

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1

OSREDNJA TEMA:
SLADKORNA BOLEZEN



Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovnica za prodajo zdravil z najširšo ponudbo izdelkov za humano in veterinarsko medicino v Sloveniji. Odlikujejo nas hitrost, varnost in zanesljivost. Svoje delo opravljamo srčno in predano. Prav zaradi tega nam zaupajo številne 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!

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si





STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1 | april 2019 | letnik 70

ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočever Glavač

UREDNIŠKI ODBOR:
Mitja Kos
Janja Marc
Andrijana Tivadar
Matjaž Tuš
Tomaž Vovk
Alenka Zvonar Pobirk

IZDAJATELJSKI SVET:
Cvetka Bačar Bole
Mateja Cvirn Novak
Mirjana Gašperlin
Janez Ilaš
Smilja Milošev Tuševljak
Maja Petre
Nina Pisk

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: 3.550 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.

Naj ta uvodnik začnem nekoliko drugače kot sicer. Običajno v uvodnih besedah predstavimo znanstvene in strokovne članke in tudi na ta način poskusimo pritegniti bralčevo pozornost. Veseli smo namreč, da so prispevki v Farmacevtskem vestniku prepoznani kot zanimivi za širši krog strokovne javnosti. V tej številki Farmacevtskega vestnika pa želim usmeriti vašo pozornost na stran, kjer Slovensko farmacevtsko društvo razpisuje delovno mesto generalnega sekretarja (generalne sekretarke) društva. Vzrok je sila preprost: magistra Jelka Dolinar se je odločila, da bo delovno mesto zapustila zaradi odhoda v pokoj. In moram priznati, da me je v srcu kar malo stisnilo ... Vsakič, ko se srečujem z Jelko, me njena vedrina, poskočnost, energija in toplota navdajo s pozitivnostjo, ki jo čutim še nekaj časa. Pa čeprav me večkrat ošteva, zakaj nisem oddal prispevka, pogledal članka, napisal uvodnika ... A to za na tak simpatičen način, da se vedno samo nasmejim. In zaradi tako pozitivnih oseb je tudi slovenska farmacija boljša, močnejša! Draga Jelka, ne izpustimo te še, upam, da boš tudi v pokoju pomagala društvu s svojim znanjem in energijo.

Sicer pa je osrednja tema te številke Farmacevtskega vestnika sladkorna bolezen. Doc. dr. Nace Zidar je predstavil pregled peroralnih antidiabetikov v zdravljenju sladkorne bolezni, obenem pa opisal tudi nove molekule, ki so potencialna zdravila v prihodnosti. Temu sledi strokovni članek dr. Alenke Kovačič o polifarmakoterapiji pri sladkorni bolezni. Kolegica Šoštarčič opisuje zdravljenje nevropatske bolečine pri sladkorni bolezni, v prispevku dr. Mojce Lunder in dr. Miodraga Janjića pa izvememo, kaj se dogaja onkraj urejene glikemije. V zadnjih nekaj letih se kot nova tehnologija priprave rastlinskih izvlečkov vse bolj uveljavlja ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami, kar opisujeta kolegici Katja Kramberger in izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač. O novi terapevtski strategiji uporabe protismiselnih oligonukleotidov pa nas bo podučil izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič. In še za konec: izjemno zanimiv zgodovinski pregled je pripravil prof. dr. Aleš Krbavčič, ki opisuje potek klinične farmakologije in farmakoterapije v Padovi iz leta 1840.

Naj bo torej prva številka Farmacevtskega vestnika v letu 2019 pozitivno sprejeta tudi med vami, člani Slovenskega farmacevtskega društva.

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Odgovorni urednik



VSEBINA / CONTENT

STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

- 3** Aleš Krbavčič
Klinična farmakologija in farmakoterapija na Visoki medicinski šoli v Padovi leta 1840
Clinical pharmacology and pharmacotherapy at the Medical High School in Padua 1840
- 14** Alenka Kovačič
Polifarmakoterapija pri bolniku s sladkorno boleznijo
Polypharmacotherapy in a patient with diabetes

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 19** Nace Zidar
Peroralni antidiabetiki – pregled stanja in pogled v prihodnost
Oral antidiabetic drugs – current overview and future perspectives
- 27** Mojca Lunder, Miodrag Janić
Onkraj urejene glikemije: zmanjšanje srčno-žilnih zapletov pri bolnikih s sladkorno boleznijo
Beyond glycaemia control: reduction of cardiovascular complications in diabetes mellitus patients
- 35** Sabina Šoštarić
Zdravljenje nevropatske bolečine kot zapleta sladkorne bolezni
Treatment of painful diabetic neuropathy
- 43** Nace Zidar
Mehanizmi razvoja bakterijske odpornosti na antibiotike
Understanding the mechanisms of antibiotic resistance
- 50** Katja Kramberger, Nina Kočever Glavač
Rastlinski izvlečki ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami in njihova uporaba
Supercritical fluid plant extracts and their use
- 57** Tomaž Bratkovič
Modulacija povezovanja eksonov s protismiselnimi oligonukleotidi kot terapevtska strategija
Splicing modulation with antisense oligonucleotides as a therapeutic strategy

DRUŠTVENE VESTI

- 69** Razpis za zasedbo delovnega mesta generalni sekretar / sekretarka Društva
- 71** 3. strokovno srečanje Sekcije za zgodovino farmacije

KLINIČNA FARMAKOLOGIJA IN FARMAKOTERAPIJA NA VISOKI MEDICINSKI ŠOLI V PADOVI LETA 1840

CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOTHERAPY AT THE MEDICAL HIGH SCHOOL IN PADUA 1840

AVTOR / AUTHOR:

Prof. dr. Aleš Krbavčič

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ales.krbavcic@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Zelo previdno, s citiranjem zgodovinskih in takrat sodobnih avtoritet ter postulata, da mora biti nauk o zdravlilih vedno korak za patologijo, je Lipičev sodelavec Koestl na Medi-

POVZETEK

Fran Viljem Lipič je bil direktor Medicinskega kliničnega inštituta v Padovi med leti 1834 do 1841 in kasneje profesor interne medicine na medicinski fakulteti na Dunaju. To je bilo razburkano obdobje razhajanja med vse bolj natančno patofiziološko diagnostiko in med zdravljenjem z množico zdravil brez terapevtskih uspehov in brez zdravorazumske osnove za uporabo. To je sam izkusil med svojim delom, ko je bil drugi mestni zdravnik v Ljubljani. Za zdravljenje neželenih učinkov terapije z zdravili iz živega srebra je uvedel ekstrakt kranjske bunike (*Scopolia carniolica*). Fran Koestl je bil Lipičev sodelavec na Medicinskem kliničnem inštitutu. Zbral je terapevtske nasvete in recepture za zdravila, ki so jih uporabljali na kliniki in predstavljali na predavanjih. Za to obdobje je značilno prizadevanje za uporabo lokalnih mineralnih in rastlinskih virov, balneologije in novih fizioterapevtskih možnosti. Takratno znanje na področju novih sinteznih zdravil je bilo zelo omejeno, vendar so bila prisotna prizadevanja za opazovanje in razlago terapevtskega delovanja uporabljenih zdravil. Ti dve osebnosti iz takrat skromne habsburške dežele Kranjske sta odločilno prispevali k novemu eksperimentalnemu pristopu v farmakoterapiji.

KLJUČNE BESEDE:

Koestl, Lipič, Medicinsko klinični inštitut v Padovi (1834–1841), *Scopolia carniolica*, živosrebrova zdravila

ABSTRACT

Fran Viljem Lipič was a director at the Medical clinical Institute in Padua from 1834–1841, and later a professor of internal medicine at the Medical faculty in Vienna during the disrupting period of therapeutic nihilism due to divergence among the emerging possibilities of pathophysiologically based diagnostic methods and the multitude of medicines lacking therapeutic results and evidence-based reasons for use. This was his personal experience while serving as the second medic in Ljubljana. He was the first to use the extract of *Scopolia carniolica* for the alleviation of side effects of mercurial medicines. Franz Koestl was Lipič's co-worker at the Institute. He compiled therapeutic suggestions and formulations for medicines in use, and presented them in lectures



at the Institute. Marked is their interest in local plant and mineral sources of medicines, local resources for balneology and critical comments on some established procedures. Their endeavour was to present the experience with medicines supported by clinical observations. Pharmaceutical chemical knowledge at their time was extremely limited. However, it is remarkable that the two aforementioned personalities, emerging from the then modest Habsburg province of Carniola, contributed to a new experimental pharmacotherapeutic approach.

KEY WORDS:

Koestl, Lipich, Medical Clinical institute in Padua (1834–1841), mercurial medicines, *Scopolia carniolica*

cinskem kliničnem inštitutu v Padovi objavil izkušnje in opazovanja farmakoterapije z magistralnimi recepturami v knjigi »*Observationes et experientiae, circa remedia eorumque formulas*«. V skladu s pravili šole je delo objavil v latinščini. Delo, ki na dvanajstih straneh uvoda opisuje namen in na 208 straneh recepture zdravil in rezultate zdravljenja, je bilo v formatu 13 × 20 cm natisnjeno na Dunaju pri tiskarju in založniku Braumueller&Seidel leta 1843 (1).

Oglejmo si okoliščine nastanka in nekatera značilna zdravila in terapevtske nasvete v zbirki receptur, ki bi jo danes morda najbolje označili z besedno zvezo farmakoterapevtski priročnik. Koestlovo delo je izšlo na Dunaju v času, ko so se zdravniki, soočeni z nemočjo pri zdravljenju bolnikov, ki so jim z vse bolj izpopolnjeno fiziološko diagnostiko ugotavljali bolezni, niso pa jim mogli pomagati z učinkovitimi zdravili. Po eni strani se je vse bolj razvijala fiziološka razlaga bolezni (Rokitansky in njegova šola), po drugi strani pa so kritiki farmakoterapije izražali nemočni nihilizem (Joseph Dietel) oz. so zahtevali revizijo zdravljenja s stotinami zdravil in postopkov, katerih raba je temeljila na izgovoru, da navsezadnje bolezni premaga samozdravilna moč narave (*vis medicatrix naturae*) in ne zdravnikovo posredovanje.

2 ZDRAVILA IN TERAPIJA V PREDMARČNI DOBI

Farmakoterapija in farmakologija sta bili takrat na začetku znanstveno utemeljenega delovanja. Joseph Schueller je

leta 1844 na Dunaju objavil članek, v katerem pravi, da je skrajni čas uspehe fizikalne diagnostike bolezni dopolniti z dejavnim zdravljenjem bolnika, tudi z upoštevanjem vse bolj napredujočega znanja kemije in sistematičnega preizkušanja zdravil. V širokem krogu dunajskih praktičnih zdravnikov se je uveljavilo razmišljanje, da se morajo o delovanju zdravil prepričati z lastnimi poskusi. V okviru Cesarsko-kraljevega društva dunajskih zdravnikov so leta 1844 ustanovili Odbor za podpiranje preizkušanja zdravil z utemeljitvijo, da zdravljenje z zdravili zahteva temeljito raziskovalno delo, saj so bili razočarani tako nad Brownovimi »*dosis maxima tolerata*« kot nad Hahnemannovimi infinitezimalnimi odmerki zdravil. Ko se je v Evropi razvedelo za prvo uspešno operacijo v narkozi z etrom, so zdravniki pričeli s samopreizkušanjem dietiletra. Mogoče so pri tem ugotovili, da večkratno preizkušanje privede do etrske odvisnosti (2, 3).

2.1 ZAČETEK ZNANSTVENEGA PRISTOPA K RAZISKOVANJU DELOVANJA ZDRAVIL

Zametek prvega univerzitetnega farmakološkega inštituta je zastavil leta 1847 Rudolf Buchheim v Dorpatu, v kleti svoje hiše (2). Njegova ideja je bila preizkusiti kloralhidrat kot narkotik na osnovi podatka, da se iz kloralhidrata v alkalnem sprosti kloroform. To je na sebi in nekaterih pacientih dejansko uspešno izvedel. Menimo, da je s tem utemeljil farmakološko preizkušanje zdravil, čeprav se je kasneje pokazalo, da je učinkoviti metabolit trikloretnol. Da so se farmakološki preizkusi nato razmahnil, je bilo treba počakati na razvoj prvih sinteznih zdravil, kot so barbiturati, acetanilid, antipirin in acetilsalicilna kislina, ker so izumitelji v tekmi za razvoj novih sinteznih zdravil potrebovali podatke za patentno zaščito, blagovno znamko in dovoljenje za promet.

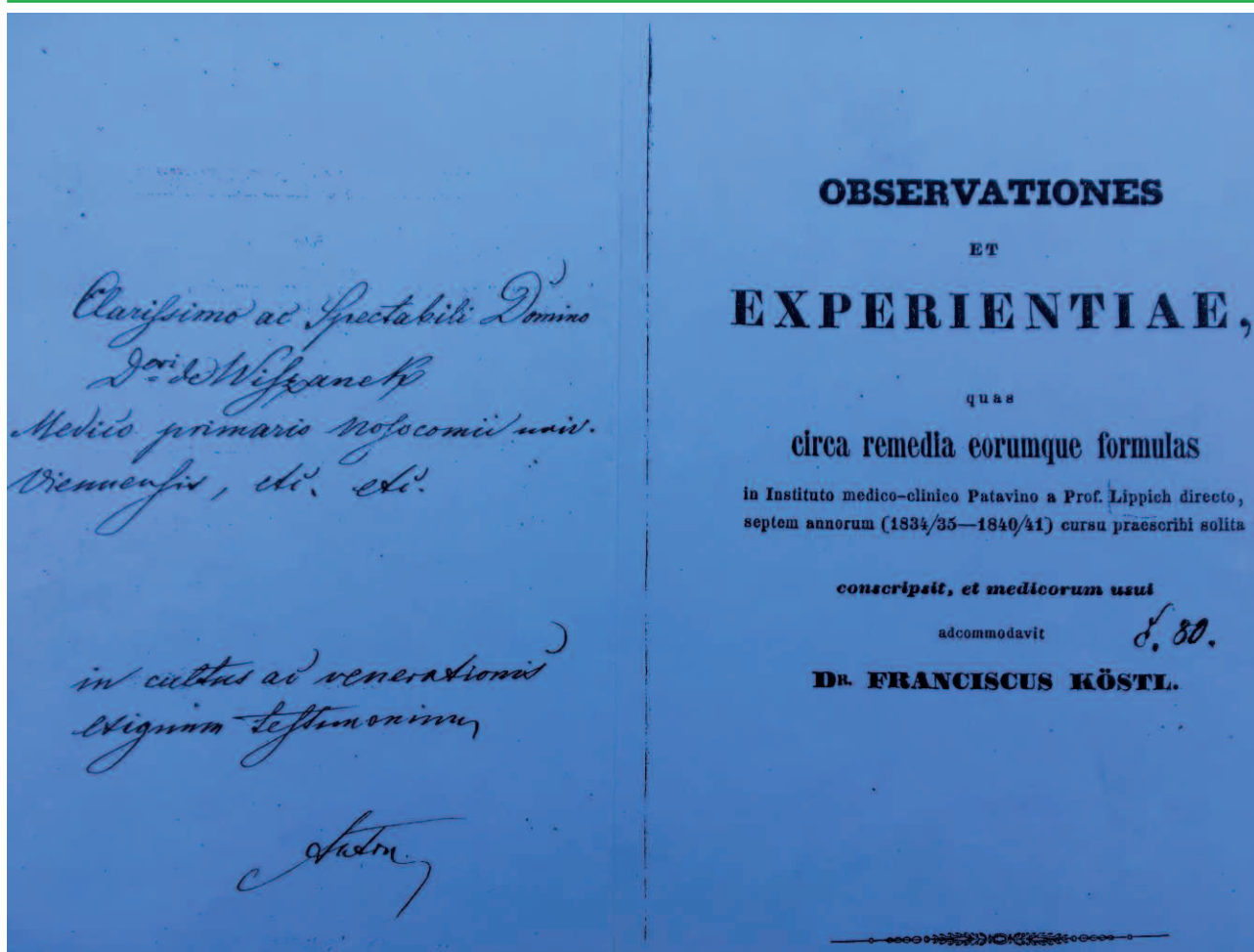
V teh okoliščinah objavljene Koestlove recepture na osnovi Lipičeve šole so pomenile aktualno prizadevanje za izboljšanje in dopolnitev farmakoterapije. Koestl je objavljaj uporabo novih receptur zdravil in postopkov zdravljenja tako z rastlinskimi drogami kot tudi s takrat redkimi izoliranimi učinkovinami. Vendar takratna raven znanja farmacevtske kemije še ni mogla odločilno pomagati do učinkovitih in relativno varnih zdravil. Zdravljenje je bilo predvsem usmerjeno v uporabo anorganskih zdravilnih učinkovin in takrat redke izolirane učinkovine iz rastlinskega sveta. Slednje so bile zaradi visoke cene malo v rabi. Koestl je opisal npr. dve vrsti srebrovega nitrata, taljeni srebrov nitrat (lapis), kalijev aluminijev sulfat (alumen) in številna druga anorgan-

ska zdravila. Navajal je tudi balneoterapijo z jadransko morsko vodo, sulfidnimi mineralnimi vreli iz Padovi bližnjih evganejskih vulkanskih hribov, priporočal je alge in blato iz beneških lagun, a tudi zdravila, ki jih je Lipič uporabljal že v času svojega dela v Ljubljani. Koestl je opisal več kot dvesto zdravil in njihovih farmacevtskih oblik ter pojasnil njihovo uporabo na osnovi lastnih izkušenj na kliniki v Padovi (1).

V času objave Koestlove knjige (1843) svet še ni poznal množično industrijsko izdelanih zdravil. Vendar to ne pomeni, da proizvodnja zdravil ni bila znana. Zagotovo vemo, da so že v antičnem času izdelovali nekatera značilna zdravila množično: znana je na primer *terra sigillata* iz Lemnosa, opremljena s pečatnimi odtisi proizvajalcev (najprej grška Artemis, pod Osmani carigrabski sultan), dokler je v sredini 18. stoletja ni zmanjkalo. *Terra sigillata* je bila v ploščate

valje oblikovana glina različnega izvora oz. strukture in kot adsorbent zato različne moči. Da bi zaščitili mesto pridobivanja, pristnost in tudi ceno, so v ploščice odtisnili značilne znake.

Morda je s *terro sigillato* povezana odmevna raziskava na psih: »V majhnem rudarskem mestu Striga v Šleziji (danes Strzegom na Poljskem) je tamkajšnji mestni zdravnik Johannes Scultetus Trimontanus (1531-1604) uporabljal skrivno zdravilo zoper težke zastrupitve in druge bolezni. Zdravilno snov so z veliko težavo nabirali med kamenjem v opuščenih rudnikih zlata. Morda je to delo zanj opravljal rudar Andreas Berthold, ki je okrog leta 1580 v nemških deželah to glino pod imenom *Terra sigillata Strigonensis* prodajal kot protistrup in univerzalno zdravilo. To je počel javno in je vabil oblastnike k preizkušanju. Odzvali so se v mestu Juelich, in sicer je tamkajšnji župan dal izvesti poskus



Slika 1: Fotografija Koestlove knjige »Observationes et experientiae, circa remedia eorumque formulas«.

Figure 1: Photo of Koestl's book »Observationes et experientiae, circa remedia eorumque formulas«.

na osmih psih: dali so jim štiri različne vrste strupov, nato pa štirim psom dodali protistrup, torej *Terro sigillato Strigonensis*, drugim štirim pa ne. Pokazalo se je, da so bili vsi štirje obvarovani delovanja strupov, enemu, ki se je še boril z zastrupitvijo, so celo pomagali z naknadnim obrokom protistrupa. Wilhelm II Hohenloški pa je odredil preizkus na na smrt obsojenem hudodelcu, ki so mu dali močan strup in ga prav tako ohranili pri življenju s čudežno glino. Andreas Berthold je o teh eksperimentih dobil uradno potrdilo in s pomočjo teh listin uspešno prodajal, kot se je kasneje pokazalo, tuje znanje in tujo lastnino. Opuščeni rudniki so bili namreč na mestnem zemljišču Strige, pa tudi mestni zdravnik je svojo metodo zdravljenja odstopil mestu. Tako je mesto vsaj dvesto let imelo lepe dohodka od tega preizkušnega zdravila.« (4).

2.2 PRIPRAVA ZDRAVIL PRI NAS NA OSNOVI LIPIČEVIH IN KOESTLOVIH IZKUŠENJ

Prva desetletja 19. stoletja so bila že čas odkrivanja in pridobivanja najprej organskih kislin in kasneje tudi bazičnih snovi iz rastlinskih drog, katerih delovanje je bilo večinoma že znano in preizkušeno. Pripravljanje materije medike iz mineralnih, rastlinskih in živalskih virov je že tradicionalno potekalo v laboratorijih lekarn. Zato so bili ti tudi pogosto mesto novih odkritij na področju izolacije, pa tudi sinteznega pridobivanja novih učinkovin. To je prvemu uspelo Friedrichu Sertuernerju, ki je v prostem času ob vsakodnevnem delu v lekarniškem laboratoriju izoliral bistvene sestavine opija (5). K vsakdanjemu delu lekarnarja in njegovih asistentov je spadala priprava ekstraktov iz alkaloidnih drog. V času Lipičevega delovanja v Ljubljani sta imela večji laboratorij vsaj dva od takrat štirih ljubljanskih lekarnarjev: Wagner in njegov nečak Žiga (Sigismund) Graf ter Franc von Gromadzky, pri katerem je nekaj časa delal tudi farmacevt Henrik (Henricus) Freyer, kasnejši kustos Deželnega muzeja vojvodine Kranjske. Kmalu so nekateri lekarnarji v svojih laboratorijih prevzeli pripravo zdravil nove materije medike tudi za druge lekarnarje, ki so imeli zaradi manjšega števila pacientov z laboratorijskim delom in osebjem velike nepokrite stroške (5).

Najbolj znana proizvajalca alkaloidov iz skorje kininovca sta bila pariška lekarnarja Caventou in Pelletier, ki sta leta 1826 (šest let po izolaciji kinina) že tovarniško izdelovala kininjev sulfat. Ta alkaloid je najhitreje prodril med zdravila in odprl pot za industrijsko pridobivanje zdravilnih učinkovin za lekarniško pripravljanje zdravil (5).

2.2.1 Fran Viljem Lipič

Na medicinski fakulteti dunajske Albertine diplomirani medicinec Fran Viljem Lipič, rojen v Spiški Novi Vesi (Slovaška) leta 1799 in umrl na Dunaju leta 1845, je bil drugi mestni zdravnik v Ljubljani (1823–1834) ter predstojnik Inštituta za klinično medicino na medicinski fakulteti v Padovi (1834–1841). Nato je bil povabljen na kliniko medicinske fakultete na Dunaju, kjer je nasledil von Hildebranda. V kratkem času, do prerane smrti, je kliniko preuredil in svojemu nasledniku Jožefu Škodi omogočil odpreti novo poglavje dunajske medicinske šole. Lipič je deset let zbiral gradivo za svojo *Topografijo mesta Ljubljane* (6), v kateri je takratni ljubljanski družbi neposredno in znanstveno podprto prikazal geografski, zgodovinski in predvsem življenjski utrip in zdravje mesta. Da so njegovo delo z zanimanjem pričakovali, pričajo imena prednaročnikov, med njimi Matija Čop, knjižničar v licejski knjižnici, Rozalija Eger, lastnica tiskarne in litografske delavnice, dr. Ivan Čuber, cesarsko-kraljevi profesor splošne medicine, Žiga Graf, lekarnar, botanik in doktor kemije, Henrik Freyer, kustos deželnega muzeja, Franc grof Hohenwart, cesarsko-kraljevi komornik, Josip Mayr, lekarnar, ljubljanski knezoškof Anton Alojzij Wolf.

Dolgoletne izkušnje z diagnostiko in terapijo, pridobljene med delovanjem v Ljubljani, je Lipič izkoristil na novem delovnem mestu na medicinski fakulteti v Padovi, ki spada med najstarejše v Evropi, ustanovljena je bila leta 1222 (1, 6).

2.2.2 Franz Koestl

Franz Koestl, rojen 28. 3. 1811 v Cerkljah na Gorenjskem, po izobrazbi zdravnik psihiater, je bil Lipičev svak. Poročen je bil z Lipičevo sestro Terezijo, ki je bila pri Langusu in kasneje v Benetkah šolana slikarka. Študij medicine je končal v Padovi leta 1835 in tam deloval do leta 1843, ko se je posvetil psihiatriji v Pragi in bil leta 1866 imenovan za prvega profesorja psihiatrije na Karlovi univerzi v Pragi. Svojo poklicno pot je končal kot direktor psihiatrične klinike v Gradcu. Znale so njegove publikacije in prizadevanja za preprečevanje kretinizma na državni ravni (1855). Upokojen je umrl 7. 12. 1882 v Gradcu (6).

3 URADNA IN »TAJNA« ZDRAVILA V LIPIČEVEM OBDOBJU

Nekatera zdravila imajo tudi neželeno oz. nečastno vzporedno zgodovino: tajna zdravila skrivne sestave in pogosto

tudi skritega vira izdelovanja. To so bila nadomestila za draga čezmorska zdravila v Evropi, npr. za skorjo kininovca, in povsem nesmiselno sestavljena zdravila za zdravljenje nevarnih oz. v svojem času neozdravljivih bolezni.

3.1 ZDRAVILO ZA ZDRAVLJENJE STEKLINE

Zdravilo za zdravljenje stekline je po visoki ceni od nekega saškega kmeta odkupil pruski kralj Friderik II po nasvetu svojih vojaških kirurgov. Kasneje so neodvisni ocenjevalci seveda hitro ugotovili, da ta pripravek, narejen iz »majskih črvov«, ne zdravi niti ne preprečuje stekline (7). Lipič je v svoji *Topografiji mesta Ljubljane* opisal običajna »domača zdravila« in mazaška zdravila v takratni Ljubljani (6).

3.2 PNEUMOKATHATERION

Za primer tajnega, z zvenečim imenom prodajanega zdravila navajamo *Pneumokathaterion*, kar v neposrednem prevodu pomen »čistilo za pljuča«. Gre za razredčeno raztopino kalcijevega hipoklorita, ki so ga kot drago, skrivnostno zdravilo za odpravljanje ustnega zadaha prodajali tudi v času, ko so nastale Lipičeve in Koestlove recepture. V referenci (1) na strani 47 Koestl navaja vrsto receptur s kalcijevim hipokloritom:

Calcaria chlorica, Chloras Calcis

To snov, običajno imenovano klorno apno, so tedaj v lekarniških laboratorijih pripravljali z uvajanjem klora v praškasti hidratizirani kalcijev hidroksid (gašeno apno). Sestavo klornega apna so predpisovali različni farmakopejski predpisi. Med recepturami s klornim apnom sta tudi dve za uporabo v zobozdravstvu – za zdravljenje karioznih zob v obliki ustne vode in odpravljanje neprijetnega zadaha (pod poglavje 3.3).

Ustna voda:

Rp. Calcariae chloratae

Aquae destillatae

Tri v steklenem možnarju z vodo v zaporednih obrokih, filtrirani raztopini dodaj

Alcohol 36 oB

Olei Rosarum destillatum gtt IV

Navodilo: Čajna žlica raztopine na kozarec vode je dobro sredstvo za odpravo neprijetnega vonja iz ust.

Pneumokathaterion je bila močno razredčena raztopina klornega apna. Tajna zdravila so prodajali seveda izven lekarn. Lipič je v *Topografiji mesta Ljubljane* opisal vrsto tajnih zdravil, od raznobarvnih papirnih kroglic (imitacij pilul)

do Leroyevih odvajal 1. do 4. stopnje in olupkov repe za obliže (6). Tajna zdravila so bila prepovedana, vendar se je vedno našlo dovolj prebrisanih preprodajalcev in lahkovernih kupcev, da je kupčija cvetela.

3.3 ORALNA ROTULA

Za odpravo neprijetnega zadaha navaja Koestl za pacienta zelo prikladno farmacevtsko obliko – oralno rotulo:

Rp. Chloratis Calcis scrupulum unum

Amyli drachmam unam et semis

Olei destillati Caryophyllorum guttas quatuor

Mucilagini Gummi Tragacanthi quantum satis ut fiant lege artis rotulae – quindecim.

Navodilo: Zadrži v ustih po eno na vsaki dve uri.

Kako je izdelal rotule na osnovi te recepture lekarnar? Poglejmo navodilo za izdelavo rotul po Avstrijski farmakopeji iz leta 1820 (8). Tam je naslednji predpis za izdelavo rotul z eteričnim oljem poprove mete (*Menthae piperitae aetheroleum*):

»Eno unčo drobno zdrobljenega sladkorja segrejemo in dodamo 24 granov eteričnega olja poprove mete ter toliko destilirane vode poprove mete, da nastane gosto tekoča zmes. Zmes (prelijemo v koničasto vrečko z medeninastim izlivom in jo /pripomba komentatorja/) takoj nakapamo na hladno površino /običajno je bila to debela, na površini gladko zbrušena kamnita plošča/. Ko se zmes strdi, postrgamo »hlebčke« (rotule) v posodo s tesno prilegajočim se pokrovom.« To so bile znamenite melisnice, še dolgo po zgolj zdravilski uporabi priljubljena slaščica.

Z enako tehnologijo so izdelali rotule s klornim apnom, tako da so gosto tekočo zmes pripravili s škrobom in raztopino tragakanta.

4 NAČINI APLIKACIJE ZDRAVIL IN VRSTE ZDRAVIL

4.1 ENDERMATIČNA APLIKACIJA

Za več učinkovin Koestl opisuje endermatično aplikacijo zdravil. Bistvo te metode je odstranitev povrhnjice na različnih mestih telesa (pogosto odvisno od lokacije ali domnevne lokacije bolezenske spremembe). Za odstranitev povrhnjice so uporabili mehurnike (*vesicatoria*). Najbolj znano sredstvo je bil obliž s kantaridami (španska muha,

Lytta vesicatoria). Očetno-etanolni ekstrakt teh žuželk, nanesen na kožo, takoj povzroči kemijsko opekline v obliki mehurja, napolnjenega s sokrvice. Mehur so predrti ali pustili, da je splahnel. Mesto, s katerega je bila odstranjena povrhnjica, je bilo ciljno mesto za zdravila, ki se absorbirajo skozi ranjeno kožo. To so bile npr. živosrebrove spojine, soli kinina, soli morfina, ekstrakt pikastega mišjaka (*Conium maculatum*) in ekstrakt morske čebulice (*Urginea maritima*).

V takratnem času so na ta način nadomeščali injektabilno parenteralno aplikacijo zdravil. Pravazova poročila o uporabi injekcijske brizgalke za podkožno injiciranje raztopljenih zdravil so se pojavila leta 1853 in šele proti koncu 19. stoletja so se uveljavile sterilne injekcijske raztopine v steklenih ampulah, ki jih je vpeljal pariški lekarnar Limousin (4). Endermatično metodo bi lahko primerjali z današnjimi transdermalnimi obliži. Razširjena uporaba mehurnikov v tistem času je še vedno temeljila na takratnem nazoru, da je treba v telesu nastajajočemu ali dozorelemu bolezenskemu dogajanju odpreti naravne poti ali pa narediti umetno pot za izločanje škodljivih snovi, ki so vzrok ali posledica patološkega dogajanja. Tako so po aplikaciji obliža z mehurnikom na isto mesto postavili še medicinske pijavke (*Hirudo medicinalis*).

Med recepturami Koestla in Lipiča najdemo tudi primere tovrstne aplikacije brez predhodne uporabe mehurnikov. Zlasti ekstrakt črnega zobnika (*Hyosyamus niger*) so pogosto predpisovali kot mazilo za uporabo na določenih predelih telesa, npr. na področju prsnice. Mazila z oljem iz semen črnega zobnika so bila aktualna še v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. Tipična receptura je bil *Oleum Hyoscyami* (DAB 6. izdaja in dopolnilo 1958).

4.2 MAZILA (LINIMENTA)

V nadaljevanju navajamo zanimiv recept za liniment za preležanine, ki so ga izdelovali iz aluminijevega kalijevega sulfata in jajčnega beljaka s stepanjem s topim nožem (spatulo) do nastanka goste pene. Predpisano je bilo mazanje na predelu trtice.

Rp. Albumin. Ovi unius

Alumin. crudi drachm. unam

Agitendtur isimul ope cultri, donec in spumam densam abeant

D.S. Adplicetur ad os coccigis

4.3 MEDICINSKE PIJAVKE (HIRUDINES)

Uporaba medicinskih pijavk je obširno opisana v receptariju Koestla in Lipiča na str. 101 (1). Številne na tem mestu na-

vedene indikacije kažejo na možnost, da ni bilo pomembno le izsesavanje krvi, temveč tudi prehajanje antikoagulantnih učinkovin iz pijavkinega sesalnega aparata v krvni obtok, kar ji je omogočalo neovirano črpanje krvi. Za primer navajamo naslednje poročilo: večkratno postavljanje pijavk na vrat (hkrati z Autenriethovim mazilom) je v 19 dneh povsem pozdravilo paraplegijo zgornjih udov kot posledico krvne apopleksije. Koestl je posvetil naštevanju uspešnega zdravljenja s pijavkami dve strani in jih sklenil s stavkom, da padovanski zdravniki na kliniki in v zasebni praksi z zadovoljstvom uporabljajo veliko število pijavk. Naj omenimo, da je imel Lipič bogate izkušnje s pijavkami še iz svojega ljubljanskega obdobja. Takrat je bilo na Ljubljanskem barju teh živali veliko, tako da je taksa zdravil za mesto Ljubljana zanje predpisovala nižjo ceno.

4.4 ZDRAVILA Z ŽIVIM SREBROM IN ŽIVOSREBROVIMI SPOJINAMI (MERCURIALIA)

V materiji mediki Koestlove recepturne zbirke imajo pomembno mesto zdravila z živim srebrom in spojinami živega srebra. Drobnno porazdeljeno živo srebro ima več imen. *Mitigirano živo srebro*: lahko gibljivo tekočo kovino s postopkom izdelave umirijo (ime izhaja iz latinščine, *mitigatio* pomeni pomirjanje). *Upepeljeno živo srebro*: izhaja iz latinske besede *cinis* (pepel), ker je v farmacevtski obliki sivo oziroma črno. Med recepturami je pogosto omenjeno neapeljsko mazilo, Unguentum Neapolitanum oz. Unguentum Hydrargyri cinereum ali griseum. Poznala sta ga že arabska zdravnik Razes in Avicenna. Po predpisu takrat aktualne izdaje Avstrijske farmakopeje (8) so ga pripravili iz enakih delov kovinskega živega srebra in ovčjega loja z vztrajnim mešanjem v steklenem ali porcelanastem možnarju do temnosivega, gladkega mazila, ki so mu vmešali še tri dele svinjske masti. Tako dispergirano živo srebro so za zdravljenje sifilisa dajali transdermalno, s sistematičnim nanašanjem na posamezne dele telesa v določenem zaporedju vse do salivacije. »To metodo je mogoče kadar koli ponoviti, če z ustreznim načinom salivacije odpravimo,« (1) navaja Koestl na str. 114.

5 ZDRAVILNE RASTLINE IZ DOMAČEGA OKOLJA

Lipič omenja kranjsko bunico že v svoji *Topografiji mesta Ljubljane* (6). Med opisi domače flore, ki je uporabna za

zdravljenje, navaja tudi »vzburjevalna omamna sredstva, ki poleg tega učinkujejo tudi na kožo – to so predvsem razhudnikovke: volčja češnja (*Atropa belladonna*), kristavec (*Datura stramonium*) in po mojih izkušnjah tudi bunika (*Scopolina/Scopolia/atropoides*, sicer imenovana *Hyoscyamus Scopolii*), ki je pogosta v okolici Vrhnike in Iga, in vrste preobjed (*Aconitum napellus*) itd.« Poudarjeno mesto nam postane razumljivo, ko preberemo podrobnosti o Lipičevih poskusih s to zdravilno rastlino v pričujočih Izkušnjah (1) in jih primerjamo z Lipičevim mnenjem o preizkušanju zdravil.

Lipičeva želja je bila tudi preveriti tedaj razvpita homeopatska zdravila. Zanje so razglašali, da je bistvo njihovega delovanja, da se klin s klinom izbija. Že v svojem ljubljanskem obdobju je Lipič o homeopatiji zapisal, da bi za objektivno presojo postopkov zdravljenja in delovanja zdravil vsakega zdravnika, ne le glede predpisovanja zdravil, temveč tudi glede številnih rezultatov, zdravnike nekaj časa nadzoroval nepristranski pristojni urad (6, str. 244). »Tako bo mogoče primerjati delovanje naravne zdravilne moči in homeopatije šele tedaj, ko bo prepoved homeopatije preklicana oz. ko ji bo začasno delovanje pod zanesljivim nadzorom dovoljeno vsaj v nekaterih bolnišnicah,« je menil Lipič (6, str. 296). Predlagal je torej statistično podprto preverjanje delovanja te metode zdravljenja. Ko je opisoval ljubljanske lekarne, je navajal, da nobena ne pripravlja homeopatskih zdravil. »Če bi jim država to dovolila, bi uporabila posredno sredstvo, s katerim bi uničila delo homeopatov, ki ljubosumno varujejo svoje samovoljno predpisovanje zdravil.« navaja Lipič (6, str. 307).

5.1 KRANJSKA BUNIKA

To znamenito rastlino, ki jo je na Idrijskem odkril rudniški zdravnik in naravoslovec Joannes Scopoli, sta Lipiču verjetno omenila njegova svetovalca za naravoslovna vprašanja, Žiga Graf in Henrik Freyer. Carl Linne je rastlino po njenem odkritelju in jo uvrstil med razhudnikovke (*Solanaceae*).

Scopoli je vedel, da je rastlino že pred njim našel in opisal Pietro Andrea Mattioli, ki je med leti 1542 in 1554 deloval kot zdravnik v Gorici. Ta je novo vrsto razhudnikovk odkril na pobočju Sabotina, ki ga je takrat pokrival bukov gozd. Imenoval jo je *Solanum somniferum alterum* in lesorez rastline objavil v svojih *Commentarij*ih, le plodove je opisal napačno, kot je kasneje ugotovil Scopoli. Kljub temu sta dve sto let kasneje Scopolijevo natančnejše botanično delo in uspešna kalitev semen, ki jih je poslal Carlu Linneju, prinesla



Slika 2: Kranjska bunika, *Scopolia carnioolica* Jacq. (levo, foto: Javor Kac) in Hladnikova bunika, *Scopolia carnioolica* f. *hladnikiana* (desno, foto: Jože Bavcon, vir: Botanični vrt Univerze v Ljubljani).

Figure 2: *Scopolia carnioolica* (left, photo: Javor Kac) and *Scopolia carnioolica* f. *hladnikiana* (right, photo: Jože Bavcon, source: University Botanic Gardens Ljubljana).

slavo odkritelja Scopoliju (9). Danes poznamo kranjsko buniko, *Scopolia carnioolica* Jacq., in manj pogosto Hladnikovo buniko, *Scopolia carnioolica* f. *hladnikiana*. Nekateri botaniki uporabljajo namesto termina bunika termin volčič (10). Mala flora Slovenije navaja termin bunika.

O tem priča naslednji Freyerjev zapis (11): »V dokaz, da mi je bil (Franz de Paula Hladnik, takrat upravnik vrta) resnično naklonjen, naj omenim, da mi je pokazal rumeno cvetoči *Hyosc. Scop.* s pripombo, da se njemu razen barve ne zdi pravi, in je želel moje mnenje. Prosil sem ga, da bi primerek v znak posebnega spoštovanja uvrstil v herbarij kot *Hyoscyamus hladniki*. Vendar sem šele 1833. leta dobil popoln primerek rastline, ki sem jo imenoval *Scopolia hladnikii*.«

Posebej bi izpostavili, da je kranjska bunika emblem Slovenskega društva za anesteziologijo in intenzivno medicino ter tesno povezana z delovanjem prve profesorice za anesteziologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani, dr. Darinke Soban. Njena zasluga so ne le sodobni in inovativni pristopi k splošni in regionalni anesteziji ter ustanovitve in štiridesetletno vodenje katedre, temveč tudi zbiranje in prevažanje latinske korespondence med Scopolijem in Linnejem v letih 1761 do 1773 v slovenščino in angleščino. Tako beremo v Linnejevem 11. pismu (8. 3. 1771): »Tvoja *Scopolia* bujno raste v mojem vrtu, zares edinstvena rastlina, s samo dvema poganjkoma. S posamičnimi premenjalnimi stebelnimi listi. Na razvejkih pa s parnimi premenjalnimi listi. Je to *Solanum somniferum bacciferum*?« Rastlina še vedno uspeva na Linnejevem vrtu v Uppsali (12).

Sobanova navaja tudi razvoj imena rastline (12). Prvega je zapisal Mattioli: *Solanum somnificum alterum*. Linne je kranjsko bunico imenoval: *Hyoscyamus scopolia* in tudi *Solanum somnificum bacciferum* po Bauhinu ml., verjetno na osnovi napačnega Mattiolijevega mnenja, da je njen plod jagoda. Nikolaus Joseph von Jacquin jo je imenoval *Scopola carniolica* in ustanovil zanj samostojen rod. Popravek v *Scopolia carniolica* se je ohranil do danes.

Koestl je pripravil obširen opis rastline in naslovil njeno monografijo *Scopolina atropoides*. Za starejša imena v opisu droge navaja sinonime *Atropa Scopolii* ter *Hyoscyamus Scopolii* (1). Domnevamo, da so Lipiču v laboratoriju Grafove lekarne »Pri enoročcu« izdelali primerno farmacevtsko obliko iz te rastline. Grafova lekarna je imela takrat v Ljubljani najboljši laboratorij. Graf, ki je bil magister farmacije in doktor kemije, je bil tudi uradno priznan izvedenec v vprašanih zdravilih in strupov (torej forenzični toksikolog) za Vojvodino Kranjsko. Tema njegovega doktorata na Dunajski univerzi je bila s področja skorje kininovca, zato je toliko bolj verjetno, da sta Lipič in Graf sodelovala pri vprašanju uporabe kranjske bunike (13). Lipiču je bilo znano, da so za zdravljenje škrlatinke svetovali volčjo češnjo (*Atropa belladonna*). Tako navaja: »Pri nekaterih se je poskusilo z volčjo češnjo s preventivnim namenom. Ti so preživel. Vendar ta rezultat ne dokazuje ničesar, kar potrjuje dogodek, ki sem mu bil priča naslednje leto. Zdrava družina namreč, ki je uporabljala to preventivno zdravilo, je zbolela za škrlatinko.« Takratna uradna farmakoterapija oziroma preventiva škrlatinke, kot jo opisuje Lipič, je bila uperjena zoper simptome in je bila po svoje absurdna (14).

5.1.1 Opazovanje še neznanih učinkov kranjske bunike

V receptariju Koestla in Lipiča (1) na str. 180 do 184 (*Opazovanja in izkušnje*) je opisana priprava suhega ekstrakta kranjske bunike, imenovane *Scopolina atropoides*, neposredno s sušenjem iztisnjene soka. Najprej v opisu rastline navajata, da jo je pred mnogimi leti našel Scopoli. Takrat vodilni dunajski botanik Jacquin jo je poimenoval po odkritelju: *Scopolia carniolica*, zaradi podobnosti z volčjo češnjo (*Atropa belladonna*) pa so ji dodali besedo *atropoides*, podobna atropi.

V Padovi so za pripravo ekstrakta uporabili metodo iz Pruske farmakopeje: 48 dunajskih komercialnih liber sveže zeli s koreninami (tj. 32 kg) so najprej v možnarju zdrobili v gosto tekočo kašo, jo v stiskalnici iztisnili in pridobljenih 22 liber soka segrevali, tako da so oborili rastlinske beljakovine, ki so tehtale eno libro in pol. Z uparivanjem preostale tekočine

so pridobili 8 liber suhega ekstrakta oziroma, natančneje, do suhega uparjenega, iz sveže rastline iztisnjene soka. Ekstrakt je bil temen, vodna raztopina motna, ne ravno neprijetnega vonja, a podobnega drugim ostrim strupenim rastlinam. Ta metoda je podobna metodi za suhe ekstrakte rastlinskih sokov, predpisani po Avstrijski farmakopeji iz leta 1820, vendar brez predhodne ekstrakcije z etanolom (8).

Očitno je imel Lipič s kranjskimi oziroma primorskimi herbalisti dobre zveze. Danes bi zavarovano rastlino v tolikšni količini težko pridobili.

Lipič je z enim granom (73 mg) ekstrakta izvedel samopreizkus: opazil je vrsto znanih, za volčjo češnjo značilnih simptomov, vendar tudi nekaj posebnih, za učinke na osrednje živčevje značilnih pojavov, ki jih pri volčji češnji ni opazil. Tako navaja Koestl: »Ekstrakt so v veliki količini preizkusili na kuncih, ki jim ni škodil, tudi druge ostre rastline, na primer *hyoscyamus*, *belladonna* in *stramonium*, škodljive ljudem, psom in mačkam, prenašajo brez škode.« Lipič je najprej opazil »suhost in boleče žrelo pri požiranju sline, težko goltanje, zmanjšano izločanje sline, ekscitacijo misli in duševno veselost, prikazovanje bleščečih prividov, zaspanost in sen, a pred njim ognjene iskre v očeh, prekinjajoče se s tresljaji, podobnimi električnim. Drugi so doživeli celo delirij, težko izkašljevanje iz žrela, znatno razširitev zenic in bežno nastali škrlatinskemu podobni eksantem po vsem telesu.« Lipič je po analogiji s podobnimi učinki volčje češnje še v času svojega delovanja v Ljubljani suhi ekstrakt kranjske bunike preizkusil za preventivo škrlatinke. »13 dečkov, ki so dobili preprečevalni odmerek tega zdravila in so bili v stiku s škrlatinko, ni zbolelo. Vendar bi bilo to treba še potrditi,« je zapisal (5). Izkušnje medicinske šole v Padovi je Koestl predstavil tako: »Zadnji poskusi na Inštitutu pri boleznih s preveliko salivacijo in ulceracijo žrela kažejo skoraj vedno uspeh. Salivacijo po uporabi merkurija je uspelo zaustaviti v treh dneh. Isto zdravilo je pri merkurijskih aftah te zmanjšalo. Prav tako je skopolina močna pri odstranjevanju neprijetnega vonja ulceracij v ustih. Prav tako je izvrstna za odpravljanje neprijetnega vonja ulceracij v ustih, zdravljenje ulkusov (čirov), nahajajočih se v žrelu, povzročenih z merkurijem ali če so sifilitične narave. Vendar in samo s tem zdravilom je le te mogoče ozdraviti, medtem ko so ostala (zdravila) samo pomožna. Hitro in povsem odpravi stomatitis s slinjenjem in zoženje v žrelu, zdravi skrofulozno ozeno in krvavi nosni izcedek. Ima izvrstno moč zmanjšati, zgostiti in osušiti serozne mukozne membrane; povsem premaga bolezn, ki so vztrajale že več mesecev. Vsekakor so posledice dolgotrajnega vztrajnega vpliva (zdravila?) očiščene, z rdečico označene tudi razmehčane tonzile. V tem primeru je bilo uporabljenih šest granov v sedmih dneh, dokler se niso

razširile zenice. V primeru univerzalnega sifilisa je bilo z nekoliko grani živosrebrovega cianida povzročeno salivacijo, sifilis mogoče hitro do kraja premagati tudi samo s skopolino. V drugem podobnem, vendar mnogo hujšem primeru, ki izbranim zdravilom in režimom ni popustil, je (skopolina) ne samo salivacijo, temveč tudi kostne bolečine tako hitro ozdravila, da je tudi ulkuse v treh dneh odpravila. Skopolina je brez merkurija in zgolj z močjo dekokta sarsaparile ter s pijavkami, nameščenimi ob strani vratu, odpravila sifilitične ulkuse žrela in izginile so bolečine v kosteh. Tudi pri drugih ne ravno lahkih primerih sifilisa je (skopolina) pokazala vrednost, dovolj pogosto preizkušena pri zdravljenju določenih oblik sifilisa, posebno v zvezi z uničujočimi ulceracijami.« (1, str. 182).

Za aplikacijo ekstrakta je v Koestlovem delu naveden recept za pilule, ki olajšajo jemanje:

Rec. Extr. Scopolin. atropoid. grana quatuor

Extr. Liquirit. scrupul. semis

Pulv. Liquirit. q. s. ut f. pil. decem

D.S. Omni bihorio pilula una.

Koestl in Lipič sta se zavedala, da bi bila za razlago delovanja potrebna natančnejša kemijska analiza sestavin ekstrakta (1, str. 182).

Na podlagi rezultatov sodobne analize vzorcev volčje češnje in kranjske bunike, ki je predstavljena v diplomskem delu Uroša Klančarja (15), lahko razumemo navdušenje nad suhim ekstraktom svežega soka kranjske bunike. Klančar je za kvantitativno analizo najprej preizkusil tankoplastno kromatografijo z denzitometrijo, nato pa uporabil kapilarno elektroforezo. S to metodo je analiziral vzorce listov volčje češnje, nabrane v juliju 2004 na področju Dolenjske (Dvor), in vzorce listov kranjske bunike, nabrane v aprilu 2004 na področju Ljubljane (Vič). Ugotovljene vsebnosti atropina v volčji češnji so bile 0,412 do 0,552 % ter skopolamina 0,007 do 0,009 %, v kranjski buniki pa 0,041 % atropina in 0,013 % skopolamina.

Skopolamina je v listih kranjske bunike torej znatno več kot v listih volčje češnje. Različni deli rastline v različnih obdobjih rastnega ciklusa in na različnih rastiščih vsebujejo različne količine obeh alkaloidov. To se kaže v težko napovedljivi stopnji zastrupitve. V nekaterih primerih že 1 g posušene rastlinske droge ali ena jagoda volčje češnje povzroči nevarno zastrupitev (16). Skopolamin je zelo učinkovit antagonist acetilholina na muskarinskih receptorjih že v nanomolarnih, na nikotinskih receptorjih pa v mikromolarnih koncentracijah. Maksimalni dnevni odmerek atropina je 0,003 g in skopolamina 0,0015 g (17). Ti odmerki se uje-

majo z Lipičevimi podatki o delovanju ekstrakta, tj. sveže iztisnjenega in posušenega soka kranjske bunike.

5.1.2 Ekstrakt kranjske bunike pri škrlatinki

Ekstrakt kranjske bunike so predpisovali v obliki praškov ali zaradi lažjega odmerjanja in jemanja v obliki pilul, oblikovanih z ekstraktom in praškom sladkega korena. Dnevni odmerek je znašal 4 grane (292 mg) ekstrakta. Na preveliko odmerjanje opozarja navedek, da so nekateri (zdravljenci) izkusili celo delirij. Zelo zanimiv je podatek, da je Lipič najprej pri sebi opazil po vsem telesu nastali eksantem, podoben tistemu pri škrlatinki (1).

S škrlatinko je imel Lipič precej opraviti v svojem ljubljanskem obdobju, in sicer je v *Topografiji mesta Ljubljane* opisal pojavnost bolezni v Ljubljani tako: »Od kongresnega leta 1821 ogenj sporadične škrlatinke nikoli ne ugasne.« Ugotavlja, da so zaradi pretoplih stanovanj pogosta možganska vnetja zlasti pri premožnejših (6).

Žrtev škrlatinke je bil tudi Lipičev prijatelj Žiga Graf, ki je »zaradi težkega vnetja možganov od škrlatinke umrl leta 1838 po štirih dneh bolezni« (13). Zato ne preseneča, da je želel s svojim novim zdravilom preizkusiti tudi Hahnemannovo zamisel, da je zdravilo za neko bolezen oziroma za njen znak lahko tista snov, ki pri zdravem osebk povzroči prav takšne bolezenske znake. Ekstrakt kranjske bunike je že v svojem ljubljanskem delovanju preizkusil za preventivo škrlatinke na trinajstih dečkih, ki po uporabi zdravila res niso zboleli za škrlatinko. Lipiču je zmanjkalo časa in morda tudi možnosti za posplošitev metode. Morda pa je ugotovil, da je homeopatska metoda že uspešno uporabljena pri variolizaciji in da je pravo smer homeopatije iskati v tem smislu, torej pri podpiranju metod za pridobivanje naravne odpornosti v smislu povečanja imunske obrambe telesa. V takrat sodobnem delu Friedricha Molla *Handbuch der Pharmacologie* (16) na str. 431 navajajo, »da je Belladonna zaščitno sredstvo proti kontagiji škrlatinke, kar je prvi priporočal Hahnemann in kasneje je bilo večkrat z mnogimi izkušnjami in opažanji potrjeno«.

Koestl je Lipičeve ljubljanske komentarje potrdil z izkušnjami klinike v Padovi (1): »Zategadelj je bilo najprej uporabljeno za preprečevanje škrlatinke. Vendar je bilo upanje zagnjeno, ko je v trinajstih primerih dečkov, ki so bili izpostavljeni škrlatinki in so ostali zdravi, kljub temu bilo treba še čvrsto dokazati. Takšni poskusi so bili izvedeni v Ljubljani.«

Jukič in sodelavci poročajo, da na živčevje delujejo še druge v kranjski buniki prisotne učinkovine (19). Na osnovi računalniškega reševanja ugotavljajo, da skopolin (mono-O-glukozid skopoletina) in skopoletin, ki je njegov aglikon (6-metoksiumbeliferon), zavirata acetilholin-esterazo. V ek-

straktu kranjske bunike (1) sta zagotovo prisotna, morda tudi razgradni produkt skopolamina, imenovan oscin ali skopolin.

Vsekakor se je Lipič odločil za realno uporabo zdravila iz kranjske bunike pri zdravljenju neželenih posledic takrat še zelo razširjene merkurialne materije medike, predvsem kalomela in mazil z dispergiranim elementnim živim srebrom. Uspešno, še enkrat hitreje kot z drugimi zdravili, je s suhim ekstraktom kranjske bunike odpravljal merkurialno salivacijo in merkurialni stomatitis. Uporabo ekstrakta je Koestl poudaril za pomemben prispevek k zdravljenju z merkurialnimi pripravki (1). Merkurialna zdravila so obvladovala področje sifilisa in nekaterih drugih nalezljivih bolezni vse do Ehrlichovega odkritja arzenovih zdravil.

5.2 ISLANDSKI LIŠAJ KOT ZDRAVILO IN HRANILO

Med lišaji navaja Koestl (1, str. 137) zaradi pogoste uporabe islandski lišaj (*Cetraria islandica*) in njegovo drogo Lichen islandicus »kot pomembno krepčilo za rekonvalescente zlasti pri boleznih pljuč in bronhijev, posebej pri začetni ftizi. Pri tem je sedaj prešlo v navado zgostitve in vnetja v prsih imenovati >Lichen<.« Prav tako je izkoristil grenkost droge in predpisoval dekokt skupaj z grenkosladom (*Solanum dulcamara*) pri vnetju jeter.

Islandski lišaj je v naših krajih opisal Scopoli in ga uporabljal ter priporočal kot roborans tudi svojemu znancu Francu Mygindu (1710–1789), direktorju tovarne sladkorja na Reki in ljubitelju botanike. Ta mu je odgovoril, da »obnovi moči, sprosti prsa in umiri živce«. Scopoli piše, da je islandski lišaj nabiral v Kranjskih in Bohinjskih Alpah ter z njim prvi zdravil v avstrijskih deželah. Leta 1761 je v Kranjskih Alpah srečal več žensk, ki so tovorile velike svežnje lišaja. Pojasnile so mu, da s tem tako hitro spitajo prašiče kot z nobeno drugo hrano. Izvedel je tudi, da kmetje na Kranjskem in Tolminskem sestradano živino ženejo na gorsko pašo, kjer je veliko islandskega lišaja. Znano je, da je islandski lišaj glavna hrana severnih jelenov in po izluženju grenkih lišajskih kislin nadomestilo za moko. Zanimivo domače ime za islandski lišaj je bohinjski mah. Scopolija je botanično navdušenje vodilo tudi v Bohinjski kot in pri tem je znal prisluhniti in upoštevati znanje domačinov (9, str. 59).

5.3 DRUGO

Lipič in Koestl sta spremljala tudi novosti. Znano je, da se je Lipič zanimal za zdravljenje z magnetizmom (beležke o

poskusih so ostale v rokopisu) in za zdravljenje z elektriko. O tem je poročal Koestl, da sta uporabljala aparat po dr. Andreasu von Ettingshausenu, profesorju matematike in fizike na Dunajski politehnik. Ob tem je zanimiv podatek, da je pri njem študiral Jožef Stefan. Ettingshausen je za medicinsko uporabo priredil svoj »magneto-električni aparat«, takrat zadnjo novost v elektriziranju. Za razliko od torne elektrike in galvanske elektrike je pri tem stroju električni tok pridobljen z gibanjem vodnika skozi magnetno polje (18, 494-505). Koestl opisuje primer paraplegije pri 27-letnem kmetu močne konstitucije, ki si je bolezen nakopal z delom po cele dneve stoječ v vodi. Zdravljenje z mehurniki in opijem mu ni pomagalo. Elektroterapija z magneto-električnim aparatom je po mesecu in pol pokazala uspehe, bolnik je čutil nekoliko lažje premikanje nog. (1, 91-93).

6 SKLEP

Lipič je v Ljubljani in nato v Padovi ter na Dunaju uvažal farmakoterapevtske raziskave po vzoru takratnih običajnih samopreizkusov in z uporabo statističnih metod, ki jih je v tistem času zdravnik Pierre Luis uporabil v svojem delu *Raziskave o zdravljenju sušice*, objavljenem leta 1825 v Parizu. V tem času je bil Lipič že dve leti uradni zdravnik v Ljubljani. Lipičevo eksperimentalno ravnanje pri zdravljenju nam ilustrira tudi njegov kratki zapis v *Topografiji*, povezan z zdravljenjem danes znane avitaminoze: »redki primeri nočne slepote so reagirali na vdihavanje pare sveže kuhanih jeter« (6).

Lipič je ravnal po prepričanju, da se v vsakem geografskem in klimatskem področju pojavljajo značilne bolezni in da na istem območju najdemo zdravilne rastline in minerale, ki te bolezni lahko zdravijo ali ozdravijo. Vendar teh naturofilozofskih načel ni postavljaj pred opazovanje bolnika in njegovo reagiranje na zdravljenje. Prvo načelo, iskanje zdravil domačega izvora, je odmevno prikazal z vpeljavo takrat le lokalno znane rastline, kranjske bunike. S samopreizkusom njenega ekstrakta je ugotovil, da je njeno delovanje podobno delovanju prav tako na Kranjskem razširjene volčje češnje. V samopreizkusu je opisal za skopolamin značilne učinke. Pri tem sta mu opaženi eritem in eksantem pomagala razrešiti homeopatsko dilemo o preventivnem delovanju volčje češnje pri škrlatinki. Ekstrakt kranjske bunike je Lipič tudi prvi uporabil v farmakoterapiji.

Inhibicijo oziroma zmanjšanje delovanja vseh izločevalnih žlez zlasti na koži in sluznicah je Lipič izkoristil pri zdravljenju sifilisa z zdravili iz živega srebra. Ugotovil je, da ekstrakt kranjske bunike trikrat hitreje zaustavi salivacijo, stomatitis in ulceracije v žrelu. Na ta način je res samo zmanjšal izražanje toksičnih učinkov zdravil iz živega srebra. Vendar če pomislimo, da je zdravljenje sifilisa še v tridesetih letih 20. stoletja temeljilo na merkurialnem zdravljenju, potem ni presenetljivo, da so se za Lipičevo metodo navduševali takratni specialisti za to nevarno bolezen. Niti kasnejša uvedba kalijevega jodida za olajšano izločanje živosrebrovih ionov iz organizma (po vzoru zdravljenja poklicnega merkurializma) ni prinesla racionalne rešitve za infekcije s treponemami. Šele odkritje učinkovitega zdravljenja z benzilpenicilinom v velikih odmerkih in depo oblik benzilpenicilina v obliki soli z benzatinom za dolgotrajno dajanje predstavlja dandanes temelj zdravljenja vseh oblik sifilisa. Lipičeva izobrazba in nadarjenost v Ljubljani nista mogli priti do pravega izraza, čeprav je že v tem obdobju objavil več prispevkov v avstrijski medicinski literaturi. Zato je razumljivo, da je iskal priložnost v bližnjih univerzitetnih mestih. V Padovi in kasneje na Dunaju je našel primerno okolje za razvoj svojih zamisli. Njegov sodelavec na Medicinski fakulteti v Padovi, Franz Koestl, je skrbno beležil uporabljeno farmakoterapijo.

7 ZAHVALA

Za vpogled v knjigo »*Observationes et experientiae, circa remedia eorumque formulas*« in njeno kopijo se zahvaljujem prof. dr. Zvonki Zupanič Slavec, predstojnici Inštituta za zgodovino medicine na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

8 LITERATURA

- Koestl F. *Observationes et experientiae, circa remedia eorumque formulas*. In *Instituto medico clinico Pataviano a prof. Lippich directo, praescribi solita*. Viennae, 1843. Fotokopija.
- Čech P. Rodovniški pregled F. V. Lipiča in njegovih potomcev. In: Lipič FV. *Osnovne značilnosti dipsobiostatike*. Ljubljana: Založba ZRC; 2005. p. 135.
- Heischkel E. *Arzneimittelversuche in aertztlichen Vereinen um die Mitte des 19. Jahrhunderts*. Hippocrates. 1955;17:526-39.
- Rankin A, Rivest J. *History of Clinical Trials, Monopoly and the Premodern State - Early Clinical trials*. N Engl J Med. 2016; 376(2):107-9.
- Krbavčič A, Pečar S. Od prve objave odkritja morfina (1805) do njegovega mednarodnega priznanja (1817). *Farm Vestn*. 2017;68:315-5.
- Ovsec DJ. "Lipič, Fran Viljem: Topografija c.-kr. deželnega glavnega mesta Ljubljane z vidika naravoslovja in medicine, zdravstvene ureditve in biostatike ..." *Etnolog*. Nova vrsta (Ljubljana) volume 13. issue 1 (2003) p. 660-663.
- Friedrich C, Mueller-Jahnke W-D. In: Schmitz R. *Geschichte der Pharmazie II*. Eschborn: Govi Verlag 2005.p. 382-3.
- Pharmacopoeia Austriaca*. 1820 . Editio tertia, emendata. Vindobonae MDCCCXX.
- Petkovšek V. J. A. Scopoli, njegovo življenje in delo v slovenskem prostoru. SAZU, Razprave XX/2 Ljubljana 1977.
- Bavcon J. *Botanični vrt Univerze v Ljubljani*. Zal. Kmečki glas, Ljubljana 2010. p. 85.
- Predin Š. Freyer H. In: *Slovenski farmacevti v naravoslovju*. Mariborske lekarne. Maribor 2002. p. 18.
- Soban D. Linnejeva pisma Scopoliju/Linnes Letters to Scopoli 1761-1773. *Proteusova knjižnica*. Ljubljana 1995.
- Predin Š. Žiga Graf, slovenski florist, kemik in lekarnar. *Mariborske lekarne*, Maribor 1977.
- Lipič, F.V. *Bolezni Ljubljančanov / Morbi Lubeanorum, ki jih je leta 1828 opazoval Fran Viljem Lipič, doktor medicine, poprej zdravnik ordinarij mesta Ljubljana, sedaj na Univerzi v Padovi redni profesor medicinske prakse*. Prevod in ponatis. Prevedel Matej Hriberšek/uredila Zvonka Zupanič Slavec. Ljubljana 2007
- Klančar U. *Kvantitativna analiza tropanskih alkaloidov v Solanacejah iz Slovenije*. Diplomsko delo. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani 2005.
- Klančar U, Kac J, Mlinarič A, Krbavčič A. Vsebnosti atropina in skopolamina v strupenih rastlinah razhudnikov na Slovenskem. *Zdrav Vestn*. 2006;75:157-62.
- Brown JH. Atropine, scopolamine and related antimuscarinic drugs. In: Goodman and Gillmans, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw/Hill 2001.
- Moll F. *Molls Handbuch der Pharmakologie*. I. Wien 1843. pp 494-505.
- Jukič M, Perdih A, Šolmajer T. Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farm Vestn*. 2012;63:54-63

POLIFARMAKO- TERAPIJA PRI BOLNIKU S SLADKORNO BOLEZNIJO

POLYPHARMACOTHE- RAPY IN A PATIENT WITH DIABETES

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Alenka Kovačič, mag. farm., spec.

*Splošna bolnišnica Murska Sobota,
Ulica dr. Vrbnjaka 6, 9000 Murska Sobota*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: alenka.kovacic@sb-ms.si

1 UVOD

Sladkorna bolezen (*diabetes mellitus*) je skupina različnih bolezni, ki jim je skupna previsoka koncentracija glukoze v krvi. Sladkorna bolezen se pojavlja vse pogostejše, še posebej narašča število prebivalcev s sladkorno boleznijo tipa 2, ki jo ima 90 do 95 % pacientov s sladkorno boleznijo (1). Povečini je to povezano s staranjem prebivalstva in neugodnimi spremembami v življenjskem slogu, zaradi česar naraščajoči trend pričakujemo tudi v prihodnje (1). Ne glede na diagnozo sladkorne bolezni narašča tudi število bolnikov, ki skupaj prejemajo več zdravil hkrati. Zdravljenje z več zdravili sočasno oz. polifarmakoterapija, ki je pri multimor-

POVZETEK

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo se polifarmakoterapija pojavlja pri 57 do 84 % bolnikov, odvisno od starosti. Bolniki sočasno prejemajo zdravila iz različnih terapevtskih skupin, zelo pogosto tudi nesteroidne antirevmatike. Uspešno zdravljenje sladkorne bolezni je povezano z rednim jemanjem zdravil, spremljanjem neželenih učinkov in prilagajanjem terapije z zdravili. Periodične reevalvacije terapije po ustreznih algoritmičnih dela pripomorejo k boljšim kliničnim izidom zdravljenja. Pri obvladovanju polifarmakoterapije in optimiziranju terapije z zdravili so farmacevti svetovalci in lekarniški farmacevti na primarnem nivoju zdravstvenega varstva ter klinični farmacevti na sekundarnem in terciarnem nivoju zdravstvenega varstva neizogiben člen v multidisciplinarnem timu, ki skrbi za bolnika s sladkorno boleznijo.

KLJUČNE BESEDE:

Farmakoterapijski pregled, farmacevt svetovalec, klinični farmacevt, reevalvacija zdravljenja z zdravili

ABSTRACT

In patients with diabetes, polypharmacotherapy occurs in 57 to 84% of patients depending on age. Patients receive concomitant medication from various therapeutic groups, and very often non-steroidal anti-inflammatory drugs. Successful treatment of diabetes is associated with regular medication intake, monitoring of adverse reactions and individualizing drug therapy for each patient. Periodic re-evaluations of therapy according to appropriate working algorithms contribute to better clinical outcomes of treatment. In polypharmacotherapy and drug therapy optimization, consultant pharmacist and community pharmacists at the primary level of health care, and clinical pharmacists at secondary and tertiary level of health care are required member in a multidisciplinary team that takes care of a diabetic patient.

KEY WORDS:

Clinical pharmacist, consultant pharmacist, pharmacotherapy review, reevaluation of drug treatment

bidnih pacientih večinoma potrebna, je učinkovito, še posebej pri zdravljenju kompleksnih bolezni, kot so npr. srčno-žilne bolezni. Pri tem so največkrat potrebna tako zdravila

za zdravljenje hipertenzije, srčnega popuščanja, moteni srčnega ritma kot tudi zdravila za zniževanje ravni krvnih maščob in zdravila proti strjevanju krvi (2). Polifarmakoterapija je v takem primeru neizbežna in koristna, saj bolniku izboljša zdravstveno stanje in omogoča kakovostnejše življenje (3). Ugotovili so, da več kot polovica ljudi, starih 65 let in več, prejema več kot pet zdravil sočasno (4-6). V Sloveniji je v letu 2017 prejelo pet do devet zdravil hkrati 277.805 oseb (7). Deset ali več zdravil hkrati je prejelo več kot 213.970 oseb (7). Kot zanimivost je Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS) objavil, da je bila leta 2017 z izjemo območne enote Nova Gorica povsod drugod po Sloveniji vsaj ena oseba, ki je prejela 31 ali več učinkovin hkrati (7). Podatki kažejo, da se na splošno polifarmakoterapija v Sloveniji povečuje. Povečujeta se tako število pacientov, ki prejema večje število učinkovin, kot tudi število prejetih učinkovin na pacienta. To je eden redkih podatkov na področju zdravil, ki kaže male razlike med regijami. Obvladovanje polifarmakoterapije zahteva veliko znanja, volje in sodelovanja (7). Terapevtske smernice za posamezne bolezni ne upoštevajo polimorbidnosti in vodijo v polifarmakoterapijo, če zdravnik v sodelovanju z bolnikom ne določi prioritete in le najpomembnejših zdravil (7).

2 POLIFARMAKOTERAPIJA IN BOLNIK S SLADKORNO BOLEZNIJO

Glede na to, da narašča število bolnikov s sladkorno boleznijo, narašča tudi število prejemnikov zdravil za sladkorno bolezen v Sloveniji (preglednica 1) (8).

Iz preglednice je razvidno, da je bilo v letu 2018 v Sloveniji 113.963 bolnikov s sladkorno boleznijo, ki so prejeli zdravila za to bolezen. Poleg teh zdravil pa so najverjetneje prejeli še številna druga zdravila za zdravljenje spremljajočih diagnoz.

2.1 VZROKI ZA POLIFARMAKOTERAPIJO PRI BOLNIKI S SLADKORNO BOLEZNIJO

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo so pogoste tudi hipertenzija, dislipidemija, srčno-žilne bolezni, depresija in kronična bolezen ledvic (9). Vsi ti bolniki imajo veliko verjetnost, da jih zdravijo z veliko zdravili hkrati. Prevalenca polifarmakoterapije

Preglednica 1: Število prejemnikov zdravil za zdravljenje sladkorne bolezni v Sloveniji (8).

Table 1: Number of persons receiving medications for the treatment of diabetes in Slovenia.

Leto	Samo inzulini	Samo ostala zdravila	Kombinacije	Skupaj	Delež samo inzulini (%)	Delež samo ostala zdravila (%)	Delež kombinacije (%)	Indeks rasti št. oseb
2005	13.993	47.510	8.900	70.403	20	67	13	/
2006	14.869	50.245	9.705	74.819	20	67	13	106
2007	15.663	52.921	10.596	79.180	20	67	13	106
2008	16.199	55.628	11.595	83.422	19	67	14	105
2009	16.641	58.858	12.566	88.065	19	67	14	106
2010	17.145	62.177	13.158	92.480	19	67	14	105
2011	17.572	65.390	13.792	96.754	18	68	14	105
2012	17.662	67.382	14.199	99.243	18	68	14	103
2013	17.806	69.389	14.698	101.893	17	68	14	103
2014	17.908	71.358	15.069	104.335	17	68	14	102
2015	17.659	73.328	15.554	106.541	17	69	15	102
2016	17.086	75.365	16.317	108.768	16	69	15	102
2017	16.699	77.823	17.008	111.530	15	70	15	103
2018	16.191	79.993	17.779	113.963	14	70	16	102

oz. prejetanja petih ali več zdravil hkrati pri bolnikih s sladkorno boleznijo je 57 do 84 %, odvisno od starosti bolnika (10). Najpogostejši vzroki za polifarmakoterapijo so: več različnih predpisovalcev zdravil (več različnih specialistov), staranje populacije, zahtevne (kompleksne) sheme zdravljenja, psihosocialni vzroki in neželeni učinki zdravil, ki se interpretirajo kot novo bolezensko stanje (11). Vse prevečkrat se sheme zdravljenja z zdravili pri bolnikih ne evalvirajo in vedno večja je tendenca k dodajanju zdravil kot pa k ukinjanju že vpeljanih (12). Dodajanje zdravil velikokrat pomeni, da so nekatera že vpeljana odveč, a jih vedno ne ukinemo (12). Zato je kontinuirano dodajanje zdravil preko daljšega časa, brez periodične reevalvacije sheme zdravljenja, eden glavnih vzrokov za razvoj polifarmakoterapije, ki je hitro lahko neustrezna (12). Pomembno je tudi veliko število različnih smernic in priporočil za zdravljenje številnih bolezni, ki se velikokrat ne dotikajo sočasnih bolezenskih stanj pri enem bolniku. Že leta 2005 je NGC (*National Guideline Clearinghouse*) naštel več kot 1.650 veljavnih kliničnih smernic oz. priporočil, od tega jih je bilo samo za zdravljenje sladkorne bolezni 386 (13). V novejši raziskavi na Bližnjem vzhodu so ugotavljali najpogostejše predpisana zdravila, ki jih prejemajo bolniki s sladkorno boleznijo (14):

- peroralni antidiabetiki: 81,4 % bolnikov,
- nesteroidni antirevmatiki (NSAR): 72,4 % bolnikov,
- zdravila za zmanjšanje ravni serumskih lipidov: 68,8 % bolnikov,
- zaviralci protonske črpalke: 28,4 % bolnikov,
- zaviralci angiotenzin-konvertaze: 25,9 % bolnikov,
- inzulini: 25,2 % bolnikov,
- zaviralci kalcijevih kanalčkov: 24,2 % bolnikov,
- lokalni kortikosteroidi: 21,1 % bolnikov,
- diuretiki: 21,6 % bolnikov,
- selektivni zaviralci adrenergičnih receptorjev beta: 20,2 % bolnikov,
- antagonisti angiotenzina II: 20,1 % bolnikov,
- zdravila za zdravljenje ščitnice: 15,1 % bolnikov,
- antihistaminiki: 9,2 % bolnikov,
- sistemski kortikosteroidi: 6,7 % bolnikov,
- antiagregacijska zdravila: 4,0 % bolnikov itd.

Med naštetimi skupinami najbolj preseneča druga skupina, in sicer NSAR, ki naj bi se jih pri bolnikih s sladkorno boleznijo izogibali, predvsem zaradi neželenih učinkov na ledvice (15). Podoben trend opazamo tudi v Sloveniji. Poudariti moramo, da omenjeno skupino zdravil lahko kupimo v lekarnah brez recepta, zato sta tudi pri zdravljenju z režimom brez recepta pomembna vloga lekarniškega farmacevta in ustrezno svetovanje.

Vzrok za pogosto polifarmakoterapijo pri bolnikih s sladkorno boleznijo je tudi sama bolezen, saj je hipertenzija pri bolnikih s sladkorno boleznijo dvakrat pogostejša glede na bolnike, ki sladkorne bolezni nimajo (16). Zelo pomembno je, da je krvni tlak pri bolnikih s sladkorno boleznijo uravnan, zato različna priporočila svetujejo agresivno zniževanje krvnega tlaka (16), kar pa seveda lahko vodi do kombinacijskega zdravljenja z več antihipertenzivi naenkrat. Prav tako je sladkorna bolezen dejavnik tveganja, ki bolnike uvrsti v najvišji razred tveganja za srčne bolezni, zato je pri njih zdravljenje z zdravili za zmanjševanje ravni serumskih lipidov upravičeno že pri nižjih vrednostih LDL (16). Pri bolnikih s sladkorno boleznijo so pogoste tudi diabetična nevropatija, nefropatija in druge pridružene bolezni, za katere prav tako prejmejo zdravila (16).

2.2 POSLEDICE POLIFARMAKOTERAPIJE PRI BOLNIKI S SLADKORNO BOLEZNIJO

Najpomembnejše posledice polifarmakoterapije pri bolnikih s sladkorno boleznijo so: večja verjetnost za neželene učinke zdravil, interakcije med zdravili, potencialna podvajanja terapije, zmanjšana aderenza, pogostejše hospitalizacije in urgentni pregledi, zmanjšana kakovost življenja in višji stroški zdravljenja (11). Če so obširne sheme zdravljenja z zdravili potrebne, je za ustrezno aderenza pomembno, da bolnik pozna svoja zdravila in namen ter cilj zdravljenja, tako jih tudi bolj redno jemlje (11).

3 PRISTOPI ZA PRIMERNO PREDPISOVANJE ZDRAVIL PRI BOLNIKU S SLADKORNO BOLEZNIJO

Najpomembnejši pristop so redni pregledi shem zdravljenja, t. i. reevalvacija terapije, ki mora potekati na točno določeno obdobje (periodično) (11, 14, 16). Pregled terapije mora potekati najprej s preverjanjem adherence. Zato je obvezen del pregleda tudi pogovor z bolnikom (ne le pregled zdravstvene kartoteke). Pomemben je pogovor z bolnikom o neželenih učinkih (na katere sam opozori), pregled dvigov zdravil in časovnega obdobja dvigov. Nato pregledamo vsa zdravila, ki jih bolnik jemlje redno, in potem še vsa, ki jih jemlje po potrebi, predvsem če še obstajajo indikacije

zanje in če je morda zaradi spremenjenega kliničnega stanja bolnika potrebna prilagoditev terapije (14, 17). V tujini uporabljane sheme reevalvacije so zelo podobne algoritmu dela farmacevtov svetovalcev pri nas v Sloveniji (18).

Priporočila za primerno predpisovanje zdravil (evalvacija terapije) (16):

- Potrebno je uporabiti nefarmakološke ukrepe, če je le-to izvedljivo in so dostopni.
- Preden uvedemo novo zdravilo, je potrebno premisliti, če niso morda simptomi pri bolniku povezani z neželenimi učinki obstoječih zdravil.
- Ob predpisu novega zdravila je potrebno bolnika poučiti glede indikacije, ustrezne uporabe zdravila, pogostih neželenih učinkov in tudi glede bolj nevarnih neželenih učinkov in kako ravnati, če se le-ti pojavijo (npr. hipoglikemije).
- Redno pregledujemo celotno shemo zdravljenja z zdravili, vključno z OTC-zdravili, izdelki rastlinskega izvora in dodatki vitaminov in mineralov. Opolnomočiti je potrebno bolnika, da ima vedno popoln revidiran seznam zdravil, ki jih jemlje.
- Potrebno je sodelovanje z vsemi zdravstvenimi delavci, ki sodelujejo pri zdravljenju bolnika, da preprečimo podvajanje terapije.
- Identificirati je potrebno vse indikacije za predpisana zdravila.
- Potrebno je spremljanje kliničnega učinka zdravil, ki jih bolnik jemlje.
- Ukiniti je potrebno zdravila, kjer ni jasne indikacije za zdravljenje.
- Ukiniti je potrebno zdravila, kjer ni ustreznega pričakovanega kliničnega učinka.
- Pri starostnikih se je potrebno izogibati manj primernim zdravilom za starostnike.
- Če je možno, z enim zdravilom pokrijemo dve ali več indikacij.
- Redno je potrebno preverjati adherenco pri zdravljenju z zdravili, še posebej pred uvajanjem sprememb ali dodajanjem zdravil.
- Izbrati je potrebno zdravila s širokim terapevtskim oknom, kadar je le mogoče.
- Preverjati je potrebno interakcije med zdravili.
- Preden uvajamo zdravila v preventivne namene, je vedno potrebno pretehtati koristi zdravljenja pri bolniku, z upoštevanjem starosti bolnika in komorbidnosti.

V Sloveniji potekajo različni projekti in razvojne naloge, ki vključujejo tudi farmacevte svetovalce, ki lahko v večini naštetih ukrepov zelo učinkovito svetujejo. Zdravniki družinske medicine imajo v farmacevtskih svetovalcih, ki so vključeni že v večini zdravstvenih domov, velikega zaveznika in pomoč-

nika. Tudi v bolnišnicah se klinični farmacevti vse pogostejše vključujejo v obravnavo bolnikov. Morda je elektronski recept, s katerim sedaj enostavno podaljšujemo terapijo ne glede na število zdravil, zmanjšal zdravnikovo občutljivost za polifarmakoterapijo (7). Po drugi strani pa jo je z elektronsko podporo, ki je zelo napredovala, enostavneje zaznati (7).

Glede na pogostost polifarmakoterapije pri bolnikih s sladkorno boleznijo pričakujemo, da se bo farmacevta svetovalca in lekarniškega farmacevta na primarnem nivoju zdravstvenega varstva in kliničnega farmacevta na sekundarnem in terciarnem nivoju zdravstvenega varstva povsod vključilo v razvojne programe, ki vključujejo svetovanje, preventivo in zdravljenje sladkornega bolnika. Pozitiven pristop je viden v Pomurju, kjer smo različni zdravstveni profili timsko pristopili k obravnavi bolnika s sladkorno boleznijo, pripravljena so Priporočila o celostni obravnavi bolnika s sladkorno boleznijo tipa 2 v Pomurju (19). Priporočila postavljajo farmacevta svetovalca v obvezen tim, bolnika s sladkorno boleznijo, ki prejema pet ali več zdravil hkrati, pa naj bi družinski zdravnik redno enkrat letno poslal na farmakoterapijski pregled v ambulantno farmacevta svetovalca (19). Priporočila se v redno prakso še vpeljujejo.

4 SKLEP

Polifarmakoterapija je pri bolniku s sladkorno boleznijo pogosta in velikokrat neizogibna. Ker lahko vodi do številnih zapletov pri zdravljenju, jo je pomembno obvladovati. Najpomembnejši pristop je redna periodična reevalvacija terapije z zdravili. Farmacevti lahko pripomorejo, svetujejo in pomagajo zdravnikom in drugim zdravstvenim delavcem pri prepoznavanju polifarmakoterapije, interakcij med zdravili in optimizirajo terapijo s poenostavljanjem odmernih shem zdravljenja, s tem tudi z zmanjševanjem števila odmerkov zdravil. S tem lahko vplivajo na boljšo adherenco in posledično tudi na boljšo urejenost sladkorne bolezni.

5 LITERATURA

1. Sladkorna bolezen. NIJZ. Dostop 22.3.2019. <http://www.nijz.si/sl/sladkorna-bolezen#zdravljenje-sladkorne-bolezni>.

2. Jelenc M, Gabrovec B, Kostnapfel T. Poraba zdravil pri slovenskih starostnikih v letu 2016. *Javno zdravje* 2017;1(1): 34-44.
3. Jelenc M. Poraba zdravil v Sloveniji v obdobju 2002-2011. Specialistična naloga. Nacionalni inštitut za javno zdravje, Ljubljana, 2013.
4. Onder G, Bonassi S, Abbatecola AM, Folino-Gallo P, Lapi F, Marchionni N, et al. High prevalence of poor quality drug prescribing in older individuals: a nationwide report from the Italian Medicines Agency (AIFA). *J Gerontol A Biol Med Sci*. 2014;69:430-7.
5. Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States: the Slone survey. *JAMA*. 2002;287:337-44.
6. Palmer K, Marengoni A, Russo P, Mammarella F, Onder G. Frailty and drug use. V: B. Vellas (ur.), *White Book on Frailty* (pp. 102– 106). Chengdu, China: Center of Gerontology and Geriatrics, West China Hospital, Sichuan University. Pridobljeno 20.5.2017 s spletne strani: www.garn-network.org/documents/WHITEBOOKONFRAILITY-USVERSION.pdf.
7. Fürst J. Kazalniki predpisovanja zdravil za družinsko medicino: polifarmakoterapija. Recept – Bilten o zdravilih in obveznega zdravstvenega zavarovanja. ZZZS. Letnik 15, št. 1. 24. september 2018.
8. Fürst J. Poraba zdravil za zdravljenje sladkorne bolezni v Sloveniji. 9. Simpozij Sekcije kliničnih farmacevtov. Radenci, 8-9. marec 2019.
9. Grant RW, Devita NG, Singer DE, Meigs JB. Polypharmacy and medication adherence in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26:1408-12.
10. Gadsby R, Galloway M, Barker P, Sinclair A. Prescribed medicines for elderly frail people with diabetes resident in nursing homes-issues of polypharmacy and medication costs. *Diabet Med*. 2012;29:136-9.
11. Austin RP. Polypharmacy as a Risk Factor in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Spectrum*. Vol 19: No 1, 2006.
12. Walter DG. Rational prescribing: the principles of drug selection and assessment of efficacy. *Clin Med*. 2005;5:26-28.
13. O'Connor PJ. Adding value to evidence-based clinical guidelines. *JAMA*. 2005; 294:741-743.
14. Alwhibi M, Balkhi B, Alhawassi TM, Alkofide H, Alduhaim N, Alabdulali R et al. Polypharmacy among patients with diabetes: a cross-sectional retrospective study in a tertiary hospital in Saudi Arabia. *BMJ Open* 2018;8:e020852.
15. American Society of Nephrology. Choosing wisely: Avoid nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in individuals with hypertension or heart failure or chronic kidney disease of all causes, including diabetes. Dostop 23.3.2019: <https://www.aafp.org/afp/recommendations/viewRecommendation.htm?recommendationId=36>
16. Good CB. Polypharmacy in Elderly Patients With Diabetes. *Diabetes Spectrum*, Vol 15; No 4, 2002.
17. Peron E, Ogbonna K, Donohoe K. Diabetic Medications and Polypharmacy. *Clin Geriatr Med*. Feb 2015; 31(1): 17-vii.
18. Kovačič A. Farmakoterapijski pregled in ambulantne farmacevta svetovalca v Sloveniji. *Farm Vestnik* 2018; 69:39-43.
19. Trpkovski Z, Mikolič R, Tratnjek Z, Gašparič Pincetič T, Ambrož A, Primožič J et al. Priporočil o celostni obravnavi bolnika s sladkornoboleznijo tipa 2 v Pomurju. 2018.

PERORALNI ANTIDIABETIKI – PREGLED STANJA IN POGLED V PRIHODNOST ORAL ANTIDIABETIC DRUGS – CURRENT OVERVIEW AND FUTURE PERSPECTIVES

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Nace Zidar, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: nace.zidar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Sladkorna bolezen je kronična metabolna bolezen, za katero je značilna povečana koncentracija krvnega sladkorja. Število pacientov s sladkorno boleznijo se je s 108 milijonov leta 1980 povzpelo na 422 milijonov leta 2014 (1). Najpo-

POVZETEK

Sladkorna bolezen tipa 2 je kronična progresivna metabolna bolezen, ki nastane, ko trebušna slinavka ne proizvede dovolj inzulina ali kadar človeško telo proizvedenega inzulina ne uspe učinkovito izrabiti. Zaradi njihove učinkovitosti in enostavnosti jemanja za preprečevanje hiperglikemije pri pacientih s sladkorno boleznijo tipa 2 pogosto uporabljamo peroralne anti-diabetike. Med najbolj uveljavljene uvrščamo metformin in sulfonilsečnine, ki so v uporabi že več kot 50 let. Poleg teh pa v terapiji uporabljamo še številne druge skupine učinkovin, kot so meglitinidi, tiazolidindioni, zaviralci alfa-glukozidaze, zaviralci dipeptidil-peptidaze 4 (DPP-4) in zaviralci kotransporterja natrijevih ionov in glukoze 2 (SGLT-2). Število učinkovin za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 se je v zadnjih letih močno povečalo. V članku predstavljamo pregled obstoječih skupin peroralnih anti-diabetikov in nekatere novejš skupine učinkovin, ki so v različnih fazah razvoja.

KLJUČNE BESEDE:

metformin, peroralni anti-diabetik, sladkorna bolezen tipa 2, zaviralec, sulfonilsečnina

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a chronic progressive metabolic disorder that occurs either when the pancreas does not produce enough insulin or when the body cannot effectively use the insulin it produces. Because of their effectiveness and convenience of administration, oral antidiabetic drugs are frequently prescribed for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Metformin and sulfonylureas are among the most known oral antidiabetic drugs and have been used in the clinic for more than 50 years. In addition, several other classes of drugs are known, such as meglitinides, thiazolidinediones, alpha-glucosidase inhibitors, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors and sodium/glucose cotransporter 2 (SGLT-2) inhibitors. The number of available therapies for the treatment of type 2 diabetes has grown considerably in recent years. In this paper, we present an overview of clinically approved oral antidiabetic agents and some new classes of drugs that are currently in different stages of development.

KEY WORDS:

inhibitor, metformin, oral antidiabetic drug, sulfonylurea, type 2 diabetes mellitus

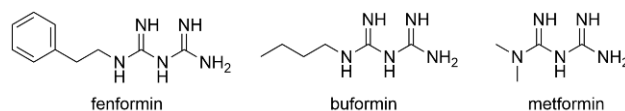


gostejša oblika sladkorne bolezni je sladkorna bolezen tipa 2, ki jo ima približno 90 % vseh diabetikov (2). Medtem ko je za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 1 nujno potreben inzulin, lahko k zdravljenju tipa 2 veliko pripomoreta zdrav način življenja in ustrezna prehrana, pomagamo pa si lahko tudi s peroralnimi antidiabetiki (3). Peroralni antidiabetiki delujejo tako, da znižujejo raven krvnega sladkorja. Obstaja več skupin peroralnih antidiabetikov, ki jih razdelimo na i) učinkovine, ki povečajo izločanje inzulina iz trebušne slinavke, ii) učinkovine, ki povečajo občutljivost tarčnih tkiv na inzulin in iii) učinkovine, ki zmanjšajo hitrost absorpcije glukoze iz gastrointestinalnega trakta. Pogosto uporabljamo kombinacijo več učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja, ki skupaj dosegajo sinergističen učinek (4). Poznamo več skupin peroralnih antidiabetikov, med katerimi so najbolj razširjeni metformin in sulfonilsečnine, ki so v uporabi že več kot 50 let (5). V zadnjih desetletjih so v uporabo prešle še številne druge skupine, kot so meglitinidi, tiazolidindioni, zaviralci alfa-glukozidaze, zaviralci dipeptidil-peptidaze 4 (DPP-4), zaviralci kotransporterja natrijevih ionov in glukoze 2 (SGLT-2, *sodium/glucose cotransporter 2*), vezalci žolčnih kislin in agonisti dopaminskega receptorja D2 (6-8). Poleg uveljavljenih skupin antidiabetikov pa je v različnih fazah razvoja še več drugih skupin učinkovin (9-11). V nadaljevanju podajamo pregled najpomembnejših skupin peroralnih antidiabetikov, mehanizme njihovega delovanja, njihove prednosti in slabosti in njihove najbolj značilne predstavnike.

2 SKUPINE PERORALNIH ANTIDIABETIKOV

2.1 BIGVANIDI

Že od leta 1918 je znano, da gvanidin znižuje koncentracijo glukoze v krvi (12), vendar zaradi svoje toksičnosti nikoli ni bil uporabljen v terapiji. Leta 1957 so odkrili gvanidinski derivat fenformin (slika 1), ki pa je bil zaradi visokega tveganja za pojav mlečne acidoze (laktacidoze) leta 1970 umaknjen s trga. V Združenih državah Amerike je zaradi uporabe fenformina umrlo tudi do nekaj sto pacientov letno (8). Tudi gvanidinski derivat buformin (slika 1) je bil zaradi tveganja za pojav laktacidoze v večini držav umaknjen s trga. Edina učinkovina iz tega strukturnega razreda, ki jo uporabljamo v terapiji, je metformin (dimetilbigvanid, slika 1), ki danes predstavlja učinkovino prvega izbora za zniževanje



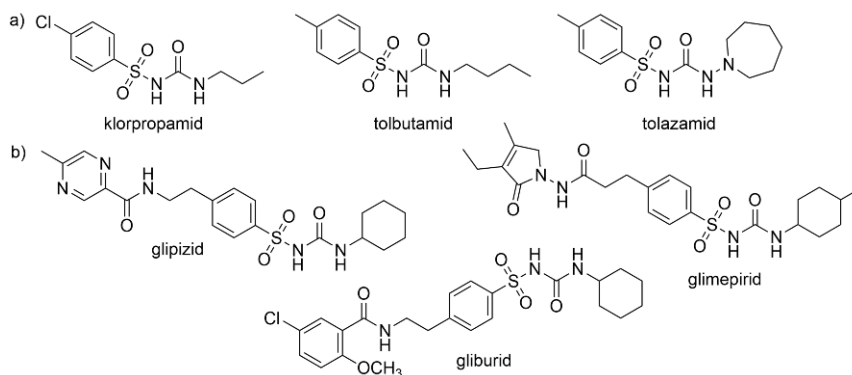
Slika 1: Strukture predstavnikov bigvanidnih antidiabetikov.

Figure 1: Structures of the representative biguanide antidiabetics.

koncentracije glukoze v krvi. Metformin zavira tvorbo glukoze v jetrih, poveča občutljivost tkiv na inzulin, poveča privzem glukoze v perifernih tkivih, zmanjša oksidacijo maščobnih kislin in zmanjša absorpcijo glukoze iz gastrointestinalnega trakta (13). Molekularni mehanizem delovanja metformina ni popolnoma pojasnjen, obstajajo pa dokazi, da vpliva na zaviranje kompleksa I v dihalni verigi, aktivira od AMP odvisno protein-kinazo (AMPK), zavira z glukagonom spodbujeno povečanje koncentracije cikličnega AMP (cAMP) in sledečo aktivacijo protein-kinaze A ter vpliva na metabolizem črevesne mikrobiote (13, 14). Metformin izkazuje nizko stopnjo tveganja za pojav hipoglikemije in laktacidoze. Kljub temu je kontraindiciran pri ljudeh, ki imajo povečano tveganje za pojav laktacidoze, npr. pri pacientih z okvaro ledvic, boleznimi pljuč ali jeter. Metformin pogosto uporabljamo v kombinaciji z drugimi peroralnimi antidiabetiki, npr. s tiazolidindioni (4).

2.2 SULFONILSEČNINE

Sulfonilsečnine so v uporabi od 50. let prejšnjega stoletja in predstavljajo prvo skupino peroralnih antidiabetikov, ki so prišli v klinično prakso (4). Še danes je njihova uporaba močno razširjena, saj so za metforminom učinkovine drugega izbora za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 (15). Sulfonilsečnine zmanjšujejo koncentracijo sladkorjev v krvi preko vplivanja na povečano izločanje inzulina iz trebušne slinavke. Njihovo vezavno mesto je receptor za sulfonilsečnine (SUR-1), ki se nahaja na površini beta-celic trebušne slinavke. Vezava sulfonilsečnin na SUR-1 povzroči zaprtje od ATP odvisnih kalijevih kanalov, kar vodi do depolarizacije membrane, vstop kalcijevih ionov v celico in s tem do povečanega izločanja inzulina (4). Sulfonilsečnine poleg tega zmanjšajo glukoneogenezo v jetrih, zmanjšajo razgradnjo lipidov do maščobnih kislin in vplivajo na manjši jetrni očistek inzulina (16). Ločimo sulfonilsečnine prve generacije, kamor spadajo klorpropamid, tolbutamid in tolazamid (slika 2a), in sulfonilsečnine druge generacije, npr. glipizid, glimepirid in gliburid (slika 2b). Sulfonilsečnin prve generacije zaradi nekaterih resnih neželenih učinkov, kot so hipoglikemija, hipoglikemična koma, zakasnen pričetek delovanja in povečano tveganje za srčno-žilne zaplete, danes ne



Slika 2: Strukture predstavnikov sulfonilsečnin prve (a) in druge (b) generacije.

Figure 2: Structures of the representative first- (a) and second-generation (b) sulfonylureas.

uporabljamo več. Sulfonilsečnine druge generacije izkazuje večjo jakost delovanja, večjo varnost, manjšo verjetnost za hipoglikemijo, manj srčno-žilnih neželenih učinkov in imajo hitrejši pričetek delovanja. Sulfonilsečnine so kontraindicirane pri pacientih z okvarami jeter in ledvic in pri nosečnicah (3).

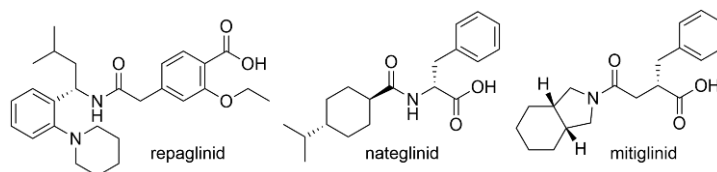
2.3 MEGLITINIDI

Meglitinide so za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 uvedli leta 1997, mehanizem njihovega delovanja pa je podoben kot pri sulfonilsečninah. Meglitinidi stimulirajo izločanje inzulina iz beta-celic trebušne slinavke, tako da vplivajo na zapiranje od ATP odvisnih kalijevih kanalov, čemur sledi odpiranje napetostno odvisnih kalcijevih kanalov in povečanje znotrajcelične koncentracije kalcija (10). Meglitinidi se na receptorje SUR-1 na beta-celicah vežejo podobno kot sulfonilsečnine, vendar je njihova interakcija z receptorjem šibkejša, disociacija pa hitrejša, zaradi česar je njihovo delovanje krajše, izrazi pa se šele pri višjih koncentracijah glukoze v krvi. V primerjavi s sulfonilsečninami je verjetnost za pojav hipoglikemije pri uporabi meglitinidov manjša (6). Najbolj pogost predstavnik meglitinidov je re-

paglinid, v to skupino pa spadata še nateglinid in mitiglinid (slika 3) (4).

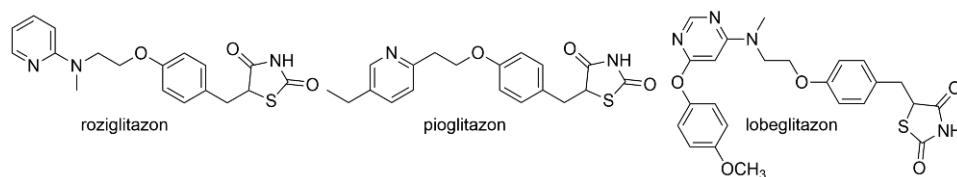
2.4 TIAZOLIDINDIONI

Tiazolidindioni so agonisti receptorja, aktiviranega s proliferatorjem peroksisomov gama (PPAR γ , *peroxisome proliferator activated receptor gamma*), preko katerega povečajo občutljivost tkiv na inzulin ter znižajo ravni glukoze, trigliceridov in maščobnih kislin v krvi (17). PPAR γ spada v družino jedrnih receptorjev in ima vlogo transkripcijskega dejavnika. Obstajajo trije receptorji iz družine PPAR: PPAR α , PPAR β in PPAR γ , ki se razlikujejo po izražanju v različnih tkivih, afiniteti do različnih ligandov in funkciji (18). PPAR γ je pretežno izražen v maščobnem tkivu, v manjši meri pa v debelem črevesu in makrofagih (10). Endogeni ligandi za te receptorje so proste maščobne kisline in eikozanoidi. Ob aktivaciji se ti receptorji v kompleksu z retinoidnimi receptorji X (RXR, retinoid X receptor) vežejo na DNA, s čimer povečajo ekspresijo številnih genov, povezanih z metabolizmom glukoze, maščobnih kislin in holesterola (8). Preko aktivacije PPAR γ tako tiazolidindioni povečajo privzem glukoze v skeletne mišice in maščobno tkivo in zmanjšajo



Slika 3: Strukture predstavnikov meglitinidov.

Figure 3: Structures of the representative meglitinides.



Slika 4: Strukture predstavnikov tiazolidindionov.

Figure 4: Structures of the representative thiazolidinediones.

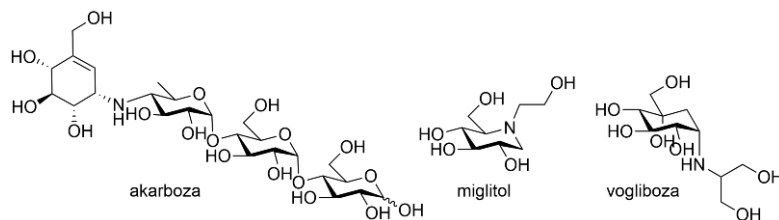
glukoneogenezo v jetrih (6). Terapija s tiazolidindioni je povezana z nekaterimi resnimi neželenimi učinki, kot so hepatotoksičnost, toksičnost za ledvice (19) in v kombinaciji z inzulinom tudi okvara srca, zaradi česar tiazolidindioni niso učinkovine prvega izbora za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 (10). Predstavniki tiazolidindionov v klinični praksi so rosiglitazon, pioglitazon in lobeglitazon (slika 4).

2.5 ZAVIRALCI ALFA-GLUKOZIDAZE

Zaviralci alfa-glukozidaze so reverzibilni, kompetitivni zaviralci encimov, ki so v tankem črevesu odgovorni za razgradnjo kompleksnejših ogljikovih hidratov do monosaharidov, ki se lahko absorbirajo v krvni obtok. Zaviralci alfa-glukozidaze zmanjšajo vpliv ogljikovih hidratov iz hrane na koncentracijo sladkorja v krvi in so najbolj učinkoviti pri postprandialni hiperglikemiji (20). V primerjavi z metforminom in sulfonilsečninami so v splošnem manj učinkoviti za zniževanje ravni krvnega sladkorja (4). Ker ne vplivajo na izločanje inzulina, pri uporabi zaviralcev alfa-glukozidaze ne pride do hipoglikemije, lahko pa se pojavijo gastrointestinalni neželeni učinki, kot so napenjanje, driska in bolečine v trebuhu (8). Primeri klinično uporabnih zaviralcev alfa-glukozidaz so akarboza, miglitol in vogliboza (slika 5), ki imajo podoben, vendar ne enak mehanizem delovanja, saj je njihova vezavna afiniteta do različnih vrst alfa-glukozidaz različna (8).

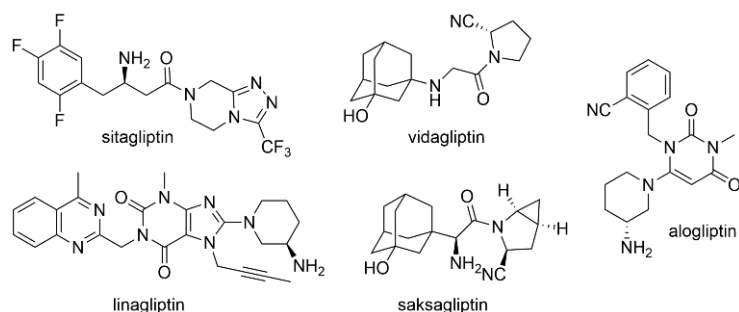
2.6 ZAVIRALCI DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4 (DPP-4) – GLIPTINI

Dipeptidil-peptidaza je transmembranski encim, izražen v številnih celicah, ki cepi dve N-terminalni aminokislini s peptidov, ki vsebujejo na drugem mestu prolin ali alanin. S cepitvijo dveh terminalnih aminokislin DPP-4 inaktivira tako glukagonu podoben peptid 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide-1*) kot od glukoze odvisni inzulinotropni polipeptid (GIP, *glucose-dependent insulintropic peptide*) (21). GLP-1 in GIP spadata v skupino metabolnih hormonov, imenovanih inkretini, ki vplivajo na zmanjšanje koncentracije glukoze v krvi preko vezave na receptor za GLP-1, ki se nahaja na beta-celicah trebušne slinavke. Inkretini se sproščajo po obroku in povečajo izločanje inzulina iz trebušne slinavke. Zaviralci DPP-4 zavrejo razgradnjo endogenih inkretinov, s čimer vplivajo na povečano raven inzulina. Ker je sproščanje inzulina pod vplivom inkretinov odvisno od koncentracije glukoze v krvi, inkretini pri nizkih koncentracijah glukoze nimajo vpliva, s čimer je verjetnost za pojav hipoglikemije pri uporabi zaviralcev DPP-4 majhna (4). Prvi zaviralec DPP-4, ki ga je leta 2006 odobrila ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA), je bil sitagliptin, v to skupino pa spadajo še vidagliptin, saksagliptin, linagliptin in alogliptin (slika 6) (4). Zaviralce DPP-4 uporabljamo samostojno ali v kombinaciji z drugimi antidiabetiki, kot so metformin in tiazolidindioni (22).



Slika 5: Strukture predstavnikov zaviralcev alfa-glukozidaze.

Figure 5: Structures of the representative alpha-glucosidase inhibitors.



Slika 6: Strukture predstavnikov zaviralcev dipeptidil-peptidaze 4 (DPP-4).

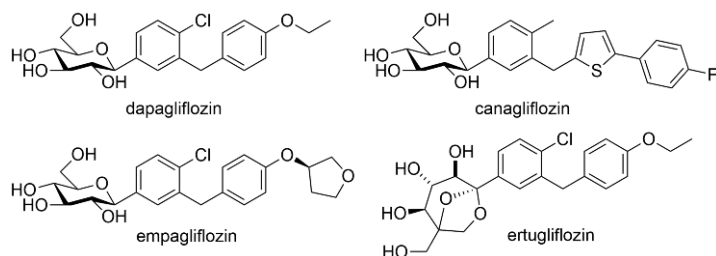
Figure 6: Structures of the representative dipeptidyl dipeptidase-4 (DPP-4) inhibitors.

2.7 ZAVIRALCI KOTRANSPORTERJA NATRIJEVIH IONOV IN GLUKOZE 2 (SGLT-2) – GLIFLOZINI

Zaviralci kotransporterja natrijevih ionov in glukoze 2 (SGLT-2, *sodium/glucose cotransporter 2*) spadajo med novejšje peroralne anti-diabetike. SGLT-2 je protein, ki spada v družino od natrijevih ionov odvisnih kotransporterjev za glukozo in je odgovoren za reabsorpcijo glukoze v ledvicah. S pomočjo SGLT-2 ledvice reabsorbirajo približno 90 % od 180 g glukoze, ki jo filtrirajo vsak dan (23). Ker zaviralci SGLT-2 delujejo po mehanizmu, ki ni odvisen od insulina, so potencialno uporabni tudi v napredovalih fazah sladkorne bolezni, v katerih so pankreasne beta-celice že močno okvarjene (3). Prvi predstavnik zaviralcev SGLT-2 je bil dapagliflozin, ki so ga v Evropi registrirali leta 2012. Med ostale zaviralce SGLT-2 spadajo še canagliflozin, empagliflozin in ertugliflozin (slika 7), številni pa so še v kliničnih fazah raziskav. Med neželene učinke zaviralcev SGLT-2 spadajo povečano tveganje za okužbe sečil in spolovil ter redkeje pojav ketoacidoze (4).

2.8 VEZALCI ŽOLČNIH KISLIN

Vežalci žolčnih kislin so ionsko-izmenjevalne smole, ki vežejo žolčne kisline iz gastrointestinalnega trakta, s čemer preprečijo njihovo reabsorpcijo. Ker gre za velike polimerne spojine, se ne absorbirajo iz črevesja in se zato izločijo z blatom (24). V splošnem vezalce žolčnih kislin uporabljamo kot sredstva za zniževanje ravni holesterola v krvi, v zadnjem času pa so odkrili, da nekateri predstavniki vplivajo tudi na raven krvne glukoze (25). Mehanizem, po katerem vezalci žolčnih kislin znižuje raven glukoze v krvi, še ni pojasnjen. Med vezalce žolčnih kislin prve generacije spadata učinkoviniolestiramin in kolestipol, ki pa ju zaradi dokaj šibkega delovanja in nekaterih neželenih učinkov uporabljamo redko (24). Druga generacija vezalcev žolčnih kislin, kamor uvrščamo kolesevelam in kolestimid, ima izboljšano toleranco, poleg zniževanja ravni holesterola pa znižuje tudi raven glukoze v krvi brez vplivanja na endogeno koncentracijo insulina. Pri uporabi kolesevelama niso zaznali povečane telesne mase ali hipoglikemije, lahko pa se pojavijo gastrointestinalni neželeni učinki, kot sta zaprtje in dispepsija (7, 26, 27).



Slika 7: Strukture predstavnikov zaviralcev kotransporterja natrijevih ionov in glukoze 2 (SGLT-2).

Figure 7: Structures of the representative sodium/glucose cotransporter 2 (SGLT-2) inhibitors.

2.9 AGONISTI DOPAMINSKEGA RECEPTORJA D2

Edina učinkovina iz tega strukturnega razreda je bromokriptin, njegov mehanizem zniževanja krvnega sladkorja pa ni popolnoma pojasnjen (2). Bromokriptin je centralno delujoč agonist dopaminskega receptorja D2 ter receptorjev za serotonin in adrenergičnih receptorjev α_1 in α_2 . Med drugim ga uporabljamo za zdravljenje hiperprolaktinemije in galaktoreje pri pacientih s tumorjem hipofize, za zdravljenje akromegalije in Parkinsonove bolezni (28). Za zdravljenje diabetesa tipa 2 ga je FDA odobrila leta 2009 (4). Raziskave na ljudeh nakazujejo na to, da bromokriptin znižuje raven glukoze v krvi preko povečanja občutljivosti tkiv na inzulin, brez vplivanja na endogeno izločanje inzulina (2), kar je najverjetneje posledica njegove vezave na dopaminske in serotonininske receptorje (5).

2.10 NEKATERE NOVEJŠE SKUPINE PERORALNIH ANTIDIABETIKOV V FAZAH RAZVOJA

2.10.1 Tetrahidotriazini (glimini)

Prva učinkovina iz tega strukturnega razreda je imeglimin (slika 8), ki je trenutno v kliničnih fazah razvoja (29). Imeglimin je zaviralec oksidativne fosforilacije, ki zavira glukoneogenezo v jetrih, poveča privzem glukoze v mišice in uravnava izločanje inzulina. Imeglimin hkrati deluje na jetra, mišice in trebušno slinavko ter s tem vpliva tako na izločanje inzulina kot na večjo občutljivost tkiv na inzulin (9).

2.10.2 Agonisti z G-proteinom sklopljenih receptorjev (GPCR)

Z G-proteinom sklopljeni receptorji (GPCR) imajo pomembno vlogo pri uravnavanju postprandialnega meta-

bolizma. Ekspresija teh receptorjev je tkivno specifična, zato ima njihova aktivacija različne fiziološke vloge (30). Potencialne tarče za nove antidiabetike iz družine GPCR so receptorji za inkretine, izraženi v beta-celicah trebušne slinavke, med katere spadajo GPR119, GPR40 in GPR120 (31). Aktivacija teh receptorjev stimulira izločanje inzulina (9).

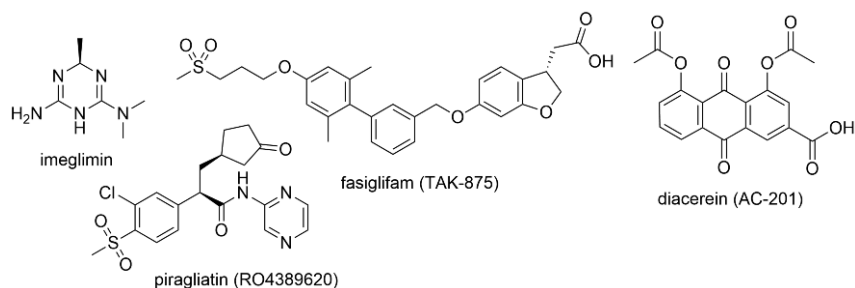
Najbolj znana učinkovina iz te skupine je fasiglifam (TAK-875, slika 8), katere razvoj so ustavili v tretji fazi kliničnih preizkušanj zaradi potencialne hepatotoksičnosti (32). Trenutno je v različnih fazah razvoja še več učinkovin iz tega strukturnega razreda (33).

2.10.3 Protivnetne učinkovine

Pri sladkorni bolezni tipa 2 so adipociti v stanju kroničnega vnetja in v okolico sproščajo velike količine provnetnih citokinov, npr. interleukine (IL) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α), ki aktivirajo različne receptorje. V razvoju so številne učinkovine, ki delujejo na te mediatorje vnetja (34). Diacerein (slika 8) je učinkovina, ki zavira tvorbo in delovanje interleukina 1 β (IL-1 β) in zmanjša izražanje receptorja za interleukin 1 (IL-1R). Diacerein se uporablja za zdravljenje bolezni sklepov, kot je osteoartritis, trenutno pa je v kliničnih fazah raziskav za izboljšanje glikemične kontrole pri pacientih s sladkorno boleznijo tipa 2 (35).

2.10.4 Aktivatorji glukokinaze

Glukokinaza je encim, ki je izražen v organih, ki zaznavajo glukozo, kot so trebušna slinavka, jetra, možgani in gastrointestinalni trakt (9). V beta-celicah trebušne slinavke ima glukokinaza pomembno vlogo pri uravnavanju izločanja inzulina, v hepatocitih pa uravnava porabo glukoze. Na podlagi dokazov, da aktivacija glukokinaze v trebušni slinavki in jetrih povzroči povečano izločanje inzulina in privzem glukoze v jetrih, bi bili lahko alosterični aktivatorji glukokinaze zanimiva skupina učinkovin za zdravljenje



Slika 8: Strukture predstavnikov nekaterih novejših skupin peroralnih antidiabetikov v fazah razvoja.

Figure 8: Structures of the representative new-class oral antidiabetics that are currently in development.

sladkorne bolezni tipa 2 (36, 37). Kljub temu, da je v različnih fazah raziskav veliko aktivatorjev glukokinaze, npr. pi-ragliatin (38) (slika 8), pa do danes nobeden izmed njih ni prešel druge faze kliničnih preizkušanj (9).

3 SKLEP

Kljub širokemu naboru učinkovin za zniževanje koncentracije sladkorja v krvi, ima trenutna terapija bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 številne pomanjkljivosti. Problem znanih skupin peroralnih antidiabetikov so nekateri neželeni učinki, med katerimi sta pogosta hipoglikemija in povečanje telesne mase. Glavna pomanjkljivost trenutnih načinov zdravljenj sladkorne bolezni pa je, da z njim ne odpravimo osnovnega vzroka bolezni, tj. okvare delovanja beta-celic trebušne slinavke in njihovega progresivnega zmanjševanja izločanja inzulina. Poleg tega trenutno tudi ne poznamo učinkovin, ki bi zmanjšale tveganje za srčno-žilne bolezni, ki so močno povezane s sladkorno boleznijo. Pri razvoju novih učinkovin za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 bi bilo zato, poleg zniževanja ravni sladkorja v krvi, nujno upoštevati tudi omenjene dejavnike. Čeprav si ne moremo obetati, da bomo v bližnji prihodnosti sladkorno bolezen popolnoma pozdravili, pa bodo zagotovo nekatere učinkovine, ki so trenutno v fazah razvoja, izboljšale kakovost življenja pacientov s sladkorno boleznijo tipa 2.

4 LITERATURA

1. WHO Fact Sheet, Diabetes, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
2. Tran L, Zielinski A, Roach AH, Jende JA, Householder AM, Cole EE, et al. Pharmacologic treatment of type 2 diabetes: oral medications. *Ann Pharmacother* 2015; 49(5): 540–556.
3. Chaudhury A, Duvoor C, Dendi VSR, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, et al. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front Endocrinol* 2017; 8(6).
4. He ZX, Zhou ZW, Yang YX, Yang TX, Pan SY, Qiu JX, et al. Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol P* 2015; 42(2): 125–138.
5. Pijl H, Edo AM. Modulation of monoaminergic neural circuits: potential for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Treat Endocrinol* 2002; 1(2): 71–78.
6. Alhadramy MS. Diabetes and oral therapies: a review of oral therapies for diabetes mellitus. *J Taibah Univ Med Sc* 2016; 11(4): 317–329.
7. Goldfine AB, Fonseca VA, Jones MR, Wang AC, Ford DM, Truitt KE. Long-term safety and tolerability of colesevelam HCl in subjects with type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2010; 42(1): 23–30.
8. Kokil GR, Rewatkar PV, Verma A, Thareja S, Naik SR. Pharmacology and chemistry of diabetes mellitus and antidiabetic drugs: a critical review. *Curr Med Chem* 2010; 17(35): 4405–4423.
9. Chikara G, Sharma PK, Dwivedi P, Charan J, Ambwani S, Singh S. A narrative review of potential future antidiabetic drugs: should we expect more? *Indian J Clin Biochem* 2018; 33(2): 121–131.
10. Blind E, Janssen H, Dunder K, de Graeff PA. The European Medicines Agency's approval of new medicines for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20(9): 2059–2063.
11. Lehrke M, Marx N. New antidiabetic therapies: innovative strategies for an old problem. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23(6): 569–575.
12. C. K. Watanabe. Studies in the metabolism changes induced by administration of guanidine bases: i. influence of injected guanidine hydrochloride upon blood sugar content. *J Biol Chem* 1918; 33: 253.
13. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci* 2012; 122(5-6): 253–270.
14. Cabreiro F, Au C, Leung KY, Vergara-Irigaray N, Cocheme HM, Noori T, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell* 2013; 153(1): 228–239.
15. Green JB, Feinglos MN. Are sulfonylureas passe? *Curr Diabetes Rep* 2006; 6(5): 373–377.
16. Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: S368–S376.
17. Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab* 2014; 20(4): 573–591.
18. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013; 19(5): 557–566.
19. Kung J, Henry RR. Thiazolidinedione safety. *Expert Opin Drug Saf* 2012; 11(4): 565–579.
20. Derosa G, Maffioli P. alpha-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 2012; 8(5): 899–906.
21. Stonehouse AH, Darsow T, Maggs DG. Incretin-based therapies. *J Diabetes* 2012; 4(1): 55–67.
22. Roy S, Khanna V, Mitra S, Dhar A, Singh S, Mahajan DC, et al. Combination of dipeptidylpeptidase IV inhibitor and low dose thiazolidinedione: Preclinical efficacy and safety in db/db mice. *Life Sci* 2007; 81(1): 72–79.
23. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetic Med* 2010; 27(2): 136–142.
24. Out C, Groen AK, Brufau G. Bile acid sequestrants: more than simple resins. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23(1): 43–55.
25. Takebayashi K, Aso Y, Inukai T. Role of bile acid sequestrants in the treatment of type 2 diabetes. *World J Diabetes* 2010; 1(5): 146–152.
26. Bays HE, Goldberg RB, Truitt KE, Jones MR. Colesevelam hydrochloride therapy in patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin - Glucose and lipid effects. *Arch Intern Med* 2008; 168(18): 1975–1983.



27. Schwartz SL, Lai YL, Xu JB, Abby SL, Misir S, Jones MR, et al. The effect of colesevelam hydrochloride on insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes: a pilot study. *Metab Syndr Relat D* 2010; 8(2): 179–187.
28. Holt RIG, Barnett AH, Bailey CJ. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12(12): 1048–1057.
29. Vuylsteke V, Chastain LM, Maggu GA, Brown C. Imeglimin: a potential new multi-target drug for type 2 diabetes. *Drugs R D* 2015; 15(3): 227–232.
30. Tan T, Bloom S. Gut hormones as therapeutic agents in treatment of diabetes and obesity. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13(6): 996–1001.
31. Mancini AD, Poitout V. GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes: life after 'TAKing' a hit. *Diabetes Obes Metab* 2015; 17(7): 622–629.
32. Kim M, Gu GJ, Koh YS, Lee SH, Na YR, Seok SH, et al. Fasiglifam (TAK-875), a G protein-coupled receptor 40 (GPR40) agonist, may induce hepatotoxicity through reactive oxygen species generation in a GPR40-dependent manner. *Biomol Ther* 2018; 26(6): 599–607.
33. Huang H, Winters MP, Meegalla SK, Arnoult E, Lee SP, Zhao SY, et al. Discovery of novel benzo(b)thiophene tetrazoles as non-carboxylate GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2018; 28(3): 429–436.
34. Mittermayer F, Caveney E, De Oliveira C, Gourgiotis L, Puri M, Tai LJ, et al. Addressing unmet medical needs in type 2 diabetes: a narrative review of drugs under development. *Curr Diabetes Rev* 2015; 11(1): 17–31.
35. Oliinyk M, Zhuravlyova L. The Efficiency of treatment with diacerein on course of osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis Int* 2018; 29: S557–S557.
36. Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, et al. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 2006; 55(1): 1–12.
37. Fujieda H, Kogami M, Sakairi M, Kato N, Makino M, Takahashi N, et al. Discovery of a potent glucokinase activator with a favorable liver and pancreas distribution pattern for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Eur J Med Chem* 2018; 156: 269–294.
38. Bonadonna RC, Heise T, Arbet-Engels C, Kapitza C, Avogaro A, Grimsby J, et al. Piragliatin (RO4389620), a novel glucokinase activator, lowers plasma glucose both in the postabsorptive state and after a glucose challenge in patients with type 2 diabetes mellitus: a mechanistic study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(11): 5028–5036.

MOČ JE V ZAŠČITI



Pred uporabo pazljivo preberite navodila.
Za informacije o indikacijah, varnostnih ukrepih
in stranskih učinkih se posvetujte z zdravnikom
ali farmacevtom.

Uvoznik za Slovenijo:



medical intertrade
Brodišče 12, 1236 Trzin

Actinica losjon je učinkovit medicinski pripomoček, ki nudi visok spekter zaščite pred UV žarki. Razvit je posebej za osebe z visokim tveganjem, da obolijo za kožnim rakom, kot posledico izpostavljanja UV žarkom. Actinica učinkovito ščiti pred nekaterimi vrstami nemelanomskih oblik kožnega raka, kar je bilo dokazano v klinični študiji. Actinica losjon kožo vlaži, ne vsebuje dišav in PEG emulgatorjev, zaradi česar ga koža dobro prenaša in je prijeten za vsakodnevno uporabo za vse tipe kože. Dozator na potisk omogoča nanašanje pravilne količine Actinice, da boste v vsakem trenutku prepričani, da ste uporabili zadostno količino za zaščito vaše kože.

Spremenite zaščito v preventivo.


Actinica[®]
Lotion

 **GALDERMA**

ONKRAJ UREJENE GLIKEMIJE: ZMANJŠANJE SRČNO- ŽILNIH ZAPLETOV PRI BOLNIKIH S SLADKORNO BOLEZNIJO

BEYOND GLYCAEMIA CONTROL: REDUCTION OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS IN DIABETES MELLITUS PATIENTS

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Mojca Lunder, dr. med.¹

Asist. dr. Miodrag Janić, dr. med.²

¹ Klinični oddelek za endokrinologijo,
diabetes in presnovne bolezni,
Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

² Klinični oddelek za žilne bolezni,
Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: mojca.lunder@kclj.si

POVZETEK

Sladkorna bolezen poveča tveganje za srčno-žilne bolezni za dva do trikrat. Dosedanje raziskave so pokazale, da z izboljšanjem njene urejenosti znižamo pojavnost mikrovaskularnih zapletov, na srčno-žilne dogodke (makrovaskularne zaplete) pa imamo le majhen vpliv. Za nekatere antidiabetike so ugotovili, da poleg znižanja ravni krvnega sladkorja delujejo zaščitno tudi pred pojavom srčno-žilnih dogodkov. Mednje prištevamo metformin in nekatere predstavnike skupin zaviralcev SGLT-2 ter agonistov receptorjev GLP-1. Glede na te izsledke najnovejši dogovor svetovnih diabetoloških združenj predlaga izbiro antidiabetične učinkovine pri posameznem bolniku s sladkorno boleznijo tipa 2 na osnovi njegovega srčno-žilnega tveganja in pridruženih bolezni. Pri tistih, ki so srčno-žilni dogodek že utrpeli ali imajo visoko tveganje zanj, se priporoča antidiabetična učinkovina z dokazanim zaščitnim delovanjem na srčno-žilni sistem. Prispevek opisuje problematiko srčno-žilnih bolezni pri bolnikih s sladkorno boleznijo, povzema skupine antidiabetičnih učinkovin z zaščitnim delovanjem na srčno-žilni sistem ter razpravlja glede možnosti uveljavitve novega pristopa tudi v Sloveniji.

KLJUČNE BESEDE:

agonisti GLP-1, metformin, sladkorna bolezen, srčno-žilne bolezni, zaviralci SGLT-2

ABSTRACT

Diabetes increases cardiovascular risk by two to three times. Improved glycaemic control leads to decreased incidence of microvascular complications, whereas it has only a small impact on the incidence of cardiovascular events (macrovascular complications). In addition to blood glucose lowering, some antidiabetic drugs have protective cardiovascular profile, thus reducing the incidence of cardiovascular events. Among them are metformin, particular SGLT-2 inhibitors and particular GLP-1 receptor agonists. Recent consensus on treatment of type 2 diabetes, reached by American and European diabetes associations, suggests the individually based prescription of an antidiabetic drug, based on patient's cardiovascular risk and concomitant diseases. In those with either prior cardio-



vascular event or increased cardiovascular risk, antidiabetic drug with proven cardiovascular protection is recommended. We describe the problematics of cardiovascular diseases in patients with diabetes, summarize antidiabetic drugs with known cardiovascular protection, and discuss the possibility of introduction of this new approach in Slovenia.

KEY WORDS:

cardiovascular diseases, diabetes mellitus, GLP-1 agonists, metformin, SGLT-2 inhibitors

1 UVOD

Sladkorna bolezen je kronična bolezen, ki je posledica pomanjkanja inzulina in/ali neodzivnosti tarčnih tkiv nanj. Vodi v stanje kronične hiperglikemije, ki botruje poškodbam številnih organov oz. kroničnim zapletom sladkorne bolezni (1). Prevalenca sladkorne bolezni v Evropi je leta 2017 znašala 58 milijonov bolnikov, epidemiološka predvidevanja pa kažejo, da bo do leta 2045 porasla na 67 milijonov. V Sloveniji je bilo leta 2017 v populaciji, stari med 20 in 79 let, približno 10,4 % (162 na 1000 prebivalcev) bolnikov s sladkorno boleznijo. Leta 2045 naj bi ta številka porasla na 12,2 % (170 na 1000 prebivalcev) (2).

Tretjina bolnikov s sladkorno boleznijo doživi srčno-žilne zaplete, ki predstavljajo pomemben vzrok umrljivosti pri tej populaciji. Sladkorna bolezen je pomemben dejavnik tveganja za razvoj z aterosklerozo povezanih srčno-žilnih zapletov, in sicer angine pectoris, miokardnega infarkta, srčnega popuščanja, možganske kapi ter periferne arterijske bolezni. Tveganje za miokardni infarkt ali možgansko kap je pri bolnikih s sladkorno boleznijo dva do trikrat večje kot pri vrstnikih brez sladkorne bolezni (1, 3). Bolniki s sladkorno boleznijo imajo enako tveganje za srčno-žilno smrt ali neusodni aterotrombotični dogodek kot bolniki brez nje, ki so že utrpeli miokardni infarkt. Posledično lahko sladkorna bolezen obravnavamo kot »ekvivalent srčno-žilne bolezni« (4). Glede na srčno-žilno ogroženost bolnikov raste potreba po učinkovitem in varnem zdravljenju sladkorne bolezni, ki bi poleg uravnavanja glikemije zmanjšalo tudi njihovo ogroženost oz. pojavnost srčno-žilnih zapletov.

2 SPREMEMBA PRISTOPA K ZDRAVLJENJU SLADKORNE BOLEZNI TIPA 2

Cilj zdravljenja sladkorne bolezni je preprečevanje in obvladovanje njenih kroničnih zapletov ter vzdrževanje ustrezne kakovosti bolnikovega življenja. Pri zdravljenju bolnika s sladkorno boleznijo je poleg uravnavanja glikemije potrebna tudi celostna obravnava, ki vključuje čim boljši nadzor nad vsemi dejavniki tveganja za srčno-žilne bolezni (5). Pojavnost mikrovaskularnih zapletov (diabetične retinopatije, nefropatije in nevropatije) je neposredno odvisna od urejenosti glikemije, medtem ko stopnja makrovaskularnih zapletov (srčno-žilni dogodki) z urejenostjo glikemije neposredno ne korelira, ob boljše urejeni glikemiji se nakazuje le manjši upad njihove pojavnosti (1).

Pri zdravljenju sladkorne bolezni sprva svetujemo spremembo življenjskega sloga, to je nefarmakološke ukrepe. Bolnike in njihove svojce vključimo v izobraževanje o sladkorni bolezni. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, ki z nefarmakološkimi ukrepi niso dosegli zadovoljive urejenosti glikemije, je po slovenskih in tujih smernicah učinkovina prvega izbora metformin. Če ob tem glikemija ni zadovoljivo urejena, je glede na slovenske smernice učinkovina drugega izbora sulfonilsečnina oziroma repaglinid, na tretjem mestu je zaviralec kotransporterja natrijevih ionov in glukoze 2 (SGLT-2, *sodium/glucose cotransporter 2*) ali zaviralec dipeptidil-peptidaze 4 (DPP-4), nato pa se odločamo o uvedbi injektabilnih učinkovin, to je agonist receptorjev za glukagonu podoben peptid 1 (GLP-1) ali inzulin (6). Za razliko od slovenskih smernic so priporočila Ameriškega združenja za diabetes (ADA, *American Diabetes Association*) in Evropskega združenja za proučevanje diabetesa (EASD, *European Association for the Study of Diabetes*) do lanskega leta poleg nefarmakoloških ukrepov kot prvo učinkovino priporočala metformin, v primeru nedoseganja ciljnih vrednosti glikemije pa so priporočili uvedbo katerega koli drugega peroralnega ali injektabilnega antidiabetika. Odločitev o vrsti zdravljenja je potekala individualno in je temeljila na oceni učinkovitosti, tveganju za hipoglikemijo, tveganju za porast telesne mase, možnih neželenih učinkih in ceni zdravlila (5).

Konec leta 2018 sta zgoraj omenjeni združenji izdali nova, spremenjena priporočila za zdravljenje bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2. Slednja temeljijo na rezultatih raziskav na področju srčno-žilne varnosti, ki jih od leta 2008 za anti-diabetike zahteva ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA, *Food and Drug Administration*). Učinkovina prvega

izbora ostaja metformin. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 in aterosklerotično srčno-žilno boleznijo, srčnim popuščanjem ali kronično ledvično boleznijo sedaj kot učinkovino drugega izbora priporočajo uvedbo zaviralca SGLT-2 ali agonista receptorjev GLP-1, ki ima dokazano srčno-žilno korist, ob tem tudi upočasnje napredovanje srčnega popuščanja in/ali kronične ledvične bolezni (mehanizmi so opisani v nadaljevanju). Priporočila tudi poudarjajo, da na prvem mestu ostaja na bolnika osredotočeno vodenje glikemije. Pri izbiri antidiabetika je namreč potrebno presoditi, ali je pri bolniku smiselno zmanjšanje telesne mase, oceniti tveganje za hipoglikemijo, upoštevati ceno zdravljenja in tudi morebitne bolnikove želje ter individualne lastnosti (3, 5).

3 ANTIDIABETIČNE UČINKOVINE Z ZNANIM ZAŠČITNIM DELOVANJEM NA SRČNO-ŽILNI SISTEM

3.1 METFORMIN

Metformin je učinkovina prvega izbora pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2. Učinkovito zniža raven glikiranega hemoglobina (HbA1c) za 1,0–1,5 %. Deluje preko zmanjšanja proizvodnje glukoze v jetih (zavora glukoneogeneze in glikogenolize), povečuje občutljivost jeter in skeletnih mišic za inzulin (zmanjša inzulinsko odpornost), s čimer povečuje privzem glukoze v ta tkiva, ter zmanjša absorpcijo glukoze iz prebavil. Ne povečuje tveganja za hipoglikemijo, ima ugoden učinek na zmanjšanje telesne mase in je poceni. Kombiniramo ga lahko z vsemi drugimi antidiabetiki ter inzulinom. Metformin ima poleg osnovnih učinkov tudi dodatne ugodne, t. i. pleiotropne učinke, ki se izražajo predvsem na srčno-žilnem sistemu (prikazani na sliki 1), pa tudi drugih organih. Neželeni učinki ob zdravljenju z metforminom so redki. Večinoma se pojavljajo ob uvedbi zdravila v obliki prebavnih težav (slabost, driska, bolečine v trebuhu). Ob dolgotrajnem zdravljenju lahko pride do pomanjkanja vitamina B12. Najbolj nevaren neželeni učinek je z metforminom povezana laktacidoza, ki je redka. Do njenega nastanka pride predvsem pri bolnikih, ki imajo napredovalo ledvično ali jetrno bolezen ter pri bolnikih z akutnim srčnim popuščanjem ali pri nekaterih drugih akutnih boleznih. Pri redkih stanjih je kontraindiciran (preobčutljivost, stanje kritično bolnega, napredovale bolezni srca, ledvic in jeter) (7, 8).

Dostopni podatki kažejo, da ima metformin ugodne srčno-žilne učinke pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2. Temeljna raziskava na tem področju je *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), kjer so primerjali vpliv prehrane ali metformina na urejenost glikemije pri podskupini čezmerno prehranjenih bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 (preglednica 1). Pri zdravljenih z metforminom so beležili znižanje s sladkorno boleznijo povezane umrljivosti (za 42 %) in celokupne umrljivosti (za 36 %), manjša je bila tudi pojavnost miokardnega infarkta (za 39 %). Kljub majhnemu številu vključenih bolnikov so zaščitne učinke metformina beležili tudi po 10 letih. Ob zaključku raziskave, ko pomembnega učinka na urejenost glikemije ni bilo več, je vztrajalo zmanjšanje tveganja za miokardni infarkt (za 33 %) ter celokupno umrljivost (za 27 %) (9, 10). V manjši prospektivni randomizirani raziskavi so proučevali vpliv dodatka metformina pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, zdravljenih z inzulinom. Po 4,3 letih spremljanja niso dosegli zmanjšanja primarnega izida (skupno zmanjšanje obolevnosti in umrljivosti zaradi mikrovaskularnih in makrovaskularnih zapletov sladkorne bolezni), beležili pa so pomembno zmanjšanje pojavnosti makrovaskularnih dogodkov (za 39 %; sekundarni izid). Poleg tega so v skupini, zdravljeni z metforminom, opazili večje zmanjšanje telesne mase, boljše urejeno glikemijo in manjšo potrebo po inzulinu (11). Metaanalize ostalih kliničnih raziskav z metforminom so si na opisanem področju nasprotujoče. Nekatere kažejo jasno zmanjšanje srčno-žilnih dogodkov, srčno-žilne umrljivosti in celokupne umrljivosti, druge tega niso pokazale (12).

3.2 ZAVIRALCI KOTRANSPORTERJA NATRIJEVIH IONOV IN GLUKOZE 2 (SGLT-2)

Zaviralci SGLT-2 so najnovejša skupina peroralnih učinkovin za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Delujejo v proksimalnih tubulih ledvic, kjer zmanjšajo reabsorpcijo glukoze in povečajo njeno izločanje z urinom. Slednje vodi v upad koncentracije glukoze v krvi. Učinek je odvisen od izhodiščne koncentracije glukoze – pri višjih koncentracijah je količina z urinom izločene glukoze večja. Ko se koncentracija glukoze v krvi približuje normalni, njihov učinek postopoma izžveneva, zato ne povečajo tveganja za hipoglikemijo. Izkazali so se kot učinkoviti pri zniževanju ravni krvnega sladkorja in telesne mase. V povprečju znižajo HbA1c za 0,69 % in telesno maso za 1–5 kg. Poleg opisanih imajo tudi druge ugodne presnovne učinke, kot so: znižanje koncen-

tracije sečne kisline, znižanje koncentracije trigliceridov, povišanje koncentracije HDL ter znižanje sistolnega in diastolnega krvnega tlaka brez sočasnega porasta srčne frekvence. V številnih raziskavah so pokazali tudi zaščitno delovanje na ledvice (13-15). Najpogostejši neželeni učinki pri zdravljenju z zaviralci SGLT-2 so okužbe urogenitalnega trakta (vulvitis, vulvovaginitis, balanitis in balanopostitis), ki pa jih je možno preprečevati z dobro higieno (16). Povečano pojavnost genitalnih okužb pripisujejo povečanju količine glukoze v urinu, kar spodbuja razrast gliv in omogoča množenje bakterij (17). Zaradi osmotske diureze lahko privedejo tudi do ortostatske hipotenzije, ki je ob dobri hidraciji redka (16, 17). Povečujejo koncentracijo LDL, do 10 %, medtem ko zaradi sočasnega vpliva na koncentracijo HDL ostaja razmerje med LDL in HDL nespremenjeno (14, 18). Ob zdravljenju s kanagliflozinom so opazili povečano pojavnost nizkoenergetskih zlomov (do 23 %) ter do dvakrat povečano tveganje za amputacijo spodnjih okončin (19). V literaturi so opisani tudi primeri pojava evglikemične diabetične ketoacidoze. Slednja je bila najpogostejše opisana pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 ali pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 ob pridruženem sprožilnem dejavniku (akutna bolezen, okužbe, zmanjšan vnos hrane in tekočin, izpuščen odmerek inzulina, kirurški posegi, uživanje alkohola itn.) (17, 20). V namen preprečevanja njenega nastanka je potrebno zaviralec SGLT2 ukiniti 24 ur pred operativnim ali invazivnim posegom, pred večjo telesno aktivnostjo in v primeru akutnega bolezenskega stanja (21). Priporočeno je, da jih ne uvajamo pri bolnikih s karcinomom mehurja (17). Pri bolnikih, zdravljenjih z zaviralci SGLT-2, so se pojavili zelo redki primeri nekrotizirajočega fasciitisa (Fournierjeva gangrena) (22, 23). Med letoma 2013 in 2018 so zabeležili le 12 tovrstnih primerov, vendar glede na to, da gre za življenje ogrožujoče stanje, FDA svetuje previdnost. Zaviralci SGLT-2 so kontraindicirani pri kronični ledvični bolezni z oGF pod 60 mL/min, medtem ko jih je pri oGF pod 45 mL/min potrebno ukiniti (13).

V Sloveniji imamo na voljo dva zaviralca SGLT-2: empagliflozin in dapagliflozin. Ugodno delovanje na srčno-žilni sistem sta v dosedanjih raziskavah pokazala empagliflozin in kanagliflozin (preglednica 1). Tako empagliflozin kot tudi kanagliflozin sta v raziskavah srčno-žilne varnosti statistično značilno znižala pojavnost primarnega opazovanega dogodka, sestavljenega iz srčno-žilne smrti, neusodnega miokardnega infarkta in neusodne možganske kapi (oba za 14 %). Zmanjšala sta delež hospitalizacij zaradi srčnega popuščanja (empagliflozin za 35 % in kanagliflozin za 33 %). Empagliflozin je izkazal tudi zmanjšanje srčno-žilne umrljivosti in umrljivosti iz katerega koli vzroka

(za 32 %) (24, 25). V nedavno objavljeni raziskavi je dapagliflozin pokazal nevtralen učinek na primarni opazovani dogodek, znižal pa je število srčno-žilnih smrti in hospitalizacij zaradi srčnega popuščanja (26). Mehanizmi zaščitnega delovanja zaviralcev SGLT2 na srčno-žilni sistem še niso natančno raziskani, možni pa so hemodinamski učinki (znižanje krvnega tlaka, diuretični učinek – zmanjšanje predobremenitve srca), izboljšanje delovanja endotelija, zmanjšanje togosti arterijske stene, sprememba goriv za srčno mišico (poraba ketonskih teles), zmanjšanje oksidativnega stresa ali kombinacija različnih mehanizmov (slika 1) (17, 19, 27).

3.3 AGONISTI RECEPTORJEV ZA GLUKAGONU PODOBEN PEPTID 1 (GLP-1)

Agonisti receptorjev GLP-1 delujejo preko inkretinskega sistema. Inkretinski učinek nastane v nekaj minutah po zaužitju hranil, ko se v prebavilih sproščajo prebavni hormoni, od katerih sta najpomembnejša od glukoze odvisni inzulinotropni peptid (GIP) in glukagonu podoben peptid 1 (GLP-1). Oba spodbujata izločanje inzulina iz beta-celic trebušne slinavke, dokler je koncentracija krvnega sladkorja nad 4 mmol/L; pri nižjih vrednostih krvnega sladkorja njihov učinek preneha. Iz slednjega je razvidno, da ne povečujejo tveganja za hipoglikemijo. Endogeni GLP-1 se v nekaj minutah razgradi z encimom dipeptidil-peptidazo 4 (DPP-4) (4, 28, 29). Agonisti receptorjev GLP-1 aktivirajo GLP-1 receptorje in so odporni na razgradnjo z encimom DPP-4, kar jim omogoča podaljšano delovanje (4). Preko vpliva na trebušno slinavko izboljšajo urejenost glikemije zaradi povečanja izločanja inzulina in zmanjšanja izločanja glukagona. V povprečju znižajo raven HbA1c za 0,5–1,5 % (29). Receptorji GLP-1 so izraženi tudi v drugih tkivih, med katerimi so najpomembnejša prebavila in osrednje živčevje (29). Agonisti GLP-1 upočasnijo praznjenje želodca in preko vpliva na osrednje živčevje povečajo občutek sitosti. Slednje vodi v zmanjšanje vnosa hranil in posledično znižanje telesne mase, v povprečju za 1–4 kg v nekaj mesecih zdravljenja (4, 29). Poleg ugodnega vpliva na urejenost glikemije imajo tudi druge ugodne učinke: zaščitno delujejo na ledvice in srčno-žilni sistem, imajo zaviralni učinek na aterosklerozo, nekateri predstavniki delujejo zaščitno na centralni živčni sistem, npr. pri možganski kapi (29-31). Med neželenimi učinki lahko v začetnem obdobju zdravljenja povzročijo slabost in bruhanje (4). Agonisti receptorjev GLP-1 povzročajo zmerno povišanje srčne frekvence (v povprečju



za 3–8 utripov/min) (31). V nekaterih raziskavah so beležili povečanje pojavnosti akutnega pankreatitisa in karcinoma trebušne slinavke, česar pa nato v nedavni metaanalizi niso potrdili (29, 32). Zdravljenje z agonisti receptorjev GLP-1 je bilo v nekliničnih raziskavah povezano z večjo pojavnostjo karcinoma ščitnice. Opisali so tudi več zapletov z žolčnimi kamni (29). Pri zdravljenju s semaglutidom je bila večja verjetnost zapletov retinopatije (33).

Klinično je v uporabi šest agonistov receptorjev GLP-1, vse v obliki injektabilnega zdravljenja. Ugoden vpliv na srčno-žilni sistem sta v dosedanjih raziskavah pokazala liraglutid in semaglutid (preglednica 1); eksenatid in liksisenatid pa v primerjavi s placebom nista pokazala razlik v vplivu na srčno-žilne dogodke (4, 29). V raziskavah srčno-žilne varnosti z liraglutidom in semaglutidom je bil primarni opazovani dogodek sestavljen iz srčno-žilne

smrti, neusodnega miokardnega infarkta in neusodne možganske kapi (33, 34). Oba sta povzročila statistično značilno znižanje pojavnosti primarnega opazovanega dogodka (liraglutid za 13 %, semaglutid za 26 %), pri čemer se je za liraglutid pokazalo tudi zmanjšanje srčno-žilne umrljivosti (za 22 %) in umrljivosti iz katerega koli vzroka (za 15 %) (34); pri semaglutidu pa zmanjšanje pojavnosti možganske kapi (za 39 %) (33). V Sloveniji je trenutno na voljo le liraglutid, semaglutid pa bo verjetno na voljo letos. Mehanizmi zaščitnega delovanja agonistov receptorjev GLP-1 na srčno-žilni sistem še niso natančno raziskani, razlagajo pa jih z več mehanizmi: z izboljšanjem delovanja endotelija, z znižanjem krvnega tlaka, s povečanjem viabilnosti kardiomiocitov in krčljivosti levega prekata ter z zaviralnim učinkom na aterosklerozo (slika 1) (4, 30, 35–37).

Preglednica 1: Pregled raziskav, ki so proučevale srčno-žilne izide ob zdravljenju z metforminom, zaviralci SGLT-2 ali agonisti receptorjev GLP-1. Povzeto po (9, 10, 24, 25, 33, 34).

Table 1: An overview of cardiovascular outcome trials with metformin, SGLT-2 inhibitors or GLP-1 receptor agonists. Adapted from (9, 10, 24, 25, 33, 34).

Skupina	Bigvanid	Zaviralec SGLT-2		Agonist receptorjev GLP-1	
Učinkovina	Metformin	Empagliflozin	Kanagliflozin	Liraglutid	Semaglutid
Raziskava	UKPDS – UKPDS80 (9, 10)	EMPA-REG OUTCOME (24)	CANVAS (25)	LEADER (34)	SUSTAIN-6 (33)
Število vključenih bolnikov	1704	7020	10142	9340	3297
Čas spremljanja (let)	6,6	3,1	3,6	3,8	2,1
Primarni opazovani dogodek	- 32 %	- 14%	- 14%	- 13%	- 26%
Srčno-žilna umrljivost	/	- 38%	NS	- 22%	NS
Umrljivost iz kateregakoli vzroka	- 36 %	- 32%	NS	- 15%	NS
Miokardni infarkt	- 39 %	NS	NS	NS	NS
Možganska kap	/	NS	NS	NS	- 39%
Hospitalizacija zaradi srčnega popuščanja	/	- 35%	- 33%	NS	NS

Razlaga kratic: NS – statistično neznačilna razlika; UKPDS – United Kingdom Prospective Diabetes Study; UKPDS80 – 10-letno spremljanje bolnikov iz UKPDS, EMPA-REG Outcome – Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients-Removing Excess Glucose; CANVAS – Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study; LEADER – Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of CV Outcome Results; SUSTAIN-6 – Trial to Evaluate Cardiovascular and Other Long-term Outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes, / – ni bilo proučevano.



Slika 1: Prikaz algoritma izbora antidiabetičnih učinkovin pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 s srčno-žilno ogroženostjo, ki so ga v zadnjih priporočilih predlagala svetovna diabetološka združenja. Prikazani so tudi možni mehanizmi zaščitnega delovanja na srčno-žilni sistem. Poudarjamo, da zgornji pristop v Sloveniji še ni v klinični uporabi. Povzeto po (4, 5, 16, 18, 24, 27, 32-34).

Figure 1: An overview of the treatment algorithm for the selection of antidiabetic drugs in patients with type 2 diabetes with cardiovascular risk, proposed by the American and European diabetes associations. Possible mechanisms of protective cardiovascular effects are also shown. It should be emphasized that the approach presented above has not yet been incorporated into clinical practice in Slovenia. Adapted from (4, 5, 16, 18, 24, 27, 32-34).

Ostale skupine antidiabetikov (sulfonilsečnine, glinidi, zaviralci encima DPP-4 in inzulin) niso pokazale zaščitnega delovanja na srčno-žilni sistem, temveč je bil njihov vpliv nevtralen. Slednje pomeni, da so varni in ne povečajo tveganja za srčno-žilne zaplete.

4 STANJE V SLOVENIJI

V Sloveniji novih priporočil svetovnih diabetoloških združenj še ne moremo upoštevati, saj smo pri predpisovanju

novejših antidiabetikov omejeni s strani Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS). Glede na pravila ZZZS lahko zaviralec SGLT-2 predpiše le diabetolog: a) v kombinaciji z metforminom ali pripravki sulfonilsečnine/repaglinidom oz. v primeru kontraindikacij zanje ali neželenih učinkov, b) kot tretji antidiabetik pri zdravljenju z optimalnimi odmerki metformina in sulfonilsečnine/repaglinida, ko obstaja zadržek za zdravljenje z inzulinom ali c) v kombinaciji z inzulinom in/ali metforminom (6). Agonist receptorjev GLP-1 lahko glede na pravila ZZZS predpišemo: a) bolnikom s sladkorno boleznijo tipa 2 in indeksom telesne mase $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, ob maksimalnih odmerkih dvotirne peroralne terapije ali b) bolnikom, ki

jim je potrebno zdravljenje z insulinom odložiti zaradi narave poklicnega dela.

5 SKLEP

Na tržišču je dostopnih veliko skupin antidiabetikov, vendar so le posamezni predstavniki iz treh skupin pokazali zaščitno delovanje pred srčno-žilnimi zapleti: poleg metformina, ki je že dolga leta steber antidiabetičnega zdravljenja, še empagliflozin in kanagliflozin iz skupine zaviralcev SGLT-2 ter liraglutid in semaglutid iz skupine agonistov receptorjev GLP-1. Na podlagi rezultatov raziskav srčno-žilne varnosti najnovejša priporočila tujih diabetoloških združenj (ADA in EASD) svetujejo, da zdravljenje sladkorne bolezni pri posameznem bolniku prilagodimo glede na njegovo tveganje za srčno-žilne zaplete. V primeru visoke srčno-žilne ogroženosti za metforminom svetujejo predpis enega od zgoraj naštetih antidiabetikov. Dobrobit takšnega zdravljenja, poleg ugodnega učinka na urejenost glikemije in srčno-žilni sistem, najverjetneje dolgoročno prinaša tudi prihranek na državnem nivoju, saj lahko pričakujemo manjšo potrebo po zdravljenju kroničnih zapletov sladkorne bolezni. Zato bi bilo smiselno, da bi se predlagana priporočila tujih diabetoloških združenj v prihodnosti uveljavila tudi v slovenskem prostoru.

6 LITERATURA

1. Lunder M, Janić M, Šabovič M. Prevention of Vascular Complications in Diabetes Mellitus Patients: Focus on the Arterial Wall. *Curr Vasc Pharmacol*. 2019;17(1):6-15.
2. IDF Diabetes Atlas - 8th Edition. 2017 [10.12.2017]; Available from: <http://www.diabetesatlas.org/#>.
3. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Value Health*. 2018 Jul;21(7):881-90.
4. Sposito AC, Berwanger O, de Carvalho LSF, Saraiva JF. GLP-1RAs in type 2 diabetes: mechanisms that underlie cardiovascular effects and overview of cardiovascular outcome data. *Cardiovasc Diabetol*. 2018 Dec 13;17(1):157.
5. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*. 2018 Dec;61(12):2461-98.
6. Zaletel J, Ravnik Oblak M, editors. Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2. 3 ed. Ljubljana: Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Interna klinika UKC Ljubljana in Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Pediatrična klinika Ljubljana; 2016.
7. Janić M, Volčanšek Š, Lunder M, Janež A. Metformin: od mehanizmov delovanja do napredne klinične uporabe. *Zdrav Vestn*. 2017 Apr;86(2):138-57.
8. Lunder M, Janić M, Volčanšek Š, Janež A. Metformin: 60 let učinkovite in varne klinične uporabe v zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2. *Med Razgl*. 2018 Dec;57(4):591-600.
9. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):854-65.
10. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2008 Oct 9;359(15):1577-89.
11. Kooy A, de Jager J, Lehert P, Bets D, Wulflele MG, Donker AJ, et al. Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2009 Mar 23;169(6):616-25.
12. Paneni F, Luscher TF. Cardiovascular Protection in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Review of Clinical Trial Results Across Drug Classes. *Am J Cardiol*. 2017 Jul 1;120(1S):S17-S27.
13. Lunder M, Janić M, Šabovič M, Janež A. Zaviralci SGLT-2: novost v zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2. *Zdrav Vestn*. 2018 Oct;87(9-10):493-505.
14. Storgaard H, Gluud LL, Bennett C, Grondahl MF, Christensen MB, Knop FK, et al. Benefits and Harms of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166125.
15. Chen W, Zhou Y, Kong Z, Wang X, Lv W, Geng Z, et al. The Renoprotective Effects of SGLT2 Inhibitors versus Placebo in Patients with Type 2 Diabetes with or without Prevalent Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2018 Dec 18.
16. Kalra S. Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Ther*. 2014 Dec;5(2):355-66.
17. Vallianou NG, Geladari E, Kazazis CE. SGLT-2 inhibitors: Their pleiotropic properties. *Diabetes Metab Syndr*. 2017 Oct - Dec;11(4):311-5.
18. Kohler S, Zeller C, Iliev H, Kaspers S. Safety and Tolerability of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes: Pooled Analysis of Phase I-III Clinical Trials. *Adv Ther*. 2017 Jul;34(7):1707-26.
19. Rastogi A, Bhansali A. SGLT2 Inhibitors Through the Windows of EMPA-REG and CANVAS Trials: A Review. *Diabetes Ther*. 2017 Dec;8(6):1245-51.
20. Rosenstock J, Ferrannini E. Euglycemic Diabetic Ketoacidosis: A Predictable, Detectable, and Preventable Safety Concern With SGLT2 Inhibitors. *Diabetes Care*. 2015 Sep;38(9):1638-42.
21. Handelsman Y, Henry RR, Bloomgarden ZT, Dagogo-Jack S, DeFronzo RA, Einhorn D, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Position Statement on the Association of Sglit-2 Inhibitors and Diabetic Ketoacidosis. *Endocr Pract*. 2016 Jun;22(6):753-62.



22. Onder CE, Gursoy K, Kuskonmaz SM, Kocer U, Culha C. Fournier's gangrene in a patient on dapagliflozin treatment for type 2 diabetes. *J Diabetes*. 2019 Jan 2.
23. Kumar S, Costello AJ, Colman PG. Fournier's gangrene in a man on empagliflozin for treatment of Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2017 Nov;34(11):1646-8.
24. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015 Nov 26;373(22):2117-28.
25. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondy N, et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017 Aug 17;377(7):644-57.
26. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*. 2018 Nov 10.
27. Lioudaki E, Androulakis ES, Whyte M, Stylianou KG, Daphnis EK, Ganotakis ES. The Effect of Sodium-Glucose Co-transporter-2 (SGLT-2) Inhibitors on Cardiometabolic Profile; Beyond the Hypoglycaemic Action. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Apr;31(2):215-25.
28. Ferjan S, Janež A, Jensterle Sever M. Inkretinski sistem pri sindromu policističnih jajčnikov: novo izhodišče za zdravljenje določenih podskupin presnovno visoko ogroženih bolnic s sindromom policističnih jajčnikov. *Med Razgl*. 2017;56(3):373-84.
29. Andersen A, Lund A, Knop FK, Vilsboll T. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Jul;14(7):390-403.
30. Jojima T, Uchida K, Akimoto K, Tomotsune T, Yanagi K, Iijima T, et al. Liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by enhancing AMP-activated protein kinase and cell cycle regulation, and delays atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*. 2017 Jun;261:44-51.
31. Darsalia V, Nathanson D, Nystrom T, Klein T, Sjöholm A, Patrone C. GLP-1R activation for the treatment of stroke: updating and future perspectives. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014 Sep;15(3):233-42.
32. Storgaard H, Cold F, Gluud LL, Vilsboll T, Knop FK. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and risk of acute pancreatitis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2017 Jun;19(6):906-8.
33. Marso SP, Bain SC, Consoli A, Eliaschewitz FG, Jodar E, Leiter LA, et al. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1834-44.
34. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016 Jul 28;375(4):311-22.
35. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. 2004 Mar 2;109(8):962-5.
36. Koska J, Sands M, Burciu C, D'Souza KM, Raravikar K, Liu J, et al. Exenatide Protects Against Glucose- and Lipid-Induced Endothelial Dysfunction: Evidence for Direct Vasodilation Effect of GLP-1 Receptor Agonists in Humans. *Diabetes*. 2015 Jul;64(7):2624-35.
37. Sun F, Wu S, Guo S, Yu K, Yang Z, Li L, et al. Impact of GLP-1 receptor agonists on blood pressure, heart rate and hypertension among patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015 Oct;110(1):26-37.

ZDRAVLJENJE NEVROPATSKE BOLEČINE KOT ZAPLETA SLADKORNE BOLEZNI

TREATMENT OF PAINFUL DIABETIC NEUROPATHY

AVTOR / AUTHOR:

Sabina Šoštaric, mag. farm.

*Univerzitetni rehabilitacijski inštitut – Soča,
Linhartova 51, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
sabina.sostaric@ir-rs.si

1 UVOD

Nevropatska bolečina je posledica bolezni ali poškodbe v centralnem ali perifernem živčevju (1). Pomembno zmanjša kakovost življenja, povezana je z ekonomskim bremenom tako za zdravstveni sistem kot širšo družbo (2, 3), njeno zdravljenje pa je pogosto neučinkovito (4). Z delovanjem nevrottransmitterjev in drugih snovi, ki so vpleteni v nastanek in vzdrževanje nevropatske bolečine, lahko delno pojasnimo visoko stopnjo komorbidnosti za motnje razpoloženja

POVZETEK

Boleča kronična nevropatija se pri bolnikih s sladkorno boleznijo pojavlja v pogostosti 20 do 30 %. Slabo nadzorovana hiperglikemija poveča tveganje za nevropatijo s posledično nevropatsko bolečino in trofičnimi spremembami v stopalih, kar lahko preprečimo z edukacijo bolnikov. Prvi korak pri obvladovanju boleče diabetične nevropatije je dober nadzor hiperglikemije. Trenutno ne poznamo vzročnega zdravljenja, ki bi ustavilo napredovanje bolezni ali odpravilo nastale spremembe. Cilj zdravljenja je lajšanje simptomov. Antidepresivi, kot so triciklični antidepresivi (amitriptilin) in selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina in noradrenalina (duloksetin, venlafaksin), so učinkoviti pri lajšanju bolečine. Antikonvulzivi (pregabalin, gabapentin) so prav tako pokazali dobre rezultate pri nadzoru bolečinskih simptomov. Učinkovita je tudi uporaba dermalnih lokalnih anestetikov (kapsaicin, lidokain). Uporaba opioidov je sicer pogosta, a ni zaželeno.

KLJUČNE BESEDE:

diabetična periferna nevropatija, fantomska bolečina, nevropatska bolečina, sladkorna bolezen

ABSTRACT

Painful chronic neuropathy in patients with diabetes mellitus ranges from 20-30 %. Poor diabetic control increases the risk of neuropathy with subsequent neuropathic pains and trophic changes in the feet, which can be prevented by education of patients. The first step in the management of painful diabetic neuropathy is a tight glycaemic control. Currently there is no medicine which could halt or reverse the progression of the disease. Most of the therapies prevalent aim at providing a symptomatic relief. Antidepressants like tricyclic antidepressants (amitriptyline) and selective norepinephrine reuptake inhibitors (duloxetine, venlafaxine) have good efficacy in controlling the symptoms. Anticonvulsants including pregabalin and gabapentin have also shown good results in the control of symptoms. Topical agents (capsaicin, lidocaine) have also been used with good results. Use of opioids is although common but is not preferable.

KEY WORDS:

diabetic peripheral neuropathy, neuropathic pain, phantom limb pain, diabetes mellitus



(npr. depresija) in motnje spanja. Poznavanje patofiziologije nam polega tega pomaga razumeti, zakaj so zdravila, ki jih sicer uporabljamo za druge indikacije (npr. antidepresivi, antiepileptiki), učinkovita tudi pri nevropatski bolečini (5). Diabetična periferna nevropatija (DPN) je najpogostejši kronični zaplet sladkorne bolezni, za katero je značilna disfunkcija perifernega živčevja, ki jo diagnosticiramo po izključitvi drugih vzrokov, kot so ledvična insuficienca, periferna žilna bolezen, hipotireoza, pomanjkanje vitamina B12, neželeni učinki zdravil (metformin) ali sistemska vnetna bolezen. Lahko je prisotna že ob ugotovitvi sladkorne bolezni. Gre za posledico presnovne okvare, in sicer predvidevamo, da se zaradi vnetnih in oksidativnih procesov ob hiperglikemiji spremenita zgradba in funkcija mielinskih ovojníc in aksonov (6). DPN je najpogostejša nevropatija v razvitem svetu s prevalenco do 50 %, od katerih jih 20–30 % trpi zaradi nevropatske bolečine (7, 9).

2 BOLEČA DIABETIČNA POLINEVROPATIJA

Najpogostejša oblika DPN je distalna simetrična senzorična in motorična polinevropatija (DSSMPN), in sicer predstavlja približno 85 % diabetičnih nevropatij. Podatki v literaturi so različni, njena prevalenca med sladkornimi bolniki naj bi se gibala med 16–50 %. Do 50 % bolnikov z distalno simetrično polinevropatijo navaja bolečinske simptome, pri 10–20 % so le-ti tako hudi, da jih je potrebno zdraviti (8, 9, 10).

Značilna je simetrična distalna prizadetost **senzoričnega** sistema (vzorec nogavic-rokavic). Simptomi okvare so odrevenelost, mravljinčenje, elektriziranje in so pogosto izrazitejši proti večeru in ponoči. Prevladujejo v stopalih in se s časom širijo navzgor nad gležnja, v roki in v sprednji del trupa. Lahko je prisotna tudi bolečina, ki je najpogostejše pekoča, srbeča, mravljinčava, zbadajoča. Poleg tega so prisotni senzorični znaki, kot je izguba ali zmanjšano zaznavanje zbojlijav in termalnih dražljajev, alodinija (boleč odziv na normalno neboleč dražljaj) in hiperalgezija (okrepljen odziv na normalno boleč dražljaj). Pogosto je zgodaj pridruženo zmanjšano zaznavanje vibracij, z napredovanjem bolezni pa tudi zmanjšano zaznavanje dotika, pritiska in položaja. Okvare **motoričnega** sistema so znak napredovale polinevropatije in povzročajo atrofijo mišic ter mišično šibkost, kar lahko vodi do deformacij stopal in spremenjene mehanike hoje ter poveča tveganje za padce (6, 7, 8).

Raziskave kažejo, da boleča diabetična polinevropatija pomembno poslabša kakovost življenja, saj vpliva na čustveno stabilnost, spanje, voljo do dela, mobilnost in sposobnost za delo (2, 3, 9). Posledice diabetične nevropatije, kot so ulceracije na nogi in kasnejše amputacije, dodatno pomembno vplivajo tako na kakovost življenja kot na stroške (11, 12, 13).

3 PREVENTIVA

Več raziskav je pokazalo, da zgolj povečan nadzor glukoze v krvi ni dovolj za preprečevanje nastanka in napredovanja DPN (14, 15). V zadnjem času z DPN povezujemo srčno-žilne dejavnike tveganja, kot so debelost, dislipidemija, hipertenzija in kajenje pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, ključna dejavnika pa sta tudi trajanje sladkorne bolezni ter glikoziliranaost hemoglobina A1c (HbA1c) kot pokazatelja urejenosti sladkorne bolezni (16–20). Glede na to, da nimamo na voljo vzročnega zdravljenja za DPN, je prepoznavanje dejavnikov tveganja za njen nastanek in njihov uspešen nadzor ključnega pomena za preprečevanje pojava DPN ter zmanjšanje njenih resnih posledic, kot je ulkus, gangrena ali amputacija. Kot preventivni ukrepi so ključni dobro vodenje glikemije, sočasno zdravljenje dejavnikov tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni in terapevtska vadba.

4 ZDRAVLJENJE BOLEČE DIABETIČNE NEVROPATIJE

Bolečino pri diabetični polinevropatiji zdravimo stopenjsko, in sicer po splošnih priporočilih za zdravljenje nevropatske bolečine (8). Nevropatsko bolečino le redko povsem ublažimo. Zdravila, ki so trenutno na voljo za zdravljenje boleče nevropatije, imajo omejeno terapevtsko učinkovitost. Pri 40–60 % bolnikov dosežemo klinično pomembno ublažitev bolečine, kar pomeni zmanjšanje bolečine za 30 % ali za 20 mm na vidni analogni lestvici (VAL). Cilj je zmanjšati bolečino pod 40 mm na VAL-u (21). Pri zdravljenju nevropatske bolečine je poleg farmakoterapije potrebno upoštevati tudi **metode fizikalne medicine** (npr. transkutana električna stimulacija živčevja (TENS), transkranično ma-

gnetno draženje) in **rehabilitacijske tehnike** (npr. kognitivno-vedenjska terapija, relaksacijska tehnika, terapija z ogledalom, akupunktura) in **medicinske posege za zmanjšanje bolečine** (npr. draženje zadnjih stebričev hrbtenjače) (22).

4.1 NEFARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE

Izmed fizikalnih metod sta priporočljiva redna aerobna vadba (23, 24) in električno draženje živcev, npr. TENS (25, 26). Druge fizikalne metode zdravljenja (visokofrekvenčna mišična stimulacija, akupunktura) in draženje zadnjih stebričev hrbtenjače so pogojno učinkovite (27, 28).

4.2 FARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE

4.2.1 Učinkovine prve izbire

Posodobljene smernice (6, 7, 8, 29, 30, 31) priporočajo za prvo izbiro zdravljenja triciklične antidepresive (amitriptilin), antidepresive, ki zavirajo privzem serotonina in noreadrenalina (duloksetin in venlafaksin) in antiepileptike, ki so analogi gama-aminomaslene kisline (pregabalin in gabapentin). Izmed naštetih imata indikacijo za zdravljenje nevropatske bolečine le duloksetin in pregabalin, ki sta tudi najbolj proučevani učinkovini za diabetično nevropatijo. Cochranov pregled, objavljen v letu 2017, o učinkovitosti venlafaksina za zdravljenje nevropatske bolečine kaže malo dokazov za njegovo uporabo. Izkazal se je sicer kot učinkovitega v nekaterih raziskavah, vendar imajo le-te določene metodološke omejitve. (35)

4.2.2 Učinkovine druge izbire

Priporočila vključujejo med učinkovine druge izbire šibki opioid tramadol, tramadol v kombinaciji s paracetamolom, lidokainske obliže in kapsaicinske obliže. Medtem ko obliža delujeta lokalno, tramadol deluje sistemsko in ga lahko uporabljamo tudi za bolečino, ki ni perifernega izvora.

4.2.3 Učinkovine tretje izbire

Močne opioide po novem zaradi visokega tveganja za odvisnost uvrščamo med učinkovine tretje izbire, medtem ko so jih v predhodnih priporočilih uvrščali med učinkovine prve ali druge izbire (21, 32). Najbolj proučevana med njimi sta oksikodon in morfin, o tapentadolu pa najdemo različna priporočila (6, 29). Tako kot za venlafaksin tudi za morfin Cochranov pregled iz leta 2017 navaja, da ni prepričljivih dokazov, da bi bil morfin učinkovit pri dolgoročnem lajšanju nevropatske bolečine. Dobrih dokazov o visoki stopnji anal-

gezije (vsaj 50-odstotno zmanjšanje bolečine) ni pri raziskavah, ki so trajale vsaj 12 tednov, kar pa ne izključuje možnosti, da nekaterim bolnikom morfin učinkovito lajša bolečino (36). Kot učinkovina tretje izbire je možna tudi aplikacija botulinjskega toksina A, a le v specialističnem okolju, priporočilo za zdravljenje periferne nevropatske bolečine pa je šibko (29). Če učinkovina prve izbire v zadostnem odmerku in po zadostnem času jemanja nima želenega terapevtskega učinka, jo lahko zamenjamo z drugo učinkovino prve izbire ali dodamo učinkovino druge izbire. Kombiniramo učinkovine z različnim farmakološkim učinkom (npr. antidepresiv in antiepileptik in ne dva antidepresiva hkrati). Možno je tudi uporabiti kombinacijo dveh učinkovin iz skupine prve izbire že na začetku zdravljenja. Če z učinkovinami prve izbire ne dosežemo zadostnega zmanjšanja bolečine, uvedemo ali dodamo učinkovine druge in nato tretje izbire. Če je potrebno, bolnika napotimo v specializirano protibolečinsko ali nevrološko ustanovo za uporabo drugih metod (npr. biopsihosocialna rehabilitacija, kognitivno-vedenjska terapija, aplikacija zdravil v specialističnih ambulantah). Odmerki učinkovin, neželeni učinki in opozorila so navedeni v preglednicah 1 in 2.

4.2.4 Patogenetsko zdravljenje

Glede na znano pomembnost oksidativnega stresa v osnovni endotelijski disfunkciji in mikrovaskularnih zapletih pri DPN, bi pričakovali, da bi bili antioksidanti ena izmed možnosti vzročnega zdravljenja. V maščobah topen derivat vitamina B1 (tiamina) **benfotiamin** se v organizmu fosforilira v biološko aktivni tiamin difosfat (TDP) in tiamin trifosfat (TTP). Kot koencim je TDP vpleten v presnovo ogljikovih hidratov in preprečuje nastanek končnih produktov pospešene glikacije ter na ta način zmanjšuje poškodbe, ki jih povzroči hiperglikemija, in posledično nevropatske senzorične simptome. O učinkovitosti derivata vitamina B1 pri diabetični nevropatiji so si rezultati raziskav nasprotujoči (33, 38-41) in raziskovalci poudarjajo potrebo po nadaljnjih raziskavah o potencialu benfotiamina pri zdravljenju zapletov ožilja in sladkorne bolezni.

O učinkovitosti tioktinske kisline najdemo več podatkov. **Tioktinska kislina** je naravna ditiolna spojina, ki se encimsko sintetizira v mitohondriju iz oktanojske kisline. Deluje močno antioksidativno in izboljša simptome in znake DSSMPN (34, 42-45). Drugo pomembno vlogo ima na področju prevajanja celičnih signalov, v svoji reducirani obliki aktivira receptorje za insulin, kar sproži translokacijo glukoznih transporterjev iz citoplazme na površje celice. Po osmih tednih njenega jemanja se je povečala občutljivost tkiv na insulin ter znižala koncentracija glukoze v plazmi

na tešče in po jedi (46, 47). Ob tem je potrebno krvni sladkor spremljati in prilagoditi odmerke zdravil za sladkorno bolezen, če je to potrebno. Drugih pomembnih neželenih učinkov ne navajajo, pogosto pa se lahko pojavi slabost ali omotica (48). V primeru hudih nenavadnih občutij v koži lahko zdravljenje uvedemo sprva intravensko, nato nadaljujemo peroralno. Maksimalni dnevni odmerek je 600 mg.

Tioktinska kislina je kelator kovinskih ionov, zato je ne smemo uporabljati sočasno s spojinami, ki vsebujejo kovinske ione (npr. pripravki z dvovalentnimi ioni, kot so železo, magnezij, ter mlečni izdelki zaradi vsebnosti kalcija). Sočasno jemanje s hrano lahko zmanjša absorpcijo tioktinske kisline, zato priporočamo jemanje na prazen želodec (48).

Preglednica 1: Učinkovine za zdravljenje boleče diabetične nevropatije in odmerki (6,29,30).

Table 1: Treatment for pain associated with diabetic neuropathy (6,29,30).

STOPNJA PRIPOROČILA	TIP UČINKOVINE	UČINKOVINA	ZAČETNI ODMEREK	POVEČEVANJE ODMERKA	NAJVEČJI ODMEREK	TRAJANJE PREIZKUŠANJA (za 1. izbira)
1. izbira	Triciklični antidepresivi	amitriptilin	10–25 mg	10–25 mg na 3–7 dni	150 mg (pri starostnikih 75 mg)	6–8 tednov, 2 tedna na odmerku večjem od 40 mg
	Zaviralci privzema serotonina in noradrenalina	duloksetin	60 mg	60 mg po 4 tednih	120 mg	4 tedne
		venlafaksin	37,5 mg enkrat ali dvakrat dnevno	75 mg na teden	225 mg dnevno	4–6 tednov
	Antiepileptiki (analogi GABA)	pregabalin	50–75 mg enkrat ali dvakrat dnevno ALI začeti z nižjim odmerkom 25 mg zvečer 2 dni	50–150 mg na 3–7 dni ALI počasnejša titracija: 25 mg dvakrat dnevno 2 dni, nato 25 + 50 mg	600 mg dnevno (dvakrat 300 mg dnevno)	4 tedne
		gabapentin	100–300 mg zvečer ali 100–300 mg trikrat dnevno	100–300 mg trikrat dnevno na 3–7 dni	3600 mg dnevno (trikrat 1200 mg)	3–8 tednov, 2 tedna na največjem odmerku
2. izbira	Šibki opioidi	tramadol	50 mg, enkrat do dvakrat dnevno	povečevati počasi po 50 mg do 200–400 mg v deljenih odmerkih	400 mg, v 2 (s podaljšanim sproščanjem) ali 3 deljenih odmerkih	
		tramadol s paracetamolom	začetno 37,5 mg/325 mg dvakrat dnevno + po potrebi	povečevati za 37,5 mg/325 mg do največ 8 tbl (300 mg tramadola/2600 mg paracetamola), med odmerki vsaj 6 ur		
		5% lidokainski obliž*	do 3 obliže za 12 ur			
		8% kapsaicinski obliž**	do 4 obliže za 30–60 min na 3 mesece			

3. izbira	Močni opiodi	oksikodon SR	10 mg dvakrat dnevno	povečevati počasi do 40 mg dvakrat dnevno	120 mg	individualna titracija, (nimajo učinka zgornje meje)
		morfin	15 mg dvakrat dnevno (oblika s podaljšanim sproščanjem)***	povečevati počasi do 60 mg dvakrat dnevno	180 mg	individualna titracija (nimajo učinka zgornje meje)
		Botulin toksin A, s.c.****	50–200 enot v boleče področje, vsake 3 mesece			

*Omejitev predpisovanja:

Le za zdravljenje bolnikov s postherpetično bolečino, kadar je izčrpano zdravljenje z ostalimi zdravili in fizikalnimi metodami oziroma kadar zdravljenje s peroralnimi zdravili ni možno.

**Omejitev predpisovanja:

1. Le za zdravljenje bolnikov s periferno nevropatsko bolečino, največ dva obliža na aplikacijo, kadar zdravljenje z ostalimi zdravili in fizikalnimi metodami ni dovolj učinkovito oz. kadar tako zdravljenje ni možno.

2. Zdravilo se financira v okviru specialistične zunajbolnišnične dejavnosti. ZZ – Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo pa uporabljamo samo v javnih zdravstvenih zavodih ter pri pravnih in fizičnih osebah, ki opravljajo zdravstveno dejavnost.

***V Sloveniji na voljo le oblika s takojšnjim sproščanjem, oblika s podaljšanim sproščanjem ima status zdravila z začasnim dovoljenjem za vnos/uvoz s seznama esencialnih zdravil ali nujno potrebnih zdravil in se uporablja, kadar z zdravili z dovoljenjem za promet ni mogoče doseči enakovrednih terapevtskih izidov.

****Omejitev predpisovanja:

1. Le za zdravljenje: 1.1. spastičnega tortikolisa pri odraslih, 1.2. blefarospazma pri odraslih, 1.3. hemifacialnega spazma pri odraslih, 1.4. spastičnosti roke pri možganski kapi pri odraslih, 1.5. dinamičnega ekvinusa noge zaradi spastičnosti pri pokretnih otrocih s cerebralno paralizo, starih 2 leti ali starejših. 1.6. Za odrasle bolnike z urinsko inkontinenco zaradi idiopatskega prekomerno aktivnega sečnega mehurja ali nevrogenega prekomerno aktivnega detruzorja. 2. Zdravilo se financira v okviru specialistične zunajbolnišnične dejavnosti za določene klinike.

Preglednica 2: Neželeni učinki in opozorila (6, 51, 52).

Table 2: Adverse reactions and alerts (6, 51, 52).

TIP UČINKOVINE	UČINKOVINA	POGOSTI NEŽELENI UČINKI	PREVIDNOST, OPOZORILA
Triciklični antidepresivi	amitriptilin	sedacija, zaspanost, vrtoglavica, antiholinergični neželeni učinki, porast telesne mase, motnje ritma, hipotenzija	začetni EKG pri bolnikih nad 40 let in redni pri odmerkih nad 150 mg, spremljanje srčnega ritma pri povečevanju odmerka, nadzor telesne mase, previdno pri povišanem intraokularnem tlaku
Zaviralci privzema serotonina in noradrenalina	duloksetin	slabost, zaprtje, bolečine v trebuhu, dispepsija, glavobol, suha usta, povišan krvni tlak, zaspanost, vrtoglavica	nadzor krvnega tlaka po 1. mesecu terapije, kadilci imajo za 50 % manjšo plazemsko koncentracijo, sočasno zdravljenje s zaviralci MAO, fluvoksaminom, <u>ciprofloksacinom</u> , enkosacinom kontraindicirano, previdno pri povišanem intraokularnem tlaku
	venlafaksin	slabost, dispepsija, suha usta, hipertenzija pri visokih odmerkih, zaspanost, vrtoglavica	pozor pri srčnih bolnikih (tveganje za aritmije), spremljanje krvnega tlaka in srčne frekvence, previdno pri povišanem intraokularnem tlaku
Antiepileptiki (analogi GABA)	pregabalin	omotica, somnolenca, glavobol,	spremljanje telesne mase, zmanjšati odmerke pri bolnikih z ledvično insuficienco
	gabapentin	zmedenost, razdražljivost, zaprtje, porast apetita, periferni edemi	

Šibki opioidi	tramadol	slabost, bruhanje, dispepsija, zaprtje, zaspanost, vrtoglavica, glavobol	ne uporabljati tramadola pri bolnikih, ki so nagnjeni k odvisnosti, previdno pri sočasni uporabi tramadola z antidepresivi (SSRI), nevroleptiki, sedativi, anksiolitiki, previdno pri epilepsiji
	5% lidokainski obliž	lokalni eritem, srbečica, izpuščaj	ugoden varnostni profil
	8% kapsaicinski obliž**	bolečina v okončini, pekoč občutek, bolečina na mestu aplikacije, eritemi, otekline in draženje na mestu aplikacije	previdno pri bolnikih z zmanjšanim zaznavanjem v stopalih in bolnikih z večjim tveganjem za takšne spremembe senzorične funkcije
Močni opioidi	oksikodon SR	slabost, bruhanje, zaprtje, vrtoglavica, zaspanost, srbenje, potenje	razvije se toleranca in odvisnost, zato je pred uvedbo potrebno oceniti tveganja in koristi za posameznega bolnika
	morfin		
	Botulin toksin A, s.c.	bolečina na mestu aplikacije	lahko se pojavi prekomerna oslabeledost mišic

5 FANTOMSKA BOLEČINA

Če zapleti sladkorne bolezni privedejo do amputacije, se pri bolniku lahko pojavi fantomska bolečina, ki je resnično občutena bolečina v amputirani okončini. Mehanizmov nastanka fantomske bolečine je več. Po eni izmed teorij naj bi jo povzročala živčna vlakna, odgovorna za občutke amputirane okončine, ki so ostala v glavnem živcu. Z draženjem neizoliranih živcev v štrclju nastanejo občutki, ki jih možgani interpretirajo kot bolečino, in to naprej projicirajo v neobstoječo okončino (37). Pri zdravljenju fantomske bolečine uporabljamo ista zdravila kot pri zdravljenju nevropatske bolečine, ob tem pa imajo veliko vlogo tudi nefarmakološke metode (npr. različne vrste nevromodulacije, TENS, masaža, kognitivno-vedenjske tehnike, *biofeedback*). Ena izmed preprostih in učinkovitih nefarmakoloških metod je terapija z ogledalom, kjer bolnik v sklopu terapije čuti imaginarne premike amputirane noge preko zdrave okončine s pomočjo ogledala (51, 52). Pri tem gre za delovanje zrcalnega nevrona v možganski skorji, ki se aktivira pri gibih ali pričakovanih gibih nasprotne okončine in v tem kontekstu lahko bolnik čuti fantomsko bolečino tudi v zdravi okončini.

6 SKLEP

Pri izbiri načina zdravljenja bolečine pri boleči diabetični periferni nevropatiji se odločamo individualno za vsakega bolnika v okviru priporočil in pri tem upoštevamo potencialne neželene učinke zdravil in kontraindikacije, njegovo starost ter spremljajoče bolezni, ostalo redno farmakoterapijo, morebitne probleme z duševnim zdravjem (depresija, anksioznost) in bolnikove želje in življenjski slog. Uspešna farmakološka terapija nevropatske bolečine v sklopu diabetične nevropatije je povezana s povečano kakovostjo življenja bolnikov s sladkorno boleznijo in manjšimi celokupnimi stroški bolezni. Poleg zdravljenja z zdravili pa je potrebno upoštevati tudi preventivne ukrepe in metode fizikalne in rehabilitacijske medicine.

7 LITERATURA

1. IASP Terminology. <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Neuropathicpain>. Dostop 2. 2. 2019.



2. Liedgens H, Obradovic M, De Courcy J et al. A burden of illness study for neuropathic pain in Europe. *Clinicoecon Outcomes Res* 2016; 8:113-26.
3. Schaefer C, Sadosky A, Mann R et al. Pain severity and the economic burden of neuropathic pain in the United States: BEAT Neuropathic Pain Observational Study. *Clinicoecon Outcomes Res* 2014; 6:483-96.
4. Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 2014; 348:f7656.
5. Ludman T, Bouhassira D, Baron R et al. Neuropathic pain. *Nature Reviews. Disease Primers* 2017; 3, Article number: 17002.
6. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman E L et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017; 40:136-54.
7. Juster-Swityk K, Smith AG. Updates in diabetic peripheral neuropathy. *F1000Res*. 2016; 5:F1000 Faculty Rev-738.
8. Urbančič V, Pražnikar A. Diabetična nevropatija. <http://endodiab.si/wp-content/uploads/sites/2/2015/12/16.-Diabeti%C4%B3Dna-nevropatija.pdf>. Dostop 10. 2. 2019.
9. Davies M, Brophy S, Williams R et al. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29(7):1518-22.
10. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T et al. Neuropathic pain in diabetes, prediabetes and normal glucose tolerance: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Pain Med* 2009;10(2):393-400.
11. Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. (1995) Chapter 18. Lower Extremity Foot Ulcers and Amputations in Diabetes.
12. Driver VR, Fabbi M, Lavery LA et al. The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team. *J Am Podiatr Med Assoc* 2010; 100(5):335-41.
13. Foot Care in Diabetes: The Human and Financial Cost. <http://www.londonscn.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/04/dia-foot-care-mtg-kerr-27042017.pdf>. Dostop 16. 2. 2019.
14. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL et al. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 6:CD007543.
15. Callaghan BC, Hur J, Feldman EL. Diabetic neuropathy: one disease or two? *Curr Opin Neurol* 2012; 25:536-41.
16. Costa LA, Canani LH, Lisboa HR et al. Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21:252-55.
17. Bonadonna R, Cucinotta D, Fedele D et al. The metabolic syndrome is a risk indicator of microvascular and macrovascular complications in diabetes: results from Metascreen, a multicenter diabetes clinicbased survey. *Diabetes Care* 2006; 29:2701-07.
18. Smith AG, Singleton JR. Obesity and hyperlipidemia are risk factors for early diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications* 2013; 27:436-42.
19. Isomaa B, Henricsson M, Almgren P et al. The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:1148-54.
20. Yang CP, Lin CC, Li CI et al. Cardiovascular Risk Factors Increase the Risks of Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: The Taiwan Diabetes Study. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(42):e1783.
21. Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J. Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clin Proc* 2010; 85(3 Suppl): S3-S14.
22. Akyuz G, Kenis O. Physical Therapy Modalities and Rehabilitation Techniques in the Treatment of Neuropathic Pain. *Int J Phys Med Rehabil* 2013; 1-4.
23. Balducci S1, Iacobellis G, Parisi L. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Complications* 2006; 20(4):216-23.
24. Praet SFE, van Loon LJC. Exercise therapy in Type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2009; 46: 263-78.
25. Somers DL, Somers MF. Treatment of neuropathic pain in a patient with diabetic neuropathy using transcutaneous electrical nerve stimulation applied to the skin of the lumbar region. *Phys Ther* 1999; 79:767-75.
26. Dubinsky RM, Miyasaki J. Assessment: efficacy of transcutaneous electric nerve stimulation in the treatment of pain in neurologic disorders (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2010; 74: 173-6.
27. Abuaisha BB, Costanzi JB, Boulton AJ. Acupuncture for the treatment of chronic painful peripheral diabetic neuropathy: a long-term study. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 39:115-21.
28. de Vos CC, Rajan V, Steenbergen W, van der Aa HE et al. Effect and safety of spinal cord stimulation for treatment of chronic pain caused by diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications* 2009; 23: 40-5.
29. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2015; 162-73.
30. Bril V, Breiner A, Perkins BA et al. 2018 Clinical Practice Guidelines Neuropathy Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. *Can J Diabetes* 2018; 42:S217-21.
31. NICE Guidelines. Neuropathic pain in adults: pharmacological management in nonspecialist settings. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg173>. Dostop 14. 2. 2019.
32. Attal N, Cruccu G, Baron R. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 2010; 17(9):1113-e88.
33. Fraser DA, Diep LM, Hovden IA. The effects of long-term oral benfotiamine supplementation on peripheral nerve function and inflammatory markers in patients with type 1 diabetes: a 24-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 2012; 35(5):1095-7.
34. Garcia-Alcala H, Santos Vichido CI, Islas Macedo S et al. Treatment with α -Lipoic Acid over 16 Weeks in Type 2 Diabetic Patients with Symptomatic Polyneuropathy Who Responded to Initial 4-Week High-Dose Loading. *Journal of Diabetes Research* 2015; 2015: 189857.
35. Gallagher HC, Gallagher RM, Butler M et al. Venlafaxine for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015; 8: CD011091.
36. Cooper TE, Chen J, Wiffen PJ et al. Morphine for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017; 5: CD011669.
37. Subedi B, Grossberg GT. Phantom Limb Pain: Mechanisms and Treatment Approaches. *Pain Res Treat* 2011; 2011: 864605.
38. Winkler G, Pál B, Nagybégyi E et al. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung* 1999; 49(3):220-4.
39. Trippe BS, Barrentine LW, Cuore MV et al. Nutritional management of patients with diabetic peripheral neuropathy with L-methylfolate-methylcobalamin-pyridoxal-5-phosphate: results of a real-world patient experience trial. *Curr Med Res Opin* 2016; 32(2):219-27.

40. Serhiyenko V, Hotsko M, Snitynska O. Benfotiamine and Type 2 Diabetes Mellitus. *MOJ Public Health* 2018; 7(1): 00200.
41. Stirban A, Tesfaye S, Gurieva I et al. Benfotiamine: Commentary and Update on Recent Studies. *Diabetes, Stoffwechsel und Herz* 2014; 23(4):203-6.
42. Reljanovic M, Reichel G, Rett K et al. Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (a-lipoic acid): a two year multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial (ALADIN II). *Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Free Radical Researc* 1999; 31:171-9.
43. Bril V, England J, Franklin GM et al. American Academy of Neurology; American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine; American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. Evidence-based guideline: treatment of painful diabetic neuropathy: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 2011; 76: 1758-65.
44. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ et al. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant a-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 1995;38:1425-33.
45. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant a-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. *Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Diabetes Care* 1999; 22:1296-301.
46. Ansar H, Mazloom Z, Kazemi F et al. Effect of alpha-lipoic acid on blood glucose, insulin resistance and glutathione peroxidase of type 2 diabetic patients. *Saudi Med J.* 2011;32:584-8.
47. Kamenova P. Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of a-lipoic acid. *Hormones* 2006;5:251-8.
48. Povzetek glavnih značilnosti. Thiogamma. www.cbz.si. Dostop 25. 2. 2019.
49. Aleš Pražnikar. Klinični pristop k zdravljenju nevropatske bolečine. 2018.
50. Urbanc M, Locatelli I. Zdravila za zdravljenje nevropatske bolečine. *Farm vestn* 2016; 67:325-32.
51. Chan BL, Witt R, Charrow AP et al. Mirror therapy for phantom limb pain. *N Engl J Med* 2007; 357(21):2206-7.
52. Kim SY, Kim YY. Mirror therapy for phantom limb pain. *Korean J Pain* 2012; 25(4):272-4.

MEHANIZMI RAZVOJA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM

UNDERSTANDING THE MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Nace Zidar, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: nace.zidar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Odkritje antibiotikov je v številnih pogledih spremenilo sodobno medicino in velja za enega največjih znanstvenih dosežkov vseh časov (1). V prvih desetletjih po odkritju penicilina so zaradi intenzivnih raziskav odkrili večino strukturnih razredov protibakterijskih učinkovin, ki so v uporabi še da-

POVZETEK

Hitro širjenje bakterijske odpornosti proti uveljavljenim antibiotikom predstavlja eno izmed največjih groženj za javno zdravje. Vzroki za pomanjkanje učinkovitih antibiotikov na trgu so v veliki meri povezani z njihovo neustrezno uporabo in manjšim številom novih odobrenih učinkovin. Bakterije lahko odpornost proti antibiotikom razvijejo na dva načina, z mutacijo genov, ki so povezani z delovanjem antibiotika, ali s privzemom tuje DNA, ki vsebuje zapis za gene, odgovorne za razvoj odpornosti. Obstaja več mehanizmov za razvoj odpornosti, med katere spadajo otežen dostop antibiotika do tarče, sprememba strukture tarče ali neposredna sprememba strukture antibiotika. Poznavanje teh mehanizmov je ključnega pomena za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin, pri uporabi katerih bi bil razvoj odpornosti manj verjeten. Zaradi splošne uveljavljenosti izraz antibiotik v članku uporabljamo kot sopomenko za protibakterijsko učinkovino.

KLJUČNE BESEDE:

antibiotik, bakterijska odpornost, izlivna črpalka, mutacija, protibakterijska učinkovina,

ABSTRACT

Occurrence of resistance of the most prevalent bacterial pathogens to antibiotics is one of the major threats to public health. The main reasons for the lack of effective antibiotics have been the misuse of those agents and the unavailability of newer drugs. Bacteria adapt to antibiotics using two main strategies: with mutations of genes that are associated with the action of antibiotics or with the acquisition of foreign DNA coding for such genes. There are several mechanisms for the development of antibiotic resistance, which include prevention of access to drug targets, changes in the structure of antibiotic targets and direct modification of antibiotic structures. It is important to understand these mechanisms in order to successfully design new antibacterial drugs with a lower probability for resistance development. Because the terms have become interchangeable, for the purpose of this article, the term antibiotic is used as a synonym for an antibacterial drug.

KEY WORDS:

antibacterial drug, antibiotic, bacterial resistance, efflux pump, mutation



nes, kot so cefalosporini, makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi, glikopeptidi in kloramfenikol (2). V 60. letih prejšnjega stoletja je veljalo prepričanje, da lahko večino nalezljivih bolezni nadzorujemo z obstoječimi učinkovinami in da zato razvoj novih protibakterijskih učinkovin ni več potreben. Množična uporaba antibiotikov je v nadaljnjih letih povzročila razvoj bakterijskih sevov, ki izkazujejo odpornost proti posameznim ali več različnim antibiotikom, t. i. multirezistentnih (MDR, *multidrug-resistant*) in zelo rezistentnih (XDR, *extensively drug-resistant*) bakterijskih sevov. Med najbolj problematične odporne patogene bakterije spadajo npr. na meticilin odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA), na vankomicin odporni enterokoki (VRE) (3) in nekatere po Gramu negativne bakterije, ki so odporne proti večini antibiotikov, npr. *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* in *Escherichia coli* (5, 6). Zaradi okužb s proti antibiotikom odpornimi bakterijami umre na leto okoli 700.000 ljudi (7). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, *World Health Organisation*) je označila bakterijsko odpornost za eno izmed treh največjih groženj za javno zdravje v 21. stoletju (8). Na hiter razvoj bakterijske odpornosti v veliki meri vplivajo neustrezno in prekomerno predpisovanje antibiotikov, njihovo nepravilno jemanje s strani pacientov in uporaba v preventivne namene v veterini. Z množično uporabo antibiotikov izvajamo selekcijski pritisk, ki pospešuje nastanek oz. rast odpornih bakterijskih sevov. Na hitrost nastanka odpornosti vpliva več dejavnikov, kot so velikost bakterijske populacije, stabilnost in sestava okolja, prilagojenost bakterij na okolje in pomen mutacije za preživetje bakterij (9, 10).

2 NARAVNA IN PRIDOBLENA ODPORNOST

Bakterije so naravno odporne proti antibiotikom ali pa odpornost pridobijo preko mutacij v genih ali s horizontalnim prenosom genov. Naravna odpornost določenih bakterijskih sevov proti antibiotikom je posledica njihove značilne zgradbe ali fizioloških funkcij. Primer je naravna odpornost nekaterih po Gramu negativnih bakterij proti učinkovinam, ki ne morejo prehajati zunanje membrane teh bakterij. To je značilno npr. za glikopeptidni antibiotik vankomicin, ki je aktiven le na po Gramu pozitivne bakterije (11). K naravni odpornosti številnih po Gramu negativnih bakterij pripomorejo tudi izlivne črpalke, ki številne antibiotike aktivno črpajo iz bakterijskih celic.

Pridobljena odpornost je značilna le za nekatere seve znotraj vrste ali rodu in nastane zaradi mutacij v genih za tarčo antibiotika ali zaradi prenosa genetske informacije med bakterijami s plazmidi (krajšimi krožnimi izvenkromosomskimi segmenti DNA) ali transpozoni (odseki DNA, ki se s transpozicijo prenašajo z enega dela kromosomske DNA na drugega ali s kromosomske DNA na plazmid). Za razvoj odpornosti je navadno potrebnih več točkovnih mutacij, njihova pogostost pa se ob izpostavljenosti antibiotikom poveča. Bolj razširjena kot točkovne mutacije je odpornost, ki nastane zaradi vertikalnega prenosa genov preko bakterijskega kromosoma iz generacije v generacijo ali s horizontalnim prenosom dednega materiala med bakterijami. Plazmidi se lahko med bakterijami prenašajo skozi cevasto tvorbo, imenovano pilus, čemur pravimo konjugacija. Drugi možen način za prenos dednega materiala med bakterijami je transdukcija, tj. prenos DNA preko bakteriofagnega vektorja. Bakterije lahko v svoj genom vključijo tudi golo DNA iz okolice, kar imenujemo transformacija (12). Dobro razvita sposobnost izmenjevanja dednega materiala v kombinaciji z izjemno hitrim razmnoževanjem bakterijam omogoča, da se zanje ugodne spremembe v populaciji zelo hitro razširijo.

3 MEHANIZMI RAZVOJA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI

Ločimo štiri glavne mehanizme, po katerih bakterije razvijejo odpornost proti protibakterijskim učinkovinam: zmanjšanje prepustnosti zunanje bakterijske membrane, aktivno črpanje antibiotikov iz bakterijske celice s pomočjo izlivnih črpalk, sprememba tarčnega mesta za antibiotik in razvoj encimov, ki razgradijo ali spremenijo strukturo antibiotika.

3.1. ZMANJŠANJE PREPUSTNOSTI ZUNANJE BAKTERIJSKE MEMBRANE

Številni antibiotiki, ki jih uporabljamo v kliniki, delujejo na tarče, ki se nahajajo v notranjosti bakterijske celice, zaradi česar morajo učinkovine najprej preiti skozi bakterijsko ovojnico. Zaradi kompleksne zgradbe njihove zunanje membrane so po Gramu negativne bakterije in mikobakterije naravno odporne proti številnim antibiotikom. Zunanja membrana teh bakterij deluje kot zaščita pred vdorom zanje toksičnih snovi iz okolice, med katere spadajo tudi antibiotiki.

Primer antibiotika, ki ni učinkovit proti po Gramu negativnim bakterijam zaradi nezmožnosti prehajanja zunanje membrane, je glikopeptid vankomicin. Nekatere majhne hidrofilne molekule lahko prehajajo v celico po Gramu negativnih bakterij s prosto difuzijo skozi z vodo napolnjene kanale, imenovane porini. Med takšne spojine uvrščamo β -laktamske antibiotike, tetracikline in nekatere fluorokinolone. Bakterije lahko omejijo prehajanje teh antibiotikov v celico s spremembo nivoja izražanja porinov ali z mutacijami v genih za porine (13). Primer odpornosti, ki nastane zaradi spreminjenega izražanja porinov, je odpornost bakterije *K. pneumoniae* proti β -laktamskim antibiotikom. Primerjava bakterijskih sevov pred terapijo z β -laktamskimi antibiotiki in po njej je pokazala, da je po terapiji prišlo do povečanega izražanja porinov, ki so imeli manjšo velikost por, zaradi česar so bakterije postale manj dovzetne za antibiotike (14).

3.2. AKTIVNO ČRPANJE ANTIBIOTIKOV IZ BAKTERIJSKE CELICE

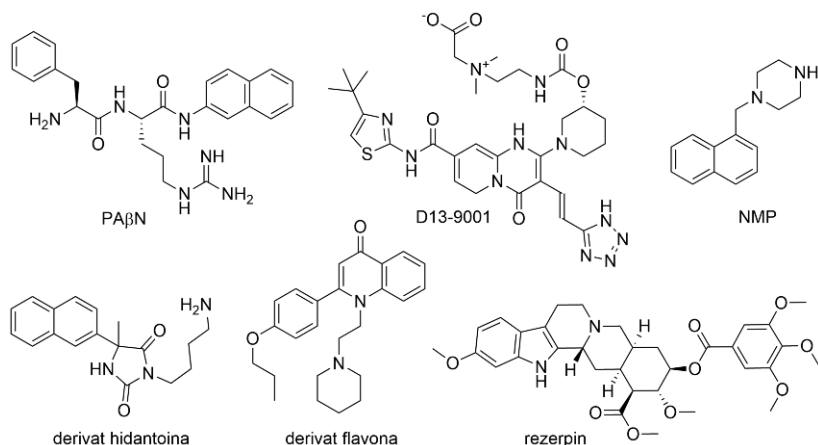
Antibiotike lahko bakterijske celice aktivno odstranjujejo s pomočjo izlivnih črpalk (15, 16). Ta mehanizem odpornosti je bolj izražen pri po Gramu negativnih bakterijah, vendar je značilen tudi za nekatere po Gramu pozitivne bakterije. Kot vir energije izlivne črpalke uporabljajo energijo, ki jo dobijo iz gradienta ionov – najpogosteje protonov ali natrijevih ionov – oz. s pomočjo hidrolize ATP. Nekatere izlivne črpalke so delno specifične za določen substrat, številne pa prenašajo strukturno različne spojine. Geni za izlivne črpalke so lahko del bakterijskega kromosoma ali pa se med bakterijami prenašajo s plazmidi, zaradi česar se odpornost med bakterijami hitro širi.

Eden izmed najbolj raziskanih predstavnikov izlivnih črpalk je sistem AcrAB-TolC, ki ga najdemo v bakteriji *E. coli* (17, 18). S to črpalko bakterije aktivno odstranjujejo številne antibiotike, barvila, površinsko aktivne snovi in težke kovine. Črpalke je zgrajena iz kanala skozi zunanjo membrano, imenovanega TolC, sekundarnega transporterja, ki se nahaja v citoplazemski membrani, imenovanega AcrB, in dela, imenovanega AcrA, ki povezuje oba integralna membranska proteina in se nahaja v periplazemskem prostoru. S pomočjo izlivne črpalke AcrAB-TolC bakterije odstranjujejo številne kemijsko nesorodne snovi, kar lahko privede do odpornosti proti širokemu spektru različnih antibiotikov (19). Poleg črpalke AcrAB-TolC vsebuje bakterija *E. coli* tudi druge skupine izlivnih črpalk, ki so odgovorne za črpanje številnih ksenobiotikov (20). Aktivno črpanje antibiotikov iz bakterijskih celic s pomočjo izlivnih črpalk predstavlja enega izmed največjih izzivov pri načrtovanju

novih protibakterijskih učinkovin z aktivnostjo na po Gramu negativne bakterije (21). V zadnjih letih smo dosegli velik napredek pri razumevanju strukture in funkcije izlivnih črpalk (22), kar bi v prihodnosti lahko uporabili za načrtovanje spojin, ki ne bodo substrati za te črpalke. Možen je tudi razvoj učinkovin, ki bi vplivale na manjše izražanje izlivnih črpalk, ali spojin, ki bi zavrele delovanje izlivnih črpalk (23).

3.2.1. Zaviralci izlivnih črpalk

Zaviralci izlivnih črpalk lahko povečajo učinkovitost tistih antibiotikov, ki so dobri substrati za te črpalke (24). Obstaja več načinov, kako lahko zavremo delovanje izlivnih črpalk. Eden je, da prekinemo vir energije za črpanje, tako da onemogočimo nastanek elektrokemičnega protonskega gradienta, ki je potreben za proizvodnjo ATP (25, 26). Drugi način zaviranja izlivnih črpalk je priprava spojin, ki so dobri substrati za izlivne črpalke in zaradi tega tekmujejo za vezavo z antibiotikom (27). Med najbolj poznane zaviralce s tem mehanizmom delovanja spada dipeptid fenilalanin-arginin β -naftilamid (PA β N) (slika 1) (28, 29). Zaradi toksičnosti PA β N in njegovih derivatov ti niso uporabni v terapiji (30). Poleg PA β N so razvili tudi druge zaviralce izlivnih črpalk, kot so piridopirimidini in arilpiperazini (31). Predstavnik piridopirimidinov je spojina D13-9001 (slika 1), ki se je izkazala kot specifičen zaviralec izlivne črpalke MexAB-OprM iz bakterije *P. aeruginosa* (32), medtem ko je najaktivnejši zaviralec med arilpiperazini 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) (slika 1) (33). Pred kratkim so razvili tudi derivate hidantoina (slika 1) z zaviralnim delovanjem na črpalko AcrAB-TolC iz bakterije *Enterobacter aerogenes*, ki so ob hkratni uporabi izboljšali protibakterijsko delovanje nalidiksne kisline in klo-ramfenikola (34). Širok nabor spojin, ki služijo za razvoj učinkovin z delovanjem na izlivne črpalke, je rastlinskega izvora, kamor spadajo glikozidi, flavoni, izoflavoni in kempferol ramnozid. Primer flavonskega derivata, ki izkazuje delovanje na izlivno črpalko NorA iz bakterije *S. aureus*, je prikazan na sliki 1 (35). Zaviralno delovanje na izlivne črpalke so dokazali tudi za rezerpin (slika 1), alkaloid iz rauwolfije (*Rauwolfia serpentina*), ki pa je nevrotoksičen in zato ni primeren za terapevtsko uporabo (36). Kljub številnim raziskavam na tem področju trenutno v klinični praksi ni nobenega zaviralca bakterijskih izlivnih črpalk. Opisane spojine, ki so v različnih raziskovalnih fazah, predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnji razvoj učinkovitejših zaviralcev. Poleg izboljšanja njihovega delovanja na izlivne črpalke bo potrebno izboljšati tudi njihove farmakokinetične lastnosti in zmanjšati njihovo toksičnost (37).



Slika 1: Strukture zaviralcev izlivnih črpalk: fenilalanin-arginin β-naftilamid (PAβN), piridopirimidin D13-9001, arilpiperazin NMP, derivat hidantoina, derivat flavona in rezerpin.

Figure 1: Structures of efflux pump inhibitors: phenylalanine-arginine β-naphthylamide (PAβN), pyridopyrimidine D13-9001, arylpiperazine NMP, hydantoin derivative, flavone derivative and reserpine.

3.3. SPREMEMBA TARČNEGA MESTA

Odpornost proti antibiotikom se lahko razvije s spremembo strukture tarče, pri čemer se zmanjša njena afiniteta do antibiotika, ne spremeni pa se njena osnovna funkcija. Za razvoj te vrste odpornosti je pogosto dovolj, da pride do mutacije le enega izmed aminokislinskih ostankov v vezavnem mestu za antibiotik. Ta vrsta odpornosti se lahko med bakterijami prenaša s transformacijo, tj. s privzemom gena za protein, ki je homologen osnovni tarči, vendar ni občutljiv na antibiotik. Primer je odpornost, ki nastane s privzemom gena, ki kodira penicilinvezoči protein PBP2a, ki ni občutljiv na β-laktamaze (38). Do razvoja odpornosti lahko pride tudi z mutacijo na mestu encima, ki ni neposredno udeležen pri vezavi antibiotika, vendar se na ta način spremeni konformacija proteina ali dinamika vezave antibiotika.

Poznamo tudi odpornost, za katero ni potrebna mutacija gena, ki kodira tarčni protein, ampak se tarčno mesto spremeni z encimsko modifikacijo, ki zmanjša afiniteto tarče do antibiotika. Primer takšne odpornosti je metiliranje ribosomske RNA s pomočjo metiltransferaz, ki lahko prepreči vezavo makrolidov, linkozaminov in streptograminov na bakterijski ribosom (39). Podoben mehanizem odpornosti so odkrili tudi za kloramfenikol, klindamicin, oksazolidinon in aminoglikozide (40). Geni za encime, ki modificirajo tarčna mesta antibiotikov, se med bakterijami pogosto prenašajo s konjugacijo (41).

Fluorokinoloni so protibakterijske učinkovine, ki se vežejo na kompleks med molekulo DNA in DNA-girazo ali topoizomerozo IV in preprečijo uvedbo ali odstranitev dodatnega

zvitja v molekulo DNA. Odpornost proti fluorokinolonom se lahko razvije na več načinov: s pomočjo mutacij tarčnih proteinov, s povečanim izražanjem izlivnih črpalk ali s tvorbo proteinov iz skupine PRP (*pentapeptide repeat protein*) (42). Proteini PRP se predvidoma vežejo na kompleks med DNA in encimom in povzročijo disociacijo vezane učinkovine, kar omogoči, da topoizomeroza dokonča svojo običajno funkcijo (43).

Do spremembe tarče lahko pride tudi pri uporabi polimik-sinskih antibiotikov, med katere spada kolistin. Polimik-sinski antibiotiki so zgrajeni iz cikličnega peptida, na katerega je pritrjena dolga, hidrofobna veriga. Mehanizem njihovega delovanja je vezava na lipopolisaharide (LPS) v celični membrani po Gramu negativnih bakterij, s čimer motijo funkcijo membran. Odpornost proti polimik-sinskim antibiotikom se lahko razvije s kemijsko spremembo LPS, npr. s povečanim izražanjem proteina, ki kemijsko modificira del LPS z vezavo fosfoetanolamina na lipid A. Ker se pri tem zmanjša negativni naboj LPS, je vezava antibiotikov šibkejša (44).

Glikopeptid vankomicin zavre sintezo bakterijske celične stene tako, da se veže na terminalno skupino prekursorja v sintezi peptidoglikana, zgrajeno iz dveh aminokislin D-alanina (D-Ala-D-Ala). Odpornost proti vankomicinu se razvije tako, da se spremeni topologija vezavnega mesta za vankomicin, zaradi spremembe terminalnega dipeptida iz D-Ala-D-Ala v D-alanil-D-laktat (D-Ala-D-Lac) ali D-alanil-D-serin (D-Ala-D-Ser). S tem se afiniteta do vankomicina močno zmanjša (45).

Bakterije lahko odpornost razvijejo tudi tako, da popolnoma zaobidejo določeno tarčo z razvojem novega encima ali

privzemom gena za encim, ki lahko opravi podobno biokemijsko vlogo, vendar ni tarča za antibiotik. Primer takšne odpornosti je odpornost bakterije *S. aureus* proti β -laktamskemu antibiotiku meticilinu zaradi privzema tujega gena za penicilin vezoči protein (PBP), ki ima nizko afiniteto do β -laktamskih antibiotikov (46).

3.4. RAZGRADNJA ALI SPREMEMBA STRUKTURE ANTIBIOTIKA

Najbolj znan primer encimov, ki razgrajujejo antibiotike, so β -laktamaze, ki so jih odkrili že leta 1940 (47). β -Laktamaze so encimi, ki hidrolizirajo β -laktamski obroč antibiotikov, kot so penicilini, cefalosporini in cefamicini, pri čemer se obroč odpre, antibiotiki pa izgubijo svojo aktivnost. Glede na strukturno podobnost ločimo štiri razrede β -laktamaz. Razredi A, C in D imajo v aktivnem mestu serin, ki kot nukleofil odpre β -laktamski obroč antibiotika, razred B pa ima v aktivnem mestu encima ione Zn^{2+} (48). Sprva so bile β -laktamaze aktivne le na omejenem naboru antibiotikov, z leti pa so se razvile β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL, *extended spectrum β -laktamases*) (49). Skupina β -laktamskih antibiotikov, imenovana karbapenemi, je bila sprva na β -laktamaze razmeroma odporna, kasneje pa so se razvili encimi, ki so sposobni cepiti tudi karbapeneme, imenovani karbapenemaze (50). Odpornost proti β -laktamskim antibiotikom se je s pomočjo plazmidov in vertikalnega prenosa genov z leti hitro širila in danes predstavlja velik klinični problem. Ena izmed možnih rešitev je sočasna uporaba zaviralcev β -laktamaz, kot so klavulanska kislina, sulbaktam in tazobaktam. Poleg β -laktamaz obstajajo tudi drugi encimi, ki razgrajujejo npr. aminoglikozide, kloramfenikol in makrolide (11). Primer takšnih encimov so esteraze, ki hidrolizirajo makrolidne antibiotike, ali epoksidaze, ki povzročijo odpiranje epoksidnega obroča v fosfomicinu (51).

Poleg razgradnje antibiotika se lahko odpornost razvije tudi s spremembo kemijske strukture antibiotika. Do tega lahko pride npr. z uvedbo acilne, fosfatne ali nukleotidilne skupine na antibiotik (52). Uvedba teh skupin zaradi steričnih ovir oteži vezavo antibiotika na njegovo tarčo. Med antibiotike, ki so najbolj dovzetni za kemijsko spremembo, spadajo aminoglikozidi, ker vsebujejo veliko prostih hidroksilnih in aminske skupine. Obstajajo tri glavne skupine encimov, ki modificirajo strukturo aminoglikozidov: acetiltransferaze, fosfotransferaze in nukleotidiltransferaze (53). Primer antibiotika, ki ga bakterije lahko encimatsko spremenijo, je tudi kloramfenikol. Odpornost proti kloramfenikolu se lahko razvije s proizvodnjo acetiltransferaz imenovanih CAT (klo-

ramfenikol-acetiltransferaze), ki jih proizvajajo tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije. Poznamo tudi inaktivacijo antibiotika zaradi oksidacije, kar se zgodi npr. z oksidacijo tetraciklinskega antibiotika s pomočjo encima TetX (54).

4 SKLEP

Pojav in širjenje odpornosti proti antibiotikom je neizbežen pojav, povezan z množično rabo te skupine učinkovin. Problem bakterijske odpornosti poznamo že zelo dolgo, vendar se je razumevanje mehanizmov njenega nastanka v zadnjih letih močno povečalo. K temu so pomembno prispevali napredek genomike ter sistemske in strukturne biologije. Dobro poznavanje molekularnih mehanizmov razvoja odpornosti bo v prihodnje ključno za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. S trenutnimi tehnologijami lahko že v zgodnjih stopnjah razvoja novih učinkovin ocenimo verjetnost za razvoj odpornosti in kakšen bo njen mehanizem. To znanje lahko nato uporabimo za načrtovanje učinkovin, pri katerih bo verjetnost razvoja odpornosti manjša. K razvoju tega področja bodo pomembno prispevale metode strukturno podprtega načrtovanja. Strukture izlivnih črpalk z vezanimi substrati in zaviralci nam bodo omogočile načrtovanje novih učinkovin, ki bodo imele manjšo afiniteto do teh črpalk, ali pa zaviralcev, ki bodo bolj učinkovito zavirali njihovo delovanje. Za uspešen boj proti bakterijskim okužbam bo v prihodnje ključna kombinacija več različnih pristopov, od razvoja novih učinkovin, bolj premišljene uporabe antibiotikov v zdravstvu in živinoreji, do večjega zavedanja pomena varstva okolja.

5 LITERATURA

1. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-33.
2. Lederberg J. Infectious history. *Science.* 2000;288(5464):287-93.
3. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clin Infect Dis.* 2008;46(5):668-74.
4. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(6):560-78.



5. Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Internat J Antimicrob Agents*. 2007;29(6):630-6.
6. Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*. 2008;12.
7. Tagliabue A, Rappuoli R. Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance moving to the top. *Front Immunol*. 2018;9:1068.
8. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancerepor t/en/>
9. de Visser JAGM. The fate of microbial mutators. *Microbiology*. 2002; 148:1247-52.
10. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
11. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev Microbiol*. 2015;13(1):42-51.
12. Gubina M, Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. *Medicinski razgledi: Ljubljana* 2002; 3-56, 137-158, 427-446.
13. Tamber S, Hancock REW. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Front Biosci*. 2003;8:S472-83.
14. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès JM. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2701-6.
15. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1486-513.
16. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(2):254-67.
17. Fralick JA. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1996;178(19):5803-5.
18. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(8):629-36.
19. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014;509(7501):512-5.
20. Davis TD, Gerry CJ, Tan DS. General platform for systematic quantitative evaluation of small-molecule permeability in bacteria. *ACS Chem Biol*. 2014;9(11):2535-44.
21. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):71-109.
22. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*. 2006;443(7108):173-9.
23. Zalucki YM, Dhulipala V, Shafer WM. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *MBio*. 2012;3(6).
24. Pages JM, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med*. 2005;11(8):382-9.
25. Zhang Z, Liu ZQ, Zheng PY, Tang FA, Yang PC. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2010;16(10):1279-84.
26. Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, B Sanchez M, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2013;4:103.
27. Masi M, Refregiers M, Pos KM, Pages JM. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol*. 2017;2:17001.
28. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(1):105-16.
29. Sanchez P, Le U, Martinez JL. The efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(4):1042-5.
30. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - a vision for applied use. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(7):910-8.
31. Nakayama K, Ishida Y, Ohtsuka M, Kawato H, Yoshida K, Yokomizo Y, et al. MexAB-OprM-specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(23):4201-4.
32. Yoshida K, Nakayama K, Ohtsuka M, Kuru N, Yokomizo Y, Sakamoto A, et al. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(22):7087-97.
33. Bohnert JA, Kern WV. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):849-52.
34. Otrebska-Machaj E, Chevalier J, Handzik J, Szymanska E, Schabikowski J, Boyer G, et al. Efflux pump blockers in gram-negative bacteria: the new generation of hydantoin based modulators to improve antibiotic activity. *Front Microbiol*. 2017;8:1258.
35. Sabatini S, Gosetto F, Manfroni G, Tabarrini O, Kaatz GW, Patel D, et al. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl)quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. *J Med Chem*. 2011;54(16):5722-36.
36. Garvey MI, Piddock LJV. The Efflux Pump Inhibitor Reserpine Selects Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains That Overexpress the ABC Transporters PatA and PatB. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1677-85.
37. Handzik J, Matys A, Kieć-Kononowicz K. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria *S. aureus*. *Antibiotics*. 2013;2(1):28-45.
38. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1549-55.
39. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(3):577-85.
40. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(7):2500-5.
41. Zhang WJ, Xu XR, Schwarz S, Wang XM, Dai L, Zheng HJ, et al. Characterization of the IncA/C plasmid pSEEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multi-resistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(2):385-9.
42. Vetting MW, Hegde SS, Wang MH, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J Biol Chem*. 2011;286(28):25265-73.

43. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):118-25.
44. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of Lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370-9.
45. Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *Int Journal Med Microbiol.* 2005;294(8):479-86.
46. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Rev Microbiol* 2009. 7(9):629-41.
47. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin (Reprinted from *Nature* 1940; 146: 837). *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):677-8.
48. Reeve SM, Lombardo MN, Anderson AC. Understanding the structural mechanisms of antibiotic resistance sets the platform for new discovery. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1727-33.
49. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(2):199-210.
50. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58.
51. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol.* 2008;46(1):11-21.
52. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1451-70.
53. Norris AL, Serpersu EH. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. *Protein Sci.* 2013;22(7):916-28.
54. Yang W, Moore IF, Koteva KP, Bareich DC, Hughes DW, Wright GD. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52346-52.



RASTLINSKI IZVLEČKI EKSTRAKCIJE S SUPERKRITIČNIMI TEKOČINAMI IN NJIHOVA UPORABA SUPERCRITICAL FLUID PLANT EXTRACTS AND THEIR USE

AVTOR / AUTHOR:

Asist. Katja Kramberger, mag. farm.¹

Izr. prof. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.²

¹ Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju,
Katedra za prehransko svetovanje - dietetiko,
Polje 42, 6310 Izola

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: katja.kramberger@fvz.upr.si

POVZETEK

Metoda ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami velja za relativno novo metodo pridobivanja rastlinskih izvlečkov. Je bolj učinkovita in selektivna ter okolju prijaznejša alternativa običajnim postopkom ekstrakcije. V članku navajamo postopek pridobivanja izvlečkov s superkritičnim CO₂ in prednosti njihove uporabe na področju farmacije, prehrane in kozmetike, podkrepljene s praktičnimi primeri.

KLJUČNE BESEDE:

ekstrakcija s superkritičnim CO₂, rastlinski izvlečki, bioaktivne spojine

ABSTRACT

Supercritical fluid extraction method is relatively new plant extraction method, which is more effective, selective and environment-friendlier alternative to conventional extraction procedures. In the article we present procedures for obtaining supercritical CO₂ plant extracts and advantages of their use in the field of pharmacy, nutrition and cosmetics, illustrated by practical examples.

KEY WORDS:

supercritical CO₂ extraction, plant extracts, bioactive compounds

1 UVOD

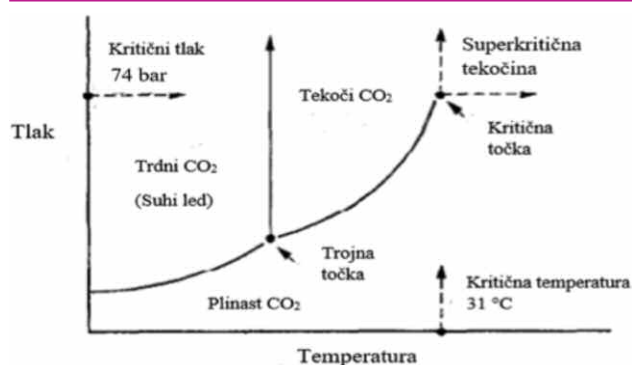
Bioaktivne spojine so v rastlinah navadno prisotne v majhnih koncentracijah, zato se znanstveniki še danes intenzivno ukvarjajo z razvojem bolj učinkovitih in selektivnih ekstrakcijskih metod (1). Čeprav so tradicionalni postopki tehnološko večinoma enostavni in uveljavljeni, je z njimi povezanih nekaj pomembnih slabosti: velike količine odpadnih topil, ki so pogosto toksična in vnetljiva, ter uporaba toplote, ki lahko privede do razpada termolabilnih molekul (2, 3). »Zelena kemija« se je za namene ekstrakcije pojavila v devetdesetih letih prejšnjega stoletja, s ciljem zmanjšanja porabe energije in zamenjave običajnih topil z naravi manj škodljivimi alternativami. Metoda ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami izpolnjuje oba navedena cilja (2). Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami se je najprej pojavila v prehranski industriji za pridobivanje brezkofeinske kave,

nato pa se je uveljavila tudi za pridobivanje rastlinskih izvlečkov za farmacevtsko uporabo (4).

2 SUPERKRITIČNE TEKOČINE IN EKSTRAKCIJA

2.1. LASTNOSTI SUPERKRITIČNIH TEKOČIN

Superkritična tekočina nastane, kadar temperatura in tlak presežeta kritično točko spojine; slika 1 prikazuje primer ogljikovega dioksida (CO_2). Nad kritično temperaturo tekoče stanje ni več mogoče, ne glede na tlak. Parni tlak snovi pri njeni kritični temperaturi imenujemo kritični tlak (2, 5).



Slika 1: Fazni diagram ogljikovega dioksida, prirejeno po (6).
Figure 1: Phase diagram for carbon dioxide, adapted from (6).

Superkritična tekočina je homogena faza z lastnostmi tekočine (možnost raztapljanja, zanemarljiva površinska napetost) kot tudi plina (prodiranje v material) (7). Fizikalne lastnosti superkritične tekočine so vmes med lastnostmi plina in tekočine: gostota in stisljivost sta podobni kot pri tekočinah, plinom pa jo približata dobra difuzivnost in nizka viskoznost (preglednica I) (2, 5, 7).

Preglednica I: Primerjava gostote, difuzivnosti in viskoznosti plinov, superkritičnih tekočin in tekočin (5).

Table I: Comparison of density, diffusion coefficient and viscosity properties of gases, supercritical fluids and liquids (5).

Fizikalna lastnost	Faza		
	Plin	Superkritična tekočina	Tekočina
Gostota (g/cm^3)	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,2–0,5	0,6–2
Difuzijski koeficient (cm^2/s)	$(1-4) \times 10^{-1}$	$10^{-3}-10^{-4}$	$(0,2-2) \times 10^{-5}$
Viskoznost ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$

Posledica nizke viskoznosti in visoke difuzivnosti superkritičnih tekočin je dobra sposobnost raztapljanja. Lažje prodrejo v porozne snovi kot tekočine in hitrost prenosa mase je večja (1). S spreminjanjem temperature in tlaka spreminjamo njihovo gostoto – če tlak pri kritičnih pogojih povežemo štirikrat, se gostota približno podvoji in približa gostoti tekočin, difuzivnost in viskoznost pa ostaneta takšni, kot ju imajo plini (2).

Možnost spreminjanja moči raztapljanja vodi do visoke selektivnosti v ekstrakciji ciljanih spojin, ki jo lahko dosežemo v precej krajšem času kot pri običajnih metodah ekstrakcije (1, 2). Sveža superkritična tekočina med dinamično ekstrakcijo nenehno teče skozi vzorec in s tem omogoča bolj kvantitativno in popolnejšo ekstrakcijo, zato so izkoristki zelo dobri. Zaoznanje topil ni, saj superkritična tekočina enostavno preide v plinasto stanje ob znižanju tlaka, nastali izvlečki pa so tudi zelo koncentrirani (1). Zaradi popolne ločitve faz je uplinjeno topilo čisto in ga lahko ponovno uporabimo. Ekstrakcija poteka pri nizki temperaturi in je predvsem primerna za pridobivanje spojin, občutljivih na visoko temperaturo (1, 2).

2.2. SUPERKRITIČNI CO_2

Izmed vseh topil najpogosteje uporabljamo CO_2 , saj ima ugodne kritične konstante ($T_c = 31,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ in $P_c = 73,8 \text{ bar}$), je brez vonja in okusa, visoke stopnje čistote, netoksičen, nevnetljiv in cenovno dostopen (7). Zaradi svoje nepolarosti zelo dobro raztaplja lipofilne snovi, kot so trigliceridi (rastlinska olja in masla), eterična olja in lipofilni vitamini. Večina bioaktivnih spojin v rastlinah je bolj polarnih od CO_2 , zato je za ekstrakcijo hidrofilnih spojin potrebno k superkritični fazi dodati polarne organske modifikatorje, kot sta etanol ali metanol (1, 4), ali tudi voda (7). Pri tem velja poudariti, da polarni modifikatorji spremenijo kvalitativno in kvantitativno sestavo izvlečka. Da se izognemo polarnim modifikatorjem, je smiselno namesto CO_2 uporabiti bolj polarno superkritično tekočino. Voda kot topilo ne pride v poštev, saj je kritična točka pri veliko ostrejših pogojih ($374 \text{ } ^\circ\text{C}$, 221 bar), pri katerih že nastopi korozivnost (7). Dovolj polarna snov z ugodnimi konstantami je npr. didušikov ok-

sid (N_2O), ki so ga uporabili za izolacijo paklitaksa. Njegova uporaba je omejena, saj lahko ob prisotnosti organskih spojin pride do eksplozije (1).

2.3. POSTOPEK EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami je petstopenjski proces. Tekoči CO_2 s pomočjo visokotlačne črpalke črpamo skozi izmenjevalec toplote v ekstrakcijsko posodo (slika 2). V izmenjevalcu toplote zaradi vpliva tlaka in temperature CO_2 preide v superkritično stanje. Superkritični CO_2 nato preide v ekstrakcijsko posodo, kjer se nahaja suh in zdrobljen rastlinski material. Med ekstrakcijo superkritično topilo prehaja skozi rastlinski material in raztaplja topne spojine. Tlak v ekstrakcijski posodi vzdržuje regulator tlaka. Zmes topljenca in superkritične tekočine vodimo v odstavne posode, kjer tlak postopoma popuščamo. Zaradi nižanja tlaka postopoma pada tudi moč raztapljanja in topjenec izpade iz topila. Na koncu tlak zmanjšamo do te mere, da CO_2 preide v plin, ki nima več moči raztapljanja. Nato ga ponovno shladimo in utekočinimo v sistemu recikliranja plina ali pa ga s pomočjo plinskih »boosterjev« in črpalke neposredno vrnemo v sistem (7).

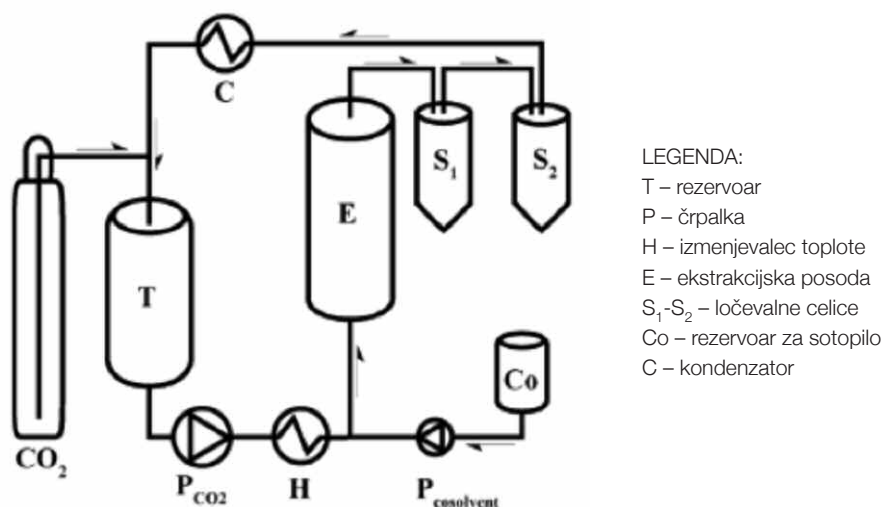
2.4. PREDNOSTI IN SLABOSTI EKSTRAKCIJE

Nekaj pozitivnih lastnosti ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami smo že izpostavili, vendar ima metoda tudi druge

prednosti, ki so bolj operativnega značaja (preglednica II). Napravo je mogoče sklopiti s kromatografskimi metodami, kot so HPLC in GC ter njuni sklopitvi z MS. Ekstrakcijo je mogoče izvesti v različnih obsegih: od analitskih (nekaj gramov), preparativnih (nekaj sto gramov) do velikih industrijskih (tone rastlinske droge). Posebnost metode je tudi ta, da daje več informacij o postopku ekstrakcije in njenem mehanizmu, saj ekstrakcijske razmere zelo natančno nadzorujemo. Na podlagi teh podatkov je mogoče oceniti učinkovitost ekstrakcije in jo ustrezno nadalje optimizirati (1). Kot vsaka metoda pa ima tudi metoda superkritične ekstrakcije slabosti (preglednica II). Najpomembnejša je zagotovo cena, saj je investicijski strošek zelo visok (2, 8).

3 UPORABA V FARMACIJI, KOZMETIKI IN PREHRANI

Z razvojem sodobnih kromatografskih in spektroskopskih metod se je izboljšalo razumevanje kemije snovi rastlinskega izvora, s tem pa se je povečalo tudi zanimanje za raziskovanje teh snovi za uporabo npr. kot zdravila, prehranska dopolnila, kozmetični izdelki ali pesticidi. Najbolj zanimivo in aktivno področje raziskav je ravno farmacevtsko, predvsem z vidika odkrivanja in proučevanja novih spojin kot potencialnih zdravilnih učinkovin (1). Podroben pregled uporabnosti ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami podajamo v preglednici III.



LEGENDA:
T – rezervoar
P – črpalka
H – izmenjevalec toplote
E – ekstrakcijska posoda
 S_1 - S_2 – ločevalne celice
Co – rezervoar za sotopilo
C – kondenzator

Slika 2: Shema naprave za ekstrakcijo s superkritičnimi tekočinami (7).
Figure 2: Supercritical fluid extraction apparatus scheme (7).

Preglednica II: Prednosti in slabosti ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami.

Table II: Advantages and disadvantages of supercritical fluid extraction.

PREDNOSTI	SLABOSTI
Selektivnost	Visok investicijski strošek
Učinkovitost	Velikost naprave
Kratek čas ekstrakcije	Potreba po organskih sotoptilih
Energetsko varčna in okolju prijazna metoda (majhna poraba energije med delovanjem, netoksična topila in možnost ponovne uporabe topila)	Zahtevnost rokovanja z napravo (visoko usposobljen kader)
Dobljeni izvlečki so koncentrirani (ločitev topila z uplinjenjem oz. odparevanjem)	
Primernost za termolabilne spojine	
Možnost sklopitve s kromatografskimi metodami	
Možnost natančne prilagoditve dejavnikov ekstrakcije in optimizacije postopka	

3.1. IZOLACIJA SPOJIN ZA RAZISKOVALNE NAMENE

Ekstrakcijo s superkritičnimi tekočinami pogosto uporabljamo v raziskovalne namene, torej za pridobivanje rastlinskih izvlečkov kot vzorcev za nadaljnjo fitokemijsko karakterizacijo (npr. s kromatografskimi, spektrometričnimi in gravimetričnimi metodami) (9). Bioaktivne spojine so razširjene v zdravilnih rastlinah, sadju, zelenjavi in tudi v odpadku, nastalem po pridelavi hrane (10). Prvi primer predstavljajo polifenoli, ki so spojine z antioksidativnim delovanjem. V primerjavi z običajnimi postopki ekstrakcije so imeli izvlečki, pridobljeni s superkritičnim CO₂, v večini primerov, kljub nižjim izkoristkom, podobne ali boljše antioksidativne lastnosti (11). Razlog je v izoliranem širšem spektru spojin, ki navadno delujejo sinergistično (11, 12). Izolacija antioksidantov je bolj učinkovita, če se poslužimo zaporedne ekstrakcije: v prvi stopnji se pod milejšimi razmerami ekstrahirajo hlapne spojine (eterična olja), nato pa v drugi stopnji z višanjem tlaka in dodajanjem organskega modifikatorja ekstrahiramo še bolj polarne spojine (polifenoli) (11). Primer tovrstne uporabe ekstrakcije s superkritičnim CO₂ je optimizacija ekstrakcijskih razmer pri ekstrakciji zeli šentjanževke (*Hypericum perforatum* L.), kjer so raziskovalci poskušali povečati delež hiperforina v izvlečkih. Ta je zaradi svoje lipofilnosti v običajnih etanolno-vodnih izvlečkih prisoten le v manjšem obsegu, medtem ko je njegov delež v rastlini precej večji. Z optimizacijo ekstrakcijskih razmer so povečali delež hiperforina v izvlečku do 35 % (4).

3.2. IZOLACIJA ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Metoda ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami je uporabna za izolacijo redkih spojin, ki so v rastlinah prisotne v majhni količini, ravno zaradi velike selektivnosti in učinkovitosti. Čeprav je ekstrakcija redkih spojin s superkritičnimi tekočinami učinkovita, pa za pridobivanje zdravilnih učinkovin v industrijskem merilu pogosto ni primerna. Viri rastlinskega materiala so namreč omejeni, zato je velikokrat potrebno spojine pripraviti sintezno. Tak primer je izolacija protirakave učinkovine paklitaksela, ki se nahaja v lubju pacifiške tise (*Taxus brevifolia* L.) v zelo majhnih količinah (50–100 mg/kg skorje) in bi za zdravljenje enega bolnika potrebovali dve do tri 60-letna drevesa (13). Drugače je z rastlinami, ki jih lahko širše umetno gojimo za namene izolacije spojin. Čeprav je možna totalna sinteza antimalarika artemizina, je izolacija iz listov (gojenega) enoletnega pelina (*Artemisia annua* L.) cenovno ugodnejša, kljub temu, da so izkoristki zgolj okoli 1 % mase suhe rastline (14). Ekstrakcija s superkritičnim CO₂ omogoča kvantitativno izolacijo artemizina in preprečuje njegov termični razpad (14, 15).

3.3. IZOLACIJA HLA PN IH SPOJIN

Hlapne spojine v aromatičnih rastlinah poznamo kot eterična olja. Kemijsko gre za zmesi mono- in seskviterpenov ter njihovih oksigeniranih derivatov (alkoholi, aldehidi, ketoni, kisline, fenoli, oksidi, laktani, estri in etri) ali fenilpropanoidov. Poudariti moramo, da so prava eterična olja le tiste hlapne

spojine, ki jih pridobimo z destilacijo in stiskanjem. Izraz eterično olje za izvlečke, pridobljene z ekstrakcijo s superkritičnimi tekočinami, zato ni najbolj primeren, čeprav vsebujejo po kemizmu enak oz. podoben profil spojin. Med postopkom destilacije lahko poleg izgube hlapnih spojin pride tudi do kemijskih sprememb (oksidacija, hidroliza) in raztapljanja bolj polarnih hlapnih spojin v vodni fazi (hidrolat). Pri ekstrakciji s superkritičnimi tekočinami topil ni potrebno odparevati, zato hlapne spojine v izvlečku ohranimo (7). Izvlečki s hlapnimi spojinami, pridobljeni s superkritičnim CO₂, so po sestavi najbolj podobni esenci rastline (16). So torej boljše kakovosti, predvsem v smislu aromatičnosti, na katero vplivamo s spreminjanjem ekstrakcijskih razmer (temperature, tlaka, pretoka, vrste in deleža organskega modifikatorja) (7). Izvlečki s hlapnimi spojinami rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), kumine (*Cuminum cyminum* L.), janeža (*Pimpinella anisum* L.) in timijana (*Thymus serpyllum* L.) so imeli boljše antioksidativno delovanje, ko so jih pridobili z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂ (17). Tovrstni rastlinski izvlečki oz. v njih prisotne hlapne spojine so izkazovali tudi dobro protibakterijsko (npr. karvakrol, α-pinen in germakrolid), protiglivično (npr. 1,8-cineol, kariofilenoksid in

kafra) in insekticidno aktivnost (npr. skvalen in kampesterol) (7).

3.4. IZOLACIJA TRIGLICERIDOV (RASTLINSKIH OLJ) IN VITAMINOV

Metoda ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami je uporabna tudi za izolacijo, frakcioniranje lipidov in njihovo predelavo do industrijskih izdelkov (6). Nerafinirana trigliceridna olja, izolirana s superkritičnimi tekočinami, veljajo za bolj kakovostna, saj vsebujejo več antioksidantov (polifenolov in tokoferolov), ki zavirajo oksidativno kvarjenje olj. V primerjavi z običajnim pridobivanjem rastlinskih olj in masel poteka postopek ekstrakcije pri nizki temperaturi in v okolju z omejenim dostopom kisika, kar prav tako pripomore k ohranjanju njihove oksidativne stabilnosti (18). Tak način ekstrakcije je pomemben predvsem za izolacijo nestabilnih olj kot je laneno olje (19). Pogosto optimiziramo ekstrakcijske razmere za povečanje izkoristka olja in vsebnosti tokoferolov. Tokoferole lahko ekstrahiramo tudi neposredno iz rastlinskega materiala – npr. iz semen vinske trte (*Vitis vinifera* L.) ali iz listov oljke (*Olea europaea* L.) (20).

Preglednica III: Primeri uporabe ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami na področjih farmacije, prehrane in kozmetike.

Table III: Examples of supercritical fluid extraction use in the fields of pharmacy, food and cosmetics.

Področje uporabe	Opis postopka ekstrakcije	Vrsta spojine	Namen/pomen ekstrakcije
Farmacija	Optimizacija izolacije partenolida iz listov belega vratiča (<i>Tanacetum parthenium</i> L.)	Seskviterpensi laktoni	Proučevanje protimigrenskega delovanja partenolida (16)
	Odstranjevanje nečistot v pomožnih snoveh	Različne spojine	Pridobivanje pomožnih snovi visoke stopnje čistosti (8)
	Odstranjevanje pesticidov iz rastlinskih zdravil kitajske tradicionalne medicine	Kloroalkani	Razvoj metode za detekcijo pesticidov (21)
	Izolacija faradiola iz cvetov ognjiča (<i>Calendula officinalis</i> L.)	Triterpensi alkoholi	Povečevanje deleža spojine s protivnetnim delovanjem (16)
	Ekstrakcija česna (<i>Allium sativum</i> L.)	Žveplove spojine	Izolacija spojin s protimikrobnim delovanjem (7)
Farmacija/prehrana	Izolacija bioaktivnih spojin rozmanola in karnozola iz rožmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) in žajblja (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Diterpeni	Odstranjevanje hlapnih substanc z neprijetnim vonjem od bioaktivnih spojin (16)
	Izolacija β-karotena iz sladkega krompirja (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	Karotenoidi	Optimizacija ekstrakcijske metode (9)
	Izolacija absintina iz pelina (<i>Artemisia absinthium</i> L.)	Seskviterpensi lakton	Izolacija grenčine brez prisotnosti β-tujona (16)



Prehrana	Izolacija flavonoidov iz eksokarpa pomela (<i>Citrus grandis</i> L.)	Flavonoidi	Testiranje metode za ekstrakcijo (22)
	Ekstrakcija konopljinega olja (<i>Cannabis sativa</i> L.)	Trigliceridi/ tokoferoli	Pridobljeno olje s povečano vsebnostjo tokoferolov (23)
	Odstranjevanje holesterola iz mleka	Steroli	Zmanjševanje deleža holesterola (9)
	Izolacija grenčin iz hmelja (<i>Humulus lupulus</i> L.)	Fluoroglucinoli	Za ojačevanje arome piva (7)
	Izolacija hlapnih spojin z antioksidativnim potencialom iz črnega popra (<i>Piper nigrum</i> L.)	Oleorezin	Primerjava metod za pridobivanje izvlečkov za zaviranje kvarjenja mlete svinjine (24)
Prehrana/ kozmetika	Optimizacija metode za pridobivanje ričkovega olja (<i>Camelina sativa</i> L.)	Trigliceridi	Pridobivanje bolj kakovostnega deviškega olja v primerjavi z ekstrakcijo s topili (25)
Kozmetika	Izolacija aromatične spojine sklareola iz muškatne kadulje (<i>Salvia sclarea</i> L.)	Diterpeni	Uporaba v parfumih, ojačevalcih vonja hrane (16)
	Pridobivanje izvlečka arnike (<i>Arnica montana</i> L.)	Seskviterpensi laktioni	Odstranjeni seskviterpensi laktioni, ki povzročajo kontaktni dermatitis (16)

4 SKLEP

Z metodo ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami lahko pripravimo izvlečke z različno sestavo in iz raznolikega rastlinskega materiala. Metoda ima številne tehnološke prednosti, med katerimi izstopata selektivnost in prilagodljivost ekstrakcijskih razmer. Kljub številnim raziskavam možnosti uporabe te »zelene« metode, je prostora za izboljšave še veliko, zlasti na področju odkrivanja zdravilnih učinkovin (7). Predvsem je pomembna uveljavitev ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami kot metode izbora z vidika ekološke trajnosti.

5 LITERATURA

1. Lang Q, Wai CM. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*. 2001 Jan;53(4):771–82.
2. Khaw K-Y, Parat M-O, Shaw PN, Falconer JR. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Mol Basel Switz*. 2017 Jul;22(7).
3. Kočvar Glavač N. Pridobivanje in vrednotenje rastlinskih izvlečkov. *Farm Vestn*. 2018 Oct; 69(4):259–64.
4. Römpp H, Seger C, Kaiser CS, Haslinger E, Schmidt PC. Enrichment of hyperforin from St. John's wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2004 Mar;21(4):443–51.
5. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. In: *Principles of Instrumental Analysis*. 6 edition. Belmont, CA: Brooks Cole; 2006. p. 856–66.
6. J.W K. Supercritical Fluid Technology for Lipid Extraction, Fractionation, and Reactions. In: *Lipid Biotechnology*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p. 663–687.
7. Capuzzo A, Maffei ME, Occhipinti A. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Mol Basel Switz*. 2013 Jun;18(6):7194–238.
8. Girotra P, Singh SK, Nagpal K. Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research. *Pharm Dev Technol*. 2013 Feb;18(1):22–38.
9. Modey WK, Mulholland DA, Raynor MW. Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products. *Phytochem Anal*. 1996 Jan;7(1):1–15.
10. Putnik P, Lorenzo J, Barba F, Roohinejad S, Režek Jambrak A, Granato D, et al. Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods*. 2018 Jul;7(7):106.

11. Díaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2006 Apr;54(7):2441–69.
12. Vági E, Rapavi E, Hadolin M, Vásárhelyiné Perédi K, Balázs A, Blázovics A, et al. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *J Agric Food Chem.* 2005 Jan;53(1):17–21.
13. Jennings DW, Deutsch HM, Zalkow LH, Teja AS. Supercritical extraction of taxol from the bark of *Taxus brevifolia*. *J Supercrit Fluids.* 1992 Mar;5(1):1–6.
14. Kohler M, Haerdi W, Christen P, Veuthey JL. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *J Chromatogr A.* 1997 Oct;785(1–2):353–60.
15. Su X, Miller LH. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci China Life Sci.* 2015 Nov;58(11):1175–9.
16. Simándi B, Kéry Á. Supercritical Fluid Extraction of Terpenoids and Steroids from Plants. [internet] Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/f0b3/ca05f3828b68ae7a28b7608638247ae461.pdf>
17. Topal U, Sasaki M, Goto M, Otles S. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *Int J Food Sci Nutr.* 2008 Dec;59(7–8):619–34.
18. Khattab RY, Zeitoun MA. Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT - Food Sci Technol.* 2013 Sep;53(1):338–45.
19. Kramberger K. Vpliv izbranih izvlečkov ekstrakcije s superkritičnem ogljikovim dioksidom, dodanih lanenemu olju, na njegovo peroksidno in anizidinsko število. Ljubljana: Univeza v Ljubljani; 2018. 68 p.
20. Malekbala MR, Soltani SM, Hosseini S, Eghbali Babadi F, Malekbala R. Current technologies in the extraction, enrichment and analytical detection of tocopherols and tocotrienols: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Sep;57(14):2935–42.
21. Ling YC, Teng HC, Cartwright C. Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in Chinese herbal medicine. *J Chromatogr A.* 1999 Mar;835(1–2):145–57.
22. He J-Z, Shao P, Liu J-H, Ru Q-M. Supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel and their antioxidant activity. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct;13(10):13065–78.
23. Aladić K, Jarni K, Barbir T, Vidović S, Vladić J, Bilić M, in sod. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Ind Crops Prod.* 2015 Dec;76:472–8.
24. Tipsrisukond N, Fernando LN, Clarke AD. Antioxidant Effects of Essential Oil and Oleoresin of Black Pepper from Supercritical Carbon Dioxide Extractions in Ground Pork. *J Agric Food Chem.* 1998 Oct;46(10):4329–33.
25. Belayneh HD, Wehling RL, Cahoon E, Ciftci ON. Extraction of omega-3-rich oil from *Camelina sativa* seed using supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids.* 2015 Sep;104:153–9.

MODULACIJA POVEZOVANJA EKSONOV S PROTISMISELNIMI OLIGONUKLEOTIDI KOT TERAPEVTSKA STRATEGIJA

SPLICING MODULATION WITH ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AS A THERAPEUTIC STRATEGY

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Številne genske bolezni so posledica mutacij, ki vodijo v napake pri procesiranju primarnih genskih prepisov (pre-mRNA). Izrezovanje intronov in povezovanje eksonov katalizira ribonukleoproteinski kompleks, imenovan spajalno telesce, proces pa nadzirajo številni proteinski dejavniki, ki se vežejo na regulatorna zaporedja pre-mRNA in bodisi spodbujajo ali zavirajo vključevanje posameznih eksonov v zrelo mRNA. S sintezniimi oligonukleotidi, komplementarnimi regulatornim zaporedjem na pre-mRNA, lahko zelo specifično zaviramo vezavo proteinskih dejavnikov in posledično vplivamo na profil povezovanja eksonov (ter s tem na strukturo in funkcijo proteinskega produkta) s ciljem doseči terapevtski izid. Nedavno sta Evropska agencija za zdravila (EMA) in ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) odobrili uporabo prvih terapevtskih protismiselnih oligonukleotidov, ki modulirata proces povezovanja eksonov, za zdravljenje spinalne mišične atrofije in Duchennove mišične distrofije. V prispevku je podrobneje predstavljen terapevtski potencial te nove skupine učinkovin, njihovi mehanizmi delovanja ter omejitve, s katerimi se srečujejo pri razvoju.

KLJUČNE BESEDE:

Duchennova mišična distrofija, povezovanje eksonov, protismiselni oligonukleotidi, spinalna mišična atrofija

ABSTRACT

Many gene diseases arise from mutations responsible for incorrect primary transcript (pre-mRNA) processing. RNA splicing (exon joining and intron removal) is catalyzed by a ribonucleoprotein complex termed the spliceosome, and regulated by numerous protein factors binding to pre-mRNA regulatory sequences, thereby either promoting or suppressing specific exon inclusion. In order to achieve therapeutic results, the binding of protein factors to pre-mRNA can be blocked by synthetic complementary (antisense) oligonucleotides. In turn, the splicing profile (i.e. exon usage) is changed, leading to modified protein product structure and function. Recently, European Medicinal Agency (EMA) and the US Food and Drug Administration (FDA) have approved the first two antisense oligonu-



cleotide drugs that modulate splicing for the treatment of spinal muscular atrophy and Duchenne muscular dystrophy. Here, the therapeutic potential and mechanisms of action of antisense oligonucleotide splicing modulators are reviewed, and their limitations are discussed.

KEY WORDS:

antisense oligonucleotides, Duchenne muscular dystrophy, RNA splicing, spinal muscular atrophy

1 UVOD

V nasprotju s prokariotskimi (bakterijskimi in arhejskimi) je večina evkariontskih genov, ki kodirajo proteine, sestavljena iz izmenjujočih se eksonskih in intronskih nukleotidnih zaporedij. V procesu »zorenja« primarnega genskega prepisa (prekursorske mRNA (pre-mRNA); molekule RNA, ki predstavlja neposreden prepis gena) se v jedru celic introni izrežejo, eksoni pa povežejo med seboj in tvorijo »zrelo« informacijsko RNA (mRNA). Ta proces, imenovan povezovanje (spajanje) eksonov (tudi izrezovanje intronov, *splicing*; slika 1A), katalizira dinamični ribonukleoproteinski izrezovalno-povezovalni kompleks oz. spajalno telesce (*spliceosome*), sestavljen iz malih jedrnih RNA (*small nuclear RNAs*, snRNAs) in številnih proteinov (1). Spajalno telesce prepozna kratke nukleotidne motive na meji med introni in eksoni, pri čemer njegovo interakcijo s pre-mRNA usmerjajo različni proteini z vezavo na cis-regulatorne elemente (specifična nukleotidna zaporedja) primarnega genskega prepisa (2, 3) (slika 1B). Zrela mRNA prenese informacijo za sintezo proteinov v citosol, kjer jo preda ribosomom.

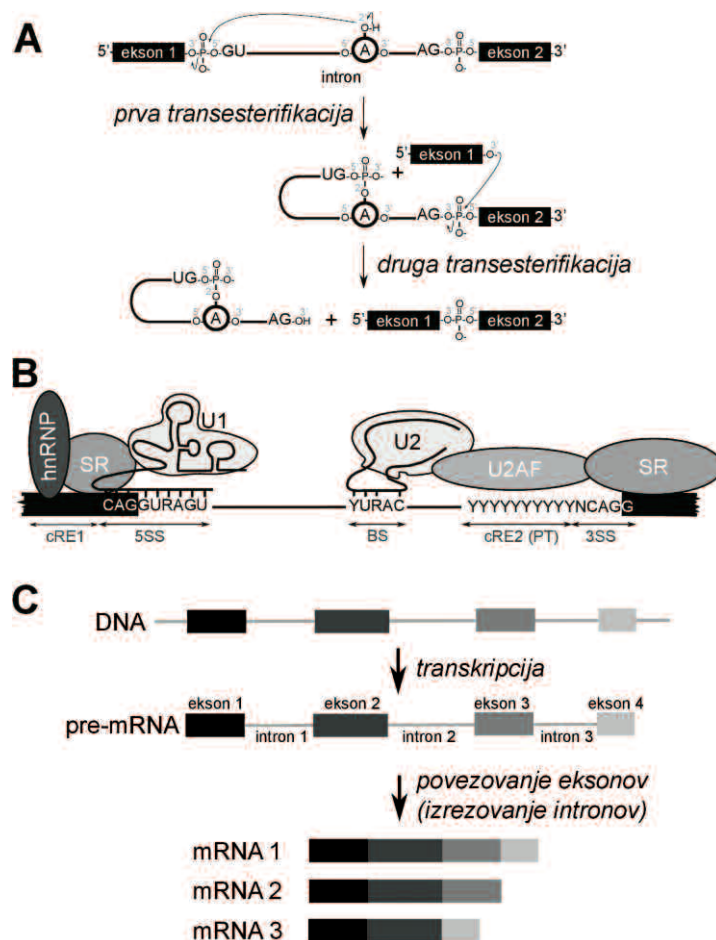
Analize transkriptoma (sekvenciranja mRNA (4)) so razkrile, da v različnih tkivih pogosto s prepisovanjem istih genov na račun alternativnega povezovanja eksonov (slika 1C) poteka sinteza proteinskih izooblik z nekoliko različnimi funkcijami. Različna raba genske informacije je v nekaterih primerih povezana tudi z razvojno stopnjo organizma ali z odzivom na fiziološke dražljaje (5). Mehanizmi, ki uravnavajo nastajanje posamezne spojivitvene različice, so zapleteni in še ne povsem pojasnjeni, nedvomno pa igrajo pri tem osrednjo vlogo RNA-vezavni proteini kot trans-delujoči dejavniki. Ti se vežejo na cis-regulatorne elemente v eksonih ali intronih pre-mRNA in bodisi spodbudijo vključitev (rabo) določenega eksona (z vezavo na ojačevalna zaporedja) ali pa jo zavrejo (z vezavo

na utiševalna zaporedja; slika 2A). Alternativno povezovanje eksonov prispeva k učinkovitejši izrabi sicer omejene genske informacije. Tako (vsaj deloma) pojasnjujemo tudi razlike med posameznimi vrstami celic ter zapletenost organizmov (6). Ocenjujejo, da alternativno spajanje eksonov poteka pri več kot 95 % človeških genov (4).

Številne genske bolezni so posledica mutacij v cis-regulatornih elementih, ki spremenijo profil povezovanja eksonov (7, 8). Nekatere mutacije prek izključitve določenega eksona (ali zaviranja izrezovanja introna) vodijo v premik bralnega okvirja in s tem onemogočajo tvorbo funkcionalnih proteinov. Tako tudi mutacije oz. polimorfizmi posameznih nukleotidov v intronih ali eksonske sinonimne mutacije (točkovne mutacije, ki sicer spremenijo kodon, a ta še vedno zapisuje isti aminokislinski ostanek) lahko vodijo v napačno procesiranje pre-mRNA, ki je vzrok bolezenskemu stanju (9). S kratkimi sintezni oligonukleotidi, komplementarnimi cis-regulatornim elementom na pre-mRNA (t. i. protismislnimi oligonukleotidi, ASO, *antisense oligonucleotide*), je mogoče ovirati vezavo endogenih trans-delujočih RNA in proteinov ter s tem modulirati proces izrezovanja intronov in povezovanja eksonov (slika 2B) z namenom doseči terapevtski učinek (10). Podoben endogeni način uravnavanja procesa zorenja so, zanimivo, opisali tudi za mRNA serotonininskega receptorja 2c, kjer nekodirajoča RNA SNORD115 z vezavo na utiševalno zaporedje v alternativnem eksonu 5b spodbudi nastanek daljše proteinske spojivitvene izooblike, ki ima sposobnost prenosa signala, medtem ko krajša ne doseže celične membrane (11, 12).

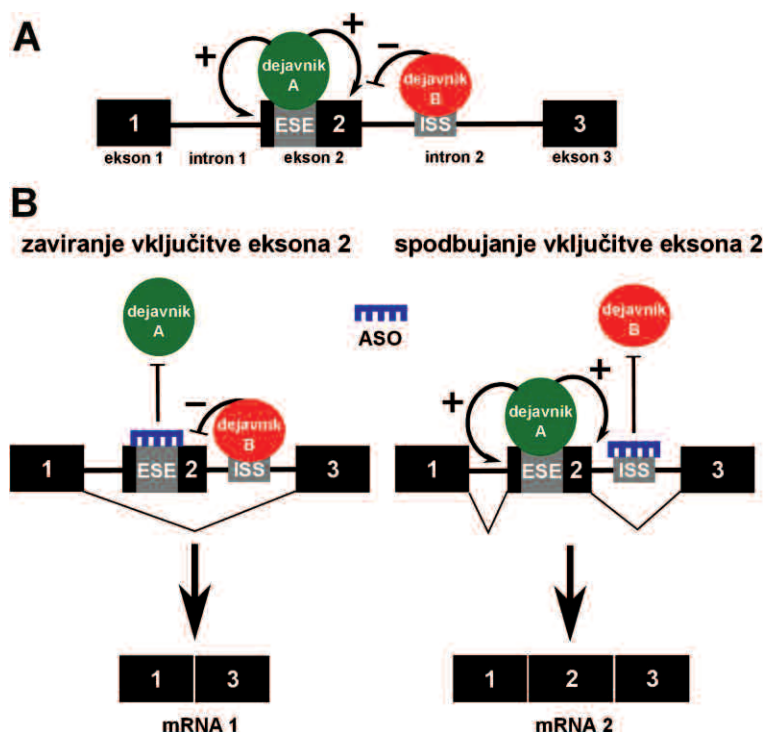
2 KEMIZEM, MEHANIZMI DELOVANJ IN FARMAKOKINETIKA PROTISMISLNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Protismislni oligonukleotidi (ASO) so sintezne spojine, zgrajene iz 15 do 30 nukleotidov ali njihovih analogov, katerih zaporedje je načrtovano tako, da so komplementarni (pre-)mRNA (15). Učinkujejo po več mehanizmi, kar je primarno povezano z njihovo strukturo (tj. z modifikacijami nukleotidnih gradnikov; slika 3) (16). Ker so RNA-oligonukleotidi neobstoječi *in vivo* (občutljivi so na razgradnjo z RNazami), uporabljamo pri sintezi terapevtskih ASO nenaravne nukleotide s spremenjenim sladkorno-fosfatnim ogrodjem. Fosforotioatni analogi (kjer je en kisikov atom fosfatne skupine zamenjan za žveplovega) so sicer odporni



Slika 1: Shematska ponazoritev izrezovanja intronov (predstavljeni kot črte) in povezovanja eksonov (pravokotniki; prirejeno po (13, 14)). **A.** Mehanizem povezovanja eksonov: eksona, ki ju loči intronsko zaporedje, se spojit v dveh zaporednih reakcijah transesterifikacije, pri tem izstopi intron v obliki zanke. Donorsko mesto introna (na 5'-koncu) ima ohranjeno dinukleotidno zaporedje GU, akceptorsko (na 3'-koncu) se zaključuje z AG. V bližini slednjega se nahaja t. i. razvejitveno mesto z adenozinom (obkrožen), katerega 2'-OH skupina riboze napade fosfatno skupino donorskega gvanozinskega ostanka. **B.** Podrobnejša ponazoritev regulatornih elementov, ki uravnavajo proces povezovanja eksonov. Ohranjeno zaporedje 5'-spojitvenega mesta (5SS) prepozna mala jedrna RNA (snRNA) U1, razvejitveno mesto pa snRNA U2 (obe sta del ribonukleoproteinskih kompleksov (snRNP), ki skupaj z drugimi komponentami (niso prikazane) tvorita spajalno telesce). Pri vezavi snRNP na pre-mRNA sodelujejo številni trans-delujoči dejavniki, kot so heterogeni jedrni ribonukleoproteini (hnRNP), proteini, bogati s serini in arginini (SR), ter pomožni dejavnik U2 (U2AF). cRE1 in cRE2 – cis-regulatorna elementa, BS – razvejitveno mesto, PT – polipirimidinski trakt, 3SS – 3'-spojitveno mesto, Y – pirimidinski nukleotid (C ali U), R – purinski nukleotid (A ali G), N – poljuben nukleotid. **C.** Alternativno povezovanje eksonov, ki vodi do treh spojitvenih različic mRNA.

Figure 1: Schematic representation of pre-mRNA splicing. Exons are depicted as boxes, while introns are shown as thin lines (adapted from refs. (13, 14)). **A.** Splicing mechanism: exons separated by an intron are joined in two subsequent transesterification reactions. The intron is released in the form of lariat. Intron donor site (at the 5' end of intron) and acceptor site (at the 3' end) harbour conserved GU and AG dinucleotide sequences, respectively. Upstream of the AG motif there is a branch site (BS) containing adenosine (circled), whose 2'-ribose OH-group attacks the phosphate group of the donor site guanosine residue. **B.** Detailed depiction of regulatory elements governing splicing. The conserved motif of 5' splice site (5SS) is recognized by small nuclear RNA (snRNA) U1, while that of 3' splice site (3SS) is bound by snRNA U2 (both snRNAs are an integral part of ribonucleoprotein complexes (snRNP) that, together with other components (not shown), form the spliceosome. The binding of snRNPs to pre-mRNA is guided by numerous trans-acting factors, such as heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), serine/arginine-rich proteins (SR), and U2 auxiliary factor (U2AF). cRE1 and cRE2 – cis-regulatory elements, PT – polypyrimidine tract, Y – pyrimidine nucleotide (i.e., C or U), R – purine nucleotide (i.e., A or G), N – poljuben nucleotid. **C.** Alternative splicing resulting in three different mRNA splice variants being produced from a single gene.



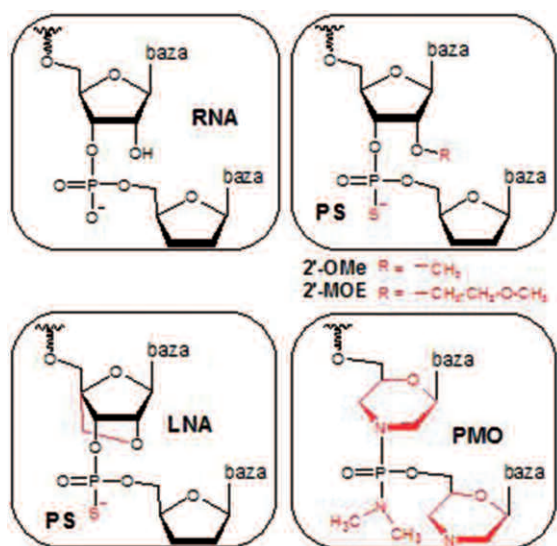
Slika 2: Modulacija povezovanja eksonov s protismiselnimi oligonukleotidi (prirejeno po (10)). **A.** Shematična ponazoritev pre-mRNA z eksoni (črni pravokotniki) in introni (tanke črte). Na intronski utiševalen (ISS) in eksonski ojačevalen regulatorni element (ESE; siva pravokotnika) sta vezana trans-delujoča dejavnika (elipsi), ki bodisi zavirata (–) ali spodbujata (+) vključitev eksona 2. **B.** Protismiseln oligonukleotid (ASO), komplementaren ESE (levo), prepreči vezavo dejavniku A na pripadajoče ojačevalno zaporedje, kar vodi v izpustitev (preskok) eksona 2. ASO, komplementaren ISS (desno), onemogoči vezavo zaviralnemu dejavniku B na utiševalno regulatorno zaporedje, s čimer spodbudi vključitev eksona 2.

Figure 2: Modulation of splicing by antisense oligonucleotides (ASOs; adapted from ref. (10)). **A.** Schematic depiction of pre-mRNA with exons (black boxes) and introns (thin lines). Exonic splicing enhancer (ESE) and intronic splicing silencer (ISS) regulatory elements (shown as grey boxes) are bound by trans-acting factors A and B, respectively. They either block (–) or promote (+) exon 2 inclusion. **B.** ASO complementary to ESE (left) displaces splicing factor A, thereby inhibiting exon 2 inclusion (i.e., promotes exon 2 skipping). In contrast, ASO complementary to ISS prevents the binding of negatively acting splicing factor B, thus promoting exon 2 inclusion.

proti nukleazam, a se na (pre-)mRNA vežejo z nižjo afiniteto (17). Zaradi negativnega naboja se vežejo na plazemske proteine, kar je ugodno z vidika dolge biološke razpolovne dobe (počasneje se odstranjujejo z glomerulno filtracijo), a izzovejo nekatere neželene učinke, kot so aktivacija komplementa, podaljšanje protrombinskega časa in okvara ledvične funkcije (18). Dodatne modifikacije nukleotidov, zlasti metilacija in metoksietilacija 2'-OH skupine riboze, doprinesejo k odpornosti ASO proti RNazam (17), medtem ko metilenski most med 2'-OH skupino in atomom C4 riboze (t. i. LNA, *locked nucleic acids*) spremeni topologijo ASO v smeri višje afinitete vezave na tarčno RNA (19). Fosforodiamidatni morfolinski analogi nukleotidov niso negativno nabiti in se zato manj vežejo na plazemske proteine;

kot taki se sicer hitreje odstranjujejo iz organizma, a izkazujejo ugodnejši toksikološki profil (20).

Protismiseln oligonukleotidi kot učinkovine niso novost. FDA in EMA sta že pred dvajsetimi leti odobrili uporabo **fomivirsena**, 21 nukleotidov dolgega fosforotioatnega ASO za zdravljenje citomegalovirusnega retinitisa pri imunsko oslabljenih bolnikih, primarno tistih z aidsom. Zdravilo so aplicirali lokalno v obliki intravitrealne injekcije. Fomivirsen z vezavo na mRNA *UL123* **s sterično blokado onemogoča translacijo** tega za replikacijo virusa esencialnega gena (21). Po le nekaj letih je nosilec tržnega dovoljenja zdravilo samoiniciativno umaknil, saj je v vmesnem obdobju prišlo do precejšnjega napredka pri zdravljenju okužb z virusom HIV in s tem bistveno manjše potrebe po fomivir-



Slika 3: Primerjava struktur oligonukleotidnih analogov (prirejeno po (10)): RNA – ribonukleinska kislina, PS – fosforotioat, 2'-OMe – 2'-O-metil, 2'-MOE – 2'-O-metoksietil, LNA – analog z metilenskim mostičkom med 2'-OH skupino in atomom C4 riboze, PMO – fosforodiamidatni morfolinski analog.

Figure 3: Comparison of oligonucleotide analogues' structures (adapted from ref. (10)): RNA – ribonucleic acid, PS – phosphorothioate, 2'-OMe – 2'-O-methyl, 2'-MOE – 2'-O-methoxyethyl, LNA – locked nucleic acid, PMO – phosphorodiamidate morpholino analogue.

senu. Še en primer ASO kot učinkovine je **mipomersen**, v ZDA odobren leta 2013 za zdravljenje družinske hiperholesterolemije, genske bolezni, ki je posledica mutacij obeh alelov gena za LDL-receptor (EMA je izdajo tržnega dovoljenja zavrnila zaradi hepatotoksičnosti). Mipomersen je 21-nukleotidni fosforotioatni ASO z deoksiribozami na osrednjih nukleotidih, medtem ko so gradniki na 5'- in 3'-koncih 2'-O-metoksietilirani. Komplementaren je mRNA za apolipoprotein B-100 (ApoB-100) in deluje tako, da **aktivira razgradnjo tarčne RNA z RNazo H** (endonukleazo, ki katalizira hidrolizo RNA v heterodupleksu RNA:DNA); posledično omejuje nastanek ApoB-100, glavne proteinske komponente lipoproteinov z nizko gostoto (LDL) (21). Aplikiramo ga subkutano, zdravljenje je dovoljeno le v kontekstu strogega načrta obvladovanja tveganja. Predstavniki nove skupine terapevtskih ASO (preglednica 1) so načrtovani tako, da so komplementarni cis-regulatornim elementom na pre-mRNA (10, 15), zato **ovirajo vezavo trans-delujočih dejavnikov** (slika 2) ter tako **spajalno telesce usmerjajo k specifičnemu spojitvenemu mestu ali ga odvrčajo od njega**, s čimer je moč

preusmeriti profil nastalih spojitvenih izooblik mRNA. Najpomembnejše predstavnike podrobneje predstavljamo v poglavju 3.

ASO apliciramo subkutano ali intravensko, če je cilj dostava v določena tkiva, tudi intramuskularno ali intravitrealno. Slabo prehajajo krvno-možgansko pregrado, zato je za dostavo v centralni živčni sistem potrebno poseči po intratekalni ali celo intracerebroventrikularni aplikaciji (10). Opažanja iz poskusov na živalih nakazujejo, da so vplivi ASO na povezovanje eksonov že po enkratni aplikaciji razmeroma dolgotrajni, v nekaterih tkivih vztrajajo tudi več kot šest mesecev (28, 29). V celice tudi *in vivo* vstopajo v »goli« obliki, tj. ne da bi jih vgrajevali v liposome ali nanodelce. Fosforotioatni oligonukleotidi se neposredno vežejo na nekatere celične receptorje (30), domnevno pa privzem poteka tudi posredno z receptorsko endocitozo; po tej poti vstopajo v celice številni proteini, na katere so vezani ASO (10). Kako ASO izstopijo iz endosomov v citosol in nato preidejo v jedro, še ni povsem pojasnjeno (31, 32).

3 PROTISMISLNI OLIGONUKLEOTIDI KOT MODULATORJI POVEZOVANJA EKSONOV

3.1 DUCHENNOVA MIŠIČNA DISTROFIJA

Duchennova mišična distrofija (DMD (33)) je huda progresivna genska bolezen. Nastopi zaradi mutacij v genu za distrofin (*DMD*), ki se nahaja na spolnem kromosomu X, in v povprečju prizadene enega na 5000 dečkov. Distrofin je strukturni protein, ki v skeletnih mišičnih celicah povezuje citoskelet z distroglikanskim membranskim kompleksom, ta pa omogoča pritrdjevanje celic na zunajcelični matriks. Gen za distrofin je eden najdaljših genov pri človeku (razteza se prek 2,3 milijona baznih parov, kar predstavlja kar okoli 0,08 % človeškega genoma, in je sestavljen iz 79 eksonov), zato so mutacije v tem genu razmeroma pogoste. Večino mutacij predstavljajo delecije eksonov, ki so razlog za premik bralnega okvirja in oblikovanje prezgodnjega zaključnega kodona. To se odraža v odsotnosti distrofina, kar vodi v progresivno pešanje mišic in invalidnost že v otroštvu. V večini primerov bolniki umrejo zaradi zapletov, povezanih z odpovedjo dihalnih mišic, ali kardiomiopatij. Zelo podobno klinično sliko ima redkejša Beckerjeva mišična distrofija (BMD), le da se bolezen pojavi kasneje in na-

Preglednica 1: Izbrani predstavniki protismiselnih oligonukleotidov (ASO), ki delujejo kot modulatorji povezovanja eksonov.
Table 1: Selected splicing-modifying antisense oligonucleotides.

ASO	Terapevtska indikacija ^a	Tarčna pre-mRNA	Mehanizem delovanja	Razvojna faza	Referenca ^b
Nusinersen (ISIS 396443)	SMA	SMN2	Spodbujanje vključitve eksona 7; nastanek funkcionalne izooblike proteina SMN2	Dovoljenje za promet v EU in ZDA	NCT01494701 NCT01703988 NCT01780246 NCT01839656 NCT02052791 NCT02193074 NCT02292537 NCT02386553 NCT02462759 NCT02594124 NCT02865109 NCT03709784
Eteplirsén (AVI-4658)	DMD	DMD	Preskok eksona 51; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	Uporaba pogojno odobrena v ZDA; EMA dovoljenja za promet ni priporočila	NCT00159250 NCT00844597 NCT01396239 NCT01540409 NCT02255552 NCT02286947 NCT02420379 NCT03218995
Drisapersen (PRO051, GSK2402968)			Preskok eksona 51; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	Razvoj ustavljen po F III	NCT01153932 NCT01480245 NCT01803412 NCT01910649 NCT02636686
Golodirsén (SRR-4053)			Preskok eksona 53; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I/II	NCT02310906
Kazimersén (SRP-4045)			Preskok eksona 45; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I	NCT02530905
Kazimersén (SRP-4045) in golodirsén (SRR-4053)			Preskok eksonov 45 ali 53; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F III	NCT02500381 NCT03532542
PRO044 (BMN-044)			Preskok eksona 44; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F II	NCT01037309 NCT02329769 NCT02958202

PRO045 (BMN-045)			Preskok eksona 45; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I/II	NCT01826474
DS-5141b			Preskok eksona 45; vzpostavitev bralnega okvirja, ki vodi do krajše delno funkcionalne oblike proteina distrofina	F I/II	NCT02667483
ASO-021	Alzheimerjeva bolezen	<i>APOER2</i>	Spodbujanje vključitve eksona 19; nastanek funkcionalnega receptorja APOER2	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(22)
"4R to 3R splicing ASO"	Alzheimerjeva bolezen in druge taupatije	<i>tau (MAPT)</i>	Preskok eksona 10; promocija krajše izooblike proteina Tau, manj podvržene fosforilaciji in agregaciji	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(23)
ASO MDM4	Rak	<i>MDM4</i>	Preskok eksona 6; razgradnja transkripta onkogenega MDM4 s prezgodnjim zaključnim kodonom (angl. <i>nonsense-mediated decay</i>)	predklinični dokaz koncepta na več melanomskih celičnih linijah ter na ksenograftih	(24)
ST2	Rak	<i>STAT3</i>	Spodbujanje rabe alternativnega akceptorskega mesta povezovanja v eksonu 23; nastanek proapoptotične izooblike proteina STAT3β	predklinični dokaz koncepta na dveh celičnih linijah raka dojke ter na ksenograftih	(25)
"APO-skip SSO"	Družinska hiperholesterolemija	<i>APOB</i>	Preskok eksona 27; nastanek krajše izooblike proteina APOB, ki zavira sestavljanje LDL	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(26)
AON5 in AON6 (dostava z adenoasociacijskim virusnim vektorjem)	Hipertrofična kardiomiopatija	<i>MYBPC4</i>	Preskok eksonov 5 in 6; nastanek krajše delno funkcionalne oblike proteina cMyBP-C	predklinični dokaz koncepta na mišjem modelu	(27)

^a SMA – spinalna mišična atrofija, DMD – Duchennova mišična distrofija

^b Za klinična vrednotenja so podane identifikacijske številke raziskav iz mednarodne podatkovne zbirke *ClinicalTrials.gov* (<https://clinicaltrials.gov/>)

preduje počasneje. Tudi vzrok BMD so mutacije v genu za distrofin, a te (za razliko od DMD) ne porušijobralnega okvirja. Opažanja, da so krajše oblike distrofina (npr. zaradi delecij nekaterih celotnih eksonov) delno funkcionalne (34), so porodile idejo o terapevtski uporabi ASO za preskakanje posameznih eksonov distrofina pri DMD s ciljem ponovno vzpostaviti pravilni bralni okvir (10) (slika 4A).

Okoli 70 % mutacij, ki izzovejo DMD, zajema delecijo regij gena za distrofin med eksonoma 45 in 55 (15, 35). Izpustitev (preskok) eksona 51 bi teoretično izzval terapevtski učinek pri ~14 % bolnikov z DMD, saj bi omogočil nastanek distrofina, kakršnega opažamo pri bolnikih z BMD (10, 15). V predkliničnih raziskavah, izvedenih na človeških celicah *in vitro* ter na mišjem modelu DMD, so dokazali izvedljivost tovrstnega terapevtskega koncepta; v klinično vrednotenje je vstopilo več učinkovin ASO (36), najbolj znani sta drisapersen ter eteplirsena.

Drisapersen je fosforotioatni, 2'-O-metilirani ASO iz 20 nukleotidov, ki se selektivno veže na ojačevalno zaporedje v eksonu 51 pre-mRNA *DMD* in tako spodbuja preskok tega eksona ter vzpostavitev bralnega okvirja in nastanek krajše, a delno funkcionalne oblike distrofina. Zgodnje klinične raziskave (37, 38), opravljene na majhnih skupinah dečkov z DMD, so nakazovale učinkovitost drisapersena po intramuskularnem ali subkutanem injiciranju, saj so z imunohistokemijsko analizo biopsijskih vzorcev mišic potrdili nastajanje distrofina, udeleženci raziskave pa so izkazovali tudi napredek v šestminutnem testu hoje (6MTH). V drugi fazi kliničnega vrednotenja (študija DEMAND 2 (39)) so primerjali učinkovitost zdravljenja DMD po kontinuirani ali intermitentni subkutani aplikaciji drisapersena in placeba pri 53 dečkih. Po 25 tednih zdravljenja so poročali o statistično značilnem napredku pri 6MTH ter majhnem porastu izražanja distrofina na nivoju mRNA in proteina v skupini, ki je prejela drisapersen. Tretja klinična faza (DEMAND 3 (36)), ki je zajela 186 dečkov z DMD, zdravljenih 48 tednov s 6 mg drisapersena subkutano/kg/teden, ni potrdila učinkovitosti (tj. razlik v 6MTH glede na placebo niso zaznali), a so bili vključitveni kriteriji za študiji DEMAND 2 in 3 različni. Poleg tega so se pri udeležencih pojavili resni neželeni učinki zdravljenja (61 % je utrpelo poškodbe ledvic, pri 2 % sodelujočih je prišlo do hude trombocitopenije), zato so nadaljnji razvoj drisapersena ustavili.

Eteplirsena je morfolinski fosforodiamidatni ASO dolžine 30 nukleotidov, ki se veže na isto vezavno mesto kot drisapersen in ima enak mehanizem delovanja. V zgodnjih kliničnih vrednotenjih intravensko ali intramuskularno apliciranega eteplirsena so potrdili vpliv na spodbujanje nastajanja distrofina z imunohistokemijsko analizo biopsijskih

vzorcev (učinek je bil odvisen od odmerka eteplirsena), ne pa tudi izboljšanja mišične funkcije (40, 41). V kliničnih raziskavah, ki sta zajeli daljše časovno obdobje (48 tednov + nadaljnjih 36 mesecev (42, 43)), so ob vplivu na povečano izražanje distrofina (sicer vsega 0,93-odstotni porast po 180 tednih zdravljenja) poročali tudi o počasnejšem napredovanju bolezni (glede na kontrolno skupino obolelih za DMD primerljive stopnje bolezni in starosti). Resnih neželenih učinkov niso zaznali. Na osnovi teh rezultatov je FDA septembra 2016 po pospešenem postopku pogojno odobrila uporabo eteplirsena za zdravljenje DMD pri bolnikih, kjer je terapevtski učinek moč pričakovati s preskokom eksona 51. Priporočeni odmerek eteplirsena je 30 mg/kg/teden, apliciran z infuzijo. Lastnika tržnega dovoljenja je FDA hkrati zavezala k postmarketinškemu vrednotenju klinične učinkovitosti (do maja 2021), saj sta ključni klinični raziskavi zajeli le 12 bolnikov. Nasprotno je Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini (CHMP) pri EMA maja 2018 izrazil negativno mnenje in ni priporočil odobritve dovoljenja za promet z zdravilom v Evropski uniji (44).

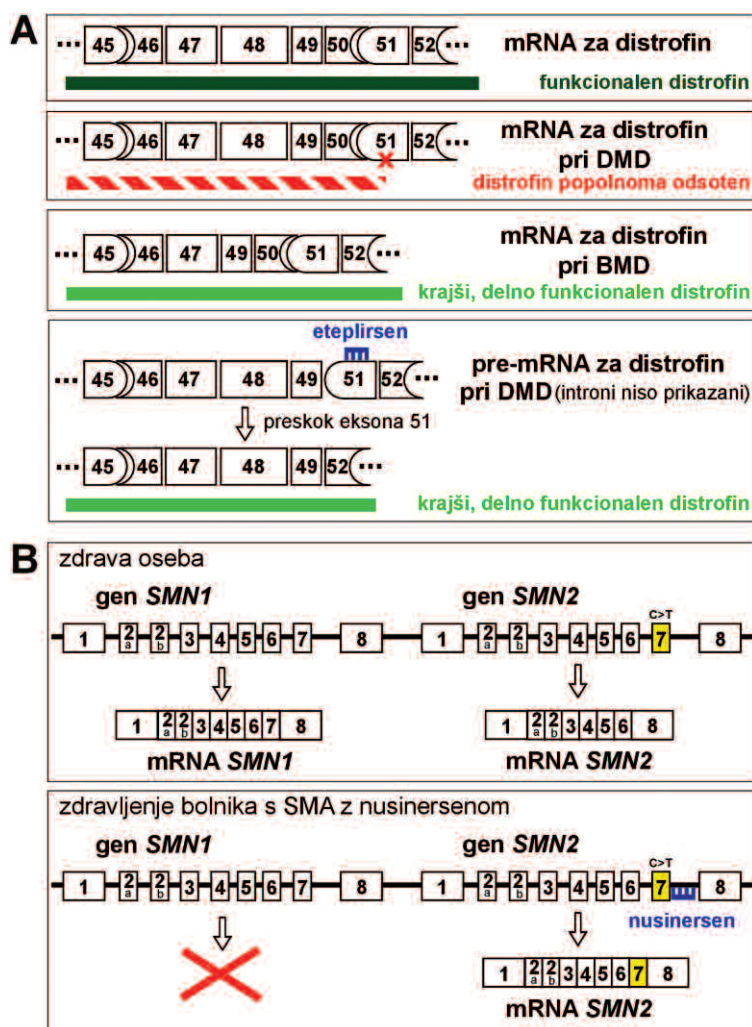
3.2 SPINALNA MIŠIČNA ATROFIJA

Spinalna mišična atrofija (SMA (45)) je avtosomna recesivna genska bolezen z okvirno incidenco 1 na 11.000 rojstev, za katero je značilna progresivna degeneracija motoričnih nevronov. Posledično postopno propadajo mišična vlakna, kar vodi v napredujočo invalidnost in smrt zaradi oslabelosti dihalnih mišic. V 95 % primerov bolezni nastopi zaradi delecij ali mutacij obeh alelov gena *SMN1* (*survival of motor neuron 1*) na kromosomu 5. Protein SMN igra osrednjo vlogo pri procesiranju nevronske pre-mRNA in je ključen za tvorbo izrastkov živčnih celic (aksona in dendritov), potrebnih za prenos signalov med nevroni ter med nevroni in mišičnimi celicami. Človeški kromosom 5 nosi tudi zapis za eno ali več kopij paralognega gena *SMN2*, ki se od gena *SMN1* razlikuje le v nekaj nukleotidih. Biološko najpomembnejša razlika med paralogoma je mutacija citidina v timidin v ojačevalnem zaporedju eksona 7 *SMN2*, saj je odgovorna za spremembo vzorca povezovanja eksonov – v večini prepisov gena *SMN2* pride do preskoka (opustitve) eksona 7 in s tem do zelo omejenega nastajanja (10–15 %) funkcionalnega proteinskega produkta SMN gena *SMN2* (slika 4B). Klinična slika SMA je odvisna od števila kopij gena *SMN2*; pri večjem številu kopij praviloma opazimo manj izrazite simptome bolezni, kar nakazuje, da *SMN2* lahko delno nadomesti odsotnost funkcionalnega gena *SMN1* (46).

Do pred kratkim je bilo zdravljenje SMA le podporno, tj. omejeno na obvladovanje pulmoloških, gastrointestinalnih

in ortopedskih zapletov. Tako **nusinersen**, v ZDA odobren decembra 2016, v Evropi pa šest mesecev za tem, predstavlja revolucijo v zdravljenju SMA. Nusinersen je sintezni ASO, zgrajen iz 18 fosforotioatnih, 2'-O-metoksietiliranih nukleotidov, komplementaren utiševalnemu zaporedju v intronu 7. Z oviranjem vezave zaviralnih trans-delujočih dejavnikov spodbudi vključitev eksona 7 v mRNA *SMN2* (slika

4B), s čimer okrepi nastajanje funkcionalnega proteina SMN (47). V prvi fazi kliničnega vrednotenja (48) so nusinersen vbrizgali pediatričnim bolnikom v enem odmerku (1 mg, 3 mg, 6 mg ali 9 mg) intratekalno ter ovrednotili izražanje SMN v cerebrospinalni tekočini po 9 in 14 mesecih. V skupinah bolnikov, ki so prejeli največja odmerka, so za beležili povprečno 118 % oz. 161 % porasta SMN. V sku-



Slika 4: Mehanizma delovanj ASO pri zdravljenju Duchennove mišične distrofije (DMD) in spinalne mišične atrofije (SMA; prirejeno po (15)). **A.** Ponazoritev povezovanja eksonov v mRNA za distrofin pri DMD (primer nesmiselne točkovne mutacije v eksonu 51, rdeč križec) in Beckerjevi mišični distrofiji (BMD; primer delecije eksona 48) ter modulacija povezovanja eksonov z eteplirsienom (preskok eksona 51) kot terapevtska strategija za zdravljenje DMD. **B.** Ponazoritev povezovanja eksonov v mRNA *SMN1* in *SMN2* ter spodbujanje vključitve eksona 7 *SMN2* z nusinersenom, ki zavira vezavo zaviralnega trans-delujočega dejavnika na intronsko utiševalno zaporedje.

Figure 4: Mechanisms of action of ASOs in treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and spinal muscular atrophy (SMA; adapted from (15)). **A.** Depiction of dystrophin mRNA splicing in DMD (an example of nonsense point mutation in exon 51, red cross) and Becker muscular dystrophy (BMD; an example of in-frame exon 48 deletion), and modulation of splicing with eteplirsien (induction of exon 51 skipping) as a therapeutic strategy for DMD. **B.** Depiction of *SMN1* and *SMN2* mRNA splicing, and promotion of *SMN2* exon 7 inclusion with nusinersen, which blocks the binding of trans-acting splicing repressor to the intronic splice silencer, as a therapeutic strategy for SMA.

pini, ki je prejela 9 mg nusinersena so poročali tudi o izboljšanju motoričnih funkcij (ocenjeno po razširjeni Hammersmithovi lestvici gibalnih sposobnosti) v primerjavi s stanjem pred začetkom zdravljenja. Resnih neželenih učinkov niso zaznali. Učinkovitost in varnost nusinersena so potrdili tudi v raziskavi druge faze (49), ki je zajela 20 pediatričnih bolnikov (dojenčkov starosti med tremi tedni in sedmimi meseci). V tem primeru so bolniki prejeli nusinersen v obdobju 32 mesecev (1., 15., 85. dan (po 6 ali 12 mg) in 253. dan ter nato vsake štiri mesece (po 12 mg)). Večina sodelujočih otrok je izkazovala napredek v razvoju in izboljšane motorične funkcije (glede na siceršnji pričakovani potek bolezni) ter ni potrebovala pomoči pri dihanju. Nekateri otroci so celo sedeli samostojno ali se samostojno prevahili na bok, funkcije rok in nog ter gibanje glave so se izboljšali. V živčnem tkivu treh od štirih sodelujočih, ki so med raziskavo umrli (kar pa ni bila posledica neželenih učinkov zdravljenja), so potrdili dva- do šestkrat višje nivoje mRNA SMN2 z eksonom 7 (v primerjavi z otroki, ki niso bili vključeni v raziskavo) kot tudi višjo koncentracijo proteina SMN. Tretji fazi kliničnega vrednotenja (ENDEAR (50) in CHERISH (51)) sta zajeli 121 dojenčkov s SMA oz. 126 otrok, pri katerih so se simptomi bolezni pojavili po šestem mesecu starosti. V obeh primerih je zdravljenje potekalo več kot eno leto (13 oz. 15 mesecev), udeleženci so prejeli po 12 mg nusinersena intratekalno ali placebo v štirih oz. šestih odmerkih. Tudi tokrat se je nusinersen izkazal za razmeroma varno učinkovino. V raziskavi ENDEAR so dosegli klinično izboljšanje motoričnih funkcij pri 51 % prejemnikov nusinersena (v primerjavi z 0 % v skupini, ki je prejela placebo). Tudi v raziskavi CHERISH so bili izsledki spodbudni: po 15 mesecih zdravljenja so zabeležili napredek v motoričnih funkcijah pri bolnikih, ki so prejeli nusinersen (ocenjen kot porast v obsegu $3,9 \pm 0,49$ točke po razširjeni Hammersmithovi lestvici gibalnih sposobnosti glede na začetno vrednost, medtem ko je motorična funkcija v skupini, ki je prejela placebo, upadla (znižala se je za $-1,0 \pm 0,76$ točke)). Z nusinersenom od marca 2017 zdravijo pediatrične bolnike s SMA tudi na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (52).

4 SKLEP

Modulacija povezovanja eksonov s protismiselnimi oligonukleotidi je nova, še ne uveljavljena terapevtska strategija,

ki obljublja možnost spopadanja s številnimi neozdravljivimi genskimi boleznimi. Relativno kratko nukleotidno zaporedje, komplementarno cis-regulatornim regijam pre-mRNA, zagotavlja visoko selektivnost delovanja ASO. Pri tem je pomembno zavedanje, da modulacija povezovanja eksonov ne omogoča zdravljenja bolezni, temveč zgolj blaženje simptomov, saj je učinek ASO reverzibilen (za razliko od eksperimentalnih oblik genskega zdravljenja, ki slonijo npr. na urejanju genov s tehnologijo CRISPR/Cas (53)). Na reverzibilnost učinka lahko gledamo tudi kot na prednost – učinek »zgrešitve želene tarče« (*off-target effect*) na nivoju RNA je namreč nepomemben, če pa pride do poškodbe DNA, je to za celico lahko usodno ali pa (v primeru inaktivacije tumor-supresorskih genov) privede celo do pojava neoplazij.

Precejšnje oviro pri vrednotenju učinkovitosti ASO predstavlja dejstvo, da jih razvijajo za zdravljenje redkih bolezni, kar otežuje rekrutiranje homogenih populacij bolnikov (npr. podobne starosti, z enakimi ali podobnimi genetskimi napakami in stopnjo bolezni). Iz etičnih razlogov se včasih odločijo za kontrolno skupino bolnikov z genetsko napako, kjer terapevtskega učinka po zdravljenju z ASO ni moč pričakovati, a razlike v genetskem ozadju so lahko vzrok različnim manifestacijam bolezni. Hkrati je vprašljiva tudi ustreznost prognostičnih označevalcev, kot je primer nivojev distrofina (mRNA ali proteina) za napovedovanje terapevtskega učinka ASO pri zdravljenju DMD. To so bili tudi poglavitni očitki Odbora za zdravila za uporabo v humani medicini (CHMP, EMA), ki je zavrnil registracijo eteplirsena (54). Po drugi strani je neprepričljivo učinkovitost eteplirsena v primerjavi z nusinersenom mogoče pojasniti tudi s konceptualno razliko v mehanizmi delovanja obeh ASO: nusinersen spodbuja nastanek polno funkcionalnega proteina SMN, medtem ko eteplirsen omogoča le nastanek delno funkcionalne, skrajšane oblike distrofina (zato je pričakovani terapevtski učinek že v osnovi bistveno manjši (10)). Na učinkovitost ASO nenazadnje vpliva tudi sekundarna struktura tarčne RNA, ki lahko močno omeji sposobnost asociacije s cis-regulatornimi elementi in s tem možnost tekmovanja za vezavo s trans-delujočimi regulatorji povezovanja eksonov ali spajalnim telescem. Ob izjemno visokih neposrednih stroških zdravljenja z ASO (npr. cena enega odmerka nusinersena znaša 125.000 USD, tj. 625.000–750.000 USD za prvo leto zdravljenja in nato po 375.000 USD za vzdrževalne odmerke vsako nadaljnje leto (55), oz. 270.000 EUR/leto (15)) je razumljivo, da se med deležniki pogosto postavlja vprašanje stroškovne učinkovitosti te skupine zdravil.

5 LITERATURA

1. Papasaïkas P, Valcarcel J. The spliceosome: the ultimate RNA chaperone and sculptor. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(1):33-45.
2. Hang J, Wan R, Yan C, Shi Y. Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science.* 2015; 349(6253):1191-8.
3. Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA.* 2008;14(5):802-13.
4. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008; 40(12):1413-5.
5. Gallego-Paez LM, Bordone MC, Leote AC, Saraiva-Agostinho N, Ascensao-Ferreira M, Barbosa-Morais NL. Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige. *Hum Genet.* 2017;136(9):1015-42.
6. Gueroussov S, Gonatopoulos-Pournatzis T, Irimia M, Raj B, Lin ZY, Gingras AC et al. An alternative splicing event amplifies evolutionary differences between vertebrates. *Science.* 2015;349(6250):868-73.
7. Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet.* 2016;17(1):19-32.
8. Baralle D, Buratti E. RNA splicing in human disease and in the clinic. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(5):355-68.
9. Ohno K, Takeda JI, Masuda A. Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(1):
10. Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6549-63.
11. Kishore S, Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science.* 2006;311(5758):230-2.
12. Bratkovič T, Modic M, Camargo Ortega G, Drukker M, Rogelj B. Neuronal differentiation induces SNORD115 expression and is accompanied by post-transcriptional changes of serotonin receptor 2c mRNA. *Sci Rep.* 2018;8(1):5101.
13. Sperling J, Azubel M, Sperling R. Structure and function of the pre-mRNA splicing machine. *Structure.* 2008;16(11):1605-15.
14. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(1):14-26.
15. Goyal N, Narayanaswami P. Making sense of antisense oligonucleotides: a narrative review. *Muscle Nerve.* 2018;57(3):356-70.
16. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002;1(5):347-55.
17. Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(6):374-87.
18. Iannitti T, Morales-Medina JC, Palmieri B. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity. *Curr Drug Targets* 2014;15(7):663-73.
19. Hagedorn PH, Persson R, Funder ED, Albaek N, Diemer SL, Hansen DJ et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov Today.* 2018; 23(1):101-14.
20. Amantana A, Iversen PL. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(5):550-5.
21. Stein CA, Castanotto D. FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Mol Ther.* 2017;25(5):1069-75.
22. Hinrich AJ, Jodelka FM, Chang JL, Brutman D, Bruno AM, Briggs CA et al. Therapeutic correction of ApoER2 splicing in Alzheimer's disease mice using antisense oligonucleotides. *EMBO Mol Med.* 2016;8(4):328-45.
23. Schoch KM, DeVos SL, Miller RL, Chun SJ, Norrbom M, Wozniak DF et al. Increased 4R-Tau induces pathological changes in a human-Tau mouse model. *Neuron.* 2016;90(5):941-7.
24. Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, Bezzi M, Teo SX, Low DH et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest.* 2016;126(1):68-84.
25. Zammarchi F, de Stanchina E, Bournazou E, Supakorndej T, Martires K, Riedel E et al. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(43):17779-84.
26. Disterer P, Al-Shawi R, Ellmerich S, Waddington SN, Owen JS, Simons JP et al. Exon skipping of hepatic APOB pre-mRNA with splice-switching oligonucleotides reduces LDL cholesterol in vivo. *Mol Ther.* 2013;21(3):602-9.
27. Geddicke-Hornung C, Behrens-Gawlik V, Reischmann S, Geertz B, Stimpel D, Weinberger F et al. Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in Mybpc3-targeted knock-in mice. *EMBO Mol Med.* 2013;5(7):1128-45.
28. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010; 24(15):1634-44.
29. Rigo F, Chun SJ, Norris DA, Hung G, Lee S, Matson J et al. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;350(1):46-55.
30. Miller CM, Tanowitz M, Donner AJ, Prakash TP, Swayze EE, Harris EN et al. Receptor-mediated uptake of phosphorothioate antisense oligonucleotides in different cell types of the liver. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(3):119-27.
31. Lorenz P, Misteli T, Baker BF, Bennett CF, Spector DL. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(2):582-92.
32. Miller CM, Wan WB, Seth PP, Harris EN. Endosomal escape of antisense oligonucleotides internalized by stabilin receptors is regulated by Rab5C and EEA1 during endosomal maturation. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(2):86-96.
33. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health.* 2015;51(8):759-64.
34. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):498-506.
35. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731-40.
36. Niks EH, Aartsma-Rus A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(2):225-36.
37. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007;357(26):2677-86.
38. Goemans NM, Tulinus M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhardt PF, Heuvelmans N et al. Systemic administration of PRO051 in



- Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2011;364(16):1513-22.
39. Voit T, Topaloglu H, Straub V, Muntoni F, Deconinck N, Campion G et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):987-96.
 40. Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C et al. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 2009;8(10):918-28.
 41. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet.* 2011;378(9791):595-605.
 42. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013;74(5):637-47.
 43. Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Shao J et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2016;79(2):257-71.
 44. Aartsma-Rus A, Goemans N. A sequel to the eteplirsen saga: eteplirsen is approved in the United States but was not approved in Europe. *Nucleic Acid Ther.* 2019;29(1):13-15.
 45. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy. *Neurol Clin.* 2015;33(4):831-46.
 46. Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmuller H, Blick S, Baasner A et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet.* 2006;119(4):422-8.
 47. Porensky PN, Mitropant C, McGovern VL, Bevan AK, Foust KD, Kaspar BK et al. A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet.* 2012;21(7):1625-38.
 48. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2016;86(10):890-7.
 49. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet.* 2016;388(10063):3017-36.
 50. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1723-32.
 51. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM et al. Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2018;378(7):625-35.
 52. Osredkar D. Na Pediatrični kliniki pričeli z zdravljenjem otroka s SMA tip I (sporočilo za javnost). 2017; www.kclj.si/dokumenti/spm_Na_Pediatricni_kliniki_priceli_z_zdravljenjem_otroka_s_SMA_tip_I_07032017.pdf. Dostop: 10-01-2019.
 53. Hussain W, Mahmood T, Hussain J, Ali N, Shah T, Qayyum S et al. CRISPR/Cas system: A game changing genome editing technology, to treat human genetic diseases. *Gene.* 2019;685:70-5.
 54. EMA. Znanstveni zaključki in podlaga za zavrnitev zdravlila Exondys (povzetek evropskega javnega poročila o oceni zdravlila). 2018; www.ema.europa.eu/documents/scientific-conclusion/exondys-epar-scientific-conclusions-grounds-refusal_sl.pdf. Dostop: 10-01-2019.
 55. Treating rare disorders: time to act on unfair prices. *Lancet Neurol.* 2017;16(10):761.

Na podlagi sklepa 8. seje izvršnega odbora Slovenskega farmacevtskega društva (v nadaljevanju »Društvo«)
z dne 21. 1. 2019

Slovensko farmacevtsko društvo, Dunajska 184 A, Ljubljana,

objavlja
razpis za zasedbo delovnega mesta
generalni sekretar / sekretarka Društva

Kandidat mora poleg splošnih pogojev, določenih z zakonom, ki ureja delovna razmerja, izpolnjevati še zahteve glede usposobljenosti, kot so določene v tej objavi, in mora biti član Društva.

Zahtevana usposobljenost:

- magister farmacije z najmanj 5 let delovnih izkušenj,
- dobre organizacijske in komunikacijske sposobnosti,
- dobro poznavanje strokovne problematike v farmaciji in zdravstvu ter veljavne zakonodaje s tega področja,
- aktivno znanje slovenskega in angleškega jezika,
- dobra računalniška pismenost,
- samostojnost in kreativnost.

Naloge generalnega sekretarja / sekretarke:

- vodi in organizira delo sekretariata skladno z delovno zakonodajo,
- vodi finančno poslovanje v skladu s sprejetim finančnim planom in pooblastili izvršnega odbora društva,
- skrbi za zakonitost dela sekretariata in organov društva,
- v sodelovanju s pristojnimi organi Društva pripravlja gradiva za seje in organizira seje,
- nudi strokovno in tehnično podporo pri organizaciji vseh prireditev društva, založniške dejavnosti društva, obveščanju članov društva in zainteresirane javnosti,
- spremlja javne razpise in pripravlja razpisno dokumentacijo,
- sodeluje z drugimi ustanovami pri obravnavi problematike s področja farmacije,
- opravlja druga dela, po katerih se potreba pojavlja občasno ali nepričakovano.

Prijava mora vsebovati:

- kratek življenjepis z opisom delovnih izkušenj, pridobljene izobrazbe ter drugih znanj in veščin,
- dokazila o izpolnjevanju pogojev (kopijo diplome),
- vizijo vodenja pisarne društva,
- izjavo, da ni bil pravnomočno obsojen zaradi naklepne kaznivega dejanja in, da ni bil obsojen na nepogojno kazen zaporu v trajanje več kot šest mesecev,
- izjavo, da zoper njega ni vložena pravnomočna obtožnica zaradi naklepne kaznivega dejanja, ki se preganja po uradni dolžnosti.

Z izbranim kandidatom bo Društvo sklenilo pogodbo o zaposlitvi za nedoločen čas s polnim delovnim časom in s poskusno dobo v trajanju šestih mesecev.

Predvideni začetek dela – 1. 9. 2019.

Kandidati/kandidatke pošljejo pisno prijavo s priporočeno pošto v zaprti ovojnici do 20. 5. 2019 na naslov: SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO, Dunajska 184 A, 1000 Ljubljana, s pripisom: Prijava na razpis - NE ODPIRAJ!

Nepopolne in nepravčasno prispеле prijave ne bodo uvrščene v izbirni postopek.

Kandidati bodo o izbiri obveščeni do 30. 6. 2019.



3. STROKOVNO SREČANJE SEKCIJE ZA ZGODOVINO FARMACIJE PO POTI MARIBORSKEGA LEKARNARJA FRANCA MINAŘIKA

3. strokovno srečanje članov Sekcije za zgodovino farmacije Slovenskega farmacevtskega društva je bilo 18. oktobra 2018 v Mariboru. Poimenovali smo ga: »Po poti mariborskega lekarnarja Franca Minařika«.

Tako izpolnjujemo naš cilj, da postopno evidentiramo in obiščemo medicinsko-farmacevtske muzejske zbirke. Magister Dermota je organiziral ogled Pokrajinskega muzeja Maribor pod vodstvom kustosinje ga. Varlove, ki je izpostavila Minařikovo zbirko oziroma lekarno ter nas seznanila s pomenom zbiranja in predaje predmetov ustreznim ustanovam. Posebej se je zahvalila mag. Dermoti za dolgoletno sodelovanje z muzejem pri zbiranju lekarniškega pohištva in posodja. Magister Dermota je tudi najbolj zaslužen, da je Zdravniško društvo iz Maribora zagotovilo odkritje spominske plošče mr. Franca Minařika leta 2018 na zgradbi, v kateri je bila Minařikova lekarna. Na predvečer odkritja spominske plošče je mag. Dermota lastnoročno očistil in pobarval del fasade, na katero so pritrdili spominsko ploščo.

V zahvalo mu je magistra Breda Kosirnik poklonila kopijo knjižice »Črtice iz zgodovine kranjske farmacije« avtorja mr. F. Minařika, ki jo je našla v zasebnem arhivu potomcev družine mr. B. Lavičke, marca 2018.

Knjižica na 97 straneh popisuje zgodovino farmacije Dežele kranjske, od samostanskih lekarn, prvih deželnih lekarn, o nadzoru v lekarnah, navaja splošna poročila starejših ljubljanskih lekarn, lekarniških davkih, finančni položaj lekarnarjev, življenjepisne beležke o ljubljanskih lekarnarjih 17. stol., opis in popis vseh ljubljanskih lekarnarjev tega stoletja, o nastanku kranjskega lekarniškega reda itd. Črtice so izhajale v Apotekarskem vjestniku v Zagrebu med leti 1930 in 1935. Avtorju je tiskarna naredila posebni odtis v katerem so združeni vsi članki. Koliko je bilo izvodov posebnega odtisa se ne ve. Enega je s posvetilom avtor poklonil prijatelju mr. B. Lavički.

Ob predaji knjižice je citirala razmišljanja:

Dr. mr. Hrvoje Tartalja: Lekarništvo se je pojavljalo v zgodovini kot dejavnost in pozneje kot samostojen poklic samo v razmerah civilizacijskega razvoja. Obstoj kake lekarne v času in prostoru je hkrati dokaz za kulturni razvoj kakega kraja ali mesta. Tudi lekarništvo je namreč samo del človekovega razvoja, njegove tehnike, znanosti in kulture. (vir: Od staroslovanskega vraštva do sodobnega zdravlila)

Mr. Minařik: Noben narod ni kulturen, če se ne zanima za svoj lastni razvoj in razvoj svoje kulturne zgodovine, tudi noben poklic, nobena stroka ne predstavlja kulture, če se ne zanima za svoj lastni razvoj.

V popoldanskem času smo si ogledali spominsko ploščo mr. F. Minařiku.



Spominska plošča - mr. Franc Minařik



Udeleženci 3. strokovnega srečanja Sekcije za zgodovino farmacije v Pokrajinskem muzeju v Mariboru

Ob tej priliki je kolega Slavko Rataj povedal anekdoto, ki jo je napisal mr. Štefan Predin v svojem delu *Mariborski lekarnarji skozi stoletja, Mariborske lekarne 1994*, na strani 69 piše :

» Leta 1815 se je lastnik lekarne (Pri črnem orlu) zopet menjal. Bil je to Franc Ksaver Welkhammer, poročen pa je bil s hčerko Hartnaglovih, ki so bili tedaj imoviti mariborski meščani in lastniki sosednje hiše, ki meji na Lekarniško ulico. Še danes Hartnaglovo hišo povezuje obok z lekarniško hišo. Na Hartnaglove še danes spominja spominska plošča vzdana na steni njihove hiše v Lekarniški ulici.

Welkhammer pa je že leta 1818 umrl in lekarna je prišla v last njegove tašče Terezije, o kateri je Minařik napisal zanimivo zgodbo. Ko je Minařik dal leta 1929 lekarniške prostore prepleskati – tedaj je bil že lastnik te lekarne, so na steni, ki je bila dotlej zakrita s policami, odkrili podobo žen-

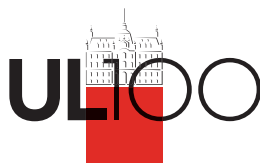
ske, ki je bila podobna mački. Ob sliki so bili zapisani še podatki o družinah Hartnagl in Welkhammer.

Podoba naj bi po izjavi neke Hartnaglove sorodnice predstavljala staro gospo Terezijo, ki jo je dal upodobiti njen provizor farmacevt Kranjc. Ta se z lastnico lekarne ni dobro razumel, ker bi se naj vtikala v njegove poslovne in strokovne zadeve; zato bi naj pri pleskanju prostorov prav on dal naslikati to podobo.

Kranjc je bil sposoben farmacevt in dober analitik, saj so mu zaupali analizo blejskega vrelca.

Morda je Hartnaglova tudi iz teh razlogov lekarno že leta 1821 prodala Dunajčanu Francu Freystaetterju. Ta pa jo je že po sedmih letih – imenovala se je tedaj Lekarna pri cesarskem orlu – prodal Celjanu Francu Ksaverju Baumbachu.«

Darja Frankič, Breda Kosirnik



Klub alumnov UL Fakultete za farmacijo

Bliža se 60-letnica študija na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Ob tej priložnosti bi radi še v večji meri navezali stik z našimi diplomanti, zato vas vabimo, da se pridružite Klubu alumnov UL Fakultete za farmacijo (<http://www.ffa.uni-lj.si/fakulteta/alumni>). Klub je namenjen diplomantom vseh programov in vseh generacij UL Fakultete za farmacijo in diplomantom programa farmacija na vseh njenih predhodnicah. Klub deluje v sklopu Alumni UL, ki predstavlja mrežo vseh klubov alumnov Univerze v Ljubljani.

V Klub alumnov se včlanite na spletnem portalu Alumni UL (<https://alumniul.online/>), preko katerega poteka tudi vsa komunikacija z našimi člani.

Prednosti včlanitve na spletnem portalu Alumni UL:

- Neposreden stik z drugimi alumni, obujanje spominov s sošolci,
- mreženje in iskanje novih poslovnih priložnosti,
- spremljanje aktivnosti in dogodkov, namenjenih alumnom UL,
- mentorski program za prenos znanja,
- pregled zaposlitvenih možnosti s spremljanjem objavljenih delovnih mest,
- koriščenje ugodnosti, ki jih Univerza v Ljubljani in njene članice nudijo alumnom UL.



Želimo si, da Fakulteta za farmacijo ostane del vašega življenja tudi po koncu študija.

79th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Abu Dhabi,
United Arab Emirates
22 - 26 September 2019

New horizons for
pharmacy –
Navigating winds
of change



več o 79. FIP kongresu 2019:

<https://abudhabi2019.congress.pharmacy/>