molekulske označevalce, ki jih izražajo na svojih površinah. Med limfociti T CD4+ obstajajo različni podtipi (Th1, Th2, Th17, Treg itd.), ki se med seboj razlikujejo glede na vrste citokinov, ki jih proizvajajo, in seveda glede na efektorske funkcije, ki jih opravljajo, medtem ko večino celic CD8+ predstavljajo citotoksični limfociti T. Celice T pomagalk tipa 1 (Th1) proizvajajo vnetne citokine (IL-2, IFN- γ), celice T pomagalk tipa 2 (Th2) protivnetne (IL-4, IL-13), celice T pomagalk tipa 17 (Th17) vnetni IL-17, naravni regulatorni limfociti Treg pa protivnetni IL-10 (25). Vsi limfociti T s svojimi klonsko porazdeljenimi T-celičnimi receptorji (TCR) specifično prepoznajo antigene v obliki peptidov, vezanih na molekule pglavitnega kom-

pleksa tkivne skladnosti razredov I (limfociti T CD8+) in II (limfociti T CD4+), ki jih pri ljudeh označujemo s kratico HLA (*human leukocyte antigens*). MSC preprečujejo proliferacijo limfocitov T neodvisno od omejitev na nivoju molekul HLA, in sicer s proizvodnjo in izločanjem PGE2, IDO, hepatocitnega ravnega dejavnika (HGF), TGF- β , dušikovega oksida (NO), galektina 1 ter z neposrednimi medceličnimi interakcijami preko vezave PD-1 na PD1-L (24, 25). Poleg tega MSC spodbujajo tudi nastajanje induciranih regulatornih limfocitov T (npr. Tr1), ki z izločanjem IL-10 in TGF- β zavirajo aktivacijo celic T. Ko so proučevali vplive MSC na celjenje kožnih ran so dokazali, da le-te s svojim parakrinim delovanjem pospešujejo celjenje, angiogenezo in remodeliranje zunajceličnega matriksa ter tako omogočajo popolno regeneracijo funkcionalnega tkiva brez nastanka brazgotin (26, 27).

2.2 MSC V REGENERATIVNI MEDICINI

Regenerativna medicina omogoča obnovo strukture in funkcije poškodovanih tkiv in organov. Gre za razmeroma nove načine zdravljenja z uporabo zunanjih celičnih virov, ki so običajno matične ali druge progenitorske celice (28). Za zdravljenje mišično-skeletnih bolezni večinoma uporabljamo avtologne (bolniku lastne) celice, nekaj novejših raziskav pa že proučuje tudi možnost uporabe alogenskih (darovanih) celic (29, 30). Mehanizem delovanja MSC pri regeneraciji tkiv je povezan z izražanjem številnih citokinov, kemokinov in ravnih dejavnikov, ki izboljšujejo angiogenezo, zavirajo vnetje in inhibirajo apoptozo ter spodbudijo endogene popravilne mehanizme. Samo usmerjeno diferenciacijo MSC pa lahko dosežemo z ustrezno mikrookoljsko, mehansko in biološko stimulacijo celic. Vse naštetje lastnosti MSC močno podpirajo njihovo uporabo pri številnih patoloških stanjih, za katere sta značilna vnetje in degeneracija tkiva. Klinična uporaba MSC v mišično-skeletnem sistemu se vsako leto povečuje. Podatke o aktualnih kliničnih raziskavah na tem področju smo zbrali v preglednici 3.

Po neobjavljenih podatkih je število bolnikov z boleznimi mišično-skeletnega sistema, zdravljenih z MSC, še mnogo večje. Klinično MSC uporabljamo predvsem za zdravljenje tkiv, ki se sama po sebi slabo obnavljajo (sklepni hrustanec), in tistih, ki imajo zaradi določenega kroničnega stanja prizadeto sposobnost celjenja (npr. kronične rupture tetiv in mišic, psevdootroze kosti). V klinični praksi MSC apliciramo bodisi z neposrednim injiciranjem njihove suspenzije v sklep ali tetivo ali pa kirurško, kjer jih dodamo neposredno na mesto okvare, običajno na biokompatibilnem celičnem nosilcu (54). Glavnina kliničnih raziskav zaenkrat poteka samo v obliki predstavitev zdravljenih serij bolnikov, brez kontrolnih

Preglednica 3: Klinična uporaba MSC za regeneracijo mišično-skeletnega (MSK) sistema.

Table 3: Clinical application of MSCs for musculoskeletal (MSK) system regeneration.

Patologija v MSK sistemu	Objavljene raziskave
Osteoartroza in hondralne lezije velikih sklepov	Sánchez M BioMed Res Int 2016 (31) Pers YM Stem Cells Transl Med 2016 (33) Freitag J BMJ Open 2015 (35) Davatchi F Int J Rheum Dis 2015 (37) Vega A Transplantation 2015 (39) Vangsness CT J Bone Joint Surg 2015 (41) Akgun I Arch Ortop Trauma Surg 2015 (43) Wong K Arthroscopy 2013 (32) Orozco Transplantation J 2013 (34) Jo CH Stem cells 2014 (36) Davatchi F Int J Rheum Dis 2011 (38) Centeno CJ Pain Physician 2008 (40) Centeno CJ J Pain Res 2015 (42) Koh YG Arthroscopy 2016 (44)
Tendinopatije (Ahilova tetiva, lateralni epikondilitis, rotatorna manšeta)	Lee SY Stem cells 2015 (45) Centeno CJ J Pain Res 2015 (42)
Osteonekroza (okvara kosti zaradi motnje prekrvavitve po poškodbi, uživanju določenih zdravil ali zaradi spontanega nastanka) kolčne glavice in femoralnih kondilov kolen	Chen C Mol Med Rep 2016 (46) Daltro Cerqueira C Stem Cell Res Ther 2012 (47) Aoyama T Tissue Eng Part B Rev 2014 (48) Rastogi S Musculoskelet Surg 2013 (49) Zhao D Bone 2012 (50)
Celjenje psevdootroze kosti po zlomu	Weel H BMC Musculoskelet Disord 2015 (51) Kim SJ Cell Transplant 2017 (52)

skupin. Ne glede na to pa v enem od zadnjih preglednih prispevkov o vplivu MSC na regeneracijo hialinega hrustanca Reissis s sod. poročajo o njihovem predominantno pozitivnem delovanju z zelo malo neželenimi učinki (53). Poudarjajo tudi, da je klinično raziskovanje vplivov MSC na obnovo hrustanca še zelo v začetni fazi, zato ni jasno, kateri vir MSC, kolikšna koncentracija MSC, kateri način njihove vsaditve, morebitna uporaba nosilcev ali rastnih dejavnikov ter kakšen program rehabilitacije so najboljši oz. najučinkovitejši. Pri kirurškem zdravljenju simptomatskih, zamejenih hrustančnih lezij, ki se slabo celijo in lahko napredujejo v generalizirano OA, se pojavlja vprašanje, ali je dodaten vnos koncentriranih avtolognih MSC, izoliranih iz druge lokacije, sploh potreben oz. ali ni dovolj zgolj kombinacija biokompatibilnega nosilca in fizioloških koncentracij MSC iz lokalnega okolja lezije (največkrat iz subhondralne kosti). V nedavnih sistematskih preglednih prispevkih Kon in sod. ter Deng in sod. ugotavljajo veliko heterogenost uporabljenih celičnih pripravkov, biomaterialov in kliničnih protokolov (55, 56). Oboji so mnenja, da sta oba omenjena pristopa glede vira MSC varna in uspešna, pri čemer o terapevtskih prednostih enega oz. drugega zaradi omejenega

števila preliminarnih rezultatov še ne morejo govoriti. Opazili pa so, da se je v zadnjih letih povečal trend dostave predhodno *in vitro* namnoženih avtolognih MSC, pridobljenih iz druge lokacije, v hrustančne lezije. Najpogostejši vir MSC za obnovo skeletno-mišičnega sistema še vedno predstavlja kostni mozeg, čeprav se v zadnjem času pojavlja vedno več raziskav, v katerih uporabljajo tudi MSC, pridobljene iz maščobnega tkiva/lipoaspirata. MSC je namreč v kostnem mozgu zelo malo, le 0.01% do 0.001 % vseh enojedrnih celic. Za pridobivanje terapevtsko primerne števila celic moramo zato MSC več tednov namnoževati v laboratoriju, to pa je povezano z velikimi stroški in zakonskimi omejitvami. Da bi se temu postopku izognili, so razvili nove, t. i. enostopenjske postopke, ki jih izvedemo v sami operacijski dvorani v okviru operativnega posega. Na Ortopedski kliniki UKC Ljubljana v sodelovanju s podjetjem Educell že od leta 2014 uporabljamo filtrirane MSC iz kostnega mozga. Doslej smo na ta način zdravili 42 bolnikov z omejenimi hondralnimi ali osteohondralnimi lezijami (27 kolen, 13 gležnjeve in 2 kolka). MSC pridobimo s punkcijo medenične kosti, iz katere odzamemo 20 do 30 mL aspirata kostnega mozga z dodatkom antikoagulant. Aspirat nato znotraj



operacijske dvorane s pomočjo posebne celične kolone obdelamo tako, da odstranimo glavnino eritrocitov in zmanjšamo deleže drugih večjedrnih celic, ki niso pomembne za regeneracijo. Na koncu dobimo 3 do 5 mL celičnega pripravka, v katerem je koncentracija MSC 1.5-krat povečana, in ga na mesto lezije prenesemo skupaj z ustreznim celičnim nosilcem (kolagensko-hidroksiapatitna membrana, kolagenski gel, fibrinsko lepilo). Seriji na ta način zdravljenih bolnikov redno sledimo. Doslej je bilo zdravljenje praviloma uspešno. Zabeležili smo le štiri propade vsadka, ki pa jih nismo mogli povezati z uporabo MSC, temveč so bili posledica drugih vzrokov.

3 POTENCIAL MSC ZA DIAGNOSTIKO MIŠIČNO-SKELETNIH BOLEZNI

MSC so zaradi svojih regeneracijskih sposobnosti najpogostejša tarča raziskav na področju regenerativne medicine. S spoznavanjem njihovih lastnosti, ki so povezane tako s fiziološko vlogo (remodelacija kosti, mišična regeneracija itd.) kot tudi s patološkimi stanji (zlomi, degenerativne bolezni itd.) se nakazuje tudi njihova potencialna uporaba v diagnostiki mišično-skeletnih bolezni. Same MSC s patološko spremenjenimi lastnostmi oz. njihovi produkti, zlasti če bi jih lahko zaznali oz. določili v periferni krvi, predstavljajo potencialne diagnostične označevalce za zgodnje neinvazivno odkrivanje degenerativnih sprememb. Vse tri najpogostejše degenerativne bolezni mišično-skeletnega sistema, osteoporoza (OP), OA in sarkopenija, še vedno najpogosteje odkrivamo v poznih fazah, ko je možno le še njihovo simptomatsko zdravljenje. Vloga MSC v patogenezi teh bolezni je v glavnem še neznana, obstajajo pa dokazi, da se pri OP zmanjša število MSC in/ali njihova sposobnost osteogene pretvorbe. Zdi se, da postanejo MSC rezistentne na aktivacijske signale, ki nastanejo pri poškodbah tkiv ali pa da pride do sprememb v njihovem mikrokolju. Ker predstavljajo MSC redke celične populacije in ker zaradi svoje multipotentnosti izražajo številne gene ter molekulske označevalce, ki so prisotni tudi na drugih, zrelih oz. diferenciranih linijah (5), je pomanjkanje raziskav o njihovi diagnostični uporabnosti povezano predvsem s pomanjkanjem občutljivih metod za njihovo specifično detekcijo. Najnovejše tehnologije, kot je npr. sekvenciranje naslednje generacije (NGS, *next generation sequencing*), omogočajo določanje transkriptoma na nivoju posamezne celice in so že pomagale odkriti specifične subpopulacije matičnih celic

pri raku črevesja, ki napovedujejo relaps bolezni (58). Pri zgodnji diagnostiki bolezni mišično-skeletnega sistema stremimo k temu, da bi MSC pridobili neinvazivno, nato pa ugotovili, če je njihova sposobnost osteogene, hondrogene in miogene diferenciacije povezana s pojavom teh bolezni, ter poiskali načine, kako jih ponovno spodbuditi k regeneraciji tkiv (kosti, hrustanca in mišic). Dokazali so že, da imajo MSC, izolirane iz tkiv starejših bolnikov, zmanjšano sposobnost pomnoževanja in osteogene pretvorbe *in vitro* (59), poleg tega pa so pri manj gibljivi in slabotnejši starejši populaciji dokazali zmanjšanje števila cirkulirajočih osteogenih predhodnikov v krvi (60). V nadaljevanju bomo predstavili, kaj je že znanega o vlogi MSC pri patogenezi nekaterih mišično-skeletnih bolezni. Njihova uporaba pri diagnostiki teh bolezni in predvsem načini, kako spodbuditi endogene MSC za uspešno regeneracijo mišično-skeletnih tkiv, pa torej ostajajo velik zalogaj za nadaljnje raziskave.

3.1 OSTEOPOROZA

Primarna OP je progresivna sistemska mišično-skeletna bolezen, ki jo kljub napredku na področju njene diagnostike in zdravljenja še vedno največkrat odkrivamo šele ob prvem zlomu, ki pa je zaradi zapletov velikokrat usoden za posameznika. Osteoblasti, ki so odgovorni za izgradnjo kostnega tkiva, izvirajo iz MSC. Te celice so zato lahko tudi vzrok za zmanjšano nastajanje in/ali dozorevanje osteoblastov ter posledično zmanjšanje obsega izgradnje kostnega tkiva, pri čemer naj bi pomembno vlogo igralo spremenjeno mikrokolje v kostnem mozgu. Prisotnost različnih dejavnikov, predvsem vnetnih citokinov, adipokinov, signalnih molekul Wnt, TGF/BMP itd., naj bi ustvarila mikrokolje, ki je ugodnejše za usmerjanje MSC v proces adipogeneze kot osteogeneze, kar poznamo kot hipotezo o debelosti kosti pri OP (5, 61). Poleg sprememb v njihovem mikrokolju pa obstajajo dokazi, da pride do sprememb tudi znotraj samih MSC. Primerjava transkriptomov človeških MSC, izoliranih iz bolnikov z OP in kontrolne skupine brez OP, je pokazala, da pride pri OP do intrinzične okvare MSC, ki je povezana s slabšim samoobnavljanjem in osteogeno pretvorbo (62). Prav tako so pri bolnikih z OP po artroplastiki opazili bolj pogosto (tudi do 50 %) omajanje proteze, kar naj bi bila posledica zmanjšane osteoblastne usmeritve MSC ter s tem povezane nezmožnosti osteointegracije proteze (63). Vedno več je tudi rezultatov raziskav o serumskih mikroRNA (miRNA), značilnih za pomenopavne bolnice z OP (64). Nekatere med njimi dokazano vplivajo na delovanje MSC. Tako miR-382-3p stimulirajo osteogenezo, med tem ko jo miR-550a-5p inhibirajo, obe vrsti miRNA pa zmanjšata tudi adipogenezo (65).

3.2 SARKOPENIJA

Sarkopenija, ki predstavlja zmanjšanje mišične mase in funkcije, si z OP deli številne podobnosti, npr. demografsko sliko bolnikov, visoko prevalenco in velik socialno-ekonomski vpliv. Sarkopenični bolniki naj bi bili bolj nagnjeni k nastanku OP, velja pa tudi obratno (66). Za razliko od OP pa klinični kriteriji za diagnostiko sarkopenije niso jasno definirani, tako da stopnja prevalence variira med 10 % vseh posameznikov nad 65 let in 30 % pri moških, starih več kot 80 let. Sarkopenija je večfaktorski sindrom, ki je posledica hormonskih motenj, vnetja in zmanjšane regenerativne sposobnosti mišic zaradi okrnjene aktivacije satelitnih celic. Do izgube skeletne mišične mase in zmanjšane moči mišic pride zaradi atrofije mišičnih vlaken tipa 2, heterogene velikosti mišičnih vlaken, kopičenja intramuskularnega vezivnega tkiva in maščobe ter zmanjšane oksidativne kapacitete mišic. Dokazali so tudi številne, s starostjo povezane spremembe okolja v nišah satelitnih celic, npr. z IL-6 posredovano zvečano signaliziranje Jak/Stat, ki zmanjšajo njihovo regeneracijsko sposobnost (67). Raziskave na področju zdravljenja te bolezni so bile do sedaj, bolj kot na celično terapijo, usmerjene v promocijo hipertrofije mišičnih vlaken ter aktivacijo endogenih satelitnih celic s pomočjo farmakoloških (jak inhibitorji itd.) in nefarmakoloških ukrepov (68, 69).

3.3 MIŠIČNA DISTROFIJA

Duchennova mišična distrofija (DMD) je na kromosom X vezana progresivna in degenerativna bolezen mišic, ki je posledica spontane mutacije v genu za distrofin, njen rezultat pa je nefunkcionalni protein, ki veže citoskelet mišičnih vlaken z zunajceličnim matriksom. Ker je distrofična mišica konstantno poškodovana, je regenerativni proces ves čas aktiven, zato rekrutira satelitne celice v večjih količinah. Kljub temu je regeneracija distrofične mišice nepopolna, posledica pa je progresivna zamenjava mišičnega tkiva z maščobnim in fibroznim (70). Poleg tega, da je distrofin izražen v zrelih mišičnih vlaknih, je prisoten tudi v satelitnih celicah, kjer igra pglavitno vlogo v regulaciji njihove polarosti in asimetrične delitve. Pri asimetrični delitvi iz ene satelitne celice nastane ena progenitorna celica ter ena satelitna celica. V odsotnosti distrofina pride zato do zmanjšane števila asimetričnih in večjega števila abnormálnih delitev, kar vodi v zmanjšano količino miogenih predhodnikov (71, 72). Terapije, ki temeljijo na uporabi matičnih celic, veljajo za najbolj obetavne metode zdravljenja mišičnih distrofij. Pri tem lahko uporabimo dve strategiji. Prva je avtologna presaditev matičnih celic, kjer izoliramo celice bolnika z DMD, jih gensko spremenimo *in vitro* tako, da pono-

vno izražajo distrofin, ter jih nato vsadimo nazaj v bolnika. Druga pa je alogenska transplantacija matičnih celic posameznika s funkcionalnim genom za distrofin. Čeprav so rezultati zdravljenja DMD spodbudni, pa so te metode omejene, saj je potrebno veliko število injekcij, lahko se pojavi imunski odziv na injicirane satelitne celice ter smrt večine injiciranih celic v prvih 72 urah po aplikaciji. Vse več raziskav zato poteka na ostalih populacijah celic, ki imajo sposobnost tvoriti mišična vlakna, npr. pericitih, mesoangioblastih, celice PW1+ itd. Te celice so sicer številnejše in lažje dostopne, vendar pa imajo v primerjavi s satelitnimi omejeno sposobnost miogene diferenciacije (73).

4 SKLEP

Mezenhimske matične celice so redka in zaradi svoje heterogenosti še dokaj neraziskana celična populacija. Imajo izjemno sposobnost regeneracije in imunosupresije, najdemo pa jih v številnih tkivih odraslih ljudi. To pomeni, da ima vsak odrasel človek svoje endogeno »orodje« za obnovo tkiv, ki pa je še v veliki meri neizkoriščeno. Ravno zaradi omenjenih lastnosti imajo MSC velik potencial za zdravljenje degenerativnih bolezni in poškodb mišično-skeletnega sistema, kjer intraoperativno procesirane MSC iz kostnega mozga in maščobnega tkiva že kažejo prve pozitivne učinke pri zdravljenju osteo-hondralnih lezij in OA sklepov ter kroničnih tendinopatij. Nove tehnologije, ki bodo omogočale njihovo boljše identifikacijo, bodo odprle nove možnosti za njihovo uporabo v regenerativni medicini. Znanja o spremembah, ki so jim MSC podvržene pri določenih patoloških stanjih, pa bodo odprla možnosti za njihovo uporabo pri diagnostiki degenerativnih bolezni, kot sta OP in OA, predvsem v smislu njunega zgodnejšega odkrivanja in novih načinov zdravljenja teh bolezni.

5 LITERATURA

1. Sacchetti B, Funari A, Remoli C et al. No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports* 2016; 6: 897-913.



2. Crisan M, Yap S, Casteilla L et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 301-313.
3. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif* 1970; 3: 393-403.
4. Pittenger M, Mackay A, Beck S et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
5. Pino AM, Rosen CJ, Rodríguez JP. In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biol Res* 2012; 45: 279-287.
6. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
7. Jankowski R, Deasy B, Huard J. Muscle-derived stem cells, *Gene Ther* 2002; 9: 642-647.
8. Kurth TB, Dell'Accio F, Crouch V et al. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1289-1300.
9. Fuchs E, Horsley V. Ferreting out stem cells from their niches. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 513-518.
10. Hardy D, Besnard A, Latil M et al. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One* 2016; 11: e0147198.
11. Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res* 2016; 11: 1-27.
12. Bianco P, Cao X, Frenette PS et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 2013; 19: 35-42.
13. Zhou BO, Yue R, Murphy MM et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 154-168.
14. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466: 829-834.
15. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M et al. PDGFR α and CD51 mark human Nestin + sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med* 2013; 210: 1351-1367.
16. Chan CKF, Seo EY, Chen JY et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell* 2015; 160: 285-298.
17. Worthley DL, Churchill M, Compton JT et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* 2015; 160: 269-284.
18. Roelofs AJ, Zupan J, Riemen AHK et al. Joint morphogenetic cells in the adult synovium. *Nat Commun* 2017; 8: 15040.
19. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* 2013; 93: 23-67.
20. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 143-152.
21. A. Birbrair, Zhang T, Wang ZM et al. Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 2298-2314.
22. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 255-267.
23. Qin Y, Guan J, Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad Med J* 2014; 90: 643-647.
24. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother* 2016; 2: 3-20.
25. Glenn JD. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* 2014; 6: 526-539.
26. Doi H, Kitajima Y, Luo L et al. Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Sci Rep* 2016; 6: 18844.
27. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 37.
28. Coelho MB, Cabral JMS, Karp JM. Intraoperative Stem Cell Therapy. *Annu Rev Biomed Eng* 2012; 14: 325-349.
29. Taketani T, Oyama C, Mihara A et al. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells with Bone Marrow Transplantation Improved Osteogenesis in Infants with Severe Hypophosphatasia. *Cell Transplant* 2015; 24: 1931-1943.
30. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 2015; 99: 1681-1690.
31. Sanchez M, Delgado D, Sanchez P et al. Combination of Intra-Articular and Intraosseous Injections of Platelet Rich Plasma for Severe Knee Osteoarthritis: A Pilot Study. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 4868613.
32. Lin Wong K, Boon Leng Lee K, Choo Tai B et al. Injectable Cultured Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in Varus Knees With Cartilage Defects Undergoing High Tibial Osteotomy: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial With 2 Years' Follow-up. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 2013; 29: 2020-2028.
33. Pers Y-MM, Rackwitz L, Ferreira R et al. Consortium, Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5: 847-856.
34. Orozco L, Munar A, Soler R et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplant J* 2013; 95: 1535-1541.
35. Freitag J, Ford J, Bates D et al. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections. *BMJ Open* 2015; 5: e009332.
36. Jo CH, Lee YG, Shin WH et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 2014; 32: 1254-1266.
37. Davatchi F, Sadeghi Abdollahi BS, Mohyeddin M et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients. *Int J Rheum Dis* 2016; 19: 219-225.
38. Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* 2011; 14: 211-215.
39. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 2015; 99: 1681-1690.

40. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J et al. Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician* 2008; 11: 343-353.
41. Vangsnest CT, Farr J, Boyd J et al. Adult Human Mesenchymal Stem Cells Delivered via Intra-Articular Injection to the Knee Following Partial Medial Meniscectomy. *J Bone Jt Surgery-American Vol* 2014; 96: 90-98.
42. Centeno CJ, Al-Sayegh H, Bashir J et al. A prospective multi-site registry study of a specific protocol of autologous bone marrow concentrate for the treatment of shoulder rotator cuff tears and osteoarthritis. *J Pain Res* 2015; 8: 269-276.
43. Akgun I, Unlu MC, Erdal OA et al. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2015; 135: 251-263.
44. Koh YG, Kwon OR, Kim YS et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Arthroscopy* 2016; 32: 97-109.
45. Lee SY, Kim W, Lim C et al. Treatment of lateral epicondylitis by using allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells: a pilot study. *Stem Cells* 2015; 33: 2995-3005.
46. Chen C, Qu Z, Yin X et al. Efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head: A three-year follow-up study. *Mol Med Rep* 2016; 14: 4209-4215.
47. Cerqueira Daltro G, Fortuna V, Silva De Souza E et al. Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. *Stem Cell Res Ther* 2012; 6: 110.
48. Aoyama T, Goto K, Kakinoki R et al. An Exploratory Clinical Trial for Idiopathic Osteonecrosis of Femoral Head by Cultured Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Augmented with Vascularized Bone Grafts. *TISSUE Eng. Part B.* 2014; 20: 233-242.
49. Rastogi S, Sankineani SR, Nag HL et al. Intralesional autologous mesenchymal stem cells in management of osteonecrosis of femur: A preliminary study. *Musculoskelet Surg* 2013; 97: 223-228.
50. Zhao D, Cui D, Wang B et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 2012; 50: 325-330.
51. Weel H, Mallee WH, Van Dijk CN et al. The effect of concentrated bone marrow aspirate in operative treatment of fifth metatarsal stress fractures; a double-blind randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2015; 16: 211.
52. Kim SJ, Song DH, Park JW et al. Effect of Bone Marrow Aspirate Concentrate-Platelet-Rich Plasma on Tendon-Derived Stem Cells and Rotator Cuff Tendon Tear. *Cell Transplant* 2017; 26: 867-878.
53. Reissis D, Tang QO, Cooper NC et al. Current clinical evidence for the use of mesenchymal stem cells in articular cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 2016; 16: 535-557.
54. Mardones R, Via AG, Jofré C et al. Cell therapy for cartilage defects of the hip. *Muscles Ligaments Tendons J* 2016; 6: 361-366.
55. Kon E, Roffi A, Filardo G et al. Scaffold-based cartilage treatments: With or without cells? A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 2015; 31: 767-775.
56. Deng Z, Jin J, Zhao J et al. Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 9201492.
57. Veronesi F, Giavaresi G, Tschon M et al. Clinical Use of Bone Marrow, Bone Marrow Concentrate, and Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Disease. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 181-192.
58. Merlos-Suá Rez A, Barriga FM, Jung P et al. The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 511-524.
59. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW et al. Age-Related Intrinsic Changes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation to Osteoblasts. *Aging Cell* 2008; 7: 335-343.
60. Gunawardene P, Bermeo S, Vidal C et al. Association Between Circulating Osteogenic Progenitor Cells and Disability and Frailty in Older Persons: The Nepean Osteoporosis and Frailty Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71: 1124-1130.
61. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 35-43.
62. Benisch P, Schilling T, Klein-Hitpass L et al. The Transcriptional Profile of Mesenchymal Stem Cell Populations in Primary Osteoporosis Is Distinct and Shows Overexpression of Osteogenic Inhibitors. *PLoS One.* 2012; 7: e45142.
63. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J et al. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9: 61-71.
64. Marc J, Ostanek B, Kranjc T. Bone microRNAs and aging. *Curr Pharm Biotechnol* 2017; 18: 210-220.
65. Heilmeyer U, Hackl M, Skalicky S et al. Serum miRNA Signatures Are Indicative of Skeletal Fractures in Postmenopausal Women With and Without Type 2 Diabetes and Influence Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *J Bone Miner Res* 2016; 31: 2173-2192.
66. Edwards MH, Ward KA, Ntani G et al. Lean mass and fat mass have differing associations with bone microarchitecture assessed by high resolution peripheral quantitative computed tomography in men and women from the Hertfordshire Cohort Study Europe PMC Funders Group. *Bone* 2015; 81: 145-151.
67. Doles JD, Olwin BB. The impact of JAK-STAT signaling on muscle regeneration. *Nat Med* 2014; 20: 1094-1095.
68. Snijders T, Verdijk LB, van Loon LJC. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 328-338.
69. Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med* 2016; 50: 109-117.
70. Musarò A. The Basis of Muscle Regeneration. *Adv Biol* 2014; 2014: 1-16.
71. Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF et al. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1078686.
72. Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* 2015; 21: 1455-1463.
73. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120: 11-19.



DRUŠTVENE VESTI

ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

42. SKUPŠČINA SFD

Jelka Dolinar

42. skupščina SFD je potekala 13. maja 2017 v kongresnem centru Bernardin v Portorožu.

Delegati so potrdili poročilo o delu in poslovanju SFD ter poročilo nadzornega odbora.

Matjaž Tuš, kandidat za predsednika SFD, je predstavil svojo vizijo delovanja društva v naslednjem dvehletnem obdobju. Še naprej si bo prizadeval za povezovanje članov z različnih področij dela in uveljavitev tistih standardov dela v farmaciji, predvsem na področju lekarništva, ki ohranjajo strokovno neodvisnost poklica. V okviru možnosti bo sodeloval pri prenovi zdravstvene zakonodaje in se trudil, da bi se interesi fizičnih oseb, članov SFD, v čim večji meri uveljavili tudi v zakonodaji.

V času, ko postaja strokovno izpopolnjevanje zakonsko zavezujoče in je ponudba izobraževalnih programov na trgu vse večja, mora SFD na tem področju ohraniti konkurenčnost in svojim članom omogočiti raznolike, visoko strokovne in obenem ekonomsko zdržne oblike strokovnih izpopolnjevanj, po potrebi tudi ustrezno spremeniti obstoječi

model in ponuditi možnost pridobivanja znanj in informacij tudi s pomočjo sodobnih informacijskih tehnologij.

Kandidat za predsednika je tudi ocenil, da so način izvajanja poslanstva in usmeritve SFD, kot so bile zastavljene v preteklosti, še vedno ustrezne in primerne za ta čas in da Društvo deluje dobro, zato v naslednjem mandatu ne načrtuje večjih odmikov od začrtane poti. Poleg tega je SFD organizirano tako, da se lahko dovolj hitro odzove na spremembe v okolju in spremenjene pogoje za njegovo delovanje, če bi to bilo potrebno. Ob tem je delegate tudi obvestil, da se bo z letom 2019 upokojila magistra Jelka Dolinar, zato bo mesto generalne sekretarke SFD odprto za novo zaposlitev.

42. skupščina SFD je potrdila Matjaža Tuša za predsednika društva in izvolila organe SFD za mandatno obdobje 2017–2019.

Delegati so potrdili finančni plan za leto 2017 in članarino za leto 2018:

Farmaceuti – zaposleni 35 €

Tehniki 25 €

Seniorji 20 €

Študenti 15 €



Predsednik SFD	Matjaž Tuš
IZVRŠNI ODBOR	
Podružnice	
Celjska podružnica	Nataša Čater
Dolenjska podružnica	Petra Matekovič
Gorenjska podružnica	Alja Dolinar
Ljubljanska podružnica	Vladka Češek Bizjak
Mariborska podružnica	Helena Pavšar
Pomurska podružnica	Nina Šterbenc
Posavska podružnica	Irena Groboljšek Kavčič
Primorska podružnica	Samo Mahovič
Zasavska podružnica	Anja Ključevšek
Sekcije	
Homeopatska sekcija	Alenka Andjelić Dolžan
Sekcija bolnišničnih farmacevtov	Franci Tratar
Sekcija farmacevtskih tehnologov	Zrinka Abramović
Sekcija farmacevtskih tehnikov	Karmen Grom
Sekcija farmacevtskih znanosti	Irena Mlinarič Raščan
Sekcija kliničnih farmacevtov	Alenka Premuš Marušič
Sekcija farmacevtov javnih lekarn	Miroslava Abazović
Sekcija seniorjev	Marija Vrtačnik
Sekcija študentov	Stefan Lukič
Sekcija za farmacevtsko kemijo	Marko Anderluh
Regulatorna sekcija	Urša Pavlovčič
Sekcija za zgodovino farmacije	Darja Frankič
Nadzorni odbor	Gašper Marc Aleš Obreza Marina Urbanc
Disciplinsko sodišče	Slavko Pečar Vesna Bizjak Karlina Turk
Odbor za podeljevanje društvenih priznanj	Simona Cencelj Tajda Gala Miharija Sabina Grm Tatjana Kogovšek Vidmar Marinka Kregar Julijana Kristl Darja Potočnik Benčič
Izdajateljski svet	Cvetka Bačar Bole Mateja Cvirn Novak Mirjana Gašperlin Janez Ilaš Maja Petre Nina Pisk Smilja Milošev Tuševljak
Farmacevtski vestnik:	
Odgovorni urednik	Borut Štukelj
Glavna urednica	Nina Kočever Glavač

PODELITEV DRUŠTVENIH PRIZNANJ V LETU 2017

Slovesna podelitev društvenih priznanj je potekala v Tartinijevem gledališču v Piranu 11. maja 2017 ob zanimivem glasbenem programu, ki ga je izvajala Ditka ob spremljavi Gorazda Čepina. Prireditev je povezoval Luka Rudl. Pri-

znanja sta podelila **predsednik SFD mag. Matjaž Tuš** in **predsednica Odbora za podeljevanje društvenih priznanj prof. dr. Julijana Kristl**.

Minařikovo odličje je prejel mag. **Vojmir Urlep**, mag. farm.

Minařikova priznanja so prejeli:
mag. **Mateja Cvirn Novak**, mag. farm., spec.
Vladka Češek Bizjak, mag. farm.
Polonca Drofenič, mag. farm., spec.
Romana Rakovec, mag. farm.
izr. prof. dr. **Tomaž Vovk**, mag. farm.



UTEMELJITEV ZA PODELITEV MINAŘIKOVEGA ODLIČJA

Mag. Vojmir Urlep, mag. farm. – predlog Ljubljanske podružnice, ki so ga podprle Sekcija farmacevtskih znanosti, Sekcija za farmacevtsko kemijo in Sekcija farmacevtskih tehnologov



Vojmir Urlep spada med redke farmacevte, ki so v svoji karieri delovali na vseh glavnih področjih v farmaciji, v lekarništvu, farmacevtski industriji, veletrgovinah in na univerzi. Začel je že v času služenja vojaškega roka, ko je pol leta vodil lekarno Medicinsko rekrutnega centra v Podgorici, kjer se je izkazal kot strokovno zelo dosleden in nepopustljiv. Takoj po diplomi leta 1981 se je zaposlil najprej v Salusu, po dveh letih je svojo poklicno pot nadaljeval v Leku, kjer je do leta 2000 deloval v zunanji trgovini, izvozu, marketingu kot direktor različnih Lekovih enot in predstavništev v tujini, več let je bil član uprave Leka, dve leti tudi njen predsednik. Leta 2000 je prevzel funkcijo predsednika uprave Kemo-farmacije, ki jo je vodil 7 let. Iz veletrgovine je ponovno odšel v Lek. Imenovan je bil na mesto predsednika uprave Leka in Novartisa v Sloveniji, ki jo opravlja še danes. Poleg rednega dela že 25 let aktivno deluje kot gostujoči pred-

vatelj pri izvajanju predmeta *Trženje v farmacevtski industriji* na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Bil je eden ključnih pri odločitvi Leka, da se poda na najzahtevnejši generični trg ZDA s končnimi izdelki, in je ves čas aktivno sodeloval pri izvedbi tega prelomnega projekta. Po nastopu funkcije predsednika uprave družbe Lek leta 2007 je začrtal strategijo, s katero se je Lek uveljavil kot eden najuspešnejših delov globalne korporacije Novartis. Strategija je temeljila na izjemnem znanju, ki ga imajo številni Lekovi strokovnjaki in strokovnjaki slovenske akademske in raziskovalne sfere s ciljem, da v Slovenijo pripeljejo kompleksne projekte, temelječe na najsodobnejših in najzahtevnejših tehnologijah.

Vojmir Urlep si je skupaj s sodelavci prizadeval in tudi uspel Slovenijo umestiti na zemljevid držav, v katerih potekajo razvojne in proizvodne aktivnosti na področju, ne samo generičnih, temveč tudi novih t. i. inovativnih zdravil in učinkovin.

Lek je prav v času pod vodstvom mag. Urlepa okrepil sodelovanje z znanstveno-raziskovalnimi ustanovami, tudi na področju izobraževanja in uveljavljanja stroke ter usposabljanja mladih strokovnjakov. Tako je Lek pred dvema letoma podprl 9 mladih doktorjev naravoslovnih znanosti pri pridobitvi možnosti za vstop v program »Raziskovalci na začetku kariere«. V letošnjem letu bo na Fakulteti za farmacijo tudi doktorirala prva skupina mladih strokovnjakov, ki svoje raziskave izvajajo pod skupnim mentorstvom strokovnjakov iz Leka in Fakultete za farmacijo. Sodelovanje poteka tudi na znanstveno raziskovalnem področju, pri razvoju končnih zdravil s klasičnimi in podobnimi biološkimi učinkovinami.

S timom sodelavcev je zasnoval koncept Regijskega Bio-Campa, ki je v šestih letih dozorel v trajno povezovanje gospodarske in akademske sfere in odpira vrata novemu znanju in inovativnemu razmišljanju za prihodnost. Perspektivnim študentom naravoslovnih ved omogoča vpogled v delovanje farmacevtske industrije in srečanje z izkušenimi strokovnjaki in menedžerji. Obenem potrjuje osredotočenost Sandoza v Sloveniji na vlaganje v razvoj ter dolgoročno podporo mladim talentiranim študentom in raziskovalcem.

Vojmir Urlep se zaveda, da danes ne moreš vsega specialističnega znanja posedovati znotraj hiše. Pomembno je povezovanje z zunanjimi strokovnjaki, ki jih moraš znati

prepoznati. Tu se srečamo s t. i. področjem *open innovation*, kar pomeni, da v Leku ustvarjajo mešane raziskovalne skupine, sestavljene iz njihovih strokovnjakov in strokovnjakov iz fakultet in inštitutov naravoslovnih ved, ki skupaj razvijajo nove izdelke in tehnologije.

V času od leta 2007, ko Lek vodi Vojmir Urlep, je družba podvojila število razvojnih projektov in postala vodilni Sandozov razvojni center za tehnološko zahtevne projekte (kot so sterilni izdelki in pršila za nos).

Lek je v zadnjih petih letih ustvaril več kot 1.300 novih delovnih mest. Danes je v Leku zaposlenih več kot 3.500 sodelavcev. Visokošolsko izobrazbo ima več kot 47 odstotkov vseh zaposlenih, od tega je več kot 410 magistrov in doktorjev znanosti.

V Leku je zaposlenih 488 farmacevtov, od tega je več kot 80 magistrov in doktorjev znanosti.



Rezultate njegovega dela so prepoznala tudi strokovna in poslovna združenja. Združenje manager mu je podelilo priznanje *Manager leta 2012*. Prejel je *nagrado GZS* za izjemne gospodarske dosežke 2013 med velikimi podjetji, leta 2016 pa mu je Univerza v Ljubljani podelila plaketo *Pro universitate labacensi* za uspešen prenos izkušenj in znanj ter izmenjavo strokovnjakov iz poslovnega konkurenčnega sveta farmacevtske industrije v akademsko okolje.



Vojmir Urlep je že v času študija delil svoje bogato znanje s kolegi in bil aktiven član Društva študentov farmacije. S Slovenskim farmacevtskim društvom sodeluje pri organizaciji strokovnih in znanstvenih simpozijev, večkrat pa tudi kot vabljeni predavatelj.

Vojmir Urlep je skozi celotno delovno kariero nenehno dokazoval, da je možno strokovno znanje slovenskih strokovnjakov, med katerimi igrajo zelo pomembno vlogo tudi farmacevti, na temelju sodelovanja in medsebojnega spoštovanja in na osnovi jasne vizije in strategije, uveljaviti v svetovnem merilu, tudi v še tako zahtevnem okolju. Ni se ustrašil nobenega izziva in je pogosto s sodelavci oral ledino na področjih, ki so bila nova tudi v svetu, ne samo pri nas. Tudi zato je družba Lek danes prepoznana in cenjena kot ena najuspešnejših v skupini Novartis, kar predstavlja izjemno priložnost za nove projekte in vlaganja. Pri tem se je nenehno usposabljal in pridobival nova znanja na različnih področjih svojega delovanja, vseskozi pa je uspešno povezoval strokovna znanja farmacevta z znanji na področju vodenja in potrdil, da so možnosti osebnostnega razvoja farmacevtov izjemno široke.

Slovensko farmacevtsko društvo podeljuje Minařnikovo odličje za leto 2017 mag. Vojmirju Urlepu za njegov vizionarski in strateški opus ter s tem izjemen prispevek za razvoj slovenske farmacije.



Mag. Mateja Cvirn Novak, mag. farm., spec. – predlog
Celjske podružnice



Mateja Cvirn Novak se je po diplomi leta 1998 zaposlila v lekarni Apoteka pri Teatru v Celju, leto kasneje pa v Celjskih lekarnah, kjer deluje še danes kot lekarniška farmacevtka.

Že na začetku kariere si je prizadevala svetovati bolnikom ne le o zdravlilih, ampak tudi o zdravem življenjskem slogu. S predavanjem o debelosti in prekomerni telesni masi je sodelovala na simpoziju Slovenskega farmacevtskega društva o samozdravljenju leta 2001 na Brdu pri Kranju ter na simpoziju ob redni letni skupščini leta 2010 v Portorožu. Svoje znanje je nadgrajevala tudi z raziskovalnim delom o individualnem svetovanju pri zmanjšanju telesne mase. Rezultate je predstavila tudi na mednarodnem kongresu FIP v Lizboni leta 2010 s plakatom in predavanjem, kasneje pa tudi številnim kolegom v regiji. Na to temo je pripravila protokol obravnave bolnikov s čezmerno telesno maso in brošuro za laično javnost »Dnevnik prehrane in telesne dejavnosti«.

V letih 2008 in 2011 je vodila obširno raziskavo na 98 bolnikih s kroničnimi boleznimi in opisala prve primere pregleda uporabe zdravil in pristope farmacevta za izboljšanje varnosti zdravljenja z zdravili.

Leta 2007 je zaključila specializacijo iz lekarniške farmacije, leta 2012 tudi magistrski študij farmacije.

Mateja Cvirn Novak pogosto predava in piše članke za strokovna društva in združenja. Dvakrat je sodelovala na simpoziju Slovenskega farmacevtskega društva ob letni skupščini. V okviru Lekarniške zbornice je predavala farmacevtskim tehnikom o komunikaciji z bolniki pri svetovanju boljšega življenjskega sloga. Problematiko intimne nege kože in sluznic je predstavila zdravnikom ginekologom na simpoziju Slovenskega zdravniškega društva.

Za priročnik za bolnike Samozdravljenje, ki ga je leta 2011 izdalo Slovensko farmacevtsko društvo, je pripravila dva prispevka.

Od 2007 sodeluje pri promociji Celjskih lekarn v projektu *Točka zdravja*, ki je namenjen bolnikom. Na spletni strani Celjskih lekarn v rubriki *Vprašajte farmacevta* odgovarja na različna vprašanja v zvezi z zdravjem in uporabo zdravil.

Magistra Mateja Cvirn Novak je prepoznavna in cenjena v Javnem zavodu Celjske lekarne, v Celjski regiji, v lekarniški stroki in širše v slovenskem prostoru in je veliko prispevala za boljše javno zdravje v svojem okolju, zato ji SFD podeljuje Minařikovo priznanje.



Vladka Češek Bizjak, mag. farm. – predlog Ljubljanske podružnice



Predanost poklicu, strokovnost, moralna integriteta, komunikativnost in podjetniška žilica so vrline, ki odlikujejo Vladko Češek Bizjak, vodjo Lekarne pri šišenski knjižnici, mentorico za praktično usposabljanje študentov farmacije in od leta 2011 predsednico Ljubljanske podružnice SFD ter članico IO SFD.

Vladka Češek Bizjak je ves čas svoje strokovne poti predana poslanstvu magistrov farmacije ter redno skrbi za promocijo stroke in uveljavitev njenega ugleda tako v strokovni kot tudi v laični javnosti.

Stroko in nova dognanja želi približati vsem, s katerimi prihaja v stik: bolnikom s strokovnimi nasveti, predanostjo in prijazno besedo; sodelavkam z vzgledom in vztrajnim spodbujanjem; in širši strokovni javnosti z organizacijo in vodenjem strokovnih srečanj Ljubljanske podružnice SFD, v okviru katerih že od leta 2011 skrbi, da smo redno seznanjeni z novostmi pri obravnavi bolnikov z zdravili. Pri tem skrbno pazi, da so strokovna predavanja tematsko uravnotežena in izvedena na visoki strokovni ravni.

Njeno izjemno predanost poklicu je prepoznala tudi širša laična javnost, ki jo je za njeno delo poleg številnih pohval in zahval nagradila tudi z nominacijo za "Naj farmacevta leta" pri Nedeljskem dnevniku v letu 2002 in v letu 2013

z nazivom "Najbolj cenjena lekarna v Sloveniji" po izboru revije *Moje zdravje*, ki ga je pod njenim vodstvom po ocenah obiskovalcev prejela Lekarna pri šišenski knjižnici. Njene vrline so prepoznali in nagradili tudi znotraj Javnega zavoda Lekarna Ljubljana in Vladko s priznanjem "Zvezda LL za timsko delo" v letu 2010 in "Zvezda LL za izjemne poslovne dosežke in zadovoljstvo strank" v letu 2013.

Ker se zaveda pomena, ki ga imajo osebni stiki v neformalnih okoljih za boljše medsebojno sodelovanje, zelo uspešno skrbi tudi za organizacijo in izvedbo družabnih in kulturnih srečanj Ljubljanske podružnice in širše. Kljub omejitvam, ki otežujejo financiranje družabnih srečanj, je z vodilom »zdrav duh v zdravem telesu« že štiri leta zapored uspešno izpeljala tudi športne igre SFD. Zaradi izjemne osebne motivacije in strokovne usposobljenosti je Vladka od leta 2014 članica organizacijskega odbora za pripravo simpozija in skupščine v Portorožu.

Njeno vodilo pri delu je vodenje z zgledom. Prijetna klima, ki jo ustvarja v svojem delovnem okolju in društvu temelji na spoštovanju, zaupanju, prijaznosti, odprtosti, skromnosti, doslednem spoštovanju in izvajanju visokih moralnih in etičnih meril, trdem delu in dobrih medčloveških odnosih. Za njen trud na področju organizacije izobraževanj, prispevek k ugledu lekarniške farmacije in za zavzeto delo v Slovenskem farmacevtskem društvu, ji zvršni odbor Slovenskega farmacevtskega društva podeljuje Minařnikovo priznanje.



Polonca Drofenik, mag. farm., spec. - predlog Sekcije kliničnih farmacevtov



Polonca Drofenik je zaključila univerzitetni študij farmacije na Univerzi v Ljubljani na Fakulteti za farmacijo leta 1989 in se zaposlila v UKC Maribor, kjer je zaposlena še danes. Leta 2001 je zaključila specializacijo iz klinične farmacije z naslovom *Vpliv uvedbe liste rezervnih antibiotikov na njihovo predpisovanje*.

Svoje znanje izpopolnjuje in prenaša v delovno prakso v bolnišnični lekarni in s pedagoškim delom kot vabljen predavateljica, somentorica in mentorica farmacevtskim tehnikom, študentom farmacevtskega študijskega programa in specializantom klinične farmacije na Univerzi v Ljubljani Fakulteti za farmacijo ter kot habilitirana predavateljica na Fakulteti za zdravstvene vede na Univerzi v Mariboru. Na znanstveno-raziskovalnem delu se je posebej izkazala na področju protimikrobnega zdravljenja. Leta 1999 je začela aktivno sodelovati pri uvedbi rezervne liste protimikrobnih zdravil in individualnem predpisovanju le-teh v UKC Maribor. Raziskovalne rezultate izsledkov specialistične naloge je implementirala v klinično prakso tako, da je uvedla terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (TDM servis) v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Z raziskavo, postavitvijo protokola, uvedbo v vsakodnevno prakso je zagotovila storitev za vse bolnike, ki prejemajo vankomicin, gentamicin, amikacin ter po naročilu metildigoksin.

Znanje in izkušnje so bile osnova, da od leta 2002 sodeluje v Evropskem projektu o nadzoru porabe protimikrobnih učinkovin. V okviru mariborske bolnišnice sodeluje v različnih strokovnih komisijah in odborih: Komisiji za zdravila, Komisiji za klinično prehrano, Komisiji za izobraževanje zaposlenih. Aktivno je sodelovala tudi v mednarodnem projektu *Nutrition day* 2014 in 2015.

Je tudi cenjena predavateljica in avtorica številnih člankov. O vsem tem priča njena bibliografija, ki obsega 46 objav, med njimi izvirne in kratke znanstvene članke, prispevke in povzetke na konferencah, strokovne članke in drugo. Kot vabljen predavateljica je svoje znanje že večkrat predstavila na izobraževanjih zaposlenih v UKC Maribor, predvsem na temo protimikrobnega zdravljenja, simpozijih Sekcije kliničnih farmacevtov pri SFD, na rednih strokovnih izpopolnjevanjih Lekarniške zbornice Slovenije, na zdravniških simpozijih. Sodelovala je tudi na konferencah v tujini.

Polonca Drofenik je še posebej prepoznavna na področju razvoja klinične farmacije v Sloveniji, kjer je znala ustrezno povezati teorijo in prakso. Leta 2007 je začela pilotni projekt vključevanja kliničnega farmacevta v delo na oddelku za nefrologijo mariborske bolnišnice, ki je prerastel v trajno sodelovanje in vključitev v dnevno prakso.

Magistra Polonca Drofenik je vnesla številne pozitivne spremembe na svojem delovnem področju in prispevala k uveljavitvi nove dejavnosti kliničnega farmacevta v bolnišničnem okolju. Zato ji izvršni odbor Slovenskega farmacevtskega društva podeljuje Minařikovo priznanje.



Romana Rakovec, mag. farm. – predlog Gorenjske podružnice



Romana Rakovec je službeno pot začela na delovnem mestu farmacevta receptarja v javni in zasebni lekarni. Ob zaposlitvi v Javnem zavodu Gorenjske lekarne je vzporedno delala v Bolnišnici za porodništvo in ginekologijo Kranj ter krajši čas sodelovala tudi s Klinikom Golnik. Povezovanje raznolikih strokovnih izkušenj je kasneje uporabila pri delu v Farmakoinformativni službi Gorenjskih lekarn, kjer jo je vodila ideja, da je znanje farmacevtov o zdravilih treba približati bolnikom in nesebično nuditi pomoč tudi drugim zdravstvenim sodelavcem. Od leta 2004 vodi Javni zavod Gorenjske lekarne.

Romana Rakovec je zelo aktivna članica Slovenskega farmacevtskega društva, Gorenjske podružnice SFD in tudi Lekarniške zbornice Slovenije. Celih dvanajst let, od januarja 2005 do decembra 2016, je bila predsednica Sekcije javnih zavodov LZS, od leta 2008 pa je članica Upravnega odbora Lekarniške zbornice Slovenije. Je namestnica arbitra Lekarniške zbornice Slovenije za sprejem Splošnega dogovora za leto 2017 in članica delovne skupine za prenovno statuta Lekarniške zbornice Slovenije.

Njena sposobnost za dialog med farmacevtskimi deležniki je prepoznana tudi izven lekarniške stroke. Tako jo je Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije dvakrat imenovalo v delovno skupino za pripravo novega Zakona o lekarniški dejavnosti ter v različne druge delovne skupine, ki so pri-

pravljale predloge za financiranje lekarniške dejavnosti, standarde in normative.

Kot direktorica Javnega zavoda Gorenjske lekarne si na lokalnem nivoju zelo prizadeva za krepitev strokovne integritete farmacevtov in za uvajanje kognitivnih storitev, kot so osebna kartica zdravil, evidentiranje farmacevtskih intervencij, uvajanje klinične farmacije na področju oskrbe socialno-varstvenih zavodov, pregled uporabe in porabe zdravil. S strpno in argumentirano komunikacijo je Romana Rakovec uspel poslovni dogovor z Osnovnim zdravstvom Gorenjske, ki vključuje vse zdravstvene domove na Gorenjskem, za izvajanje farmakoterapijskih pregledov s strani farmacevtov svetovalcev. To pomeni, da bodo klinični farmacevti izvajali farmakoterapijske preglede na nivoju institucionalnega sodelovanja, kar predstavlja prelomnico v razvoju lekarniške dejavnosti na primarni ravni.

Z veliko posluha za tehnične novosti, kot so lekarniški roboti in virtualne lekarniške police, omogoča, da farmacevti čim več svojega časa namenijo svetovanju bolnikom. Obenem skrbi za širjenje lekarniške mreže tudi na demografsko ogroženih območjih in odpiranje novih delovnih mest za farmacevte.

Magistra Romana Rakovec je osebnost, ki je širši lekarniški stroki znana po preudarnosti, strokovnosti, obenem pa tudi dostopnosti in sposobnosti za povezovanje. Za njen celovit prispevek k ugledu lekarništva v Sloveniji ji SFD podeljuje Minaříkovo priznanje za leto 2017.



Izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm. – predlog Ljubljanske podružnice



Tomaž Vovk je svojo 20-letno poklicno pot posvetil raziskovalnemu in pedagoškemu delu za področje biofarmacije in farmakokinetike na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Njegovo znanstveno raziskovalno delo vključuje 30 objav v revijah s faktorjem vpliva, številne objavljene znanstvene ali strokovne prispevke ter vabljen predavanja na domačih in tujih konferencah.

Tomaž Vovk je že kmalu po zaposlitvi sprejel sodelovanje pri organizaciji podiplomskih strokovnih izobraževanj. S prof. Obrezo sta od leta 2008 do 2010 organizirala tri podiplomska izobraževanja na Fakulteti za farmacijo. Bil je član organizacijskih odborov mednarodnih znanstvenih konferenc, ki sta jih organizirala Slovensko farmacevtsko društvo in Fakulteta za farmacijo: Centralnoevropski simpozij iz farmacevtske tehnologije in biotehnologije (CESPT), leta 2008 in 2014, ter konference 4BBBB leta 2011.

S Slovenskim farmacevtskim društvom neprekinjeno sodeluje že več kot 10 let v različnih vlogah, kot predavatelj, pri pripravi in predstavitvi kliničnih primerov na različnih simpozijih, kot recenzent, član uredniškega odbora in gostujoči urednik Farmaceutskega vestnika. Z veliko posluha za strpno in konstruktivno komunikacijo povezuje različne profile strokovnjakov: lekarniške in nelekarniške farmacevte,

zdravnike, informatike in druge strokovnjake pri nastajanju strokovnih vsebin.

Tomaž Vovk je bil med prvimi, ki so širši strokovni javnosti predstavili modele prepoznavanja klinično pomembnih interakcij zdravil z uporabo računalniško podprte informatike, in sicer na simpoziju ob redni letni skupščini SFD 2005 ter v okviru učnih delavnic, ki jih je SFD organiziralo s podporo Leka (leta 2005 in 2007). Predstavitev izkušenj iz lekarniške prakse je znal povezati z znanstveno podprto farmacijo. Zato ni čudno, da ga je Sekcija farmacevtov javnih lekarn povabila, da prevzame vodenje letnih simpozijev, ki jih organizira ob Dnevih slovenskih lekarn. Organizacijo teh simpozijev je vodil v letih od 2010 do 2013, od leta 2014 pa je predsednik strokovno-organizacijskega odbora vsakoletne največje strokovne prireditve SFD, simpozija ob redni letni skupščini v Portorožu.

Poleg operativnega dela pri organizaciji vseh simpozijev, ki jih je vodil, je nudil predvsem strokovno podporo. Sodeloval je tudi kot recenzent treh knjižic, ki jih je SFD izdalo ob Dnevih slovenskih lekarn ter strokovnega priročnika Samozdravljenje.

Za njegov prispevek na področju znanstvene farmacije, za trud, ki ga vlaga v razvoj lekarniške farmacije in za zavzeto delo v Slovenskem farmacevtskem društvu, podeljuje izvršni odbor SFD izr. prof. dr. Tomažu Vovku Minařikovo priznanje za leto 2017.



ZAHVALA PREJEMNIKA MINAŘIKOVEGA ODLIČJA

Spoštovani predsednik SFD mag. Matjaž Tuš, spoštovana predsednica Odbora za podeljevanje društvenih priznanj prof. dr. Julijana Kristl, spoštovane kolegice in kolegi

Lepo je zaključiti pomembno življenjsko obdobje s prestižnim priznanjem, kot je Minařikovo odličje. Še posebej, ker je to priznanje stroke, kateri pripadam in sem ji bil zvest celotno delovno obdobje.

Ko se ozrem nazaj na prehojeno pot, se mi seveda poraja vprašanje ali bi, če bi mi bilo dano, spet krenil po njej in ali bi kaj storil drugače. Odgovor na prvo vprašanje je da, na drugo morda, a ne nujno. Bilo je veliko izzivov, lepih in manj lepih trenutkov, a nikoli dolgčas. Ponosen sem, da je naša farmacevtska industrija dokazala, da se lahko brez strahu in sramu postavimo ob bok najboljšim in uspevamo tudi v neusmiljenem boju na globalnem trgu. Da smo to dosegli, smo morali preseči omejitve, ki izhajajo iz naše majhnosti, a ne toliko tiste geografske kot tiste, ki je v naših glavah in nas vedno znova deli na naše in vaše, na rdeče in bele, leve in desne. Dokazali smo, da pot k uspehu vodi preko sodelovanja, medsebojnega razumevanja in podpore, preko delitve radosti in veselja ob skupnih in uspehih vsakega posameznika brez tako vsesplošno prisotne in tako slovenske lastnosti, ki ji pravimo zavist.

Predvsem pa naši uspehi temeljijo na znanju, dobrini, ki je še vedno premalo cenjena in spoštovana. Večkrat sem javno pove-

dal, da ne podcenjujem pridnih rok, po katerih naj bi prislovično sloveli, a pridne roke že dolgo ne zadoščajo več za uspešno uveljavljanje v strokovnem in poslovnem svetu. Znanje je tudi temelj naše stroke in, če kdo, se mi tega še kako zavedamo. V polpretekli zgodovini smo imeli parolo delu čast in oblast, če delo zamenjamo z znanjem bi rešili marsikateri problem slovenske družbe.

V posebno čast in zadovoljstvo mi je bilo vsa ta leta sodelovati s številnimi tukaj prisotnimi. Skupaj smo si prizadevali za ugled stroke in njenega poslanstva in sledili vsak svojim in skupnim sanjam. Z izrednim veseljem sem tudi prenašal del svojih znanj in izkušenj na prihajajoče generacije farmaceutov, ki me vedno znova presenetijo s svojo podjetnostjo in obvladovanjem sodobnih trendov, a žal tudi opomnijo, da proces življenjskega žlahtnjenja neusmiljeno teče.

Ob koncu se zahvaljujem predlagateljem, odboru za podeljevanje društvenih priznanj in izvršnemu odboru SFD za podeljeno priznanje.

Naj se poslovim s citatom iz pesmi meni še kako ljubega pevca in avtorja Đ. Balaševića: Upam, da se bomo še videvali, v nekem drugem mestu, na neki drugi predstavi, v nekem drugem cirku.

*Hvala in prijeten večer vam želim.
Vojmir Urlep*



Udeleženci prireditve so z zanimanjem spremljali podelitev društvenih priznanj in spremljevalni kulturni program.

ČESTITKE PREJEMNIKOM DRUŠTVENIH PRIZNANJ V LETU 2017



PREJEMNIKI POHVAL, KI SO JIH PODELILE PODRUŽNICE IN SEKCIJE ZA LETO 2017

Primorska podružnica:

Ana Banović, mag. farm., spec.
Marija Brenčič, mag. farm., spec.
Andrej Fister, mag. farm.

Dolenjska podružnica

Mirjana Dragoš, mag. farm.
Petra Matekovič, mag. farm.

Gorenjska podružnica

asist. Maja Jošt, mag. farm., spec.
Barbara Koder, mag. farm., spec.

Celjska podružnica

Jelka Dolinar, mag. farm.
Natalija Gerbič

Sekcija farmacevtov javnih lekarn

Helena Pavšar, mag. farm., spec.
Darja Potočnik Benčič, mag. farm., spec.

Sekcija bolnišničnih farmacevtov

Vesna Bizjak, mag. farm., spec.
Polonca Drogenik, mag. farm., spec.
Nataša Faganeli, mag. farm., spec.
Brigita Mavsar Najdenov, mag. farm., spec.
Tajda Miharija Gala, mag. farm., spec.
Simona Mitrovič, mag. farm., spec.
Demetrij Petrica, mag. farm., spec.
Martina Ravnkar, mag. farm., spec.
mag. Franci Tratar, mag. farm., spec.



70 let Kemofarmacije

tradicija, znanje, izkušnje



Podelitev društvenih priznanj je sovpadla s praznovanjem 70-letnice Kemofarmacije



V SPOMIN VELISLAVI ZALOKAR



V neprijaznem zimskem dnevu 2. februarja 2017 smo se poslovili od spoštovane kolegice, magistre farmacije in medicinske biokemičarke Velislave Zalokar.

Leta odraščanja so ji, rojeni Ljubljanki (3. 7. 1927), tekla v ljubeči družini, a vojni čas jih je grenko oplazil. Magistrin oče je izgubil dva brata; hči Velislava je bila med šestim razredom gimnazije zaprta v policijskih zaporih na Prešernovi cesti (26. 2. 1944 do 30. 3. 1944), ker je z vrstniki sodelovala pri akcijah OF v mestu.

Po sedmem razredu gimnazije na Poljanah je z mislijo na načrtovani študij farmacije poleti 1945 prostovoljno obiskovala trimesečni tečaj za lekarniške pomočnice. Priedilo ga je Ministrstvo za narodno zdravje, da bi omililo pomanjkanje strokovnega osebja v lekarnah takoj po vojni. Vsaka udeleženka je z izpitom na koncu pridobila spričevalo s pripisom, da je »usposobljena za apotekarsko pomožno službo in ima prednost pri vpisu v apotekarsko srednjo šolo«; ustanovili so jo v prihodnjem letu. Absolventkam tečaja je Ministrstvo takoj določilo delovna mesta po Sloveniji, za Velislavo v dveh lekarnah na vzhodnem robu ožje domovine. Trdno odločena, da bo študirala farmacijo, zato pa najprej maturirala, je to možnost odklonila. V zadnjih mesecih leta 1945 je brez dovoljenja Ministrstva pogumno pričela obiskovati pouk v 8. razredu poljanske gimnazije, dovoljenje za vpis pa dočkala kasneje.

Napovedi, da bo s šolskim letom 1946/1947 ustanovljen na ljubljanski univerzi odsek za farmacijo, so bile negotove, zato je Velislava Kariž (dekliski priimek) po maturi jeseni 1946 začela študirati na farmacevtski fakulteti v Beogradu. Medtem je dvoletni študij v Sloveniji res stekel, zato se je po prvem semestru vrnila v Ljubljano ter tu končala drugi, tretji in četrti semester. V začetku petega semestra (šolsko

leto 1948/1949) je študij spet nadaljevala v Beogradu in tam diplomirala 18. marca 1953.

Zadnji del predpisanega staža (po Centralni lekarni in Higienem zavodu) je opravljala v biokemičnem laboratoriju interne klinike Kliničnih bolnic; tam so ji ponudili službo. Začela je 1. oktobra 1954 in se tako pridružila tedaj še redkim farmacevtom, ki so se odločili za delo na kakšnem drugem področju, ne v lekarni. Leta 1974 se je njihov laboratorij vključil v Centralni laboratorij, ustanovljen 1970 kot samostojna enota nastajajočega Kliničnega centra (KC). Magistra Kariž, od leta 1955 poročena Zalokar, je specialistični izpit iz medicinske biokemije opravila 19. februarja 1971. Vse bolj se je posvečala ožjemu strokovnemu področju, proteinom, lipidom in lipoproteinom in leta 1975 tudi uradno postala vodja laboratorija za proteinsko diagnostiko v Centralnem klinično kemičnem laboratoriju KC. Nadaljevala je v dejavnosti, v kateri je pri nas zaoral temeljne in globoke brazde kemik dr. Pavel Dolar (1915–1995), in jo do upokojitve razvijala. Leta 1982 je bila odlikovana z redom dela s srebrnim vencem.

Po sprejemu v službo se je kolegica Zalokar včlanila v takratno farmacevtsko društvo. Drugega oktobra 1961 jo najdemo med ustanovnimi člani sekcije medicinskih biokemikov pri tem društvu. V njej je od 15. oktobra 1963 do 16. decembra 1964 opravljala tajniške naloge. Leta 1981 je bila med prejemniki priznanj »za 20-letno uspešno sodelovanje« v sekciji. Kot ena od ustanovnih članov sekcije je 2011 od Slovenskega združenja za klinično kemijo (SZKK) prejela spominsko plaketo.

Zadnji delovni dan kolegice Zalokar kot vodje proteinskega laboratorija na Inštitutu za klinično kemijo in klinično biokemijo v KC je bil 28. junij 1989. Po upokojitvi je v odboru seniorske sekcije Slovenskega farmacevtskega društva sedem let vidno sooblikovala program za izobraževanje in sprostitev za upokojene člane. Vse življenje jo je radostil stik z naravo, rada je smučala in planinarila, uživala na koncertih klasične glasbe in folklornih prireditvah. »Svoj poklic je opravljala s ponosom in se zavzeto trudila za njegovo prepoznavanje in priznanje v zdravstvu« (iz obrazložitve k prejetemu Priznanju SZKK v letu 2004).

Magistro Velislavo smo izgubili 27. januarja letos. Sodelavci in prijatelji smo ji hvaležni za bogate skupne trenutke.

Marta Kramberger



POPRAVEK

V rubriki »Novi doktorji znanosti«, objavljeni v 1. številki Farmacevtskega vestnika 2017 (stran 50), je prišlo do napake v opisu doktorskega dela Daniele Milosheske, mag. farm. Prispevek ponovno objavljamo.

Daniela Milosheska, mag. farm.

KLINIČNA FARMAKOKINETIKA LAMOTRIGINA, OKSKARBAZEPINA IN TOPIRAMATA PRI BOLNIKI Z EPILEPSIJO

Mentor: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Somentor: izr. prof. dr. Tomaž Vovk

Zdravljenje epilepsije je v večini primerov simptomatsko s protiepileptičnimi zdravili. Zaradi narave bolezni je klinično spremljanje učinkovitosti in varnosti zdravljenja težavno. V pomoč pri načrtovanju odmerjanja so lahko meritve koncentracije zdravilne učinkovine v krvi bolnika.

Kandidatkinino delo lahko razdelimo v dva sklopa. V prvem je predstavljen razvoj analiznih metod za terapevtsko spremljanje koncentracije protiepileptičnih zdravil, v drugem sklopu pa so podani rezultati dveh kliničnih farmakokinetičnih študij na bolnikih z epilepsijo.

Kandidatka je razvila in validirala dve kromatografski analizni metodi, ki omogočata sočasno določanje 12 protiepileptičnih zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v krvni plazmi. Poleg tega je razvila tudi metodo, ki omogoča

določanje okskarbazepina in karbamazepina ter njihovih metabolitov v posušeni krvi. Zaradi zelo majhnega volumna odvzete krvi je ta metoda zelo uporabna za spremljanje terapije pri dojenčkih in otrocih. V klinični raziskavi farmakokinetike lamotrigina je ugotovila, da na hitrost izločanja lamotrigina iz telesa vplivajo genetski dejavniki, telesna masa bolnika, ledvična funkcija, kajenje in sočasna uporaba zdravil, ki inducirajo ali inhibirajo presnovo. Z raziskavo farmakokinetike okskarbazepina pri otrocih je razvila model, ki omogoča zdravljenje prilagojeno posameznemu otroku. Rezultati raziskav doktorskega dela so vidni in so mednarodno primerljivi, kar je razvidno iz doktorandkine bibliografije, ki obsega tri objavljene in pet v objavo poslanih prispevkov v revije s faktorjem vpliva.

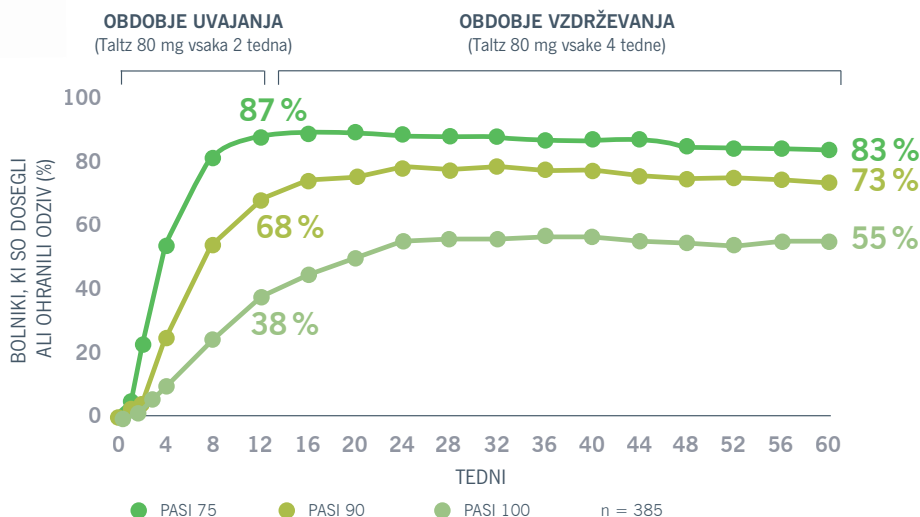




ZDRAVILO TALTZ je indicirano za zdravljenje **zmerne do hude psorizae s plaki** pri odraslih, ki so primerni za sistemsko zdravljenje.¹

ČISTA. DOTIKU PRIJAZNA. KOŽA.

RAZISKAVA UNCOVER-3: ZDRUŽENA STOPNJA ODZIVNOSTI MED OBDOBJEM UVAJANJA IN VZDRŽEVANJA, NRI^{2*}



▼ Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti. Tako bodo hitreje na voljo nove informacije o njegovi varnosti.

Taltz 80 mg raztopina za injiciranje v napolnjenem injekcijskem peresniku En napolnjen injekcijski peresnik vsebuje 80 mg iksekizumaba v 1 ml. **Terapevtske indikacije:** Zdravilo Taltz je indicirano za zdravljenje zmerne do hude psorizae s plaki pri odraslih, ki so primerni za sistemsko zdravljenje. **Odmerjanje in način uporabe:** *Odmerjanje:* Priporočeni odmerek je 160 mg s subkutano injekcijo (dve injekciji po 80 mg) v tednu 0, ki mu sledi 80 mg (ena injekcija) v tednih 2, 4, 6, 8, 10 in 12, nato pa vzdrževalno odmerjanje 80 mg (ena injekcija) vsake 4 tedne. Pri bolnikih, ki se po 16 do 20 tednih niso odzvali na zdravljenje, je treba razmisliti o prekinitvi zdravljenja. Pri nekaterih bolnikih z začetnim delnim odzivom se stanje ob nadaljevanju zdravljenja prek 20 tednov lahko izboljša. *Pediatrična populacija:* Varnost in učinkovitost zdravila Taltz pri otrocih in mladostnikih, starih od 6 do 18 let, še nista bili dokazani. Podatki niso na voljo. *Način uporabe:* Subkutana uporaba. Raztopine/injekcijske brizge ne smete stresati. **Kontraindikacije:** Resna preobčutljivost na zdravilno učinkovino ali katero koli pomožno snov. Klinično pomembne aktivne okužbe (npr. aktivna tuberkuloza). **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** *Okužbe:* Zdravljenje z zdravilom Taltz je povezano s povečano stopnjo okužb, kot so okužbe zgornjih dihalnih poti, oralna kandidaza, konjunktivitis in glivične okužbe kože. Zdravilo Taltz je treba pri bolnikih s klinično pomembnimi kroničnimi okužbami uporabljati previdno. Zdravila Taltz se ne sme dajati bolnikom z aktivno tuberkulozo (TB). Pri bolnikih z latentno tuberkulozo je treba pred začetkom zdravljenja z zdravilom Taltz razmisliti o zdravljenju proti tuberkulozi. *Preobčutljivost:* Poročali so o resnih preobčutljivostnih reakcijah, vključno z nekaj primeri angioedema, urtikarije in, redko, resnih zapoznelih (10–14 dni po injiciranju) preobčutljivostnih reakcij, ki so vključevale široko razširjeno urtikarijo, dispnejo in visoke titre protiteles. *Vnetna črevesna bolezen:* Previdnost je potrebna pri predpisovanju zdravila Taltz bolnikom z vnetno črevesno boleznijo, vključno s Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom, bolnike pa je treba skrbno spremljati. *Cepjenja:* Zdravila Taltz se ne sme uporabljati skupaj z živimi cepivi. **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili in druge oblike interakcij:** Varnost zdravila Taltz v kombinaciji z drugimi imunomodulatorji ali fototerapijo ni bila ovrednotena. Opravili niso nobenih formalnih študij medsebojnega delovanja zdravil *in vivo*. Ob uvedbi zdravljenja z iksekizumabom je treba pri bolnikih, ki prejemajo zdravila, ki se presnavljajo prek CYP450, razmisliti o terapevtskem spremljanju zdravljenja. **Plodnost, nosečnost in dojenje:** Ženske v rodni dobi morajo med zdravljenjem in vsaj 10 tednov po njem uporabljati učinkovito kontracepcijsko metodo. Na voljo so le omejeni podatki o uporabi iksekizumaba pri nosečnicah. Iz previdnostnih ukrepov se je med nosečnostjo bolje izogibati uporabi zdravila Taltz. Ni znano, ali se iksekizumab izloča v materino mleko pri človeku in ali se sistemsko absorbira po zaužitju. **Neželeni učinki:** Neželeni učinki zdravila, o katerih so najpogosteje poročali, so bili reakcije na mestu injiciranja in okužbe zgornjih dihalnih poti (najpogosteje nazofaringitis). *Zelo pogosti:* okužbe zgornjih dihalnih poti, reakcije na mestu injiciranja. *Pogosti:* glivične okužbe kože, orofaringealna bolečina, navzea. *Občasni:* influenza, rinitis, oralna kandidaza, konjunktivitis, celulitis, nevtropenija, trombocitopenija, urtikarija. **Rok uporabnosti 2 leti.** **Posebna navodila za shranjevanje:** Shranjujte v hladilniku (2 °C–8 °C). Ne zamrzujte. Shranjujte v originalni zunanji ovojnini, da bo zdravilo zaščiteno pred svetlobo. Zdravilo Taltz lahko hranite zunaj hladilnika največ 5 dni, pri temperaturi, ki ne presega 30 °C. **Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom:** Eli Lilly Nederland BV, Papendorpseweg 83, 3528 BJ Utrecht, Nizozemska. **Način predpisovanja:** Rp/Spec: Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept zdravnika specialista ustreznega področja medicine ali od njega pooblaščenega zdravnika. **Datum zadnje revizije besedila:** 12.10.2016
SITLZ00009(1), 26.10.2016. Samo za strokovno javnost.

POMEMBNO OBVESTILO

Pričujoče gradivo je namenjeno samo za strokovno javnost. Pred predpisovanjem zdravila Taltz preberite celotni Povzetek glavnih značilnosti zdravila Taltz.

Referenca:

1. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Taltz, datum zadnje revizije besedila 12.10.2016.
2. Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, et al. Phase 3 trials of ixekizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis. *N Engl J Med.* doi: 10.1056/NEJMoa1512711.

*Rezultati, pridobljeni na osnovi post hoc analize.

Rezultati, pridobljeni od bolnikov, zdravljenih s 160 mg zdravila Taltz v tednu 0, potem z 80 mg vsaka 2 tedna do 12. tedna in nato z 80 mg vsake 4 tedne do 60. tedna.

Eli Lilly farmacevtska družba, d.o.o., Dunajska cesta 167, 1000 Ljubljana, telefon 01 / 580 00 10, faks 01 / 569 17 05

SITLZ00024, 21.11.2016 Samo za strokovno javnost.

PERSENOŠAN®

ZA BOLJŠI SPANEC

NOVO



član skupine Sandoz

Zdravilo Perseonosan vsebuje izvlečke korenine zdravilne špajke (baldrijana).

SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA PERSENOŠAN obložene tablete

SESTAVA: Ena obložena tableta zdravila Perseonosan vsebuje 445 mg suhega vodnoetanolnega ekstrakta korenine zdravilne špajke (*Valeriana officinalis* L. s.l., *radix*) (3–6:1); ekstrakcijsko topilo: 70-odstotni (V/V) etanol. Pomožna snov z znanim učinkom: 95,6 mg saharoze. Za celoten seznam pomožnih snovi glejte poglavje 6.1 SmPCja. **TERAPEVTSKE INDIKACIJE:** Zdravilo rastlinskega izvora za lajšanje motenj spanja in pomirjanje blage živčne napetosti. Zdravilo Perseonosan je indicirano pri mladostnikih, starejših od 12 let, odraslih in starejših bolnikih. **ODMERJANJE IN NAČIN UPORABE:** Odmegjanje: Mladostniki, starejši od 12 let, odrasli in starejše osebe: Za pomirjanje blage živčne napetosti: ena obložena tableta do trikrat dnevno. Za lajšanje motenj spanja: ena obložena tableta pol ure do eno uro pred spanjem, če je potrebno z zgodnejšim odmerkom zvečer. Največji dnevni odmerek: 4 obložene tablete. Trajanje zdravljenja: Ker učinek nastopi postopoma, korenina zdravilne špajke ni primerna za akutno intervencijsko zdravljenje blage živčne napetosti ali motenj spanja. Za najboljši učinek zdravljenja priporočamo neprekinjeno uporabo, ki traja 2–4 tedne. Če se simptomi v štirinajstih dneh ne izboljšajo ali se celo poslabšajo, se mora bolnik posvetovati z zdravnikom. **Pediatrična populacija:** Varnost in učinkovitost obloženih tablet zdravilne špajke pri otrocih, mlajših od 12 let, še nista dokazani. Podatkov ni na voljo. **Način uporabe:** Za peroralno uporabo. Obložene tablete je treba vzeti z zadostno količino hladne tekočine (najbolje s kozarcem hladne vode). Obložene tablete je treba pogoltniti cele; zaradi neprijetnega vonja in okusa

ekstrakta zdravilne špajke se naj ne lomijo ali žvečijo. **KONTRAINDIKACIJE:** Preobčutljivost na zdravilno učinkovino ali katerikoli pomožno snov, navedeno v poglavju 6.1 SmPCja. **POSEBNA OPOZORILO IN PREVIDNOSTNI UKREPI:** Zdravilo Perseonosan vsebuje saharozo (95,6 mg na tableto). Bolniki z redko dedno intoleranco za fruktozo, malabsorpcijo glukoze/galaktoze ali pomanjkanjem saharoza-izomaltaze ne smejo jemati tega zdravila. **Pediatrična populacija:** Uporaba tega zdravila pri otrocih, mlajših od 12 let, zaradi pomanjkanja ustreznih podatkov ni priporočena. **MEDSEBOJNO DELOVANJE Z DRUGIMI ZDRAVILI IN DRUGE OBLIKE INTERAKCIJ:** Pri kombinaciji s sintetičnimi pomirjevali sta potrebna zdravniška diagnoza in nadzor. **NEŽELENI UČINKI:** Po zaužitju pripravkov iz korenine zdravilne špajke se lahko pojavijo gastrointestinalni simptomi (npr. navzea, trebušni krči). Njihova pogostost ni znana. **OPREMA:** V škatli je 30 obloženih tablet, pakiranih v PVC/PVDC-pretisne omete po 15 tablet. **NAČIN IN REŽIM IZDAJE ZDRAVILA:** BRP I, p. Izdaja zdravila je brez recepta v lekarnah in specializiranih prodajalnah. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET Z ZDRAVILOM:** Lek farmacevtska družba d. d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana, Slovenija. **INFORMACIJA PRIPRAVLJENA:** april 2017 (Ref. 22. 5. 2016).

Pred priporočanjem ali izdajanjem zdravila, prosimo, preberite celoten povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC), ki je na voljo na www.lek.si/vademekum.

SAMO ZA STROKOVNO JAVNOST | Informacija pripravljena: april 2017 | SI1704631880
www.lek.si | Lek farmacevtska družba d. d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana, Slovenija