

Farmacevtski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 4 • D E C E M B E R 2 0 0 5 • L E T N I K 5 6

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Andrijana Tivadar

Uredniški odbor

Tajda Gala Miharija

Stanko Gobec

Katja Gombač Aver

Iztok Grabnar

Janja Marc

Franc Vrečer

Izdajateljski svet

Stane Srčič

Mojca Kerec

Tatjana Kogovšek Vidmar

Mateja Malešič

Zofija Vitkovič

Anamarija Zega

Magda Zimic

Naslov uredništva / Adress of the Editorial Office:

Farmacevtski vestnik, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana,

telefon/phone: 386 1 476 95 00

Farmacevtski vestnik izdaja Slovensko farmacevtsko društvo,

Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja štirikrat letno.

Letna naročnina je 15.000 SIT, za člane SFD je vključena v članarino.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Avtor fotografije na naslovnici, Silvo Koder

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 2900 izvodov

Letnik 2005 sofinancira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS

Farmacevtski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published quarterly by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 15.000 SIT other countries US\$ 100.

Farmacevtski vestnik is regularly abstracted in:

BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

Obljuba dela dolg! V prejšnji številki smo najavili prihod preglednega članka o ptičji gripi in zdravilnih učinkovinah, ki delujejo kot učinkoviti inhibitorji virusne nevraminidaze. Boštjan Debeljak v uvodnem članku opisuje lastnosti virusa influence-A in nakazuje možnosti preprečevanja in zdravljenja bolezni. V drugem članku avtorici Rozman Petreka in Sollner Dolenc natančno opredeljujeta različne tipe gripoznih stanj, razložen je mehanizem vstopa virusa v organizem, predvsem pa so podane novosti pri zdravljenju virusnih obolenj z inhibitorji virusne nevraminidaze. Bojimo se pandemije in 29. januarja, ko se v kitajskem novem letu pričnejo množične migracije prebivalstva na Kitajskem. Ali je Slovenija na to pripravljena? Ali imamo farmacevti izdelan krizni plan oskrbe z zdravili v primeru izbruha pandemije? Vprašnja so namenjena odgovornim osebam v lekarnah, veldrogerijah, na Ministrstvu za zdravje. O paracetamolu vemo veliko, a vedno znova se sprašujemo, kako varna je ta zdravilna učinkovina. V članku so podane farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti paracetamola in ukrepi pri zastrupitvah. Samo upamo lahko, da se zaradi sprememb v novem Zakonu o zdravilih število zastrupitev in smrtnih primerov zaradi prekomernega odmerjanja paracetamola ne bo bistveno zvišalo. Ali so opzori, ki jih naslavljam o farmacevtih, zamen? Naj se nam ne zgodi farmacevtska »tragedija diskoteke Lipa«, da nam bodo prisluhnili! V nizu si sledijo trije članki o diagnostiki in zapletih pri sladkorni bolezni, izjemno razširjeni bolezenski tegobi sodobnega sveta. Po oceni svetovne zdravstvene organizacije obsega sladkorna bolezen okoli 140 milijonov bolnikov, smrtnost zaradi sladkorne bolezni pa je v razvitem svetu na sedmem mestu. O obeh oblikah sladkorne bolezni in zapletih, ki nastanejo zaradi kronične narave te bolezni, si preberite v Farmacevtskem vestniku.

In nenazadnje, zakoračili smo v novo leto 2006. Želim vam obilo zdravja, osebne sreče in uspehov. »Carpe diem«, ki naj velja na začetku leta, naj bo letošnje geslo nas, farmacevtov.

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

Vsebina

Borut Štrukelj Beseda gostujočega urednika	213
--	------------

Pregledni članki – Review Articles

Boštjan Debeljak Grožnja ptičje gripe The threat of avian influenza	215
--	------------

Tanja Rozman Peterka, Marija Sollner Dolenc Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze Influenza and viral neuraminidase inhibitors	221
--	------------

Tadeja Dolinar, Aleš Mrhar Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo? Paracetamol – effective and safe medicine?	229
--	------------

Jana Lukač Bajalo novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni New criteria in laboratory diagnosis and monitoring of diabetes mellitus	241
---	------------

Borut Božič sladkorna bolezen in avtoimunost Diabetes and autoimmunity	250
---	------------

Darko Černe Klinična biokemija pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni Medical biochemistry assessment of renal diseases in diabetes mellitus	254
---	------------

Katja Kristan, Tea Lanišnik Rižner 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases – potential pharmacological targets	259
--	------------

<i>Zanimivosti iz stroke</i>	269
-------------------------------------	------------

Novice iz sveta farmacije

Aleš Mlinarič
Prve Študijske lekarne v Sloveniji

<i>Iz društvenega življenja</i>	272
--	------------

Saša Baumgartner
PAT - procesno-analizne tehnologije - poročilo s 17. posvetovanja Tehnološke sekcije

Razpis za podelitev društvenih priznanj
Program strokovnih prireditev v letu 2006
Zahvala recenzentom
Letno kazalo

214 farm vestn 2005; 56

Grožnja ptičje gripe

The Threat of Avian Influenza

Boštjan Debeljak

Povzetek: Virusi influence-A s svojo sposobnostjo genskih mutacij, izraženih predvsem na površinskih glikoproteinih hemaglutininu in nevraminidazi predstavljajo stalno grožnjo ljudem. Virus H5N1 je sicer povzročitelj zoonoze in zaenkrat le izjemoma preide na človeka. Vendar pa je v takih primerih smrtnost za posledicami respiratornih simptomov gripe izredno visoka. Preventivni ukrepi, uporaba zdravil, ki delujejo na viruse influence-A in razvoj učinkovitega cepiva naj bi zavrla pretečo nevarnost.

Ključne besede: aviarna, influenza, amantadin, rimantadin, zaviralci nevraminidaze, zanamivir, oseltamivir

Abstract: Due to their high potential for genetic mutation, mainly expressed in the surface glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase, influenza A viruses pose a constant threat to people. The H5N1 virus normally causes zoonoses and has, as yet, only exceptionally spread to people. However, in people the infection is associated with extremely high mortality due to the respiratory symptoms of influenza. Steps we can take to control this threatening danger include preventive measures, medicines effective against influenza A viruses, and the development of an effective vaccine.

Key words: avian, influenza, amantadine, rimantadine, neuraminidase inhibitors, zanamivir, oseltamivir

1. Uvod-ptičja gripa

Aviarna influenza, bolj znana pod imenom »ptičja gripa«, je nalezljiva živalska bolezen, zoonoza, ki jo povzročajo podvrste virusa influence A. Običajno prizadene ptice, redkeje prašiče. Virusi aviarne influence so visoko species-specifični, a v zelo redkih primerih lahko preidejo z živali na človeka in ga okužijo.

Pri perutnini, najpogostejše kokoših in vodnih pticah, povzročata okužbo z aviarno influenco dve obliki virusa – šibko virulentna in močno virulentna. Okužba s »šibko patogeno obliko« se običajno odraža v blagih znakih (razmršenost perja, padec nesnosti) in pogosto mine neopažena. Znaki pri močno patogeni obliki okužbe pa so dramatični. Zelo hitro se širi v jati, prizadene več notranjih organov ptic, njena smrtnost pa je izredno visoka, saj se pogosto že v 48 urah približa 100 % (1,2).

Zaradi visoke smrtnosti ob sicer izredno redkih primerih prenosa podvrste virusa influence A (H5N1) s ptic na ljudi vodilni zdravstveni znanstveniki in strokovnjaki v svetu opozarjajo na nevarnost preteče pandemije in priporočajo izvajanje vrste ukrepov za njeno preprečitev.

1.1. Virus influence

Virus gripe spada v družino ortomiksovirusov, ima enojno vijačnico RNK in ovojnico.

Njegova RNK je sestavljena iz osmih segmentov in ravno to segmentiranje genoma mu omogoča pogosto in hitro genetsko spreminjanje (variabilnost), kar pomeni mutiranje virusa.

Segmenti RNK kodirajo deset virusnih beljakovin: hemaglutinin (HA), nevraminidazo (NA), nukleoprotein (NP), beljakovini matriksa (M1) in (M2), polimerazne beljakovine (PB1), (PB2) in (PA) ter nestrukturne beljakovine (NS) in (NS) (3).

Virusi so okroglaste oblike, premera 80 do 120 nm, včasih tudi palčasti ali združeni v skupke z različno razporeditvijo beljakovin in glikoproteinov v ovojnici. S površine ovojnice štrlijo v okolico kot bodice (peplomeri) glikoproteini nevraminidaze (NA) in hemaglutinina (HA) ter opravljajo bistveno vlogo v razmnoževanju virusa. Hemaglutinin omogoča zlepljanje eritrocitov ter pripenjanje in prodiranje virusa na/v celice gostitelja. Nevraminidaza pa ima po dosedanjih spoznanjih osrednjo vlogo pri sproščanju virusov iz okužene celice (1,2,3).

1.2. Vrste virusa influence

Virologi delijo viruse influence na 4 vrste (rodove):

Virusi influence-A: Ta vrsta virusov influence je ljudem najnevarnejša. Njihov genom predstavlja enojna vijačnica RNK iz 8 segmentov, ki se močno razlikujejo po svojih antigenskih značilnostih. Le-ti pogosto mutirajo in se premeščajo. Posamezne podvrste običajno napadajo le specifično vrsto gostitelja, saj so nanjo prilagojeni. Virusi influence-A lahko okužijo sesalce (ljudi, svinje, konje, mačke-divje in domače, vodne sesalce) in številne ptičje vrste. Primarni rezervoar vseh virusov influence-A so ravno vodne ptice in ptice obrežnih področij in kot kažejo podrobnejše primerjalne genetske raziskave, se je filogenetski prednik vseh današnjih virusov pojavil ravno med vodnimi pticami (najverjetneje racami ali čigami).

Pri tipizaciji virusov influence-A je pomembno ugotavljanje in razlikovanje antigenskih značilnosti njihovih površinskih beljakovin – glikoproteinov nevraminidaze (NA) in hemaglutinina (HA). Trenutno lahko ločijo 16 različnih podvrst virusa A glede na hemaglutinin in 9 podvrst glede na nevraminidazo. Znotraj ene same podvrste se tako lahko pojavljajo različni sevi (3).

Za ustrezno identifikacijo je potrebno natančno poimenovanje virusov v dogovorjenem zaporedju:

- kraj izolacije,
- zaporedna številka izolata (seva)
- leto izolacije
- ime podvrste glede na hemaglutinin in nevraminidazo.

Primeri: A/Hong Kong/1/68(H3N2); A/California/7/2004(H3N2)

Sevi, ki so bili izolirani iz živali (torej nečloveški sevi) vsebujejo za imenom vrste tudi navedbo gostitelja.

Primeri: A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8); A/equine/Miami/2/63 (H3N8) (3,6).

Za ljudi so najpomembnejše naslednje podvrste virusa influence A: glede na hemaglutinin (H1, H2, H3 in H5), glede na nevraminidazo (N1 in N2).

Virusi influence-B: tudi njihov genom ima 8-segmentno, enovijačno RNK. Prizadenejo le ljudi in niso tako virulentni.

Delijo jih v dve podvrsti in sicer B/Victoria in B/Yamagata (3).

Virusi influence-C: za razliko od virusov influence –A in –B imajo genom sestavljen iz 7 linearnih enovijačnih segmentov RNK. V svoji ovojnici imajo glikoprotein HEF (površinski-Hemaglutinin-Esteraza-Fuzijski-protein), ki virusom omogoča tako pripenjanje na celice gostitelja, prodiranje vanje (fuzijo), kot tudi poznejše sproščanje novonastalih virusov iz okuženih celic. Z virusi influence-C se okužijo lahko ljudje in prašiči, vendar kot povzročitelji bolezni ne igrajo bistvene vloge, saj lahko izzovejo le obolenja blagih oblik.

Trenutno ne poznamo nobenih podvrst virusov influence-C.

Togavirusi: njihov genom sestavlja 6 linearnih enovijačnih segmentov RNK. Ne okužijo ljudi, najdemo jih v klopih, komarjih in nekaterih sesalcih (mungih). Navajamo jih le kot predstavnike družine ortomiksovirusov, ki pa pri gripi ne igrajo nobene vloge (3,4).

1.2.1. Antigeni odmik

Pogoste mutacije nukleotidov na kodirajočih delih genoma, ki vsebujejo zapis za glikoproteina hemaglutinin (HA) in nevraminidazo (NA) imenujemo antigeni odmik (antigenic drift). Takšne mutacije imajo za posledico spremembe površinskih antigenov virusov influence. Lahko se zgodi, da obstoječa človeška protitelesa novih antigenov ne prepoznajo, četudi so zanje pogosto značilne le minimalne strukturne spremembe, zato lahko pride do okužbe z novo varianto virusa gripe. Človek takšne okužbe s številnimi različicami virusa gripe doživi in preboli večkrat v življenju, beležimo pa jih kot epidemije in regionalno omejene izbruhe bolezni (3).

1.2.2. Antigeni premik

V primeru, ko je organizem naenkrat okužen z dvema podvrstama/variantama virusa influence (dvojna okužba), obstaja možnost, da v okuženi celici ob sestavljanju na novo proizvedenega genetskega »materiala« v virione pride do prerazporeditve genetskih segmentov (2 x 8 segmentov RNK) (ang. gene reassortment; nem. Neuarrangement). Prerazporeditev genov lahko poteče tako v človeškem organizmu, kakor tudi pri drugih gostiteljih, kot so na primer ptice ali prašiči. Teoretično obstaja $2^8 = 256$ kombinacij takšnih pre-

razporeditev. Večje spremembe virusnega genoma, imenovane antigeni premik, se na srečo dogajajo razmeroma redko. Vendar pa zaradi nastanka novih virulentnih virusov, za katere so značilni novi površinski antigeni, zoper katere ljudje še niso razvili protiteles, obstaja resna nevarnost pandemij. V takšnih primerih govorimo pravzaprav o mutacijah virusa influence in v zadnjih stoletjih so zabeležili kar nekaj velikih epidemij in pandemij, ki so prizadele evropsko in svetovno populacijo:

- 16. in 17. stoletje pogoste (na nekaj let) epidemije gripe v Angliji in večjem delu Evrope,
- 18. stoletje epidemije v Rusiji in Vzhodni Evropi, pa tudi Severni in Južni Ameriki,
- 19. stoletje epidemija v Rusiji, vzhodni Evropi in Srednji Evropi (razprave o tem, ali so bili povzročitelji bakterije ali virusi), do sedaj najboljsežnejša in najtežja pandemija influence, tako imenovane »španske gripe« v Evropi in svetu, za katero je obolelo 700 milijonov ljudi, število umrlih pa ocenjujejo na 20 do 50 milijonov(!). Izvor bolezni je bil najverjetneje v ZDA., prvič so dokazali virus influence (vrste A, B in C) epidemija »azijske gripe«, ki je povzročila okrog 1 milijon smrtnih žrtev,
- 1918-1923 epidemija »Hongkongške gripe«; 3/4 do 1 milijon mrtvih,
- 1933 epidemija »Ruske gripe«; okrog 3/4 milijona mrtvih (3,5).
- 1957/1958
- 1968/1969
- 1976/1977

1.3 Nevarnost prehoda med vrstami

Ptičji virus gripe H5N1 zaenkrat le izjemoma prehaja s človeka na človeka, vendar pa obstaja možnost, da tako sposobnost pridobi. Zaradi visoke smrtnosti po okužbi, predstavlja taka možnost veliko grožnjo človeštvu.(7)

Hemaglutinini sevov ptičjih virusov influence prepoznajo specifične sladkorne verige glikoproteinov izraženih na površini celic prebavnega trakta ptic, hemaglutinini človeških sevov pa specifične vezi v sladkorni verigi glikoproteinov epitelnih celic respiratornega trakta. Obema vrstama sevov omenjene interakcije omogočajo pritrjevanje ob vdoru v celice gostitelja. Celice prašičjega sapnika pa izražajo oba specifična tipa vezi glikoproteinov $\alpha 1,3$ in $\alpha 1,6$ in zato lahko služijo kot idealno »delovno okolje« za nastanek novih virusov z antigenim premikom (prerazporeditev genov v »dvojno okuženem« prašiču). Takšen »uspešen« stik s prašičem bi imel lahko za človeka usodne posledice.

Obstaja tudi možnost, da se z virusom ptičje gripe H5N1 okuži prašič, v njegovih celicah pa pride po okužbi do antigeneskega odmika (mutacije), ki bi bila lahko usodna za prehod v človeka.

Ker je v zelo redkih primerih že prišlo do neposredne okužbe/prehoda virusa aviarne influence H5N1 s ptice na človeka, je možno tudi to, da bi se antigeni premik zgodil kar v človeku (z dvojno okužbo), ali pa, da bi po okužbi samo z virusom H5N1 v njegovih respiratornih celicah prišlo do genskega odmika. V obeh omenjenih primerih pa bi moral novi virus pridobiti možnost prenosa s človeka na človeka.(4)

Strokovnjaki se danes ne sprašujejo več, ali bo do razvoja visoko virulentnega, človeštvu nevarnega virusa influence-A prišlo, temveč kdaj in kje in kako bi njegovo nevarno širjenje čim prej omejili, oziroma preprečili.

2.1 Širjenje aviarnе influence

Trenutno največjo pozornost in ukrepe posvečajo ravno močno patogenemu virusu aviarnе influence H5N1, ki so ga prvič izolirali leta 1996 na farmi gosi v provinci Guandong na Kitajskem. Že naslednje leto (1997) je bila dokazana okužba 18 ljudi v Hong Kongu, od katerih jih je 6 umrlo.

V prvem valu se je virus širil po jugovzhodni Aziji (sredina leta 2003 do marca 2004) med perutnino, poročali pa so tudi o posameznih okužbah in smrtnih primerih med ljudmi.

V drugem valu (od junija do novembra 2004) so ugotavljali, da postaja virus vse bolj smrtno nevaren za sesalce, poročali pa so tudi o smrtnosti med divjo vodno perjadjo, ki je naravni rezervoar bolezni.

Avgusta 2004 so Kitajci zabeležili omejeno okužbo prašičev z virusom H5N1, oktobra pa je virus prizadel tigre v živalskih vrtovih na Tajskem. Ravno tako v oktobru so v Evropi (Bruselj) potrdili okužbo dveh orlov, ki so ju ilegalno uvozili s Tajske, s tem močno patogenim virusom. Istega meseca so ugotovili, da domače race lahko predstavljajo »tihi rezervoar«, saj so lahko odporne prenašalke virusa, ki ga v velikih količinah z izločki spuščajo v okolico. Istočasno so poročali tudi o posameznih smrtnih primerih med ljudmi, predvsem na Tajskem in v Vietnamu.

V tretjem valu, od decembra 2004 do konca oktobra 2005 (datum poročila WHO) pa so poročali tako o izbruhih ptičje gripe v posameznih azijskih državah (Indonezija, Tajska, Vietnam, Kitajska), kot o njenem nadzoru (Malezija). V juliju so na Kitajskem odkrili obstoj še virulentnejšega seva virusa H5N1 ter pričeli omenjati možnost širitve po zimskih selitvenih poteh ptic. Domneve so se praktično potrdile, saj so okuženost ptic do oktobra dokazali nato v Rusiji (Zahodna Sibirija, v več regijah), Kazahstanu, Tibetu, Mongoliji, Turčiji, Romuniji in na Hrvaškem. Istočasno so iz azijskih držav poročali tudi o okužbah ljudi, med katerimi je do začetka novembra znanih skupaj 125 primerov, od tega 64 smrtnih (Kambodža, Indonezija, Tajska Vietnam). (7,8,9) Raziskave so potrdile verjetnost prehoda virusa med ljudmi (hči-mati) s smrtnim izidom na Tajskem, ki pa se je zgodil že septembra 2004 (7).

Kljub poginu in pokončanju približno 150 milijonov ptic ocenjujejo, da je virus aviarnе influence (H5N1) endemično prisoten na več področjih v Indoneziji in Vietnamu, ter na posameznih področjih Kambodže, Kitajske, Tajske in verjetno tudi Laosa. Nadzor nad boleznijo med perutnino bo po pričakovanjih trajal še nekaj let (1).

2.2 Preventivni ukrepi

Ptice obvodnih področij vzhodne Azije, pogosto divje race, so naravni rezervoar in prenašalke virusa visoko patogene aviarnе influence (Highly Pathogenic Avian Influenza). Virus lahko izločajo s slino, nosnim sekretom in fekalnimi izločki. Pogosto so le prenašalke virusa ali pa imajo blage bolezenske simptome, za domačo perjad pa je okužba močno patogena, saj že v enem dnevu lahko sproži obsežen pogin

okuženih živali. Z zimskimi migracijami ptic se je pričela bolezen širiti tudi v evropski prostor (7,10).

Ker je ob prostem gibanju divjih ptic nevarnost kontaktne ali oralno-fekalne okužbe (z okuženo vodo, hrano ali tlemi) domače perutnine povečana, velja kot prvi ukrep gojitev perutnine v zaprtih prostorih in dosledno upoštevanje strogih higienskih ukrepov. Okužba se lahko širi preko okužene opreme, kletk, vozil, krme ter obutve in oblačil zaposlenih, oziroma drugih prisotnih oseb. Visoka temperatura virus uniči, nizke temperature pa njegovo preživetje podaljšajo.

V Vzhodni Aziji predstavljajo nevarnost širjenja velike farme perjadi v ruralnih področjih ter odprte tržnice, kjer perutnino in jajca pogosto prodajajo v neustreznih pogojih. V Aziji igrajo pomembno vlogo tudi močno priljubljeni petelinji boji, saj peteline v ta namen pogosto prevažajo iz pokrajine v pokrajino ali tihotapijo preko državnih meja (10).

V Republiki Sloveniji je dolžan veterinarski inšpektor v primeru dokazane (uradno potrjene) prisotnosti aviarnе influence odrediti:

- ukrepe po potrditvi na okuženem gospodarstvu (med drugim usmrtnitev in neškodljivo uničenje vse perutnine na okuženem gospodarstvu),
- določiti okuženo območje (s polmerom najmanj 3 km) in ogroženo območje (s polmerom najmanj 10 km),
- ukrepe na okuženem območju in
- ukrepe na ogroženem območju,
- ter še vrsto drugih ukrepov, med katere sodi tudi obveščanje (11).

Veterinarska služba prične tudi z izvajanjem drugih postopkov na okuženih in ogroženih območjih (11a).

2.3 Prenos virusov aviarnе influence na človeka

Stik z obolelimi pticami ali površinami, okuženimi s perjem, slino ali njihovi drugimi izločki, predstavljajo največji dejavnik tveganja pri prenosu virusa aviarnе influence s ptic na človeka.

Način prenosa na ljudi je še vedno neznan. Kaže, da so majhni otroci še posebej občutljivi. Domnevajo tudi, da za okužbo zadostuje že vdihavanje delcev okuženega prahu ali blata.

Po drugi strani pa velja dejstvo, da več deset tisoč nezaščitenih delavcev na perutninskih farmah v Aziji ni imelo nikakršnih težav. Do sedaj je bilo okuženih premajhno število ljudi, da bi lahko podrobneje sklepali o vseh morebitnih dejavnih tveganja. (10)

Pri potovanju na področja, kjer je prisotna okuženost z aviarno influenco, priporočajo ljudem preventivno obnašanje:

- Izogibanje stikov s perutnino, tako navidezno zdravo, kot bolnimi in mrtvimi živalmi. Izogibanje farmam s perjadjo, tržnicam s perutnino in površinam, kontaminiranim s ptičjimi izločki ali iztrebki.
- Skrbno in pogosto umivanje rok z milom in vodo. Če ni na razpolago čiste vode, so za umivanje rok primerna tudi razkužila na osnovi alkohola.
- Ker virus ptičje gripe uničuje povišana temperatura, mora biti vsa hrana in jajca dobro prekuhana, oziroma prepečena. Izogibajo naj se izdelkom iz surovih ali nezadostno kuhanih jajc, kot so majoneze, omake, kreme in pene.

- Če se pri osebah, ki potujejo (so potovale) po prizadetem področju pojavijo znaki, kot so: povišana telesna temperatura s kašljem, bolečine v žrelu, ali težave z dihanjem, naj poiščejo strokovno medicinsko pomoč. Enako naj storijo, če se omenjeni znaki pojavijo do 10 dni po vrnitvi s potovanja. Pri tem naj zdravstveni osebi tudi povedo: 1) kakšne simptome imajo; 2) kje so potovali in 3) če so bili v neposrednem stiku s perutnino ali resno bolnimi osebami (12).

2.4. Simptomi okužbe

Simptomi influence se pojavijo po krajšem inkubacijskem času (nekaj ur do nekaj dni; 1-3). Običajno so nespecifični in se jih lahko zamenja z drugimi akutnimi obolenji dihal. Značilno pa je, da simptomi običajno izbruhnejo nenadoma. Najpomembnejši simptomi gripe so:

- nenaden začetek z mrazenjem,
- splošno slabo telesno počutje,
- visoka telesna temperatura, nad 38 °C, tudi do 40 °C,
- glavobol in utrujenost,
- solzenje,
- suh kašelj,
- suho žrelo,
- nabrekla nosna sluznica,
- bolečine v sklepih,
- včasih bruhanje ali driska.(1,5)

Simptomi nekomPLICIRANE oblike gripe trajajo različno dolgo. Vročina popusti navadno v tednu dni, kašelj pa lahko traja tudi nekaj tednov.

V najtežji obliki lahko poteka bolezen pri (že) bolnih osebah in kroničnih bolnikih, mladostnikih in mlajših odraslih, ki imajo oslabiljen imunski odgovor ali niso bili cepljeni. Pojavi se primarna z gripo povzročena pljučnica (Influenza pneumoniae), ki se lahko že v nekaj urah konča smrtno. Ta zaplet lahko prizadene tudi nosečnice (1,13).

Drugi znani zapleti so vnetje možganov (encefalitis) ali vnetje srčne mišice (miokarditis). Ti zapleti se lahko pojavijo v vseh starostnih obdobjih, so pa precej pogostejši pri osebah s kroničnimi obolenji kot so kronične srčne in pljučne bolezni, bolezni presnove ali pomanjkanje imunskega odgovora.

Pri ljudeh so za okužbo z virusom aviarne influence H5N1 značilni ravno izrazito agresivni respiratorni simptomi s hitrim slabšanjem stanja in visoko smrtnostjo (1).

3. Zdravila, učinkovita pri okužbi z virusom Influenca-A in Influenca-B

3.1. Cepivo

Cepljenje proti gripi je primarna metoda pri zaščiti in nadzoru nad influenco.

Vendar pa je pri tem bistvenega pomena cepljenje z ustrezno vakcino, ki vsebuje antigene takega seva/podtipa virusa gripe, ki bo pozneje okužil cepljeno osebo. Zaradi ustvarjenih specifičnih protiteles bo imunska obramba osebe uspešna. Če pa bo oseba okužena z njej neznanim virusom gripe, obstaja velika verjetnost obolenosti (razvoja kliničnih znakov gripe).

Kakšen podtip virusa aviarne influence H5N1 naj bi postal močno virulenten za ljudi ni znano, zato trenutno tudi ni možna oziroma smiselna priprava cepiva proti ptičji gripi, ki grozi človeštvu. Nekaj držav sicer raziskuje in razvija vakcino proti virusu H5N1, vendar naj bi bilo zanesljivo cepivo razvito in dostopno šele nekaj mesecev po izbruhu epidemije (pandemije) (1).

Določene skupine ljudi okužba z virusom gripe, oziroma možni zapleti, pridruženi gripi, bolj prizadene (kronični bolniki – tudi otroci od 6. meseca starosti dalje, posebno tisti s pljučnimi in srčno-žilnimi boleznimi, boleznimi presnove, starostniki, osebe z imunsko pomanjkljivostjo, zdravljenje s kemo- ali radioterapijo in malignomi). Cepili naj bi se tudi družinski člani starostnikov in kroničnih bolnikov, da ne bi virusa zanesli v domače okolje. Cepljenje priporočajo tudi nosečnicam zlasti proti koncu nosečnosti, doječim materam in otrokom, zlasti šolarjem. Smiselno je tudi cepljenje vseh tistih ljudi, ki so ob svojem delu stalno v stiku s tujimi ljudmi in katerih odsotnost z dela zaradi gripe bi ohromela dejavnost (14,15).

Približno 14 dni po vakcinaciji ustvari cepljena oseba ustrezen titer protiteles.

Ker so virusi za (mrtvo) vakcino gojeni na zarodnih piščančjih celicah (v oplojenih kokošjih jajcih), je cepljenje kontraindicirano osebam, ki so preobčutljive na jajčne beljakovine. Ravno tako je vakciniranje kontraindicirano osebam z znano preobčutljivostjo na cepivo.

Sicer pa so reakcije na vakciniranje (običajno i.m., v deltoidno mišico nadlakti) običajno redke (občutljivost na mestu apliciranja, skeleča mišica, povišana telesna temperatura in slabše počutje). Hude alergične reakcije so zelo redke (15).

Ob vakciniranju z ustreznim cepivom je učinkovitost cepljenja pri zdravih osebah, starih do 65 let kar 70 – 90 %. Tudi pri otrocih od 1 do 15 let starosti je učinkovitost podobna (77 – 91 %) (15).

Od leta 2003 je v prometu (ZDA) tudi vakcina v obliki pršila za nos (FluMist^R), ki pa vsebuje oslABLJENE žIVE viruse influence (LAIV = Live Attenuated Influenza Vaccine) (15,16).

3.2 Zdravila proti virusom influence

Nabor zdravil z delovanjem na viruse influence A in B je relativno majhen.

Znana sta zaviralca ionskih kanalov amantadin in rimantadin, ki delujeta na beljakovino matriksa M2. Učinkovito delujeta le na podtipa virusov influence-A. V naši državi trenutno nobeno zdravilo z omenjenima učinkovinama nima dovoljenja za promet. Še pred nekaj leti je bilo pri nas registrirano zdravilo z amantadinom –Symmetrel, ki pa je bilo namenjeno zdravljenju Parkinsonove bolezni (terapevtska indikacija).

Amantadin je v prometu za zdravljenje in kemoprofilakso (preventivno uporabo) influence-A že od sredine 60. let prejšnjega stoletja, od leta 1976 pa je v ZDA v uporabi za zdravljenje in kemoprofilakso Influence-A pri odraslih in otrocih, starejših od enega leta.

Rimantadin je v prometu od leta 1993, ravno tako za zdravljenje in kemoprofilakso influence –A pri odraslih in profilakso pri otrocih (17).

Zanamivir in oseltamivir sta novejši učinkovini, visoko selektivna zaviralca nevraminidaze, encima na površini virusa influence. Preprečujeta sproščanje novo nastalih virusov influence iz okuženih celic in s tem nadaljnje okužbe novih celic. Obe učinkovini delujeta na viruse influence-A in influence-B. Zanamivir je namenjen zdravljenju influence pri osebah, starejših od 7 let, oseltamivir pa zdravljenju oseb od 1. leta starosti in preventivni uporabi pri osebah, starejših od 13 let. Na tržišču sta se pojavila konec prejšnjega stoletja, leta 1999 (17,18).

3.2.1. Indikacije za uporabo

Za vsa navedena zdravila je pomembno, da jih je v primeru zdravljenja simptomov influence potrebno pričeti čim hitreje, oziroma takoj, ko se simptomi influence pojavijo. Zdravljenje je potrebno pričeti v roku dveh dni po pričetku simptomov. Učinek zdravil se odrazi v zmanjšani jakosti simptomov influence in v skrajšanju trajanja bolezni za približno en dan.

Študije so opravljali v glavnem na bolnikih z nekomplikirano obliko influence, tako da so podatki o učinkovitosti teh zdravil v primeru komplikacij po okužbi z virusom influence (napr. bakterijska ali virusna pljučnica, poslabšanje kronične bolezni) omejeni (17).

Da bi zmanjšali pojav na zdravila odpornih oblik virusov influence - A, je potrebno zdravljenje z amantadinom in rimantadinom prekiniti takoj, ko je to klinično upravičeno, običajno po 3 do 5 dneh zdravljenja ali pa po 24 do 48 ur po prenehanju simptomov.

Priporočeno trajanje zdravljenja z zanamivrom in oseltamivrom pa je 5 dni.

3.2.2. Preventivna uporaba

Proizvajalci opozarjajo, da preventivna uporaba omenjenih antirotikov ni zamenjava za cepljenje proti gripi.

Amantadin in rimantadin sta oba učinkovita v 70 do 90 % pri preprečevanju okužbe z virusom influence-A. Poleg zaščite pred gripo omogočata ob stiku osebe z virusi influence in subklinični infekciji tudi razvoj protiteles in s tem pridobitev imunosti zaščitene osebe. Omenjeni učinkovini tudi ne motita razvoja protiteles po cepljenju proti gripi.

Od zaviralcev nevraminidaze se le oseltamivir uporablja preventivno, čeprav sta se v študijah obe učinkovini izkazali kot učinkoviti (nad 80 %). Niso pa znani podatki o uspešnosti učinkovin v primeru zaščite oseb s hudim pomanjkanjem imunosti.

Preventivno naj bi zdravila jemale predvsem naslednje osebe oziroma skupine:

- osebe s povečanim tveganjem (kronični bolniki, starostniki, oskrbovanci domov starejših občanov), ki so bile vakcinirane šele po izbruhu influence,
- skrbniško osebe za osebe s povečanim tveganjem,
- osebe s pomanjkljivo imunostjo,
- druge osebe (po zdravnikovi presoji).

Odporni/rezistentni sevi virusov influence-A so s se pojavili približno pri tretjini oseb, ki je jemala amantadin. Rezistentni sevi so križno odporni na rimantadin. Rezistentni sevi pa se niso pokazali kot močnejše virulentni (17).

Odpornost virusov na amantadanski učinkovini ne zmanjša učinkovitosti zaviralcev nevraminidaze.

Navzkrižno odpornost med mutiranimi virusi influence-A, ki so odporni proti zanamivirju in tudi oseltamivirju so opazovali »in vitro«. Za popolno oceno tveganja pojava rezistence in navzkrižne rezistence v klinični uporabi še ni na voljo dovolj podatkov.(18)

Najnovejša poročila pa omenjajo tudi odkritje na oseltamivir odporne- ga virusa (22).

3.2.3 Odmerjanje zdravil proti virusom influence amantadin (Symmetrel[®]) (17,19)

Odmerjanje: (zdravljenje in preventivna uporaba)	
odrasli (13-64 let)	2 x 100mg/dan
otroci (1-6 let)	5mg/kg tel. teže, do 150 mg v dveh dnevni h odmerkih
otroci (7-9 let)	5mg/kg tel. teže, do 150 mg v dveh dnevni h odmerkih
otroci (10-12 let)	2 x 100mg/dan
starostniki (nad 65 let)	do 100 mg/dan

Zdravilo ja v obliki tablet (100mg) in raztopine-sirupa (50mg/5ml).

Zmanjšano odmerjanje je priporočeno za osebe z zmanjšanim delovanjem ledvic (clearance ≤ 50 ml/min).

rimantadin (Flumadine[®]) (17,20)

Odmerjanje: zdravljenje	
odrasli (13-64 let)	2 x 100mg/dan
starostniki (nad 65 let)	100 mg/dan
preventivna uporaba	
odrasli (13-64 let)	2 x 100mg/dan
otroci (1-6 let)	5mg/kg tel. teže, do 150 mg v dveh dnevni h odmerkih
otroci (7-9 let)	5mg/kg tel. teže, do 150 mg v dveh dnevni h odmerkih
otroci (10-12 let)	2 x 100mg/dan
starostniki (nad 65 let)	100 mg/dan

Zdravilo ja v obliki tablet (100mg) in raztopine-sirupa (50mg/5ml).

zanamivir (Relenza[®]) (17,18,21)

Odmerjanje: zdravljenje	
odrasli (13-64 let)	2 x 10mg/dan
otroci (7-9 let)	2 x 10mg/dan
otroci (10-12 let)	2 x 10mg/dan
starostniki (nad 65 let)	2 x 10mg/dan

Zdravilo v obliki praška (10mg) v kapsulah se inhalira s pomočjo turbohalerja. Zaradi načina uporabe zdravilo ni primerno za osebe, mlajše od 7 let. Uporabe tudi ne priporočajo osebam z boleznimi dihal, oziroma le pod strokovnim nadzorom in ob možnosti takojšnje uporabe bronhodilatatorja (21).

oseltamivir (Tamiflu[®]) (17,18, 23)

Odmerjanje: zdravljenje	
odrasli	2 x 75mg/dan
otroci (do 15 kg)	2 x 30mg/dan
otroci (od 15 do 23 kg)	2 x 45mg/dan
otroci (od 23 do 40 kg)	2 x 60mg/dan
otroci (nad 40 kg)	2 x 75mg/dan
starostniki (nad 65 let)	2 x 75 mg/dan
preventivna uporaba	
odrasli in otroci nad 13 let	75 mg/dan do 6 tednov

Zdravilo je v obliki kapsul (75mg) in praška za pripravo peroralne suspenzije (39,4mg učinkovine/1g praška; po razredčenju 12mg/ml).

Aktivna učinkovina je oseltamivir karboksilat, ki nastane v glavnem po hidrolizi v jetrih iz predzdravila-estra.

Prilagajanje odmerkov je priporočljivo za odrasle z močno zmanjšanim delovanjem ledvic.

3.4 Opozorila: nosečnost, dojenje, neželeni učinki

V študijah na živalih sta se obe učinkovini adamantanskega tipa izkazali kot škodljivi za plod in teratogeni, za njuno delovanje na človeški plod/nosečnice pa ni zadostnih podatkov. Zato je uporaba v nosečnosti dovoljena le, če možna korist za nosečnico prevlada nad tveganjem za plod.

Za uporabo oseltamivirja med nosečnostjo ni dovolj podatkov, zato je njegova uporaba upravičena le v nujnih primerih, ko pričakovana korist za mater upravičuje tveganje za plod.

Pri zanamivirju pa obstaja relativno majhno tveganje za plod.(23)

Pri vseh štirih učinkovinah se dojenje v času njihove uporabe odsvetuje.

Neželeni učinki so najpogostejši pri amantadinu. Najpogostejši so antiholinergični učinki (motnje vida, zmedenost, motnje pri uriniranju, halucinacije, gastrointestinalne motnje, suha usta). Redkeje se pojavljajo: izguba spomina, zaviranje centralnega živčnega sistema, vpliv na srce (popuščanje), pojav depozitov v roženici in druge motnje vida, dispnea, hiperkinezija, povišan krvni tlak, levkopenija in nevtropenija, psihoze, kožni osip, motnje govora ter samomorilske misli in poizkusi.

Rimantadin ima manj neželenih učinkov, ki pa pogostejše prizadenejo starejše osebe. Pozorni moramo biti predvsem na učinke na centralno živčevje (pomanjkanje zbranosti, težave s spanjem, zmedenost, glavobol, nervoza, neobičajna utrujenost) ter na delovanje na prebavila (suha usta, izguba apetita, slabost, bolečine v trebuhu, bruhanje) (23).

Neželeni učinki zanamivirja so povezani z jemanjem zdravila v obliki inhalacij. Bronhospazem nastopi lahko predvsem pri osebah z astmo ali kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB), možne so alergijske reakcije z edemom ust in žrela, pa tudi aritmije.

Pri oseltamiviru pa navajajo naslednje možne neželene učinke: bronhitis, težko dihanje, drisko, bruhanje, bolečine v abdomnu, konjunktivitis (predvsem pri otrocih), kašelj, omotičnost, krvavitev iz nosu, utrujenost, glavobol in nespečnost (23).

4. Zaključek

Virus aviarne influence-A (H5N1) predstavlja resno grožnjo človeštvu. Trenutno ga smatrajo za povzročitelja zoonoze. Če pa bi z genskim odkimom ali premikom pridobil sposobnost prehoda na človeka, bi zaradi svoje močne virulentnosti lahko povzročil pandemijo katastrofalnih razsežnosti.

Razen s preventivnimi ukrepi, nekatere na okuženih področjih že izvajajo, bi se ob izbruhu branili z antiviralnimi učinkovinami aman-

tadinskega tipa in zaviralci nevraminidaze. Pravo rešitev pa bi predstavljala šele priprava zadostnih količin ustreznega cepiva/vakcine.

5. Reference

1. WHO. Avian influenza frequently asked questions. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avian-faqs/en/index.html
2. Antworten zu Fragen betreffend Influenza-A-(H5N1)-Infektionen beim Menschen. Bundesamt für Gesundheit. <http://www.bag.admin.ch>
3. Influenza. Wikipedia, der freie Enzyklopädie. <http://de.wikipedia.org/wiki/Grippe>
4. Stožer A. Ptičji virus gripe H5N1 in možnost nove pandemije. (seminar) Univerza v Ljubljani, MF, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo. Ljubljana, 4. prosinca 2005. <http://www.dsms.net/hista/mikra/seminarji/2005-01-05%20Pticji%20virusi%20gripe.doc>
5. Geschichte der Grippe. http://web.uni-frankfurt.de/fb15/didaktik/umat/Grippe/Grippe/Geschichte_des_Grippenvirus.htm
6. Orthomyxoviruses (Influenza). <http://www.sh.lsuhs.edu/IntraGrad/micro/influenza.doc>
7. H5N1 avian influenza: timeline. World Health Organization. 28 october 2005. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_28_10a.pdf
8. Vogelgrippe Influenza A (H5N1) – Aktueller Situationsbericht des Bundesamtes für Gesundheit (BAG). Bundesamt für Gesundheit, Bern, CH. <http://www.bag.admin.ch>
9. Influenza update. Influenza Surveillance and Risk Monitoring ECDC – European Centre for Disease prevention and Control. http://www.ecdc.eu.int/influenza/update_influenza.php
10. Ptičja gripa. PLIVAZdravje. <http://www.plivazdravje.si/?section=home&cat=t&show=1&id=11491>
11. Kokošja kuga ali Aviarne influenza (AI). Načrt ukrepov v primeru pojava aviarnе influence (AI) v Sloveniji. Posodobljeno: Oktober 2005. Poglavje D: Postopek po potrditvi bolezni: 50-53. http://www.gov.si/vurs_11a_ravno_tam; Poglavje F: Drugi postopki na okuženih in ogroženih območjih: 60-65.
12. Outbreak notice. Update: Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus in Asia. Center for Disease Control and Prevention http://www.cdc.gov/travel/other/avian_influenza_se_asia_2005.htm
13. Načrt pripravljenosti na pandemijo gripe. verzija 0.0: Priloga 1: Klinična slika gripe. RS, Ministrstvo za zdravje. <http://www2.gov.si/mz/mz-splet.nsf>
14. Vse o gripi. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. <http://www.ivz.si/ivz/novica.php>
15. Flu Vaccine (Influenza Immunization). http://www.medicinenet.com/flu_vaccination/article.htm
16. PDR Drug Information for Flumist Vaccine. http://www.drugs.com/PDR/Flumist_Vaccine.html
17. Recommendations for Using Antiviral Agents for Influenza. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/treatment/recommendations.htm>
18. <http://www.zdravila.net>
19. Drug information: Amantadine (Systemic). Medline Plus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/print/druginfo/uspdi/202024.html>
20. Drug information: Rimantadine (Systemic). Medline Plus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/print/druginfo/uspdi/202771.html>
21. Relenza (zanamivir for inhalation) http://us.gsk.com/products/assets/us_relenza.pdf
22. Vogelgrippe: Resistenz gegen Tamiflu. Pharmazeutische-Zeitung on line. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/fileadmin/pza/2005-42/pharm2.htm>
23. USP Dispensing Information (USP DI). Drug Information for the Health Care Professional. 24th ed. Thomson Micromedex, Greenwood Village, 2004.

Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze

Influenza and viral neuraminidase inhibitors

Tanja Rozman Peterka, Marija Sollner Dolenc

POVZETEK: Gripa oz. influenza je visoko infektivna respiratorna bolezen, ki povzroča periodične epidemije in pandemije. Cepiva zaradi velike antigenske variabilnosti virusa influence zagotavljajo le delno zaščito, protivirusna terapija z amantadinom in rimantadinom pa ni široko uporabna zaradi omejenega spektra delovanja, stranskih učinkov in hitrega razvoja rezistence. Nove možnosti za nadzor influence so inhibitorji encima nevraminidaze-b sialidaze. Encim je nujen za virusno replikacijo in infektivnost, njegovo aktivno mesto pa je ohranjeno pri vseh podtipih virusa influence A in B. Uspešen pristop pri razvoju učinkovitih inhibitorjev virusne nevraminidaze je bilo racionalno načrtovanje spojin s pomočjo poznavanja mehanizma delovanja encima, njegove kristalne strukture in kompleksa s substratom ter inhibitorji in z uporabo računalniškega molekulskega modeliranja. Z razvojem učinkovitih in selektivnih inhibitorjev virusne nevraminidaze, kot sta zanamivir in oseltamivir, je encim postal pomembna tarča za zdravljenje in preprečevanje infekcij, povzročenih z virusi influence.

Ključne besede: influenza, sialidaza, nevraminidaza, zanamivir, oseltamivir

ABSTRACT: Flu or influenza remains a very serious respiratory illness. It is highly infective and causes periodic epidemics and pandemics. Protection against influenza through vaccination is limited due to the antigenic variation of the influenza virus, while the use of older antiviral agents amantadine and rimantadine is limited because of lack of activity against influenza B viruses, unfavorable tolerability and rapid emergence of resistance. Influenza neuraminidase inhibitors comprise a potent new compound class that was specifically designed to target the active site of the neuraminidase - sialidase enzyme, which is conserved across all type A and B influenza neuraminidase subtypes. The enzyme is essential for virus replication and infectivity. The successful strategy which has resulted in the development of potent influenza virus sialidase inhibitors relies on several factors: the information from the X-ray crystallographic studies of influenza virus sialidase; rational drug design techniques like molecular modelling and advances in computational chemistry analysis; and an understanding of the enzyme mechanism. Influenza neuraminidase has been validated as a target for the development of anti-influenza drugs as demonstrated by the efficiency and selectivity of zanamivir and oseltamivir in the treatment and prevention of influenza virus infections.

Key words: influenza, sialidase, neuraminidase, zanamivir, oseltamivir

1 Uvod

Influenca, splošno znana kot gripa, je ena izmed najstarejših in najbolj pogostih bolezni pri človeku. Je visoko infektivna bolezen, ki povzroča periodične epidemije in pandemije (1). V prejšnjem stoletju so zabeležili kar tri velike pandemije influence leta 1918, 1957 in 1968. Največja med njimi, imenovana »španska gripa«, je med leti 1918-1919 zahtevala preko 40 milijonov mrtvih, kar je več, kot je bilo umrlih med prvo svetovno vojno (2). »Azijska influenza« leta 1957 in pandemija leta 1968 pa sta samo med prebivalci Združenih držav Amerike povzročili okoli 100 000 smrtnih primerov (3). Zaradi velikega števila obolelih v času epidemij in pandemij ter precejšnje smrtnosti povzroča influenza ogromne izgube v gospodarstvu (1, 2).

Influenca je akutna bolezen, ki jo povzročajo virusi influence tipa A in B. Širijo se po zraku, v obliki kapljic in prizadenejo respiratorni sistem. Simptomi, poleg respiratornih težav, vključujejo oslabelost, bolečine v mišicah in povišano temperaturo od 38 do 40 °C (1, 4). Najpogostejši zaplet povezan z influenco je pljučnica. Tveganje za smrt zaradi zapletov je signifikantno večje pri rizičnih skupinah, kot so starejši

ljudje, dojenčki in ljudje s kroničnimi obolenji pljuč ter boleznimi srca (1, 5). Svetovna zdravstvena organizacija je zaradi velike obolevnosti, smrtnosti in izgub v gospodarstvu vzpostavila sistem nadzora nad gripo (6). Vsako leto poskušajo oceniti antigenske spremembe virusa influence in izdelati primerno cepivo (1). Vendar so možnosti za nadzor influence omejene. Cepivo zaradi velike antigenske variabilnosti virusa influence zagotavlja le delno zaščito, zato je potrebno stalno spremljanje virusov, njihove spremenljivosti, dopolnjevanje cepiva in revakcinacija ljudi (4). Protivirusna terapija s prvo generacijo protivirusnih zdravil proti influenci, amantadinom in njegovim derivatom rimantadinom (inhibitorji ionskih kanalčkov v virusni ovojnici, ki preprečujejo sproščanje virusnih ribonukleoproteinov), ni široko uporabna zaradi omejenega spektra delovanja le na viruse influence tipa A, stranskih učinkov na centralni živčni sistem in hitrega razvoja rezistence (4, 7, 8). Nove možnosti pri zdravljenju in preventivi gripe je ponudilo odkritje, da je aktivno mesto encima virusne nevraminidaze- sialidaze ohranjeno pri različnih podtipih virusov influence (9). Encim je nujen za virusno replikacijo in infektivnost, njegovo aktivno mesto pa ostaja ohranjeno tudi med genskimi spremembami.

Tanja Rozman Peterka, mag. farm., LEK farmacevtska družba d. d., Razvoj in raziskave, Verovškova 57, Ljubljana; izr. prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm., Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana

Pregledni članki - Review Articles

Encim nevraminidaza je postal tako pomembna tarča pri razvoju protivirusnih zdravil za zdravljenje in preprečevanje influence (4).

1.1 Virusi influence

Virusi influence spadajo v družino virusov *Orthomyxoviridae*. Delimo jih na tipe A, B in C, vendar sta klinično pomembna le tipa A in B (10). Virusi influence tipa A lahko okužijo živali in človeka, medtem ko je tip B patogen le za človeka (4, 11). Viruse influence tipa A delimo na več podtipov, ki se razlikujejo v sestavi glikoproteinov hemaglutinina (HA) in nevraminidaze (NA), ki se nahajata na površini virusa (10, 12). Poznamo 15 različnih HA (H1-H15) in 9 NA (N1-N9) (4, 11), kombinacijo le-teh pa uporablja kot osnovni princip za označevanje tipov in podtipov virusov influence tudi Svetovna zdravstvena organizacija in je pomembna pri epidemioloških analizah ter razločevanju virusov (1). Trenutno prisotni podtipi človeških virusov influence imajo pretežno kombinacijo treh različnih hemaglutininov (H1, H2 in H3) in dveh nevraminidaz (N1 in N2) (3). **Hemaglutinin (HA)** omogoča vezavo virusa na receptor, ki vsebuje sialno kislino in se nahaja na površini tarčne celice v respiratornem traktu. Omogoči zlitje virusne in celične membrane gostiteljske celice. Je glavna tarča protiteles in s tem tudi cepiv (4). **Nevraminidaza (NA)** oz. **sialidaza** je encim, ki cepi terminalno sialno kislino na receptorju gostiteljske celice za hemaglutinin in s tem omogoča sproščanje novo nastalih virusov iz gostiteljeve celice ter preprečuje njihovo agregacijo (4).

Virusi influence so podvrženi pomembni variabilnosti glikoproteinov, ki se nahajajo na površini virusa (HA in NA). Okužba ali vakcinacija z enim podtipom virusa daje le malo ali nič zaščite proti drugim različnim podtipom virusov influence, zato ne moremo doseči trajne imunizacije. Genetske spremembe so vzrok epidemij, ki se pojavijo, ko nastane nova variacija virusa (4). Vsako leto cepivo temelji na tistih podtipih virusov influence, za katere pričakujejo, da se bodo pojavili tisto sezono. Cepljenje priporočajo za populacijo ljudi s povečanim tveganjem, to so starejši ljudje, ljudje s kroničnimi obolenji pljuč in boleznimi srca. Občasno pa pride do takšnih genetskih sprememb virusa, ki zelo povečajo njegovo virulentnost, spremenjen virus je usoden ne le za rizično skupino ljudi, ampak za širšo populacijo sicer zdravih ljudi (13, 14).

Poznamo dva načina, ki privedeta do antigenih sprememb (4, 10). **Antigeni odmik** (*antigenic drift*) je kopičenje točkovnih mutacij. Posledice so spremembe v aminokislinskem zaporedju na antigenih mestih hemaglutinina in/ali nevraminidaze. Te spremembe zmanjšajo vezavo protiteles in zato zmanjšujejo obstoječo imunost v populaciji. Vzrok je nastanek epidemij. Antigeni odmik se pojavlja pri

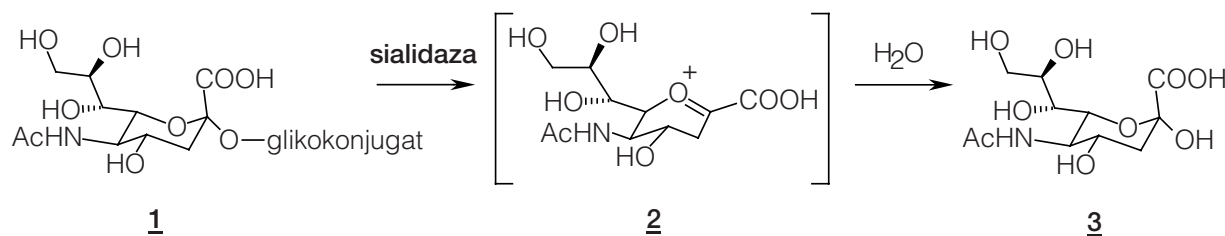
obeh tipih virusov influence (A in B). **Antigeni premik** (*antigenic shift*) je bolj dramatična in nenadna sprememba, ki se pojavi v hemaglutininu in/ali nevraminidazi le pri virusih influence tipa A. Spremembe so posledica nadomestitve celotnega virusnega gena z zapisom za HA ali NA z genom iz živalskega virusa influence (npr.: ptičjega). Ker je v populaciji malo ali nič imunosti proti takšnim variacijam virusa, nastanejo pandemije, ki imajo za posledico visoko obolevnost in tudi smrtnost.

Za razliko od hemaglutinina je aminokislinsko zaporedje v aktivnem mestu nevraminidaze zelo malo spremenjeno med antigeno zelo različnimi podtipi virusov influence. Kljub temu, da večji del NA variira med posameznimi podtipi virusov influence, kristalografske analize kažejo, da aminokislinsko zaporedje in tridimenzionalna struktura aktivnega mesta nevraminidaze ostaja ohranjena (4). Vseh 11 aminokislinskih ostankov, ki določajo in omejujejo žep v aktivnem mestu encima, tvori interakcije s substratom.

1.2 Encim nevraminidaza

Nevraminidaza oz. sialidaza je glikoprotein - encim, ki se nahaja na površini virusa influence tipa A in B. Ima pomembno vlogo pri virusni replikaciji in njegovi infektivnosti (8, 15). Encim katalizira cepitev $\alpha(2-6)$ - ali $\alpha(2-3)$ -glikozidne vezi med terminalno sialno kislino (N-acetilnevraminsko kislino) in sladkornim ostankom (8, 10) (slika 1). Cepitev te vezi je nujna za širjenje virusa po dihalnih poteh, saj omogoča sproščanje virusov iz okužene celice in preprečuje agregacijo sproščenih virusov.

Aktivno mesto nevraminidaze vsebuje večje število polarnih in ioniziranih aminokislin, ki interagirajo s polarnim substratom - sialno kislino (9). Vsi aminokislinski ostanki nevraminidaze, ki interagirajo s substratom, so ohranjeni pri obeh tipih virusov influence (9). S temi aminokislinskimi ostanki tvorijo interakcije tudi kompetitivni inhibitorji. Negativno nabita karboksilna skupina substrata in inhibitorjev tvori ionske interakcije z Arg triado (Arg 118, 292 in 371), N-acetilna skupina pa tvori polarne in nepolarne interakcije z Arg 152, Trp 178 in Ile 222 (15). Aktivno mesto nevraminidaze lahko razdelimo na tri večje dobro definirane vezavne žepe. **Žep 1** vsebuje polarne ostanke Glu 276, Glu 277, Arg 292, Asn 294 in hidrofolni Ala 246. Kljub temu, da je žep 1 po strukturi zelo polaren, nova dognanja kažejo tudi na možnost nepolarnih interakcij, s katerimi razlagajo večjo afiniteto novjših inhibitorjev do encima (15). **Žep 2** sestavljajo Ile 222, Arg 224 in Ala 246. Tretje vezavno mesto – **žep 3** je večje in vsebuje hidrofolne in hidrofilne ostanke (Glu 119, Asp 151, Arg 152, Trp 178, Ser 179, Ile 222 in Glu 227); sem se vežeta C-4 hidroksilna in 5 N-acetilna



Slika 1: Mehanizem cepitve sialne kisline z encimom sialidazo
Figure 1: Neuraminidase enzyme mechanism

skupina sialne kisline, vendar ne tvorita interakcij z vsemi aminokislinskimi ostanki v tem žepu (15).

2 Inhibitorji virusne nevraminidaze

Prve inhibitorje virusne sialidaze (nevraminidaze) so odkrili z naključnim rešanjem različnih molekul, zato so le-ti imeli nizko učinkovitost, slabo selektivnost in/ali pomanjkanje *in vivo* aktivnosti (npr. derivati oksamske kisline **4**) (16). Prvi inhibitor virusne sialidaze, po strukturi podoben substratu, pa je bil Neu5Ac2en (**5**) ($K_i \approx 10^{-5}$ - 10^{-6} M), ki je mimetik prehodnega stanja (**2**, slika 1). Neu5Ac2en je *in vitro* učinkovit inhibitor virusne sialidaze, vendar je slabo selektiven in neučinkovit *in vivo* (12, 16). Preproste strukturne spremembe na Neu5Ac2en, npr. priprava trifluoroacetamido derivata (**6**) niso vplivale na izboljšanje *in vivo* inhibicije. V literaturi so kot inhibitorji opisani tudi številni analogi sialne kisline: npr. fluorirani derivat **9** ($K_i = 8 \cdot 10^{-6}$ M), analog fosforne (V) kisline **10** ($K_i \approx 10^{-4}$ - 10^{-5} M), vendar noben izmed teh analogov ni kazal signifikantnega izboljšanja inhibicije virusne sialidaze (16).

Uspešen pristop pri razvoju učinkovitih inhibitorjev virusne sialidaze je bilo racionalno načrtovanje spojin, ki so po svoji strukturi primerne za vezavo v aktivno mesto encima. V veliko pomoč pri tem je bilo poznavanje kristalne strukture encima in njegovega kompleksa s substratom in inhibitorji, poznavanje mehanizma delovanja encima in uporaba molekulskega modeliranja. Na podlagi strukturnih informacij in študij biokemičnih mehanizmov cepitve sialne kisline so predvidevali, da poteka proces katalize preko sialoilnega kationa, kot intermedija v prehodnem stanju (**2**, slika 1) (15, 16). Pripravili so spojine, ki ga oponašajo. Takšne mimetike prehodnega stanja po njihovi strukturi lahko razdelimo na (15, 16):

- analoge sialne kisline z dihidropiranovim obročem (zanamivir),
- analoge sialne kisline z benzenovim obročem,
- cikloheksenske analoge sialne kisline (oseltamivir),
- analoge sialne kisline s petčlenskimi obroči.

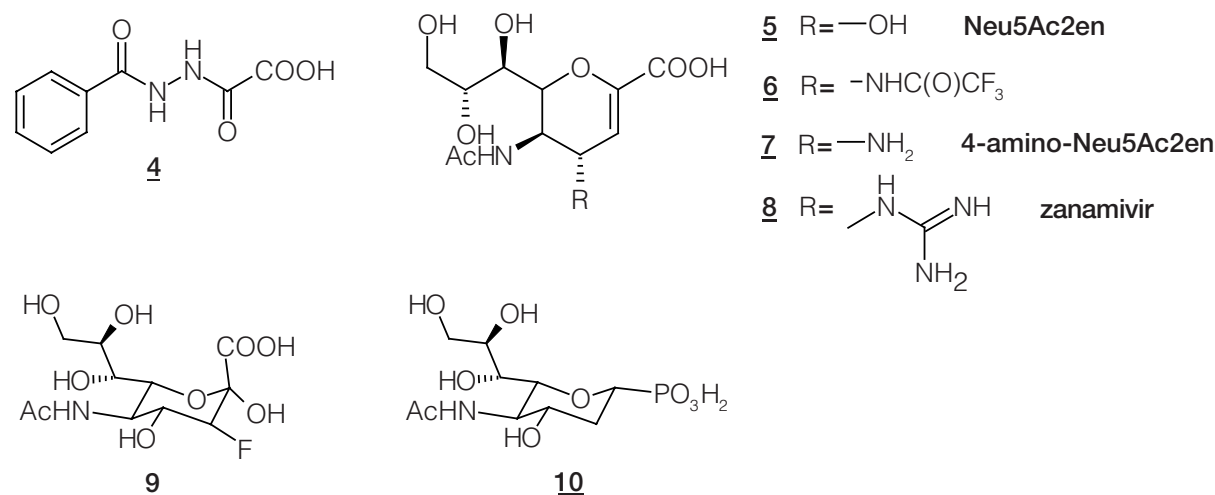
2.1 Analogi sialne kisline z dihidropiranovim obročem

Z določitvijo kristalne strukture kompleksa Neu5Ac2en s sialidazo so dobili informacije potrebne za ustrezne modifikacije Neu5Ac2en za razvoj bolj učinkovitih inhibitorjev. Ugotovili so, da zamenjava hidroksilne skupine na C-4 z amino skupino omogoča ionske interakcije z Glu 119 na aktivnem mestu ter da je žep na tem mestu dovolj velik za vezavo večjih bazičnih skupin, kot je gvanidinska skupina, ki lahko tvori ionske interakcije z Glu 119 in Glu 227 (16).

S pripravo spojin 4-amino-Neu5Ac2en (**7**) in 4-gvanidino-Neu5Ac2en (**8**) so dobili učinkovita *in vitro* in *in vivo* inhibitorja virusne sialidaze A in B tipa virusa influence. Spojina **8** z generičnim imenom zanamivir je učinkovita že v subnanomolarnih koncentracijah ($K_i \approx 10^{-11}$ M) in je tudi registrirana kot zdravilo za zdravljenje ter preventivo gripe (17). Zaradi neustrezne biološke uporabnosti in hitrega metabolizma se uporablja v obliki inhalacij. Pomembna je selektivnost zanamivirja glede na ostale virusne, bakterijske in sesalske sialidaze. Selektivnost razlagajo na podlagi arhitekture aktivnega mesta različnih sialidaz, ki je le pri sialidazi virusa influence takšna, da se vanj lahko prilega relativno velik bazičen C-4 substituent, kot je gvanidinska skupina (16).

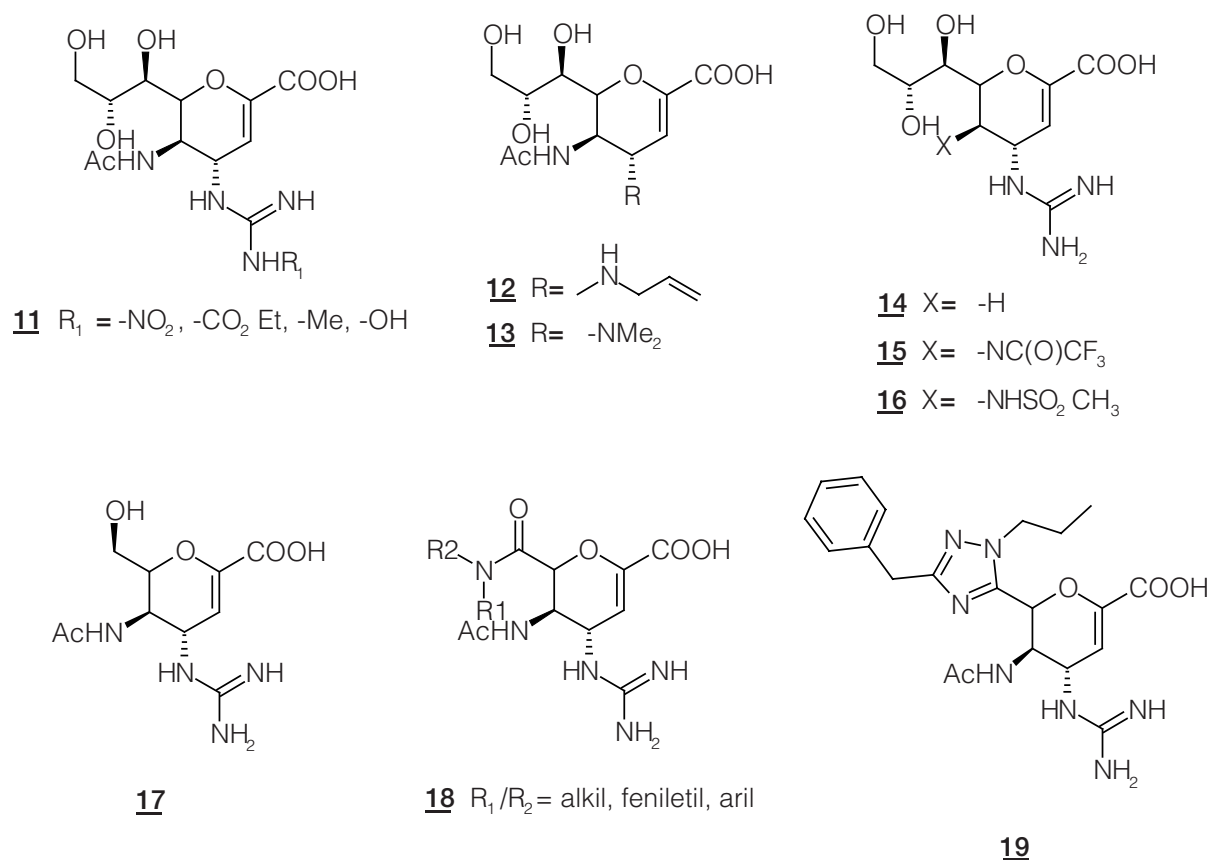
Raziskovalci so poskusili pripraviti tudi številne analoge zanamivirja, ki bi imeli ustrežnejše farmakokinetične lastnosti (16). Substitucija gvanidinskega dušika z različnimi skupinami (**11**) ali uporaba drugih dušik vsebujočih substituentov (**12**, **13**) na mestu C-4 je negativno vplivala na inhibicijo sialidaze. Tudi acetamidna skupina na mestu C-5 je pomembna za inhibicijo encima, z njeno odstranitvijo (**14**) se je 25000-krat zmanjšala afiniteta do encima. S substitucijo tega mesta s trifluoroacetamidno (**15**) in sulfonamidno funkcionalno skupino (**16**) so dobili še vedno učinkovite inhibitorje, ki pa so imeli manjšo afiniteto do encima kot zanamivir ($K_i \approx 2 \cdot 10^{-8}$ M in $9 \cdot 10^{-8}$ M).

Modifikacije stranske glicerolne verige zanamivirja so dale vpogled za strukturne zahteve na tem mestu. Skrajšanje stranske verige (**17**) je vplivalo na izgubo afintete. Najbolj zanimiva modifikacije stranke



Slika 2: Inhibitorji virusne nevraminidaze
Figure 2: Virus neuraminidase inhibitors

Pregledni članki - Review Articles



Slika 3: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline z dihidropiranovim obročem
Figure 3: Virus neuraminidase inhibitors: dihydropyran analogs of sialic acid

verige na C-6 je karboksamidna skupina, substituirana z alkillnimi verigami, feniletilnim ali arilnim fragmentom (**18**). Spojine imajo primerljivo inhibicijo z zanamivirjem. Vendar pa niso primerne za peroralno aplikacijo niti ne za inhalacijo. Substitucija glicerolne stranske verige s heterocikli (oksadiazoli, triazoli) (**19**) je povečala selektivnost za tip A glede na tip B virusa influence.

2.2 Analogi sialne kisline z benzenovim obročem

Veliko napora so raziskovalci vložili v iskanje manj polarnih inhibitorjev virusne sialidaze, ki bi imeli ugodnejše fizikalno-kemične lastnosti. Z nadomestitvijo dihidropiranskega obroča s planarnim benzenovim obročem so dobili številne derivate benzojske kisline (**20, 21, 22, 23, 24, 25**) (**16, 18**). Najučinkovitejši derivat benzojske kisline kot inhibitor virusne sialidaze *in vitro* je bil **22** (BANA 113), vendar ni kazal *in vivo* inhibicije na modelih miši. Predvidevajo, da je vzrok hitro odstranjevanje z mesta delovanja - pljuč z metabolizmom in/ali absorpcijo (**16**).

2.3 Cikloheksenski analogi sialne kisline

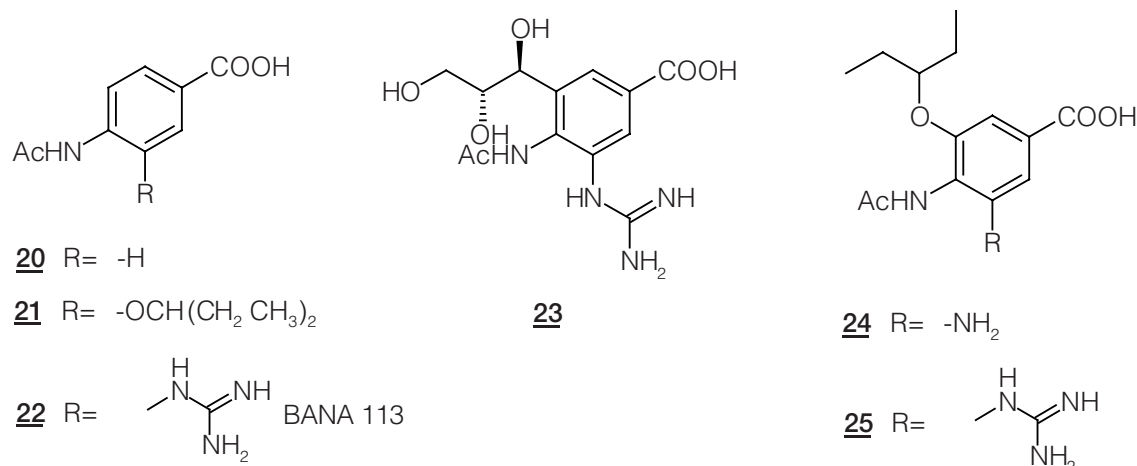
Pri iskanju učinkovitega inhibitorja sialidaze, ki bi bil uporaben za peroralno aplikacijo, so uporabili kot osnovni skelet tudi cikloheksen.

Predvidevali so, da je dvojna vez v cikloheksenu primerna izosterna zamenjava za planaren oksonijev kation, ki nastane v prehodnem stanju encimske cepitve sialne kisline (**16, 19**). Cikloheksenov obroč je tudi kemično in encimsko stabilen ter primeren za kemične modifikacije substituentov za optimizacijo biološke aktivnosti (**15**).

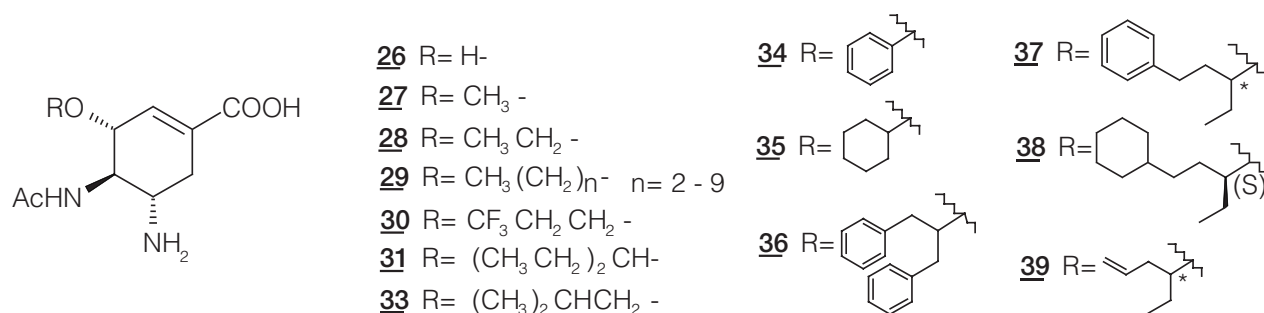
Pri načrtovanju peroralno aktivne protivirusne spojine so želeli povečati lipofilnost molekule in s tem uravnati učinke polarnih funkcionalnih skupin v molekuli (C-1 karboksilno skupino, C-4 acetamidno in C-5 amino skupino), ki so nujno potrebne za inhibitorno aktivnost. Z dodatkom ustreznih stranskih verig na mestu C-3 so želeli povečati celokupno biološko uporabnost (**15**). Pripravili so številne analoge (**26 – 39**) z različnimi alkillnimi in arilnimi stranskimi verigami na C-3 in sistematično raziskali možnosti za hidrofobne interakcije (**15, 19, 20**).

Ugotovili so, da sprememba dolžine in geometrije stranskih alkillnih verig vpliva na inhibitorno aktivnost za sialidazo (**15, 19, 20**). Najučinkovitejši inhibitor virusne sialidaze je bila spojina **31**. Kristalna struktura spojine **31** (GS 4071) kaže na to, da je vezava karbocikličnih inhibitorjev iz te serije podobna vezavi spojine 4-amino-Neu5Ac2en. Polarne funkcionalne skupine interagirajo z istimi aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu. Kristalna struktura kaže spremembe v

Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze



Slika 4: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline z benzenovim obročem
Figure 4: Virus neuraminidase inhibitors: benzene analogs of sialic acid



Slika 5: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline z cikloheksenovim obročem
Figure 5: Virus neuraminidase inhibitors: cyclohexene analogs of sialic acid

vezavi 3-pentilne stranske skupine GS 4071, ki tvori hidrofbne interakcije, ki jih pred tem niso opazili pri vezavi sialne kisline. Na podlagi kristalografskih študij analogov so ugotovili, da v aktivnem mestu encima obstaja hidrofbni žep, ki ga sestavljajo aminokisline Glu276, Ala246, Arg224 in Ile222 in v katerega se po velikosti in obliki prilaga 3-pentilna skupina in signifikantno vpliva na povečanje vezavne afinitete spojine **31** (15, 19, 20).

Izkazalo se je, da ima GS 4071, ki je bil razvit za peroralno uporabo, zelo slabo biološko uporabnost. Pretvorba GS 4071 v ustrezen etilni ester- predzdravilo **oseltamivir** (GS 4104) (**30**), je izrazito povečala biološko uporabnost, tako da je spojina primerna za peroralno aplikacijo (15).

Vpliv mesta dvojne vezi v cikloheksenem obroču je dobro viden pri primerjavi inhibitorne aktivnosti analogov s 3-pentilno stransko verigo (**40**, **41**, **42**). Spremembe mesta dvojne vezi zelo zmanjšajo afiniteto do encima, iz česar lahko sklepamo, da je le izomer **31** dober mimetik strukture prehodnega stanja (15). Izosterne zamenjave O z S, NH in CH₂ so pokazale, da imajo C-3 karba, tio in aza izosteri primerljivo inhibitorno aktivnost (15).

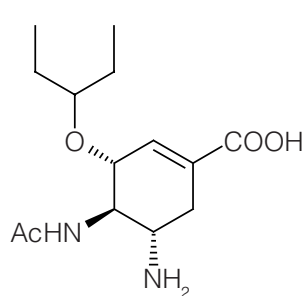
2.4 Analogi sialne kisline s petčlenskimi obroči

Pripravili so tudi analoge sialne kisline, kjer so za osnovni skelet uporabili ciklopentanski, pirolidinski in tetrahidrofuranski obroč (21, 22, 23). Od teh sta zelo učinkovita inhibitorja nevraminidaze peramivir oz. BCX-1812 (**43**) s ciklopentanskim skeletom in spojina A-315675 (**44**) s pirolidinskim obročem, medtem ko so derivati s tetrahidrofuranovim obročem (**45**, **46**) slabši inhibitorji nevraminidaze kot njihovi pirolidinski analogi (22). Učinkovina peramivir je v fazi kliničnih testiranj, spojina A-315677 (predzdravilo A-315675) pa v predklinični fazi razvoja (21).

3 Terapevtska uporaba inhibitorjev virusne nevraminidaze

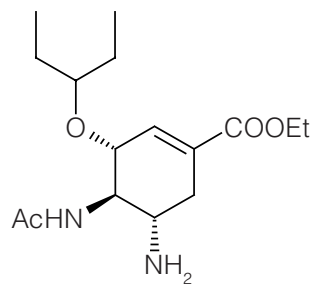
Zanamivir (**8**) in oseltamivir (**32**) sta učinkovita *in vitro* in *in vivo* inhibitorja sialidaze virusa influence tipa A in B, ki se uporabljata za zdravljenje in preprečevanje gripe (24, 25, 26). Zanamivir ima neustrezno biološko uporabnost po peroralni aplikaciji, zato se uporablja lokalno v obliki inhalacij. Oseltamivir (**32**) pa je predzdravi-

Pregledni članki - Review Articles

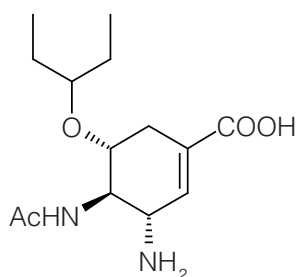


31 GS 4071

IC_{50} = 1 nM tip A influenze
 IC_{50} = 3 nM tip B influenze

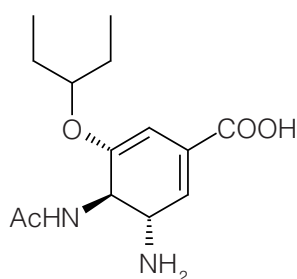


32 GS 4104 oseltamivir



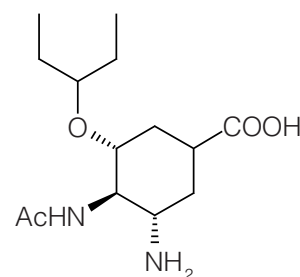
40

IC_{50} = 30 nM tip A
 IC_{50} = 500 nM tip B



41

IC_{50} = 1500 nM tip A
 IC_{50} = 6600 nM tip B

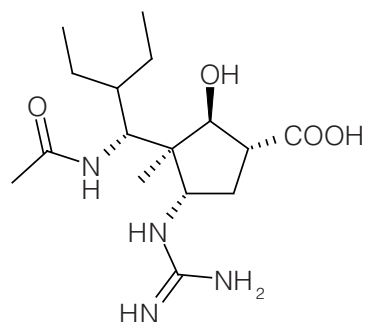


42

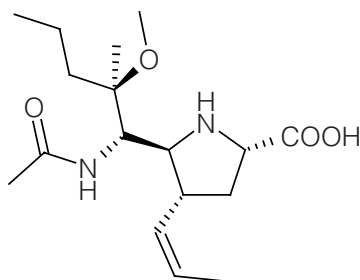
IC_{50} = 380 nM tip A
 IC_{50} = 1800 nM tip B

Slika 6: Inhibitorji virusne nevraminidaze: GS 4071, oseltamivir in analogi

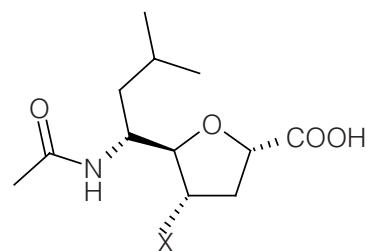
Figure 6: Virus neuraminidase inhibitors: GS 4071, oseltamivir and analogs



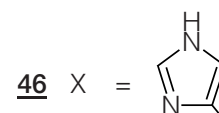
43 peramivir (BCX-1812)



44 A-315675



45 X = -COOCH₃



46 X =

Slika 7: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline s ciklopentenskim, pirolidinskim in tetrahidrofuranovim obročem

Figure 7: Virus neuraminidase inhibitors: sialic acid analogs with cyclopentene, pyrrolidine and tetrahydrofuran ring

Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze

lo spojine GS 4071 (31) in je uporaben peroralno. Po absorpciji v prebavnem traktu se pod vplivom encimov v krvi pretvori v GS 4071, ki se distribuira v vsa tkiva, tudi na glavno mesto infekcije z virusi influence, zgornji in spodnji respiratorni trakt. Pri terapiji gripe sta zanamivir (10 mg 2 x dnevno) ali oseltamivir (75 mg 2 x dnevno) skrajšala trajanje simptomov gripe, kot so mialgija, povišana temperatura in glavobol za 0,7-1,5 dni (24). Večjo klinično učinkovitost (zmanjšanje simptomov za 1,5-2 dni) so opazili pri pacientih s potrjeno influenco, ki so dobili terapijo v 30-ih urah po pojavu simptomov. Za profilakso gripe so zanamivir (10 mg 1 x dnevno) in oseltamivir (75 mg 1 x dnevno) uporabljali 4-6 tednov, kjer je bila učinkovitost 67-74 % (24). Najbolj pogosti stranski učinki (<5 %) so bili respiratorni. Pri bolnikih, ki so prejemali oseltamivir, pa še glavobol, slabost in bruhanje (24, 26).

4 Rezistenca

Pri uvedbi protivirusne terapije z inhibitorji nevraminidaze pa se pojavlja tudi bojazen, da bi njihova uporaba lahko povzročila nastanek rezistentnih virusov influence. Za spremljanje pojavljanja rezistence so ustanovili »*Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN)*«, mednarodni sistem nadzora pojavljanja odpornih virusov na inhibitorje nevraminidaze (21, 27). Študije kažejo, da postanejo virusi influence *in vitro* odporni na inhibitorje nevraminidaze le pri dolgotrajnem gojenju v laboratoriju pri visokih koncentracijah učinkovine. Prav tako je dokaj redek pojav nastanek odpornih virusov pri klinični uporabi inhibitorjev nevraminidaze. Pri zdravljenju 789 bolnikov z oseltamivirjem so izolirali na oseltamivir odporne viruse pri 14 bolnikih (1,8 %) (27). Simptomni bolnikov s spremenjenimi virusi so bili enaki kot pri tistih z divjim tipom virusa, bolniki pa so normalno okrevali (28).

Rezistenca na inhibitorje virusne sialidaze nastane zaradi točkovnih mutacij na virusni RNA, kar povzroči spremembo aminokislinske blizu ali na aktivnem mestu sialidaze. Odpornost na inhibitorje nevraminidaze pa je lahko tudi posledica spremembe na antigenskem mestu hemaglutinina. Pri ugotavljanju mehanizma rezistence na inhibitorje nevraminidaze so ugotovili naslednje mutacije nevraminidaze (27):

- najbolj pogosta je bila mutacija Arg292Lys (27, 28)
- v manjšem obsegu je prišlo do mutacij Glu119Val, opazili pa so še druge mutacije na mestu 119 (Glu119Gly, Glu119Ala, Glu119Asp) (27)
- opisani so posamezni primeri mutacije His274Tyr (27), en primer mutacije Arg152Lys pri otroku z oslabiljenim imunskim sistemom (27) in mutacijo Asp198Asn pri virusu influence tipa B (21).

Mutirani virusi kažejo zmanjšano infektivnost in virulentnost *in vivo* ter se težko prenašajo iz človeka na človeka. Študije na živalih potrjujejo podatke kliničnih študij, da so virusi odporni na inhibitorje virusne nevraminidaze manj virulentni kot divji tipi virusa, imajo zmanjšano patogenost in infektivnost. To je tudi pričakovano, saj mutacije, na sicer strogo ohranjenem aktivnem mestu encima, zelo oslabijo funkcionalnost nevraminidaze, ki je nujna za širjenje virusov (27, 28).

5 Sklep

Podatki o žrtvah v času velikih pandemij influence v letih 1918, 1957 in 1968 ter pojav ptičje gripe v zadnjih letih v Aziji, v tem letu pa tudi v Evropi, vsekakor vplivajo na zavedanje o nevarnosti gripe. Vendar

ljudje kljub temu gripo še vedno prepogosto enačijo z navadnim prehladom in le-ta pogosto velja za bolezen, ki ogroža le starejše ljudi. Danes, ko živimo v času globalizacije in velike mobilnosti ljudi, lahko hitro pride do širjenja mutiranega virusa in pandemije gripe. Cepiva in zdravila, kot so inhibitorji nevraminidaze, so le začetek nove dobe v boju proti gripi. V literaturi so opisani kot potencialna zdravila za zdravljenje gripe še inhibitorji virusne RNA transkriptaze in replikaze, inhibitorji vezave virusov influence na receptor gostiteljske celice za hemaglutinin in spojine, ki stabilizirajo konformacijo hemaglutinina ter inhibitorni oligoribonukleotidi (29, 30). Vprašanje pa je, katera od njih bodo sploh dosegla fazo kliničnih testiranj in ali bo farmacevtska industrija vlagala denar v drag razvoj novih zdravil, ki morda ne bodo povrnili stroškov razvoja. Zato je toliko bolj pomembno, kako cepiva in zdravila, ki so na razpolago za zdravljenje in preventivo influence, v primeru pandemije ali epidemije uporabiti v klinični praksi, da bo njihov učinek največji.

6 Literatura

1. Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. *Biomed & Pharmacother* 2000; 54: 188-195.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
3. Palese P. Influenza: Old and new threats. *Nature Medicine* 2004; 10: 82-87.
4. Oxford JS, Lambkin R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. *DDT* 1998; 3: 448-456.
5. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999; 354: 1277-1282.
6. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/>
7. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355: 827-835.
8. Calfee DP, Hayden FG. New Approaches to Influenza Chemotherapy-Neuraminidase inhibitors. *Drugs* 1998; 56: 537-553.
9. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983; 303: 41-44.
10. Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed & Pharmacother* 2000; 54: 196-209.
11. <http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/Orthomyxoviruses.html>
12. Varghese JN. Development of Neuraminidase Inhibitors as Anti-Influenza Virus Drugs. *Drug Development Research* 1999; 46: 176-196.
13. Bradbury J. What makes an influenza virus virulent? *Lancet* 1998; 352: 629.
14. Claas ECJ, Osterhaus ADME. New clues to the emergence of flu pandemics. *Nature medicine* 1998; 4: 1122-1123.
15. Lew W, Chen X, Kim CU. Discovery and Development of GS 4104 (oseltamivir): An Orally Active Influenza Neuraminidase Inhibitor. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 663-672.
16. Kiefel MJ, Itzstein M. Influenza Virus Sialidase: A Target for Drug Discovery. *Progress in medicinal Chemistry* 1999; 36: 1-28.
17. http://www.gov.si/ivz/knjiznica/reg_zdravil/RZ_ATCJ.HTM
18. Atigadda VR, Brouillette WJ, Duarte F et al. Hydrophobic Benzoic Acids as Inhibitors of Influenza Neuraminidase. *Bioorg. Med. Chem.* 1999; 7: 2487-2497.
19. Williams MA, Lew W, Mendel DB et al. Structure-activity relationships of carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1997; 7 (14): 1837-1842.
20. Kim CU, Lew W, Williams MA et al. Structure-Activity Relationship Studies of Novel Carbocyclic Influenza Neuraminidase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 1998; 41: 2451-2460.
21. Gubareva LV. Molecular mechanism of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Research* 2004; 103: 199-203.
22. Wang GT, Wang S, Gentles R et al. Design, synthesis, and structural analysis of inhibitors of influenza neuraminidase containing a 2,3-disubstituted tetrahydrofuran-5-carboxylic acid core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 15: 125-128.
23. Kati WM, Montgomery D, Carrick R et al. In Vitro Characterization of A-315675, a Highly Potent Inhibitor of A and B Strain Influenza Neuraminidases and Influenza Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 1014-1021.
24. McNicholl IR, McNicholl JJ. Neuraminidase Inhibitors: Zanamivir and Oseltamivir. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 57-70.
25. Waghorn SL, Goa KL. Zanamivir. *Drugs* 1998; 55: 721-725.
26. Bardsley-Elliott A, Noble S. Oseltamivir. *Drugs* 1999; 58: 851-860.
27. Jackson HC, Roberts N, Wang ZM et al. Management of Influenza. *Clin Drug Invest* 2000; 20: 447-454.
28. Carr J, Ives J, Kelly L et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Research* 2002; 54: 79-88.
29. Oxford JS, Bossuyt S, Eswarasaran R, Lambkin R. Drugs to combat the epidemic and pandemic faces of influenza. In: Potter CW. *Perspectives in medicinal virology* 7; Influenza. Elsevier Science 2002: 201-234.
30. Ge Q, Filip L, Bai A et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *PNAS* 2004; 101: 8676-8681.



FARMADENT



*Zahvaljujemo se Vam za dosedanje zaupanje
in Vam želimo vesele praznike ter
veliko zdravja in uspehov v Novem letu*

Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo?

Paracetamol – effective and safe medicine?

Tadeja Dolinar, Aleš Mrhar

POVZETEK: Analgetični, antipiretični in protivnetni učinek povzročijo učinkovine, ki inhibirajo ciklooksigenaze (encime COX) in posledično zmanjšajo nastajanje prostaglandinov v telesu. Prostaglandini, še posebej PGE_2 , so spojine v kaskadi, ki vodi do glavnih znakov vnetja kot so vročina, rdečina, oteklina in bolečina. Poznamo tri oblike encima COX: doslej znani obliki COX-1 in COX-2 ter novo odkrito obliko COX-3. Paracetamol je analgetik in antipiretik, vendar ne deluje protivnetno. Študije na *in vitro* modelih so pokazale, da paracetamol inhibira COX-3 pri znatno nižjih koncentracijah kot COX-1 in COX-2. Bolečino in verjetno tudi vročino naj bi zmanjšal z inhibicijo COX-3 v osrednjem živčnem sistemu. Ob občasnem jemanju priporočenih odmerkov je paracetamol varno zdravilo in so neželeni učinki blago izraženi. Previsoki enkratni in večkratni odmerki paracetamola pa so zelo nevarni, saj lahko njegov toksični metabolit N-acetil-p-benzokinonimin poškoduje jetra in ledvice. Toksičnost je odvisna od odmerka. Pri hitrem dajanju antidota N-acetilcisteina lahko preprečimo hepatotoksičnost in nefrotoksičnost paracetamola in možen smrtni izid. Zastrupitev s paracetamolom ima vedno višjo stopnjo incidence in smrtnosti.

Ključne besede: encimi COX, prostaglandini, paracetamol, analgetični učinek, antipiretični učinek, toksičnost.

ABSTRACT: Active substances which inhibit cyclooxygenase enzymes cause inhibition of synthesis of prostaglandins and show pain-relieving, fever-reducing and anti-inflammatory effects on the body. Prostaglandins, especially PGE_2 , are mediators in the cascade, which leads to inflammatory disease, characterized by fever, flush, edema and pain. Enzymes COX exist in the following forms: as COX-1 and COX-2 which have been discovered previously and as a newly discovered form COX-3.

Paracetamol relieves pain and reduces fever but it is not an effective antiinflammatory agent. *In vitro* COX-3 activity is inhibited at significantly lower concentrations of paracetamol than both COX-1 and COX-2 activities. It is suggested that paracetamol decreases pain and possibly fever by inhibition of COX-3 in the central nervous system.

Paracetamol is a safe medicine and its side effects are weakly expressed when its administration is only periodical and in recommended dosage. Very large acute and chronic doses of paracetamol are dangerous. N-acetyl-p-benzoquinoneimine, a product of paracetamol metabolism, can damage liver and kidneys. Toxicity depends on the dose. If the antidote N-acetylcysteine is given rapidly, hepatotoxicity and nephrotoxicity and possible death can be prevented.

Morbidity and mortality rate of paracetamol poisoning are rising steadily.

Key words: COX enzymes, prostaglandins, paracetamol, analgetic effect, antipyretic effect, toxicity.

1 Uvod

Paracetamol je bil v medicini prvič uporabljen že leta 1893, FDA pa je registracijo tega zdravila odobrila šele leta 1955. Uporablja se kot analgetik in antipiretik, njegov mehanizem delovanja pa še ni natančno poznan. Paracetamol zmanjšuje bolečino in znižuje vročino, vendar ni učinkovito zdravilo proti vnetju (1), kar je razvidno tudi iz dodeljene ATC oznake: N02BE.

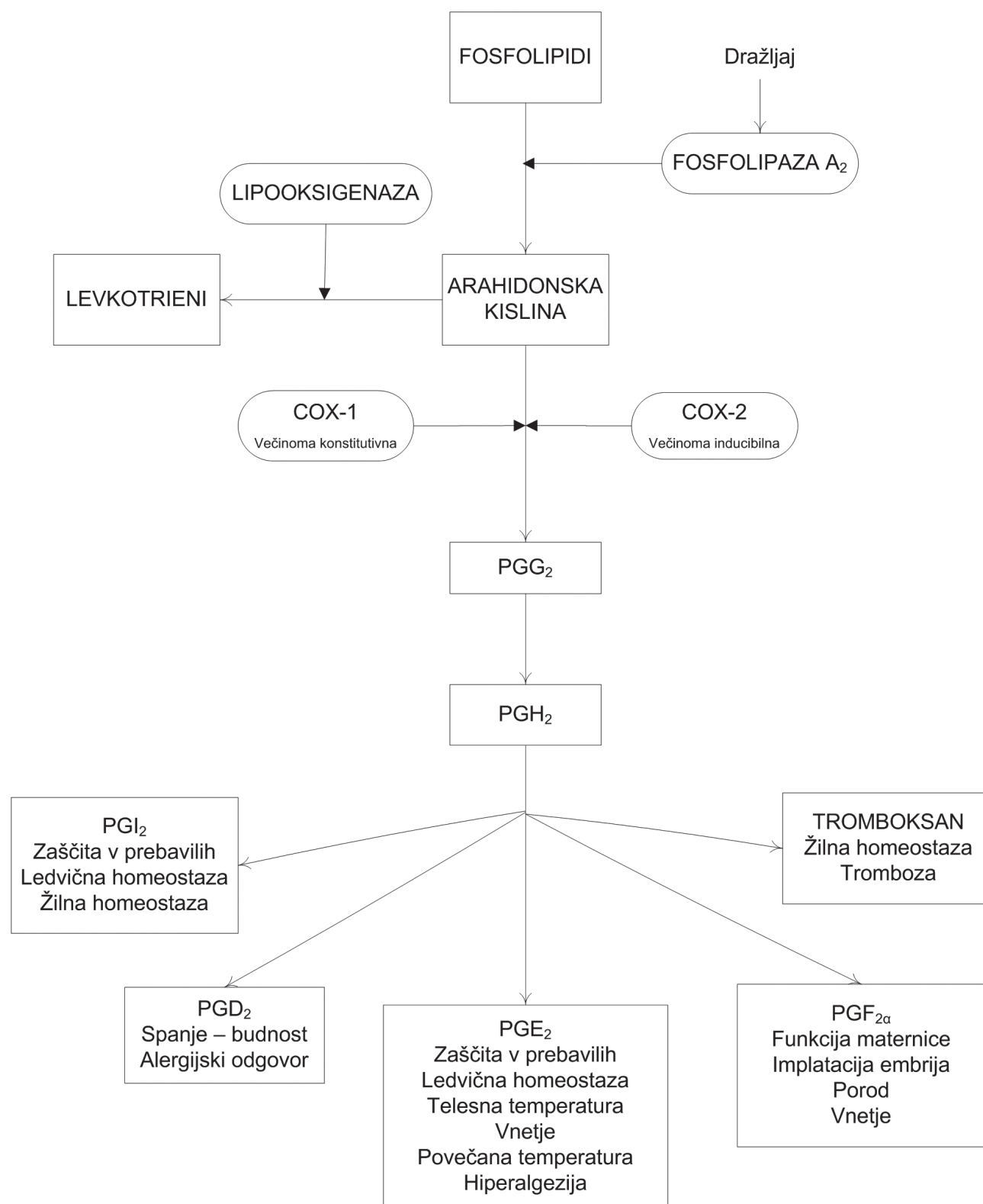
Doslej znana encima COX-1 in COX-2 sta izoencima, ki katalizirata sintezo prostaglandinov in sta tarčno mesto za učinkovine, ki jih v literaturi večinoma označujejo z izrazom nesteroidne protivnetne učinkovine. Te učinkovine zavirajo sintezo prostaglandinov tako, da inhibirajo obe izoformi COX, vendar z različno močjo (2). Od tega, v kolikšni meri zavirajo izoformi COX, pa so odvisni tudi neželeni učinki teh učinkovin. Paracetamol pri terapevtskih koncentracijah znatno ne

inhibira encimov COX-1 in COX-2 in s tem lahko pojasnimo njegovo pomanjkanje protivnetnega delovanja (3).

Nedavno so odkrili tretji encim COX, poimenovan COX-3, ki je v večji meri prisoten v možganih, in je lahko obsežno vpleten v posredovanje bolečine in vročine. Sklepajo, da je COX-3 možno mesto delovanja paracetamola (4). Tudi za nekatere druge analgetične in antipiretične učinkovine je bilo v *in vitro* poskusih ugotovljeno, da inhibirajo COX-3, torej bi lahko razširili njihov mehanizem delovanja od inhibicije izoform COX-1 in COX-2 do inhibicije vseh treh izoform COX (4).

Paracetamol se v lekarnah vsakodnevno izdaja in uporablja. Je lahko dostopno zdravilo. Znano je tudi, da se paracetamol zlorablja. Odmerjanje, ki ni v skladu z navodili za uporabo zdravila, lahko resno poškoduje ledvica in predvsem jetra.

Pregledni članki - Review Articles



Slika 1: Biosinteza in vloga prostaglandinov (5)

Figure 1: Biosynthesis and function of prostaglandins (5)

Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo?

V tem prispevku so opisana nova dognanja o mehanizmu delovanja paracetamola, predstavljena so dejstva, ki pojasnjujejo, kdaj in kako se lahko jemlje paracetamol, in ki opozarjajo na potencialne toksične učinke tega zdravila.

2 Struktura, genotip, porazdelitev po organizmu in fiziološka funkcija encimov COX-1, COX-2 in COX-3

Prostaglandini (PG) so derivati prostanojske kisline, to je 20-C maščobne kisline, ki vsebuje 5-členski ogljikov obroč. V telesu prostaglandini izvirajo iz arahidonske kisline. Arahidonska kislina nastane iz membranskih fosfolipidov z razgradnjo z encimom fosfolipaza A₂. Arahidonska kislina je substrat za ciklooksigenaze, ki sintetizirajo prostaglandin H₂ (PGH₂), iz katerega izhajajo ostali prostaglandini, ki imajo enako osnovno kemijsko zgradbo, vendar povzročajo različne učinke (5). Biosinteza in vloga prostaglandinov je predstavljena na sliki 1. Ti prostaglandini, posebno še prostaglandin E₂ (PGE₂), so pomembne spojine v kaskadi, ki vodi do glavnih znakov vnetja kot so vročina, rdečina, oteklina in bolečina (2). Prostaglandini E (PGE) v hipotalamusu povzročijo povišanje telesne temperature (3).

Encim COX obstaja v več oblikah: v doslej znanih COX-1 in COX-2 ter v nedavno odkriti obliki COX-3 (4).

Struktura encimov COX-1 in COX-2 je zelo podobna. Približno 60 % beljakovin obeh encimov je homolognih. Encim COX-2 ima v svoji strukturi dodaten žep, ki v primerjavi z encimom COX-1 poveča aktivno mesto encima (3). Ta dodaten žep je vezavno mesto za selektivne inhibitorje COX-2.

Encim COX-1 izhaja iz gena za COX-1, encim COX-2 pa iz gena za COX-2, medtem ko encim COX-3 izhaja iz gena za COX-1 (2).

Encim COX-1 je konstitutiven in je večinoma odgovoren za sintezo homeostatskih prostaglandinov, ki vzdržujejo normalno želodčno sluznico in elektrolitsko ravnotežje. Normalno je prisoten v prebavilih, ledvicah in trombocitih. Prostaglandini v želodcu uravnavajo kislost želodčnega soka, tvorbo sluzi in bikarbonata (5). Ti prostaglandini so citoprotektivni, saj imajo v želodcu protisekrecijsko in zaščitno vlogo. COX-1, ki nastaja v žilju, glomerulih in zbiralnih vodih ledvic, verjetno vpliva na vazodilatatorne prostaglandine, ki zaradi izločanja angiotenzina glomerulno filtracijo ohranjajo tudi v pogojih sistemske vazokonstrikcije (5).

Trombociti izločajo tromboksan A₂ s pomočjo lastnega encima COX-1 (5).

Encim COX-2 je inducibilen in nastaja predvsem v patoloških pogojih vnetja v celicah in tkivih. Induciran je s citokini, ki so povezani z vnetjem, poškodbo, napadom bolezni, rastnimi hormoni, nevrottransmiterji, oksidativnim stresom, nizkimi koncentracijami kisika v možganih in nevrodegeneracijo (2). Odgovoren je za nastanek PGE₂, ki je najpomembnejši posrednik vnetja. Ta zmanjšuje prag za bolečino in senzitivizira nociceptorje živčnih končičev za mediatorje vnetja, npr. bradikinin. Poleg tega PGE₂ zvišuje telesno temperaturo. Encim COX-2 je izražen tudi konstitutivno, in sicer v centralnem živčnem sistemu in v ledvicah (3). Pri človeku so odkrili encim COX-2 v podocitih glomerulov in v endotelih celicah arterij in ven ledvic (5). Inducira se

tudi kot odgovor na zmanjšan vnos soli (5). Vpleten je v izločanje renina in ima konstitutivno vlogo v razvoju ledvične skorje in pri ohranjanju ledvične funkcije z vazodilatatornimi prostaglandini (5).

Encim COX-3 izhaja iz gena za COX-1. Je konstitutiven ter ima ciklooksigenazno aktivnost in pomembne strukturne lastnosti encimov COX-1 in COX-2 (4). Encim COX-3 je pri človeku v največjem obsegu prisoten v srcu in možganski skorji, kjer predstavlja približno 5 % koncentracije encima COX-1 (2). Glede na izide raziskav v *in vitro* poskusih je možno, da je encim COX-3 v centralnem živčnem sistemu obsežno vpleten v posredovanje bolečine (2).

Normalna telesna temperatura je regulirana v centru v hipotalamusu, ki zagotavlja ravnotežje med izgubo in produkcijo toplote. Med vnetno reakcijo bakterijski endotoksini povzročijo, da makrofagi sprostijo interleukin-1 (IL-1), ki je pirogen. IL-1 v hipotalamusu stimulira nastanek PGE, le-ti pa povzročijo povišanje temperature (3). Možno je, da sta pri tem vpletena tako COX-2 kot tudi COX-3 (3). Encim COX-2 je namreč induciran z IL-1 v endoteliju krvnih žil v hipotalamusu. Vloge encima COX-3 pri nastanku vročine pa še niso potrdili.

Inhibicija encimov COX in posledično zmanjšano nastajanje prostaglandinov v telesu povzroča tri glavne farmakološko **želene učinke: protivnetni, analgetični in antipiretični učinek.**

Protivnetno delovanje je v glavnem posledica inhibicije encima COX-2 (3). Tako se zmanjša sinteza vazodilatatornih prostaglandinov (PGE₂, PGI₂), čemur sledi zmanjšanje vazodilatacije in manjše nastajanje edemov. Kljub temu kopičenje vnetnih celic ni zavrto.

Antipiretično delovanje nastopi predvsem zaradi inhibicije biosinteze prostaglandinov v hipotalamusu, kjer je možno, da sta udeležena encima COX-2 in COX-3 (3).

Analgetično delovanje nastopi na mestu vnetja ali poškodovanega tkiva, kjer se inhibira biosinteza prostaglandinov, kar pomeni zmanjšano senzitivizacijo nociceptorjev na živčnih končičih za vnetne mediatorje (3). Sposobnost odpravljanja glavobola je lahko povezana s prekinitev vazodilatatornih učinkov prostaglandinov na možgansko žilje. Poročila najnovejših raziskav *in vitro* kažejo, da se analgetični učinek pojavi zaradi inhibicije encima COX-3 v možganih in s tem tam zavrte biosinteze prostaglandinov (4).

Inhibicija encima COX-1 je trenutna in kompetitivno reverzibilna pri vseh analgetičnih in antipiretičnih učinkovinah ter nesteroidnih protivnetnih učinkovinah, razen pri acetilsalicilni kislini. Inhibicija encima COX-2 je odvisna od časa, to pomeni, da učinek inhibicije narašča s časom.

V preglednici 1 so predstavljene odkrite ciklooksigenaze, geni, iz katerih izhajajo, njihove lastnosti izražanja, nekatere funkcije in učinkovine, ki jih inhibirajo.

Neželeni učinki se pojavijo zaradi inhibicije konstitutivnih encimov COX, medtem ko inducibilni encimi COX pri tem nimajo vloge.

Gastrointestinalne motnje so večinoma posledica inhibicije encima COX-1 (3), saj ta inhibicija povzroča sistemske zaviranje citoprotektivnih prostaglandinov v sluznici želodca in dvanajstnika (5). Poleg tega posrednega načina lahko do okvare sluznice želodca in dvanajstnika pride tudi na neposreden način. To velja za tiste učinkovine, ki so šibke kisline, ki po kaskadi reakcij povzročijo poškodbo celičnih

Pregledni članki - Review Articles

COX	Gen, iz katerega izhaja	Lastnosti izražanja	Funkcije	Inhibicija z učinkovinami
COX-1	COX-1	konstitutivno izražen	vpleten pri bolečini, aktivaciji trombocitov, zaščiti želodca	nesteroidne protivnetne učinkovine, vključno z acetilsalicilno kislino, ostale učinkovine proti bolečini
COX-3	COX-1	konstitutivno izražen	verjetna vpletenost pri občutenju bolečine, majhna vpletenost pri vnetju	močno ga inhibira paracetamol in tudi nekatere nesteroidne protivnetne učinkovine
COX-2	COX-2	induciran z rastnimi faktorji, nevrottransmiterji, vnetnimi citokini, oksidativnim stresom, poškodbo, vnetjem, nizkimi koncentracijami kisika v možganih, krči, nevrodegeneracijo; konstitutivno izražen v možganih, ledvicah in drugih organih.	inducibilen encim COX-2 povzroča bolečino zaradi vnetja in vročino; konstitutiven encim COX-2 je vpleten v dozetnost sinaps	Nesteroidne protivnetne učinkovine, COX-2 selektivni inhibitorji

Preglednica 1: Ciklooksigenaze (2)
Table 1: Cyclooxygenases (2)

struktur v želodčni sluznici (5). Simptomi so dispepsija, diareja in včasih zaprtje, slabost in bruhanje, krvavitve v želodcu in nastanek gnojenja ali čira.

Neželeni učinki na ledvicah se pojavijo zaradi inhibicije encimov COX-1 in COX-2, kar povzroča zaviranje sinteze prostaglandinov. Lahko pride do akutne ledvične insuficience, ki je reverzibilna, če se prekine z jemanjem zdravila (3). Pojavi se zaradi inhibicije sinteze prostaglandinov PGE₂ in PGI₂, ki sta vpletena v vzdrževanje dinamike pretoka skozi ledvica (5). Vazodilatorni prostaglandini v ledvicah namreč vzdržujejo ravnovesje z vazokonstriktornim angiotenzinom II in pomagajo ohranяти glomerulno filtracijo (5). Če se poruši to ravnovesje, lahko nastanejo edemi, kar lahko pripelje do manjšega učinka antihipertenzivnih zdravil in povišanja krvnega tlaka za 5 mm Hg (5).

Preko trombocitov izraženi neželeni učinki so posledica inhibicije samo COX-2. Trombociti izločajo tromboksan A₂ s pomočjo lastne COX-1 (5). Tromboksan je močan vazokonstriktor in ima proagregacijsko delovanje. Prostaciklin, ki ga katalizira COX-2 v endotelnih celicah, deluje obratno in vzdržuje potrebno ravnovesje (5). Pri učinkovinah, ki zavirajo oba encima, so proagregacijski in antiagregacijski dejavniki v ravnovesju (5). Selektivni inhibitorji COX-2 pa zavirajo samo nastanek prostaciklina, ne pa tudi tromboksana, zato povečujejo tveganje za srčno-žilne bolezni (5).

3 Učinkovitost in jakost inhibicije encimov COX in vitro

Farmakodinamske lastnosti so opisane za nekatere antipiretične in analgetične učinkovine ter nesteroidne protivnetne učinkovine. Razlaga temelji na rezultatih, dobljenih s pomočjo *in vitro* modelov.

Namen raziskave je bil ugotoviti sposobnost inhibicije encimov COX-1, COX-2 in COX-3 nekaterih analgetičnih in antipiretičnih učinkovin (paracetamol, fenacetin, antipirin, dipiron) ter nekaterih nesteroidnih

protivnetnih učinkovin (acetilsalicilna kislina, diklofenak, ibuprofen in indometacin) (4).

Poskus je bil izveden na celicah insektov, ki so bile infektirane z encimi COX-1, COX-2 in COX-3. Te celice so preinkubirali z izbrano učinkovino in jim dodali arahidonsko kislino. Preskusili so aktivnost ciklooksigenaz pri razgradnji arahidonske kisline do PGE₂ ob prisotnosti izbranih učinkovin. V tabeli 2 so predstavljeni rezultati inhibicije encimov COX v obliki IC₅₀ vrednosti učinkovin ob prisotnosti 30 μM arahidonske kisline.

Paracetamol pri 30 μM koncentraciji arahidonske kisline inhibira samo COX-3 pri IC₅₀ = 460 μM, za inhibicijo COX-1 in COX-2 pa so potrebne koncentracije, večje od 1000 μM. Paracetamol naj bi zmanjšal bolečino in verjetno tudi vročino tako, da inhibira COX-3 v možganih. Zaradi zelo šibke afinitete do COX-1 in COX-2, paracetamol skoraj ne zavira sinteze prostaglandinov na periferiji telesa in zato nima niti protivnetne učinkovitosti, niti neželenih učinkov na želodec in trombocite.

Paracetamol je metabolni produkt fenacetina. **Fenacetin** je analgetik in antipiretik, ki ga ne uporabljamo več, ker je bil zelo škodljiv za ledvica. Če so ga ljudje prepogosto jemali, je lahko povzročil hemolitično anemijo in methemoglobinemijo (6), sumijo pa tudi, da je bil karcinogen za ledvica (4). Fenacetin se v telesu hitro O-deetilira in nastane paracetamol, le-ta pa se naprej metabolizira v druge spojine (N-acetil-p-benzokinonimin), ki so toksične (4) (slika 2). Torej le manjša količina fenacetina kroži po krvi. Fenacetin močnejše in hitreje inhibira COX-3, saj njegova IC₅₀ vrednost znaša 102 μM merjeno pri enakih pogojih kot v primeru paracetamola. Fenacetin ravnotako kot paracetamol inhibira COX-1 in COX-2 pri odmerkih, ki so višji od 1000 μM.

Pirazolonske učinkovine, to so dipiron, aminopirin in antipirin, se danes ne uporabljajo več. Dipiron je povzročal agranulocitozo, ki je lahko bila smrtna (6). Poskus je pokazal, da te učinkovine prednostno inhibirajo COX-3.

Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo?

Učinkovina	IC ₅₀ , μM			Želeni učinki	Možni neželeni učinki (na organih)
	COX-1	COX-2	COX-3		
Paracetamol	>1000	>1000	460	analgetični, antipiretični	
Aminopirin (4-dimetilaminoantipirin)	>1000	>1000	688	analgetični, antipiretični	
Antipirin (1-fenil-2,3-dimetilpirazol-5-on)	>1000	>1000	863	analgetični, antipiretični	
Acetilsalicilna kislina	10	>1000	3,1	analgetični, antipiretični, protivnetni	neželeni učinki na gastrointestinalni trakt
Diklofenak	0,035	0,041	0,008	analgetični, antipiretični, protivnetni	želodčne razjede, neželeni učinki na ledvicah
Dipiron	350	>1000	52	analgetični, antipiretični	
Ibuprofen	2,4	5,7	0,24	analgetični, antipiretični, protivnetni	želodčne razjede, neželeni učinki na ledvicah
Indometacin	0,010	0,66	0,016	analgetični, antipiretični, protivnetni	želodčne razjede, neželeni učinki na ledvicah
Fenacetin	>1000	>1000	102	analgetični, antipiretični	
Kofein	>1000	>1000	>1000	analgetični	
Talidomid	>1000	>1000	>1000	analgetični	

Preglednica 2: Vrednosti IC₅₀ izbranih analgetičnih in antipiretičnih učinkovin ter nesteroidnih protivnetnih učinkovin (4)
Table 2: Values of selected analgesic and antipyretic drugs and non-steroid antiinflammatory drugs (4)

Dipiron močnejše inhibira COX-3 kot COX-1 in COX-2. Dipiron inhibira COX-3 z IC₅₀ vrednostjo 52 μM in COX-1 s 6,6–krat višjo koncentracijo. Inhibicije COX-2 pri odmerkih pod 1000 μM ni bilo. Dipiron je predzdravilo, ki v vodni raztopini razpade na spojine, ki imajo pirazolonsko strukturo in so različno močni analgetiki in antipiretiki.

Antipirin in dimetilaminopiren sta po strukturi podobna dipironu, vendar v primerjavi z njim šibkeje inhibirata COX-3.

Nekatere nesteroidne protivnetne učinkovine z različno močjo inhibirajo COX-3. **Diklofenak** je najmočnejši inhibitor COX-3. **Diklofenak, ibuprofen in indometacin** inhibirajo vse tri izoencime COX, **acetilsalicilna kislina** pa prednostno inhibira COX-1 in COX-3.

Diklofenak (maksimalni dnevni odmerek 150 mg), **ibuprofen** (maksimalni dnevni odmerek 3200 mg) in **indometacin** (maksimalni dnevni odmerek 200 mg) se ne razlikujejo v glavnih farmakodinamskih učinkih; vsi delujejo analgetično, antipiretično in protivnetno. Protivnetno delovanje teh učinkovin je posledica inhibicije predvsem COX-2. Kadar so te učinkovine namenjene za zdravljenje vnetja, so njihovi neželeni učinki posledica njihovega inhibiranja periferne COX-1 in COX-2. Zaradi inhibicije COX-1 se pojavijo želodčne razjede in neželeni učinki na ledvicah, slednji nastopijo tudi zaradi inhibicije COX-2.

Iz poskusa je razvidno, da diklofenak, ibuprofen in indometacin inhibirajo COX-3 pri znatno nižjih koncentracijah kot paracetamol, vendar pa v primerjavi s paracetamolom slabše prehajajo hematocencefalno bariero. Za razliko od paracetamola inhibirajo tudi COX-1 in COX-2 pri zelo nizkih koncentracijah.

Acetilsalicilna kislina inhibira COX-1 in COX-3. Inhibicija COX-3 v centralnem živčnem sistemu naj bi povzročila analgetični učinek, lahko pa tudi antipiretični učinek. V poskusu acetilsalicilna kislina inhibira COX-2 v

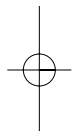
koncentraciji nad 1000 μM. Že od prej je znano, da pri ljudeh deluje analgetično že pri odmerkih 5-15 mg/kg, medtem ko so odmerki za protivnetno delovanje višji in znašajo 60-80 mg/kg (4). Zaradi močne inhibicije COX-1 so močno izraženi njeni neželeni učinki na gastrointestinalni trakt.

Talidomid in kofein, ki delujeta analgetično, ne inhibirata ciklooksigenaze. FDA je leta 1988 odobrila registracijo talidomida, vendar se le redko uporablja pri zdravljenju lepše in v onkologiji, predvsem pri multiplem mielomu. Kofein pa je prisoten kot ena izmed učinkovin v nekaterih kombiniranih zdravilih proti bolečini in vročini.

Mehanizem delovanja **paracetamola** dolgo ni bil poznan; domnevali so, da inhibira encim COX v možganih, vendar ta encim ni bil identificiran (7). Kasneje so potrdili, da se COX-3 nahaja v človeških možganih, natančneje v možganski skorji (4), kamor paracetamol zaradi svojega lipofilnega značaja dobro prehaja (8), zato se je odprla pot za razlago njegovega mehanizma delovanja.

Predlagani mehanizem delovanja bi lahko razširili tudi na pirazolonske učinkovine, kot so dipiron, aminopirin in antipirin; še posebej zato, ker je bilo dokazano, da dipironov aktivni metabolit 4-metilaminoantipirin doseže koncentracije 104 mM v plazmi in 86 mM v centralnem živčnem sistemu (4), kar pomeni inhibicijo COX-3 v možganih pri terapevtskih koncentracijah pirazolonskih učinkovin. Po analogiji lahko torej sklepamo, da tudi pri terapevtski koncentraciji paracetamola v plazmi, ki znaša približno 100 μM, prihaja do inhibicije COX-3 v možganih, predvsem ker paracetamol dobro prehaja krvno-možgansko bariero in zato lahko predpostavljamo, da je koncentracija paracetamola v možganih enakega velikostnega razreda kot koncentracija v plazmi.

COX-3 v centralnem živčnem sistemu bi torej lahko bil glavno mesto delovanja vseh nesteroidnih protivnetnih učinkovin ter analgetikov in antipiretikov (4). Nesteroidne protivnetne učinkovine, ki v svoji struk-



turi vsebujejo karboksilno skupino, krvno-možgansko bariero sicer prehajajo slabše, kljub temu pa je možno, da dosežejo zadostno koncentracijo v možganih in hrbtenjači, da inhibirajo COX-3 (4).

4 Klinična učinkovitost in varnost paracetamola

4.1 Delovanje in lastnosti paracetamola pri terapevtskih odmerkih

Paracetamol je **analgetik in antipiretik, ne deluje pa protivnetno**. Po peroralni uporabi se iz zgornjega dela gastrointestinalnega trakta **absorbira** približno 80 % odmerka zdravila. Pomembno mesto absorpcije učinkovine je tanko črevo. Hitrost absorpcije je odvisna od hitrosti praznjenja želodca; zmanjša se, če bolnik zaužije obrok, ki vsebuje veliko ogljikovih hidratov.

Po 1 uri znaša koncentracija paracetamola v plazmi 6,4 µg/ml (42 µM) (8), največjo koncentracijo v plazmi pa doseže po 2 do 3 urah po zaužitju. Po večkratnem jemanju zdravila se vzpostavi stacionarno stanje, kjer maksimalna plazemska koncentracija znaša 8,2 µg/ml (54 µM), minimalna pa 6,9 µg/ml (46 µM). Te koncentracije so izračunane za 70 kg težkega človeka za odmerek 500 mg pri 4-urnem intervalu odmerjanja, ob predpostavki, da se paracetamol porazdeljuje po telesu v skladu z enoprostornim modelom s povprečnimi vrednostmi parametrov F (obseg absorpcije), V_D (volumen porazdelitve) in $t_{1/2}$ (biološka razpolovna doba).

Paracetamol se enakomerno **porazdeli** po telesu in se minimalno veže na plazemske beljakovine (15 do 25 %). Njegov razpolovni čas v plazmi ob terapevtskem odmerku je od 1 do 3 ure.

Paracetamol se **presnovi** pretežno v jetrih, zelo malo tudi v črevesju in v ledvicah. Osnovna presnovna pot je tvorba konjugatov z glukuronsko in žveplovo kislino. Pri običajnem odmerjanju so pretežni metaboliti paracetamola sulfati in glukuronidi, ki so netoksični metaboliti. Majhen del učinkovine pa se metabolizira z encimom citokrom P-450 2E1 do N-acetil-p-benzokinonimina, ki je zelo reaktiven metabolit, toksičen za jetrne celice (3, 9).

Pri normalnih odmerkih paracetamola se N-acetil-p-benzokinonimin razstruplja s konjugacijo z glutationom (telesu lastna snov, ki je donor SH-skupine) in nastanejo vodotopni netoksični konjugati, ki se **izločijo** skozi ledvica z urinom.

Poleg te reakcije viri navajajo tudi reakcijo, ki vodi do nastanka fenoksilnega radikala paracetamola (10). Ocenjujejo, da je ta radikal odgovoren za poškodbe, ki jih navadno predpisujejo N-acetil-p-benzokinoniminu (10). Fenoksilni radikal paracetamola se z glutationom ne reducira popolno, se pa z askorbatom (11).

Na sliki 2 je metabolizem paracetamola predstavljen shematsko.

4.2 Prekoračitev odmerka in toksičnost paracetamola

Previsoki odmerki paracetamola so zelo nevarni in lahko povzročijo jetrno okvaro s smrtnim izidom. Toksičnost je odvisna od odmerka. Akutni toksični učinki pri odrasli osebi lahko nastopijo že pri 12 tabletah paracetamola (6 gramov) (13). Kot hepatotoksičen enkratni

odmerek paracetamola pri odrasli osebi je sprejeta vrednost 150 mg/kg telesne mase (14). Pri otrocih se znaki enkratnega prevelikega odmerjanja pokažejo pri odmerkih, ki so večji od 90 mg/kg telesne mase.

Količina paracetamola, ki je potrebna, da se razvije kronična toksičnost, ni točno definirana, vendar je količina manjša od tiste, ki je potrebna za enkratno preveliko odmerjanje. Če jemljemo paracetamol nekaj dni do več tednov v odmerkih, ki so večji od priporočenega dnevnega maksimalnega terapevtskega odmerka, in so hkrati manjši od enkratnega toksičnega odmerka, lahko povzročijo poškodbo jeter in ledvic.

Dejavniki, ki vplivajo na toksičnost paracetamola so (15):

- odmerek paracetamola,
- količina paracetamola, ki se absorbira,
- aktivnost glukuronidacijskih in sulfatnih sistemov,
- zaloge glutaciona v jetrih,
- dolgotrajnost uporabe paracetamola (16),
- uporaba kombiniranih zdravil s paracetamolom (16).

Pri enkratnem prevelikem odmerjanju paracetamola ali ko se paracetamol jemlje skozi daljši čas v odmerkih, ki presegajo maksimalni dnevni odmerek, se tkivne zaloge glutaciona porabijo in N-acetil-p-benzokinonimin se prične kumulirati in kovalentno vezati na **jetrne celice**. To povzroči nekrozo jetrnih celic in tudi ledvičnih tubulov (3). Klinično se poškodba jeter in ledvic pokaže šele čez 2–4 dni (9).

24 ur po prekoračitvi priporočenega odmerka se redko pojavijo resni simptomi, pojavijo se le slabost in bruhanje. Kjer je paracetamol le sestavina v kombiniranem pripravku, se bodo simptomi zaradi paracetamola pojavili za simptomi, ki jih bodo povzročile druge učinkovine v pripravku (17). Bolniki, ki vzamejo zelo veliko količino paracetamola, bodo že po enem dnevu lahko imeli povišano aktivnost jetrnih encimov alanin aminotransferaze (ALT) in aspartat aminotransferaze (AST) (18). Bolnik to lahko občuti le kot bolečino na desni strani trebuha. Če se prekomerno odmerjanje paracetamola nadaljuje, nastopijo zmedenost, zlatenica, nesposobnost strjevanja krvi, otekanje možganov in posledično smrt (13). Pri zelo resnih primerih se poleg jetrne odpovedi pojavi tudi ledvična odpoved.

Ker paracetamol sam ne povzroči takojšnje zaspanosti ali nezvesti in ker se resni klinični simptomi zastrupitve pojavijo šele po 2–4 dneh, je zelo verjetno, da bolniki takoj ne poiščejo zdravniške pomoči. Pri paracetamolu je namreč ravno čim prejšnja ugotovitev, da gre za zastrupitev s paracetamolom, življenjskega pomena, ker je možno z antidotom preprečiti poškodbo jeter. Zdravljenje prekoračitve odmerka je simptomatsko. Specifični antidot pri prevelikem odmerjanju paracetamola je N-acetilcistein, ki ga je treba dati intravensko v prvih 6–12 urah po prevelikem odmerjanju. Če odpovedi jeter ni moč ustaviti, je edina možnost za rešitev transplantacija jeter. N-acetilcistein obnovi zaloge glutaciona v jetrih in ledvicah, neposredno se veže z N-acetil-p-benzokinoniminom namesto glutaciona in poveča konjugacijo paracetamola s sulfatom (9). Antidot pri prekoračitvi odmerka paracetamola je tudi metionin, ki ga dajemo peroralno, vendar je njegov učinek manj zanesljiv.

Toksičnost paracetamola je največkrat povezana s hepatotoksičnostjo, vendar elektrofilni kinoni nastajajo tudi v **ledvicah**, ravno tako pod

Pregledni članki - Review Articles

vplivom encimov citokrom P-450 (19). Reaktivni metaboliti so nevtralizirani z glutationom. Toksični učinek na ledvice se pojavi, ko je presežena nevtralizacijska kapaciteta glutationa. Zaradi uporabe paracetamola se lahko pojavi akutna ali kronična ledvična odpoved, ker zaradi kinonov pride do nekroze ledvičnih tubulov. Akutna ledvična odpoved zaradi paracetamola se manifestira kot akutna papilarna nekroza, ki se lahko pojavi samostojno ali v povezavi z jetrno nekrozo (20).

Paracetamol povzroča ledvično papilarno nekrozo, ki se začne z odmiranjem tkiva v Henleyevi zanki in se nadaljuje dokler ne odmrne celotna papila (19). Znaki so glavobol, dispepsija, infekcija urinarnega trakta, pojava se lahko tudi hipertenzija in zaprtje urinarnega trakta, kar je posledica uničene papile (19).

Paracetamol poleg tega inhibira nastajanje ledvičnih prostaglandinov. V ledvicah je največ encimov COX-1, inducirajo pa se lahko tudi encimi COX-2. Predvidevajo, da paracetamol v manj primerih kot ostali analgetiki povzroča akutno ledvično odpoved. Vzrok je šibka inhibicija periferne ciklooksigenaze (1).

Na akutno nefrotoksičnost paracetamola vplivajo akutna ali kronična jetrna poškodba, starost, hkratna indukcija encimov citokrom P-450 in že prisotna ledvična poškodba (19). Ljudje, ki dnevno jemljejo paracetamol, izkazujejo večje tveganje za ledvično bolezen, kot ljudje, ki paracetamol vzamejo le občasno.

Večja možnost za hepatotoksičnost in nefrotoksičnost paracetamola je pri bolnikih s predhodno jetrno ali ledvično okvaro.

Bolj občutljivi za toksične učinke prevelikega odmerjanja paracetamola so bolniki, ki jemljejo zdravila, ki inducirajo encimski sistem citokrom P450, še posebej izoencim 2E1 (rifampicin, fenobarbital, izoniazid, fenitoin, karbamazepin) (9). Ti bolniki lahko v večjem obsegu metabolizirajo paracetamol do N-acetil-p-benzokinonimina.

Večje tveganje za pojav toksičnih učinkov paracetamola je tudi pri bolnikih z motnjami hranjenja in pri bolnikih z AIDS-om, ker imajo manjše zaloge glutationa in posledica tega je manjša sposobnost razstrupljanja N-acetil-p-benzokinonimina (9).

Toksični odmerek paracetamola pri bolnikih z večjim tveganjem je 75 mg/kg telesne mase (14).

Raziskave, opravljene na živalih, so pokazale različen vpliv alkohola na toksičnost paracetamola, odvisno od časa in trajanja jemanja paracetamola in alkohola (21, 22). V primeru hkratnega jemanja paracetamola in alkohola, alkohol kompetitivno inhibira encim citokrom P450 2E1 in tako zaustavi pot metabolizma paracetamola do toksičnega metabolita N-acetil-p-benzokinonimina (21).

Kronično uživanje alkohola pa inducira encim citokrom P450 2E1 in tudi zmanjša zalogo glutationa (21). Če se vzame paracetamol, ko je etanol že izločen iz telesa (vsaj po 12 urah), encim citokrom P450 2E1 pa je induciran, prihaja do kumulacije N-acetil-p-benzokinonimina v jetrih, kar vodi do povečanja toksičnosti paracetamola že pri terapevtskih odmerkih (21).

Do sedaj teh ugotovitev na človeku še niso potrdili, vendar je pri ljudeh, ki kronično uživajo alkohol, večja predispozicija za hepatotoksičnost paracetamola in sicer že pri terapevtskih odmerkih paracetamola (23, 24). V ZDA je telefonska anketa pokazala, da 22 % odrasle

populacije vsak teden jemlje paracetamol (24). Ocenjujejo, da je od 5 % do 10 % ljudi alkoholikov, zato je potrebno upoštevati zdravstvene posledice resnih neželenih učinkov paracetamola (24).

Otroci večinoma dobijo paracetamol s kombiniranimi zdravili za lajšanje posledic gripoznih okužb in prehladnih težav kot so kašelj, izcedek iz nosu, glavobol. Nobena študija ni dokazala učinkovitosti teh zdravil za pospeševanje zdravljenja teh bolezni in večina otrok se sčasoma pozdravi neodvisno od zdravljenja z zdravili (25). Večina zdravil vsebuje več učinkovin kot so dekongestiv, učinkovino proti kašlju, antihistaminik, antipiretik oziroma analgetik. Tveganje za toksičnost paracetamola pri otrocih je prisotno zaradi možne prekoračitve odmerka in trajanja jemanja, kar se dogodi predvsem kadar zdravila v priporočenih odmerkih ne dosežejo želenega učinka in zato starši povečajo odmerek ali pa otroku celo dajo zdravilo za odrasle, ker ga dojemajo kot močnejšega (25).

Spremembe, ki nastanejo v jetrnih celicah zaradi starosti vodijo do večje dovzetnosti oziroma občutljivosti za paracetamol, s čimer se poveča tveganje za jetrno odpoved, ki je posledica predoziranja paracetamola (23). Tveganje za to je večje pri ljudeh, ki so starejši od 40 let in se s starostjo povečuje še zaradi višje prevalence kroničnega pitja alkohola (23). Do smrtnih izidov zaradi predoziranja paracetamola pride pogosteje pri starejših odraslih kot pri mladih ljudeh. Možno je tudi, da mladi ljudje preprosto prenesejo obsežnejšo poškodbo jeter zaradi večje mase funkcionalnih jetrnih celic (23).

4.3 Indikacije (8)

Paracetamol se uporablja za

- zniževanje zvišane telesne temperature, ki spremlja različne bakterijske in virusne okužbe,
- lajšanje blagih do zmerno močnih bolečin kot so glavobol, zobobol, bolečine med menstruacijo, bolečine pri poškodbah ter po zdravniških in zobozdravniških posegih, prehodne bolečine v mišicah in sklepah pri prehladu in gripi,
- lajšanje revmatičnih bolečin, npr. pri osteoartritozi,
- lajšanje bolečin v križu, ki so nevnetnega izvora,
- lajšanje bolečin pri dobivanju zob (26),
- zniževanje zvišane telesne temperature, ki se pojavi pri otroških okužbah, kakor so norice, oslovski kašelj, ošpice in mumps (26),
- zniževanje zvišane telesne temperature po cepljenjih pri otrocih starih 2 do 3 mesece (26).

4.4 Kontraindikacije (27)

Zdravila ne dajemo bolnikom s hujšimi motnjami v delovanju ledvic in jeter ter ljudem, ki so preobčutljivi na paracetamol. Kontraindikacija je virusni hepatitis. Paracetamol je kontraindiciran tudi pri ljudeh, ki imajo pomanjkanje encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze v rdečih krvničkah.

4.5 Interakcije paracetamola z drugimi učinkovinami (8)

Pri hkratnem jemanju paracetamola in

- **zdravil, ki inducirajo jetrne encime (npr. antiepileptiki: fenitoin, fenobarbital in karbamazepin, barbiturati in rifampicin),** se poveča tvorba hepatotoksičnih metabolitov paracetamola, ki povzročijo jetrne okvare;

- **izoniazida** se zveča nevarnost hepatotoksičnosti. Bolniki morajo omejiti uporabo paracetamola;
- **antikonvulzivov ali peroralnih steroidnih kontracepcijskih sredstev** skozi daljše časovno obdobje se pospeši presnova paracetamola in njegovo izločanje iz telesa (28);
- **alkohola** se lahko poveča hepatotoksičnost paracetamola;
- **varfarina in drugih kumarinov** se okrepi njihov antikoagulantni učinek in poveča tveganje za krvavitve (27);
- **metoklopramida in domperidona** se poveča hitrost absorpcije paracetamola (27);
- **holestiramina** se zmanjša obseg absorpcije paracetamola (zmanjšan učinek paracetamola) (27);
- **kloramfenikola** se razpolovni čas kloramfenikola lahko podaljša (do petkrat) (27);
- **zidovudina** lahko pride do granulocitopenije;
- **acetilsalicilne kisline ter drugih analgetikov in antipiretikov** se zveča tveganje za nastanek nefropatije in ledvične papilarne nekroze;
- **salicilamida** se podaljšuje čas izločanja paracetamola, kar vodi do kopičenja učinkovine in do povečane tvorbe toksičnih presnovkov (27).

4.6 Odmerjanje in uporaba paracetamola (28)

Odrasli (tudi starejši) in otroci, starejši od 12 let, vzamejo eno do dve 500 mg tableti vsakih 4–6 ur. Zdravila se ne sme vzeti pogosteje kot vsake 4 ure. Posamezni odmerek ne sme biti večji kot 2 tableti. Največji dnevni odmerek je 8 tablet (4 g paracetamola na dan).

Otroci, stari od 6–12 let, dobijo polovico do ene 500 mg tablete vsakih 4–6 ur. Zdravila ne smejo dobiti pogosteje kot vsake 4 ure. Največji dnevni odmerek je 4 tablete (2 g paracetamola na dan).

Za otroke, mlajše od 6 let, odmerek paracetamola določimo glede na njihovo starost.

Otroci od 1 do 6 let dobijo 120 do 240 mg paracetamola, dojenčki od 3 do 12 mesecev pa dobijo 60 do 120 mg paracetamola. Dojenčki do 3 mesecev paracetamol lahko dobijo le po predhodnem posvetu z zdravnikom.

Odmerek se po potrebi ponovi na vsakih 4 do 6 ur, vendar ne pogosteje kot na vsake 4 ure. Otroci ne smejo jemati paracetamola dlje kot 3 dni ne da bi se starši oziroma skrbniki posvetovali z zdravnikom. Za otroke se uporabljajo farmacevtske oblike kot so sirupi, suspenzije ali svečke.

4.7 Neželeni učinki paracetamola pri terapevtskem odmerjanju (27)

Ob jemanju priporočenih odmerkov so neželeni učinki redki in blagi. Občasno se pojavijo slabost in preobčutljivostne kožne reakcije (izpuščaji, koprivnica, srbečica). Izjemno redki so primeri hematoloških reakcij (trombocitopenija, levkopenija, agranulocitoza, hemolitična anemija). Lahko se pojavijo utrujenost, bruhanje, driska, zlatenica, pankreatitis in povečana aktivnost jetrnih encimov. Zelo redko se lahko pojavijo znaki anafilaktične reakcije (29). Varnost je manjša, če so odmerki in trajanje jemanja prekoračeni.

5 Farmakovigilančni vidiki uporabe paracetamola

Paracetamol je na voljo na recept in brez recepta in sicer kot edina učinkovina v zdravilu ali kot sestavina v različnih kombiniranih pripravkih. Kombinacije lahko vsebujejo različne učinkovine kot so acetilsalicilna kislina, kodein, propifenazon, kofein, efedrin, psevdoefedrin, dekstrometorfan, vitamin C. Ta zdravila so večinoma namenjena za zmanjševanje bolečine ali pa se uporabljajo kot zdravila za lajšanje posledic gripoznih obolenj in prehladov. Paracetamol je na voljo pod številnimi lastniškimi imeni zdravil, kar otežuje izbiro in ustvarja zmedo. Ljudi pa k nakupu in samozdravljenju mnogokrat spodbuja tudi široko reklamiranje zdravil, ki so na voljo brez recepta.

Sam paracetamol je ob predpisani in le občasni uporabi varen. Nekateri bolniki pa ga zaradi kroničnih bolečin kot so glavobol, bolečine v hrbtenici ali artritis, zlorablajo. Pogostost njegove uporabe lahko pojasnita dve dejstvi. Prvo je to, da je paracetamol lahko dostopno zdravilo, saj ga lahko kupimo brez recepta in tako rekoč ni nadzora nad tem, kakšne količine paracetamola nekateri bolniki jemljejo. Drugo dejstvo pa je, da se ljudje ne zavedajo potencialnih nevarnosti pri predolgem jemanju paracetamola ali pri preseganju maksimalnega dnevnega odmerka. Ljudje niso poučeni o učinkih, ki jih povzroči preveliko odmerjanje paracetamola in v kolikšnem času ti učinki nastopijo. Ne zavedajo se tudi dejavnikov tveganja, ki znižajo mejo varnosti že pri terapevtskih odmerkih paracetamola.

Statistična poročila o predpisovanju zdravil v Sloveniji kažejo, da za zdravljenje oziroma lajšanje bolečine veliko uporabljamo nesteroidna protivnetna zdravila, premalo pa uporabljamo opioide, podcenjena pa je tudi terapevtska vrednost paracetamola (30, 31). Opazimo pa lahko, da predpisovanje paracetamola v Sloveniji zadnja leta narašča (30, 32, 33, 34). Poraba paracetamola se je v letu 2004 zvišala za 9 % v primerjavi z letom 2003 (34). Problematika prevelikega odmerjanja in zastrupljanja s paracetamolom v Sloveniji ni izpostavljena, medtem ko je v Veliki Britaniji temu posvečeno veliko pozornosti. Tam je paracetamol na voljo v lekarnah ter v trgovinah, supermarketih in na bencinskih črpalkah. V Veliki Britaniji je paracetamol najbolj razširjeno zdravilo vzeto v prevelikem odmerku (14, 35) in obsega 50 % akutnih bolnišničnih zastrupitev (14). Povzroča polovico vseh primerov akutnih jetrnih odpovedi (16). Največkrat je to povezano z namerno samozastrupitvijo, vendar je tudi veliko primerov nenamernega prevelikega odmerjanja (16). Študija, ki so jo izvedli, je med drugim pokazala, da ljudje izberejo paracetamol, ker je lahko dostopen in poceni (35).

Center, ki spremlja podatke o zastrupitvah in smrtih zaradi prevelikih odmerkov zdravil, poroča, da je v Angliji in Walesu vsako leto približno 2500 smrti zaradi prevelikega odmerjanja zdravil ali zastrupitve z zdravili (13). Najpogostejši vzrok smrti zaradi neopiatnih učinkovin je paracetamol, ki povzroči jetrno bolezen s smrtnim izidom, če se ga vzame v prevelikem odmerku namerno ali nenamerno (13). Na osnovi retrospektivne raziskave s pomočjo podatkovne baze o smrtih zaradi prevelikega odmerjanja in zastrupitve z zdravili so ugotovili, kakšna je bila smrtnost zaradi paracetamola v Angliji in Walesu med leti 1993 – 1997 (13). Smrti, povezane s paracetamolom, so lahko nastopile kot posledica vzetega samega paracetamola, paracetamola v sestavljenem pripravku ali pa paracetamola, ki je bil vzet z enim ali več drugimi zdravili. V letih 1993–1997 je bilo 2499 smrti, povezanih s paraceta-

Pregledni članki - Review Articles

molom (13). Povprečno število smrti zaradi paracetamola se zelo razlikuje, odvisno od tega, kako definiramo takšno smrt: število znaša od 500 smrti na leto za vse smrti zaradi prevelikega odmerjanja in zastrupitev, kjer je bil paracetamol omenjen, do 175 smrti na leto, kjer je bil zaužit samo paracetamol, in do 90 smrti na leto, kjer je nastopila jetrna bolezen in je bil zaužit samo paracetamol (13). 175 smrti na leto verjetno prikazuje boljše določitev smrtnosti, ki je povezana s paracetamolom, kot pa število smrti, ki bazira na vseh smrtih, kjer je bil paracetamol le eno izmed zdravil, ki so jih ti ljudje vzeli. Največje število smrti se pojavi v starostni skupini 30–34 let, tako pri moških kot pri ženskah (13).

Enega izmed pokazateljev, kako pogostokrat je paracetamol zdravilo, s katerim se ljudje zastrupijo, najdemo v angleški bazi podatkov "Toxbase". Dostopna je na spletni strani www.spib.axl.co.uk, upravlja pa jo nacionalna pisarna za informiranje o zastrupitvah (36, 37, 38). Ljudje so največkrat poizvedovali o paracetamolu. Predvsem zdravstveni delavci so največkrat iskali pomoč pri izračunu koncentracije paracetamola na kilogram telesne mase (mg/kg) in jo potem primerjali s koncentracijo, ki je sprejeta kot toksična koncentracija (38).

Ocena koliko prevelikih odmerjanj paracetamola se dogodi na leto v Angliji in Walesu je 41.200 (36). Za celo državo Veliko Britanijo pa so ocenili, da število prevelikih odmerjanj paracetamola na leto dosega 70.000 primerov (36).

Med leti 1974 in 1990 je bila narejena primerjava uporabe paracetamola v Veliki Britaniji in Franciji in sicer z namenom, da se oceni, ali bi bile restrikcije pri dostopnosti paracetamola opravičljive (35). V tistem času je bil paracetamol prosto dostopen v Angliji in Walesu v neomejenih količinah v lekarni in do 12 gramov v supermarketih. V Franciji so ljudje lahko kupili paracetamol le v lekarni in vsebina vsake škatle je bila omejena na 8 gramov. Ugotovili so korelacijo med prodajo in predoziranjem paracetamola (35). Odstotek smrtnih primerov je bil 4-krat višji v Angliji in Walesu kot pa v Franciji (35). Zaključek, ki je sledil, je, da večja razpoložljivost paracetamola ustreza povečanju njegove uporabe pri predoziranjih, ter da bi Velika Britanija morala uvesti vsaj restrikcije pri pakiranjih paracetamola (35).

Leta 1998 je Velika Britanija sprejela pravilnik, ki je omejil količino paracetamola, ki se ga lahko naenkrat kupi brez recepta in sicer na 16 g (32 tablet po 500 mg) v lekarnah in 8 g (16 tablet po 500 mg) v trgovinah in na bencinskih črpalkah (36, 16). Na navodila za uporabo so začeli tiskati izrečna opozorila o predoziranju paracetamola (16). Tablete so začeli pakirati v pretisne omote (39). Pravilnik, ki omejuje dostopnost paracetamola, bi lahko pomembno vplival na število in resnost prevelikega odmerjanja paracetamola, vendar ocenjevalci trdijo, da je še prezgodaj sklepati o dolgoročnih posledicah tega ukrepa (36), kratkoročne posledice tega pravilnika pa kažejo, da je incidenca jetrne odpovedi zaradi paracetamola zmanjšana, da je manj smrti zaradi zastrupitve s paracetamolom (39, 40) in da ljudje v namernih prekoračitvah odmerka vzamejo manj tablet (16).

Angleška agencija za zdravila in medicinske pripomočke je paracetamol uvrstila med učinkovine, nad katerimi izvaja temeljit nadzor (41). Nujno je poročanje vsakršnega neželenega učinka, za katerega je možno, da je povezan s paracetamolom.

V tej državi so torej po uvedbi sprostite prodaje in široke dostopnosti paracetamola na novo uvedli določene restrikcije, saj so zastrupitve s paracetamolom začele postajati vedno večji zdravstveni problem. Varno in učinkovito jemanje paracetamola je v tej državi eden izmed večjih izzivov in tako je ali pa bi moralo biti tudi v drugih državah.

Tudi na Irskem je paracetamol najbolj široko razširjeno zdravilo pri samozastrutitvah in je pogost vzrok bolnišničnega zdravljenja zaradi zastrupitve (40). Na Irskem so izvedli študijo, da bi ugotovili, kako in kje bolniki dobijo paracetamol za predoziranje, njihovo zavedanje o njegovi toksičnosti in ali obstaja povezava med domnevnim samomorilnim namenom in količino vzetega paracetamola (40). Večina bolnikov, ki so bili sprejeti v bolnišnico, je slabo razumela toksičnost paracetamola. Od 100 bolnikov jih je 66 % paracetamol dobilo v supermarketih, trgovinah ali na bencinskih črpalkah in 82 % jih je kot razlog tega nakupa navedlo njegovo enostavno dostopnost (40). 55 % bolnikov se je zavedalo njegove toksičnosti, 31 % bolnikov je pričakovalo jetrne poškodbe po prekoračitvi odmerka in 68 % jih ni prebralo opozorila na škatlici (40). Več moških (73 %) kot žensk (46 %) je priznalo, da so poleg pili alkohol (40). Izkazalo se je, da je signifikantna povezava med samomorilnim namenom in količino vzetih tablet, moški so povprečno vzeli 51,3 tablete, ženske pa 37,2 tablete (40). Rezultati te študije so skladni z rezultati drugih študij, ki kažejo, da razpoložljivost paracetamola v velikih količinah prispeva k njegovem prevelikem odmerjanju, predvsem ker veliko bolnikov podcenjuje njegovo toksičnost (40). Več študij kaže, da je napačna uporaba paracetamola povezana z večjo dostopnostjo tega zdravila in s slabim razumevanjem možnih posledic njegove nepravilne uporabe (40). Na Irskem to neomejeno dostopnost paracetamola grajajo in tudi omenjena študija je pokazala, da bi omejena razpoložljivost paracetamola lahko znižala število predoziranj (40).

V ZDA zaradi paracetamola zabeležijo več kot 100.000 klicev letno na centre za kontrolo zastrupitev, 56.000 nujnih medicinskih pomoči, 26.000 hospitalizacij in 450 smrtnih izidov (42). V letih 1991–1995 je bila v ZDA izpostavljenost paracetamolu najpogostejša med sporočenimi incidenti na center za kontrolo zastrupitev in sicer je obsegala 5,5 % vseh incidentov, ocenjujejo pa, da jih je več, kajti vse zastrupitve niso sporočene (43). Predoziranje paracetamola je bil vodilni vzrok smrti zaradi zastrupitve, zajemal je kar 9,9 % smrti zaradi zastrupitev (43). Povprečno je v ZDA prijavljenih 27.000 naključnih predoziranj paracetamola pri otrocih na leto, je pa smrt zaradi tega pri otrocih redka (44).

Tudi v ZDA se paracetamol prodaja v širokem obsegu v trgovinah in na bencinskih črpalkah. Nepravilna uporaba paracetamola se je za državo izkazala kot zelo draga in z veliko bolnišničnimi zdravljenji. Finančne posledice bolnišničnega zdravljenja, transplantacije jeter in morebitne smrti zaradi predoziranja paracetamola so visoke. V ZDA so bili direktni stroški samo zaradi predoziranj paracetamola ocenjeni na 87 milijonov USD letno, vendar naj bi bila to zelo konzervativna ocena (35). V letu 1995 so izračunali, da znaša povprečen strošek povezan z namerno zastrupitvijo s paracetamolom pri mladih in odraslih v ZDA za enega človeka 2172 USD, za zastrupljenega otroka pa so stroški še veliko višji (35). V študiji, ki so jo izvedli med leti 1992 in 1995, je bil povprečen strošek nege bolnika, ki je nenamerno prekoračil odmere paracetamola 19.000 USD (35).

Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo?

Zastrupitev s paracetamolom je torej problematična tudi v ZDA, vendar FDA ni sprejela ukrepa, da bi zmanjšali število tablet v pakiranju; predlagala je le spremembe na ovojnicah zdravila in razširjena opozorila o nevarnosti paracetamola (42).

V študiji, ki so jo izvedli v Kanadi, je 298 mater otrok, starih od 5 do 12 let, poročalo, da imajo doma na zalogi do 8 različnih zdravil proti bolečini za otroke (45). V 96 % teh domov je bil prisoten paracetamol in 75 % teh mater je v zadnjem mesecu svojemu otroku dalo paracetamol (45).

V študiji, ki je zajela 100 staršev, ki so na urgentni oddelek pripeljali svojega otroka (starost 2 do 10 let) zaradi bolečin, so starše zaprosili, da izračunajo in odmerijo otroku pravi odmerek paracetamola (45). Le 20 % staršev je izračunalo pravi odmerek in med temi jih je le 30 % zdravilo pravilno odmerilo (45).

Jasno je, da morajo biti starši poučeni o različnih oblikah in jakostih paracetamola, spodbujati jih moramo, da natančno preberejo navodilo za uporabo, tako da se izognejo napakam pri odmerjanju zdravila in možnem hkratnem dajanju več zdravil, ki vsebujejo paracetamol.

Toksičnost paracetamola je bila prvič zabeležena v 60-ih letih 20. stoletja (35). Od takrat se incidenca zastrupitve s paracetamolom povečuje, zastrupitev s paracetamolom ima visoko stopnjo zbolelosti in smrtnosti (35). Meja med varnostjo in toksičnimi učinki paracetamola je namreč zelo ozka, pri čemer je prekoračen odmerek paracetamola lahko smrten. Informacija o odmerku paracetamola, ki ga ljudje zaužijejo, ko se zastrupijo, bi bila zelo uporabna in bi pomagala določiti, kako varen je paracetamol v terapevtskih odmerkih, predvsem pri bolnikih, ki imajo ali predispozicijo za poškodbo jeter, ali jemljejo zdravila, ki inducirajo jetrne encime, ali pa so podhranjeni in uživajo alkohol.

Ljudje zaradi možnosti nakupa paracetamola in ostalih zdravil brez recepta v specializiranih trgovinah lahko izgubijo občutek, da je paracetamol zdravilo. Posledica tega je, da ljudje pogosto kupujejo zdravila brez recepta zase in za druge, ne da bi ob nakupu dobili nasvet farmacevta, ki bi jim razložil tveganja, ki so povezana z jemanjem paracetamola, podal možne alternative ali pa priporočal posvet z zdravnikom (45). Tako bi bila zagotovljena pravilna in varna uporaba zdravil, ki niso blago široke potrošnje, ampak imajo poseben namen, njihova uporaba pa je povezana ne samo s koristjo ampak tudi s tveganjem. Študija, ki so jo izvedli v ZDA z več kot 1000 odraslimi Američani je pokazala, kakšen je njihov odnos in mnenje o uporabi zdravil proti bolečinam (16). Več kot 60 % ljudi ni vedelo katera učinkovina je v njihovem zdravilu proti bolečinam (16), tretjina ljudi zajetih v študiji vzame večji odmerek zdravila brez recepta kot je priporočeno, ker smatrajo, da bo večji odmerek povečal učinkovitost zdravila (16). Poleg tega le eden izmed desetih ljudi prebere navodilo za uporabo o možnih neželenih učinkih ali opozorilih, ko prvič vzame določeno zdravilo, ki ga je dobil brez recepta (16), kar 41 % ljudi pa domneva, da so zdravila brez recepta prešibka, da bi lahko povzročila kakršne koli težave (16, 46). Iz tega je razvidno, zakaj se dogaja toliko zastrupitev s paracetamolom, ki smo jih opisali zgoraj. Mnogo bolnikov se ne drži priporočil in določene občutljive bolnike lahko že kratkotrajna izpostavljenost paracetamolu privede do tveganja za zastrupitev.

Vse te ugotovitve imajo tesno zvezo z varovanjem javnega zdravja in poudarjajo, da široka dostopnost paracetamola v velikih količinah ne prispeva k njegovi pravilni in varni uporabi. To je lahko dokaz za trditve, da izdaja zdravil sodi samo v lekarno.

Premisliti bi bilo potrebno o tem, kakšne dodatne in sistematizirane farmakovigilantne aktivnosti bi lahko vzpostavili, da bi bile učinkovite pri poročanju neželenih učinkov zdravil brez recepta, ki se prodajajo v lekarnah. Ti neželeni učinki so verjetno manj poročani kot neželeni učinki zdravil, ki so dostopna le na recept. Zdravila, ki so na voljo brez recepta, ljudje dojemajo kot varna in je težje vzpostaviti povezavo med zdravilom in opaženim neželenim učinkom. Ključno vlogo pri paracetamolu in pri drugih zdravilih brez recepta imata bolnik in farmacevt, ki morata biti informirana o pomembnosti spremljanja varnosti zdravil in stalnega prepoznavanja in preprečevanja škodljivih učinkov zdravil. Tudi zdravila, ki se izdajo brez recepta, so lahko enako nevarna kot zdravila, ki se izdajajo na recept.

6 Sklep

V predpisanih režimih odmerjanja in le ob občasnem jemanju je paracetamol učinkovit in varen analgetik in antipiretik. Vendar pa bolniki marsikdaj prekoračijo priporočen odmerek in priporočeno trajanje zdravljenja, kar močno poveča tveganje za neželene učinke paracetamola.

Paracetamol je dostopen (tudi) brez recepta in bolnik ga lahko zato dojemata kot varno zdravilo. Zato mora farmacevt bolnika ob izdaji zdravila s paracetamolom vprašati, če ima jetrne ali ledvične težave in mu zagotoviti celostno in točno informacijo o možni hepatotoksičnosti in nefrotoksičnosti paracetamola. Pri vsakem izdajanju zdravila ga mora opozoriti na priporočeno odmerjanje in na to, da naj istočasno ne uživa alkoholnih pijač. Farmacevt naj spodbuja bolnika, da prebere in shrani navodilo za uporabo zdravila. Farmacevt naj razloži bolniku resnost napačnega odmerjanja in naj poudari, da v primeru dvoma o pravilnem odmerku ali jakosti pokliče zdravnika ali farmacevta.

Pri predpisovanju zdravil naj bo zdravnik pozoren na seznam zdravil na recept in brez recepta, ki jih bolnik že jemlje, da ne bi prišlo do interakcij med zdravili. Pozornost naj bo usmerjena tudi na zdravila rastlinskega izvora.

Pri uveljavljanju doktrine samozdravljenja akutne, občasne ali dolgotrajnejše bolečine bi morali izpopolniti informacijo za bolnike o paracetamolu in tudi drugih analgetikih, ki so na voljo brez recepta, da bi s tem povečali učinkovitost in varnost uporabe. Posebna skrb naj bo namenjena otrokom, starejšim in nosečnicam. Vzpostaviti bi morali ravnotežje med varnostjo in bolnikovo avtonomnostjo pri zdravljenju. Kako varno je zdravilo uporabljeno je namreč odvisno od tega, kakšno informacijo poda farmacevt bolniku, ko mu izda zdravilo, in na kakšen način je ta informacija o zdravilu bolniku predstavljena. Nad zdravili, ki se izdajajo v lekarnah, ima farmacevt določen nadzor, lahko spodbuja pravilno uporabo in poskuša minimizirati škodo za bolnike, medtem ko to ne drži za zdravila, ki so na voljo v specializiranih trgovinah.

Ker želimo zagotoviti čim bolj varno uporabo paracetamola, mora leta ostati zdravilo, ki ga izdaja farmacevt v lekarni.

Pregledni članki - Review Articles

7 Viri in literatura:

- Shargel L, Mutnick HA, Souney FP. Comprehensive Pharmacy Review. Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 587-602.
- Bazan NG, Flower RJ. Lipid signals in pain control. *Nature* 2002; 420: 135-137.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM et al. Pharmacology. Churchill Livingstone, 2003: 246-248, 251-252.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos LTK et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002; 99 (21): 13926-13931.
- Krčevski Škarč N, Rozman Marčič J, Ivanuša M. Nekateri novejši pogledi na nesteroidne antirevmatike. *Zdrav Vestn* 2001; 70: 405-13.
- FDA, Department of Health and Human Services: List of Drug Products That Have Been Withdrawn or Removed From the Market for Reasons of Safety or Effectiveness. *Fed Regist* 1998; 63 (195): 54082-54089.
- Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 1972; 240: 410-411.
- Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net>, SmPC za zdravilo Lekadol 500 mg filmsko obložene tablete
- Farrell SE. Toxicity, Acetaminophen. Last Updated: July 29, 2004. <http://www.emedicine.com/emerg/topic819.htm>
- West PR, Harman LS, Josephy PD et al. Acetaminophen: enzymatic formation of a transient phenoxyl free radical. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 (18): 2933-2936.
- Rao DNR, Fischer V, Mason RP. Glutathione and ascorbate reduction of the acetaminophen radical formed by peroxidase. *J Biol Chem* 1990; 265 (2): 844-847.
- Chemistry of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), lecture 2, January 11th 2001. www.uic.edu/labs/mesecar/lecture_2.htm
- Atcha Z, Majeed A. Paracetamol related deaths in England and Wales, 1993-97. *Health Stat Q* 2000; 7: 5-9.
- Greene SL, Dargan PI, Jones AL. Acute poisoning: understanding 90% of cases in a nutshell. *Postgrad Med J* 2005; 81: 204-216.
- <http://toxicology.lsumc.edu/acetinfo.htm>
- Roumie CL, Griffin MR. Over-the-Counter Analgesics in Older Adults: A Call for Improved Labelling and Consumer Education. *Drugs Aging* 2004; 21(8): 485-498.
- Hawton K, Simkin S, Deecks J. Co-proxamol and suicide: A study of national mortality statistics and local non-fatal self poisonings. *BMJ* 2003; 326: 1006-1008.
- Routledge P, Vale JA, Bateman DN et al. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *BMJ* 1998; 317: 1609-1610.
- Karnik J, Chertow GM. Analgesic-related renal disease: Causes, patients at risk, management. *J Crit Illn* 2000; 15 (1): 49-58.
- Guo X, Nzerue C. How to prevent, recognize, and treat drug-induced nephrotoxicity. *Cleve Clin J Med* 2002; 69 (4): 289-312.
- Dargan PI, Jones AL. Should a lower treatment line be used when treating paracetamol poisoning in patient with chronic alcoholism? A case against. *Drug Saf* 2002; 25 (6): 619-624(6).
- Buckley NA, Srinivasan J. Should a lower treatment line be used when treating paracetamol poisoning in patient with chronic alcoholism? A case for. *Drug Saf* 2002; 25 (6): 625-632(8).
- Schmidt LE. Age and paracetamol self-poisoning. *Gut* 2005; 54(5): 686-690.
- Dart RC. The use and effect of analgesics in patients who regularly drink alcohol. *Am J Manag Care* 2001; 7(19 Suppl): S597-601.
- Gunn VL, Taha SH, Liebelt EL et al. Toxicity of over-the-counter cough and cold medications. *Pediatrics* 2001; 108(3): E52.
- Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net>, SmPC za zdravilo Panadol Baby peroralna suspenzija.
- Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net>, SmPC za zdravilo Daleron peroralna suspenzija 120 mg/5 ml.
- Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net>, SmPC za zdravilo Calpol
- Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net>, SmPC za zdravilo Lekadol direkt
- Fuerst J. Predpisovanje zdravil v letu 2002. *Zdrav Vestn* 2003; 72: 163-166.
- Fuerst J. Predpisovanje zdravil v letu 2003. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 519-524.
- Fuerst J. Predpisovanje zdravil v letu 2000. *Zdrav Vestn* 2001; 70: 569-571.
- Fuerst J, Samaluk V. Predpisovanje zdravil v letu 2001. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 251-254.
- Fuerst J. Predpisovanje zdravil v letu 2004. *Zdrav Vestn* 2005; 74: 381-385.
- Sheen CL, Dillon JF, Bateman DN et al. Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system. *Q J Med* 2002; 95: 609-619.
- Camidge DR, Wood RJ, Bateman DN. The epidemiology of self-poisoning in the UK. *Clin Pharmacol* 2003; 56: 613-619.
- Camidge R, Bateman DN. Self-poisoning in the UK: Epidemiology and toxidromes. *Clin Med* 2003; 3: 111-114.
- 2003 Annual report. NHS, National Poisons Information Service, Edinburgh Centre. www.npis.org
- Morgan O, Griffiths C, Majeed A. Impact of paracetamol pack size restrictions on poisoning from paracetamol in England and Wales: an observational study. *J Public Health* 2005; 27(1): 19-24.
- O'Rourke M, Garland MR, McCormick PA. Ease of access is a principal factor in the frequency of paracetamol overdose. *Ir J Med Sci* 2002; 171(3): 148-150.
- New drugs under intensive surveillance, May 2005. www.mhra.gov.uk
- News. FDA fails to reduce accessibility of paracetamol despite 450 deaths a year. *BMJ* 2002; 325: 678.
- Krenzelok EP: Controversies in management. Should methionine be added to every paracetamol tablet? *BMJ* 1997; 315: 303-304.
- Accidental childhood acetaminophen overdosis illustrate our responsibility to educate parents, August 2005. <http://www.ismp.org/MSAarticles/calendar/Aug02.htm>
- Lowe NK, Ryan-Wenger NM. Over-the-counter medications and self-care. *Nurse Pract* 1999; 24(12): 34-44.
- Zagaria ME. OTC medication use in seniors. *US Pharm* 2005; 8: 24-26.

Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni

New Criteria in Laboratory Diagnosis and Monitoring of Diabetes Mellitus

Jana Lukač Bajalo

POVZETEK: Sladkorna bolezen je skupina presnovnih motenj, ki jim je skupna kronična hiperglikemija. Za postavitev diagnoze, spremljanje metabolne urejenosti bolnika in napoved zapletov je v uporabi veliko laboratorijskih preiskav. Ameriško združenje za diabetes (ADA) je leta 1997 objavilo novo klasifikacijo in diagnostične kriterije. Po usklajevanju ekspertnih skupin v obdobju od leta 1998-2000 so bila po ponovni reviziji strokovnjakov ADA leta 2002 objavljena navodila in priporočila za laboratorijsko diagnostiko in vodenje sladkorne bolezni. V prispevku so predstavljena splošna spoznanja o vzrokih za nastanek različnih tipov sladkorne bolezni, nova klasifikacija in novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki. Podrobneje so predstavljeni tisti testi in metode, ki so priporočeni za postavitev diagnoze in razvrstitev sladkorne bolezni v ustrezno podskupino ter za sledenje metabolne urejenosti bolnikov (glukoza, OGTT, ketoni, GHb, mikroalbuminurija). Omenjeni so tudi testi, ki se uporabljajo predvsem v raziskovalne namene in le izjemoma za razjasnitev specifičnih primerov bolezni (genetski označevalci, avtoimunske označevalci, potencialno pomembni analiti).

Ključne besede: sladkorna bolezen, klasifikacija, laboratorijska diagnostika

ABSTRACT: Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders, characterized by chronic hyperglycaemia. In the diagnosis and management of patients with diabetes mellitus, multiple laboratory tests are used. In 1997, American Diabetes Association (ADA) published new classification and a draft of the guidelines for the use of laboratory analysis in patients with diabetes. The draft was modified by external experts in the period from 1998 to 2000. The guidelines and recommendations were again reviewed by the Professional Practice Committee of the ADA and published in 2002.

In our article, after short introduction to diabetes mellitus, we show new classification and new criteria for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. Stress is done on recommended tests and methods (glucose, OGTT, ketones, GHb, mikroalbuminurija), and also tests, which are not recommended for the routine diagnosis, but are useful for research purposes and evaluation of specific syndromes, are discussed (genetic markers, autoimmune markers, potentially important analytes).

Key words: diabetes mellitus, classification, laboratory diagnosis

1 Splošno o sladkorni bolezni

Sladkorna bolezen (SB) je bila po do sedaj znanih podatkih opisana na papirusu iz Egipta že v obdobju med 3000 in 1500 let pred našim štetjem. Grški zdravniki so jo imenovali »diabetes mellitus« (»diabetes« → »grem skozi«, pospešen tok, oziroma pospešen nastanek urina zaradi visoke ravni sladkorja; »mellitus« → okus urina po medu) (1). Ameriško združenje za sladkorno bolezen (ADA) in svetovna zdravstvena organizacija (WHO) opredeljujeta diabetes mellitus, kot skupino presnovnih bolezni s kronično hiperglikemijo (2, 3).

Po oceni svetovne zdravstvene organizacije je sladkorna bolezen ena izmed najbolj razširjenih kroničnih bolezni razvitega sveta, saj obsega

skupaj 120 do 140 milijonov bolnikov, smrtnost zaradi sladkorne bolezni pa je na sedmem mestu. Glede na nezdrav način prehranjevanja, debelost, premalo gibanja in staranje populacije v razvitem svetu, ocenjujejo, da se bo število sladkornih bolnikov do leta 2025 podvojilo. V razvitem svetu naj bi bilo največje povečanje v starostni skupini nad 65 let, v deželah v razvoju pa v starostni skupini 45-64 let. V zvezi s tem nastaja tudi velik ekonomski problem, saj je zdravstvena oskrba sladkornega bolnika 4-krat dražja kot nesladkornega bolnika in to tako na račun akutnih (ketoacidoza, hipoglikemija, AHS → akutni hiperosmolarni sindrom), kot tudi kroničnih zapletov (mikrovaskularni: retinopatije, nefropatije, nevropatije; makrovaskularni: srčno-žilna obolenja) (4, 5).

Pregledni članki - Review Articles

S patofiziološkega stališča je sladkorna bolezen stanje, ki nastane zaradi pomanjkanja učinkov inzulina. Vzrok je lahko v pomankanju ali neučinkovitosti samega inzulina ali v neodzivnosti tarčnih tkiv na njegovo delovanje, kar v organizmu povzroči moteno presnovo ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin in posledično akutne in kronične zaplete. Bolezen nastane na osnovi dejavnikov dednosti in okolja, ki pogosto delujejo skupaj (2).

1.1 Inzulin

Glavna vloga inzulina v okviru glukostatičnih mehanizmov je uravnavanje privzema glukoze v jetrne, mišične in maščobne celice. V ostale celice poteka vstop glukoze z olajšano difuzijo s pomočjo membranskega transportnega proteina, razen v nevrone, ki so prepustni za glukozo. V procesih skladiščenja energije sodeluje inzulin preko spodbujanja procesov, ki vodijo k sintezi glikogena, trigliceridov in beljakovin (anabolni učinek) in prek zaviranja procesov, ki vodijo v razgradnjo teh snovi (antikatabolni učinek), kar je prikazano v preglednici 1. V katabolnih procesih sodelujejo katabolni hormoni, predvsem glukagon, adrenalin, rastni hormon in kortizol (6).

Pri SB je lahko vzrok za pomankljiv učinek inzulina na naslednjih ravneh:

- motnja v biosintezi inzulina v celicah β ,
- motnja v izločanju inzulina iz celic β ,
- motnja v potovanju inzulina po krvnem obtoku,
- motnja v delovanju inzulina na tarčno celico.

Biosinteza inzulina poteka v celicah β Langerhansovih otočkov trebušne slinavke (pankreas), kjer se iz preproinzulina sintetizira najprej biološko neučinkovit proinzulin. Sestavljen je iz dveh polipeptidnih verig, A in B (veriga A iz 21, veriga B iz 30 aminokislin), ki sta med seboj povezani z dvema disulfidnima mostovoma in še z veznim C-peptidom (Connecting peptide iz 31 aminokislin). V Golgijevem aparatu se tvorijo zrnca (vezikli) v katerih se pod vplivom endopeptidaz odcepi C-peptid in nastaneta ekvimolarni količini dvoverižnega hormona inzulina in C-peptida, ki se z eksocitozo izločita v izvencelično tekočino. Inzulin je lahko neučinkovit, če se sintetizira nepravilna molekula inzulina ali, če je pretvorba proinzulina v inzulin nepopolna (6).

Izločanje inzulina iz celic β je uravnavano s koncentracijo glukoze v krvi, ki z olajšano difuzijo, s pomočjo prenašalca glukoze (GLUT-2) prehaja v celice β . Zvišana koncentracija glukoze spodbudi zvečano izločanje inzulina iz zrnca. Poleg glukoze pospešujejo izločanje inzulina še aminokisline (še posebno arginin in leucin), proste maščobne kisline, ketoni, hormoni prebavnega trakta, $\beta 2$ agonisti in vagus. Stanja, ki spodbujajo simpatik (hipoksija, hipotermija, opeklina, kirurški posegi) pa zavirajo izločanje inzulina prek $\alpha 2$ adrenergičnih receptorjev. Hitrost izločanja inzulina je sorazmerna hitrosti presnove glukoze v celicah β . Inzulin se iz trebušne slinavke izloča v portalni obtok, okoli 50 % inzulina, ki pride po portalni krvi do jeter se tam razgradi in ne doseže sistemskega obtoka. Koncentracija inzulina v sistemskega krvnem obtoku je na tešče 0,5 $\mu\text{g/L}$, po hranjenju pa naraste do 6-krat. Razpolovni čas inzulina je normalno 5-6 minut. Izločanje inzulina je zavrto, če je zvišan nivo inzulinu nasprotno učinkujočih hormonov (7, 8).

Potovanje inzulina po krvnem obtoku do tarčnih celic je lahko moteno, če so v krvi prisotna protitelesa proti inzulinu ali proti inzulinskim receptorjem.

Motnje v delovanju inzulina na tarčne celice lahko razdelimo na več možnih ravni:

- motnje v vezavi inzulina na receptor,
- zmanjšano število receptorjev za inzulin,
- motnje v glukoznem transportu,
- motnje v postreceptorskem dogajanju.

Učinki inzulina na periferne celice se začnejo z vezavo inzulina na specifičen membranski receptor, ki ga uvrščamo v družino tirozinskih proteinskih kinaz. Inzulinski receptorji se nahajajo praktično na vseh celicah, tako na klasičnih tarčnih celicah jeter, mišic in maščevja, kot tudi na celicah za katere velja, da inzulin nanje ne učinkuje (eritrociti, celice živčevja). Število receptorjev na celicah je različno in se giblje od 40 (eritrociti) do 300.000 (jetrne, maščobne celice).

Receptor ima dve podenoti α in dve podenoti β , ki sta med seboj povezani z disulfidnimi vezmi. Podenoti α sta nad površino, podenoti β pa na notranji strani celične membrane. Inzulin se veže na podenoto α , s tem sproži transmembranski signal, ki spodbudi aktivnost tirozin-kinaze v podenoti β k avtofosforilaciji in fosforilaciji drugih

Preglednica 1: Anabolni in antikatabolni učinki inzulina

	JETRA	MAŠČEVJE	MIŠICE
ANABOLNI UČINKI	↑glikogeneza	↑sinteza glicerola	↑vstop AK
	↑sinteza PMK	↑sinteza PMK	↑sinteza beljakovin
			↑glikogeneza
ANTIKATABOLNI UČINKI	↓glikogenoliza	↓lipoliza	↓razgradnja beljakovin
	↓glukoneogeneza		↓izplavljanje AK
	↓sinteza ketonov		
Legenda: ↑-pospešen proces; ↓-upočasnen proces; PMK–proste maščobne kisline; AK–aminokisline			

Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni

kinaz, kar aktivira transmembranski prenašalni sistem za prenos glukoze v celico. Učinki inzulina pojenjajo takoj, ko koncentracija glukoze pade na normalno vrednost. Organizem je zavarovan pred hipoglikemijo z obratom anabolne faze v katabolno, kar stimulira že sama odsotnost inzulina in učinek katabolnih hormonov. Učinek inzulina je lahko zmanjšan, če je zmanjšano število receptorjev, če je receptor okvarjen in je vezava inzulina nanj ovirana, ali če so prisotna protitelesa proti receptorju (7, 8)

Postreceptorski učinki inzulina na presnovne procese v celici, še niso povsem razjasnjeni (6).

2 Klasifikacija sladkorne bolezni

Ameriško združenje za diabetes je leta 1997 pripravilo novo klasifikacijo in diagnostične kriterije sladkorne bolezni, ki jih je leta 1998 sprejela WHO (2, 3). Po usklajevanju ekspertov Ameriškega združenja za klinično kemijo (AACC) z drugimi ekspertnimi skupinami v obdobju od leta 1998-2000, so bila po ponovni reviziji leta 2002 objavljena navodila in priporočila za laboratorijsko diagnostiko in vodenje sladkorne bolezni. Po novi klasifikaciji ločimo dva glavna tipa sladkorne bolezni; SB tip 1 (avtoimunsko povzročeno in idiopatsko) in SB tip 2. Poleg teh dveh pa še nosečnostno SB in druge redke specifične tipe SB (2, 9).

SB tip 1 (prej imenovana od insulina odvisna SB → IDDM ali juvenilni diabetes) je posledica večletnega avtoimunskega propada celic β Langerhansovih otočkov pankreasa, kar vodi do popolne nesposobnosti sinteze in izločanja inzulina (2).

Avtoimunski proces dokazujejo prisotna avtoprotelesa proti insulinu, proti dekarboksilazi glutaminske kisline (GAD65Ab) in proti β -celičnemu antigenu 2 (IA-2Ab). Poleg tega je pri bolnikih s SB tipa 1 znatno znižana koncentracija C-peptida, ki je pokazatelj endogene sinteze inzulina. Etiologija ni povsem znana, se pa intenzivno raziskuje. Klinični znaki se pojavijo, ko je uničenih 80-90 % celic β . K temu prispevajo svoj delež genetska nagnenja (60 % HLA geni (DQ, DR in drugi) ter 40 % ne-HLA geni (gen za inzulin, gen za citotoksični T-limfocitni antigen → CTLA-4)), virusne infekcije v nosečnosti in kasneje (rubella, coxsackie virus B, mumps) in faktorji okolja (kemični vplivi, hrana) (10). Raziskave SB tipa 1 pri enojajčnih dvojčkih so pokazale le 50 % skladnost, kar kaže na to, da genetski faktorji sodelujejo pri nastanku bolezni, niso pa prevladujoči. Zdravljenje SB tipa 1 je z insulinom, ki nadomešča primankljaj inzulina celic β trebušne slinavke bolnika. Za to obliko oboleva ≤ 10 % vseh bolnikov s sladkorno boleznijo, pojavi se lahko v katerikoli starosti, običajna starost bolnikov pa je pod 30 let. Pojavlja se tudi **idiopatska oblika SB tip 1** s stalno inzulinopenijo, vendar brez vsakršnih znakov autoimunosti. Pri odraslih se tip 1 lahko kaže kot tip 2, oziroma kot **latentni autoimunske diabetes** ali **počasi razvijajoči se autoimunske diabetes** → LADA (*late onset autoimmunity diabetes of adults*) ali **tip 1,5 diabetes** (11).

SB tip 2 (prej imenovana od insulina neodvisna SB → NIDDM ali diabetes odraslih), je rezultat kombinacije neustreznega izločanja inzulina in zmanjšane občutljivosti tarčnih celic za inzulin (inzulinska rezistenca) (9, 12, 13).

V zgodnji fazi bolezni je v ospredju neodzivnost tarčnih celic na inzulin, ki je pretežno genetsko določena in se kaže z motnjami na

receptorski in postreceptorski ravni. Receptorska motnja se kaže v zmanjšanem številu receptorjev in znižani aktivnosti tirozin-kinaze in posledično zmanjšanem učinku inzulina, kar pomeni, da bi bila za enak učinek potrebna višja koncentracija inzulina. Pri postreceptorski motnji pa tudi zelo visoka koncentracija inzulina ne more doseči zadostnega učinka, ker je motnja v signalu za prenos glukoze v celico ali zmanjšanem številu prenašalcev za glukozo (GLUT 1-5) ali njihovi zmanjšani aktivnosti ali motnja v celičnih presnovnih poteh (motnja v oksidativni presnovi glukoze, zmanjšana aktivnost glikogenске sintetaze). Večina bolnikov ima v tej fazi bolezni hiperinzulinemijo (14). Povečano izločanje inzulina iz celic β je povezano s povečanim izločanjem amilina (iz amiloida) iz istih zrn, kar v daljšem času povzroča degenerativne spremembe Langerhansovih otočkov in posledično zmanjšano izločanje inzulina. Znaki bolezni se pojavljajo postopoma in bolezen največkrat odkrijemo pri rutinskih pregledih, ko pri asimptomatičnem preiskovancu ugotovimo zvišano koncentracijo glukoze. Ob diagnozi SB tipa 2 so pogosto že prisotni kronični zapleti.

Pri SB tipa 2 dominirajo genetski vzroki pred vplivi okolja. Raziskave enojajčnih dvojčkov so pokazale skoraj 100 % skladnost, kar potrjuje prevladujoč vpliv genetskih dejavnikov. Klasična SB tipa 2 je poligenška presnovna motnja, ki vključuje veliko genov in je tesno povezana z drugimi genetskimi motnjami, kot so: debelost, hiperlipidemija, napredovana ateroskleroza, hipertenzija in celo policistični ovarijski. Pojavljajo se tudi specifični genetski podtipi imenovani **MODY 1-5** (*maturity-onset diabetes of the young*), monogenske napake v funkciji celic β . Odkrite so tudi točkaste mutacije v mitohondrijski DNA, ki so povezane s SB in gluhostjo. Tip 2 je najpogostejši tip in obsega 90-95 % vseh oblik diabetesa. Ob nastopu bolezni so bolniki starejši od 30 let, razen pri podtipih MODY, ki se pojavljajo pred 25. letom. (15, 16).

Nosečnostna SB se pojavi pri približno 4 % vseh nosečnosti. Nastopi zaradi povečane insulinske rezistence pretežno v drugem in tretjem trimestrju. To stanje je običajno brez znakov bolezni, je pa povezano z večjo smrtnostjo novorojenčkov, hipoglikemijo, makrosomijo in zlatenico. Razvije se pogosteje pri debelih nosečnicah, starejših nosečnicah in osebah, ki imajo v družini SB. Ženske z nosečnostno SB imajo značilno večje tveganje za razvoj sladkorne bolezni, 30-40 % jih v naslednjih 10-20 letih razvije SB tip 2 (9, 17).

Ostali specifični tipi SB so zelo redki, z zelo različno etiologijo in patofiziologijo, največkrat povezani z motnjo izločanja inzulina in njegovo učinkovitostjo. Klasifikacija je prikazana v preglednici 2 (2, 9).

3 Novelirani laboratorijski kriteriji v diagnostiki sladkorne bolezni

3.1 Glukoza v plazmi

Povečana koncentracija glukoze v plazmi je ključni kriterij za postavitev diagnoze SB.

Referenčne vrednosti za koncentracijo glukoze v plazmi so:

- za otroke so v območju 3,3–5,6 mmol/L,
- za odrasle so v območju 4,1–5,9 mmol/L.

Pregledni članki - Review Articles

Preglednica 2: Klasifikacija sladkorne bolezni

SB tip 1
A. imunsko povzročena
B. idiopatska
SB tip 2
Drugi specifični tipi
Genetske okvare funkcije celic-β
Genetske okvare v učinkovanju insulina
Bolezni eksokrinega pankreasa
Pankreasne endokrinopatije
Z zdravili in kemikalijami povzročena
Z infekcijami vzbujena
Neobičajne oblike imunsko povzročene SB
Drugi genetski sindromi včasih povezani s SB
Nosečnostna SB

Pri odraslih koncentracija glukoze v plazmi na tešče narašča s starostjo od 30. do 60. leta, po tem obdobju pa ne več značilno. Po obremenitvi z glukozo je porast koncentracije glukoze značilno večji pri starejših, kar kaže na naraščajočo inzulinsko rezistenco

Za postavitev diagnoze SB se uporablja kriterije ADA (2, 9).

Novelirani kriteriji za postavitev diagnoze SB so:

- Prisotni simptomi sladkorne bolezni in koncentracija glukoze v plazmi ≥11,0 mmol/L, ne glede na čas predhodnega obroka hrane.
- Koncentracija glukoze v plazmi na tešče ≥7,0 mmol/L; tešč najmanj 8 ur (dovoljeno je pitje vode).
- Koncentracija glukoze v plazmi ≥11,0 mmol/L dve uri po oralnem glukoznem tolerančnem testu (OGTT - obremenitvi s 75 g glukoze) →priporočila WHO.
- Za postavitev diagnoze mora biti koncentracija glukoze v plazmi izmerjena v akreditiranem laboratoriju (v Evropi in pri nas akreditirani po EN15189).
- Za rutinsko sledenje koncentracije glukoze pri bolnikih s SB ni nujno, da je izmerjena v akreditiranem laboratoriju.
- Kri se odvzame z antikoagulantom (EDTA ali Li-heparinat ali K-oksalat ali citrat).
- Plazma mora biti ločena od celic v 60 minutah, sicer je potrebno dodati inhibitor glikolize Na-fluorid (2,5 mg/mL krvi → inhibira enolazo) ali Li-jodoacetat (0,5 mg/mL krvi). Kljub temu, da je dodan inhibitor, koncentracija glukoze v prvi uri pade za 5-7 %, nato je po 4 urah stabilna 72 ur pri sobni temperaturi. Pri levkocitozah je glikoliza pojačana, kljub prisitnosti inhibitorja.
- Koncentracija glukoze v plazmi je približno 11 % višja kot v polni krvi, ker je koncentracija vode (kg/L) v plazmi približno 11 % višja kot v polni krvi.
- Koncentracija glukoze v plazmi je približno 5 % nižja, kot v serumu, verjetno zaradi vpliva antikoagulantov (prehod vode iz eritrocitov v plazmo). Veliko laboratorijev, tudi v Sloveniji, še vedno

določa glukozo v serumu, v tem primeru je potrebno upoštevati, da so meje postavljene za koncentracijo glukoze v plazmi.

- V sterilnem serumu, ločenem od koaguluma, brez hemolize, brez fluorida, je koncentracija glukoze stabilna 8 ur pri 25 °C in 72 ur pri 4 °C
- Če je katerikoli od prvih treh kriterijev izpolnjen, je za potrditev diagnoze potrebna ponovitev testiranja, vendar ne istega dne. Ponavljanje testov ni nujno, če ima bolnik nedvoumno hiperglikemijo kombinirano z akutnimi metaboličnimi zapleti. Čeprav je OGTT vključen v diagnostični kriterij, ni priporočen v rutinski klinični diagnostiki, razen pri nosečnicah.

Odkrivanje bolnikov s SB - presejevanje

Priporočeno je presejevanje na SB pri tistih osebah, ki so rizične za razvoj SB (9, 18, 19):

- Pri starosti ≥45 let; če je koncentracija glukoze v plazmi na tešče ≤6,1 mmol/L, je testiranje potrebno ponavljati v 3-letnih intervalih; če je koncentracija glukoze v plazmi na tešče 5,8–6,9 mmol/L, se priporoča ponovitev testiranja (zaradi velike biološke variabilnosti analita znotraj osebk).
- Če je koncentracija glukoze v plazmi na tešče 5,3–5,7 mmol/L, je zaradi velike biološke variabilnosti analita znotraj osebk zaželeno ponavljati testiranje v krajših obdobjih od 3 let. Pogostejše testiranje se priporoča pri koncentracijah na tešče 5,8–6,9 mmol/L, vendar tudi v tem primeru njegova pogostnost ni natančneje opredeljena.
- Pri starosti <45 let, če so prisotni rizični dejavniki za razvoj SB.
- Pri otrocih ≥10 let, ki so predebeli in imajo še dva dodatna rizična dejavnika: družinska obremenitev, rasa/etnična skupina, znaki inzulinske rezistence. Testiranje je potrebno ponavljati vsake 2 leti.
- Tudi v teh rizičnih skupinah mora biti koncentracija glukoze v plazmi izmerjena v akreditiranem laboratoriju.

Analizne metode

Koncentracijo glukoze se meri skoraj izključno z encimskimi metodami, ki so dobro standardizirane. 99 % laboratorijev uporablja heksokinazno ali glukozo-oksidadno metodo in le 1 % glukozo-dehidrogenazno. Nenatančnost izražena kot koeficijent variacije (KV) za obe najpogostejše uporabljani metodi je <4 %, pri sladkornih bolnikih med laboratoriji pa je 5 %. Relativno velika biološka variabilnost analita znotraj osebk (~5-7%), lahko povzroči napačno klasifikacijo SB. V splošnem velja, da je sprejemljiva analitična nenatančnost ≤3,3 %, netočnost ≤2,5 %, skupna napaka ≤7,9 % (20).

V urgentnih primerih naj bi bila glukozo izmerjena v 30 minutah, intervale določanja pa narekuje klinično stanje bolnika in so lahko od 30 minut do več kot-24 ur. Kot praktična rešitev se pojavlja tudi testiranje ob postelji bolnika s prenosnimi merilci glukoze - glukometri (bedside monitoring), ki pa je namenjeno spremljanju, ne pa diagnosticiranju SB.

Prenosni merilci koncentracije glukoze ali glukometri

Priporočeni so glukometri, ki merijo glukozo v plazmi. Nekateri glukometri imajo vgrajeno porozno membrano, ki odstrani krvne celice in tako omogočajo merjenje glukoze v polni krvi. Na testnem traku poteče encimska reakcija s heksokinazo ali glukozo-oksidadzo in nastali reakcijski produkt običajno izmerimo z refleksijsko spektrometrijo. Uporablja jih zdravstveno osebje ali bolniki v naslednjih primerih (9):

Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni

- pri bolniku ob bolnikovi postelji na bolniškem oddelku, za orientacijo v akutnih in kroničnih stanjih,
- v zdravniških ordinacijah oziroma ambulantah,
- za samokontrolo na bolnikovem domu, na delu, v šoli.

Samokontrola

V ZDA vrši samokontrolo najmanj 1-krat dnevno 40 % bolnikov s SB tip 1 in 26 % bolnikov s SB tip 2. ADA predpisuje samokontrolo:

- za nadzor glikemije pri vseh bolnikih, ki so na inzulinskem zdravljenju (pri SB tipa 1 vsaj 3-krat dnevno), in pri zdravljenju s sulfanilureo ali drugimi vzbujevalci izločanja inzulina → samokontrola omogoča ustrezno odmerjanje inzulina ali drugih zdravil,
- za preprečevanje in zaznavanje hipoglikemije,
- za preprečevanje resne hiperglikemije,
- za prilagajanje na spremenjen stil življenja,
- za zaznavanje potrebe po uvedbi inzulinskega zdravljenja pri nosečnostni SB.

Bolniki in drugi, ki uporabljajo glukometre, morajo biti seznanjeni s pravilno uporabo le-teh, izvajati morajo nadzor kakovosti rezultatov in v rednih intervalih primerjati svoje rezultate z rezultati, izmerjenimi v akreditiranem laboratoriju.

Zaradi nenatančnosti glukometrov, nedoseganja ciljev ADA ($KV \leq 5\%$), kakor tudi zaradi znatnih razlik med različnimi glukometri (celo istega proizvajalca), se jih ne sme uporabljati za postavitev diagnoze SB in so tudi omejeno uporabni za presejevanje na SB (9).

Neinvazivni ali minimalno invazivni merilci glukoze

Neprekinjeno sledenje koncentracije glukoze s transkutanimi, subkutanimi ali implantiranimi senzorji *in vivo* je velika prednost za bolnike s SB, vendar zaenkrat še ne morejo nadomestiti samokontrole bolnikov ali merjenja glukoze v akreditiranih laboratorijih. Trenutno sta sprejemljiva dva sistema: Gluco Watch Biographer (Cygnus), ki deluje na osnovi reverzne iontoforeze in Continous Glucose Monitoring System (MiniMed). Sledenje koncentracije glukoze *in vivo* omogoča avtomatsko doziranje inzulina in je razvoj te tehnologije predmet intenzivnega proučevanja in dogovarjanja med strokovnimi združenji (25).

3.2 Oralni glukozni tolerančni test - OGTT

OGTT je bil včasih zlati standard v diagnostiki SB, vendar ga ADA ne priporoča za diagnostiko SB tipa 1 in tipa 2. WHO v ta namen še vedno priporoča 2-urni OGTT. Tako ADA kot WHO priporočata OGTT v diagnostiki nosečnostne SB (3, 9, 21). Razlogi ADA za opustitev OGTT so naslednji:

- s to preiskavo ne diagnosticiramo bistveno več (samo ~2 % več) SB, kot samo z določanjem koncentracije glukoze na tešče ob novo postavljeni meji 7,0 mmol/L,
- visoke koncentracije glukoze ($\geq 11,1$ mmol/L) pri OGTT v primeru SB še dodatno prispevajo k razvoju zapletov,
- OGTT je nepraktičen test za diagnostiko v ordinacijah, oziroma v ambulantah,
- test je zelo slabo ponovljiv ($KV=50-66\%$), k čemur prispeva biološka variabilnost koncentracije glukoze, različni vplivi hiperosmolarne raztopine glukoze na praznjenje prebavnega sistema in vplivi temperature okolja.

Preglednica 3: WHO kriteriji za interpretacijo OGTT

Interpretacija	Koncentracija glukoze v plazmi mmol/L	
	0 ^h	2 ^h
Neustrezna glukoza na tešče	$\geq 6,1$ do $<7,0$	$< 7,8$
Neustrezna toleranca	$<7,0$	$\geq 7,8$ do $<11,1$
SB	$\geq 7,0$	$\geq 11,1$

Priporočila WHO za izvedbo OGTT

WHO priporoča izvedbo OGTT, kadar je koncentracija glukoze v plazmi na tešče v območju **6,1 mmol/L do 7,0 mmol/L**:

- preiskovanec je 3 dni na normalni prehrani, pred obremenitvijo je 8-14 ur tešč,
- vzame se kri (čas 0^h), nato v 5 minutah spi 75 g brezvodne glukoze raztopljene v 250-300 mL vode ali čaja,
- če je preiskovanec otrok je doza 1,75 g/kg telesne teže oz. največ 75 g,
- po 2 urah se vzame kri in v obeh vzorcih (0^h in 2^h) izmeri koncentracijo glukoze.

Interpretacija možnih rezultatov OGTT je prikazana v preglednici 3.

Če katerakoli vrednost odstopa, mora biti ponovljena v naslednjih dneh (9).

OGTT in nosečnostna SB

ADA priporoča naslednje (9, 22):

1. Nosečnice z majhnim tveganjem za razvoj SB ne potrebujejo testiranja. Kriteriji za majhno tveganje so naslednji:
 - starost <25 let,
 - normalna teža pred nosečnostjo,
 - pripadnost etnični skupini z majhno prevalenco nosečnostne SB,
 - ni znane SB v prvi veji sorodstva,
 - ni znane nenormalne tolerance za glukozo,
 - ni znanih zapletov po porodu.
2. Nosečnice s srednje velikim tveganjem za razvoj SB morajo biti testirane v obdobju 24-28 tednov nosečnosti. Kriteriji za srednje veliko tveganje so vmes med kriteriji za majhno in veliko tveganje.
3. Nosečnice z velikim tveganjem morajo biti testirane takoj. Kriterij za veliko tveganje je katerikoli od naslednjih:
 - debelost,
 - nosečnostna SB v preteklosti,
 - glikozurija,
 - SB v sorodstvu.

Prvi korak pri testiranju nosečnic je enak kot pri diagnostiki SB tipa 1 ali 2: glukoza na tešče $\geq 7,0$ mmol/L, ali kadarkoli čez dan $\geq 11,1$ mmol/L in potrditev teh vrednosti, vendar ne istega dne, je dokaz SB. Če pri nosečnicah s srednjim in velikim tveganjem v prvem koraku SB nismo dokazali, ADA priporoča nadaljne testiranje in sicer enostopenjski ali dvostopenjski OGTT.

Pregledni članki - Review Articles

Preglednica 4: Kriteriji za potrditev nosečnosti SB s 100 g OGTT

Čas	Koncentracija glukoze v plazmi mmol/L
0 ^h	≥ 5,3
1 ^h	≥ 10,0
2 ^h	≥ 8,6
3 ^h	≥ 7,8

Enostopenjski OGTT

- 8-14 ur tešč, brez diete ali omejitve fizične aktivnost, kajenje med testom ni dovoljeno
- meritev koncentracije glukoze pred obremenitvijo na tešče → čas 0^h
- 100 g (75 g) OGTT → obremenitev s 100 g (75 g) glukoze
- meritev koncentracije glukoze 1^h, 2^h in 3^h po obremenitvi
- za diagnozo nosečnosti SB so sprejete 5-10 % nižje vrednosti glukoze
- če so kriteriji prikazani v preglednici 4 doseženi ali preseženi v vsaj dveh primerih je to potrditev nosečnosti SB
- kriteriji za 75 g OGTT so enaki, le da ni merjenja koncentracije glukoze po 3^h

Dvostopenjski OGTT

- prva stopnja je obremenitev s 50 g glukoze, pri čemer nosečnici ni potrebno biti tešč
- koncentracija glukoze se izmeri po 1^h in v primeru koncentracije ≥ 7,8 mmol/L, se izvede zgoraj opisani 100 g (75 g) OGTT
- če znižamo mejno vrednost po 1^h na ≥ 7,2 mmol/L, odkrijemo približno 10 % več nosečnosti SB

Predstavljena priporočila glede OGTT in nosečnosti SB kažejo na to, da ni popolnega soglasja med ADA, WHO in različnimi strokovnimi združenji (23, 24).

3.3 Glukoza v urinu

Semikvantitativno določanje glukoze v urinu se je uporabljalo predvsem za samokontrolo diabetičnih bolnikov na domu. Ker glukoza v urinu ne odseva prave koncentracije glukoze v plazmi, poleg tega pa se v urinu normalno pojavi samo pri visokih koncentracijah v plazmi (~10 mmol/L), ni več priporočena za rutinsko spremljanje bolnikov s SB, ki imajo pri dobrem vodenju koncentracijo glukoze v plazmi običajno <10 mmol/L.

V primerih, ko bolniki niso sposobni sami kontrolirati glukozo v plazmi, so priporočeni testni trakovi s specifično reakcijo na glukozo (glukozaoksidazni test) v priložnostnem vzorcu urina. Testi na reducirajoče snovi v urinu niso priporočeni (9, 18).

3.4 Ketoni

Določanje ketonov v urinu ali krvi (v bolnišnici, ambulant ali doma) je pomembna dodatna preiskava tako pri diagnozi, kot sledenju diabetične ketoacidoze. Ketoni (acetoacetat, β-hidroksibutirat in aceton) so katabolni produkti trigliceridov oziroma prostih maščobnih kislin. Prva dva dominirata in sta v ekvimolarnih koncentracijah, medtem ko je acetona zelo malo in je produkt spontane dekarboksilacije acetoacetata. ADA priporoča testiranje ketonov v urinu pri bolnikih s SB,

še posebej pri SB tipa 1, pri nosečnicah s SB, pri nosečnosti SB, v akutnih stanjih bolezni, stresu, daljši hiperglikemiji (>16,7 mmol/L) in simptomih diabetične ketoacidoze (9).

Ketoni v urinu

Običajno je v urinu zelo malo ketonov (pod mejo določljivosti). Najpogostejše uporabljena metoda je kolorimetrični test z nitroprusidom (Na-nitrofericianid in glicin na testnem traku ali v tabletah), ki daje s ketoni purpurno rdeč produkt. Nitroprusidni test zajame samo acetoacetat in aceton, ne pa β-hidroksibutirata. Lažno pozitivne rezultate lahko dobimo pri močno obarvanem urinu in ob prisotnosti nekaterih zdravil, kislem urinu (napr. pri velikem vnosu askorbinske kisline) ali zaradi prisotnosti mikrobov. Aceton je hlapen, zato mora biti vzorec urina pred analizo zaprt (9).

Ketoni v krvi

Normalno je v serumu/plazmi zelo malo ketonov (<0,5 mmol/L), pri izraziti ketoacidozi pa je koncentracija >2 mmol/L, dominira pa β-hidroksibutirat, ki ga z nitroprusidnim testom ne zajamemo. Priporoča se uporaba specifičnega encimskega testa za merjenje koncentracije β-hidroksibutirata (pretvorba β-hidroksibutirata v acetoacetat z β-hidroksibutirat-dehidrogenazo ob sočasnem prehodu NAD⁺ v NADH). Ali ima merjenje ketonov v krvi klinične prednosti pred standardnimi kazalci ketoacidoze (pH, celokupni CO₂, anionska vrzel), je še vedno v fazi preverjanja (9, 26).

3.5 Glikirani hemoglobin - GHb

Merjenje odstotka glikiranih proteinov, predvsem glikiranega hemoglobina (GHb), predstavlja veliko pridobitev za spremljanje metabolne urejenosti sladkornega bolnika za daljše preteklo časovno obdobje, za načrtovanje prihodnjega terapijskega režima in za oceno tveganja za razvoj kroničnih zapletov SB (18). Glikirani proteini nastanejo potranslacijsko s počasno neencimsko kovalentno vezavo glukoze (in presnovkov glikolize) na amino skupine proteinov. Za hemoglobin velja, da je stopnja, oziroma hitrost sinteze GHb funkcija koncentracije glukoze, ki so ji izpostavljeni eritrociti (sprememba GHb za 1 % je povezana s spremembo koncentracije glukoze za približno 2 mmol/L). Od vseh glikiranih hemoglobinov (Hb A1a, Hb A1b in Hb A1c) zavzema približno 80 % Hb A1c, to je frakcija, kjer je v hemoglobinu na NH₂-terminalni valin ene ali obeh verig β vezana glukoza (27). Študije so pokazale, da koncentracija GHb odraža povprečno glikemijo zadnjih 60-120 dni, medtem ko glikirani plazemski proteini (fruktozamin) odražajo povprečno glikemijo zadnjih 15-30 dni (28). ADA priporoča merjenje GHb najmanj dvakrat letno pri SB tipa 1 in SB tipa 2 ali štirikrat letno, če smo spremenili režim zdravljenja.

Analizne metode

Priporočena je uporaba metod, ki imajo certifikat NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program). V uporabi je nad 30 različnih metod, v glavnem pa spadajo v dve skupini; prva kvantificira GHb na osnovi različnega naboja glikiranih in neglikiranih komponent (kationska izmenjalna kromatografija, agar-gelska kromatografija ? večina kvantificira HbA1c), druga pa temelji na strukturnem razlikovanju glikiranih in neglikiranih komponent (boronatna afinitetna kromatografija, imunokemijske metode → večina kvantificira HbA1c). Kandidatni referenčni metodi po priporočilih IFCC sta masna spek-

Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni

troskopija in kapilarna elektroforeza, ki sta bolj specifični. Ker metodi dajeta nižje rezultate, je pred uporabo le-teh potrebno mednarodno soglasje, tako med kliniki kot tudi laboratorijskimi strokovnjaki (9).

Priporočeno je merjenje frakcije HbA_{1c} v sveži polni krvi, venozni ali kapilarni, odvzeti z EDTA ali antikoagulantnim sredstvom, ki ga priporoča proizvajalec analiznega kompleta. Vzorci krvi so stabilni 1 teden pri 4 °C, oziroma pri -70 °C najmanj 1 leto (pri -20 °C niso stabilni). Za pošiljanje vzorcev v laboratorij ali po pošti so različni proizvajalci razvili različne sisteme (na filter papirju, male stekleničke s stabilizatorjem/lizatorjem).

Ugotovljeno je, da starost, spol, etnična pripadnost, sezonske spremembe in akutna stanja ne vplivajo bistveno na vrednosti GHb. Vsa klinična stanja z znižano življensko dobo eritrocitov ali znižano povprečno starostjo eritrocitov (hemolitična anemija, akutna izguba krvi) vplivajo na lažno znižanje GHb. Tudi vitamin C in vitamin E lažno znižujeta GHb (verjetno inhibirata glikacijo), kar je laho zaščita pred zapleti, vendar v teh primerih GHb ni resnični pokazatelj glikemičnega stanja (9, 29, 30). V nekaterih metodah je rezultat interference s C vitaminom, salicilati, opiat, in stanji kot so hiperbilirubinemija, kronični alkoholizem, hipertrigliceridemija in uremija, višja vrednost GHb (29). Razne hemoglobinopatije (Hb S, C, Graz, Sherwood Forest, D in Padova) interferirajo odvisno od metode z lažno višjo ali nižjo vrednostjo GHb in v teh primerih je priporočena boronatna afinitetna kromatografija, kjer so ti vplivi manj izraziti (31). Pri izbiri metode je vse naštetu potrebno upoštevati in izbor prilagoditi testirani populaciji. Priporočene so metode s katerimi dosežemo znotraj laboratorija KV <3 % in med laboratoriji KV <5 %, kakovost rezultatov pa je potrebno nadzorovati z dvema kontrolnima vzorcema (z nizko in visoko vrednostjo GHb) na začetku in na koncu analiznega dne (9).

Želeni cilj terapevtskega režima po DCCT (Diabetes Control and Complication Trials) je vrednost GHb <7 %, (referenčni interval je 4-6 %), režim zdravljenja pa je potrebno prevrednotiti pri vrednostih >8 % (18, 19). Vse vrednosti pod spodnjo referenčno vrednostjo in vrednosti >15 % GHb je potrebno ponoviti in če se potrdijo, je potrebno preveriti možne vzroke (varianete Hb). Zelo pomembna je interpretacija rezultatov, za kar je potrebno dobro poznavanje kinetike GHb, značilnosti in omejitve uporabljene metode in možne interference.

Drugi glikirani proteini

Klinična uporabnost drugih glikiranih proteinov, na primer fruktozamina, za sledenje glikemije in napoved zapletov, še ni potrjena in zahteva nadaljne raziskave (9).

3.6 Genetični označevalci

Genetični označevalci ali markerji so trenutno v omejeni uporabi pri diagnostični obravnavi bolnika s SB, so pa obetajoči za prihodnost, ker lahko dajejo prognostične informacije in omogočijo genetsko svetovanje. HLA-DR/DQ tipizacija, analiza gena za inzulin in analiza CTLA-4 gena so uporabni označevalci tveganja za razvoj SB tip 1 in za pojasnitev SB nejasne etiologije.

Pri SB tipa 2, ki je heterogena poligenska bolezen, je genotipizacija zelo kompleksna. Fenotip SB je rezultat interakcije genetskih dejavnikov z dejavniki okolja in z molekularno genetiko lahko pojasni mo le malo primerov (<5 %), tako da rutinska uporaba genetičnih

markerjev ni upravičena. Tudi pri monogenih tipih MODY, genetične preiskave niso priporočene za rutinsko uporabo in so omejene predvsem na raziskave. Z možnostjo uvedbe direktnega avtomatskega sekveniranja vpletenih genov pa bi v prihodnosti tudi te preiskave lahko postale dostopnejše in številčnejše (9).

3.7 Avtoimunski označevalci

Pri SB tipa 1, ki je avtoimunska povzročena bolezen, so prisotna različna avtoprotitelesa; proti citoplazmi celic β , proti inzulinu, proti GAD₆₅ in proti dvema tirozin-fosfatazama. Tudi 10-15 % odraslih bolnikov s SB tipa 2 ima avtoprotitelesa proti celicam β , predvsem proti GAD₆₅, kar napoveduje inzulinsko odvisnost (tip LADA) (32). Vendar za rutinsko obravnavo bolnikov s SB tipa 1, ali za testiranje sorodnikov bolnikov, ali za presejevanje populacije, dokazovanje avtoprotiteles ni priporočeno. Priporočeno pa je za presejevanje sorodnikov bolnika s SB tipa 1, ki želijo darovati del pankreasa za transplantacijo bolniku v končni fazi bolezni. Avtoprotitelesa se lahko določajo samo v akreditiranem laboratoriju z uvedenim nadzorom kakovosti (9, 33).

3.8 Mikroalbuminurija

Merjenje mikroalbuminurije je test za zgodnje odkrivanje diabetične nefropatije. Ker je sladkorna bolezen vodilni vzrok končne ledvične odpovedi, tako v ZDA kot tudi v Evropi, ADA priporoča periodično (enkrat letno) merjenje koncentracije albumina v urinu pri vseh bolnikih s SB brez proteinurije. Mikroalbuminurija je definirana, kot izločanje »mikro« količin albumina v urinu, to je 30-300 mg albumina/24 ur (ali 20-200 μ g/min ali 30-300 μ g/mg kreatinina), ki jo s klasičnimi testi za albumin ne odkrijemo, ker so premalo občutljivi. Za odkrivanje mikroalbuminurije uporabljamo zelo občutljive teste, semikvantitativne in kvalitativne (testne trakove), ki zaznajo koncentracije v območju 20-50 mg/L (zahtevana je >95 % diagnostična občutljivost) in v primeru pozitivnega testa mora biti testiranje ponovljeno s kvantitativnimi metodami (9, 34).

3.9 Drugi potencialno pomembni analiti

Izulin in prekurzori

V večini primerov SB ni potrebe po merjenju inzulina, C-peptida ali proinzulina. Visoka koncentracija inzulina je posredni označevalec, ki ga lahko uporabimo za oceno inzulinske neodzivnosti in za odkrivanje rizičnih oseb za razvoj sindroma X (sindrom inzulinske rezistence). Ugotovljeno je, da je visoka koncentracija inzulina in/ali proinzulina v plazmi nediabetičnih bolnikov lahko napoved razvoja šrčno žilne bolezni. Večji klinični pomen, kot merjenje samega inzulina (proinzulina), ima merjenje posledic hiperinzulinemije (ali hiperproinzulinemije), skupaj s posledicami inzulinske neodzivnosti, kot so; krvni tlak, stopnja tolerance za glukozo, koncentracija trigliceridov in koncentracija HDL-holesterola v plazmi (35).

Merjenje inzulina v plazmi je nujno pri razjasnitvi hipoglikemije na tešče, ki je prisotna tudi pri tumorju celic otočkov pankreasa, kjer je koncentracija inzulina visoka ob nizki koncentraciji glukoze in kjer je razmerje inzulin/proinzulin visoko. Poleg tega je merjenje inzulina nujno pri sindromu policističnih ovarijev, kjer je izražena inzulinska rezistenca zaradi presežka androgenov in motenj v presnovi ogljikovih hidratov, obe motnji pa sta posledici zdravljenja z metforminom ali s tiazolidindioni (9, 19).

Pregledni članki - Review Articles

Merjenje C-peptida kot odziv na intravensko dani glukagon je pomoč pri redki težavi razlikovanja med SB tipa 1 in SB tipa 2 (9).

Metode, ki se uporabljajo za merjenje koncentracije inzulina, proinzulina in C-peptida so v glavnem imunokemijske, vendar niso standardizirane, zato je priporočeno, da posamezni laboratoriji izdelajo svoje referenčne vrednosti. Za bolnike na inzulinski črpalki je priporočeno meriti C-peptid, katerega vrednost naj bi bila pod spodnjo referenčno mejo ($\leq 0,5 \mu\text{g/L}$), povečana za 10 % zaradi nenatančnosti testa (9).

Inzulinska protitelesa

Merjenje inzulinskih protiteles za rutisko obravnavo bolnikov s SB ni priporočeno. Pri večini bolnikov je titer protiteles nizek, še posebno nizek pri tistih, ki so na zdravljenju s humanim rekombinantnim inzulinom. V redkih primerih je titer inzulinskih protiteles pri SB tipa 2 iz neznanega vzroka zelo visok, z dramatičnimi posledicami neučinkovitega znižanja plazemske koncentracije glukoze (9).

Amilin

Amilin je pankreatični peptid, sestavljen iz 37 amino kislin, ki se izloča iz pankreatičnih celic β skupaj z inzulinom. Verjetno sodeluje pri uravnavanju presnove glukoze s tem, da upočasnjuje praznjenje želodca in zmanjšuje produkcijo glukagona. Znižana koncentracija se lahko pojavi ob inzulinopeniji pri bolnikih s SB tipa 2. Merjenje amilina je sedaj omejeno na raziskave in ni priporočeno za klinično obravnavo sladkornih bolnikov (9, 36).

Leptin

Leptin je protein, sestavljen iz 167 amino kislin, ki se sintetizira v maščobnem tkivu in ima verjetno skupaj s hipotalamusom vlogo v uravnavanju apetita (vnosu energije), termogenezi in tudi reprodukciji. Mnogi debeli ljudje imajo zvišao koncentracijo leptina in izgleda, da je koncentracija leptina v sorazmerju z debelostjo in koncentracijo inzulina v plazmi. Raziskave kažejo na to, da gre za spremenjen gen za leptinski receptor in posledično okvaro receptoja. Pri današnji stopnji vedenja o leptinu, ga je smiselno določati, kadar pričakujemo nizke vrednosti, to je pri zgodnji masivni debelosti (9, 37).

Lipidi

Srčnožilne okvare so najpogostejši vzrok smrti bolnikov s SB tipa 2, zato je odkrivanje in zdravljenje spremljajočih dislipidemij nujno. Za sledenje diabetične dislipidemije je priporočeno meriti v plazmi koncentracije holesterola, LDL-holesterola, HDL-holesterola in trigliceridov. ADA razvršča bolnike po vrednostih lipidov v tri skupine tveganja za razvoj srčnožilne okvare, kar je prikazano v Preglednici 5 (9).

Priporočeno je testiranje vseh sladkornih bolnikov enkrat letno; tiste, za katere se ugotovi, da so v skupini z nizkim tveganjem, je lahko nadaljne testiranje manj pogosto. Preiskovanci morajo biti pred testiranjem tešči. Uporabljene metode so standardne; za HDL-holesterol precipitacijske, LDL-holesterol se izračuna ali izmeri z direktnimi metodami. Pri vrednostih trigliceridov $\geq 4,5 \text{ mmol/L}$ je priporočena meritev holesterola in trigliceridov v z ultracentrifugiranjem ločenih lipoproteinskih frakcijah (38).

Poleg naštetih parametrov, ki so znanilci srčnožilnih okvar, je tudi veliko novejših netradicionalnih dejavnikov tveganja, kot so homocistein, fibrinolitična kapaciteta, fibrinogen in C-reaktivni protein (CRP), pa tudi lipoproteini HDL₂, HDL₃, lipoprotein(a) ter apo A-I in apo-B. Ti novejši dejavniki tveganja niso priporočeni za rutinsko obravnavo sladkornega bolnika, se bodo pa v prihodnosti, ko bo narejenih več študij, priporočila prilagajala rezultatom raziskav (9, 39, 40, 41).

4 Zaključek

Prikazana nova klasifikacija sladkorne bolezni in novelirani kriteriji za postavitev diagnoze, spremljanje metabolne urejenosti bolnika in prisotnost ali napoved spremljajočih zapletov, je rezultat dolgoletnega usklajevanja med ADA, WHO in nacionalnimi strokovnimi združenji. Proces vsekakor ni zaključen, saj raziskave vseh oblik sladkorne bolezni intenzivno potekajo na več ravneh, predvsem na imunološki in genetski ravni. Poleg tega se razvijajo nove metode in instrumentalne tehnike, ki poenostavljajo presejevanje, diagnostiko in samokontrolo, kakor tudi zdravljenje in spremljanje učinkov zdravljenja. Zato je nujno, da vsi, ki se ukvarjajo z diagnostiko in zdravljenjem sladkorne bolezni, tekoče sledijo objavljenim, usklajenim in noveliranim priporočilom.

5. Literatura

1. Pintar I. Kratka zgodovina medicine. Ljubljana: Tiskarna Ljudske pravice, 1950.
2. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1997; 20:1183-1201.
3. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication. Report of a WHO Consultation, Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva WHO: WHO/NCD/NCS/99.2, 1999.
4. American Diabetes Association. Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S. in 1997. Diabetes Care 1998; 21:296-309.
5. Natham DM. Long-term complications of diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 328:1676-1685.
6. Grubič Z. Patofiziologija sladkorne bolezni. Medicinski razgledi 1993; 499-

Preglednica 5: Razvrščanje bolnikov s SB v skupine tveganja za srčnožilne okvare

Koncentracija mmol/L	Visoko tveganje	Srednje tveganje	Nizko tveganje
LDL-holesterol	$\geq 3,35$	$\geq 2,60-3,35$	$<2,6$
HDL-holesterol	moški: $\geq 0,90$	0,9-1,15	moški: $>1,15$
	ženske: $<1,15$		ženske: $>1,40$
Trigliceridi	$\geq 4,5$	2,3-4,5	$<2,3$

Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni

- 537.
7. Goodman Gilman's. The Pharmacological basis of Therapeutics 1996; 1487-1516.
8. Faye OW, Lemke TL, Williams DA. Principles of Medical Chemistry 1996; 581-588.
9. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2002; 48:436-472.
10. Shamon H. Patophysiology of diabetes. Drugs 1992; 44(3).
11. Lernmark Č. Type I Diabetes. Clin Chem 1999; 45:1331-1338.
12. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988; 37:1595-1607.
13. Sacks DB, McDonald JM. The pathogenesis of type II diabetes mellitus: a polygenic disease. Am J Clin Pathol 1996; 105:149-156.
14. Mrevlje F. Bolezni presnove. V: Kocijančič A, Mrevlje F. Interna medicina. 1. izdaja. Ljubljana: EWO, DZS, 1993; 158:1743-1752.
15. Lebovitz HE. Type 2 diabetes: An overview. Clin Chem 1999; 45:1339-1345.
16. Mrevlje F. Sladkorna bolezen tip 2 in metabolični sindrom – dejavnika tveganja za aterosklerotično srčno-žilno bolezen. Med razgl 2001; 40(S3):1-10.
17. Rubenstein AH. A 64-year-old man with adult-onset diabetes. JAMA 1996; 276:816-821.
18. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes care 2001; 24:S80-S82.
19. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. Diabetes care 2000; 23:381-389.
20. Ricos C, Alvarez V, Cava F *et al.* Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59:491-500.
21. The Expert Committee. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1999; 22:S5-S19.22. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. Diabetes care 2000; 23:S77-S79.
23. Hoffman L, Nolan C, Wilson JD *et al.* Gestational diabetes mellitus – management guidelines. The Australasian Diabetes in Pregnancy Society. Med J Aust 1998; 169:93-97.
24. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. Diabetes Care 1998; 21:B161-B167.
25. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association annual meeting, 1999. New approaches to insulin treatment and glucose monitoring. Diabetes Care 1999; 22:2078-2082.
26. Porter WH, Yao HH, Karounos DG. Laboratory and clinical evaluation of assays for β -hydroxybutyrate. Am J Clin Pathol 1997; 107:353-358.
27. Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. Am J Med 1981; 70:325-330.
28. Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA_{1c}, glycated albumin, and fructosamin and analysis of their Weight function against preceding plasma glucose level. Diabetes Care 1995; 18:440-447.
29. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effects of vitamin C on glycosilation of proteins. Diabetes 1992; 41:167-173.
30. Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A *et al.* Vitamin E reduction of protein glycosilation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complication? Diabetes Care 1991; 14:68-72.
31. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001; 7:153-163.
32. Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent Autoimmune Diabetes of Adults): definition, characterization, and potential prevention. Diabetes Care 2001; 24:1460-1467.
33. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001; 358:221-229.
34. American Diabetes Association. Diabetes nephropathy. Diabetes Care 1999; 22:S66-S69.
35. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. Am J Cardiol 1999; 83:25F-29F.
36. Cooper GJ, Willis AC, Clark A *et al.* Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:8628-8632.
37. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 1998; 395:763-770.
38. Warnick GR. Measurement of cholesterol and other lipoprotein constituents in the clinical laboratory. Clin Chem Lab Med 2000; 38:287-300.
39. Saito I, Folsom AR, Brancati FL *et al.* Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Ann Intern Med 2000; 133:81-91.
40. Plazar N, Marušič D. Vrednosti c troponina I, kreatin kinaze, izoencima MB in mioglobina v serumu po transtorakalni direktni elektrokonverziji. Farm Vestn 2000; 51:425-427.
41. Plazar N, Stegnar M, Žužek Rešek S, Lukač Bajalo J. Hiperhomocisteinemija pri dializnih bolnikih. Farm Vestn 2004; 55:294-296.

Sladkorna bolezen in avtoimunost

Diabetes and Autoimmunity

Borut Božič

POVZETEK: Sladkorna bolezen je heterogena skupina motenj z značilno hiperglikemijo. Imunsko pogojene oblike sladkorne bolezni poskušamo razlagati z vpletenostjo citokinov, naravnih celic ubijalk, izgubo lastne tolerance, apoptozo, molekulske mimikrije in delovanjem superantigenov. Med okoljskimi vplivi so najpomembnejše infekcije (tveganje) in dojenje (zaščita). Geni poglavitnega tkivnoskladnostnega kompleksa nosijo 60 % genskega vpliva na razvoj bolezni, 40 % pa drugi geni. Antigenska in epitopska razširitev avtoprotitelesnega odziva je eden izmed pomembnih označevalcev prihajajočega razvoja bolezni, vendar interpretacija analiznih rezultatov ni brez pasti. Celovito razumevanje nastanka imunsko pogojene sladkorne bolezni bo mogoče doseči z upoštevanjem kompleksnih interakcij različnih dogajanj, ne pa z analizami posamičnega vzročnega faktorja.

Ključne besede: sladkorna bolezen, diabetes tipa 1, avtoimunost

ABSTRACT: Diabetes mellitus is a heterogeneous group of disorders, all characterized by hyperglycemia. Cytokines, natural killer T cells, loss of self tolerance, apoptosis, molecular mimicry, and superantigens are used to explain immune dependent diabetes. Infections (as risk) and breast feeding (as preventing) are the most important environmental factors. 60 % of the genetic susceptibility is conferred by HLA, 40 % by other genes' transcripts. Antigenic and epitope spreading of the autoantibody responses is one of the important markers of imminent progression, but the interpretation of the analytical results is not without troubles. A complete understanding of immune dependant diabetes's genesis would be derived from the comprehension of the complex interaction amongst different events and not from the analysis of single causative factor.

Key words: diabetes melitus, diabetes type 1, autoimmunity

1 Diagnostična in klasifikacijska merila

Sladkorna bolezen je heterogena skupina motenj – nekateri avtorji pišejo kar o družini bolezni. Za vse je značilna hiperglikemija in motnja v glukoznem metabolizmu (1). Strokovnjaki priporočajo dve skupini kriterijev: eno za diagnosticiranje bolezni, ki omogoča varno in optimalno obravnavo bolnika, in drugo za podporo raziskovalnemu delu, zato da bi razumeli etiologijo in patogenezo sladkorne bolezni (2, 3).

Osnova diagnostičnim merilom je povišana plazemska koncentracija glukoze, po etiološki klasifikaciji pa ločimo (4):

1. sladkorna bolezen tipa 1 z destrukcijo celic β Langerhansovih otočkov z dvema podskupinama:
 - za tip 1a je značilna avtoimunska destrukcija celic;
 - za tip 1b je značilna idiopatska destrukcija celic β ;
2. sladkorna bolezen tipa 2 z neznano etiologijo, ki obsega 90 % vseh sladkornih bolnikov;
3. druge specifične tipe sladkorne bolezni, ki vključujejo:
 - neobičajne oblike imunsko pogojene sladkorne bolezni;
 - genetske pomanjkljivosti inzulinskega delovanja ali okvare delovanja celic β ;
 - bolezni eksokrinega pankreasa;
 - z zdravili povzročeno sladkorno bolezen.

4. nosečnostno sladkorno bolezen, ki jo ima okoli 4 % nosečnic. Običajno je asimptomatična in bolnic ne ogroža. Ločiti jo moramo od prikrita sladkorne bolezni, ki se v nosečnosti izrazi s polno klinično sliko.

Izrazi, kakor so inzulinsko odvisni diabetes mellitus, inzulinsko neodvisni diabetes mellitus, juvenilni in starostni diabetes mellitus, niso ustrezni, ker ne odražajo resničnega stanja in se zato opuščajo.

Pomemben praktični vidik v zdravstvu je ločitev bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1, pri katerih gre za imunsko pogojeno bolezen od bolnikov z boleznijo tipa 2, pri katerih avtoimunost ni poglavitni vzrok bolezni. Obstajajo pa tudi bolniki, ki razvijejo blažjo obliko bolezni tipa 1 z značilnimi protitelesi, toda s kliničnimi znaki bolezni tipa 2. Ta oblika bolezni se včasih žargonsko označi kot tip 1,5 (5). V članku obravnavamo predvsem imunsko pogojeno sladkorno bolezen v povezavi z avtoimunostjo.

2 Avtoimunost

Avtoimunost je reakcija imunskega sistema na tkiva lastnega telesa. Da bi razumeli, kako se avtoimunska reakcija sploh razvije, moramo poznati mehanizme, s katerimi je mogoča lastna prepoznavna, in mehanizme, s katerimi je normalno vzdrževana lastna tolerance. To vključuje:

1. zaprtje avtoantigenov na nedostopna mesta;
2. odstranitev avtoreaktivnih limfocitov T med razvojem v priželjcu;
3. procesiranje in predstavitev posameznih lastnih molekul;
4. indukcijo anergije ali neodzivnosti avtoreaktivnih limfocitov T;
5. delovanje supresorskih celic in hormonov.

Napaka v katerem koli od navedenih procesov lahko povzroči avtoimunske reakcije. Avtoimunska bolezen nastopi, ko avtoimunska reakcija povzroči patološko okvaro tkiva.

3 Modeli razlage imunske pogojene sladkorne bolezni

Za razlago imunske pogojene bolezni uporabljamo šest imunskih modelov, ki so verjetni in podprti z dokazi. Ti vključujejo citokine, naravne celice ubijalke, izgubo lastne tolerance, apoptozo, molekularno mimikrijo in superantigene.

Citokini so pomembni pri nadzoru in razvoju imunskega odziva, saj vplivajo na aktivacijo limfocitov in fagocitov. Celice pomagalke T ločimo v dve podskupini: Celice pomagalke T tipa 1 izločajo interferon α in interleukin 2, ki spodbujata celično imunost. Celice pomagalke T tipa 2 izločajo pretežno interleukina 4 in 10, ki zavirajoče vplivata na celice pomagalke T tipa 1 in sta vpletena pretežno v humoralno imunost. Celice tipa 1 bi lahko spodbujale avtoimunske bolezni, medtem ko bi celice tipa 2 lahko delovale protektivno (6). Toda dokazali so obstoj patogenih celic tipa 1, ki so bile diabetogene tudi po preklopu v tip 2 (7).

Celice naravne ubijalke so sposobne hitro proizvesti velike količine citokinov, predvsem interleukina 4, ki zavira delovanje celic pomagalke T tipa 1. Sposobne so prepoznati molekule celične diferenciacije CD1. Molekule CD1 so antigen predstavljene molekule in ne pripadajo poglavitnemu tkivnoskladnostnemu kompleksu (MHC *major histocompatibility complex*). Zgodnja okvara celic naravnih ubijalk T bi lahko privedla do avtoimunske motnje (8).

Izguba lastne tolerance omogoči avtoreaktivnim elementom izogniti se negativni selekciji v timusu. Vsak zdrav imunski sistem vsebuje tudi potencialne avtoagresivne citotoksične celice T CD4+ in vprašanje je, v katerih stanjih se avtoreaktivnost sprevrže v avtoagresivnost (9). Virusne infekcije so zagotovo eno izmed takih stanj.

Apoptotične celice so vpleteno tudi v imunske procese. Lahko prikažejo avtoreaktivne antigene na površini svojih brstov, lahko aktivirajo dendritične celice in lahko sprožijo nastanek avtoprotiteles. Za sladkorno bolezen pa je posebno pomemben neonatalni val apoptoze celic β (10).

O molekularni mimikriji govorimo, kadar obstaja strukturna podobnost med molekulami patogena in lastnega proteina gostitelja. Avtoimunost se lahko pojavi, če reaktivnost celic T proti infektivnemu agensu povzroči aktivacijo in razmnožitev križno reaktivnih celic T proti biološko pomembnemu epitopu avtoantigena. Direktna mimikrija z virusi je pri razvoju diabetesa verjetna zaradi aminokislinske podobnosti med virusnimi proteini in proteini celic β . Ugotovljena je bila sekvenca šestih aminokislin, ki je enaka pri glutamatni dekarboksilazi

otoških celic in proteinu replikacije kokseki virusa (CVB4). Ta sekvenca sestavlja glavni epitop pri četrtini novo diagnosticiranih bolnikov s sladkorno (11). Humani protein IA-2 (islet antigen, antigen otoških celic) deli aminokislinsko podobnost z rotavirusi, citomegalovirusi, rinovirusi, hantavirusi, flavivirusi, virusom hepatitisa B, herpesvirusi in drugimi (12). Obstajajo pa tudi nasprotna mnenja, ki zavračajo morebitno povezavo med infekcijami in diabetesom prek mimikrije (13).

Z infekcijami so povezani tudi superantigeni. Vsak superantigen je sposoben aktivirati do 30 % krožečih limfocitov T, kar je nekaj tisočkrat več kakor običajni antigeni. Med aktiviranimi celicami T so tako tudi avtoreaktivne celice, ki lahko povzročijo avtoimunske bolezni – tudi diabetes (14).

4 Dovzetnost za razvoj bolezni

Na našo dovzetnost za razvoj avtoimunske sladkorne bolezni vplivajo genetski in okoljski dejavniki (15). Infekcije so najpomembnejši okoljski dejavniki. Z infekcijami v zelo zgodnjem otroštvu povezujejo tudi dejstvo, da dojeni otroci redkeje zbolijo za imunske pogojene sladkorne bolezni kakor otroci, ki niso bili dojeni, ali pa dojeni le kratek čas. Nekateri strokovnjaki menijo, da je znižanje incidence infektivnih bolezni odgovorno za rast sladkorne bolezni v "zahodni" civilizaciji s "prečistim" okoljem ("hygiene hypothesis") (16).

Kadar koli je govor o lastni prepoznavi, so v dogajanje vpleteni geni MHC s svojimi proizvodi – proteini HLA. Genomska regija MHC vsebuje imunske odzivne gene, ki so pomembni za učenje celic T in za predstavitev antigenov z molekulami MHC 1. in 2. razreda. Predel HLA 2. razreda, imenovan tudi regija 1 imunske pogojene bolezni (17), obsega alele DR in DQ. Ta predel ima vlogo pri antigeni predstavitvi in sproženju imunskega odziva. Analiza podtipa DRB1*04 je še posebno zanimiva: tveganje za razvoj imunske pogojene diabetesa, ki je povezano z omenjenim podtipom, je zelo odvisno od preiskovane populacije. Različni aleli so navedeni kot povečano tveganje za imunske pogojene sladkorne bolezni pri Norvežanih, Francozih, Špancih in Avstralcih. Isti podtip, torej DRB1*04, pa predstavlja z nekaterimi aleli tudi zaščito pred nastankom imunske pogojene sladkorne bolezni (18). Tudi tu velja, da so vpleteni pri različnih populacijah različni aleli. Okoli 60 % genske nagnjenosti za pojav imunske pogojene sladkorne bolezni prispevajo geni HLA, 40 % pa drugi geni s svojimi prepisi. (19, 20).

Z navedenimi mehanizmi ter genetskimi in okoljskimi vplivi poskušamo razlagati patogenezo imunske pogojene sladkorne bolezni. Limfociti T igrajo osrednjo vlogo. Imunske pogojene sladkorne bolezni je posledica celično posredovanega avtoimunskega napada na Langerhansove otočke, ki proizvajajo inzulin, kar povzroča specifičen razpad pankreasnih celic β , pri čemer je regeneracija tkiva nezadostna (21). Med klinično izraženo boleznijo je več kakor tri četrtine celic β že uničenih, po nekaterih podatkih celo več kakor 95 % (18, 22).

5 Značilnosti avtoprotiteles pri sladkorni bolezni

Dolgo preden je mogoče ugotoviti sliko diabetesa, lahko določimo protitelesa proti celicam β in njihovim antigenom. Ta protitelesa so

Pregledni članki - Review Articles

bistvena za razlikovanje med sladkorno boleznijo tipa 2 in tako imenovanim tipom 1,5. Spekter protiteles, njihova avidnost in afiniteta razlikujeta posameznike, ki bodo zboleli za sladkorno boleznijo, in tistimi, ki ne bodo. Antigenska in epitopska razširitev avtoprotitelesnega odziva je eden od pomembnih označevalcev morebitnega razvoja bolezni: pri posameznikih s protitelesi proti več antigenom je potek najpogostejše hiter, medtem ko protitelesa proti enemu samemu antigenu najpogostejše ne napovedujejo bolezni (23, 24, 25).

Ob vrednotenju rezultatov laboratorijskih preiskav (diagnostična specifičnost in diagnostična občutljivost) ne smemo zanemariti vrednotenja laboratorijskih metod (analizna specifičnost in analizna občutljivost). Zaradi konformacijsko odvisnih epitopov je kazalo, da imajo radioimunske tehnike določeno prednost pred encimskoimunskimi, katerih uporaba je vse pogostejša zaradi navidezne preprostosti in navidezne nezahtevnosti. Delovna skupina Combinatorial Islet Autoantibody Workshop se že skoraj dvajset let ukvarja s standardizacijo določanja klinično pomembnih protiteles pri diabetesu. Vendar težava ni samo v medlaboratorijskih odstopanjih, ampak tudi v heterogenosti protiteles. Določanje količine, koncentracije in oziroma ali vezavnih lastnosti (avidnosti) protiteles poliklonskega odziva vsebuje tudi teoretične pasti. Slednje se nanašajo na izbiro metode (afinitetno ali kapacitetno odvisna) in izbiro vzorcev za medlaboratorijsko testiranje oziroma za umerjanje metode (problem zadostnega volumna vzorcev za razpošiljanje) (26). Seveda pa se moramo pri tem zavedati tudi druge plati: pri biokemijskih označevalcih, ki se pojavijo več let pred klinično sliko bolezni, je težko določiti, ali pripadajo podskupini zdravih ljudi ali so resnični označevalci razvijajoče se bolezni (21, 27).

6 Zgodnje faze v razvoju bolezni

Predstavitev za celice β specifičnih avtoantigenov limfocitom pomagalkam (Th CD4+) v povezavi z molekulami MHC 2. razreda se šteje za prvi korak k sprožitvi sladkorne bolezni (14, 28). Limfociti B verjetno bolj vplivajo na nastanek bolezni s predstavitvijo avtoantigenov celicam CD4+ kakor pa s proizvodnjo in izločanjem avtoprotiteles. Za razpad celic β sta namreč pomembni obe podskupini limfocitov T: CD4+ in CD8+. Citotoksični limfociti T (CD8+) povzročijo razpad celic β po prepoznavanju specifičnih avtoantigenov na celicah β v povezavi z molekulami MHC 1. razreda (zunanjimi antigeni) s sproščanjem perforinov in grancimov ter z apoptozo, pogojeno z ligandom Fas.

Neustrezna predstavitev lastnih peptidov MHC 1. razreda bi lahko bila posledica napačne translacije ali transkripcije proteazne podenote proteosoma z imenom LMP2. Izkazalo se je namreč, da neustrezno izražanje moti proteolitično procesiranje transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki igra osrednjo vlogo pri učinkovitem limfocitnem zorenju, normalni regulaciji citokinske produkcije v limfocitih T in zaščiti limfocitov T pred apoptozo (25). Poročajo pa tudi o neustreznem izražanju in delovanju kaspaze 3 v limfocitih bolnikov s sladkorno boleznijo, kar naj bi vplivalo na neustrezno periferno toleranco (30).

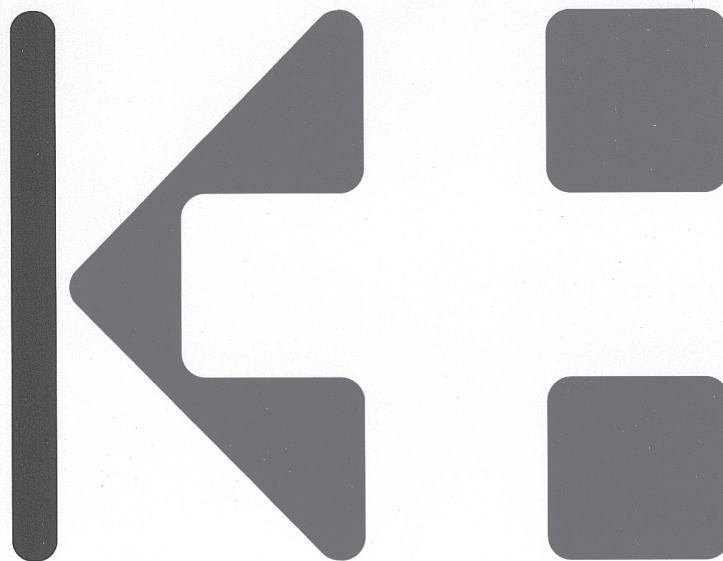
7 Zaključek

Pri diabetičnih bolnikih torej odkrijemo neustrezno predstavitev antigenov, neustrezno in vitro proteosomsko obdelovanje in moten prikaz lastnih peptidov MHC 1. razreda z revno selekcijo limfocitov T, kar daje predloženi razlagi patogeneze ustrezno težo.

Število ljudi, ki so prizadeti zaradi imunsko pogojene sladkorne bolezni, narašča izjemno hitro. Za to ne morejo biti vzrok niti samo genetski niti samo okoljski vplivi. Celovito razumevanje nastanka imunsko pogojenega diabetesa bo mogoče doseči z upoštevanjem kompleksnih interakcij različnih dogajanj, ne pa samo z analizami posamičnega vzročnega faktorja.

8 Literatura

1. Medvešček M. Sladkorna bolezen - Uvod. V: Kocijančič A, Mrevlje F (ur) Interna medicina. DZS - EW, Ljubljana 1998, str. 545-548.
2. WHO Study group. Diabetes mellitus. WHO technical report series, 1985: 727.
3. The National Diabetes Data Group. National Institute of Health (NIH). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. Diabetes 1979; 1039-1057.
4. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1997; 20: 1183-1197.
5. Kobayashi T, Nakanishi K, Murase T et al. Small doses of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive beta-cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical features of NIDDM. Diabetes 1996; 45: 622-626.
6. Katz J, Wang B, Haskins K et al. Following a diabetogenic T cells from genesis through pathogenesis. Cell 1993; 74: 1089-1100.
7. Haskins K, Wegmann. Diabetogenic T-cell clones. Diabetes 1996; 45: 1299-1305.
8. Lee PT, Putnam A, Benlagha K et al. A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. J Clin Invest 2002; 110: 793-800.
9. Parry SL, Hall FC, Olson J et al. Autoreactivity versus autoaggression: a different perspective on human autoantigens. Current Opinion in Immunology 1998; 10: 663-668.
10. Trudea JD, Dutz JP, Agrany E et al. Neonatal β -cell apoptosis. A trigger for autoimmune diabetes? Diabetes 2000; 49: 1-7.
11. Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL. T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. J Exp Med 1994; 180: 1979-1984.
12. Maclaren NK, Atkinson MA. Insulin-dependent diabetes mellitus: the hypothesis of molecular mimicry between islet cell antigens and microorganisms. Mol Med Today 1997; 3: 76-83.
13. Tuvermo T, Dahlquist F, Frisk G et al. The Swedish childhood diabetes study III: IgM against coxsackie B viruses in newly diagnosed type 1 (insulin dependent) diabetic children - no evidence of increased antibody frequency. Diabetologia 1989; 32: 745-747.
14. Conrad B, Weidmann E, Trucco G et al. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus etiology. Nature 1994; 371: 351-355.
15. Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. Immunol Rev 2005; 204: 232-249.
16. Kukreja A, Maclaren NK. NKT cells and type-1 diabetes and the "hygiene hypothesis" to explain the rising incidence rates. Diabetes Technol Ther 2002; 4: 323-333.
17. She JX. Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited. Immunol Today 1996; 17: 323-329.
18. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. J Clin Endocrinol Metabol 1999; 84: 4371-4378.
19. Lucassen AM, Screaton GR, Julier C et al. Regulation of gene expression by the IDDM-associated, insulin locus haplotype. Hum Mol Gen 1995; 4: 501-506.
20. Marron MP, Raffel LJ, Garchon H-J et al. Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA-4 polymorphisms in multiple ethnic groups. Hum Mol Gen 1997; 8: 1275-1282.
21. Bason-Laubert A, Boehm B, Lang-Muritano M et al. Association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. Diabetologia 2005; 48: 900-905.
22. Delovitch T, Sing B. The non-obese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. Immunity 1997; 7: 727-738.
23. Pietropaolo M, Peakman M, Pietropaolo SL et al. Combined analysis of GAD 65 and ICA512 (IA-2) autoantibodies in organ and non-organ specific autoimmune diseases confers high specificity for insulin-dependent diabetes mellitus. J Autoimmun 1998; 11: 1-10.
24. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E et al. Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determine risk of Type 1 diabetes. J Autoimmun 1996; 9: 379-383.
25. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK et al. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. Diabetes 1997; 46: 1701-1710.
26. Potter KN, Wilkin TJ. The molecular specificity of insulin autoantibodies. Diabetes Metab Res Rev 2000; 16: 338-353.
27. Falorni A, Brozzetti A. Diabetes-related antibodies in adult diabetic patients. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2005; 19: 119-133.
28. Rajasalu T, Barth C, Spyrtantis A et al. Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 2004; 1037: 208-215.
29. Hayashi T, Faustman D. The role of the proteasome in autoimmunity. Diabetes Metab Res Rev 2000; 16: 325-337.
30. Vendrame F, Santangelo C, Misasi R, et al. Defective lymphocyte caspase-3 expression in type 1 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol. 2005; 152(1): 119-125.



KEMOFARMACIJA

Lekarne, bolnišnice, zdravstveni domovi in
veterinarske ustanove večino svojih
nakupov opravijo pri nas.

Uspeh našega poslovanja temelji na
kakovostni ponudbi, ki pokriva vsa
področja humane medicine in veterine, pa
tudi na hitrem in natančnem odzivu na
zahteve naših kupcev.

KEMOFARMACIJA - VAŠ ZANESLJIVI DOBAVITELJ!



KEMOFARMACIJA

Veletrgovina za oskrbo zdravstva, d.d. / 1000 Ljubljana, Cesta na Brdo 100
Telefon: 01 47-09-800 / Telefaks: 01 47-09-973

Klinična biokemija pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni

Medical biochemistry assessment of renal diseases in diabetes mellitus

Darko Černe

POVZETEK: V članku je predstavljen pomen klinične biokemije pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni, kot so diabetična nefropatija, ateroskleroza renalnih arterij, pielonefritis in papilarna nekroza. Mikroalbuminurija (zgodnji porast koncentracije albumina v urinu) je danes najmočnejši in najpogostejše uporabljen napovednik razvoja napredovane diabetične nefropatije oziroma zgodnji označevalec že prisotne bolezni, zato se mora koncentracija albumina v urinu sladkornih bolnikov meriti redno po uveljavljenih priporočilih. Aktivnost von Willebrandovega faktorja v plazmi in renalna funkcijska rezerva, ki se danes uporabljata predvsem v raziskovalne namene, bi v prihodnosti lahko postali sestavni del zahtevnejše laboratorijske obravnave diabetične nefropatije. Pri odkrivanju ateroskleroze renalnih arterij laboratorijska diagnostika nima pomembnejše vloge, z izjemo analize priznanih dejavnikov tveganja za razvoj ateroskleroze (lipidi, lipoproteini, C-reaktivni protein, homocistein). Pri laboratorijski obravnavi pielonefritisa in papilarne nekroze imajo osnovne preiskave urina pomembno vlogo, zato se morajo pri ogroženih bolnikih izvajati redno. Namen prispevka je pomagati pri izbiri in pravilni uporabi primernih laboratorijskih preiskav za odkrivanje in sledenje ledvičnih zapletov sladkorne bolezni.

Ključne besede: ledvična bolezen, sladkorna bolezen, klinična biokemija

ABSTRACT: Here we describe the importance of medical biochemistry in diagnosis and monitoring of renal complications of diabetes mellitus, such as diabetic nephropathy, renal artery atherosclerosis, pielonephritis and papillary necrosis. Microalbuminuria (early increase of albumin concentration in urine) is nowadays the strongest and the most frequently used prognostic marker of advanced diabetic nephropathy and diagnostic indicator of an early disease, therefore, measurement of albumin concentration in urine of diabetic patients should be regularly measured according to the recommended guidelines. Von Willebrand factor activity in plasma and renal functional reserve, nowadays used in research only, may become in future a part of a routine laboratory diagnostics of diabetic nephropathy. In renal artery atherosclerosis laboratory diagnostics has only minor importance and is limited to analysis of "conventional" parameters for atherosclerotic risk stratification (lipids, lipoproteins, C-reactive protein, homocysteine). In diagnosis and treatment of pielonephritis and papillary necrosis basic urinalysis has important role and should be regularly performed. Our overview may be of help when choosing appropriate laboratory assays for diagnosis and monitoring of renal complications of diabetes mellitus.

Key words: renal disease, diabetes mellitus, medical biochemistry

1 Uvod

V razvitem svetu je sladkorna bolezen sedmi najpogostejši vzrok smrti (1). Bolniki s pojavom sladkorne bolezni tipa 1 v mladosti imajo v četrtem desetletju življenja dvajsetkrat večjo umrljivost in petnajst let krajšo življenjsko dobo kot njihovi zdravi vrstniki. Zapleti sladkorne bolezni so akutni (hipoglikemija, ketoacidoza) in kronični (retinopatija, nevropatija, angiopatija, nefropatija) (2). Med omenjenimi kroničnimi zapleti so nefropatije, pridružene srčno-žilnim boleznim, za bolnika zagotovo najusodnejše. Ledvični zapleti sladkorne bolezni so diabetična nefropatija, ateroskleroza renalnih arterij, pielonefritis in papilarna nekroza.

2 Diabetična nefropatija

Diabetična nefropatija (DN) je kronični ledvični zaplet, specifičen za sladkorno bolezen. Za napredovano bolezen je značilna močno zmanjšana glomerulna filtracija, edemi, hipertenzija, huda proteinurija ($> 3,5$ g/dan) in močno patološki biokemični kazalci ledvične odpovedi. Končna ledvična odpoved v zadnjem stadiju bolezni zahteva nadomestno zdravljenje. DN razvije 30–40 % bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 in 10–20 % bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 (3). 25–30 % dializnih bolnikov je sladkornih bolnikov (4). Gledano histološko, je DN skupek specifičnih morfoloških sprememb, ki se pojavijo predvsem v bazalni membrani glomerulov

Klinična biokemija pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni

(membrana se značilno odebeli) in mezangijumu. Dodatne morfološke spremembe v žilni steni aferentnih in eferentnih arteriol lahko povzročijo hudo ishemijo, tubulno atrofijo ter v zadnjem stadiju bolezni propad celotnega nefrona in razrast vezivnega tkiva (5). Omenjene morfološke spremembe so posledica neencimske glikolizacije prostih aaminskih skupin in motenj v sintezi ter razgradnji različnih beljakovin. V etiologiji bolezni ima pomembno vlogo tudi spremenjena znotrajledvična hemodinamika (6). S hiperglikemijo in hipervolemijo povzročen zvečan pretok krvi skozi ledvici povzroči vazodilatacijo aferentne in vazokonstrikcijo eferentne arteriole, porast intraglomerularnega tlaka, hiperfiltracijo, hiperplazijo glomerulnih kapilar ter hipertrofijo ledvične mase. Toda dolgotrajno zvišan intraglomerularni tlak poškoduje glomerule in povzroči napredovanje bolezni ter pešanje ledvične funkcije, ki jo lahko spremljamo kot upadanje hitrosti glomerulne filtracije (GFR) z različnimi standardnimi in rutinskimi biokemičnimi testi (merjenje očistka inulina, izotopov ali kreatinina, izračunani očistek kreatinina, merjenje serumske koncentracije cistatina). Novejše raziskave opozarjajo tudi na pomembno patofiziološko vlogo zvišane reabsorpcije natrija v proksimalnih tubulih (7) in na povezavo razvoja DN s subkliničnimi vnetnimi procesi (8).

Glede na funkcionalne in morfološke spremembe delimo DN na pet stadijev (2). Ker sta prva dva stadija bolezni reverzibilna, je zgodnje odkrivanje bolezni izjemno pomembno. DN lahko odkrijemo ali potrdimo z ledvično biopsijo. Zaradi invazivnosti posega in ker so začetne morfološke spremembe difuzne in nespecifične (5), se uveljavljajo novejša preiskave, kot so mikroalbuminurija, merjenje koncentracije označevalcev poškodovanega endotelija v plazmi (von Willebrandov faktor, endotelin-1) in renalna funkcijska rezerva. Omenjene alternativne preiskave pomenijo za klinično biokemijo velik znanstveni izziv in so že pomembna sestavina vsakdanje laboratorijske dejavnosti.

2.1 Mikroalbuminurija

Nekoč splošno veljavno prepričanje, da v primeru prisotne klinično zaznavne proteinurije lahko le še upočasnimo, ne moremo pa preprečiti napredovanja DN v končno ledvično odpoved, je privedlo strokovnjake v osemdesetih letih do prepričanja, da zgodnji porast albumina v urinu napoveduje napredovanje bolezni. Ker so bile zvišane koncentracije albumina v urinu pod mejo občutljivosti tedaj običajnih analiznih postopkov, so preiskavo imenovali mikroalbuminurija (MA). Sicer neustrezno ime preiskave se zaradi opisanih zgodovinskih okoliščin še danes ohranja. Današnje definicije MA podaja preglednica 1 (9, 10). MA je potrjena, če je izpolnjen eden od pogojev, predstavljenih v preglednici, v dveh od treh vzorcev urina, odvzetih v obdobju 3 do 6 mesecev (11). Ker je v začetnih raziskavah kar 80 % mikroalbuminuričnih bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 razvilo klinično pomembno proteinurijo v nadaljnjih 6 do 14 letih, se je za MA uveljavilo ime začetna DN. Novejše raziskave kažejo na precej nižjo napovedno vrednost MA za razvoj napredovane DN (12). Le 30 do 45 % mikroalbuminuričnih bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 razvije klinično izraženo proteinurijo v nadaljnjih 10 letih, 25–40 % bolnikov ostane mikroalbuminuričnih, pri ostalih, približno 30 %, pa se stanje izboljša (bolniki postanejo normoalbuminurični). Podobno sliko opažamo pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2. Danes tudi

vemo, da sta MA in histološka ocena prizadetosti glomerulov šibko povezani (13). Kljub temu MA ostaja najmočnejši in najširše uporabljen napovednik razvoja napredovane DN oziroma zgodnji označevalec že prisotne bolezni, zato se mora koncentracija albumina v urinu sladkornih bolnikov meriti redno po uveljavljenih priporočilih.

Ameriško združenje za diabetes (ADA) priporoča ugotavljanje prisotnosti MA enkrat letno, in sicer pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 prvič po petih letih trajanja bolezni in po končani puberteti ter pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 ob odkritju bolezni (preglednica 2) (11). V presejalne namene ugotavljanja prisotnosti MA zadošča kvalitativna ali polkvantitativna meritev koncentracije albumina v urinu. V primeru prisotne klinične albuminurije (preglednica 1) mora biti za ugotovitev diagnoze in spremljanje zdravljenja bolezni meritev kvantitativna (preglednica 2).

Ameriško združenje za klinično kemijo (AACC) ugotavlja, da večina kvalitativnih in polkvantitativnih postopkov zahtevanih analitičnih ciljev za zanesljivost rezultatov analize danes še ne izpolnjuje, tudi če jih izvaja izkušeno laboratorijsko osebje (preglednica 2). Diagnostična občutljivost je pogosto pod zahtevanimi 95 %. Tudi negativna napovedna vrednost testov je slaba in negativen rezultat testa bolezni pogosto ne izključuje. Nasprotno, večina kvantitativnih analiznih postopkov izpolnjuje zahtevan analitični cilj za ponovljivost dela, ki je določen na podlagi podatkov o biološki variabilnosti znotraj oseba ter izražen kot koeficient variacije < 15 % (1). Biološka variabilnost koncentracije albumina v urinu znotraj oseba je najnižja 31 % pri razmerju albumin/kreatinin v prvem jutranjem vzorcu urina zdravih ljudi, pri koncentraciji albumina v 24-urnem vzorcu urina sladkornih bolnikov pa lahko preseže tudi 80 % (14). Da bi zmanjšali njen pomemben vpliv na celotno variabilnost laboratorijskega rezultata, AACC za odkrivanje bolezni priporoča določanje razmerja albumin/kreatinin v prvem jutranjem vzorcu urina. Za spremljanje bolezni kvocient albumin/kreatinin še ni dovolj preizkušen, zato se v teh primerih še naprej priporoča merjenje hitrosti izločanja albumina v urinu. Meritev koncentracije albumina v 24-urnem vzorcu urina je smiselna le v primeru istočasne potrebe po določitvi kreatininskega očistka. Priložnostni vzorci urina so primerni le v presejalne namene (1). Izguba urina pri zbiranju, na primer pri opravljanju velike potrebe, prav tako daje prednost določanju razmerja albumin/kreatinin v prvem jutranjem vzorcu urina. Urin brez konzervansov ali stabilizatorjev je stabilen teden dni pri 4 °C (15) oziroma najmanj 160 dni pri –80 °C (16). Pri –20 °C pada koncentracija albumina za 0,27 % dnevno (16).

2.2 Von Willebrandov faktor

Sladkorna bolezen prizadene tudi aferentne in eferentne arteriole in ostalo renalno žilje, zato je logična alternativna pot zgodnjega odkrivanja DN določanje biokemičnih označevalcev poškodovanega endotelija, na primer merjenje aktivnosti von Willebrandovega faktorja (vWf) v plazmi. Endotelijske celice, ki so glavni vir vWf, ga izločajo bazalno, s konstantno hitrostjo, in regulatorno iz Weibel-Paladovih teles kot posledica farmakološkega učinka nenadno zvišanega trombina, fibrina ali vazopresina. Fiziološka vloga vWf je vezava faktorja VIII, kar omogoča adhezijo trombocitov in širjenje trombocitnega strdka na površini poškodovanega endotelija. Aktivnost vWf v plazmi je

Pregledni članki - Review Articles

zvišana pri sladkornih bolnikih z MA ali klinično izraženo DN (17, 18) in je premosorazmerna hitrosti izločanja albumina v urinu, še posebej pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 s pridruženo diabetično retinopatijo (19). Zvišana aktivnost v plazmi napoveduje pojav MA pri normoalbuminuričnih bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 (20) in pri klinično zdravih preiskovancih (21). Aktivnost vWf v plazmi je merljiva enostavno. Njena pomanjkljivost je slaba specifičnost, saj je zvišanje v plazmi lahko le posledica trenutnega vpliva različnih farmakoloških učinkov na endotelij ali poškodbe endotelija v ostalih neledvičnih organih.

2.3 Renalna funkcijska rezerva

Renalna funkcijska rezerva (RFR) je sposobnost ledvic zvečati intraglomerulni tlak in hitrost GFR s spreminjanjem žilne upornosti aferentnih in eferentnih arteriol. Ledvici s tem vzdržujeta stabilno notranje okolje organizma. RFR lahko določimo *in vivo* s funkcijskim testom, v katerem izmerimo relativni porast GFR kot odgovor na obremenitev bolnika s proteinskim obrokom ali infuzijo aminokislin. Bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 imajo znižano (okrnjeno, prizadeto) RFR (22, 23). Znižano RFR v začetnem obdobju diabetične mikroangiopatije pogosto spremlja glomerulna hiperfiltracija, ki povzroči nadaljnjo vazodilatacijo in poškodbo ledvičnih kapilar (24). Tudi naše izkušnje kažejo na povezanost znižane RFR z zvišano aktivnostjo vWf v plazmi bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 (25). RFR je torej občutljiv in organsko specifičen označevalec zgodnjih morfoloških sprememb ledvičnih arteriol, značilnih za pojav DN, ki tudi napoveduje napredovanje bolezni. Slaba stran preiskave je zahtevna in za bolnika obremenjujoča izvedba funkcijskega testa, nujna pa je tudi čimprejšnja standardizacija njegove izvedbe.

3 Ateroskleroza renalnih arterij

Ateroskleroza je generaliziran, vnetnodedgenerativen kroničen bolezenski proces, ki prizadene arterijsko žilno steno koronarnih, karotidnih, perifernih in renalnih arterij. Sladkorni bolniki imajo pogostejše dejavnike tveganja za razvoj ateroskleroze. Tveganje za akutne aterosklerotične zaplete je dva- do štirikrat večje kot pri njihovih zdravih vrstnikih (2). Akutni miokardni infarkt doživi dobra tretjina sladkornih bolnikov, starejših od 55 let. Ateroskleroza renalnih arterij lahko povzroči renovaskularno hipertenzijo, ishemično renalno bolezen s progresivno renalno insuficienco in je vzrok za končno ledvično odpoved pri 14 do 25 % dializnih bolnikov (26). Vloga klinične biokemije pri odkrivanju ateroskleroze renalnih arterij je majhna. Njegovo verjetnost ugotavljamo s kliničnim pregledom in različnimi funkcijskimi testi ter potrdimo z ultrazvočno preiskavo ledvic ali ledvično angiografijo. Novejše raziskave opozarjajo, da ateroskleroza poleg večjih renalnih arterij prizadene tudi drobno intrarenalno žilje in parenhimsko tkivo (27). Tudi v naši raziskavi smo našli povezavo med zmerno zvišano serumsko koncentracijo kreatinina in obsegom koronarne ateroskleroze ter zaključili, da je rahlo zvišana serumska koncentracija kreatinina pri koronarnih bolnikih pravzaprav biokemični označevalec aterosklerotične nefrovaskulopatije, ki je s koronarno aterosklerozo povezana preko skupnih dejavnikov tveganja za razvoj ateroskleroze (28).

4 Pielonefritis

Pielonefritis je bakterijska okužba ledvice ali ledvičnega meha. Pri sladkornih bolnikih je dva- do štirikrat pogostejši kot pri bolnikih brez sladkorne bolezni. Možni vzroki večje pogostnosti so glukozurija kot ugoden medij za rast bakterij, motnje v urodinamiki zaradi diskretne nevropatije avtonomnega živčevja in s hiperozmolarno ledvično središčno povzročena okrnjena fagocitoza. Pielonefritis ima dve tretjini hospitaliziranih bolnikov s sladkorno boleznijo (2, 29). Za akutni potek bolezni, ki lahko močno poslabša sladkorno bolezen, je značilna zvišana temperatura, ledvena bolečina ali bolečina v križu, slabost, bruhanje, levkocitoza, bakteriurija, niturija, levkocitni cilindri, pozitivna urikultura in hematurija v najbolj akutnem stanju bolezni. Kroničen pielonefritis pogosto poteka brezsimptomno in tudi urikultura ter sediment urina sta lahko brez posebnosti. Laboratorijska diagnostika ima pri odkrivanju bolezni pomembno vlogo. Osnovno analizo urina z reagentnimi trakovi, sediment urina in urikulturo izvajamo redno ter zaradi možnega brezsimptomnega poteka bolezni pri vseh bolnikih z velikim tveganjem.

5 Papilarna nekroza

Papilarna nekroza je nekroza papile, povzročena s ponavljajočimi okužbami sečil in pridruženo napredovano DN (2, 29). Nekrotično tkivo lahko povzroči akutno zaporo sečnih poti. Klinični znaki bolezni so ledvena bolečina ali bolečina v trebuhu, mrzlica, zvišana telesna temperatura, akutna ledvična odpoved z oligurijo ali anurijo, šok in diseminirana intravaskularna koagulacija. Laboratorijska diagnostika je v tem primeru manj pomembna, pomembnejša je na primer ultrazvočna preiskava ledvic. Kljub temu je smiselna določitev osnovne analize urina, sedimenta urina (z razliko od pielonefritisa je tu vedno prisotna hematurija, njen obseg pa je premosorazmeren velikosti nekrotičnega dela papile) ter meritev koncentracije fibrinskih razgradnih produktov v plazmi.

6 Sklep

Klinična biokemija ima pomembno vlogo pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni na vseh nivojih zdravstvene dejavnosti. Koncentracijo albumina v urinu sladkornih bolnikov merimo enkrat letno. Najprimernejši biološki vzorec je prvi jutranji urin. Priporočljiva je uporaba kvantitativnih analiznih postopkov in standardizacija koncentracije albumina na koncentracijo kreatinina v urinu. Nujno je intenzivno proučevanje in pogumnejše uvajanje novejših biokemičnih diagnostičnih in prognostičnih kazalcev DN v vsakdanjo laboratorijsko prakso, kot sta na primer vWf in RFR. Osnovno analizo urina z reagentnimi trakovi, sediment urina in urikulturo izvajamo redno ter zaradi možnega brezsimptomnega poteka ledvičnih zapletov sladkorne bolezni pri vseh bolnikih z velikim tveganjem. V primeru suma na papilarno nekrozo je smiselna meritev koncentracije fibrinskih razgradnih produktov v plazmi. Po ustaljenih priporočilih določamo tudi številne druge preiskave, kot na primer merjenje koncentracije lipidov in lipoproteinov v serumu (enkrat letno) ter ostalih označevalcev tveganja za razvoj ateroskleroze (C-reaktivni protein, homocistein), kazalce za oceno GFR (kreatinin, cistatin), če omenimo samo nekatere.

Klinična biokemija pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni

Preglednica 1. Različne definicije mikroalbuminurije glede na izločanje albumina v urinu.
Table 1. Criteria for interpreting urinary albumin excretion.

	Hitrost izločanja ^{1,2} (µg/min)	Dnevna količina ^{1,2} (mg/24 ur)	Koncentracija ¹ (g/mol kreatinina)	Koncentracija ² (g/mol kreatinina)	Koncentracija ² (mg/L urina)
Normoalbuminurija	<20	<30	<3,4	<2,7	<20
Mikroalbuminurija	20 – 200	30 – 300	3,4 – 34,0	2,7 – 22,6	20 – 200
Albuminurija	>200	>300	>34,0	>22,6	>200
	8-, 12- ali 24 -urni vzorec urina	24-urni vzorec urina	Prvi jutranji vzorec urina	Drugi jutranji vzorec urina	Drugi jutranji vzorec urina
¹ povzeto po literaturi 9; ² povzeto po literaturi 10;					

Preglednica 2. Priporočila in ugotovitve Ameriškega združenja za diabetes (ADA) in Ameriškega združenja za klinično kemijo (AACC).
Table 2. Recommendations and conclusions of American Diabetes Association (ADA) and American Association for Clinical Chemistry (AACC).

ADA	Pogostnost ugotavljanja prisotnosti mikroalbuminurije pri bolnikih s sladkorno boleznijo: enkrat letno, in sicer • pri sladkorni bolezni tipa 1 prvič po petih letih trajanja bolezni in po puberteti; • pri sladkorni bolezni tipa 2 od odkritja bolezni dalje. V presejalne namene ugotavljanja prisotnosti mikroalbuminurije zadoščajo kvalitativni ali polkvantitativni analizni postopki merjenja koncentracije albumina v urinu. V primeru prisotne klinične albuminurije je zahtevana kvantitativna meritev koncentracije albumina v urinu.
AACC	Večina kvalitativni in polkvantitativnih analiznih postopkov ni dovolj zanesljivih. Večina kvantitativnih analiznih postopkov je dovolj zanesljivih. Priporočila glede najprimernejšega biološkega vzorca in načina podajanja rezultatov so: • za odkrivanje bolezni razmerje albumin/kreatinin v prvem jutranjem vzorcu urina; • za spremljanje zdravljenja bolezni hitrost izločanja albumina v urin; • koncentracijo albumina v 24-urnem vzorcu urina merimo le v primeru istočasne potrebe po določitvi kreatininskega očistka; • priložnostne vzorce urina uporabljamo čim manj. Stabilnost bioloških vzorcev je teden dni pri 4°C (pomembni so vplivi matriksa).

7 Literatura

1. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2002; 48 (3): 436–472.

2. Mrevlje F. Bolezni presnove. In: Kocjančič A, Mrevlje F. Interna medicina. 1. izdaja. Ljubljana: EWO, DZS, 1993: 499–542.

3. Rahman M, Smith MC. Chronic renal insufficiency: a diagnostic and therapeutic approach. Arch Intern Med 1998; 158 (16): 1743–1752.

4. Dods RF. Diabetes mellitus. In: Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation. 3rd ed. St. Louis, Baltimore, Boston, Carlsbad, Chicago, Naples, New York, Philadelphia, Portland, London, Madrid, Mexico City, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, Wiesbaden: Mosby, 1996: 613–641.

5. Olsen S. The renal structural damage in patients with type 2 diabetes. In: Mogensen CE. Diabetic Nephropathy in type 2 diabetes. London: Science Press Ltd, 2002: 31–40.

6. Rudberg S, Persson B, Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy—an 8-year prospective study. Kidney Int 1992; 41 (4): 822–828.

7. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU et al. The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice. Nephrol Dial Transplant 2003; 18 (9): 1716–1725.

8. Lee SH, Lee TW, Ihm CG et al. Genetics of diabetic nephropathy in type 2 DM: candidate gene analysis for the pathogenic role of inflammation. Nephrology (Carlton) 2005; 10 (Suppl 2): S32–S36.

9. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care 2000; 23 (Suppl 1): S32–S42.

10. Boege F. Urinary proteins. In: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 382–400.

11. American Diabetes Association. Diabetes nephropathy. Diabetes Care 1999; 22 (Suppl 1): S66–S69.

Pregledni članki - Review Articles

12. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes*. 2000; 49 (9): 1399–1408.
13. Fioretto P, Steffes MW, Mauer M. Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria. *Diabetes*. 1994; 43 (11): 1358–1364.
14. Howey JE, Browning MC, Fraser CG. Biologic variation of urinary albumin: consequences for analysis, specimen collection, interpretation of results, and screening programs. *Am J Kidney Dis* 1989; 13 (1): 35–37.
15. Collins AC, Sethi M, MacDonald FA et al. Storage temperature and differing methods of sample preparation in the measurement of urinary albumin. *Diabetologia* 1993; 36 (10): 993–997.
16. MacNeil ML, Mueller PW, Caudill SP et al. Considerations when measuring urinary albumin: precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage. *Clin Chem* 1991; 37 (12): 2120–2123.
17. Zimmermann J, Schramm L, Wanner C et al. Hemorheology, plasma protein composition and von Willebrand factor in type I diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* 1996; 46 (4): 230–236.
18. Vischer UM, Emeis JJ, Bilo HJ et al. von Willebrand factor (vWf) as a plasma marker of endothelial activation in diabetes: improved reliability with parallel determination of the vWf propeptide(vWf:AgII). *Thromb Haemost* 1998; 80 (6): 1002–1007.
19. Greaves M, Malia RG, Goodfellow K et al. Fibrinogen and von Willebrand factor in IDDM: relationships to lipid vascular risk factors, blood pressure, glycaemic control and urinary albumin excretion rate: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1997; 40 (6): 698–705.
20. Stehouwer CD, Fischer HR, van Kuijk AW et al. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 1995; 44 (5): 561–564.
21. Clausen P, Feldt-Rasmussen B, Jensen G et al. Endothelial haemostatic factors are associated with progression of urinary albumin excretion in clinically healthy subjects: a 4-year prospective study. *Clin Sci (Lond)* 1999; 97 (1): 37–43.
22. Sackmann H, Tran-Van T, Tack I et al. Contrasting renal functional reserve in very long-term Type I diabetic patients with and without nephropathy. *Diabetologia* 2000; 43 (2): 227–230.
23. Sackmann H, Tran-Van T, Tack I et al. Renal functional reserve in IDDM patients. *Diabetologia* 1998; 41 (1): 86–93.
24. Zatz R, Brenner BM. Pathogenesis of diabetic microangiopathy. The hemodynamic view. *Am J Med*. 1986; 80 (3): 443–453.
25. Zaletel J, Cerne D, Lenart K, Zitta S, Jurgens G, Estelberger W, Kocijancic A. Renal functional reserve in patients with Type 1 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr*. 2004 Apr 30;116 (7-8): 246–251.
26. Scoble JE. Atherosclerotic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1999; 71: S106–109.
27. Tracy RE. Histologic characteristics of coronary artery in relation to the renovasculopathies of hypertension. *Ann Diagn Pathol* 1998; 2 (3): 159–166.
28. Cerne D, Kaplan-Pavlovic S, Kranjec I et al. Mildly elevated serum creatinine concentration correlates with the extent of coronary atherosclerosis. *Ren Fail* 2000; 22 (6): 799–808.
29. Kveder R. Bolezni Ledvic. In: Kocjančič A, Mrevlje F. *Interna medicina*. 1. izdaja. Ljubljana: EWO, DZS, 1993: 499–542.

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze - obetajoče farmakološke tarče

17 β -hydroxysteroid dehydrogenases - potential pharmacological targets

Katja Kristan, Tea Lanišnik Rižner

POVZETEK: 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD) katalizirajo oksidacijo ali redukcijo estrogenov in androgenov na mestu 17 steroidnega skeleta in s tem uravnavajo aktivnost steroidnih hormonov. Do danes je bilo pri človeku odkritih že 11 različnih tipov 17 β -HSD. Nepravilno delovanje teh encimov vodi do motenj v razvoju, do bolezni centralnega živčnega sistema, ali v razvoj številnih rakavih obolenj. Ta članek opisuje vse znane človeške 17 β -HSD, njihov pomen in vpletenost v razvoj bolezni ter predstavlja nekatere inhibitorje posameznih izooblik.

Ključne besede: 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze, androgeni, estrogeni, inhibitorji

ABSTRACT: The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) have important roles in the regulation of steroid hormone actions through their catalysis of the oxidation or reduction of estrogens and androgens at position 17. To date, 11 different human 17 β -HSDs have been described. Dysfunction of the human 17 β -HSDs results in reproduction disorders and neuronal diseases, and in the development of hormone-dependent cancers. This review summarizes current knowledge on the medical implications of the 17 β -HSDs and presents some representative inhibitors of the different 17 β -HSD isozymes.

Key words: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases, androgens, estrogens, inhibitors

1 Uvod

Moški ter ženski spolni hormoni (androgeni oz. estrogeni) so odgovorni za spolno diferenciacijo ter razvoj spolnih organov že pri zarodku, njihova koncentracija pa močno naraste v času pubertete. Androgeni so takrat odgovorni za spermatogenezo, rast in razvoj, poraščenost, spremembo glasu ter za libido moških, estrogeni pa za telesne spremembe pri ženskah, povečanje prsi, pojav menstruacije. S spolnimi hormoni je povezanih tudi 40 % vseh rakavih obolenj, gre namreč za od hormonov odvisne tipe rakov, kot so rak dojke, prostate, jajčnikov, maternice (1, 2) ter ostale od androgenov in estrogenov odvisne bolezni, kot so npr. benigna hiperplazija prostate, akne in plešavost.

1.1 Biosinteza androgenov in estrogenov v klasičnih steroidogenih tkivih

Pri moških biosinteza androgenov poteka v testisih, v Leydigovih celicah, v manjši količini pa se sintetizirajo tudi v zoni *reticularis* nadledvične žleze. Pri ženskah se androgeni sintetizirajo v veliko manjši količini, in sicer v nadledvični žlezi, v jajčnikih (*Vesicular follicles*, *Corpus luteum*) ter v placenti v času nosečnosti. Encime biosinteze aktivira luteinizirajoči hormon, koncentracija le-tega močno naraste med puberteto. Androgeni, vključno s testosteronom in 5 α -

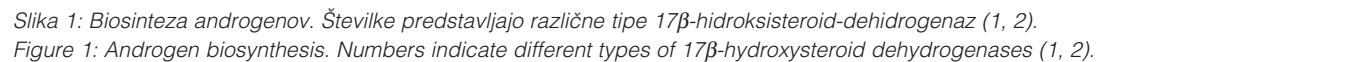
dihidrottestosteronom (DHT), ki imata največjo afiniteto do androgenih receptorjev, se sintetizirajo preko pregnenolona (slika 1) (1).

Sintezo estrogenov aktivirata luteinizirajoči ter folikel stimulirajoči hormon. Estron in aktivni ženski spolni hormon estradiol nastaneta iz androgenov po oksidativni odstranitvi C19-metilne skupine ter po sledeči aromatizaciji obroča A. Aromatizacija poteka v celicah granulozе jajčnikov, nekaj tudi v skorji nadledvične žleze (za ženske pred menopavzo manjšega pomena) ter v Sertolijevih celicah mod (slika 2) (1).

Steroidni hormoni so močno lipofilni, zato se po krvi prenašajo v obliki sulfata (dehidroepiandrosteron (DHEA), estron), ali pa se vežejo na globuline za vezavo spolnih hormonov (testosteron, estradiol) ali na albumin. V ciljnih organih se sulfatni del odstrani s steroid-sulfatazo (1, 3).

1.2 Biosinteza androgenov in estrogenov v perifernih tkivih

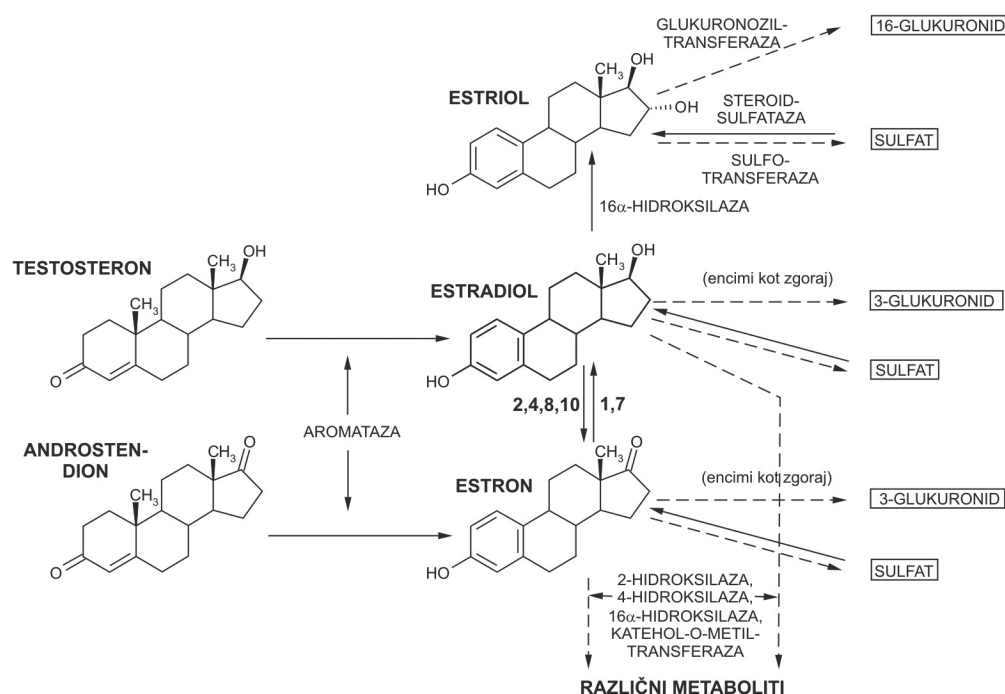
Leta 1988 so odkrili, da sinteza spolnih hormonov ne poteka samo v klasičnih steroidogenih tkivih, pač pa tudi lokalno v perifernih tarčnih tkivih, kjer hormoni tudi delujejo (intrakrlna sinteza) (4, 5). Tam se spolni hormoni sintetizirajo iz neaktivnih prekurzorjev, DHEA, DHEA-sulfata, androstendiona in estron-sulfata (2, 3). Koncentraciji DHEA in DHEA-sulfata v plazmi sta pri odraslih moških in ženskah 100–500-krat višji



SIM se že uporabljajo za zdravljenje raka na dojki. To so inhibitorji aromataze formestan, vorozol, letrozol, anastrozol in eksamestan (6). Znano je, da steroid-sulfatazo inhibirajo tibolon ter njena 3 α - in 3 β -hidroksi derivata. Tibolon predpisujejo za zdravljenje pomenopavzalnih težav ter za zdravljenje in preprečitev pomenopavzalne osteoporoze. V visoki koncentraciji steroid-sulfatazo inhibira tudi medrogeston, sintetični pregnanski derivat, ki se uporablja pri pomanjkanju progesterona (9). Za zdravljenje moške plešavosti (androgena alopecija), benigne hiperplazije ter raka prostate pa se uporablja finasterid, ki je inhibitor 5 α -reduktaze tipa 2. Zanimiva skupina potencialnih zdravilnih učinkovin so tudi inhibitorji 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz, ki se v terapiji še ne uporabljajo.

Inhibitorji encimov, ki so vključeni v biosintezo oziroma aktivacijo steroidnih hormonov, so pomembna skupina zdravilnih učinkovin za zdravljenje vseh od androgenov in estrogenov odvisnih bolezni. Med najpomembnejše encime uvrščamo aromatazo, steroid-sulfatazo ter

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 2: Biosinteza estrogenov. Številke predstavljajo različne tipe 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz (1, 2).

Figure 2: Estrogen biosynthesis. Numbers indicate different types of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (1, 2).

2 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze in inhibitorji

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD) stereospecifično in reverzibilno pretvarjajo neaktivne 17-ketosteroide v aktivne 17 β -hidroksisteroide v prisotnosti koencima. Uvrščamo jih med NAD⁺/NADPH odvisne oksidoreduktaze (10). V steroidogenih tkivih katalizirajo zadnjo stopnjo sinteze androgenov in estrogenov, v perifernih tkivih, vključno s tarčnimi tkivi steroidnih hormonov, pa delujejo kot molekularna stikala, saj pretvarjajo učinkovite steroidne hormone (testosteron, DHT, estradiol) v neaktivne metabolite (androstendion, 5 α -androstan-3,17-dion, estron), s tem pa uravnavajo količino hormonov, ki se vežejo na jedrne receptorje (predreceptorska, intrakrinska regulacija) (8, 11). Do danes je bilo pri človeku odkritih že 11 različnih tipov 17 β -HSD, ki so oštevilčeni kronološko po času odkritja. Tipa 6 in 9 pri človeku še niso našli, znana je podganja 17 β -HSD tip 6 ter mišja 17 β -HSD tip 9 (12).

2.1 17 β -HSD tip 1

17 β -HSD tip 1 je citosolni encim, ki je bil prvič opisan in delno izoliran že leta 1958 (13). Encim je odgovoren za biosintezo estradiola v jajčnikih ter v placenti, od koder se nato izloči v kri. Tip 1 pretvarja estron v estradiol tudi v dojkah (lokalno v tarčnem tkivu), kjer estradiol deluje (11, 14, 15). Znane so tudi kristalne strukture encima s številnimi inhibitorji (16).

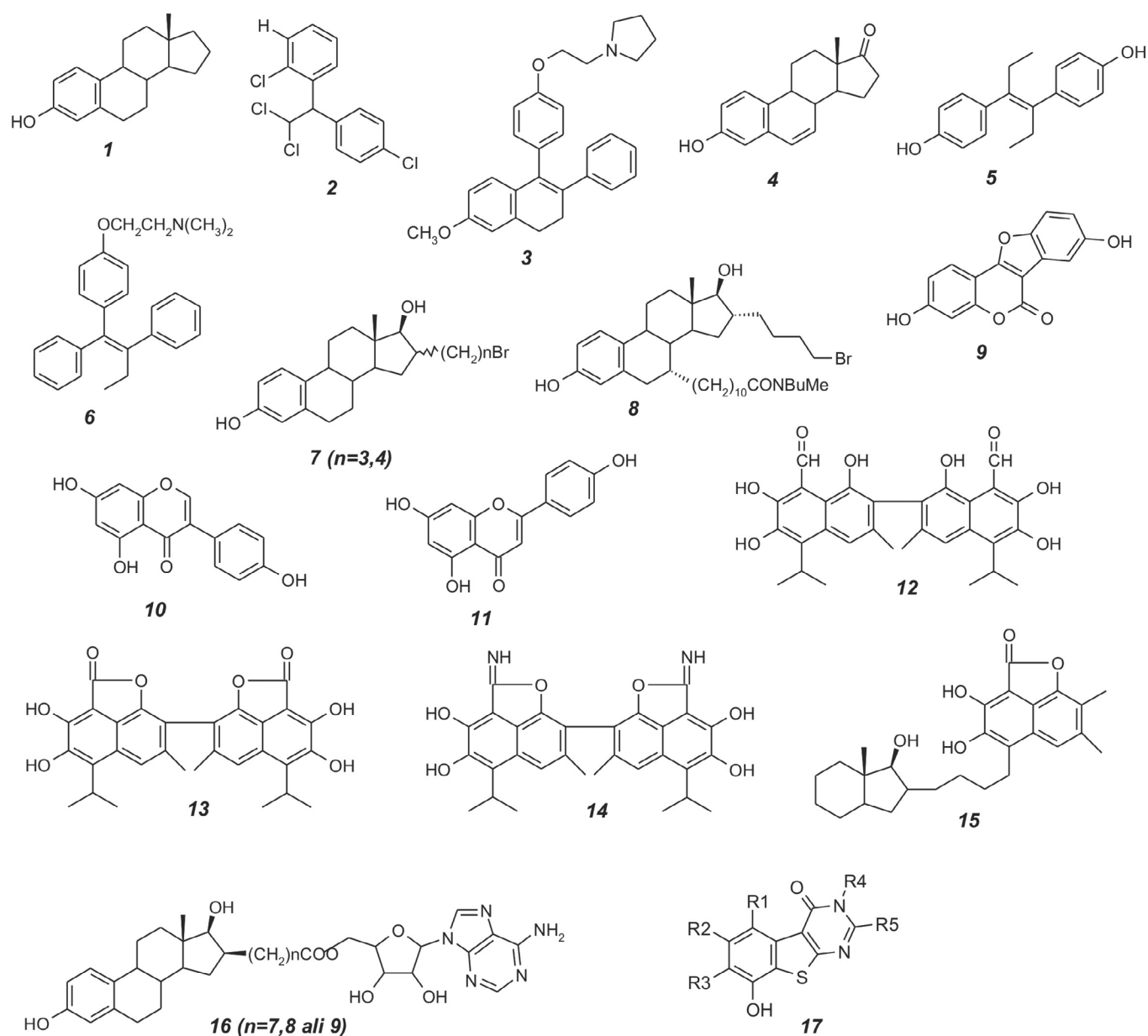
Ugotovili so, da se izražanje gena za tip 1 zelo poveča v rakavih celicah dojke, kar vodi k povečani od estrogenov odvisni proliferaciji celic (15). Zaradi navedenega je 17 β -HSD tip 1 zelo zanimiva farmakološka tarča.

Inhibitorji

Prvi znani inhibitorji so bili derivati estrona in estradiola, kasneje pa tudi spojine z nesteroidnim skeletom. Najboljši inhibitorji iz prvega obdobja so 17-dezoksi-estradiol (**1**), spojini **2** in **3** ter ekvilin (**4**) s *K_i* vrednostmi pod 1 μ M (slika 3). Kot dober inhibitor tipa 1 se je izkazal tudi nesteroidni sintezni dietilstilbestrol (**5**) (14). Kasneje so sintetizirali veliko število spojin z namenom, da bi lažje ugotovili zgradbo aktivnega mesta 17 β -HSD tipa 1. Gre za analoge naravnega substrata estrona z zelo reaktivno (npr. bromoacetoksi) skupino, ki se je kovalentno povezala z aminokislinami, odgovornimi za vezavo substrata. Kot inhibitorji so se izkazali tudi nekateri diketoni, derivati 2,3-butan-2,3-diona in 2,4-pentandiona, ter različni estronski derivati s pirazolom in izoksazolom, pripetimi na D-obroč steroidnega skeleta. Vse te sintetizirane spojine so se izkazale kot nizko selektivne, kar preprečuje njihovo uporabo v bolj kompleksnih bioloških sistemih (14).

Encim šibko inhibirajo tamoksifen (**6**) in njegova metabolita 4-hidroksin in desmetiltamoksifen. Dobri inhibitorji 17 β -HSD tipa 1 so tudi nekateri progestini (nomegestolacetat, medrogeston, tibolon in njegovi metaboliti), ki inhibirajo še steroid sulfatazo (IC₅₀ 0,5–35 μ M ob 5 nM koncentraciji substrata) (14). Zelo dobri inhibitorji tipa 1 so derivati estradiola s stransko verigo na mestih 17 α ali 16 α z IC₅₀ vrednostmi pod 1 μ M (2–6 nM substrat). Ugotovili so, da je najprimernejša dolži-

Pregledni članki - Review Articles



Slika 3: Inhibitorji 17β-HSD tipa 1
Figure 3: Inhibitors of 17β-HSD type 1

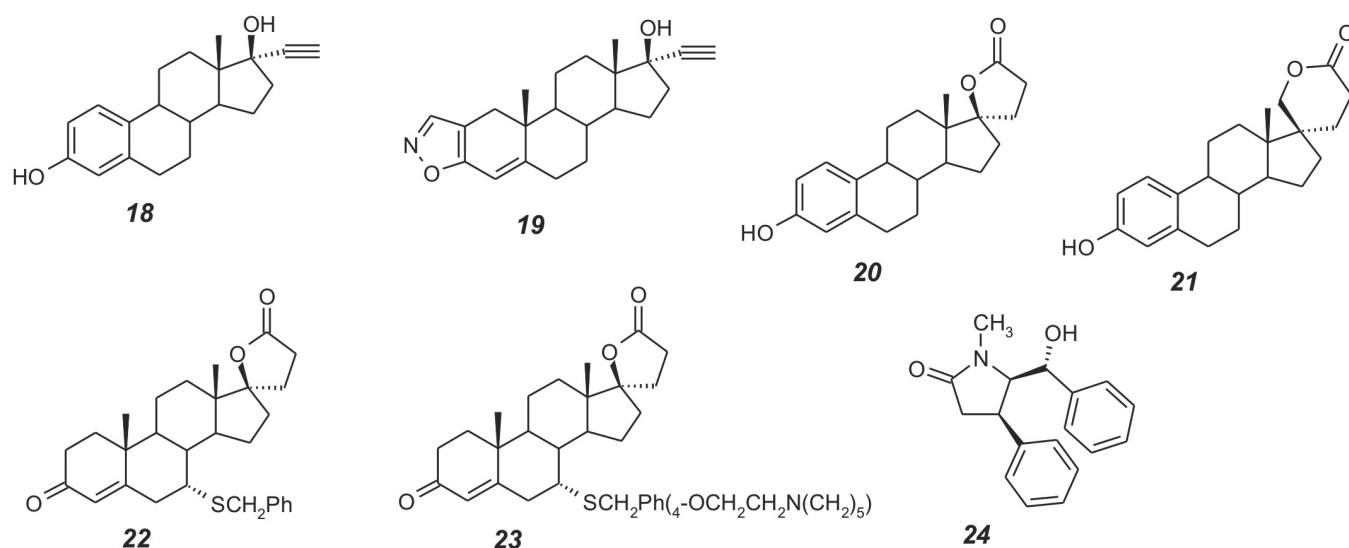
na stranske verige 3 oz. 4 ogljikove atome, za inhibicijo pa je ključen substituent na 16α položaju (**7**). Ker so spojine agonisti estrogenskih receptorjev, so uvedli dodatno verigo na mestu 7α (**8**). Te spojine estrogene aktivnosti niso imele, je pa hkrati močno padla njihova inhibitorna učinkovitost (IC_{50} 16 μM; 3,6 nM substrat) (**14**).

Epidemiološke študije so pokazale, da lahko fitoestrogeni vplivajo na razvoj raka na dojki, zato so nadaljevali s študijami na predreceptorski ravni. Fitoestrogeni, ki jih razdelimo v flavonoide (flavoni, flavanoni in izoflavoni), kumestane in lignane, so rastlinske nesteroidne spojine

z estrogeno aktivnostjo. Kot najboljši inhibitor 17β-HSD tipa 1 se je izkazal kumestan kumestrol (**9**), dobri inhibitorji pa so tudi flavoni in izoflavoni, hidroksilirani na mestih 4', 5 in 7 obročev A in B, npr. apigenin (**10**) in genistein (**11**) (**17**). Študija inhibicije encima s fitoestrogeni je prispevala tudi k iskanju novih spojin vodnic pri nadaljnjem razvoju inhibitorjev tipa 1 (**18**).

Po odkritju, da naravna spojina gosipol (**12**), polifenolni binaftil iz bombaževih semen, inhibira vse izoencime sorodne človeške laktatdehidrogenaze, so sintetizirali več njenih analogov in jih testirali kot

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 4: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 2
Figure 4: Inhibitors of 17 β -HSD type 2

potencialne inhibitorje 17 β -HSD tipa 1. Za najboljša inhibitorja sta se izkazala gosilolakton (**13**) ter gosiloiminolakton (**14**) (K_i 2,2 in 4,3 μ M), ki se glede na rezultate sidranja vežeta v mesto za vezavo koencima (19). Sintetizirane so bile tudi spojine, ki bi se hkrati vezale v mesto za vezavo substrata in koencima, t. i. panaktivni inhibitor. Prvi takšen primer je hemigosilolakton, ki predstavlja polovico molekule gosipola, ki je preko butilnega distančnika povezana z mimetikom obročev D in C estradiola (**15**) (19). Drugi takšen primer pa so spojine **16** z različno dolgo vmesno verigo. Za optimalno se je izkazala dolžina osmih CH₂ skupin (K_i 3,0 μ M) (**14**).

Kar ponuja se vprašanje, ali je sinteza spojin, ki se vežejo v mesto za vezavo koencima, ki je podobno pri vseh encimih iste proteinske družine, smiselna oz. ali sploh lahko pričakujemo selektivne inhibitorje. Kot argument za sintezo tovrstnih spojin avtorji navajajo inhibitorje kinaz, ki se vežejo v mesto za vezavo ATP, a so selektivni za posamezne tipe in so že na tržišču. Prav tako so tudi različni analogi gosipola z različnimi substituenti na mestih 4 in 7 pokazali več kot 200-kratno selektivnost za različne tipe visoko homolognih (84–89 %) človeških laktat-dehidrogenaz (19). Zadnja skupina testiranih inhibitorjev tipa 1 so različni pirimidinonski derivati (**17**) (20).

2.2 17 β -HSD tip 2

Nasprotno od 17 β -HSD tipa 1 mikrosomalni 17 β -HSD tip 2 oksidira androgene in estrogene v njihovo neaktivno obliko. Na ta način omejuje količino aktivnih spolnih hormonov v obtoku ter ščiti tarčna tkiva. Zaradi varovalne vloge se encim nahaja v številnih tkivih; v dojkah, placenti, maternici, jetrih ter tankem črevesju, v manjši meri pa tudi v prostati, ledvicah, trebušni slinavki in debelem črevesju (21). Tipično ga najdemo v epitelijskih celicah, kot so epitelijske celice gastrointestinalnega in urinarnega trakta. Znano je, da zmanjšano izražanje gena za 17 β -HSD tip 2 vodi do raka na črevesju, prostati in dojkah (15, 22). V placenti tip 2 verjetno omejuje dostop plodovih androgen-

ov do materinih tkiv in dostop materinih estrogenov v plod ter deluje kot pregrada med plodom in materjo (15).

Zaradi varovalne lastnosti inhibitorji tega encima niso zanimivi z vidika zdravljenja rakavih obolenj. Prevelika aktivnost encima pa lahko preveč zniža koncentracijo aktivnih estrogenov, ki so naravni zaviralci resorpcije kosti, zato bi se inhibitorji tipa 2 lahko uporabljali za zdravljenje osteoporoze pri ženskah v času po menopavzi (23).

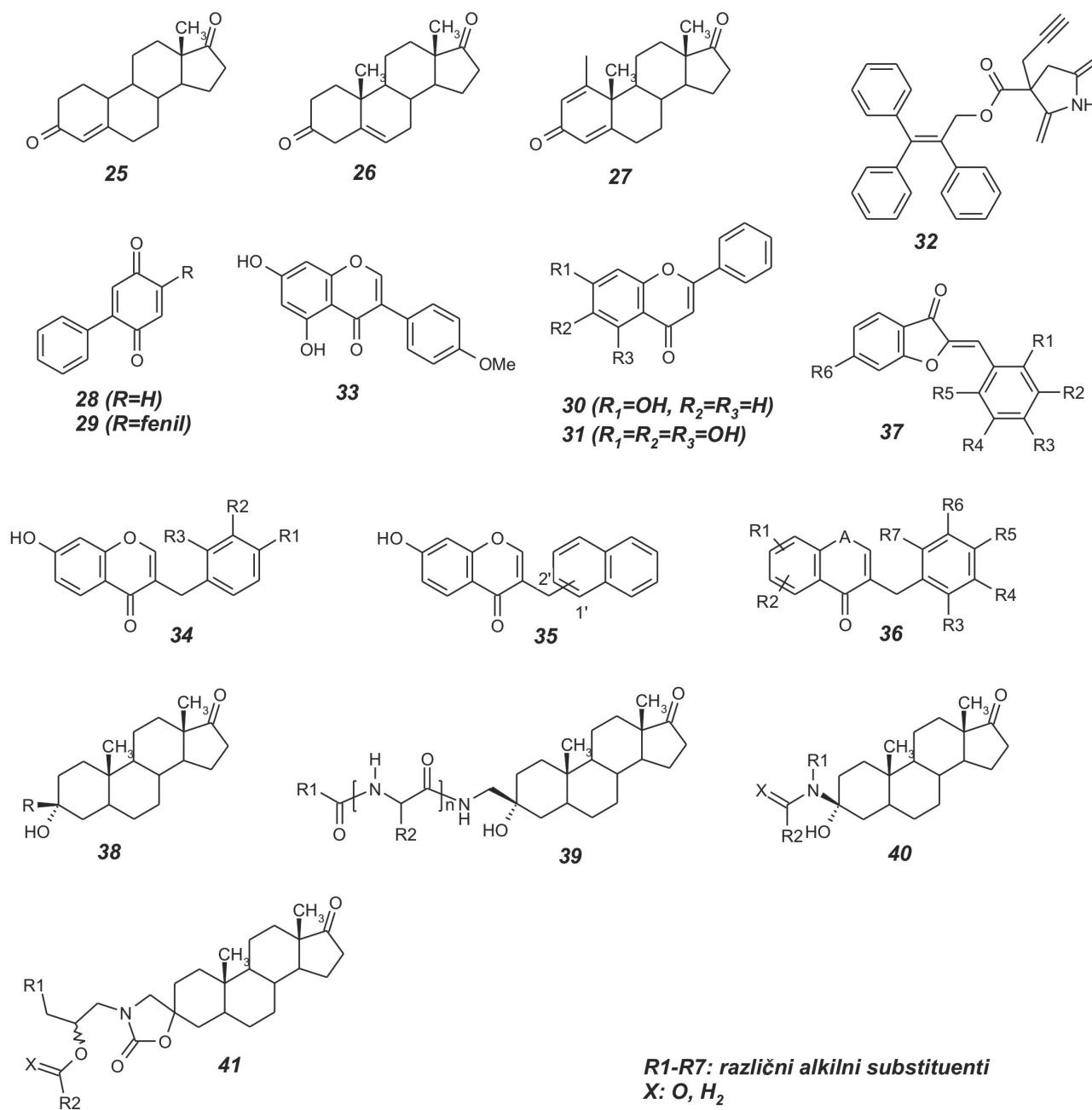
Inhibitorji

Prvi inhibitorji 17 β -HSD tipa 2 so bili objavljeni leta 1984. Najnižji K_i vrednosti sta imeli spojini 17 α -etinil-estradiol (**18**) in danazol (**19**) (K_i 0,3 in 0,6 μ M); prva spojina je hkrati agonist estrogenskega receptorja, druga pa ima androgeno aktivnost ter je šibek inhibitor steroid-sulfataze (14) (slika 4).

Testirali so tudi učinek 16 α - in 17 α -derivatov estradiola, ki so jih sintetizirali kot inhibitorje tipa 1. Ugotovili so, da le spiro- γ -laktone-estradiola (**20**) inhibira delovanje 17 β -HSD tipa 2. Ta spojina je služila kot spojina vodnica. Narejenih je bilo nekaj modifikacij, med katerimi je tudi substitucija OH-skupine, sprememba stereokemije laktone, sprememba položaja laktone, različne velikosti laktonekega obroča. Kot najboljši inhibitor se je izkazala spojina **21** (K_i 2 μ M), ki selektivno inhibira tipa 2 in 5, ne pa tipov 1, 3 in 7. Spojina ima tudi zmerno estrogeno aktivnost (14, 21).

Ker tip 2 katalizira oksidacijo estrogenov in androgenov, je bila smiselna sinteza tudi takšnih laktonev, ki imajo C19-metilno skupino. Hkrati so bile narejene tudi modifikacije A in B obroča steroidnega skeleta. Med vsemi C19 steroidnimi derivati je najboljši inhibitor spojina **22** (IC₅₀ 0,42 μ M; 3–5 nM substrat), spojina **23** (IC₅₀ 0,7 μ M; 3–5 nM substrat) pa se kot edina ni vezala na vse testirane receptorje (androgenske, estrogenske, progesteronske, glukokortikoidne). Spojina **23** tudi ni inhibitor 17 β -HSD tipov 1, 3 in 5 niti aromataze (14).

Pregledni članki - Review Articles



Slika 5: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 3
 Figure 5: Inhibitors of 17 β -HSD type 3

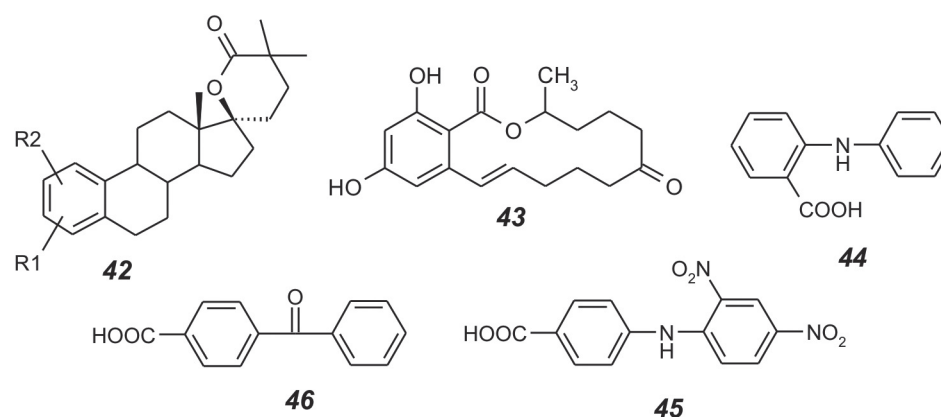
Nedavno so bili kot potencialni inhibitorji tipa 2 sintetizirani 4,5-disubstituirani cis-pirolidinoni (**24**), analogi naravne spojine klavsenamid iz drevesa *Clausena lansium* (23). Spojine so trenutno v fazi testiranja.

2.3 17 β -HSD tip 3

Tip 3 je mikrosomalni encim, ki ga najdemo izključno v Leydigovih celicah testisov in je odgovoren za biosintezo testosterona. Encim zago-

tavlja 50 % aktivnih androgenov, ki delujejo v prostati in drugje po telesu (2). Ravno zaradi tega je izredno zanimiva tarča za zdravljenje vseh od androgenov odvisnih bolezni (24). Ker ga najdemo izključno v testisih, je zanimiv tudi z vidika blokade spermatogeneze, saj bi se inhibitorji lahko uporabljali kot moški kontraceptivi (14). Mutacije na genu za 17 β -HSD tip 3, ki onemogočijo pravilno delovanje encima, so odgovorne za nastanek pseudohermafroditizma (25–27).

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 6: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 5
Figure 6: Inhibitors of 17 β -HSD type 5

Inhibitorji

Prve študije inhibicije so pokazale, da je za inhibicijo ključni steroidni skelet s karbnilno skupino na mestu 17 ter nearomatskim A-obročem. Izmed takrat 20 sintetiziranih spojin sta se kot najbolj aktivna izkazala 4-estren-3,17-dion (**25**) (K_i 2,4 μ M) in 5-androsten-3,17-dion (**26**) (K_i 6,8 μ M) (14) (slika 5).

Leta 1993 so Lombardo in sodelavci ugotovili, da je zelo dober inhibitor tipa 3 tudi atamestan (**27**), že prej znani ireverzibilni inhibitor aromataze (14). Kot potencialne inhibitorje so kasneje testirali nekatere zdravilne učinkovine. Pokazal se je inhibični učinek gentamicina ter S-petazina. Na padec serumske koncentracije testosterona vplivajo tudi spojine iz sladkega korena (14). Leta 2001 so Le Lain in sodelavci testirali 18 nesteroidnih spojin (p-benzokinoni, flavoni, izoflavoni, derivati trifeniletena). Najboljši inhibitorji človeškega 17 β -HSD tipa 3 so bili 2,5-difenil-p-benzokinon (**29**), fenil-p-kinon (**28**), 7-hidroksiflavin (**30**), derivat trifeniletena (**33**), baikalein (**31**) ter biokanin A (**33**). Te spojine niso učinkoviti inhibitorji (IC_{50} območje od 3 do 10 μ M, 2 μ M substrat), vendar so rezultati, še posebej pomen OH skupin različnih flavonov, pripomogli k načrtovanju novih inhibitorjev (14).

Istega leta so Smith in ostali patentirali vrsto spojin (**34**, **35**), ki so strukturno podobne biokaninu A. Najboljši inhibitorji so spojine s F, Cl ali Br na mestu R_1 (IC_{50} od 1,8 do 8,3 μ M; 2 μ M substrat). Kasneje so patentirali še več spojin s splošnima formulama **36** in **37**, ki inhibirajo 17 β -HSD in naj bi se uporabljale za preventivo in/ali zdravljenje različnih bolezni, povezanih z androgeni in estrogeni (14).

Študija različnih steroidov je vodila k temu, da so Poirier in ostali leta 1995 izbrali androsteron kot osnovni skelet za razvoj inhibitorjev tipa 3. Za dobre inhibitorje 17 β -HSD tipa 3 so se izkazali sintetizirani derivati s substituenti na mestu 3 β (**37**), najboljše skupine na tem mestu pa fenilmetil, cikloheksil, propil in sec-butil (IC_{50} 57–73 nM; 0,05–0,1 μ M substrat). Te spojine niso inhibirale tipov 1 in 5, imajo pa androgeno aktivnost.

Leta 2001 so Maltais in sodelavci skušali poiskati spojine, ki ne bi imele androgene aktivnosti. Naredili so serijo spojin z osnovnim skeletom **38**, najboljši inhibitor ($n=2$, R_x =fenilmetil, R_y =heksil) z IC_{50} 227 nM pri koncentraciji 0,1 μ M nima androgene aktivnosti.

Ista skupina je kasneje sintetizirala tudi različne derivate 3 β -amidometil-androsterona (**39**), ki so še boljši inhibitorji (IC_{50} 35–85 nM; 0,05 μ M substrat). Najboljši inhibitor ($X=O$, R_1 =oktil, R_2 =ciklopropil) ne kaže nobene androgene aktivnosti pri koncentracijah 0,1 μ M in 1 μ M (14).

Da bi pripravili bolj rigidne molekule, so naredili še vrsto derivatov spojine **41**. Najboljši inhibitor ($X=O$, R_1 =morfolino, R_2 =ciklopentiletil; IC_{50} 74 nM; 0,05 μ M substrat) ima zelo šibko androgeno aktivnost (14).

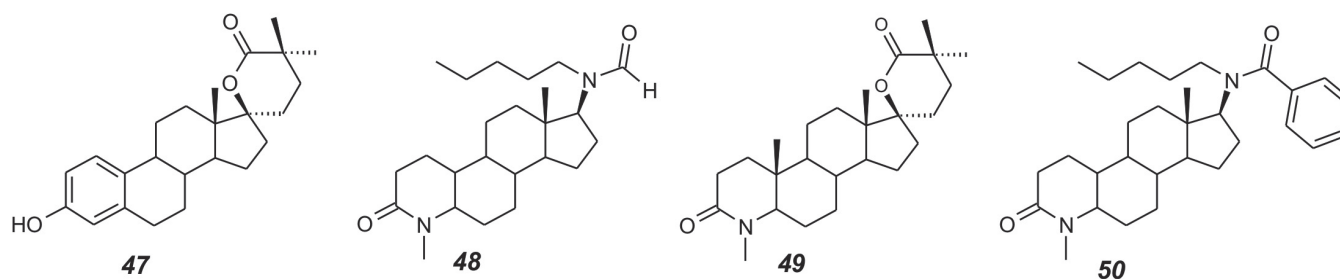
2.4 17 β -HSD tip 4

17 β -HSD tip 4 je multifunkcionalni peroksisomalni encim. N-terminalni del ima 17 β -HSD ter 3-hidroksiacyl-CoA dehidrogenazno aktivnost in katalizira oksidacije estradiola, 5-androsten-3 β ,17 β -diola ter 3-hidroksiacyl-CoA. Centralni del encima ima enoil-CoA hidratazno aktivnost, C-terminalni del proteina pa sodeluje pri prenosu 7-dehidroholesterolu in fosfatidilholina med membranami. Encim najdemo v vseh sesalskih tkivih, a je v nekaterih tkivih, kot so možgani, maternica ter pljuča, izražen samo v specifičnih celicah, kot so Purkynjeve celice ali luminalni epitelij (28). Njegova naloga je podobna nalogi 17 β -HSD tipa 2 – ščiti tkiva pred preveliko količino aktivnih spolnih hormonov (2). Znano je, da so mutacije na genu za 17 β -HSD tip 4 odgovorne za nastanek Zellwegerjevega sindroma (29). Nedavno so ugotovili, da se na 17 β -HSD tip 4 veže vitamin K in zniža koncentracijo intracelularnega estradiola. Natančni mehanizem tega delovanja še ni znan (30). Študije inhibicije na tem encimu še niso bile narejene, znana pa je kristalna struktura (16).

2.5 17 β -HSD tip 5

17 β -HSD tip 5 ali aldo-keto reduktaza 1C3 (AKR1C3) je citosolni encim in pretvarja androstendion v testosteron, DHT v 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol ter tudi estron v estradiol (31). Človeški encim deluje tudi kot 3 α -HSD, 20 α -HSD in dihidrodiol-dehidrogenaza, njegov substrat pa naj bi bil tudi prostaglandin D_2 (32). Z uporabo protiteles so ga lokalizirali v prostati, jetrih, nadledvični žlezi, testisih, endometriju, jajčnikih, mlečnih žlezah ter v ženskem maščobnem tkivu (32). Izražanje gena za ta encim je povečano pri raku prostate (15, 32) ter

Pregledni članki - Review Articles



Slika 7: Inhibitorji 17 β -HSD tipa 7
Figure 7: Inhibitors of 17 β -HSD type 7

v podkožnem (subkutanem) maščobnem tkivu pri ženskah s povečanim indeksom telesne mase (33). Takšne ženske imajo posledično povečano koncentracijo androgenov v krvi, hiperandrogenemija pa je tipični znak sindroma policističnih jajčnikov (33). Znana je kristalna struktura encima (16).

Inhibitorji

Kot prvi inhibitorji tipa 5 so bili patentirani spirolaktoni s splošno formulo **42** (slika 6). Te spojine tudi ne inhibirajo tipov 1, 2 in 3 ter 3 α -HSD tipa 1 in 3 (IC₅₀ od 2 do 54 nM, 100 nM substrat) (14). Encim inhibirajo tudi nekateri fitoestrogeni in ostale naravne substance. Najboljši inhibitorji 17 β -HSD tipa 5 so zearalenon (**43**), kumestrol (**9**), kvercetin ter biokanin A (**33**) (IC₅₀ območje od 4 do 14 μ M; 30 nM substrat) (34).

Kasneje so odkrili, da encim dobro inhibira nesteroidna protivnetna učinkovina mefenaminska kislina, zato so sintetizirali vrsto spojin na osnovi N-fenilantranilne kisline (**44**). Dva dobra inhibitorja, ki ne inhibirata AKR1C1, AKR1C2 ter ciklooksigenazi (COX) 1 in 2, sta spojini **45** in **46** s *K_i* vrednostmi 0,38 oziroma 1,9 μ M (31).

2.6 17 β -HSD tip 7

Tip 7 je membranski encim in reducira estron v estradiol, v manjši količini tudi inaktivira DHT v 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol. Našli so ga v maternici, testisih, placenti, mlečnih žlezah, ledvicah, priželjcu in prostati (15, 35). Natančnejši pomen tega encima še ni znan, glede na njegovo razširjenost v različnih tkivih pa verjetno deluje kot intrakrini regulator steroidnega metabolizma in povečuje koncentracijo estrogenov v okolici. Pomen estradiola za razvoj od estrogenov odvisnega raka dojke, jajčnikov ter maternice je dobro znan, zato je smiselna tudi sinteza inhibitorjev encima 17 β -HSD tip 7, ki bi v teh tkivih znižali koncentracijo estradiola.

Inhibitorji

Pri prvem rešetanju spojin sta se kot najboljše inhibitorja tipa 7 izkazala estra-1,3,5-trien-3-ol-17-spiro- δ -lakton (**47**), inhibitor 17 β -HSD tipa 5, ter 17 β -(N-pentilformamido)-4-metil-4-aza-5 α -androstan-3-on (**48**), dober inhibitor 5 α -reduktaze (slika 7). Da bi izboljšali njune inhibitorne lastnosti, so naredili različne derivate spojin (35). Spojina (**49**), ki strukturno vsebuje dela obeh prejšnjih inhibitorjev, 4-aza jedro ter 17-spiro- δ -lakton, je pokazala zelo dobre inhibitorne lastnosti, prav tako

tudi nekateri analogi spojine **48**, kot je spojina **50** z IC₅₀ vrednostmi okoli 0,05 μ M (0,15 μ M substrat) (35).

2.7 17 β -HSD tip 8

Tip 8 je mitohondrijski in prednostno oksidativni encim. Inaktivira predvsem estradiol, pa tudi testosteron in dihidrotestosteron. Ima še manjšo reduktivno sposobnost in reducira estron v estradiol, našli pa so ga v jetrih, spolnih žlezah, ledvicah in vranici. V ledvicah je veliko število različnih hidroksisteroid-dehidrogenaz, ki inaktivirajo glukokortikoide ter spolne hormone, z nizkim izražanjem gena za 17 β -HSD tip 8 pa povezujejo nastanek policističnih ledvic (36, 37).

2.8 17 β -HSD tip 10

Tudi tip 10 je mitohondrijski encim. Odgovoren je za oksidacijo estradiola, DHT ter L-3-hidroksiacyl-koencima A. Encim najdemo v številnih tkivih, vključno z možgani (38). V možganih pacientov z Alzheimerjevo boleznijo so ugotovili visoko koncentracijo 17 β -HSD tipov 10 (38). Tam encim interagira z amiloid β -peptidom, kar vodi do motenj v delovanju mitohondrijev in smrti živčnih celic (39). Encim dodatno katalizira nastanek toksičnih aldehydov v nevronih, z oksidacijo estradiola pa zmanjšuje koncentracijo zaščitnih estrogenov. Klinične študije so namreč pokazale, da nadomestna terapija z estrogeni zadrži ali prepreči nastanek Alzheimerjeve bolezni (38). Zaradi teh lastnosti je encim izredno zanimiv z vidika zdravljenja Alzheimerjeve bolezni.

Nedavno so ugotovili, da encim v možganih katalizira tudi oksidacijo naravnih pozitivnih alosteričnih modulatorjev GABA_A receptorja, kot sta alopregnanolon ter alotetrahidrodeoksikortikosteron (40). Takšni modulatorji pospešijo vezavo GABA na GABA_A receptor in imajo zaradi tega antikonvulzivni ter anksiolitični učinek.

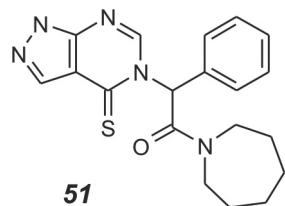
Inhibitorji

Študije različnih inhibitorjev na tem encimu še niso bile narejene, znana pa je kristalna struktura encima z vezanim inhibitorjem AG18051 (**51**) (slika 8). Ta inhibitor se veže v aktivno mesto encima ter se kovalentno poveže s koencimom NAD⁺ (39). IC₅₀ vrednost za racemno zmes tega inhibitorja je 92 nM (40 μ M substrat).

2.8 17 β -HSD tip 11, 12 in 13

Zadnji trije tipi so bili odkriti po letu 2000. Tip 11 je oksidativni encim, ki prednostno pretvarja 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol v androsteron, v

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče



Slika 8: Inhibitor 17 β -HSD tipa 10

Figure 8: Inhibitor of 17 β -HSD type 10

manjši meri tudi estradiol v estron (41). Verjetno je odgovoren za intrakrino kontrolo sinteze androgenov, saj so ga našli v različnih tkivih: pljučih, trebušni slinavki, ledvicah, jetrih, srcu, nadledvični žlezi, jajčnikih, testisih, endometriju, možganih ... (12, 42). Pravilno delovanje encima naj bi bilo ključno za normalen razvoj ploda (43). Znana je kristalna struktura človeškega 17 β -HSD tipa 11 (16).

Tip 12 je bil odkrit na osnovi podobnosti aminokislinskega zaporedja z zaporedji znanih 17 β -HSD. Najdemo ga v številnih tkivih, največ pa v jetrih, mišicah in ledvicah (12). Sodeluje pri sintezi maščobnih kislin ter redukciji ketoacil-CoA (12, 44), njegove vloge pri metabolizmu steroidov pa še niso proučevali.

V tem letu so identificirali še 17 β -HSD tip 13, ki ga najdemo predvsem v ledvicah ter v očesni mrežnici. Encim oksidira estradiol, z 10-krat nižjo aktivnostjo pa tudi testosteron. Glede na to, da je mesto za vezavo substrata v encimu zelo veliko, verjetno oksidira tudi druge, večje nesteroidne substrate. Znana je kristalna struktura encima (45).

3 SKLEP

V zadnjih nekaj letih so bile odkrite številne izooblike 17 β -HSD ter njihov pomen za razvoj različnih od androgenov in estrogenov odvisnih bolezni. Inhibitorji posameznih izooblik 17 β -HSD bi se tako lahko uporabljali kot moški kontraceptivi, anksiolitiki ali antikonvulzivi, z njimi bi lahko zdravili plešavost, prekomerno poraščenost, aknavost, osteoporozo, raka na prostati, raka dojke, sindrom policističnih jajčnikov ali preprečili nastanek Alzheimerjeve bolezni. Zaradi navedenega so 17 β -HSD zelo zanimive farmakološke tarče.

4 LITERATURA

- Norman AW, Litwack G. In: Hormones. 2nd ed. New York: Academic Press, 1997; 49-86.
- Labrie F, Luu-The V, Lin SX et al. Intracrinology: role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. J Mol Endocrinol 2000; 25: 1-16.
- Suzuki T, Moriya T, Ishida T et al. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. Biomed Pharmacother 2003; 57: 460-462.
- Biswas MG, Russell DW. Expression, cloning and characterization of oxidative 17 β - and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. J Biol Chem 1997; 272: 15959-15966.
- Labrie F. Intracrinology. Mol Cell Endocrinol 1991; 78: C113-C118.
- Geisler J. Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003; 3-5: 245-253.
- Penning TM. Beyond steroid hormone receptors – aldo-keto reductases as targets for selective intracrine modulators. Pharmacology News (University of Pennsylvania school of medicine) 2001; 9: 1-6.
- Nobel S, Abrahmsen L, Oppermann U. Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. Eur J Biochem 2001; 268: 4113-4125.
- Pasqualini JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. Biochim Biophys Acta 2004; 1654: 123-143.
- Anzyme nomenclature: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb>
- Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. Endocrine Reviews 1997; 18: 281-305.
- Mindnich R, Moller G, Adamski J. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Mol Cell Endocrinol 2004; 218: 7-20.
- Talalay P, Williams-Ashman HG. Activation of hydrogen transfer between pyridine nucleotides by steroid hormones. Proc Natl Acad Sci US 1958; 44: 15-26.
- Poirier D. Inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. Curr Med Chem 2003; 10: 453-477.
- Vihko P, Harkonen P, Soronen P et al. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases – their role in pathophysiology. Mol Cell Endocrinol. 2004; 215: 83-88.
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)
- Makela S, Poutanen M, Lehtimäki J et al. Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. Proc Soc Exp Biol Med 1995; 208 :51-59.
- Hoffren AM, Murray CM, Hoffmann RD. Structure-based focusing using pharmacophores derived from the active site of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Curr Pharm Des 2001; 7: 547-566.
- Brown WM, Metzger LE, Barlow JP et al. 17-beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold. Chem Biol Interact 2003; 143-144: 481-491.
- Messinger J, Hirvelä L, Husen B et al. New 17beta-HSD1 inhibitors – setting up a new program line. Workshop on 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: role in human disease, Abstract book, Elmau Castle, Germany, May 8-11, 2005; 37.
- Bydal P, Auger S, Poirier D. Inhibition of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase by estradiol derivatives bearing a lactone on the D-ring: structure-activity relationships. Steroids 2004; 69: 325-342.
- Oduwole OO, Makinen MJ, Isomaa VV et al. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2: independent prognostic significance and evidence of estrogen protection in female patients with colon cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 87: 133-140.
- Cook JH, Barzaya J, Brennan C et al. 4,5-Disubstituted cis-pyrrolidinones as inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase II. Part 1: Synthetic approach. Tetrahedron Letters 2005; 46: 1525-1528.
- Edwards P. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors; thrombin receptor (PAR-1) antagonists. Drug Discovery Today 2002, 7: 785-835.
- Andersson S. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: isozymes and mutations. J Endocrinol 1995; 146: 197-200.
- Goebelsmann U, Horton R, Mestman JH et al. Male pseudohermaphroditism due to testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1972; 36: 865-878.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. Nature Genetics 1994; 7: 34-39.
- Möller G, Leenders F, van Grunsven EG et al. Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. J Steroid Biochem Mol Biol 1999; 69: 441-446.

Pregledni članki - Review Articles

29. de Launoit Y, Adamski J. Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 227-240.
30. Otsuka M, Kato N, Ichimura T et al. Vitamin K2 binds 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and modulates estrogen metabolism. *Life Sci* 2005; 76: 2473-2482.
31. Bauman DR, Rudnick SI, Szewczuk LM et al. Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 60-68.
32. Soronen P, Laiti M, Torn S et al. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 92: 281-286.
33. Quinkler M, Sinha B, Tomlinson JW et al. Androgen generation in adipose tissue in women with simple obesity—a site-specific role for 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *J Endocrinol* 2004; 183: 331-342.
34. Krazeisen A, Breitling R, Möller G et al. Phytoestrogens inhibit human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 151-162.
35. Bellavance É, Luu-The V, Poirier D. First inhibitors of the steroidogenic enzyme type 7 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Letters in Drug Design & Discovery* 2004; 1: 194-197.
36. Fomitcheva J, Baker ME, Anderson E et al. Characterization of Ke6, a new 17β-hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *J Biol Chem* 1998; 273: 22664-22671.
37. Peltoketo H, Luu-The V, Simard J et al. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 1999; 23: 1-11.
38. He XZ, Merz G, Mehta P et al. Human brain short-chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single domain multifunctional enzyme. *J Biol Chem* 1999; 274: 15014-15019.
39. Kissinger CR, Rejto PA, Pelletier LA et al. Crystal structure of human ABAD/HSD10 with a bound inhibitor: implications for design of Alzheimer's disease therapeutics. *J Mol Biol* 2004; 342: 943-952.
40. He XY, Wegiel J, Yang YZ et al. Type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase catalyzing the oxidation of steroid modulators of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 111-117.
41. Adamski J, Jakob FJ. A guide to 17β-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 1-4.
42. Chai Z, Brereton P, Suzuki T et al. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology* 2003; 144: 2084-2091.
43. Brereton P, Suzuki T, Sasano H et al. Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 111-117.
44. Moon Y-A, Horton JD. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem* 2003; 278: 7335-7343.
45. Lukacik P. Structural genomics of SDR-type human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Workshop on 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: role in human disease, Abstract book, Elmau Castle, Germany, May 8-11, 2005; 13.

Novice iz sveta farmacije

Urejšajo: dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.; Petra Slanc, mag. farm.; dr. Bojan Doljak, mag. farm.; prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

EMA izdala pozitivno mnenje glede uporabe insulina za inhalacijo

Bojan Doljak

Komisija za humana zdravila (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) pri Evropski agenciji za zdravila (EMA), je izdala pozitivno mnenje glede insulina za inhalacijo (Exubera®) za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 1 in tipa 2. Na osnovi mnenja, bo EMA najverjetneje v kratkem tudi izdala dovoljenje za promet, kar pomeni, da bi bila po odkritju insulina leta 1920 to prva neinvazivna alternativa insulinskim injekcijam. Exubera® je zdravilo, ki so ga skupaj razvile družbe Pfizer, Sanofi-Aventis in Nektar Therapeutics. Indikaciji zdravila sta zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 pri odraslih, pri katerih jemanje peroralnih hipoglikemikov ne zadošča in je potrebno vpeljati insulinsko terapijo, ter zdravljenje sladkorne bolezni tipa 1 pri odraslih, ki že prejemale srednje- ali dolgodelujoči insulin subkutano. V slednjem primeru bo potrebno najprej pretehtati, ali so koristi prejemanja insulina z inhalacijo večje od potencialnih neželenih učinkov. Učinkovina novega zdravila je hitro delujoči rekombinantni človeški insulin v suhi praškasti obliki, ki se ga preko aplikatorja vdihne v pljuča. V primarni obojini je 1 mg oziroma 3 mg insulina, dajal pa naj bi se v odmerkih 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg in 5 mg.

Po podatkih WHO iz leta 2002 je v Evropi okoli 22,5 milijonov bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2, kar predstavlja od 85 do 95 % vseh primerov sladkorne bolezni, medtem, ko je v Združenih državah Amerike bolnikov s sladkorno boleznijo 17 milijonov. Najpogostejši zapleti, ki nastanejo kot posledica sladkorne bolezni, so bolezni srca in ožilja ter pešanje ledvične funkcije in vida zaradi posledic makro oziroma mikroangiopatij. Obsežna študija iz leta 2002, ki so jo opravili v osmih večjih evropskih državah, je pokazala, da neposredni stroški zaradi sladkorne bolezni tipa 2 znašajo 29 milijard evrov letno, od tega zaradi hospitalizacije 15,9 milijard evrov.

Biotehnoška družba Nektar Therapeutics je insulin za inhalacijo pripeljala do prve faze kliničnega testiranja, potem pa je licenco za tehnologijo predala družbama Pfizer in Sanofi-Aventis za nadaljnji razvoj in trženje. Do danes je v kliničnih študijah sodelovalo več kot 3500 bolnikov, nekateri med njimi insulin za inhalacijo jemljejo že sedem let. Rezultati tretje faze teh študij naj bi po podatkih družbe Nektar Therapeutics pokazali, da je učinek Exubera® primerljiv z učinkom insulina za injiciranje in boljši od učinka peroralnih hipoglikemikov. Pogodba med družbama Pfizer in Sanofi-Aventis naj bi obsegala razvoj, promocijo (kjer to zakon dovoljuje) in proizvodnjo zdravila na globalni ravni.

Ameriška agencija za zdravila (FDA) dokumentacijo o zdravilu še preučuje, iz dokumentov je razvidno, da precejšen poudarek dajejo farmakokinetiki in neželenim učinkom zdravila. Farmakokinetična parametra (AUC, c_{max}) pri večkratnem dajanju pri večini študij variirajo za več kot 50 %, pri nekaterih študijah pa za več kot 100 % (podan je koeficient variacije). Razlike so se pojavile tudi pri istih odmerkih zdravila z različnimi jakostmi (npr. 1 x 3 mg in 3 x 1 mg). Pri absorpciji, porazdelitvi in sistemski koncentraciji inhaliranega insulina igrajo pomembno vlogo patologija pljuč in drugi zunanji dejavniki. Pri kadilcih se absorpcija poveča za 2 do 5-krat, pri nekadilcih, ki so v prostoru skupaj s kadilci, in astmatikih se absorpcija inhaliranega insulina zmanjša za 20–30 %, pri bolnikih s kronično obstruktivno boleznijo pa se poveča za okoli 50 %. Če bo dovoljenje za promet izdala tudi FDA, ocenjujejo, da bi lahko prodaja zdravila v svetu dosegla 2 milijardi letno.

Vir: www.news-medical.net

Tigeciklin

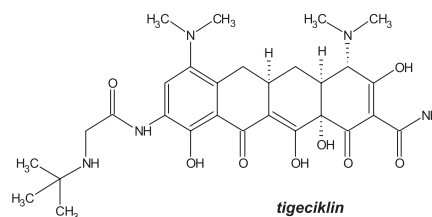
Petra Slanc

Junija letos je Agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration – FDA) v Ameriki odobrila trženje prve učinkovine nove generacije tetraciklinov.

Že v prejšnji številki smo pisali o problemu rezistence in o novih možnostih razvoja novih in novih antibiotikov, vendar pa glavne poti ostajajo enake. Glavne poti razvoja novih antibiotikov so osnovane na modifikacijah obstoječih struktur in njihove »reaktivacije« proti bakterijam, ki so razvile določene mehanske rezistence na obstoječo generacijo. Kljub temu, da je bil razvoj drugih in tretjih generacij glavnih skupin antibiotikov, kot so penicilini, cefalosporini, makrolidi in kinoloni do sedaj uspešen, pa je dovrševanje molekul ter ohranjanje njihovega antibiotičnega delovanja, selektivne toksičnosti vedno težje doseči. Poleg tega je odkrivanje novih skupin učinkovin ter njihova registracija na trgu zelo redka. Na slednje kaže tudi podatek, da sta bila v preteklih štirih desetletjih registrirana le dva povsem nova tipa učinkovin (linezolid (oksazolidioni) in daptomicin (lipopeptid)).

Prve tetracikline so odkrili pred več kot petdesetimi leti, takrat so predstavljali zelo velik napredek za zdravljenje infekcij, povzročenih s strani po Gramu negativnih kot tudi pozitivnih bakterij. Tetraciklini preprečujejo sintezo proteinov na nivoju ribosomov, saj z vezavo na podenoto 30S preprečijo vezavo kompleksa tRNA-AK na aminokislinsko mesto na ribosomu in s tem onemogočijo nadaljnje podaljševanje proteinske molekule. Sama rezistenca je vezana na dva mehanizma in sicer spremembe vezavnega mesta na ribosomu, druga pa s prenosom genske informacije za transmembranske proteine, ki povečajo izplavljanje tetraciklinov iz celice.

V prizadevanju odkritja novih tetraciklinov so bili razviti tako imenovani gliciciklini med katere spada tigeciklin. Tigeciklin predstavlja novo generacijo tetraciklinov, ki kljubuje mehanizmom bakterij, zato ga dosedanja mehanizmi rezistence ne prizadejejo.



Zanimivosti iz stroke

Klinični podatki tigeciklina so pokazali, da tigeciklin predstavlja novo možnost zdravljenja kožnih infekcij ter infekcij mehkega tkiva pri katerih je primerljiv s kombinacijo vankomicin/aztreonam. Prednosti tigeciklina pa so se pokazale tudi pri relativno varnem zdravljenju MRSA, saj ni bilo zabeleženih nobenih odpovedi organov, prav tako pa pri omenjenem zdravljenju ni bilo zabeležene bistveno višje pojavnosti slabosti in bruhanja kot pa pri vankomicin/aztreonam kombinaciji. Primerjave zdravljenja MRSA z linezolidom oziroma daptomicinom so še vedno v teku. Prav tako bodo potrebne nadaljnje študije učinkovitosti tigeciklina na vankomicin rezistentne enterokoke ter zdravljenja invazivne pnevmokokne infekcije in nekaterih drugih indikacij.

Zaključimo lahko le eno, tigeciklin je zelo perspektivna učinkovina, ki predstavlja novo alternativno, novo možnost in obrambo ter postavlja tetracikline zopet med širokospektralne antibiotike.

Vir:

Wenzel R et al. (2005) *Nature Rev* 4:809-810

FDA odprla pot generičnemu glimepiridu, amlodipin besilatu in ramiprilu

Andriana Tivadar

Glimepirid je peroralni antidiabetik, zdravilo za zdravljenje hiperglikemije pri sladkorni bolezni tipa 2. Ameriška Agencija za prehrano in zdravila (FDA) je 6. oktobra 2005 odobrila prvo generično obliko glimepirida, in sicer bo po novem za ameriško tržišče zdravilo lahko proizvajalo in prodajalo kar 5 generičnih podjetij. Pri nas je po podatkih e-Registra zdravil RS glimepirid zaenkrat registriran le pod zaščitenim imenom Amaryl® v 1-, 2- in 3-miligramskem odmerku. Največji dnevni odmerek glimepirida naj bi bil 8 mg, pri bolnikih z dobro nadzorovano sladkorno boleznijo pa je običajni odmerek od 1 do 4 mg na dan. Istočasno je FDA v ZDA poleg do sedaj uveljavljenih odmerkov (1 mg, 2 mg in 4 mg) prvič odobrila tudi generična zdravila s 3 mg, 6 mg in 8 mg glimepirida.

Ravno tako v oktobru je FDA prvič odobrila tudi generično zdravilo z amlodipin besilatom. Amlodipin spada med selektivne zaviralce kalcijevih kanalčkov z delovanjem na žile in se uporablja za zdravljenje hipertenzije, stabilne kronične in vazospastične angine pectoris in pri bolnikih z angiografično dokazano boleznijo koronarnih arterij. Pri nas poznamo tri paralelna zdravila z amlodipinom v 5 in 10 miligramskem odmerku. Generično zdravilo bo od zdaj na voljo tudi v ZDA, in sicer z 2,5 mg, 5 mg 10 mg amlodipin besilata.

V oktobrskem poročilu FDA o prvih odobritvah generične oblike zdravila je tudi ramipril (v obliki kapsul), ki je pri nas v obliki tablet registriran v kar šestih paralelah (od tega dve vsebujeta še hidroklorotiazid). Ramipril je zdravilna učinkovina za znižanje povišanega krvnega pritiska in zmanjšuje tveganje za miokardni infarkt, kakor tudi tveganje za poškodbe srca po infarktu. Spada med zaviralce angiotenzinske konvertaze. Zdravilo je na voljo v 1,25-, 2,5-, 5- in 10-miligramskem odmerku. Priporočeni začetni odmerek pri zdravljenju hipertenzije je 2,5 mg na dan, običajni vzdrževalni odmerek je 2,5 do 5 mg na dan, največji dnevni odmerek je 10 mg, po miokardnem infarktu pa je priporočeni začetni odmerek 2 x 2,5 mg na dan, največji dnevni odmerek pa 2 x 5 mg na dan.

Vira:

Medscape Medical News 2005 – www.medscape.com;

Register zdravil RS – www.ivz.si

Statini, zdravilne učinkovine za učenje?

Petra Slanc

Zgodovina se očitno zopet ponavlja, kot pri številnih učinkovinah, ki se uporabljajo ali so bile primarno razvite za neko indikacijo pa se danes uporabljajo za zdravljenje nekaterih drugih, na katere raziskovalci najverjetneje sploh niso pomislili. Pred kratkim je bila v *Current Biology* objavljena študija z zelo obetavnimi rezultati zdravljenja nevrofibratoze s pomočjo statinov. Nevrofibratoza spada med fakomatoze za katero je značilno, da se pojavlja kot motnja razvoja živčevja, mišic, kosti ter kože in za katero so značilni številni

nevrofibrini s predeli pigmentiranih lis ali tumorji možganskih živcev. Poznamo dva tipa nevrofibratoz. Nevrofibratoza tipa 1 (NF1) ali Recklinghousova bolezen se pojavlja na 4000 rojstev, nevrofibratoza tipa 2 ali bilateralna akustična nevrofibratoza (BAN) pa je manj pogosta in se pojavlja na 40000 rojstev. Klinični znaki bolezni so vezani na motnje učenja, koordinacije telesa, motnje kognitivnih (spoznavnih) funkcij in številni drugi. Oba tipa NF sta posledici avtosomne dominantne genske napake. V primeru NF1 je okvarjen gen, ki je odgovoren za produkcijo nevrofibrina. Nevrofibrin je protein, ki se vključuje v modulacijo aktivnosti drugega proteina imenovanega Ras, ki se vključuje v procese rasti celic. Nepravilnosti v aktivnosti proteina Ras oziroma njegova prekomerne vezave pa naj bi bile odgovorne za nepravilen razvoj in odzivnost nevronov v možganih. Za pravilno delovanje Ras proteina pa ni pomemben le nevrofibrin, ampak tudi drugi faktorji vezani na biosintezo holesterola, kar je raziskovalce omenjene študije napotilo k študiji, ki je na mišjem modelu potrdila, da statini izboljšajo klinično sliko NF-1 miši, ki imajo okvarjen omenjeni gen. Miši so imele izboljšano stopnjo koncentracije kot tudi učenja. Na podlagi omenjene študije so raziskovalci pridobili dovoljenje za tri klinične študije za zdravljenje nevrofibratoze s pomočjo statinov. Dve študiji bosta potekali v Združenih državah Amerike, ena pa na Nizozemskem. Skupina napoveduje, da bodo v roku enega do dveh let lahko potrdili ali je s pomočjo s statinov možno zdraviti nevrofibratozo ali ne.

Vir:

Li W et al. (2005). *Curr Biol* 15:1961-1967
<http://www.nature.com/drugdisc/news/articles/051107-4.html>

FDA odobrila prvo peroralno zdravilo za zdravljenje kronično povišanega železa v krvi

Marjetka Smolej

Presežek železa v telesu povzroča neželene, celo toksične učinke, ki se kažejo kot bruhanje

je, diareja ter okvara črevesja. Do kopičenja železa lahko pride pri osebah, ki so zdravljene z železom v prevelikih odmerkih ali pa je zdravljenje zelo dolgotrajno, pri tistih, ki prejmejo več transfuzij, in pri kroničnih alkoholikih. Povečana vsebnost železa v krvi je lahko tudi posledica dedne bolezni, ki jo imenujemo hemokromatoza. Nezdravljena hemokromatoza je lahko tudi smrtna. Simptomi se pojavijo šele v srednjih letih in se razvijejo počasi. Polt postane bakrena, razvije se ciroza in rak jeter, sladkorna bolezen in srčno popuščanje, kar navadno vodi v prezgodnjo smrt. Do sedaj je bilo osnovno zdravljenje puščanje krvi ali pa intravensko dajanje kelatorjev železa.

Agencija za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration*) FDA je odobrila novo zdravilo, ki vsebuje deferasiroks. Deferasiroks deluje kot peroralni kelator železa. Gre za prvi peroralni kelator železa, ki je dobil dovoljenje za to uporabo. Za zdravljenje kronično povišanega železa v krvi, ki lahko poškoduje srce in jetra, je bila do sedaj potrebna 8 do 12 urna infuzija zdravila, od danes pa je možno dajanje tudi peroralno, kar ima pred intravenskim dajanjem številne prednosti za bolnike. Deferasiroks je dobil dovoljenje po pospešenem postopku, ki omogoča FDA, da odobri produkte za zdravljenje bolezni, ki ogrožajo življenje, le na osnovi zgodnjih dokazov o učinkovitosti. V kliničnih študijah so se kot najpogostejši neželeni učinki kazali slabost, trebušna bolečina in povišane vrednosti jetrnih in ledvičnih testov. Manj pogosti neželeni učinki pa so bili izpuščaji ter motnje sluha in vida.

Vira:

<http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2005/N01258.html>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/medlineplusdictionary.html>

Zanimivosti iz stroke

Prve Študijske lekarnе v Sloveniji

V torek 20. septembra 2005, sta dekan Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, prof. dr. Borut Štrukelj in direktor Javnega zdravstvenega zavoda Mariborske lekarnе Maribor, Milan Pukšič, mag. farm., spec., podpisala posebno pogodbo o sodelovanju pri izvajanju izobraževalne dejavnosti.



Fakulteta za farmacijo zaradi prilagajanja smernicam EU uvaža v dodiplomski študijski program univerzitetnega študija farmacije tudi šestmesečno praktično usposabljanje. To je pogoj, da tudi druge članice EU, ki so takšno praktično usposabljanje v dodiplomskem študiju že izvajale, priznajo ustreznost diplome iz farmacije, pridobljene na Fakulteti za farmacijo UL. Fakulteta za farmacijo je že uvrstila praktično usposabljanje v študijski program za študente, ki so se vpisali v študijskem letu 2004/2005, izvajati pa ga bo pričela v študijskem letu 2007/2008. Trenutno takšno usposabljanje poteka po opravljeni diplomski in sicer kot pripravništvo po Programu pripravništva za poklic magister farmacije.

Javni zdravstveni zavod Mariborske lekarnе Maribor je bil zaradi dosedanjih dejavnosti, ustreznega kadra (zaposleni tudi z nazivom magistra in doktorja znanosti) in velikih razvojnih načrtov v prihodnosti, s strani Fakultete za farmacijo izbran za **prvi lekarniški zavod** v Sloveniji, ki bo pripravil in izvajal projekt, imenovan **Študijska lekarna**. Mariborske lekarnе so založnik javne nacionalne baze podatkov o zdravilih (www.zdravila.net), razvijajo sodobno programsko opremo, s katero bodo bistveno olajšale delo farmacevtov v lekarnah (posebne baze podatkov o medsebojnem učinkovanju zdravil, neželenih učinkih, pomoč pri svetovanju uporabnikom lekarniških storitev), zaposleni opravljajo tudi vlogo sodelavcev in učiteljev na srednjih šolah v Mariboru in Rušah, na Visoki šoli za zdravstvo in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru ter na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Mariborske lekarnе so tudi vodilni lekarniški zavod v Sloveniji, ki je izrazito razvojno in

tržno usmerjen. V ta namen imajo edini organizirano Službo za raziskave in razvoj ter Službo za trženje.

Podpisana pogodba pomeni, da bodo v izbranih enotah zavoda Mariborske lekarnе (Lekarnе Center, Pri Gradu, Nova vas in Tabor) izvajali praktično usposabljanje študentov 5. letnika študija farmacije. Poleg tega bodo v študijskih lekarnah izvajali tudi program specializacij iz lekarniške farmacije

(v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo) ter raziskovalno delo na področju socialne farmacije. Študijske lekarnе bodo tudi pilotne lekarnе za uvajanje novih lekarniških storitev in izvajanje programov farmacevtske skrbi.

Fakulteta za farmacijo se je z Mariborskimi lekarnami z isto pogodbo dogovorila o izvajanju funkcionalnih strokovnih izpopolnjevanj za zdravstvene delavce. Takšna izobraževanja, ki jih Fakulteta zelo uspešno organizira že štiri leta, bodo poslej potekala skupaj z Mariborskimi lekarnami tako v Ljubljani, kot v Mariboru.

Zavod bo prevzel skrb za usposabljanje študentov farmacije za celotno severovzhodno področje Slovenije (Štajerska, Koroška, Prekmurje) oziroma za določen delež populacije študentov v enem letniku.

Podpis pogodbe s Fakulteto za farmacijo nalaga Mariborskim lekarnam izjemno in hkrati zelo odgovorno nalogo, ki pomeni pripravo projekta, poskusno izvajanje za nekatere študente v študijskem letu 2007/2008 in izdelavo smernic za vse ostale študijske lekarnе v Sloveniji.

Kljub temu, da so Mariborske lekarnе že sedaj učni zavod in da usposabljaajo pripravnike za poklic magistra farmacije in farmacevtskega tehnika, bo nova dejavnost potekala v bistveno večjem obsegu, z velikimi zahtevami do kadra ter s preizkušanjem in uvajanjem novih lekarniških storitev, ki pomenijo tudi **višjo kakovost za uporabnike lekarniških storitev** (prebivalke in prebivalce Maribora in okolice).

Fakulteta za farmacijo UL
JZZ Mariborske lekarnе Maribor

Iz društvenega življenja

PAT - procesne analizne tehnologije - poročilo s 17. posvetovanja Tehnološke sekcije

Saša Baumgartner

Simpozij Tehnološke sekcije se je že tradicionalno odvijal v prijetnem ambientu velike dvorane PIC – Leka 9. junija 2005. Udeležilo se ga je preko 80 slušateljev, ki jih je privabil aktualen naslov posvetovanja. Strokovno organizacijski odbor v sestavi izr. prof. dr. Franc Vrečer kot predsednik ter člani prof. dr. Stane Srčič, doc. dr. Janez Kerč in Jelka Dolinar so sestavili zanimiv program in poleg uglednih domačih predavateljev povabili tudi 3 tuje. Predvsem organizacijskemu odboru in obema generalnima pokroviteljema posvetovanja Leku, novemu članu skupine Sandoz in Krki d.d., Novo mesto gre zahvala, da je bilo srečanje tako strokovno kot finančno uspešno.

PAT je zadnja leta v stroki pogosta kratica, ki marsikomu pred začetkom posvetovanja še ni bila povsem jasna. Najširše je pomen kratice PAT opredelila uvodna predavateljica mag. Breda Velkovich Remec takole: "PAT - procesne analizne tehnologije v farmacevtski industriji je sistem, ki omogoča načrtovanje, analiziranje in nadzor proizvodnje z izvajanjem časovno vzporednih preskušanj ključnih kakovostnih lastnosti materialov in izvedbenih karakteristik procesa s skupnim ciljem zagotavljanja ustreznosti kakovosti končnega izdelka. PAT je torej sistem in ne samo orodje."

Več predavateljev je ponovilo, da je cilj PAT razumevanje in kontrola proizvodnega procesa, pri čemer je potrebno poznati kritične parametre tako procesa kot izdelka. Procese pa lahko natančno spoznamo le z uporabo novih modernih analiznih tehnik in metod, med katerimi so bile NIR, MIR, raman spektroskopija, plinska kromatografija in metode spremljanja procesov kristalizacije natančno predstavljene. Med nove analizne metode za spremljanje vlage med procesom sodijo tudi dielektrični, visokofrekvenčni, mikrovalovni in NIR vlagomeri, ki jih je predstavil Andrej Mohar. Urška Škof pa je v svojem predavanju predstavila uvajanje novih metod za medprocesno spremljanje tehnologije izdelave zrn, sušenja in tabletiranja.

Večje razumevanje procesov in njihov izboljšani nadzor omogoča tudi večfaktorska analiza, kjer je možna ocena medsebojnega vpliva materialov, procesa in pogojev izvedbe ter njihov skupni vpliv na kakovost izdelka ter robustnost procesa. Dr. Rok Dreu je tako predstavil CFD oziroma numerično analizo tokov, kjer z uporabo CFD programske opreme popišemo fiziko nekega sistema z enačbami ali modeli, ki so približek realnega stanja. Tovrstna simulacija nam omogoča večje razumevanje procesa, predvidevanje vplivov raznih spremenljivk nanj, načrtovanje optimizacije procesa, ...

Ob zaključku srečanja so udeleženci ugotovili, da PAT v nekaterih okoljih do določene mere že izvajajo, drugam prihaja ta sistem nekoliko počasneje. Nekoliko deljena so bila mnenja o tem, ali se stroški uvedbe PAT sistema zares povrnejo z boljšo sledljivostjo procesov oziroma z njihovim boljšim poznavanjem in nenazadnje z večjo kakovostjo izdelka. Vsi udeleženci pa so se strinjali, da bo z razvojem PAT postal vse bolj pomemben ključ zagotavljanja kakovosti.

Letošnja tematika: PAT-procesne analizne tehnologije v farmacevtski in kemijski industriji je bila zastavljena široko, saj je poleg farmacevtskih pokrivala tudi nefarmacevtska področja, kar je vsebino simpozija le še dodatno obogatilo. Ocene simpozija s strani udeležencev so bile visoke, kar je znova potrjevalo uspešnost srečanja v vseh pogledih in izvrstno opravljeno delo vseh povablejnih predavateljev.

Še enkrat hvala vsem predavateljem za izvrstno opravljeno delo, strokovno-organizacijskemu odboru za pravo izbiro teme posvetovanja in za njegovo celovito izvedbo ter obema generalnima pokroviteljema Leku, novemu članu skupine Sandoz in Krki d.d., Novo mesto za finančno podporo.

Razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2006

Podružnice in sekcije prijavijo kandidate za podelitev društvenih priznanj skladno z določili Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj tajništvu Slovenskega farmacevtskega društva. Predlogi morajo biti pripravljeni na obrazcih, ki so sestavni del Pravilnika in objavljeni na spletni strani www.sfd.si. Predlagatelji pošljejo predloge najkasneje do 31. januarja 2006, tajništvu SFD.

Simpozij Slovenskega farmacevtskega društva
SATELITSKA TEMA: PREGLED LEKARNIŠKIH MREŽ V EU
SODOBNA DERMATOTERAPIJA

Petek, 19. maj 2006

13.00 – 14.30

Registracija

14.30 – 15.00

Otvoritev simpozija (Borut Štrukelj)

15.00 – 17.30

SATELITSKA TEMA: PREGLED LEKARNIŠKIH MREŽ V EU

Cilj: predstaviti položaj in razvojne trende lekarništva v EU in v RS, glede na predvideno večjo liberalizacijo in deregulacijo trga

15.00 – 15.30

Predstavniki PGEU

Razvoj trga zdravil v državah članicah PGEU

15.30-16.00

Predstavniki Evropske skupnosti

Pravni vidik regulacije in liberalizacije trga zdravil

16.00-16.30

Predstavniki Lekarniške zbornice Slovenije

Posnetek stanja in razvojne perspektive v RS

16.30 -17.00

Razprava

17.00 –17.30

Odmor

17.30 – 18.30

SKUPŠČINA SFD

21.00

Slavnostni program s podelitvijo društvenih priznanj

Sobota, 20. maj 2006

9.00 – 16.00

SODOBNA DERMATOTERAPIJA

9.00 – 9.30

Epidemiologija kožnih bolezni

Sodobni pristopi k zdravljenju aken

9.30 – 9.50

Etiologija in zdravljenje aken

9.50 – 10.10

Zdravilni pripravki za zdravljenje aken in nega kože

Zdravljenje dermatomikoz

10.10 – 10.30

Zdravljenje dermatomikoz

10.30 – 10.50

Antimikotiki

10.50 – 11.20

Odmor

11.20 – 11.40

Atopični dermatitis

11.40-12.00

Transdermalni prenos zdravilnih učinkovin

Novosti pri zdravljenju luskavice

12.00 -12.20

Etiologija in zdravljenje luskavice

12.20 – 12.40

Nove učinkovine za zdravljenje luskavice

12.40 – 13.00

Kožni rak

13.00 – 15.00

Kosilo

15.00 – 15.20

Pregled dermatoterapevtikov

15.20 – 15.40

Interakcije dermatoterapevtikov z drugimi zdravili

Korektivna dermatoterapija – video prezentacija

15.40 – 16.10

Plastična kirurgija Fabjan

16.10 – 16.40

Odmor

16.40 - 18.00

Strokovno šaljivi kviz

19.00

Družabno srečanje, razglasitev rezultatov kviza in podelitev nagrad

Iz društvenega življenja

Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnikov ob občnem zboru
26. – 27. maj 2005, Rogla na Pohorju
NEGA KOŽE IN SODOBNA PRIPOROČILA ZA ZAŠČITO PRED SONČNIMI ŽARKI

18. simpozij Sekcije farmacevtskih tehnologov
8. junij 2006, v PIC, Lek v Ljubljani
NOVE POMOŽNE SNOVI
element (učinkovitosti) kakovosti zdravila in kozmetičnih izdelkov

PROGRAM

Nove pomožne snovi za peletiranje
Specifične pomožne snovi za oralnodisperzibilne tablete
Ciklodekstrini
Kombinirane pomožne snovi za direktno tabletiranje
Karagenani (FMC) oz. pomožne snovi za podaljšano sproščanje, ki bi nadomestile celulozne etre
Silica v farmacevtski tehnologiji
Polimerne obloge – novosti
Novi sintezni polimeri
Pomožne snovi za nano in mikro dostavne sisteme
Dermatiki – nove pomožne snovi za poltrdne farmacevtske oblike
Nove pomožne snovi v kozmetiki

SIMPOZIJ FAKULTETE ZA FARMACIJO

- Kaj mora farmacevt vedeti o diagnostičnih testih?
- Na kaj mora farmacevt opozoriti bolnika pri vročitvi diagnostičnega testa?
- Kakšne analizne napake so možne pri samokontroli sladkorne bolezni, kardiovaskularnih bolezni ter testih povezanih z nosečnostjo in zlorabo zdravil?
- Kakšne so možnosti za samozdravljenje in preventivo pri kroničnih boleznih?
- Kako mora farmacevt postopati v primeru, ko bolnik želi zdravilo ali nasvet za zdravljenje simptoma?
- Kakšne so nevarnosti samozdravljenja med nosečnostjo?
- Kako lahko farmacevt pomaga pri zlorabi zdravil?

Če želite odgovore na zgornja vprašanje, se udeležite podiplomskega izobraževanja farmacevtov z naslovom:

FARMACEVT PRI SAMOKONTROLI IN SAMOZDRAVLJENJU

Z novimi znanji boste samozavestnejši in uspešnejši!

Program izobraževanja

Čas	Naslov teme	Predavatelj
8.30-8.40	Pozdravni nagovor	prof. dr.Jana Lukač Bajalo
8.40-9.10	Laboratorijske preiskave v lekarni in na domu	izr. prof. dr. Borut Božič
9.15-9.35	Dejavniki, ki vplivajo na rezultate analiz	izr. prof. dr. Janja Marc
9.40-10.00	Vloga farmacevta pri samozdravljenju	mag. Andreja Čufar
10.00-10.30	Odmor	
10.30-10.50	Samokontrola sladkorne bolezni	mag. Barbara Mlinar
10.55-11.15	Nevarnosti samozdravljenja pri bolnikih s sladkorno boleznijo	dr. Iztok Grabnar
11.20-11.40	Samokontrola tveganja kardiovaskularnih obolenj	doc. dr. Darko Černe
11.45-12.05	Vloga farmacevta v preventivi kardiovaskularnih obolenj	dr. Aleš Mlinarič
12.10-12.30	Nosečnost in samokontrola	izr. prof. dr. Joško Osredkar
12.35-12.55	Nevarnosti samozdravljenja v nosečnosti	dr. Mojca Kerec
13.00-14.30	Kosilo	
14.30-14.50	(Samo)kontrola zlorabe psihotropnih zdravil	mag. Maksimiljan Gorenjak
14.55-15.15	Vloga farmacevta pri preprečevanju zlorabe zdravil	izr. prof. dr. Marija Sollner Dolenc, doc. dr. Lucija Peterlin Mašič
15.20-15.50	Izbrana lekarna – izmišljotina ali stvarnost?	prof. dr. Aleš Mrhar
15.50-16.50	Razprava	vsi predavatelji, moderatorja izr. prof. dr. Borut Božič, prof. dr. Aleš Mrhar
16.50-17.00	Zaključni nagovor	prof. dr. Aleš Mrhar

- Kdaj in kje:**
 Na Fakulteti za farmacijo
- torek, 6. junij 2006,
 - četrtek, 8. junij 2006,
 - torek, 13. junij 2006 in
 - četrtek, 15. junij 2006.

Zahvala

Minilo je prvo leto po prenovi zunanje podobe Farmacevtskega vestnika (FV). Zdaj je FV videti privlačnejši, sodobnejši. Za letnik 2006 bomo izbrali novo fotografijo za naslovnico in morda uvedli še kakšne spremembe, ki bodo pomenile še dodatne izboljšave. Večina tistih, ki ste bili naveličani stare podobe Farmacevtskega vestnika, je spremembo dobro sprejela. Nekateri niste bili preveč navdušeni, morda ste bili povsem zadovoljni s »starim« FV ali pa ste pričakovali večje spremembe tudi v vsebinski zasnovi in funkciji FV.

Farmacevtski vestnik je še vedno naš, je ogledalo slovenske farmacije, našega strokovnega in društvenega udejstvovanja. Nedvomno so bili strokovni članki letos izredno kvalitetni in zanimivi, za kar bi se rada najprej zahvalila vsem avtorjem. Imena avtorjev in naslove letos objavljenih strokovnih prispevkov (originalnih znanstvenih in preglednih) lahko najdete v letnem kazalu. Hvala vsem, ki ste pridno pisali in potrpežljivo čakali na odgovore uredništva. Najlepša hvala tudi soustvarjalcem prispevkov v ostalih rubrikah.

Na tem mestu pa bi se še posebej rada zahvalila vsem recenzentom, ki so bili do sedaj neimenovani. Ti so skoraj praviloma doktorji znanosti, profesorji, docenti, nedvomno pa vidnejši predstavniki slovenske farmacevtske in medicinske stroke, ki so s svojim prostovoljnim – kar je v današnjem komercializiranem svetu že prava redkost –, poleg tega pa še izjemno strokovnim delom avtorjem kazali pot do izboljšanja kakovosti prispevkov. Nekateri med danes imenovanimi so bili še posebej dejavni in pridni, saj so bili kar večkrat izbrani za recenzente, kljub vsemu pa so se vabilu vedno prijazno odzvali. Vsem skupaj še enkrat iskrena hvala. Mislim, da lahko upravičeno zapišem, da se jim zahvaljujemo ne le v imenu uredništva, temveč tudi v imenu vseh avtorjev. Želim si, da bi še naprej tako plodno sodelovali, pisali in strokovno ocenjevali. Hkrati upam, da boste Farmacevtski vestnik še naprej radi listali in brali, zato hvala tudi vsem bralcem.

Recenzenti, ki so sodelovali pri oceni prispevkov, objavljenih v Farmacevtskem vestniku leta 2005, so navedeni po abecednem vrstnem redu glede na priimek, vendar brez pripadajočih nazivov (če smo koga izpustili se mu opravičujemo in še dodatno zahvaljujemo za sodelovanje): Anderluh Štefanič Petra, Bogataj Marija, Božič Borut, Cvelbar Martina, Filej Bojana, Gorenjak Maksimiljan, Grabnar Ahlin Pegi, Jeras Matjaž, Kerč Janez, Kikelj Danijel, Koren Srečko, Kos Janko, Krbavčič Aleš, Kreft Samo, Kristl Albin, Marc Janja, Markovič Saša, Mavri Janez, Menart Viktor, Mlinarič Aleš, Obreza Aleš, Osredkar Joško, Plesničar Božo, Poljanšek Davor, Raščan Mlinarič Irena, Skitek Milan, Snoj Nada, Štrukelj Borut, Umek Andrej, Vrečer Franc, Zaletel Jelka.

V pričakovanju novega leta (in novih člankov), novih doživetij, novih nalog in izzivov, vas prav lepo pozdravljam ter vam želim srečno in zdravo leto 2006.

Andrijana Tivadar, glavna urednica Farmacevtskega vestnika

Farmacevtski vestnik

Vsebina letnika 56

Letno kazalo

STROKOVNI ČLANKI (pregledni, originalni znanstveni in strokovni članki)

Mojca Kerec

Interakcije zdravil: zaviralci kalcijevih kanalčkov

Drug interactions: calcium channel blockers

3

Janez Mravljak, Barbara B. Byrne Habič, Slavko Pečar

Dušikov oksid II: biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO

Nitric oxideII: biological activity and compounds that dissociate NO

11

Pavle Jović

Prve tiskane knjige s področja farmacije v knjižnicah Slovenije

The first printed books on pharmacy in the libraries of Slovenia

17

Katja Gombač Aver

Kakovost predlog in hlačnih predlog za inkontinenco

Quality of incontinence products: pads and diapers

20

Boštjan Debeljak

Organizacija in delo farmacevtskega informacijskega centra pri SFD

47

Borut Štrukelj, Mitja Kos, Andreja Čufar, Vojko Kmetec, Aleš Mrhar

Strokovna informatika v lekarniški farmaciji: izobraževalni in raziskovalni vidiki

51

Alexandra Topol

An introduction to UKMi (United Kingdom Medicines Information service)

54

Zoran Grubič

Patofiziologija staranja

Pathophysiology of aging

59

Mišo Šabovič

Bolezni starostnikov

Diseases in elderly

68

Irena Mlinarič Raščan

Genska zdravila

Gene-based medicines

71

Matjaž Jeras

Transplantacija pri starostnikih

Transplantation in elderly

75

Letno kazalo

Danijel Kikelj Antitrombotična zdravila pri starostnikih Antithrombotic drugs in the elderly	78
Vita Dolžan, Iztok Grabnar Odmerjanje zdravil glede na genetski polimorfizem Genetic polymorphism and drug dosing in elderly patients	83
Tomaž Vovk, Mihaela Tršinar Interakcije med zdravili za starostnike – teoretični in praktični vidiki Drug interactions in elderly – theoretical and practical view	89
Tina Batista Napotnik, Irena Mlinarič-Raščan Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil The use of primary hepatocyte cultures in drug discovery and development	103
Branka Rozman, Saša Baumgartner, Mirjana Gašperlin Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemi Interactions between xanthan and locust bean gum in water systems	109
Andreja Plaper Določanje mutagenega potenciala snovi na celični liniji mišjega limfoma The mouse lymphoma mutagenicity assay (MLA)	115
Janez Mravljak, Barbara B. Byrne Habič, Slavko Pečar Dušikov oksid III: zaviralci prekomernega nastajanja Nitric oxide III: inhibitors of excessive formation	120
Ljuba Krnjak, Milan Skitek Pomembnost porfirinov v laboratorijski diagnostiki Importance of porphyrins in laboratory diagnostics	125
Janja Bedrač Švedski monopol prodaje zdravil nasproten evropskemu pravu – kaj pa slovenska ureditev?	131
Stanislav Šuškovič Etiologija, epidemiologija in diagnostika astme in KOPB	147
Mitja Košnik Nefarmakološki ukrepi pri zdravljenju astme in KOPB	151
Tina Morgan, Stanislav Šuškovič Farmakološko zdravljenje astme in KOPB	153
Jurij Trontelj Interakcije med zdravili za zdravljenje astme in KOPB in drugimi zdravili	159
Jurij Šorli Kazalniki kakovosti zdravljenja z zdravili pri obstruktivni boleznj pljuč	171
Mateja Praprotnik, Aleš Mrhar Vpliv programa farmacevtske skrbi na kakovost zdravljenja bolnikov z astmo in KOPB	173
Mirjana Ule Teoretični in praktični vidiki komuniciranja med bolnikom, farmacevtom in ostalimi zdravstvenimi delavci	176

Nataša Karas Kuželički, Jana Lukač-Bajalo Genetika laktozne intolerance odraslih in pogostost polimorfizma -13910C>T v slovenski populaciji Genetics of adult-type lactose intolerance and frequency of -13910C>T polymorphism in Slovenian population	183
Odon Planinšek, Jernej Zadnik, Matjaž Kunaver, Marjan Bele, Stane Srčič Določanje površinskih lastnosti vzorcev laktoze, pripravljene s sušenjem z razprševanjem, z liofilizacijo in z obarjanjem Determination of surface properties of lactose samples prepared by spray-drying, lyophilization and precipitation	188
Saša Puhar, Matjaž Jeras Predpisi za priprave tkivnega inženirstva in za somatsko celično zdravljenje Regulative for tissue engineered medical products and somatic cell therapy	194
Matej Avanzo, Alenka Šavc, Mojca Kerec Kos Zdravila v nosečnosti I: Prenos učinkovin skozi placento Drugs in pregnancy I: Drug transport across the placenta	198
Nina Kočever, Julijana Kristl Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi Tumor-specific targeting of drugs by liposomes	202
Boštjan Debeljak Grožnja ptičje gripe The threat of avian influenza	215
Tanja Rozman Peterka, Marija Sollner Dolenc Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze Influenza and viral neuraminidase inhibitors	221
Tadeja Dolinar, Aleš Mrhar Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo? Paracetamol – effective and safe medicine?	229
Jana Lukač Bajalo Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni New criteria in laboratory diagnosis and monitoring of diabetes mellitus	241
Borut Božič Sladkorna bolezen in avtoimunost Diabetes and autoimmunity	250
Darko Černe Klinična biokemija pri obravnavi ledvičnih zapletov sladkorne bolezni Medical biochemistry assessment of renal diseases in diabetes mellitus	254
Katja Kristan, Tea Lanišnik Rižner 17β-hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče 17β-hydroxysteroid dehydrogenases – potential pharmacological targets	259

Letno kazalo

ZANIMIVOSTI IZ STROKE

Mirjana Gašperlin 2000 magistrov farmacije na Fakulteti za farmacijo	10
Stane Srčič Doktorska disertacija Natalije Zajc	19
Boštjan Debeljak, Jelka Dolinar, Matjaž Jeras Farmacevtski informacijski center pri SFD	29
Milan Skitek 2. simpozij »Izzivi laboratorijske medicine«	33
Diplomanti Fakultete za farmacijo	34
Stane Srčič Doktorska disertacija Mile Božič	108
Stane Srčič Doktorska disertacija Roka Dreua	124
Martina Cvelbar Poročilo s srečanj uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev in Poročilo s Satelitskega simpozija ob 10- obletnici ustanovitve mreže uradnih evropskih kontrolnih laboratorijev	133
Aleš Mlinarič Prve Študijske lekarne v Sloveniji	271
Andrijana Tivadar, Petra Slanc, Bojan Doljak, Borut Štrukelj Novice iz sveta farmacije	30, 134, 207, 269

IZ DRUŠTVENEGA ŽIVLJENJA

Matjaž Jeras Poročilo s skupščine FIP	36
Jelka Dolinar 64. kongres FIP – poročilo	37
Jelka Dolinar 50-let Ljubljanske podružnice pri SFD	39
Ljubica Lovišček 8. Farmaski je za nami	40
Program strokovnih prireditev SFD	42
Jelka Dolinar Simpozij ob 30. skupščini SFD	137
Silvo Koder Poročilo z 10. kongresa Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov(EAHP)	140

Letno kazalo

Tajda Gala Miharija Poročilo z generalne skupščine Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov (EAHP)	141
Julijana Kristl Poročilo o 1 st PharmSciFair & Exhibition	142
Marija Brenčič Izlet seniorjev v Furlanijo Julijsko krajino	142
Zdenko Taušič Farmacevtsko-botanična ekskurzija na Slavnik	144
Osebne vesti (Liljani Cilenšek v slovo)	209
Zdensko Taušič Strokovna ekskurzija v Beograd	210
Andrej Fister Martinovanje 2005 po primorsko	211
Saša Baumbgartner PAT – procesno-analizne tehnologije – poročilo s 17. posvetovanja Tehnološke sekcije	272
Razpis za podelitev društvenih priznanj	272
Program strokovnih prireditev v letu 2006	273
Letno kazalo	277

Abecedno kazalo avtorjev originalnih znanstvenih, preglednih in strokovnih člankov v Farmacevtskem vestniku letnik 56

Avanzo, M.	198	Kunaver, M.	188
Batista Napotnik, T.	103	Lanišnik Rižner, T.	259
Baumgartner, S.	109	Lukač-Bajalo, J.	183, 241
Bedrač, J.	131	Mlinarič Raščan, I.	71, 103
Bele, M.	188	Morgan, T.	153
Božič, B.	250	Mravljak J.	11, 120
Byrne Habič, B.	11, 120	Mrhar, A.	51, 173, 229
Černe, D.	254	Pečar, S.	11, 120
Čufar, A.	51	Planinšek, O.	188
Debeljak, B.	47, 215	Plaper, A.	115
Dolinar, T.	229	Praprotnik, M.	173
Dolžan, V.	83	Puhar, S.	194
Gašperlin, M.	109	Rozman Peterka, T.	221
Gombač Aver, K.	20	Rozman, B.	109
Grabnar, I.	83	Skitek, M.	125
Grubič, Z.	59	Sollner Dolenc, M.	221
Jeras, M.	75, 194	Srčič S.	188
Jović, P.	17	Šabovič, M.	67
Karas Kuželički, N.	183	Šavc, A.	198
Kerec Kos, M.	198	Šorli, J.	171
Kerec, M.	3	Štrukelj, B.	51
Kikelj, D.	78	Šuškovič, S.	147, 153
Kmetec, V.	51	Topol, A.	54
Kočever, N.	202	Trontelj, J.	159
Kos, M.	51	Tršinar, M.	89
Košnik, M.	151	Ule, M.	176
Kristan, K.	259	Vovk, T.	89
Kristl, J.	202	Zadnik, J.	188
Krnjak, L.	125		



SALUS
SALUS, Ljubljana, d.d., Mašera-Spasićeva ul. 10, 1000 LJUBLJANA, tel. 01 58 99 100, faks: 01 56 81 022



Veletrgovina za oskrbo lekarn.

Želimo postati tudi vaš dobavitelj.

Pokličite nas!

telefon: (01) 423 48 25, (01) 423 48 88

telefaks: (01) 423 48 25

Tbilisijska 87 • Ljubljana