

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 3





STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 3 | julij 2022 | letnik 73

ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočevar Glavač

UREDNIŠKI ODBOR:
Žiga Jakopin
Marjetka Korpar
Mitja Kos
Janja Marc
Anja Pišlar
Andrijana Tivadar
Matjaž Tuš
Tomaž Vovk
Alenka Zvonar Pobirk

IZDAJATELJSKI SVET:
Mateja Cvirn Novak
Mirjana Gašperlin
Alenka Karničar
Sara Kenda
Janez Mravljak
Helena Pavšar
Janez Toni

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

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

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

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM
Fotografija na naslovnicu: Shutterstock
Naklada: 3.600 izvodov

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

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

Živimo v turbulentnih časih, ki narekujejo spremembe v strokovnem, zasebnem in družbenem življenju. Bistveno manj je ustaljenih pravil, dogovorov, načrtovanj in pričakovanj. Spremembe se vrstijo ena za drugo, od pandemije do nezanesljivosti dobav surovin in emergentov, nenazadnje tudi zdravilnih učinkovin, brez katerih pač ni na razpolago standardnih, pričakovanih medicinskih izdelkov. Prilagoditve nestabilnemu sistemu lahko vodijo do regulative in sprememb zakonodajnih aktov. Pogosto se spreminjajo odloki, celo zakoni, zato je še posebej pomembno, da se znotraj stroke konsolidiramo in redno zaznavamo vse spremembe, ki bi lahko zmanjšale kakovost, nenadomestljivost in strokovnost farmacevtske stroke v Sloveniji. Največja nevarnost, ki nam preti, pa je pasivnost, zato kot odgovorni urednik Farmacevtskega vestnika z relativnim optimizmom spremjam dejavnosti, ki jih ob močni mentorski podpori izkušenih starejših kolegic in kolegov izvajajo mlajši člani SFD, pa najsi bodo to motivacijski strokovni večeri, delavnice, poskus sprememb na bolje v kolektivih, vnos svežine v predavanjih in podobno. Čas je, da še dodatno povežemo in odpremo možnosti medgeneracijskega sodelovanja znotraj farmacevtske stroke v Sloveniji. Podatek, ki sam po sebi pove ogromno, je izjemno majhna fluktuacija mladih farmacevtskih kadrov v tujino, saj je po nekaterih podatkih ta, v primerjavi z mladimi zdravniki, vsaj desetkrat manjša! Pa še tiste farmacevtke in farmacevti, ki gredo za nekaj časa po nadgradnjo strokovnih izkušenj v tujino, pridejo kmalu nazaj in poskušajo implementirati znanje in izkušnje, ki so jih dobili v tujini, v slovenski prostor. Dajmo jim vse možnosti!

Tudi tretja številka Farmacevtskega vestnika kaže na raznolikost in veliko znanje na različnih področjih znotraj stroke. Tako imamo kar tri izvirne znanstvene članke, od zgodovinskega o lekarnarju Petru Eugenu Sušnju, preko ozaveščenosti nerazdružljivega trikotnika pacient-farmacevt-zdravnik o farmakovigilančnih ukrepih za varno uporabo retinoidov, do študije o poznavanju demence in pomoč pri tem med pacienti v Savinjski regiji.

V okviru preglednih znanstvenih člankov bomo spoznali nove dostavne sisteme na osnovi polimernih nanovlaken, temu sledi članek o semaglutidu, prvemu peroralnemu agonistu receptorjev GLP-1, zanimiv je tudi pregled protibakterijskih spojin z multiplim delovanjem. Ker je vedno več učinkovin proteinskega izvora, je pomemben doprinos članka o analiznih tehnikah vrednotenja stabilnosti proteinov. V času pandemije covid-19 smo bili velikokrat seznanjeni z delovanjem vitamina D kot zmanjševalca prekomernih akutnih vnetnih procesov kot odgovora organizma na vstop virusa, zato je dobradošel članek o razvoju metod za določanje vitamina D v krvi.

Pred nami je dolgo, vroče poletje. Ali gre pripisati vročinske valove predvsem globalnim klimatskim spremembam, sicer še ne vemo natančno, a nekaj je jasno: za stroko bomo veliko naredili, če bomo v senci, ob osvežilni pijači, v miru prebrali to številko Farmacevtskega vestnika, ki ga držite v roki.

V imenu uredniškega odbora vam želim mirne in prijetne poletne dni.

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



VSEBINA / CONTENT

IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

191 Igor Fabjančič, Aleš Obreza

O lekarnarju Petru Eugenu Sušnju in njegovem izvodu knjige Friedricha Wöhlerja

About the pharmacist Petar Eugen Sušanj and his book copy written by Friedrich Wöhler

199 Sara Prelesnik, Nanča Čeborn Lipovec, Mitja Kos

Ozaveščenost pacientk, farmacevtov in predpisovalcev o farmakovigilančnih ukrepih za varno uporabo retinoidov

Awareness of pharmacovigilance measures for safe use of retinoids among female patients, pharmacists and prescribers

210 Teja Glavnik, Brina Felc, Janja Jazbar, Zlata Felc

Poznavanje demence in podpore osebam z demenco med obiskovalci zdravstvenih domov v Savinjski regiji

Knowledge of dementia and support for people with dementia among visitors of health care services in the Savinjska region

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

222 Tanja Potrč, Mateja Erdani Kreft, Petra Kocbek

Polimerna nanovlakna za dostavo učinkovin in regeneracijo tkiv pri zdravljenju raka

Polymer nanofibers for drug delivery and tissue regeneration in cancer treatment

231 Marija Jovanović, Eva Jančič, Miodrag Janić, Andrej Janež, Mojca Lunder

Semaglutid – prvi peroralni agonist receptorjev GLP-1 za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2

Semaglutide – The first oral GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes

241 Martina Durcik, Janez Ilaš

Protibakterijske spojine z multiplim delovanjem

Antibacterial compounds with multiple mode of action

252 Nika Osel, Robert Roškar

Analizne tehnike za vrednotenje (ne)stabilnosti proteinov

Analytical techniques for evaluation of protein (in)stability

261 Katarina Mlekuš Kozamernik, Tomaž Kocjan, Tea Lanišnik Rižner

Pregled razvoja metod za določanje vitamina D v krvi

Development of methods for the measurement of vitamin D in blood – Review

268 DRUŠTVENE VESTI

O LEKARNARJU PETRU EUGENU SUŠNJU IN NJEGOVEM IZVODU KNJIGE FRIEDRICHA WÖHLERJA

ABOUT THE PHARMACIST PETAR EUGEN SUŠANJ AND HIS BOOK COPY WRITTEN BY FRIEDRICH WÖHLER

AVTORJA / AUTHORS:

Igor Fabjančič, mag. farm.¹

prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.²

¹ Lipis, d. o. o., Cesta v Šmartno 35, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,

Katedra za farmacevtsko kemijo,

Askerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

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

1 UVOD

Na razvoj kemije in posledično farmacije so močno vplivala odkritja v prvi polovici 19. stoletja, ki so povsem spremenila takratni način razmišljanja. Prvo prelomnico pomeni Sertürnerjeva izolacija morfina iz opija (1), ko je hkrati dokazal, da

POVZETEK

Petar Eugen Sušanj je bil na prelomu 19. v 20. stoletje lastnik lekarne na Sušaku (danes del Reke), v kateri je bil obiskovalcem na voljo širok nabor zdravil, ki so pokrivala takratno materijo mediko. Ponudbo lekarne lahko spremljamo s prebiranjem Novega lista, v katerem najdemo tudi njegove reklame za precej eksotična zdravila. V času študija in verjetno med poklicnim delom je uporabljal Wöhlerjevi knjigi Osnove anorganske in organske kemije, za kateri lahko na osnovi kritične ocene trdimo, da gre za najbolj kakovostni deli na področju farmacevtske kemije v 19. stoletju.

KLJUČNE BESEDE:

Friedrich Wöhler, Petar Eugen Sušanj, zgodovina farmacije

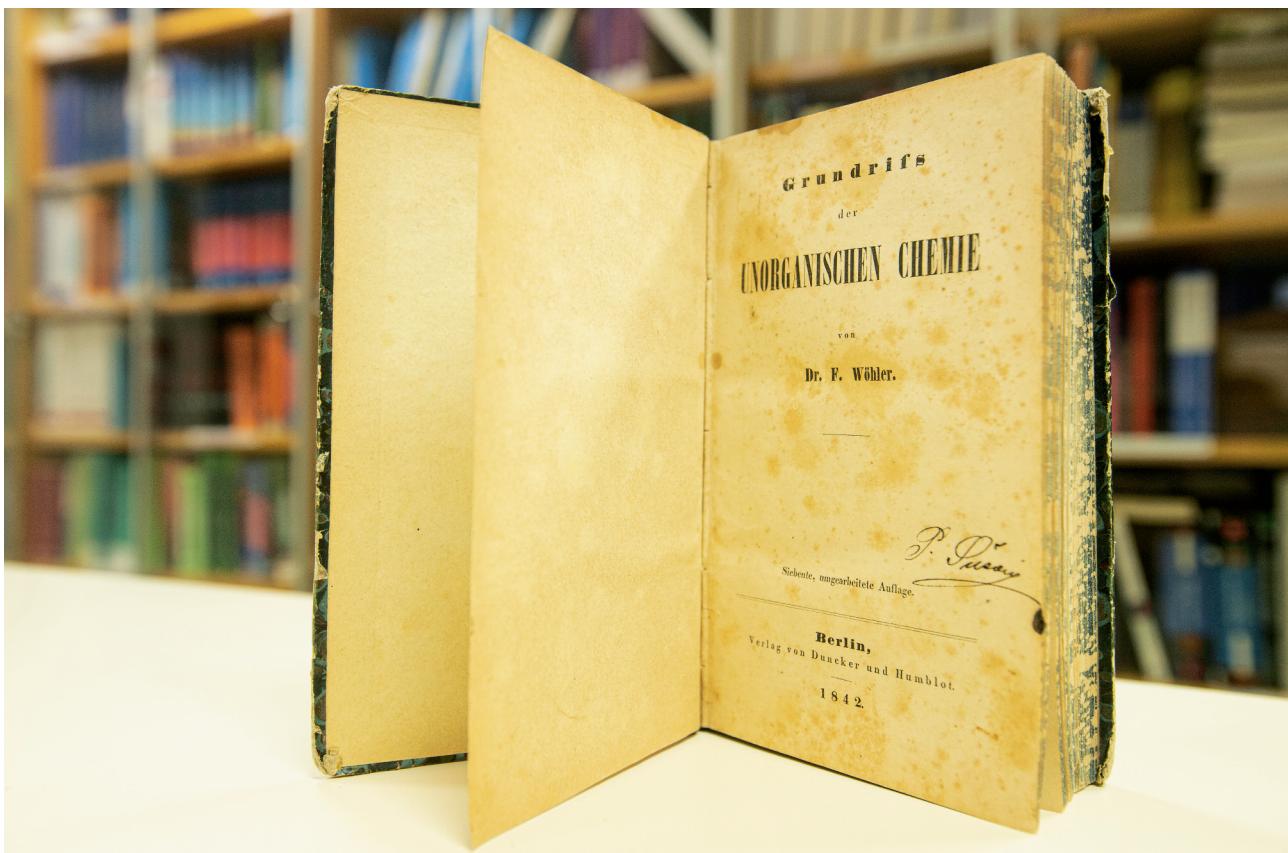
ABSTRACT

At the turn of the 19th and 20th centuries, Peter Eugen Sušanj was the owner of a pharmacy at Sušak (today part of Rijeka, Croatia), which offered visitors a wide range of medicines that covered contemporary *materia medica*. The pharmacy's offer may be followed by reading *Novi list*, which also contains Sušanj's advertisements for rather exotic medicines. During his studies and probably during his professional work, he used Wöhler's book "Fundamentals of inorganic and organic chemistry", which, based on a critical assessment, are the works of the highest quality in the field of pharmaceutical chemistry in the 19th century.

KEY WORDS:

Friedrich Wöhler, history of pharmacy, Petar Eugen Sušanj, 19th century





Slika 1: Naslovna stran knjige »Grundriss der unorganischen Chemie« iz leta 1842 s podpisom lastnika P. E. Sušnja (fotografija: A. Obreza).
 Figure 1: Title page of the book »Grundriss der unorganischen Chemie« from the year 1842 with the signature of its owner P. E. Sušanj (photo: A. Obreza).

nejših Wöhlerjevih knjižnih del, osnov anorganske (slika 1) in organske kemije, ki sta še za njegovega življenja izšli v številnih ponatisih. Nekaj izvodov njegovih knjig, vključno s tu predstavljeno, najdemo tudi na ozemlju današnje Slovenije. Iskanje podatkov o lastnikih predstavljene knjige, ki združuje obe Wöhlerjevi deli (5, 6), nas je privedlo do raziskave o hrvaškem farmacevtu in lekarnarju Petru Eugenu Sušnju, ki je knjigi uporabljal v času svojega šolanja, in o njegovi lekarni. P. E. Sušanj je bil praded soavtorja Igorja Fabjančiča po materini strani, zato je knjiga v njegovi lasti.

2 RAZISKAVA O PETRU EUGENU SUŠNJU IN NJEGOVI LEKARNI

P. E. Sušanj se je kot nezakonski sin rodil leta 1864 materi Zvanki v Bakru in po njej prevzel priimek (7). Mati in sin

edinec sta živela v precejšnjem pomanjkanju, kljub temu pa je z njeno podporo 17. julija 1890 dokončal študij v Zagrebu in se zaposlil kot lekarnar (8). Poročil se je z ladjarjevo hčerko Ano Pajkurić (1872–1953) iz Kostrene in v zadnjem desetletju 19. stoletja od ustanovitelja Milana Katalinića kupil Ljekarno k svetom Trojstvu v palači Bacchich na Reki (10). Leta 1900 je lekarno preselil v palačo Bakarčić–Sušanj (slika 2) na Sušaku, ki je danes sestavni del Reke, med obema vojnoma, ko je Reka pripadala Italiji, pa je jugoslovanski del, Sušak, postal drugo največje ladjarsko središče tedanje kraljevine, takoj za Dubrovnikom. O ureditvi lekarne v novem objektu je »spoštovano publiko« obvestil z oglasom v reškem Novem listu, katerega prve številke so takrat izšle v uredništvu hrvaškega novinarja, časnikarja in politika Frana Supila (1870–1917) (10, 11). Kasneje se je lekarna imenovala Odlikovana ljekarna k sv. Trojstvu in je delovala nekaj desetletij, zagotovo do nacionalizacije leta 1947, morda še kakšno leto dlje (12).



Slika 2: Stara fotografija vhoda v lekarno v pritličju palače Bakarčič–Sušanj (fotografija v lasti I. Fabjančiča).

Figure 2: Old photo of the entrance to the pharmacy on the ground floor of Bakarčič–Sušanj palace (photo owned by I. Fabjančič).

V zakonu z Ano Pajkurić so se mu rodili sinovi Evgen (1897–1915), Leon (1901–1969), Oskar (1899–1986), Janko (1908–1979) in hčerki Josipa (1898–1972) ter Ana, v uradnih dokumentih imenovana tudi Netty (1903–1984); (slika 3).

Vsi sinovi in hčerka Ana so postali farmacevti in so delali v njegovi lekarni. Sin Evgen je umrl mlad, zaradi tuberkuloze, Leon je bil nekaj časa lekarniški provizor, Oskar pa je doktoriral iz farmacije v Padovi in kasneje odprl svojo lekarno. P. E. Sušanj je umrl leta 1929 na Sušaku, kjer je s soprogo, sinovi in snahami pokopan na reškem pokopališču Kozala (13).

Ponudbo Ljekarne k Sv. Trojstvu v prvem desetletju njenega obstoja lahko spremljamo preko reklamnih oglasov v reškem Novem listu. Obiskovalcem so bili med drugim na voljo: Pastile z železom in hemoglobinom, »Edine prave« trsatske želodčne kapljice, Pectoral sirup, Depurativ dr. Larreya, Tenifugo, Venus krema, Venus milo in črnilo za lase. Magister Sušanj naj bi imel na zalogi tudi kakovostno ribje olje norveškega izvora (14).

V Novem listu je bila 27. marca 1900 objavljena reklama za Pastile z železom in hemoglobinom, ki so bile predstavljene kot sredstvo proti »slabosti in bledici.« Vsebovala je nasvet, pri katerih bolezenskih stanjih je smiselno uporabiti to zdravilo. Omenjeni so vsi simptomi, ki kažejo na »pomanjkanje krvi«, kar se opazi z »oslabelostjo telesa, težkim dihanjem, močnim glavobolom, slabo prebavo itd.« Navedene pastile je reklama priporočala tudi za slabotne in rabične otroke (15).

V isti številki Novega lista je izšla tudi reklama za zdravilo, ki smo ga zaradi izrazitega oglaševanja in trditev o njegovi kakovosti podrobnejše preučili. Vsekakor predstavlja zanimiv primer uporabe protimikrobnega zdravila v začetku 20. stoletja, trideset let pred odkritjem sulfanilamidov in penicilinov. P. E. Sušanj ga je poimenoval po odkritelju, nato pa navedel številne vire o njegovi uporabi in precej nekritično dodal tudi izjave njegovih uporabnikov (slika 4). Gre za Depurativ dr. Larreya za spomladansko zdravljenje, v čigar reklami beremo sledeče: »Zdravi bolezni, ki izhajajo iz pokvarjenosti krvi, kot so: škrofuloza, otekline na vratu





Slika 3: Fotografija P. E. Sušnja s sinom Evgenom in hčerkjo Josipo (fotografija v lasti I. Fabjančiča).

Figure 3: Photo of P. E. Sušanj with his son Evgen and daughter Josipa (photo owned by I. Fabjančič).

in po telesu, razne očesne bolezni, vdor krvi v glavo ...« V nadaljevanju zasledimo: »spreminjajoč nečisto kri v zdravo ima najboljše delovanje pri kožnih boleznih, razjedah, kroničnih ranah in srbežu« (10, 15). Depurativ naj bi bil po Sušnjevih besedah edino zdravilo za zdravljenje sifilisa in njegovih posledic.

Gabriela de Franceschi iz Trsta podaja svoje pozitivno pričevanje o učinkovitosti Depurativa dr. Larreya (datirano 16. 9. 1899) z navdušenimi besedami (15): »Od otroštva sem bolehal zaradi zoženja oči in občutka trganja v nogah. Menila sem, da je to posledica pokvarjenosti krvi. Zaradi tega sem tri leta obiskovala toplice v Lipiku, vendar brez uspeha. V časopisu sem brala o vašem depurativu in se ob zdravljenju z njim popolnoma pozdravila. Priporočam vaše izvrstno zdravilo.«

Za proljetno liečenje

Dra. Larey-a Depurativ

Sirup Sarsaparilje sa Jodom

Sredstvo prokušano i odlikovano na medjunarodnim izložbama, u Parizu, Londonu, Bruselju i Trstu, sa zlatnom kolajnom, počasnom diplomom i križem za zasluge.

I. Lieči bolesti koje od pokvarenosti krvi proizlaze, kao što su: škrofule, otekline na vratu i po telu, razne očne bolesti, upale i stih, kod slabog vida, navale krvi u glavu i kod periodične glavobolje, nabuhlosti, teškog hodanja i disanja.

II. Depurativ jedino je sredstvo kod sifiliških te posljive svakojakinj tajnih bolesti i zlih poslijedica istih, kao što je slabost, nemoćnost, trganje u kostima i zglobovima, bolesti i ustiju, te piegam po telu.

III. Depurativ pretvarači nečistu krv u zdravu djeluje najbolje kod bolesti kože, lišaja čirova kod odraslih i kod djece, kroničnim ranama, te srbežu po telu.

Uporabom Dr. Larey-a Depurativa nestane za kratko svih bolesti, kao što svjedoči na stotine priznaniaca.

Liepa Vam hvala na poslatom Depurativu. Grozno trganje po telu i glavobolja prestali su sasma s tim izvrstnim liekom.

Zadar, 24/5 1899.

Julius baron Krauss

Kroz više godina trpim, osobito kod promjene vremena na nesnosnoj uzrokanosti živaca i razdraženosti. Sunulo mi u glavu, oslabio vid; k tomu zadobio tromost u hodaju i slabost u pamćenju. Kušao u proljeće piti Vaš Depurativ, bocu po 3. for. i poslije treće očituo se mnogo bolji. Molim, poslati mi pouzećem s boce.

Zadar, 24/8 1899.

Andrija Nikolić

Odjetinstva bovala sam na suženju očiju i trganju u nogu, mislim da je bila posledica pokvarenost krvi. Uslijed toga polazila sam Lipik kroz tri godine, ali badava. Čital sam u novinah o Vašem Depurativu, te liečenjem istog sasna sam ozdravila Preporučan Vaš izvrstan lek.

Gabriela de Franceschi

Cijena velike boce sa naputkom kruna 6 — male boce kruna 3.—

Pastile željeza i Hemoglobline kod slabosti i blidosti: **pravilni trsat-skini želudčni kapljice. Petoral Sirup** lijek proti kašlu i bolesti pluća **Venus creme, Venus crnilo** za vlasti, itd.

Glavno skladište svih ovih preparata:

Odlikovana ljekarna P. E. Sušanj, Sušak.

Razrašiljanje dnevno na sve strane.

Slika 4: Časopisni oglas za Depurativ dr. Larreya (fotografija v lasti I. Fabjančiča).

Figure 4: Newspaper advertisement of dr. Larrey's Depurative (photo owned by I. Fabjančič).

Dominique Jean Larrey je bil v času napoleonskih vojn vodilni francoski vojaški zdravnik v srednji Evropi in nato v Španiji (16). Pri njegovem depurativu je šlo za izleček sarsaparile z dodanim jodom (Ext. Sarsapariglia jodato). Gre za rastlino *Smilax* sp., ki jo gojijo v srednji in južni Ameriki. Korenike in korenine vsebujejo saponine (predvsem sarsaponin) in fitosterole. Od 16. stoletja dalje je veljala za učinkovito sredstvo proti sifilisu, kar je navedeno tudi v Ameriški farmakopeji v letih od 1820 do 1910. Zelo je bila priljubljena na Divjem zahodu kot sestavina pijač kavbojev (17). V originalni verziji zdravila, ki naj bi delovalo proti sifilisu, pa je namesto joda dodan živosrebrev(II) klorid (mercurium corrosivum) (18). Iz zapisov lahko sklepamo, da je bila Sušnjeva lekarna založena s številnimi zdravili, katerih sestava je pokrivala takratno materijo mediko, na voljo pa so bila tudi nekatera dokaj eksotična zdravila. P. E. Sušanj je v času svojega študija uporabljal tudi deli Fridricha Wöhlerja, ki ju obravnavamo v nadaljevanju prispevka. Glede na ohranjene Sušnjeve komentarje v knjigah lahko sklepamo, da ju je uporabljal tudi v lekarniški praksi.

3 NA KRATKO O FRIEDRICHU WÖHLERJU

F. Wöhler se je rodil 31. julija 1800 v Eschersheimu pri Frankfurtu ob Majni, očetu veterinarju. Že v gimnazijskih letih v Frankfurtu je kazal veliko zanimanje za kemijo in mineralogijo, bral je knjige s teh področij in doma izvajal poskuse. Iz tistih časov izvira njegovo poznanstvo s pesnikom J. W. Goethejem, ki so ga prav tako zanimali minerali in je imel doma bogato zbirko. Kljub temu se je leta 1820 vpisal na študij medicine na Univerzi v Marburgu in se leta kasneje prepisal na Univerzo v Heidelbergu, kjer je leta 1823 uspešno zaključil študij (19, 20). Z medicino se v praksi ni nikoli ukvarjal, saj je že med študijem v Heidelbergu izvajal kemiske eksperimente, pri raziskavah pa ga je spodbujal Leopold Gmelin (21), ki ga je po koncu študija za leto dni poslal na gostovanje k Jönsu Jakobu Berzeliusu v Stockholm (22). Po vrnitvi v Nemčijo je med letoma 1826 do 1831 poučeval kemijo na novo odprti šoli (Gewerbeschule) v Berlinu, do leta 1839 na politehniki v Kasslu, nato je postal profesor kemije na Univerzi v Göttingenu, kjer je ostal do smrti leta 1882. Poročen je bil dvakrat, najprej s svojo sestrično Franzisko Wöhler, po njeni smrti pa z Julijo Pfeiffer. V obeh zakonih so se mu rodili sin in pet hčera (19).

1834 je bil kot tuji član izvoljen v Kraljevo švedsko akademijo znanosti, dvajset let kasneje je postal tuji član londonske Kraljeve družbe, leta 1855 pa član berlinske kraljevske akademije. Posebej za uspehe na področju kemije aluminija sta ga z Redom Legije časti odlikovala francoski cesar Napoleon III in z Redom Pour le mérite pruski kralj Friedrich Wilhelm (23). Leta 1872 je od londonske Kraljeve družbe za svoje znanstvene dosežke prejel Copleyevu medaljo (20). Svojo nadzorno, organizacijsko in izobraževalno vlogo je Wöhler odigral tudi kot direktor göttgenskih laboratoriјev in kot generalni inšpektor dežele Hannover za področje lekarn v letih 1836 do 1848. Med njegovimi študenti lahko posebej omenimo Adolpha Wilhelma Hermanna Kolbeja, Alberta Niemann, Rudolfa Fittiga, Heinricha Limpichta in Georga Ludviga Cariusa. Od navedenih sta bila prva dva še posebej pomembna za farmacevtsko stroko, saj je Kolbe sintezno pripravil salicilno kislino, Niemann pa izoliral kokain iz listov koke (24, 25).

Začetek njegovega raziskovanja na področju kemije predstavlja preučevanje cianatov, zaradi katerih je prišlo do enega izmed najbolj zanimivih sporov v zgodovini kemije z

Justusom Liebigom, ki je že nekaj let pripravljal fulminate. Wöhler je pripravil srebrov cianat ($\text{Ag}^+(\text{N}\equiv\text{C}-\text{O})^-$), ki naj bi bil sol neznane kislino. Rezultati kvantitativne analize elementne sestave so bili enaki, kot pri že predhodno opisani Liebigovi spojini z negativnim nabojem na ogljiku, srebrovem fulminatu ($\text{Ag}^+-(\text{C}\equiv\text{N}^+-\text{O})^-$), videz in lastnosti spojin pa so se razlikovali. Drug drugemu sta očitala, da sta slaba analitika in so zato njuni rezultati napačni. Spor med velikima kemikoma sta razrešila šele Joseph Louis Gay-Lussac in Berzelius, nakar so skupaj postavili osnove izomerije, ki upošteva ne samo število posameznih atomov v molekuli, ampak tudi njihovo razporeditev (26, 27).

Prav proučevanje srebrovega cianata in njegovih reakcij pa je vodilo v pogosto narobe razumljeno odkritje sečnine. Amonijev cianat, ki ga najpogosteje omenjajo kot reagent, je dejansko zgolj intermediat, ki nastane v reakciji med srebrovim cianatom in amonijevim kloridom, oziroma svinčevim(II) cianatom in vodno raztopino amoniaka (3, 28). Berzeliusu je pisal, da »lahko naredi sečnino brez uporabe ledvic katere koli živali, pa naj bo to človek ali pes« (29). Leta 1832 sta z Liebigom objavila raziskavo o olju grenkih mandlijev, v kateri sta s poskusi dokazala, da se benzoilni radikal, »skupina atomov ogljika, vodika in kisika«, v spojinah lahko obnaša kot element in se lahko v njih tudi zamenja z drugimi elementi (30). Razлага seveda kaže na še zelo slabo poznavanje organske kemije v prvi polovici 19. stoletja. V kasnejših letih se je večinoma ukvarjal z anorgansko kemijo, predvsem s silicijevimi spojinami, in odkril pripravo etina iz kalcijskega karbida (31, 32).

Poleg raziskovalnega dela je iz švedščine v nemščino prevedel številna Berzeliusova dela, med njimi Lehrbuch der Chemie v 4 volumnih leta 1825. Napisal pa je med drugim dva učbenika, Osnove anorganske kemije, leta 1831, in Osnove organske kemije, leta 1840. V obeh knjigah, ki sta za avtorjevega življenja izšli v petnajstih oziroma v trinajstih izdajah, se kaže močan Berzeliusov vpliv, sredi 19. stoletja pa sta veljali za najboljša učbenika kemije na svetu. Ohranjena nemška primerka iz zapuščine lekarnarja Sušnja bomo podrobneje predstavili v nadaljevanju prispevka (5, 6).

4 KRITIČNA OCENA WÖHLERJEVIH KNJIG O ANORGANSKI IN ORGANSKI KEMIJI

Knjigi F. Wöhlerja sta lahko berljivi in razumljivi, pisani v nemščini prve polovice 19. stoletja, ki se ne razlikuje bi-



stveno od današnjega nemškega jezika. Vsebini anorganske in organske kemije sta po obsegu primerljivi, kar je po eni strani posledica skoraj enciklopedične vključitve anorganske kemije tistega časa, zelo bogat pa je tudi nabor organskih snovi, ki jih doda še poglavja, ki jih danes uvrščamo v področje anatomije. Gre za kratek, površen in pogosto napačen opis človeškega organizma, nekaterih organskih sistemov (živčevje), organov (oko), tkiv (mišično, kostno tkivo), telesnih tekočin (kri, žolč, želodčni sok) in izločkov (urin). Če primerjamo kakovost njegove knjige s štiri desetletja starejšim Rüdejevim delom (2), opazimo bistven napredok na vseh področjih znanosti, zlasti organske kemije.

Poleg tega Wöhlerja odlikuje zelo natančno delo na področju analize snovi in izmenjava mnenj z Berzeliusom in Liebigom. Večina izračunov elementne sestave anorganskih, pa tudi organskih snovi, je zelo blizu točnim vrednostim, kar je glede na uporabljene metode vrhunski dosežek. Vedeti je treba, da so elementno sestavo večinoma določali in izračunavali na osnovi sežiga snovi in kvantitativne določitve plinskih produktov, kot so voda, ogljikov dioksid in dušikovi oksidi. Okside avtor sicer napačno poimenuje kisline, kot je opisano kasneje. Ob takratni laboratorijski opremi je razumljivo, da so napake, zlasti pri organskih snoveh z molekulsko maso, višjo od 200, lahko precejšnje. Trditev lahko utemeljimo z nekaj primeri pri alkaloidih. Povsem natančno je zapisana empirična formula kinina, $C^{20}H^{24}N^2O^2$. Minimalne so napake pri morfinu, kjer avtor zapiše formulo kot $NH_2 + C^{35}H^{34}O^6$, kar ustreza $C^{35}H^{40}N^2O^6$ in je zelo blizu dvakratnika dejanske strukture $C_{17}H_{19}NO_3$. Kot masne deleže ogljika podaja 72,41 % (pravilno je 71,56), vodika 6,84 (6,71), dušika 5,01 (4,91) in kisika 15,74 (16,82), kar so za prvo polovico 19. stoletja zelo dobri približki. Povsem zgrešena je empirična formula koniina $C^{12}H^{28}N^2O$ (pravilno $C_8H_{17}N$), kar kaže na kontaminiran vzorec, ki ga je preučeval. Pri večini enostavnih organskih kislin, npr. jabolčni, je sestava pravilna, $H + C^4H^4O^4$, kar ustreza $C^4H^6O^5$.

Pisanje kemijskih struktur sredi 19. stoletja še ni bilo definirano, vendar je počasi prevladoval Berzeliusov način zapisa, ki ga je uporabil tudi Wöhler (navedeni primeri zgoraj). Število atomov je nadpisano, poleg tega so s pikami nad simboli atomov definirali njihovo oksidacijsko stanje, oz. število vezanih kisikovih atomov. Prečrtani simboli, ki so zapisani že zgoraj pri morfinu, pomenijo, da je treba upoštevati dvakratnik zapisane strukture (33, 34).

Nomenklatura vključuje trivialna imena anorganskih in organskih spojin, ki jih v večini uporabljamo še danes. Pri anorganskih spojinah ne uporablja poimenovanja z uporabo

oksidacijskih števil, ki je značilno za sodobno IUPAC-nomenklaturo, pač pa uporablja ustrezne predpone hipoziroma hiper- za najnižnje in najvišje oksidacijsko število. Prav tako je že opazno poimenovanje žveplena, žveplova kisline in iz njih izhajajoči sulfiti in sulfati, ki jih zasledimo še danes. Pri soleh včasih uporablja trivialna imena, npr. pelika, hkrati pa tudi drugo, takrat veljavno obliko (kohlen-saures Kali). Za kalijev hidrogenkarbonat uporablja imeni kisli oziroma dvojni (zweifaches kohlensaures Kali). Strukturi sta poleg dveh žveplovinh spojin po Berzeliusu zapisani v sliki 5.

$K\ddot{C}$	kalijev karbonat
$K\ddot{C}^2+\ddot{H}$	kalijev hidrogenkarbonat
\ddot{S}	žveplov(VI) oksid, po Wöhlerju brezvodna žveplova kisline
$\ddot{S}+\ddot{H}$	žveplova(VI) kislina, po Wöhlerju hidratirana žveplova kislina

Slika 5: Nekaj primerov kemijskih struktur po Berzeliusu.

Figure 5: Some examples of chemical structures according to Berzelius.

Anorganske snovi predstavlja na osnovi 55 takrat znanih elementov, razdeljenih med kovine in nekovine. Zanimivo je, da je avtor opazil podobnost med amonijevimi ioni in kationi alkalijskih kovin, zato je tudi amoniak uvrstil med kovine. Organske spojine so razdeljene glede na vir, na spojine rastlinskega (kisline, baze, nevtralne snovi, snovi, ki nastajajo samo v posamezni rastlinski vrsti) in živalskega izvora. Avtor natančno opisuje fizikalne in kemijske lastnosti spojin, med njimi tudi vse, ki jih je vključevala takratna materiala medika, zato je bila knjiga kljub relativno redkim omembam uporabe v terapiji ustrezen vir informacij za le-karnarje.

Kljub večinoma zelo dobrim opisom posameznih snovi, pa opazimo tudi nekatere napake, ki so bile značilne za sredino 19. stoletja. Ker je Wöhler svoji knjigi napisal pol stoletja pred Arrheniusovo teorijo kislin in baz, je razumljivo, da je obravnavata kislin pri njem napačna. Pri kislinah loči brezvodne in hidratirane kisline. Brezvodne ustrezano nekovinskim oksidom, med katerimi je omenjena brezvodna žveplova kislina, ki ustreza žveplovemu(VI) oksidu. Žveplova(VI) kislina, kot jo poznamo danes, je hidratirana žveplova kislina (slika 4). Večkrat v svojem učbeniku anorganske kemije omeni, da je za kislo delovanje odgovoren kisik. Zanimivo je, da je avtor vztrajal pri omenjeni trditvi, čeprav je obravnaval tudi kisline, ki v svoji strukturi nimajo kisika in na to napako ni bil pozoren. Naslednja pomanjkljivost pa je ne razumevanje nekaterih reakcij, ki je prav tako presenetljiva glede na njegovo natančnost. Pri opisu kemijskih reakcij,

primer je sinteza železovega(II) sulfata z raztopljanjem železa v vodni raztopini žveplove kisline, se pojavijo napake zaradi uporabe mas in ne množin reaktantov in produktov pri razlagi reakcij.

Ne glede na pomanjkljivosti, ki so v večini primerov razumljive, če upoštevamo čas nastanka knjige, lahko z govorstvoj trdimo, da sta obravnavani Wöhlerjevi knjigi naj-kakovostnejši deli sredine 19. stoletja na svetu na področju kemije in posledično farmacije. Brez težav ju štejemo za prva sodobna in vsestransko uporabna učbenika, ki so ju pri svojem delu uporabljali številni kemiki in lekarnarji druge polovice 19. stoletja.

5 SKLEPI

Raziskava o P. E. Sušnju nas privede do zaključka, da je na prelomu 19. v 20. stoletje vodil lekarno, v kateri so bila na voljo zdravila, ki so vsebovala najpomembnejše takrat uporabljane zdravilne učinkovine. Skladno s sočasno izrazito tržno naravnostjo lekarniškega poklica je s številnimi reklamami v lokalnih tiskanih medijih uspešno skrbel za promocijo svoje lekarne. Pri študiju in zagotovo tudi kasneje pa je uporabljal najbolj kakovostna priročnika farmacevtske kemije tistega obdobja.

6 ZAHVALA

Avtorja se za pripravo slik 1, 2 in 3 zahvaljujeta Želiku Stenvaniču.

7 LITERATURA

- Krbavčič A, Pečar S. Od prve objave odkritja morfina (1805) do njegovega mednarodnega priznanja (1817). Farm Vestn. 2017;68(5):315–25.
- Kraner K, Obreza A. Iz zakladnice Slovenskega farmacevtskega društva: knjiga Farmacevtska dognanja iz leta 1804. Farm Vestn. 2018;69(5):329–34.
- Wöhler F: Über die künstliche Bildung des Harnstoffs. Poggendorffs Ann Phys Chem. 1828;12(2):253–256.
- Kinne-Safran E, Kinne RKH. Vitalism and synthesis of urea. From Friedrich Wöhler to Hans A. Krebs. Am J Nephrol. 1999;19(2):290–94.
- Wöhler F. Grundriss der unorganischen Chemie. 7. Auflage. Berlin: Verlag von Duncker und Humblot; 1842. 194 p.
- Wöhler F. Grundriss der organischen Chemie. 2. verbesserte und vermehrte Auflage. Berlin: Verlag von Duncker und Humblot; 1841. 174 p.
- Zvanka Sušanj iz Bakra zahtjev o izgradnji pećnice. Arhiv u Rijeci, sumarni inventar. Gradsko poglavarstvo Bakar, 1468–1941. Leto 1873, škatla 16, dokument št. 1085.
- Juretić D, Zorc B. Spomenica u povodu 135. obljetnice nastave farmacije. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2017. 512 p.
- Lukežić I, Obitelj Pajkurić. Sušačka revija. 2009; 61:123–30.
- Dugac Ž. Zdravstveno prosjećivanje kroz medicinsku reklamu u prvim brojevima Novog lista. v: Škrobonja A. Medicina svud oko nas. Rijeka: Digital point tiskara; 2008. p. 155–77.
- Žic I. Povijest jedne iluzije. Sušačka revija. 2008;58:59:23–32.
- Muzur A. Nezavršena povijest medicine u Rijeci. Priča o gradu, ljudima i profesiji, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Hrvatsko znanstveno društvo za povijest zdravstvene kulture. Rijeka: Naklada Kvarner; 2013. 309 p.
- Muzur A. O petstosetdesetpetoj obljetnici prvog spomena apothecariusa u Rijeci, Acta Med Hist Adriat. 2012;10(2):327–30.
- Dugac Ž, Škrobonja A. Zdravstveno prosjećivanje kroz medicinsku reklamu u prvim brojevima Novog lista, Acta Fac Med Fluminensis. 2000;25(1–2):11–7.
- Za proljetno liječenje Dr. Lareya Depurativ. Oglas. Novi list. 27. marec 1900, p. 4.
- Brewer LA. Baron Dominique Jean Larrey (1766–1842). Father of modern military surgery, innovator, humanist. J Thorac Cardiovasc Surg. 1986;92(6):1096–8.
- Fetrow CW, Avila JR. Professional 's handbook of complementary & alternative medicines, 2nd Ed. Pennsylvania: Springhouse; 2001. p. 689–92.
- de Gassicourt CL. Xarabe depurativo del Dr. Larrey. Formulario magistral y memorial farmaceutico, Cuarto edicion corregida y ammentada. Madrid: Ibarra, impresor de Camara de S.M; 1822. 444 p.
- Kauffman GB, Chooljian SH. Friedrich Wöhler (1800–1882), on the bicentennial of his birth. Chem Educ. 2001;6(4):121–33.
- Keen R. The life and work of Friedrich Wöhler (1800–1882). Nordhausen: Verlag Traugott Bautz GmbH; 2005. 490 p.
- Stumm PR, Leopold Gmelin (1788–1853), Leben und Werk eines Heidelberger Chemikers. [Internet] Universität Heidelberg: 2011. [Cited 2021 Sept 21] 644 p. Available from: <https://doi.org/10.11588/heidok.00012836>.
- Wishniak J. Jöns Jacob Berzelius A guide to the perplexed chemist. Chem Educ. 2000;5(12):343–50.
- Wöhler F. Ueber das Alumnum. Ann Phys Chem, 1818;11(1):146–61.
- Kolbe H. Über Synthese der Salicylsäure. Liebigs Ann Chim. 1860;113(1):125–7.
- Niemann A. Ueber eine neue organische Base in den Cocablättern. Arch Pharm. 1860;153(2):129–55.
- Esteban S. Liebig–Wöhler controversy and the concept of isomerism. J Chem Educ 2008;85(9):1201–3.
- Kurzer F. Fulminic acid in the history of organic chemistry. J Chem Educ 2000;77(7):851–7.
- Cohen PS, Cohen SM. Wöhler's Synthesis of Urea: How Do the Textbooks Report It? J Chem Educ 1996;73(9):883–6.



29. Wöhler F, Liebig J. Untersuchungen ueber die Natur der Harnsaeure. *Ann Chem.* 1838;26(3):241–336.
30. Wöhler F, Liebig J. Untersuchungen ueber das Radikal der Benzoësaeure. *Ann Chem.* 1832;3(3):249–82.
31. Deville H, Wöhler F. Erstmalige Erwaehnung von Si₃N₄. *Liebigs Ann Chem.* 1857;104(3):256.
32. Wöhler F. Bildung des Acetylens durch Kohlenstoffcalcium. *Ann Chem Phar.* 1862;124(1):220.
33. Rocke AJ. The reception of chemical atomism in Germany. *Hist Sci Soc.* 1979;70(4):519–36.
34. Wiswesser WJ. Historic development of chemical notations. *J Chem Inf Comput Sci.* 1985;25(3):258–63.

OZAVEŠČENOST PACIENTK, FARMACEVTOV IN PREDPISOVALCEV O FARMAKOVIGILANČNIH UKREPIH ZA VARNO UPORABO RETINOIDOV

AWARENESS OF
PHARMACOVIGILANCE MEASURES
FOR SAFE USE OF RETINOIDS
AMONG FEMALE PATIENTS,
PHARMACISTS AND PRESCRIBERS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Sara Prelesnik, mag. farm.

asist. dr. Nanča Čebron Lipovec, mag. farm.

prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: nanca.cebron.lipovec@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Retinoidi so derivati vitamina A, ki jih uporabljamo za zdravljenje kožnih bolezni, kot so hude akne, ekcemi, luskavica, psoriaza, in za zdravljenje nekaterih oblik raka. Zaradi teratogenosti je njihova uporaba med nosečnostjo kontraindicirana, vendar se uporaba med nosečnostjo kot tudi primeri prirojenih okvar ploda v klinični praksi še pojavljajo. Evropska agencija za zdravila je zato razvila farmakovigilančni program za preprečevanje nosečnosti pri uporabnicah retinoidov. V mednarodni raziskavi v osmih evropskih državah smo ovrednotili, v kolikšni meri se pacienti in zdravstveni delavci zavedajo tveganja uporabe retinoidov pri ženskah v rodni dobi ter v kolikšni meri poznajo in izvajajo ukrepe farmakovigilančnega programa. V članku predstavljamo rezultate za Slovenijo v primerjavi s povprečjem vseh osmih evropskih držav. Rezultati kažejo, da je v Sloveniji ozaveščenost o teratogenosti tako med zdravstvenimi delavci kot med pacientkami visoka, a sta uporaba informativnih gradiv in izvajanje preventivnih ukrepov za preprečevanje nosečnosti le delno vpeljana v vsakodnevno klinično prakso.

KLJUČNE BESEDE:

farmakovigilančni ukrep, nosečnost, retinoidi, teratogenost

ABSTRACT

Retinoids are compounds derived from vitamin A. They are used in the treatment of many dermatological conditions such as severe acne, eczema and psoriasis, and for certain cancers. Due to teratogenicity, the usage during pregnancy is contraindicated. As usage during pregnancy and cases of congenital malformations continue to occur, the European Medicines Agency implemented a pregnancy prevention programme. To determine patients' and healthcare professionals' awareness of teratogenic potential and their adherence to risk minimisation measures, an international study in eight European countries was conducted. This article represents results for Slovenia compared to mean data for eight European countries. The study has shown high awareness of teratogenic potential among Slovenian patients and healthcare professionals, while on the other hand, prevention mea-



sures and the usage of educational material are not fully incorporated in daily clinical practice.

KEY WORDS:

pharmacovigilance measure, pregnancy, retinoids, teratogenicity

ALI STE VEDELI?

- Prijene okvare ploda pri uporabi retinoidov med nosečnostjo so posledica nenormalne migracije in diferenciacije celic nevralnega grebena (1).
- Relativno tveganje za prijene okvare v primeru uporabe izotretinoina med nosečnostjo je primerljivo z relativnim tveganjem uporabe talidomida in znaša 26 % (2).
- Farmakovigilančni program za preprečevanje nosečnosti pri uporabnicah retinoidov so vpeljali po celem svetu že leta 1988 in ga leta 2018 posodobili in nadgradili (2).
- Primeri izpostavljenih nosečnic se kljub ukrepom še vedno pojavljajo. Med leti 2003 in 2004 so v 22 državah Evropske unije zabeležili 143 primerov nosečnic, izpostavljenih retinoidom, 147 primerov pa so zabeležili v Franciji med leti 2003 in 2006. Za 103 primere iz Francije so znani izidi nosečnosti, in sicer je sedem nosečnic splavilo, 73 se jih je odločilo za umetno prekinitev nosečnosti, 23 otrok pa je bilo živorojenih. Leta 2017 so v Švici poročali, da je letno 4–9 nosečnic izpostavljenih retinoidom (10, 11, 17).

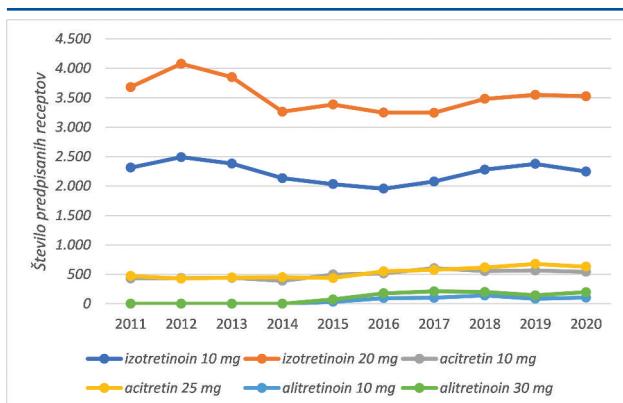
1 UVOD

1.1 PRIMER IZ PRAKSE

Dva tedna staro dojenčico so obravnavali zaradi številnih prijrenih okvar. Preiskave so pokazale hipoplazijo ušesa, šum na srcu zaradi nepopolne zapore arteriozjnega duktusa, generalizirano mišično hipotonijo, odsotnost sesalnega refleksa in blag hidrocefalus. Pri štirih mesecih je dojenčica nepričakovanovo umrla. Pregled zgodovine zdravljenja z zdravili je pokazal, da so mati zdravili z izotretinoynom zaradi hudih cističnih aken. Zdravilo je jemala prve tri dni po zapositvi, preden je izvedela, da je noseča (1).

1.2 RETINOIDI IN TERATOGENOST

Izotretinooin je derivat vitamina A, ki so ga začeli uporabljati za zdravljenje hudih aken v Združenih državah Amerike leta 1982, leto kasneje pa tudi v Evropi (2, 3). Danes zdravila z retinoidi uporabljamo peroralno in lokalno na koži za zdravljenje aken, hudih kroničnih ekcémov rok, luskavice, motnje poroževanja in nekaterih rakavih sprememb, kot so kožna manifestacija T-celičnega limfoma, akutna promielocitna levkemija ter kožne lezije pri bolnikih s Kaposijevim sarkomom (4–6). Na slovenskem trgu so registrirane učinkovine **acitretin, izotretinooin, alitretinooin, tretinooin, adapalen** in **beksaroten**. Najbolj pogosto predpisani peroralni retinoid v Sloveniji je izotretinooin (slika 1). Do decembra 2020 je za izotretinooin in alitretinooin veljala omejitev predpisovanja in izdaje za ženske v rodni dobi za en mesec zdravljenja, v sedmih dneh po predpisu dermatologa. Z novo omejitvijo se opušča časovna omejitev, in sicer je predpisovanje teh dveh učinkovin od decembra 2020 omejeno na dermatologe in za hujše oblike aken po neuspešnem sistemskem zdravljenju (izotretinooin) oz. le za hud kronični ekzem rok (alitretinooin) (7).



Slika 1: Število predpisanih receptov s peroralnimi retinoidi v letih 2011–2020 (8).

Figure 1: Number of prescriptions for oral retinoids from 2011–2020 (8).

Ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) retinoide uvršča v skupino X sistema nosečnostnih kategorij, saj lahko povzročijo spontani splav oz. t. i. embriopatijo retinojske kisline, ki vključuje okvare centralno-živčnega sistema, glave, srčno-žilnega sistema in priželjca. Tudi lokalna uporaba zdravil z retinoidi med nosečnostjo ni dovoljena, čeprav predstavlja zaradi majhne sistemske absorpcije majhno tveganje za okvare ploda (2, 3).

1.3 PROGRAM ZA PREPREČEVANJE NOSEČNOSTI

Kljub opozorilom o teratogenosti so se primeri novorjenčkov s prirojenimi okvarami pojavljali, zato so leta 1988 po celiem svetu vpeljali program za preprečevanje nosečnosti, ki je zadeval patientke in predpisovalce (3). Prve verzije informativnega gradiva so zajemale brošuro z informacijami za bolnike, vodnik o kontracepciji, vodnik za zdravnike, kontrolni seznam in potrditveni obrazec za predpisovanje zdravila (10). Leta 2003 je prišlo do harmonizacije programa za vsa generična zdravila z izotretinoinom. Med informativna gradiva so dodali **vodnik za farmacevte** in poglobljeno izobraževalno gradivo za patientke (3, 10). Program se je kasneje razširil tudi na acitretin in alitretinoin (9). Ukrepi pa se v praksi še vedno niso izvajali v zadostni meri. Med leti 2003 in 2006 so v Franciji odkrili 147 izotretinoinu izpostavljenih nosečnic. Sedem nosečnic je splavilo, 73 se jih je odločilo za umetno prekinitev nosečnosti, 23 otrok je bilo živorjenih, za preostalih 44 primerov pa izidov ne poznamo. Okvare, ki so jih odkrili, so vključevale agenejzijo verpisa, intraventrikularno septalno okvaro, okvare spolovil, motnje govora in učenja (11). Na Nizozemskem so med leti 1999 in 2007 odkrili 51 žensk, izpostavljenih izotretinoinu v obdobju 30 dni pred zanositvijo oz. med nosečnostjo. V treh primerih je prišlo do splava, v dveh pa do prirojenih okvar (12).

Leta 2018 je Odbor za oceno tveganja na področju farmakovigilance (PRAC, *Pharmacovigilance risk assessment committee*) opravil pregled ukrepov za preprečevanje nosečnosti za zdravila z retinoidi. Ugotovili so, da so se primeri nosečnic, izpostavljenih retinoidom, še vedno pojavljali in da izobraževalna gradiva za zdravila z enako zdravilno učinkovino oz. med posameznimi člancami Evropske unije niso poenotena. Na podlagi mnenja PRAC je Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini (CHMP, *Committee for medicinal products for human use*) pri Evropski agenciji za zdravila zahteval posodobitev ukrepov. Posodobljeno navodilo za uporabo je sedaj opremljeno s **QR-kodo**, ki služi kot vir podrobnih informacij o zdravilih z retinoidi, na pakiranju je **opozorilni znak**, ki prepoveduje uporabo zdravila med nosečnostjo, zdravstveni delavci pa lahko posodobljene informacije o teratogenosti dobijo v **neposrednem obvestilu za zdravstvene delavce** (DHPC, *Direct healthcare professional communication*). V uporabo je prišla **opozorilna kartica za bolnico** (*patient reminder card*), ki poudarja ključne informacije o teratogenosti in ukrepih za preprečevanje zanositve in je opremljena s preglednico obiskov

pri zdravniku. **Potrditveni obrazec za predpisovanje zdravila** (*risk acknowledgement form*) je oblikovan kot kontrolni seznam, ki predpisovalca vodi skozi razpravo s patientko, **kontrolni seznam za farmacevte** (*pharmacist checklist*) pa zagotovi, da ta pred izdajo poda informacije o varni uporabi zdravila in ravnanju z neporabljenimi tabletami ter upošteva omejitve izdane količine za 30 dni (slika 2) (9, 13).

2 NAMEN

Namen naše raziskave je bil oceniti ozaveščenost patientk in zdravstvenih delavcev o teratogenosti retinoidov in ugotoviti, v kolikšni meri so ukrepi farmakovigilančnega programa za preprečevanje nosečnosti Evropske agencije za zdravila implementirani v klinično praksu. Mednarodno farmakovigilančno raziskavo je v Sloveniji vodila Katedra za socialno farmacijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3 METODE

Mednarodna presečna raziskava je vključevala patientke, zdravljenje s peroralnimi retinoidi, farmacevte in zdravnike iz osmih evropskih držav (Slovenija, Belgija, Danska, Nizozemska, Grčija, Portugalska, Španija in Latvija). Udeleženci so bili povabljeni k izpolnitvi spletnega vprašalnika preko portala LimeSurvey, ki je zajemal različne sklope, vezane na ozaveščenost in implementacijo ukrepov za preprečevanje nosečnosti ob zdravljenju z retinoidi, in je zajemal tako vprašanja zaprtega kot odprtrega tipa. Vprašalnik je bil razvit centralno v angleškem jeziku in pilotno testiran na Danskem, končni vprašalnik pa preveden v nacionalne jezike skladno s protokolom za prevajanje.

Vprašalnik za patientke obravnava:

- zavedanje o tveganju in vire informacij,
- poznavanje in uporabo informativnega gradiva,
- posvet o kontracepciji in uporabljeno metodo,
- testiranje nosečnosti pred in med terapijo ter po njej,
- morebitno nosečnost med terapijo in spremembe terapije zaradi nosečnosti.



15.04.2019

Neposredno obvestilo za zdravstvene delavce

Retinoidi: posodobitev informacij o teratogennosti nevropsihiatričnih motnjah

OPOZORILNA KARTICA ZA BOLNIKA

Izobraževalno gradivo je pripravljeno z namenom zagotavljanja varne in učinkovite uporabe zdravila ter izboljšanja njegovega učinka.

KONTROLNI SEZNAM ZA FARMACEVTE
NAVODILA ZA IZDAJANJE ZDRAVILA

Roaccutane® izotretinojn

Izobraževalno gradivo je pripravljeno z namenom zagotavljanja varne in učinkovite uporabe zdravila ter izboljšanja njegovega učinka.

Povzetek informacij o teratogenosti

Bolnica razumlje, da je dobro potrditi, da bo zdravila uporabljena v skladu z navodili.

Testi nosečnosti:

Zenske v rodni dobi? Da/Ne

Zenske v rodni dobi?

OPOZORILO LAHKO RESNO ŠKODUJE NEROJENEMU OTROKU

Zenske morajo uporabljati zanesljivo kontracepcijo.

Ne uporabljajte, če ste noseči ali če mislite, da ste noseči.

Slika 2: Primeri informativnih gradiv, dostopnih v Sloveniji.
Figure 2: Educational materials available in Slovenia.

Vprašalnik za zdravstvene delavce vrednoti:

- zavedanje in vire informacij o teratogenosti,
- seznanjenost z regulatornimi priporočili in njihov vpliv na znanje, prakso, predpisovanje oz. izdajanje,
- implementacijo programa ter spremembe v predpisovanju/izdajanju po letu 2018,
- postopke ob predpisovanju in izdajanju (uporaba informativnih gradiv, mesečni kontrolni pregledi, testiranje nosečnosti, svetovanje o kontracepciji, ukrepi v primeru zanositve).

V raziskavo smo vključili **ženske** v rodni dobi, stare med 15 in 50 let, ki jemljejo ali so jemale peroralne retinoide, **farmacevte**, ki so vsaj enkrat izdali ali svetovali o zdravilu s peroralnim retinoidom ženski v rodni dobi, ter **specialiste ali splošne zdravnike**, ki so vsaj enkrat predpisali zdravilo s peroralnim retinoidom ali o njem svetovali ženski v rodni dobi.

Zdravstveni delavci so bili k sodelovanju povabljeni preko neposrednih stikov, elektronskih sporočil in oglasov, objavljenih na strokovnih spletnih straneh, družbenih omrežjih,



v raznih glasilih, na straneh regulatornih agencij za zdravila in farmakovigilančnih centrov. Pacientke so bile k sodelovanju povabljene preko oglasov na družbenih omrežjih in raznih forumih ter neposredno preko zdravstvenih delavcev, ki so bili zaprošeni, da uporabnike retinoidov kontaktirajo oz. jim izročijo zgibanke s povezavo do vprašalnika. V Sloveniji smo **pacientke** k sodelovanju vabili preko zdravnikov oz. farmacevtov, socialnih omrežij in elektronskih sporočil, **farmacevte** preko Slovenskega farmacevtskega društva, mreže mentorjev praktičnega usposabljanja in neposrednih stikov, **zdravnike** pa preko Zdravniške zbornice in elektronskih sporočil, poslanih zasebnikom, specialistom ter direktorjem psihiatričnih in ginekoloških klinik in zdravstvenih domov. V večini držav, vključno s Slovenijo, je anketiranje potekalo od sredine marca 2020 (izjema sta Španija in Nizozemska, kjer so z anketiranjem pričeli maja oz. junija 2020) in se je zaključilo v septembru 2020.

4 REZULTATI

4.1 VZOREC

Vzorec so sestavljale tri subpopulacije (pacientke, farmacevti in zdravniki), ki smo jih anketirali in analizirali ločeno (slika 3). V raziskavo je bilo vključenih 30 slovenskih **pacientk**, katerih povprečna starost je znašala 27 let, večina (77 %) je bila zdravljenih z izotretinozinom, v manjši meri pa z acitretinom (20 %) in alitretinozinom (3 %). V

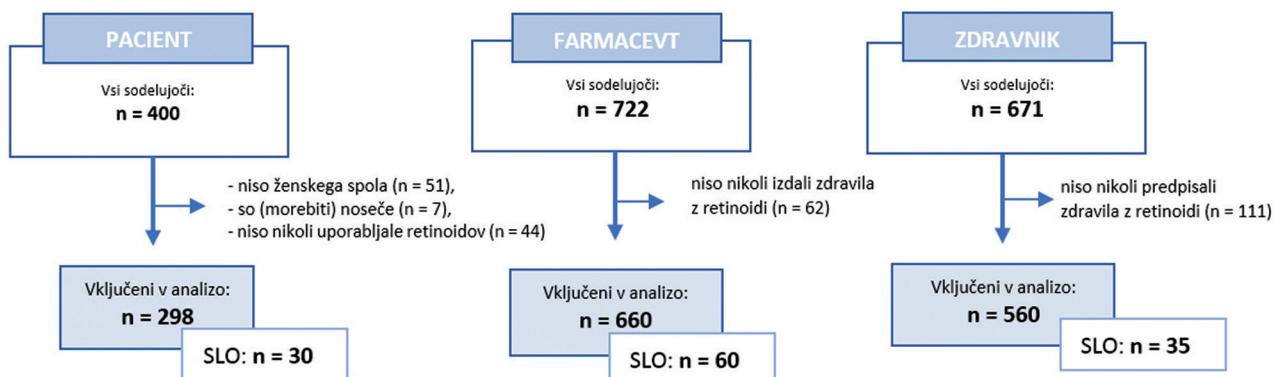
Sloveniji je sodelovalo 60 **farmacevtov**, zaposlenih v zunanjih lekarnah, in 35 **zdravnikov**. Subpopulacijo zdravnikov so sestavljali dermatologi (71 %), zdravniki družinske medicine (9 %) ter ginekologi, psihiatri in nevrologi (20 %).

4.2 ZAVEDANJE TVEGANJA

Rezultati raziskave so pokazali, da je ozaveščenost o teratogenosti retinoidov v Sloveniji med pacientkami, predvsem pa med zdravstvenimi delavci, visoka. 83 % slovenskih pacientk, vseh 60 vključenih farmacevtov in 94 % sodelujočih zdravnikov se zaveda teratogenosti. **Pacientke** so navedle, da jih je s tveganjem največkrat (92 %) seznanil dermatolog, skoraj polovica (48 %) jih je kot pomemben vir navedla tudi farmacevta. **Farmacevti** so se s teratogenostjo retinoidov seznanili predvsem preko proizvajalcev (npr. v tiskanem ali elektronskem gradivu) (53 %), med diplomskim študijem (47 %), podiplomskim študijem in strokovnimi izobraževanji (38 %), **zdravniki** pa preko proizvajalcev (58 %), podiplomskega študija oz. strokovnih izobraževanj (55 %), simpozijev, konferenc in kolegov (42 %).

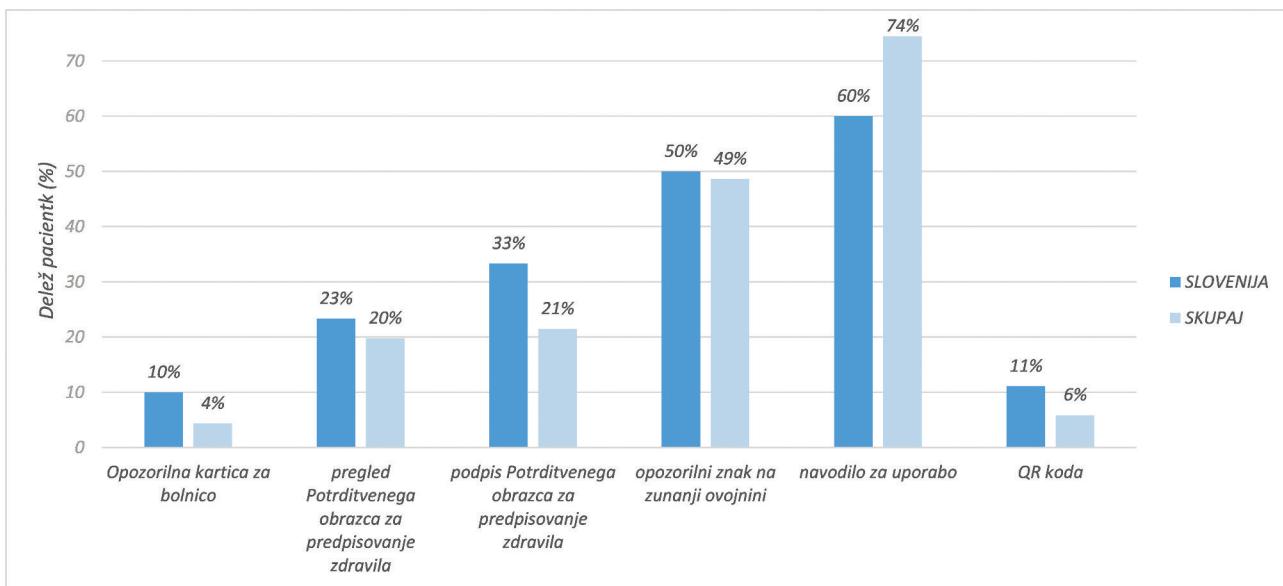
4.3 UPORABA INFORMATIVNIH GRADIV

Kot je razvidno s slike 4, je najbolj pogosto uporabljano gradivo med **pacientkami** navodilo za uporabo zdravila. Kljub temu, da ga je prebralo 60 % pacientk, jih je le 11 % opazilo QR-kodo. Polovica vprašanih patientk je opazila



Slika 3: Vzorec oseb vključenih v analizo.

Figure 3: Study sample included in the analysis.



Slika 4: Vrsta uporabljenega informativnega gradiva med pacientkami.

Figure 4: Type of educational materials used among patients.

opozorilni znak na ovojnini, tretjina pa jih je podpisala potrditveni obrazec za predpisovanje zdravila.

Po mnenju **farmacevtov** je najbolj uporaben opozorilni znak na ovojnini, ki jih opomni na potrebo po ustreznom svetovanju (slika 5), koristne informacije pa jih je tretjina prejela iz pisma DHPC. Uporaba gradiv neposredno ob izdaji je redka – le 17 % farmacevtov uporabi Kontrolni seznam za farmacevte, ki se jim pogosto zdi nesmiseln oz. časovno potraten, saj ni dostopen neposredno preko računalniške povezave na ekranu. Zaradi nedostopnosti v lekarni oz. ob izdaji redko ponudijo opozorilno kartico za bolnico. Svetovanje ovira tudi dejstvo, da pacientke niso pripravljene prisluhniti svetovanju, češ da informacije že poznajo.

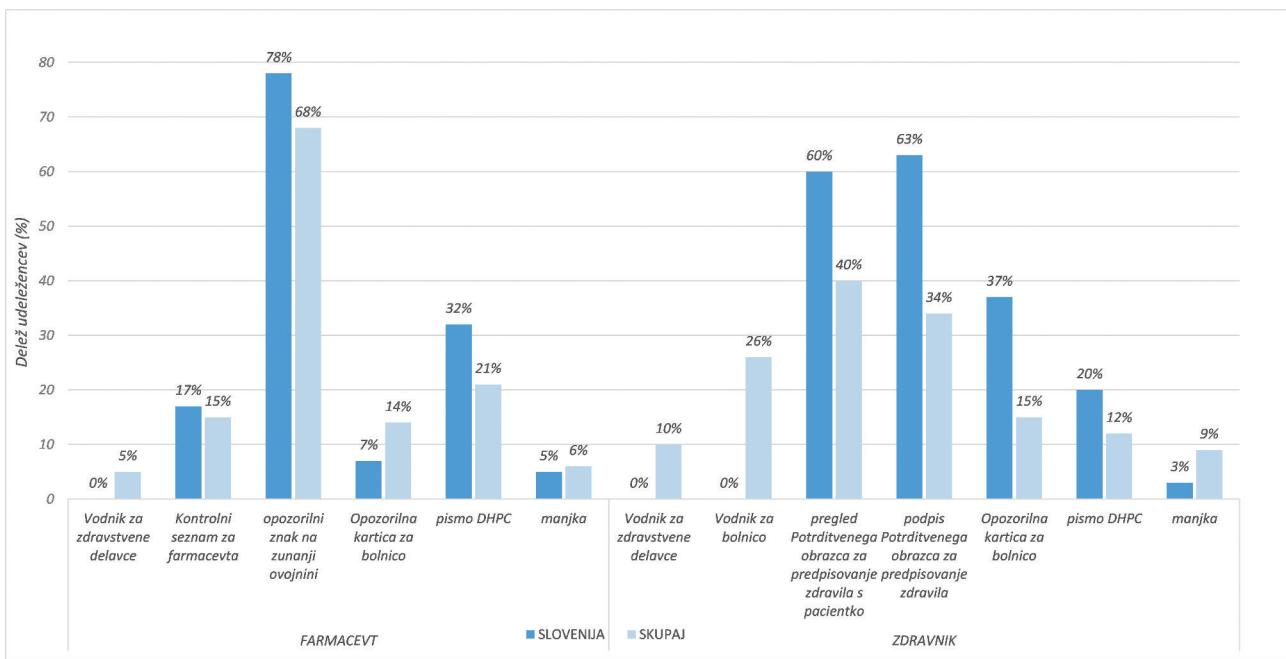
Šestdeset odstotkov **zdravnikov** je potrditveni obrazec za predpisovanje zdravila pregledalo skupaj s patientko, podoben odstotek jih je patientko prosilo, naj obrazec podpiše. V primerjavi z ostalimi državami je pri nas precej visok odstotek zdravnikov, ki so patientki izročili opozorilno kartico za bolnico, čeprav je ta med pacientkami manjkrat omenjena kot pomemben vir informacij o tveganju. Neuporaba gradiv med zdravniki izhaja iz prepričanja, da tovrstna gradiva povečujejo birokracijo oz. so nesmiselna, neuporabna, nedostopna ali neznana. Menijo, da so gradiva predolga, prestrašijo patientke in povečajo odpor do terapije. Ker pacientke gradivo pogosto založijo, je včasih informacije bolj smiselno podajati ustno.

4.4 UPORABA KONTRACEPCIJSKE ZAŠČITE IN TESTIRANJE NOSEČNOSTI

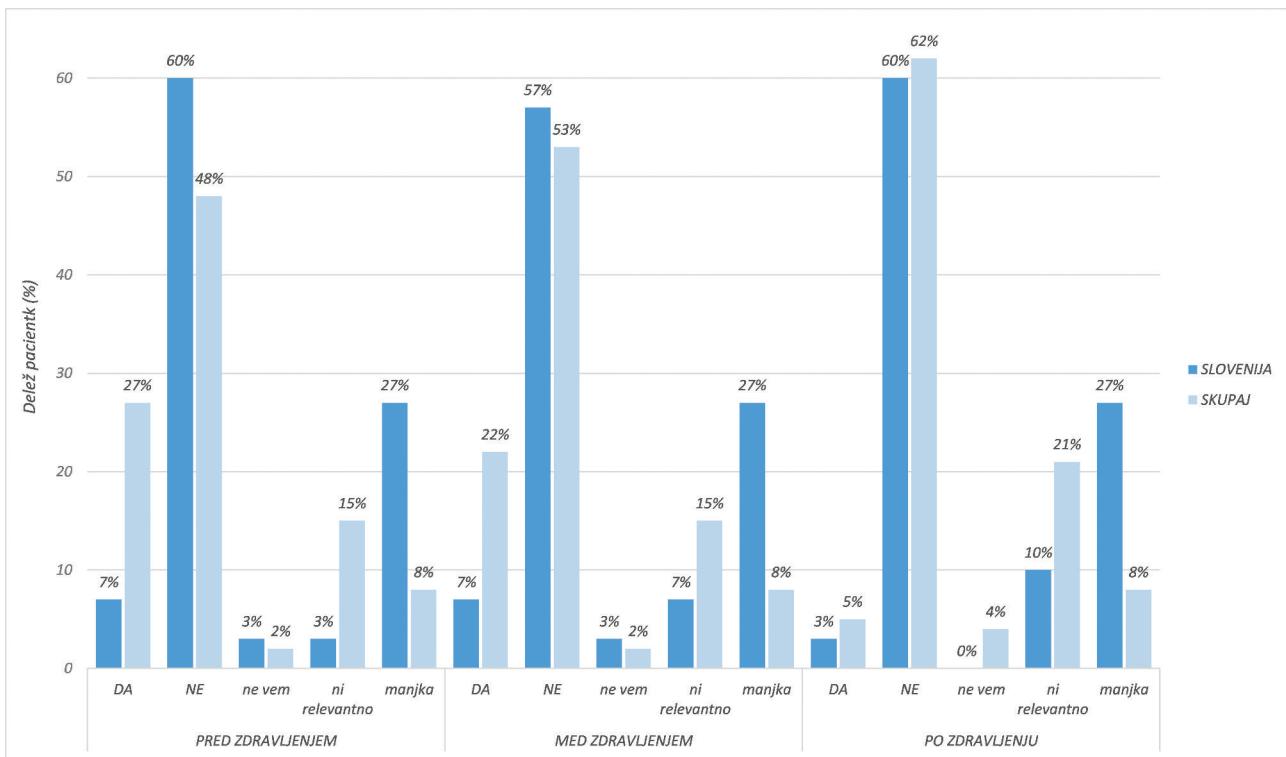
Program za preprečevanje nosečnosti določa, da mora pacientka neprekiniteno uporabljati kontracepcijo zaščito najmanj en mesec pred začetkom, med zdravljenjem in še en mesec po zaključku zdravljenja (oz. tri leta v primeru acitretina). Uporabljati mora vsaj eno zelo zanesljivo metodo kontracepcije (sterilizacija, hormonska kontracepcija, kontracepcijski vsadek, maternični vložek) ali dve manj zanesljivi metodi (kondom, prekinitev spolnega odnosa, jutranja tabletka). Prav tako se pred in med zdravljenjem ter en mesec po zaključku zdravljenja (oz. tri leta v primeru acitretina) zahteva redno izvajanje testov nosečnosti (4, 13).

V obdobju anketiranja je 27 % pacientk uporabljalo kontracepcijo, kar je skoraj pol manj od povprečja vseh osmih držav (53 %). Upoštevati moramo, da se eni od desetih pacientk uporaba kontracepcije ne zdi relevantna (npr. ker ni spolno aktivna) in je vzorec slovenskih pacientk relativno majhen, zato morda ne odraža stanja v splošni populaciji. Podatki iz literature kažejo, da je odstotek Slovenc, ki uporabljajo kontracepcijo, višji (50 %) in primerljiv z evropsko prevalenco (56 %) (14).

Test nosečnosti je pred in med zdravljenjem izvedlo le 7 % pacientk. Tudi v drugih državah večina pacientk ne izvede



Slika 5: Vrsta uporabljenega informativnega gradiva med farmaceuti in zdravniki; DHPC – neposredno obvestilo za zdravstvene delavce.
Figure 5: Type of educational materials used among pharmacists and prescribers; DHPC – Direct Healthcare Professional Communication.



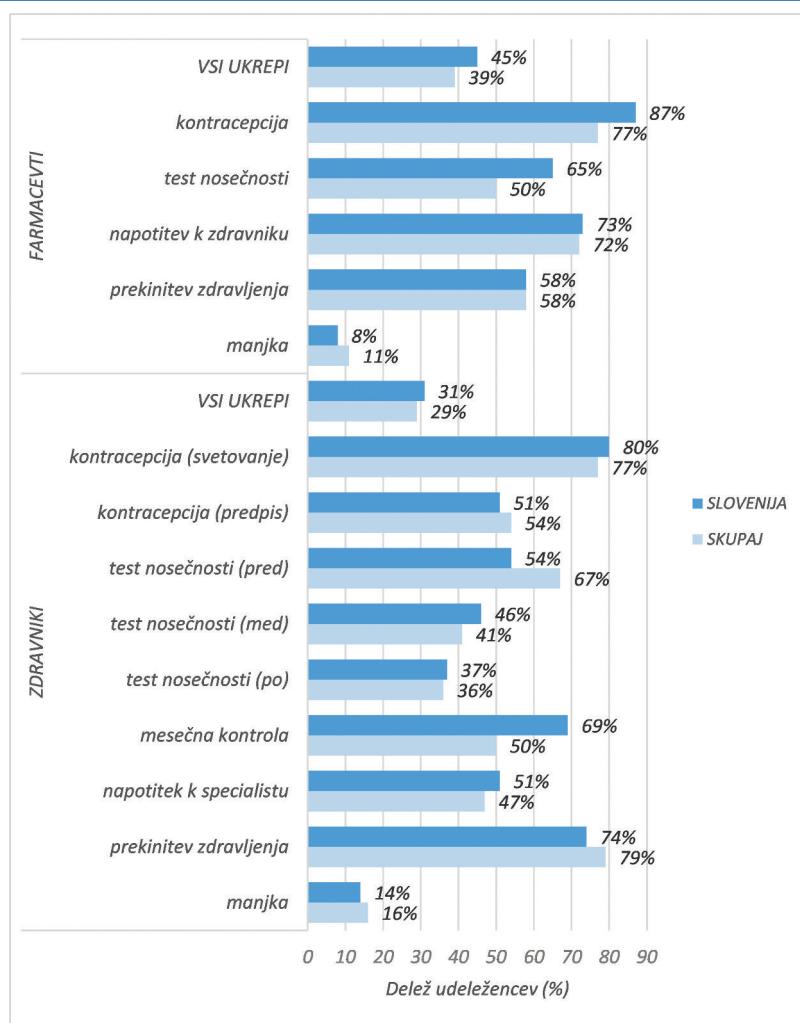
Slika 6: Testiranje nosečnosti pred, med in po zdravljenju z retinoidi.
Figure 6: Pregnancy testing before, during and after treatment with retinoids.

testa pred oz. med zdravljenjem. Po zaključku zdravljenja je odstotek pacientk, ki so izvedle test, še nižji (slika 6). Razlog, zakaj se jim testiranje nosečnosti ne zdi relevantno, je, da niso spolno aktivne.

4.5 UKREPI OB PREDPISOVANJU IN IZDAJANJU RETINOIDOV

V Sloveniji je za ženske v rodni dobi do decembra 2020 veljala omejitve predpisovanja in izdaje retinoidov za največ 30 dni, kar omogoča redne kontrolne preglede, recept pa je bil veljaven sedem dni. 88 % slovenskih farmacevtov pozna omejitve veljavnosti recepta.

Večina farmacevtov (87 %) in zdravnikov (80 %) svetuje o pomenu učinkovite kontracepcije, 51 % zdravnikov učinkovito metodo tudi predpiše. Dve tretjini zdravnikov patientke naročata na mesečne kontrolne preglede, kar je več od povprečja osmih držav. Manj pogosto pa je testiranje nosečnosti. Približno polovica zdravnikov pred začetkom zdravljenja z retinoidi zahteva izvedbo testa, kasneje se ta odstotek še zniža. Testiranje nosečnosti se jim zdi nesmiselno, če patientka nima spolnih odnosov oz. uporablja priporočeno dvojno metodo kontracepcije. Nekoliko več je farmacevtov (65 %), ki ob svetovanju poudarijo pomen testiranja nosečnosti. V primeru suma na nosečnost bi tri četrtine farmacevtov patientko napotile k zdravniku, skoraj 60 % pa bi jih svetovalo prekinitev zdravljenja (slika 7).



Slika 7: Farmakovigilančni ukrepi, ki se jih ob izdajanju oz. predpisovanju retinoidov držijo farmacevti in zdravniki.

Figure 7: Pharmacovigilance procedures used at dispensing and prescribing of retinoids among pharmacists and prescribers.

Vse pomembne ukrepe programa (prekinitev zdravljenja v primeru zanositve, napotitev k zdravniku (velja le za farmacevte), svetovanje o učinkoviti metodi kontracepcije in rednem testiranju nosečnosti) izvaja 31 % zdravnikov in 45 % farmacevtov.

5 RAZPRAVA

Raziskava je pokazala, da se pacientke, farmacevti in zdravniki zavedajo teratogenosti, a ukrepi farmakovigilančnega programa niso v celoti vpeljani v klinično prakso. Pacientke je s tveganjem največkrat seznanil dermatolog, od katerega so dobine informativno gradivo in s katerim so se pogovorile o kontracepciji. Zdravstveni delavci relativno dobro sledijo posameznim ukrepom programa. Več kot 80 % slovenskih farmacevtov in zdravnikov je navedlo, da svetujejo o pomenu učinkovite kontracepcije, okrog 60 % pa jih poudari pomen oz. zahteva izvedbo testa nosečnosti pred začetkom zdravljenja z retinoidi. Po drugi strani je anketiranje pacientk pokazalo slabše izvajanje ukrepov v praksi, saj je 40 % pacientk navedlo, da jih je zdravstveni delavec informiral o pomenu kontracepcije, le 7 % pa jih je izvedlo test nosečnosti pred začetkom zdravljenja. Deloma lahko to pojasnimo z nizko povprečno starostjo (27 let) in majhnim vzorcem, ki ni nujno prikaz realnega stanja v populaciji.

Podobno avtorji tujih raziskav ugotavljajo, da je več kot 90 % farmacevtov in dermatologov seznanjenih s farmakovigilančnim programom in teratogenostjo, a vse ukrepe izvaja le 39 % farmacevtov in 25 % zdravnikov (15). Na Nizozemskem so ugotovili, da 34 % farmacevtov ob prvi izdaji preveri uporabo kontracepcije, le 22 % pa rezultat testa nosečnosti. Za razliko od farmacevtov negativen rezultat testa ob prvem predpisu zahteva 90 % zdravnikov, 87 % pa jih preveri, ali pacientka uporablja kontracepcijo, in to bodisi predpiše ali jo napoti h ginekologu (15, 16). Raziskava kaže, da se farmacevti čutijo manj odgovorne za preprečevanje nosečnosti med zdravljenjem z retinoidi, saj jih 74 % meni, da je to odgovornost zdravnika, medtem ko 73 % predpisovalcev meni, da sta odgovorna tako zdravnik kot pacientka (15). Boljše upoštevanje ukrepov ugotavljajo v študiji iz Belgije, kjer skoraj 90 % farmacevtov in vsi zdravniki svetujejo o kontracepciji, 60 % farmacevtov in zdravnikov pa zahteva negativen test nosečnosti pred prvim predpisom/izdajo (17). Podobno kot naši raziskavi

tuji avtorji ugotavljajo, da 70–80 % zdravnikov pacientke naroča na mesečne kontrolne pregledе, a le 20–30 % zdravstvenih delavcev zahteva testiranje nosečnosti ob ponovni izdaji/predpisu (15,17). Ozaveščenost je torej visoka, izvajanje ukrepov za preprečevanje nosečnosti pa le delno, tako s strani farmacevtov in predpisovalcev kot tudi pacientk.

Leta 2002 je FDA v Združenih državah Amerike uvedla nov program za preprečevanje nosečnosti pri zdravljenju z retinoidi, imenovan SMART (*system to manage accutane-related teratogenicity*), štiri leta kasneje pa strožji in enotnejši računalniški program iPLEDGE. Kljub strožjemu nadzoru se primeri nosečnosti med zdravljenjem z retinoidi še vedno pojavljajo. FDA je v letih 1997–2017 poročala o 6740 nosečnostih pri pacientkah, ki prejemajo izotretinojn (18). Po vrhu v letu 2006 (768 primerov) je število primerov padlo, sočasna uporaba kontracepcije pa se je nekoliko povečala (18, 19). Kljub temu so leta 2017 zabeležili 250 nosečnosti, od tega se jih je 30 končalo s splavom, 32 pa z umetno prekinitevjo nosečnosti (18). Strožji program je torej le delno pripomogel k implementaciji ukrepov v prakso in zmanjšanju števila nosečnic, izpostavljenih retinoidom, a je bistveno povečal birokracijo in obremenitev zdravstvenih delavcev (12, 18, 19).

Najbolj znan primer teratogene zdravilne učinkovine je talidomid, ki so ga v 50. letih prejšnjega stoletja uporabljali kot sedativ in antiemetik za preprečevanje nosečniške slabosti. Približno 10.000 otrok, ki so bili talidomidu izpostavljeni med nosečnostjo, se je rodilo s prirojenimi okvarami, zato so ga leta 1961 umaknili s trga. Danes ga uporabljamo za zdravljenje določenih vrst raka, a le, če so izpolnjene zahteve programa za preprečevanje nosečnosti, imenovanega STEPS (*system for thalidomide education and prescribing safety*). Upoštevanje ukrepov v primeru talidomida je boljše, a je omenjeni primer tragedije s talidomidom zelo dobro poznан in to zdravilno učinkovino uporabljamo za zdravljenje plazmocitoma, ki večinoma prizadene starejše osebe, medtem ko retinoide uporabljamo za zdravljenje aken, ki pogosto prizadene mlajše ženske v rodni dobi (20–22). Dejstvo, da so uporabnice retinoidov pogosto mlajše ženske, ki niso spolno aktivne oz. ne načrtujejo zanositve, ovira izvajanje ukrepov programa, saj se svetovanje o kontracepciji in testiranje nosečnosti zdravstvenim delavcem včasih zdi nesmiselno (23).

Glavna ovira pri izvajanjiju ukrepov programa za preprečevanje nosečnosti je pomanjkanje časa, saj je ustrezno svetovanje časovno potratno. Program je povečal obseg dela zdravstvenih delavcev z dodatnimi administrativnimi nalogami in mesečnimi kontrolnimi pregledi (20). Dodatna ovira



je, da program posega v zasebnost patientke, te pa pogosto niso pripravljene razpravljati o svojem spolnem življenju, kontracepciji in nosečnosti. Pomanjkanje zasebnosti v lekarni ter občutek, da patientke niso pripravljene poslušati informacij, dodatno otežuje izvajanje ukrepov s strani farmacevtov. Problem pri implementaciji ukrepov lahko predstavlja tudi izobraževalno gradivo, ki ni nujno vedno dostopno oz. na dosegu roke (npr. shranjeno je ločeno od zdravila) ter zahteva določeno stopnjo zdravstvene, elektronske in telekomunikacijske pismenosti in računalniških veščin (22, 23). Smiselnost dodatne obremenitve zdravstvenih delavcev je odvisna od prednosti, ki jih prinaša program. Ker so podatki o učinkovitosti programov v praksi zelo omejeni, so v prihodnosti zaželene nove raziskave o številu izpostavljenih nosečnic, upoštevanju ukrepov ter uporabnosti programov, kar omogoča nadaljnje izboljšave programov (17, 24).

6 OMEJITVE RAZISKAVE

Vprašalnike je izpolnilo pre malo oseb, da bi vzorce lahko randomizirano izbirali. Posledično se lahko zgodi, da se sodelujoči razlikujejo od nesodelujočih (imajo večjo motivacijo za sodelovanje zaradi dobrih/slabih izkušenj, jih tematika bolj zanima in so bolj ozaveščeni o ukrepih). Na značilnosti vključenih oseb (mlajše ženske z višjo stopnjo izobrazbe) je lahko vplival tudi način pozivanja k sodelovanju.

7 SKLEP

Ozaveščenost o teratogenem potencialu je visoka med patientkami in zdravstvenimi delavci, ukrepi farmakovigilančnega programa pa niso v celoti vpeljani v klinično prakso – kot glavno oviro so zdravstveni delavci izpostavili pomanjkanje časa. Patientke večinoma nimajo dostopa do vseh gradiv – ena od štirih patientk je pregledala in podpisala potrditveni obrazec in ena od desetih je prejela opozorilno kartico. Patientke so se s tveganjem največkrat seznanile med pogоворom z dermatologom, iz navodila za uporabo ali pa so informacije poiskale na internetu. Po

mnenju farmacevtov so zelo priročni vizualni ukrepi (npr. opozorilni znak), ki jih ob izdaji opomnijo na ustrezeno svetovanje. V prihodnosti je smiseln razvoj oz. preoblikovanje računalniških sistemov, da bi bila izobraževalna gradiva zbrana na enem mestu in dostopna neposredno ob izdaji/predpisu. Z vidika povečanja motivacije za redno in pravilno uporabo kontracepcije je nujna ustreznna edukacija patientke, ki utemelji potrebo po kontracepciji.

8 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Evropski agenciji za zdravila in drugim državam, ki so sodelovale pri projektu.

9 LITERATURA

1. Hersh JH. Retinoic Acid Embryopathy: Timing of Exposure and Effects on Fetal Development. *JAMA J Am Med Assoc.* 1985 Aug 16;254(7):909.
2. Hartmann D, Bollag W. Historical Aspects of the Oral Use of Retinoids in Acne. *J Dermatol.* 1993 Nov;20(11):674–8.
3. Crijns HJM, Straus SM, Gispen-de Wied C, de Jong-van den Berg LTW. Compliance with pregnancy prevention programmes of isotretinoin in Europe: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2011 Feb;164(2):238–44.
4. Khalil S, Bardawil T, Stephan C, Darwiche N, Abbas O, Kibbi AG, et al. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *J Dermatolog Treat.* 2017 Nov 17;28(8):684–96.
5. Peterlin Mašič L, Obreza A, Vovk T. Minerali, vitamini in druge izbrane snovi. 1st ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2020. p. 263–74.
6. Bushue N, Wan Y-JY. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Oct;62(13):1285–98.
7. Zapisniki komisije za razvrščanje zdravil na listo [Internet]. Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije; 2021 [cited 2021 Oct 14]. Available from: https://partner.zzs.si/wps/portal/portali/aizv/zdravila_in_zivila_za_posocene_zdravstvene_namene/razvrsanje_zdravil_in_zivil_na_listo/razvrsanje_zdravil_na_listo/!/ut/p/z1/jZFPb4JAEMU_Sw9cmbcurNjbphZZ1PononQvDTSIGASDVL5-SdpDaylLpOZ_N68yQxpCkkX0TVLozoriyhv61ct3iz2rCZ8AbVwNkPlbtMzHmYlJ2vwHH3Y6h1k_e3J36HD5I99ELzKWnwDzH8IVULWb20B4NANZPjz9C9vTvAHT3-B3pG4sXy4KU2zaPlhybwS1w50Sdwlp9A11H-m9Nn3Sal_HXR2URcyclXSX7pEoq86Nq24e6Pl8eDRhomsaMsyl138uTgXuCQ3mpKfzJ0fkUBEGITB3t_DqTD5-zApA1/dz/d5/L2dBISEvZ0FBIS9nQSEh/p0/IZ7_41ElG300IO8T

- 70AQFPR16D3096=CZ6_41EIG3O0I08T70AQFPR16D3016=L
A0=/?obdobjeOd=2020&obdobjeDo=2021&Submit=Iskanje.
8. Podatki o porabi zdravil, receptna lista 2011-2020 [Internet]. Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije; 2021 [cited 2021 June 14]. Available from: https://partner.zzzs.si/wps/portal/portali/aizv/zdravila_in_zivila_z_a_posebne_zdravstvene_namene/podatki_o_porabi_zdravil/lut/pz1/04_Sj9CPyksy0xPLMnMz0vMAfijo8ziTQxdPd2N_Q08LSyCDQ0cjZzMzXz8XQ0sTAz0C7ldFQGdnpEx/.
 9. Posodobitev ukrepov za preprečevanje nosečnosti med zdravljenjem z zdravili, ki vsebujejo retinoide [Internet]. Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke; 2018 [cited 2021 Feb 16]. Available from: <https://www.jazmp.si/2018/02/26/posodobitev-ukrepov-za-preprecevanje-nosecnosti-med-zdravljenjem-z-zdravili-ki-vsebujejo-retinoide/>.
 10. Crijns I, Straus S, Luteijn M, Gispen-de Wied C, Raine J, de Jong-van den Berg L. Implementation of the Harmonized EU Isotretinoin Pregnancy Prevention Programme. *Drug Saf.* 2012 Jan;35(1):27-32.
 11. Autret-Leca E, Kreft-Jais C, Elefant E, Cissoko H, Darrouzain F, Grimaldi-Bensouda L, et al. Isotretinoin Exposure during Pregnancy. *Drug Saf.* 2010 Aug;33(8):659-65.
 12. §Zomerdijk IM, Ruiter R, Houweling LMA, Herings RMC, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM, et al. Isotretinoin exposure during pregnancy: a population-based study in The Netherlands. *BMJ Open.* 2014 Nov 12;4(11):e005602.
 13. Izobraževalna gradiva za varno uporabo zdravil [Internet]. Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke [cited 2021 June 15]. Available from: <https://www.jazmp.si/dokumenti/>.
 14. Contraceptive Use by Method 2019 [Internet]. United Nations, Department of Economic and Social Affairs; 2019 [cited 2021 June 14]. Available from: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/family/ContraceptiveUseByMethodDataBooklet2019.pdf>.
 15. Crijns I, Mantel-Teeuwisse A, Bloomberg R, Pinas E, Straus S, de Jong-van den Berg L. Healthcare professional surveys to investigate the implementation of the isotretinoin Pregnancy Prevention Programme: a descriptive study. *Expert Opin Drug Saf.* 2013 Jan 20;12(1):29-38.
 16. Rashid ZA, Al-Tabakha MM, Alomar MJ. Community pharmacists' knowledge and practice toward oral isotretinoin prescription: a systemic review. *Pharmazie.* 2020;75(2):56-60.
 17. Lelubre M, Hamdani J, Senterre C, Amighi K, Peres M, Schneider M-P, et al. Evaluation of compliance with isotretinoin PPP recommendations and exploration of reasons for non-compliance: Survey among French-speaking health care professionals and patients in Belgium. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2018 Jun;27(6):668-73.
 18. Tkachenko E, Singer S, Sharma P, Barbieri J, Mostaghimi A. US Food and Drug Administration Reports of Pregnancy and Pregnancy-Related Adverse Events Associated With Isotretinoin. *JAMA Dermatology.* 2019 Oct 1;155(10):1175.
 19. Pinheiro SP, Kang EM, Kim CY, Governale LA, Zhou EH, Hammad TA. Concomitant use of isotretinoin and contraceptives before and after iPledge in the United States. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013 Dec;22(12):1251-7.
 20. Crijns I, Zomerdijk I, Sturkenboom M, de Jong-van den Berg L, Straus S. A comparison of pregnancy prevention programmes in Europe. *Expert Opin Drug Saf.* 2014 Apr;13(4):411-20.
 21. Bonebrake R, Casey MJ, Huerter C, Ngo B, O'Brien R, Rendell M. Ethical challenges of pregnancy prevention programs. *Cutis.* 2008 Jun;81(6):494-500.
 22. Simin MK, Nagesh M. Pregnancy prevention programs for medications used in dermatology. *J Sex Transm Dis.* 2020 Apr 17;2:18.
 23. Uusküla A, Pisarev H, Kurvits K, Laius O, Laanpere M, Uusküla M. Compliance with Pregnancy Prevention Recommendations for Isotretinoin in Estonia in 2012-2016. *Drugs - Real World Outcomes.* 2018 Jun 22;5(2):129-36.
 24. Russell AM, Morato EH, Lovett RM, Smith MY. Quality of Reporting on the Evaluation of Risk Minimization Programs: A Systematic Review. *Drug Saf.* 2020 May 4;43(5):427-46.



POZNAVANJE DEMENCE IN PODPORE OSEBAM Z DEMENCO MED OBISKOVALCI ZDRAVSTVENIH DOMOV V SAVINJSKI REGIJI

KNOWLEDGE OF DEMENTIA AND SUPPORT FOR PEOPLE WITH DEMENTIA AMONG VISITORS OF HEALTH CARE SERVICES IN THE SAVINJSKA REGION

AVTORJI / AUTHORS:

Teja Glavnik, mag. farm., spec. klin. farm.¹
 mag. Brina Felc, univ. dipl. prav.^{2,3,4}
 asist. dr. Janja Jazbar, mag. farm. ⁵
 doc. dr. Zlata Felc, dr. med., spec.^{2,3}

¹ Splošna bolnišnica Murska Sobota,
Ulica dr. Vrbnjaka 6, 9000 Murska Sobota

² Visoka zdravstvena šola v Celju,
Mariborska cesta 7, 3000 Celje.

³ Združenje zahodnoštajerske pokrajine za pomoč
 pri demenci Spominčica Šentjur,
Svetinova ulica 1, 3230 Šentjur.

⁴ Okrožno sodišče v Celju, Civilni oddelek,
Prešernova 27, 3000 Celje.

⁵ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
 Katedra za socialno farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
 E-mail: brina.felc@gmail.com

POVZETEK

Zaradi staranja prebivalstva število oseb z demenco narašča. Z uporabo ustreznega načina podpore lahko ustvarimo primeren odnos laične in strokovne skupnosti v arhitekturno prilagojenem okolju, v katerem so osebe z demenco in njihovi svojci razumljeni, spošтовani ter uživajo podporo. Namen raziskave je bil pridobiti podatke o poznavanju demence in poznavanju podpore osebam z demenco v Savinjski regiji. Izvedli smo presečno raziskavo s pomočjo strukturiranega pisnega vprašalnika med odraslimi obiskovalci štirih izbranih zdravstvenih domov. Vprašalnik je izpolnilo 161 anketirancev, med njimi 35 (21,7 %) sorodnikov oseb z demenco. Povprečna ocena poznavanja demence (standardni od-klon) je znašala 9,4 (1,6) od 12 možnih točk. Boljše poznavanje demence so pokazali anketiranci z višjo stopnjo izobrazbe (model multiple linearne regresije, $p < 0,05$), ostale spremenljivke niso pokazale statistično značilne povezave s poznavanjem demence. Odgovori na vprašanja o poznavanju podpore osebam z demenco v lokalnem okolju so pokazali na potrebo po ozaveščanju o programih podpore. Dodatni izobraževalni programi in kampanje, ki podudarjajo pomen vseh stebrov podpore osebam z demenco, bi lahko pripomogli k oblikovanju osebam z demenco prijaznih skupnosti.

KLJUČNE BESEDE:

osebe z demenco, podpora, poznavanje obiskovalcev zdravstvenih domov, Savinjska regija

ABSTRACT

Due to the aging population, the number of people with dementia is increasing. By using the appropriate method of support, we can create an appropriate relationship between the general and professional community in an architecturally adapted environment in which people with dementia and their relatives are understood, respected and enjoy support. The purpose of the research was to obtain data on knowledge of dementia and knowledge of support for people with dementia in the Savinjska region. A cross-sectional survey was conducted using a structured written questionnaire among adult visitors to four selected health centers. The questionnaire was completed by 161 respondents,

including 35 (21.7%) relatives of people with dementia. The mean dementia knowledge score (standard deviation) was 9.4 (1.6) out of 12 possible points. Better knowledge of dementia was shown by respondents with a higher level of education (multiple linear regression model, $p < 0.05$), other variables did not show statistical significance. Answers to questions about knowledge of support for people with dementia in the local environment indicated the need to raise awareness about support programs. Additional education programs and campaigns highlighting the importance of all pillars of support for people with dementia could help create dementia-friendly communities.

KEY WORDS:

awareness of visitors of health care services, persons with dementia, Savinjska Region, support

1 UVOD

Zaradi staranja prebivalstva število oseb z demenco naršča tudi v Sloveniji. Po podatkih organizacije Alzheimer Europe je bilo leta 2018 v Sloveniji 34.137 ljudi z demenco, do leta 2050 pa naj bi se število podvojilo (1, 2). Sindrom demence pomeni izraz za skupek simptomov, ki so posledica možganske bolezni, običajno kronične ali napredajoče narave. Najpogosteji vzrok demence je Alzheimerjeva bolezen, ki je nasploh ena najpogostejših kroničnih napredajočih bolezni. Kaže se z motnjami višjih živčnih dejavnosti, kot so spomin (izrazitejše so spominske težave za nedavne dogodke), mišljenje, orientacija, prepoznavanje, razumevanje, računanje, sposobnost učenja ter sposobnost besednega izražanja in presoje (1, 3). O demenci ozaveščena družba je seznanjena s pravicami in težavami oseb z demenco, omogoča jim dostop do informacij, izobraževanja in vključevanje v družbo v skladu z njihovimi zmožnostmi ter optimizacijo terapije (4–9). Oblikovanje demenci prijaznega fizičnega in socialnega okolja pomeni, da so osebe z demenco čim bolj samostojne, aktivne in družbeno vključene. Pri tem ne smemo spregledati polifarmakoterapije in sočasnih bolezni pri osebah z demenco, ker demenza poveča tveganje za nepravilno uporabo zdravil (4, 7). Osebe z demenco pogosto iščejo pomoč v lekarni, ker imajo težave pri jemanju zdravil, npr. s pozabljanjem, ali so zdravila

vzeli, razporejanjem jemanja odmerkov preko dneva in razumevanjem sistema elektronskih in obnovljivih receptov (4). V lekarnah je prišlo v zadnjih letih tudi v Sloveniji do razvoja farmacevtskih svetovalnih storitev, ki so v veliko pomoč in podporo osebam z demenco in njihovim svojcem pri zdravljenju z zdravili (7). Dodatna podpora laične in strokovne skupnosti omogoča osebam z demenco, da v domačem okolju čim dlje samostojno in kakovostno živijo, ter spodbuja njihovo aktivno družbeno vključenost. Svojcem, ki so večinoma njihovi neformalni oskrbovalci, omogoča, da ostanejo v delovnem razmerju čim dlje. Z uporabo primerenega načina podpore lahko ustvarimo primeren odnos laične in strokovne skupnosti v arhitekturno prilagojeni skupnosti, v kateri so osebe z demenco in njihovi svojci razumljeni, spoštovani ter uživajo podporo (5, 7).

1.1 OSEBAM Z DEMENCO PRIJAZNA SKUPNOST

Osebam z demenco prijazna skupnost je okolje, kjer so spoštovani in se vključujejo v družbo, saj upoštevamo njihove pravice in zmožnosti (10). Pri oblikovanju takšne skupnosti so poleg strokovnih organizacij pomembne nevladne organizacije. V Sloveniji je najbolj aktivno Združenje Spominčica – Alzheimer Slovenija (2, 11, 12). Leta 2017 je združenje v prostorih Urada varuha človekovih pravic odkrlo prvo demenci prijazno točko (11, 13). Demenci prijazna točka je namenjena predvsem osebam z demenco v zgodnji fazi bolezni, ki so še samostojni in aktivni, pa tudi njihovim svojcem in drugim, ki se srečujejo z njimi. Usposobljeni zaposleni na demenci prijazni točki nudijo informacije, kako prepoznati prve znake demence, kako komunicirati z osebami z demenco in kam jih usmeriti po nadaljnjo pomoč. Z ustrezeno komunikacijo jim zagotavljajo dostenjanstvo, spoštljivo obravnavo in varno okolje. Podobno vlogo imajo varne točke za starejše, ki jih je že leta 2014 v Savinjski regiji začelo odpirati Združenje zahodnoštajerske pokrajine za pomoč pri demenci Spominčica Šentjur (Spominčica Šentjur), prostovoljno regijsko združenje za pomoč pri demenci (14, 15). Po predhodnem izobraževanju zaposlenih je v mrežo varnih točk za starejše vključenih deset različnih delovnih organizacij, med njimi obe lekarni, nekaj varnih točk za starejše so vzpostavili tudi v drugih krajih po Sloveniji. Cilji vzpostavitev varnih točk so enaki kot pri vzpostavitvi demenci prijaznih točk. Naziv varna točka za starejše, ki prvenstveno služi osebam z demenco in njihovim svojcem, se je ohranil, ker je na podeželju še vedno prisotna stigma, povezana z demenco (10). Poleg ustanavljanja varnih točk za starejše se Spominčica Šentjur posveča infor-

miranju javnosti o demenci in možnostih za njeno preprečevanje. Vodstvo in sodelavci uresničujejo svoje poslanstvo tako, da organizirajo strokovna predavanja v sproščenem vzdušju kot »Alzheimer cafe«, okrogle mize, vodijo skupino za samopomoč, izdajajo brošure, knjige ter glasilo Dotik spomina (14).

S skupnimi napori strokovnih in nevladnih organizacij so v svetu že preoblikovali nekatera mesta v demenci prijazna mesta, prvo evropsko je belgijski Bruges (16). Pri preoblikovanju so uporabili model štirih stebrov podpore. Model temelji na izboljšanju podpore osebam z demenco na štirih področjih: ljudje, prostor, socialna mreža in strokovne službe (5).

1.1.1 Ljudje

V osebam z demenco prijaznih skupnostih se družinski člani, prijatelji, sosedje, sokrajani, zdravstveni in socialni delavci ter družba primerno odzivajo na potrebe oseb z demenco, saj so informirani o demenci in poznajo njihove pravice (8). Postavljajo jih v središče vključujoče družbe, izkazujejo jim spoštovanje in podpirajo njihovo aktivno vlogo v družbi. Povezujejo se z lokalnimi in nacionalnimi prostovoljnimi društvi za pomoč pri demenci, ki organizirajo prostovoljne vire pomoči zanje in njihove svojce, kot so npr. skupine za samopomoč in redna strokovna srečanja. Strokovna srečanja potekajo v sproščenem vzdušju kot srečanja »Alzheimer cafe«, kjer na javnem kraju spregovorijo o demenci strokovnjaki in obiskovalci (17).

1.1.2 Prostor

V osebam z demenco prijaznih skupnostih so notranji in zunanj prostori arhitekturno prilagojeni in varni, ustrezna je prostorska ureditev stanovanja, ki omogoča enostavno gospodinjstvo, soseščina je dostopna, prevozna sredstva pa dosegljiva. Prostorska ureditev, ki v veliki meri sledi potrebam starostnikov, jim omogoča, da živijo samostojno v skladu s svojimi zmožnostmi. Ustrezna ureditev ugodno vpliva na njihovo orientacijo, omogoča jim varen dostop do prevoznih sredstev, trgovin, bank, pošte in drugih ustanov ter olajša samostojno gibanje npr. po krožnih sprehajalnih poteh (18).

1.1.3 Socialna mreža

Pomembno je dobro sodelovanje vseh deležnikov, ki komunicirajo, sodelujejo in skupaj načrtujejo najustreznejšo podporo za osebe z demenco in njihove svojce. Najpogosteji vzrok demence, Alzheimerjeva bolezen, je namreč še neozdravljiva in lahko čas od diagnoze do smrti traja zelo dolgo (4, 19). Mreža demenci prijaznih točk zagotavlja,

da so osebe z demenco aktivno vključene v lokalno skupnost, kjer so obstoječi prostori in storitve in znanje zaposlenih prilagojeni njihovim potrebam (11).

1.1.4 Strokovne službe (zdravniška, socialna, lekarniška)

Skupaj so zdravniška, socialna in lekarniška služba lahko opora osebam z demenco in njihovim svojcem, ki pri dolgotrajni skrbi potrebujejo čvrsto podporo (4, 7, 20–25). Zdravstvena stroka večine demenc še ne more ozdraviti, zato je pomembno pravočasno ukrepanje v skladu s stadijem bolezni in klinično sliko (20). Pravočasna diagnoza demence in zgodnja obravnava oseb z demenco sta zelo pomembni, sicer jih svojci zaradi neprepoznavnih bolezenskih znakov pogosto ne razumejo in mislijo, da so enostavno hudobni. Poleg tega je pomembno spoštovanje njihovih pravic do informiranosti in odločanja o svojem zdravljenju (8). Zaposleni v primarnih zdravstvenih ustanovah se prilagajajo njihovim potrebam in v skupnosti podpirajo zdrav življenjski slog tudi zanje ter prek medijev seznanjajo javnost z bolezenskimi znaki za hitrejše prepoznavanje demence in pravilno ukrepanje (20, 25, 26). Socialna služba izvaja ukrepe za preprečevanje socialne izključenosti oseb z demenco, saj jih zaradi okrnjenih sposobnosti okolje hitro socialno izolira. Kljub temu pa osebe z demenco, ki izgubijo sposobnost za besedno izražanje, še vedno lahko ohranajo druge komunikacijske spretnosti, kot je interakcija, podprtta z mimiko obraza, očesnim stikom, držo, dotikom in gibi. Zato je pomembno, da jim s pomočjo socialne službe omogočimo njim prilagojeno aktivno sodelovanje v družbi (21).

Sodelovanje pri zdravljenju z zdravili je pri osebah z demenco zaradi upadanja kognitivnih funkcij težko zagotoviti. Slabše sodelovanje pri zdravljenju z zdravili lahko vpliva na poslabšanje oz. hitrejše napredovanje bolezni, tako demence kot drugih kroničnih bolezni, ki jih oseba z demenco pogosto ima. Z namenom izboljšanja sodelovanja pri zdravljenju z zdravili, izboljšanju pravilne uporabe zdravil in odpravljanju morebitnih težav pri zdravljenju z zdravili in lekarnah izvajamo storitev pregled uporabe zdravil. Gre za svetovalno storitev, kjer se magister farmacije z dodatnimi znanji za izvajanje pregleda uporabe zdravil z bolnikom zasebno v prostoru za svetovanje pogovori, natančno pregleda zdravila in morebitna prehranska dopolnila, ki jih bolnik jemlje, in pripravi tudi osebno kartico zdravil – seznam zdravil z napotki, kdaj in na kakšen način jih je potrebno jemati in za kakšen namen so bila predpisana. Osebna kartica zdravil je v veliko pomoč bolniku samemu, pri napredovali bolezni pa predvsem svojcem oz. skrbnikom (3, 4, 22, 23).



Osebe z demenco zelo pogosto sočasno prejemajo veliko število zdravil, ki lahko poslabšajo simptome demence in na tak način poslabšajo kakovost življenja bolnika. Predvsem so bolniki z demenco bolj občutljivi na zdravljenje z zdravili, ki vplivajo na centralni živčni sistem in poslabšajo kognitivne funkcije, zaradi česar tudi slabše prepoznavajo morebitne druge neželene učinke zdravil. V veliko pomoč pri optimizaciji terapije je lahko zdravniku tudi farmacevtska svetovalna storitev farmakoterapijski pregled, ki jo izvajajo magistri farmacije, specialisti klinične ali lekarniške farmacije, ki so pridobili dodatna znanja za izvajanje te storitve. Ta storitev je v primerjavi s pregledom uporabe zdravil v prvi vrsti namenjena zdravniku, poteka pa lahko tako v zdravstvenem domu v okviru ambulante farmacevta svetovalca, kamor bolnika napotí družinski zdravnik, ali v bolnišnici kot konziliarni pregled oz. v okviru rednega dela kliničnega farmacevta na oddelku. V okviru te storitve farmacevt na podlagi informacij, ki jih pridobi iz zdravstvene dokumentacije in od bolnika, pregleda bolnikovo terapijo in glede na prepoznane težave pri zdravljenju z zdravili predлага lečečemu zdravniku zamenjavo zdravila za bolj primerno za posameznega bolnika (7, 24).

2 NAMEN

Namen raziskave je bil v okviru Spominčice Šentjur pridobiti podatke o poznavanju demence med odraslimi obiskovalci štirih izbranih zdravstvenih domov v Savinjski regiji in ugotoviti, kakšno je njihovo poznavanje podpore osebam z demenco v lokalnem okolju. Pridobljeni podatki bi lahko bili v pomoč pri pripravi načrta delovanja prostovoljnega regionalnega društva za pomoč pri demenci, in sicer kot izhodišče za predlog ukrepov.

3 METODE

Izvedli smo presečno raziskavo med odraslimi obiskovalci štirih zdravstvenih domov v Savinjski regiji. Zbiranje podatkov je temeljilo na kvantitativnem raziskovalnem pristopu z uporabo anketnega vprašalnika.

3.1 PREISKOVANCI

Raziskavo smo izvedli med odraslimi uporabniki v štirih zdravstvenih domovih v krajih s primerljivim številom prebivalcev v Savinjski regiji: Šentjur pri Celju, Laško, Šmarje pri Jelšah in Žalec. Po predhodnem soglasju vodstva vseh štirih izbranih zdravstvenih domov smo podatke za raziskavo zbirali v obdobju od 31. 1. 2018 do 15. 2. 2018. Medicinska sestra je v vsakem zdravstvenem domu v čakanici pred ambulanto izbranega zdravnika oz. zdravnice naključno povabila k sodelovanju v raziskavi po 60 obiskovalcev in jim obrazložila, da gre za anonimno in prostovoljno raziskavo. Anketiranci so anketni vprašalnik izpolnili samostojno med čakanjem.

3.2 UPORABLJENA ORODJA

Uporabili smo strukturiran pisni vprašalnik, narejen na osnovi vprašalnika, ki so ga leta 2017 uporabili Glynn in sod. (9), in dopolnjen in predelan na osnovi pregleda domače literature (10). Anketni vprašalnik smo oblikovali za enkratno uporabo pri tej raziskavi. Prevod ter vsebinsko in formalno plat poskusnega anketnega vprašalnika sta pregledala strokovnjaka s področja medicine in statistike. Dodatne validacije vprašalnika nismo izvedli. Zanimalo nas je predvsem, v kolikšni meri anketiranci poznajo osnovna dejstva o demenci, in ugotoviti, če poznajo storitve, ki jih lokalno okolje nudi za podporo osebam z demenco. Vprašalnik je v prvem delu obsegal 12 trditev o poznavanju demence: vzroki, razširjenost, vrste demence in vpliv demence na okolje, v katerem oseba z demenco živi. Spremenljivko poznavanje demence smo izračunali kot seštevek pravilnih odgovorov na prvih 12 vprašanj o poznavanju demence, vsak pravilen odgovor je štel eno točko, nepravilen nič točk. V drugem delu vprašalnika je bilo 11 vprašanj o poznavanju načinov podpore osebam z demenco po posameznih stebrih – ljudje, prostor, socialna mreža in strokovne službe. V zadnjem delu smo spraševali po osnovnih demografskih podatkih anketiranca (spol, starost, izobrazba, sorodstvo z osebo z demenco).

3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Velikost vzorca ($N = 240$) smo določili na podlagi števila spremenljivk (12 spremenljivk oz. kategorij spremenljivk, pomnoženo s faktorjem 10) v predvidenem modelu multiple regresijske analize in pričakovanega 50-odstotnega odziva na anketni vprašalnik. Statistična analiza podatkov je ob-

segala opis demografskih značilnosti vzorca ter opis poznavanja demence in poznavanja podpore osebam z demenco z metodami opisne statistike. Dodatno smo izvedli analizo sočasnega vpliva demografskih značilnosti oseb na poznavanje demence z modelom multiple linearne regresije. Odvisno spremenljivko v modelu je predstavljalo poznavanje demence (vsota pravilnih odgovorov na 12 vprašanj o poznavanju demence). Neodvisne spremenljivke v modelu so bile spol (moški, ženski), starost (numerična spremenljivka), izobrazba (osem stopenj po veljavni slovenski nomenklaturi: nedokončana osnovna šola, osnovna šola, dveletno nižje poklicno izobraževanje, triletno srednje poklicno izobraževanje, štiriletno srednješolsko izobraževanje, višješolski in visokošolski strokovni program (1. bol. st.), univerzitetni program in magisterij stroke (2. bol. st.) ter specializacija, magisterij znanosti, doktorat znanosti) in sorodstvo z osebo z demenco (da, ne). Statistično značilnost smo opredelili s stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Statistično analizo smo izvedli v programih IBM SPSS Statistics in MS Excel.

4 REZULTATI

Rezultati so prikazani v treh podoglajih. V prvem podoglaju so prikazane značilnosti vzorca, v drugem poznavanje demence in v tretjem poznavanje podpore za osebe z demenco.

4.1 ZNAČILNOSTI VZORCA

Z anketiranjem se je strinjalo 240 obiskovalcev v vseh štirih ždравstvenih domovih (ZD), na vprašalnik jih je odgovorilo 166 (69-odstotni odziv). Odzvalo se je 56 obiskovalcev ZD Šentjur (93 %), 51 obiskovalcev ZD Laško (85 %), 44 obiskovalcev ZD Šmarje pri Jelšah (73 %) in 15 obiskovalcev ZD Žalec (25 %). Značilnosti oseb, vključenih v raziskavo, so predstavljene v preglednici 1. Osebe so bile stare od 20 do 82 let s povprečno starostjo (SD) 48,6 (14,1) let. Približno dve tretjini oseb (62,3 %) je bilo ženskega spola. Med osebami v raziskavi je bilo 35 (21,7 %) sorodnikov oseb z demenco.

4.2 POZNAVANJE DEMENCE

Posamezna vprašanja o poznavanju demence in deleži pravilnih odgovorov so predstavljeni v preglednici 2. Več

kot 95 % oseb je odgovorilo pravilno, da je zgodnje odkrivanje demence pomembno, da število obolelih strmo narašča po 65. letu starosti in da je demenca bolezen možganov zaradi različnih vzrokov. Po drugi strani skoraj polovica oseb (49,7 %) zmotno meni, da je demenca normalna spremiščevalka starosti. Najmanjši delež pravilnih odgovorov smo zabeležili pri trditvi, da so nekatere vrste demenc ozdravljive – samo 41,6 % oseb ve, da nekatere vrste demenc lahko pozdravimo. Približno petina oseb (19,9 %) je menila, da oseba z demenco ne more živeti v domačem okolju.

Poznavanje demence glede na značilnosti vzorca je prikazano v preglednici 3. Povprečna ocena poznavanja demence (standardni odklon) je znašala 9,4 (1,6) od 12 možnih točk. Z multiplim regresijskim modelom smo preverjali sočasno povezavo med spolom, starostjo, izobrazbo in sorodstvom z osebo z demenco ter poznavanjem demence (model multiple linearne regresije; $p = 0,047$; $R^2 = 0,078$). Rezultati so prikazani v preglednici 4. Regresijski model kaže statistično značilno povezavo med izobrazbo in poznavanjem demence ob upoštevanjem sočasnih spremenljivk, in sicer poznavanje demence narašča z naraščajočo dokončano stopnjo izobrazbe ($\beta = 0,27$; 95 % CI za β : 0,09–0,45; $p = 0,003$). Ostale spremenljivke nimajo statistično značilne povezave s poznavanjem demence ($p > 0,05$).

4.3 POZNAVANJE PODPORE OSEBAM Z DEMENCO

Odgovori na vprašanja glede poznavanja podpore za osebe z demenco glede na vse štire stebre podpore so prikazani v preglednici 5. Približno polovica oseb meni, da v njihovem kraju ni dovolj informacij o storitvah za osebe z demenco (47,7 %) in da se o tem ne piše ali govoriti veliko ali brez pred sodkov (52,2 %). Samo 18,4 % anketiranih ve, če v njihovem kraju potekajo druženja s strokovnjaki v obliki »Alzheimer cafe«. Več kot štiri petine anketiranih (80,7 %) meni, da so v njihovem kraju trgovine, banke, pošta ali lekarna ustrezno dostopne. Kljub temu pa le 33,8 % anketiranih ve, če v njihovem kraju obstaja krožna sprehajjalna pot, ali meni, da bo v kratkem dokončana. Varno točko za starejše pozna komaj 18,3 % anketiranih (največ v Šentjurju: 30,7 %), za Spominčico Šentjur pa je že slišalo 52,2 % anketiranih (največ v Šentjurju: 59,2 %). Predavanj o demenci se je udeležilo le 13,0 % anketiranih (največ v Laškem (20,4 %) in nihče v Žalcu). Večina oseb meni, da zaposleni v javnih službah in storitvenih dejavnostih ustrezeno

Preglednica 1: Značilnosti oseb, vključenih v raziskavo.

Table 1: Characteristics of persons included in the study.

Značilnosti	Vzorec (N = 161)
Spol; N (%)	
moški	60 (37,7 %)
ženski	99 (62,3 %)
Starost; N (%)	
18–34 let	22 (14,1 %)
35–49 let	65 (41,7 %)
50–64 let	47 (30,1 %)
≥ 65 let	22 (14,1 %)
povprečje (SD)	48,6 (14,1)
Izobrazba; N (%)	
nedokončana osnovna šola	1 (0,7 %)
osnovna šola	18 (12,6 %)
nižje poklicno izobraževanje (dveletno)	11 (7,7 %)
srednje poklicno izobraževanje (triletno)	21 (14,7 %)
štiriletno srednješolsko izobraževanje	48 (33,6 %)
višešolski in visokošolski strokovni program (1. bol. st.)	15 (10,5 %)
univerzitetni program in magisterij stroke (2. bol. st.)	26 (18,2 %)
specializacija, magisterij znanosti, doktorat znanosti	3 (2,1 %)
Ali ste sorodnik osebe z demenco; N (%)	
ne	126 (78,3 %)
da	35 (21,7 %)

SD: standardni odklon; bol. st.: bolonjska stopnja

pomagajo osebam z demenco (77,0 %) in da jih zgodaj prepoznavajo (80,1 %).

5 RAZPRAVA

V sklopu pričujoče raziskave, v kateri smo s pomočjo ankete pridobili podatke od odraslih obiskovalcev v zdravstvenih domovih v Savinjski regiji, smo ugotovili, da je njihovo poznavanje demence dobro, zlasti pri tistih anketirancih iz vzorca, ki imajo vsaj štiriletno srednješolsko ter višjo, visoko in podiplomsko izobrazbo. V sklopu preverjanja poznavanja demence smo ugotovili relativno dobro poznavanje demence, povprečna vrednost je znašala 9,4 od 12 možnih točk. Pri tem ni bilo razlik med spoloma niti glede na starost, prav tako med svojci oseb z demenco in ostalimi ni bilo pomembnih razlik v poznavanju demence. Pokazala pa se je povezava med višjo izobrazbo in boljšim

poznavanjem demence. Ena izmed možnih razlag je, da bolj izobraženi ljudje v večji meri zaznavajo socialno izolacijo oseb z demenco, zato poiščejo več informacij o demenci (27). Morda lahko rezultat kaže tudi na dosedanja prizadevanja k ozaveščanju s strani Spominčice Šentjur in drugih strokovnih ustanov v tej regiji, npr. splošne knjižnice (14, 28).

Ugotovili smo tudi, da je v primerjavi s poznavanjem demence poznavanje stebrov podpore osebam z demenco slabše. Večina anketirancev (52,3 %) zaznava pomanjkanje informacij s področja podpore osebam z demenco v svojem lokalnem okolju. To lahko interpretiramo na način, da se zavedajo pomena delovanja podpore osebam z demenco, saj lahko ozaveščena družba s primernim delovanjem olajša življenje njim in njihovim svojcem (9, 16, 29–33).

Pri podrobnejši analizi odgovorov o poznavanju demence se je izkazalo, da se 97,5 % anketiranih zaveda pomena zgodnjega odkrivanja demence. Nadalje, 96,3 % anketiranih ve, da število obolelih z demenco po 65. letu strmo narašča. Večina anketiranih (95,0 %) se strinja, da je de-



Preglednica 2: Delež pravilnih odgovorov na vprašanja o poznavanju demence. Vprašanja so razporejena glede na delež pravilnih odgovorov od največjega do najmanjšega deleža.

Table 2: Proportion of correct answers to the questions regarding the knowledge of dementia. The questions are sorted according to the proportion of correct answers from the largest to the smallest proportion.

Vprašanje	Delež pravilnih odgovorov (%)	95-odstotni interval zaupanja
Zgodnje odkrivjanje demence je pomembno. (pravilen odgovor: da)	97,5	94,2–99,2
Število obolelih za demenco po 65. letu strmo narašča. (pravilen odgovor: da)	96,3	92,4–98,4
Demence je bolezen možganov zaradi različnih vzrokov. (pravilen odgovor: da)	95,0	90,8–97,6
Posledice demence ne vplivajo le na osebo z demenco, temveč na celo družino. (pravilen odgovor: da)	93,8	89,2–96,7
Alzheimerjevo demenco okvirno delimo na blago, zmerno in težko stopnjo. (pravilen odgovor: da)	92,4	87,5–95,8
Oseba, ki se spominja dogodka iz otroštva, nima demence. (pravilen odgovor: ne)	83,1	76,8–88,3
Po grobi oceni živi v Sloveniji z demenco okoli 32.000 oseb. (pravilen odgovor: da)	81,8	75,0–87,3
Oseba z demenco lahko živi v domačem okolju. (pravilen odgovor: da)	80,1	73,3–85,8
Alzheimerjeva demenca je najpogostejsa demenca. (pravilen odgovor: da)	71,8	64,4–78,4
Slovenska zakonodaja celovito in podrobno ureja področje demence. (pravilen odgovor: ne)	61,9	54,1–69,3
Demence je normalna spremjevalka starosti. (pravilen odgovor: ne)	50,3	42,6–58,0
Nekatere vrste demenc so ozdravljive. (pravilen odgovor: da)	41,6	34,0–49,4

menca bolezen možganov zaradi različnih vzrokov, in 93,8 % anketiranih meni, da posledice demence vplivajo na celo družino in ne le na osebe z demenco. Po drugi strani pa je skoraj polovica anketiranih (49,7 %) zmotno prepričanih, da je demence normalna spremjevalka starosti. Podobne so ugotovitve Cahillove in sod. (2015), ki so objavili sistematičen pregled literature o splošnem poznavanju Alzheimerjeve bolezni. Ena njihovih glavnih ugotovitev je bila, da ima splošna javnost zmerno znanje in razumevanje o Alzheimerjevi bolezni, vendar napačno prepričanje, da je demence običajen del staranja (34). Res se s staranjem poslabšuje kakoost delovnega spomina, kar se kaže v težavah z več informacijami hkrati, saj je ena najpogostejsih težav, o kateri poročajo starostniki, slabši spomin (35, 36).

Vendar šele, ko je samostojno funkcioniranje pri vsakodnevnih aktivnostih pomembno ovirano in se težave poslabšujejo, začnemo govoriti o patološkem staranju oz. demenci (3, 35). Seveda pa ne smemo pozabiti, da je zgodnja diagnostika demence pomembna (23, 33). V prvi vrsti ima zgodnejša diagnostika in posledično zdravljenje večjo verjetnost za pozitiven odziv na terapijo. Ljudem, ki bodo zboleli za demenco, poznavanje realnega stanja omogoča sprejemanje pomembnih življenjskih odločitev. Zgodnejša diagnostika omogoča tudi natančnejšo diagnozo, pomaga pa tudi zdraviti reverzibilne vzroke kognitivnega upada (25, 35). Rezultati številnih raziskav so pokazali, da tako miselna kot tudi fizična aktivnost in uravnotežena prehrana znižujejo verjetnost za pojav demence. Vsi ti pre-

Preglednica 3: Poznavanje demence glede na značilnosti vzorca.

Table 3: The knowledge of dementia according to the sample characteristics.

	Poznavanje demence	
	Aritmetična sredina (standardni odklon)	Minimum–maksimum
Spol		
moški	9,6 (1,3)	6–12
ženski	9,3 (1,8)	3–12
Starost		
do 34	9,7 (1,6)	6–12
35–49	9,6 (1,6)	6–12
50–64	9,2 (1,5)	3–11
65 in več	9,9 (1,3)	7–12
Izobrazba		
nedokončana osnovna šola	7 (/)	7–7
osnovna šola	9,4 (1,4)	6–12
nižje poklicno izobraževanje (dveletno)	9,3 (1,4)	6–11
srednje poklicno izobraževanje (triletno)	8,8 (1,8)	3–12
štiriletno srednješolsko izobraževanje	9,5 (1,8)	4–12
višješolski in visokošolski program (1. bol. st.)	9,6 (1,1)	7–12
univerzitetni program in magisterij stroke (2. bol. st.)	10,3 (1,4)	7–12
specializacija, magisterij znanosti, doktorat znanosti	10,7 (0,6)	10–11
Ali ste sorodnik osebe z demenco		
da	9,6 (1,4)	7–12
ne	9,4 (1,7)	3–12
Total	9,4 (1,6)	3–12

^a Poznavanje demence je izračunano kot vsota pravilnih odgovorov o demenci.

Preglednica 4: Povezava med značilnostmi vzorca in poznavanjem demence.

Table 4: Factors associated to the knowledge of dementia.

Spremenljivka	Povezava s poznavanjem demence ^a	
	Koeficient β (95-odstotni interval zaupanja)	Vrednost p
Spol (ref = moški)	-0,30 (-0,90–0,31)	0,340
Starost	0,01 (-0,01–0,03)	0,368
Izobrazba	0,27 (0,09–0,45)	0,003*
Sorodstvo z osebo z demenco (ref = ne)	0,01 (-0,70–0,71)	0,989

^a Model multiple linearne regresije ($p = 0,047$; $R^2 = 0,078$); * statistično značilna povezava

ventivni ukrepi prispevajo k večji možganski oz. kognitivni rezervi, ki pomaga posameznikom odložiti nastanek demence (26, 37).

Pri poznavanju podpore osebam z demenco smo ugotovili, da manj kot petina (18,4 %) anketiranih vé, da potekajo

krajevna druženja s strokovnjaki v obliki »Alzheimer cafe«. Svojci so največkrat neformalni oskrbovalci oseb z demenco, zato je zanje pomembna dostopnost do izobraževanja (31, 32). V prihodnje bi morala Spominčica Šentjur zato čim več predavanj in delavnic organizirati v sprošče-



Preglednica 5: Odgovori udeležencev raziskave glede poznavanja podpore osebam z demenco.

Table 5: Knowledge of support for people with dementia among the study participants.

Poznavanje podpore osebam z demenco				
Steber podpore	Vprašanje	Število odgovorov	Delež odgovorov (%)	95-odstotni interval zaupanja
Ljudje	V vašem kraju je dovolj informacij o storitvah za osebe z demenco in njihove svojce?			
	ne	74	47,7	40,0–55,6
	da	81	52,3	44,4–60,0
	Ali v vašem kraju o demenci veliko in brez predvodnikov govorijo in pišejo?			
	ne	83	52,2	44,5–59,9
	da	76	47,8	40,1–55,5
Prostor	Ali v vašem kraju kdaj potekajo druženja s strokovnjaki v obliki »Alzheimer cafe«?			
	ne	124	81,6	74,9–87,1
	da	28	18,4	12,9–25,1
	Ali v vašem kraju obstaja ali nameravajo narediti krožno sprehajalno pot?			
	ne	102	66,2	58,5–73,3
	da	52	33,8	26,7–41,5
Socialna mreža	Ali so v vašem kraju trgovine, banke, pošta, lekarna dostopne po pešpoti?			
	ne	31	19,3	13,7–25,9
	da	130	80,7	74,1–86,3
	V kraju, ki je prijazen osebam z demenco, se osebe z demenco počutijo varne.			
	ne	23	14,4	9,6–20,4
	da	137	85,6	79,6–90,4
Strokovne službe	Ali veste, če je v vašem kraju znak Varna točka za starejše?			
	ne	125	81,7	75,0–87,2
	da	28	18,3	12,8–25,0
	Ali ste že slišali za združenje za pomoč pri demenci Spominčica Šentjur?			
	ne	76	47,8	40,1–55,5
	da	83	52,2	44,5–59,9
	Ste se kdaj udeležili predavanja o demenci?			
	ne	140	87,0	81,1–91,5
	da	21	13,0	8,5–18,9
	Javne službe/storitvene dejavnosti v vašem kraju pomagajo osebam z demenco?			
	ne	35	23,0	16,9–30,2
	da	117	77,0	69,8–83,1
	Ali v vašem zdravstvenem domu zgodaj prepoznajo ljudi z demenco in jih ustrezno obravnavajo?			
	ne	29	19,9	14,0–26,9
	da	117	80,1	73,1–86,0



nem okolju »Alzheimer cafejev« v bližini njihovih prebivališč, da bi lahko s svojci obiskovali izobraževanja (17). Npr. v prijetnem lokalnu bi se lahko redno mesečno družili osebe z demenco, njihovi sorodniki, prijatelji, ostali vedoželjni ter zdravstveni in socialni delavci, izobraževali pa jih bi strokovnjaki na področju demence (17). Ob kavi, simbolu družabnega življenja, bi se lahko sproščeno pogovarjali o tem, kako živeti z demenco ter kako povezati bolnike in njihove družine z družbo ter ustreznimi ustanovami. Tako bi strokovnjaki na področju demence in člani nevladnih organizacij skupaj udejanjali poslanstvo modela štirih stebrov podpore za osebe z demenco.

Regionalno združenje Spominčica Šentjur je tudi ustavitev mreže varnih točk za starejše, vendar jih pozna le pesčica anketirancev (18,3 %). Vzrok je lahko ta, da so varne točke v Savinjski regiji prisotne v večjem številu v Šentjurju in v manjšem obsegu le še v občini Šmarje pri Jelšah (14). Pri tem se postavlja vprašanje, kaj javnost razume kot varno točko za starejše, zato bi bilo potrebno mrežo varnih točk dopolniti z bolj prepoznavno slovensko mrežo demenci prijaznih točk (11, 14). Obe vrsti točk sta namreč točki, namenjeni osebam z demenco, svojcem, vsem zaposlenim v različnih službah in tudi vsem drugim v lokalni skupnosti, saj je pomembno, da jih tudi sosedje in sokrajani prepoznaajo in jim pomagajo. Na obe točki se lahko obrnejo po informacije, predvsem pa se seznanijo z načini in postopki usmerjanja oseb z demenco, ki se izgubijo in ne najdejo poti domov. Zaposleni na točkah imajo namreč potrebno znanje in informacije o demenci. Vedo, kakšni so prvi znaki in kako jih prepoznati, kako komunicirati z osebami z demenco, kako jim pomagati v primeru, ko se izgubijo in ne vedo, kje so, kdo so in kako najti pot domov. Tam osebe z demenco in svojci dobijo informacije glede uporabe različnih storitev v skupnosti. Svojci lahko tudi poiščejo informacije o tem, kako preživeti dan z osebo z demenco v skladu z njenimi ohranjenimi zmožnostmi. Prav tako jim lahko posredujejo informacije, kam po pomoč in podporo za osebe z demenco (zdravniki specialisti, urejanje dodatka za pomoč in postrežbo, dnevnega varstva, pomoči na domu ...), svojce pa seznanijo s predavanji o demenci, ki potekajo v njihovem kraju (11, 14).

Čeprav po mnenju večine anketiranih v javnih službah in storitvenih dejavnosti, zlasti v zdravstvenih domovih, pomagajo osebam z demenco (77,0 oz. 80,1 %), je treba izpostaviti nekatera pomembna področja, ki zahtevajo implementacijo stebrov za njihovo podporo. To so zlasti področja v zdravstvenih ustanovah, kjer morajo biti zaposleni do njih prijazni in jim zagotoviti enak standard zdravstvenih storitev, primerno zdravljenje ter jih vključevati

v odločanje (8, 38). Za podporo pri zdravljenju z zdravili njim samim in njihovim svojcem so lahko v veliko pomoč farmacevtske svetovalne storitve (7). S takšnimi ukrepi in uvedbo strategij za zmanjšanje nadaljnega kognitivnega upada bo lahko večina oseb z demenco kljub napredovanju bolezni živila polno življenje z vključevanjem v družbo. Takšni ukrepi so v soglasju s priporočili Strategije obvladovanja demence v Sloveniji do leta 2020 (2016), saj zagotavljajo preventivne ukrepe (vzpostavitev pogojev, izobraževanje prebivalstva ter priporočila za zdrav način življenja, uravnoteženo prehrano, redno fizično in mentalno dejavnost), zgodnjega odkrivanja bolezni ter primeren standard zdravstvene in socialne zaščite ter zdravstvene oskrbe oseb z demenco (39).

Prvi korak, ki ga moramo narediti, je obveščanje in edukacija družbe, da osebe z demenco potrebujejo spodbujanje njihovih še ohranjenih sposobnosti, da lahko ostanejo čim dlje samostojne. Veliko vlogo pri ozaveščanju o tem ima regionalno združenje Spominčica, ki bi moralo redno nadgrajevati izobraževanje o stebrih podpore osebam z demenco prek njihovega druženja v spremstvu svojcev s strokovno ter laično javnostjo v slogu »Alzheimer cafe«. V okviru prostorske podpore bi morala beseda teči o tem, kako v njihovem kraju s fizičnim okoljem, stanovanjsko ureditvijo in javnim prevozom podpirajo osebe z demenco. V okviru uporabe ljudskih virov bi se morali pogovarjati o tem, ali obstajajo zadostne storitve in oprema za osebe z demenco, ki ustrezajo njihovim potrebam in podpirajo njihove zmožnosti. V okviru storitvenih dejavnosti in strokovnih služb bi se morali pogovarjati o tem, ali se negovalci, družine, prijatelji, sosedje, sokrajani, zdravstveni, socialni delavci in farmacevti ter širša skupnost odzivajo in podpirajo osebe z demenco. V okviru delovanja mreže bi morali ugotavljati, ali podporniki oseb z demenco komunicirajo, sodelujejo in skupaj načrtujejo. Nikakor pa ne smemo pozabiti, da ključno vlogo pri tem igrajo osebe z demenco s predlogi za njim prijazno skupnost v njihovem kraju.

Pomanjkljivosti raziskave vključujejo manjši regijsko omejen vzorec, zato rezultatov ne moremo prenesti na celotno populacijo Slovenije. Večja raziskava, ki bi vključevala več slovenskih regij, bi lahko dala širši vpogled v to tematiko v naši državi. Pomanjkljivost raziskave je tudi, da je bil vprašalnik sestavljen na pregledu le enega tujega in enega domačega vprašalnika in da po strokovni presoji vsebinske in formalne plati ni sledila validacija vprašalnika. Z uporabo drugih vprašalnikov bi lahko dobili dodatne vpoglede v poznvanje demence in razumevanje stebrov pomoči za osebe z demenco.

6 SKLEP

Raziskava prinaša pomembne nove ugotovitve o poznavanju demence in podpore za osebe z demenco v lokalnem okolju in odpira področja, kjer je potrebno dodatno ozaveščanje. Na podlagi ugotovitev izvedene raziskave lahko zaključimo, da je med odraslimi obiskovalci zdravstvenih domov v Savinjski regiji prisotno dobro poznavanje demence, kar pa ne velja za poznavanje posameznih stebrov pomoči za osebe z demenco. Najbolj pomanjkljivo je poznavanje in razumevanje aktivnosti, ki sodijo v steber podpore ljudje in mreža, kar osebam z demenco še dodatno otežuje socialno vključevanje.

Kakovostno zdravstveno obravnavo osebe z demenco, ki sodi v steber strokovne službe, bi lahko izboljšali tudi s sistematičnim izvajanjem farmacevtske svetovalne storitve farmakoterapijski pregled v okviru ambulante farmacevtskega svetovalca v zdravstvenem domu.

7 LITERATURA

1. WHO. Dementia [Internet]. WHO; 2021 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. Alzheimer Europe. Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of Dementia in Europe [Internet]. [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.alzheimer-europe.org/Publications/Dementia-in-Europe-Yearbooks>
3. Kogoj A. Značilnosti in razumevanje demence. In: Mali J, Milošević Arnold V, ur. Demenza – iziv za socialno delo. 2. natis. Ljubljana: Fakulteta za socialno delo, 2011: 5-22.
4. Glavnik T. Izzivi in nove priložnosti pri obravnavi dementnega bolnika v lekarni. Farm Vestn. 2017;68:177-83.
5. Crampton J, Dean J, Eley R. Creating a Dementia Friendly York [Internet]. Joseph Rowntree Foundation; 2012 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.jrf.org.uk/report/creating-dementia-friendly-york>
6. Hare P. Dementia without Walls: Reflections on the Joseph Rowntree Foundation Programme. Working with Older People. 2016;20(3):134-43.
7. Tašker B. Polifarmakoterapija pri dementnem bolniku – klinični primer. Farm Vestn. 2015;66:13-8.
8. Felc B. Pravica bolnika z demenco do samostojnega odločanja o zdravljenju. Pravna praksa. 2019; 38(26):14-6.
9. Glynn RW, Shelley E, Lawlor BA. Public knowledge and understanding of dementia-evidence from a national survey in Ireland. Age and Ageing. 2017;46(5):865-9.
10. Ošlak K, Musil B. Odnos do demence in stigma demence. Javno zdravje. 2017;(1):74-83.
11. Spominčica – Alzheimer Slovenija. Demenci prijazne točke DTP [Internet]. [cited 2021 Nov 12]. Available from: https://www.spomincica.si/?page_id=85825
12. Alzheimer's Disease International. Dementia Friendly Community Resources [Internet]. The Global Voice on Dementia. Canada - Dementia Friendly Communities. Available from: <https://www.alz.co.uk/dementia-friendly-communities/canada>
13. Spominčica – Alzheimer Slovenija. Usposabljanje za vzpostavitev Demenci prijazne točke na Zdravniški zbornici Slovenije [Internet]. [cited 2021 Nov 12]. Available from: <https://www.spomincica.si/?p=96769>
14. Spominčica Šentjur, 2015 [Internet]. Projekt Varne točke. [cited 2021 Nov 12]. Available from: <http://www.spomincica-sentjur.si/index.php/projekti/osebam-z-demenco-prijaznen-kraj>
15. Savinjska Statistical Region, 2018 [Internet]. WIKI 2 Wikipedia Republished. [cited 2021 Nov 12]. Available from: https://wiki2.org/en/Savinjska_Statistical_Region
16. Dobner S. Bruges: A Dementia-Friendly City [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 12]. Available from: <http://theprotocity.com/bruges-dementia-friendly-city/>
17. Greenwood N, Smith R, Akhtar F, Smith R , Akhtar F, Richardson A. A qualitative study of carers' experiences of dementia cafés: a place to feel supported and be yourself. BMC Geriatr. 2017;17(1):164-73.
18. Fleming R, Bennett K, Preece T, Phillipson L. The Development and Testing of the Dementia Friendly Communities Environment Assessment Tool (DFC EAT). International Psychogeriatrics. 2017;29(2):303-11.
19. Darovec J, Kogoj A, Kores Plesničar B, Muršec M, Pišljar M, Pregelj P, et al. Smernice za obravnavo bolnikov z demenco. Zdrav Vestn. 2014;83(7/8):497-504.
20. Brooker D, La Fontaine J, Evans S, Bray J, Saad K. Public health guidance to facilitate timely diagnosis of dementia: Alzheimer's Cooperative Valuation in Europe recommendations. Geriatric psychiatry. 2014;29(7):682-93.
21. Milošević Arnold V. Socialnode洛vn pogled na demenco. In: Mali J, Milošević Arnold V, ur. Demenza – iziv za socialno delo. 2. natis. Ljubljana: Fakulteta za socialno delo; 2011:23-36.
22. Marvanova M, Henkel PJ. Community Pharmacists' Knowledge Regarding Donepezil Averse Effects and Self-Care Recommendations for Insomnia for Persons with AD. Pharmacy. 2017;5(3):42.
23. Bernik Golubić Š. Storitev Standardni operativni postopek za storitev pregled uporabe zdravil. Lekarniška zbornica. Slovenje 2016.
24. Bernik Golubić Š. Standardni operacijski postopek za storitev farmakoterapijski pregled. Lekarniška zbornica Slovenije. 2016.
25. Kogoj A. Care for people with dementia in Slovenia. Psychiatr Danub. 2008;20(2):217-19.
26. WHO. Risk reduction of cognitive decline and dementia. WHO Guidelines [Internet]. WHO; 2019 [cited 2021 Jun 1]. Available from: https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/guidelines_risk_reduction/en/
27. Rutar Ilc Z. Znanje, razmišljanje in človečnost – od učiteljev k učencem. Vzgoja in izobraževanje 2021; 52 (1-2): 5.
28. Kare A. Podpora splošne knjižnice pri soočanju z demenco: stanje v slovenskih splošnih knjižnicah. Knjižnica. 2018;62(4):55-85.
29. Rahman S, Swaffer K. Assets-based approaches and dementia-friendly communities. Dementia. 2018;17(2): 131-7.
30. Clare L, Nalis SM, Quinn C, Martyr A, Henderson C, Hindle JV, et al. Improving the experience of dementia and enhancing active life – living well with dementia: study protocol for the

- IDEAL study. Health and Quality of Life Outcomes.* 2014;12:164-79.
31. O'Dwyer ST, Moyle W, Taylor T. In Their Own Words: How Family Carers of People with Dementia Understand Resilience. *Behav Sci* 2017; 7 (3):57-69.
32. Jensen M, Nwando A I, Canavan M, McCarthy G. Effectiveness of educational interventions for informal caregivers of individuals with dementia residing in the community: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Geriatric Psychiatry*. 2015;30(2):130-43.
33. Swafford K. Dementia: Stigma, Language, and Dementia-friendly. *Dementia*. 2014; 13(6):709-16.
34. Cahill S, Pierce M, Werner P, Darley A, Bobersky A. A systematic review of the public's knowledge and understanding of Alzheimer's disease and dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2015; 29(3):255-75.
35. Brezovar S. Med zdravim staranjem in demenco. *Otrok in knjiga* 2017;44(98):44-48.
36. Harada CN, Natelson Love MC, Triebel K. Normal Cognitive Aging. *Clin Geriatr Med*. 2013; 29(4):737-52.
37. Ovčar Štante K, Potočnik J, Rakuša M. Vaskularni kognitivni upad in vaskularna demenca. *Zdrav Vestn* 2017;86:331-45.
38. Lin SY. Dementia-friendly communities« and being dementia friendly in healthcare settings. *Curr Opin Psychiatry* 2017;30(2):145-50.
39. Ministrstvo za zdravje. Strategija obvladovanja demence v Sloveniji do leta 2020 [Internet]. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje; 2016 [cited 2021 Jun 1]. Available from: https://www.zod-lj.si/images/Strategija_obvladovanja_demence.pdf



POLIMERNA NANOVLAKNA ZA DOSTAVO UČINKOVIN IN REGENERACIJO TKIV PRI ZDRAVLJENJU RAKA

POLYMER NANOFIBERS FOR DRUG DELIVERY AND TISSUE REGENERATION IN CANCER TREATMENT

AVTORICE / AUTHORS:

Tanja Potrč, mag. farm.¹

prof. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol.²

izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.¹

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

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Inštitut za biologijo celice,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: petra.kocbek@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Nanotehnologija odpira nove možnosti za bolj učinkovito in bolniku prijazno zdravljenje raka. V zadnjem času so na tem področju aktualne raziskave polimernih nanovlaken, saj omogočajo vnos različnih vrst protirakovih učinkovin in tudi podporno zdravljenje raka ter obnovo tkiv po operativnih posegih. Veliko obetajo zlasti nanovlakna za oralno uporabo, saj predstavlja sluznica ustne votline lahko dostopno in bolniku prijazno mesto za aplikacijo dostavnih sistemov na osnovi nanovlaken. Z elektrostatskim sukanjem lahko izdelamo polimerna nanovlakna za ciljano lokalno zdravljenje, npr. raka ustne votline, ali za sistemsko lajšanje neželenih učinkov klasične kemoterapije. Inovativen pristop pa predstavlja uporaba nanovlaken z vgrajenimi celicami, ki imajo velik potencial tako pri zdravljenju raka kot pri regeneraciji tkiv. Polimerna nanovlakna tako obetajo bolj učinkovito zdravljenje določenih rakovih bolezni ter izboljšanje kakovosti življenja onkoloških bolnikov.

KLJUČNE BESEDE:

dostava učinkovin, nanovlakna, regeneracija tkiv, ustna sluznica, zdravljenje raka

ABSTRACT

Nanotechnology offers new possibilities for more efficient and patient-friendly cancer treatment. Polymer nanofibers are in the focus of research in this area. They enable delivery of various types of anticancer drugs, as well as supportive cancer treatment and tissue regeneration after surgery. Nanofibers for oral use are particularly promising, since the oral mucosa is an easily accessible and patient-friendly site for the application of nanofiber-based delivery systems. The polymer nanofibers for local cancer treatment, e.g. oral cavity cancer, or systemic treatment of side effects associated with classical chemotherapy can be produced by electrospinning. Application of nanofibers with embedded cells represents an innovative approach showing great potential in both the cancer treatment and tissue regeneration. Polymer nanofibers are thus expected to enable more efficient treatment of certain cancers and to improve quality of life of cancer patients.

KEY WORDS:

cancer treatment, drug delivery, nanofibers, oral mucosa, tissue regeneration

1 UVOD

Rakave bolezni predstavljajo drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu, takoj za srčno-žilnimi boleznimi. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije se incidenca rakavih bolezni v zadnjih letih povečuje, s čimer postajajo vedno večji zdravstveni problem v svetovnem merilu (1). Pravčasna diagnostika bolezni igra ključno vlogo pri zdravljenju ter možnosti popolne ozdravitve. Uspešnost trenutno razpoložljivih postopkov zdravljenja je v veliki meri odvisna od stadija bolezni, pomemben parameter pa predstavlja tudi mesto bolezni (1, 2).

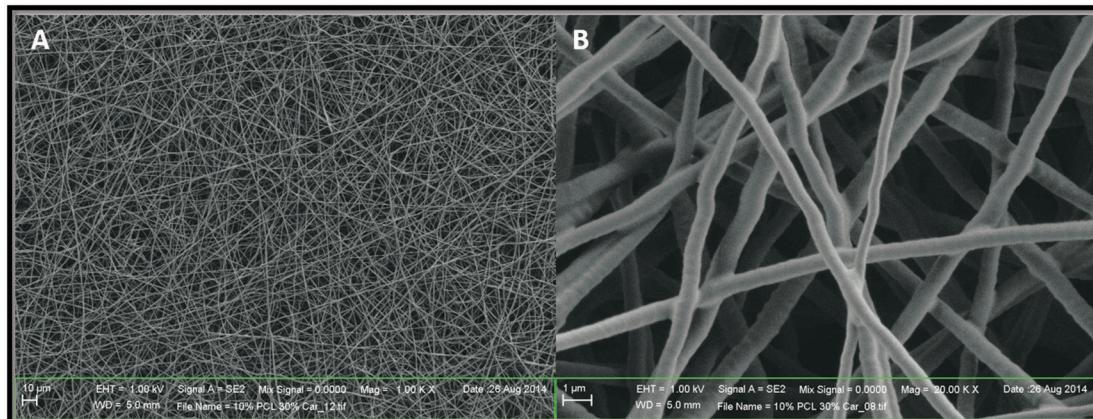
Največji težavi trenutno uveljavljenih terapevtskih pristopov za zdravljenje raka sta odpornost nekaterih oblik raka na razpoložljive pristope zdravljenja ter nespecifično porazdeljevanje zdravilnih učinkovin v organizmu, s čimer so povezani neželeni učinki (2). Po drugi strani pa poznamo vrsto potencialnih zdravilnih učinkovin, ki izkazujejo velik potencial za zdravljenje rakavih bolezni, vendar njihove specifične fizikalno-kemijske lastnosti ovirajo razvoj ustreznih farmacevtskih oblik ter njihov prihod na trg, saj ne zagotavljajo ustrezne učinkovitosti in/ali varnosti zdravila (3, 4).

Ciljano zdravljenje je zagotovo eden izmed najbolj zaželenih pristopov zdravljenja raka, saj zagotavlja dostavo in sproščanje zdravilne učinkovine na obolelem mestu. Na ta način se učinkovitost zdravljenja poveča, neželeni učinki, ki lahko močno vplivajo na kakovost življenja bolnika, pa zmanjšajo (5). Nanotehnologija predstavlja v tem okviru zelo pomem-

bno področje, saj je v zadnjem obdobju z različnimi nanozdravili, ki za dostavo učinkovin izkoriščajo nanodostavnne sisteme, bistveno doprinesla k napredku ciljanega zdravljenja (6, 7, 8). Z uporabo naprednih nanodostavnih sistemov lahko na inovativen način izboljšamo farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti že uveljavljenih ter potencialnih novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje raka (4, 9). Zmanjšana velikost dostavnega sistema kot tudi delcev same učinkovine izboljša topnost ter biološko uporabnost učinkovine, kar omogoča zmanjšanje odmerka za dosego enakega terapevtskega učinka (10). Z uporabo nanodostavnih sistemov se podaljša razpolovni čas vgrajene zdravilne učinkovine, s čimer pa se zmanjša tudi število potrebnih odmerkov zdravila (4, 9). Nekateri nanodostavnni sistemi omogočajo še premagovanje fizioloških pregrad v organizmu in vnos učinkovin na mesta, ki so s klasičnimi farmacevtskimi oblikami nedostopna (npr. vnos v možgane) (11). Poznamo več različnih vrst nanodostavnih sistemov, ki so jih že proučevali ali so že v klinični uporabi za diagnostiranje in/ali zdravljenje raka, kot so liposomi, dendrimeri, polimerni in trdni lipidni nanodelci ter imunokonjugati. Velik, vendar še neizkorisčen potencial za uporabo pri zdravljenju raka pa izkazujejo nanovlakna (12, 13).

2 NANOVLAKNA

Nanovlakna (slika 1) so trdna vlakna s premerom od nekaj deset do 1000 nm in s teoretično neomejeno dolžino (14).



Slika 1: Polimerna nanovlakna, posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri (A) majhni in (B) veliki povečavi.
Figure 1: Scanning electron microscopy image of polymer nanofibers at (A) low and (B) high magnification.



Zanje je značilna relativno velika površina na enoto mase, velika poroznost mreže nanovlaken z majhno velikostjo intrafibrilarnih por (2 do 10 nm) (15), večja prožnost ter mehanska trdnost v primerjavi z istim materialom večjih dimenzijs ter sposobnost tvorbe tridimenzionalne kontinuirane mreže. Zaradi edinstvenih fizikalnih in kemijskih lastnosti ter relativno enostavne izdelave zasedajo pomembno место v raziskavah na različnih področjih. V zadnjem času so v ospredju predvsem raziskave možnosti njihove uporabe na področju biomedicine (14, 16). Nanovlakna lahko izdelamo iz polimerov naravnega ali sinteznega izvora, ki predstavljajo ogrodje vlaken, v katero lahko vgradimo do več kot 30 % (m/m) zdravilne učinkovine (17). Izbera polimera (ali polimerov) kot ogrodnega materiala dostavnega sistema pomembno vpliva na končne lastnosti izdelka (18). Za uporabo v biomedicini je želeno, da so uporabljeni materiali biokompatibilni in biorazgradljivi (16).

Polimerna nanovlakna izdelamo z različnimi postopki, med katerimi velja elektrostatsko sukanje za eno najenostavnejših in najcenejših metod, ki omogoča kontinuirano in standardizirano pripravo nanovlaken iz raztopin ali talin različnih polimerov (13).

2.1 PRIMERI UPORABE NANOVLAKEN PRI ZDRAVLJENJU RAKA

Nanovlakna izkazujejo zaradi svojih specifičnih lastnosti obetavne rezultate na področju diagnostike in zdravljenja bolezni ter regeneracije tkiv (5). Še zlasti pomembno področje, na katerem predvsem v zadnjem desetletju potekajo obsežne raziskave, je diagnosticiranje ter zdravljenje rakih bolezni. Raziskovalna skupina Ma in sod. je kot ena prvih začela raziskave na področju nanovlaken in izkoriščanja njihovega potenciala pri zdravljenju raka (19). Predstavili so večstopenjsko pripravo hidrofilnih nanovlaken z vgrajenim paklitakselom, citostatikom novejše generacije. V prvem koraku so s pomočjo elektrostatskega sukanja pravili vlakna iz polietilenoksida in hitosana. Nastala vlakna so nato za 10 ur namočili v prečiščeno vodo, pri čemer so selektivno odstranili polietilenoksid in dobili porozna hitosanska vlakna. Nato so vlakna za nadaljnjih 8 ur izpostavili 0,1-odstotni (m/m) raztopini paklitaksela, da se je le-ta vgradil v pore vlaken. V zadnjem koraku so v sistem dodali še hialuronsko kislino, pri tem je prišlo do elektrostatskih interakcij med pozitivno nabitimi molekulami hitosana in negativno nabitimi molekulami hialuronske kisline. Na tak način je nastala zunanja plast vlaken. Učinkovitost vlaken so preizkušali *in vitro* na rakavi celični liniji prostate DU145 in dobili obetavne rezultate, saj sta se zmanjšali tako ad-

hezija kot proliferacija celic. Dobljeni rezultati kažejo velik potencial dostavnega sistema na osnovi nanovlaken za uporabo pri postoperativni kemoterapiji raka prostate (19). Amna s sod. je proučeval sistem polikaprolaktionskih nanovlaken z vgrajenim kamptotecinom, ki ga uvrščamo med zaviralce topoizomeraze I (20). Osnovni cilj raziskave je bil izboljšati stabilnost in topnost učinkovine ter doseči bolj učinkovito protitumorno delovanje. Citotoksičnost izdelanega dostavnega sistema so proučevali na mišji mioblastni celični liniji C2C12, pri čemer so kot kontrolo uporabili učinkovino v prosti obliki ter polikaprolaktionska vlakna brez vgrajenega kamptotecina. V primerjavi z obema kontrolama so nanovlakna z vgrajeno učinkovino izkazovala večjo citotoksičnost. Dokazali so, da je slednje posledica povečane stabilnosti kamptotecina v nanovlaknih. Zaradi velike površine na enoto mase nanovlaken se je znatno povečala tudi topnost zdravilne učinkovine. Poleg tega predvidevajo, da se je v prisotnosti nanovlaken povečal privzem kamptotecina v celice, kar še dodatno utemeljuje bistveno večjo citotoksičnost sistema. Rezultati tako kažejo, da z vgrajevanjem v nanovlakna izboljšamo terapevtsko učinkovitost kamptotecina ter drugih slabih topnih protitumornih učinkov (20).

Za zagotavljanje varnosti tovrstnih nanodostavnih sistemov bi bilo v prihodnje pomembno izvesti še dodatna testiranja na zdravih celicah ter dokazati učinek tudi na kompleksnejših 3D modelih *in vitro*. Tudi raziskovalna skupina Guimarăesa, ki je s pomočjo elektrostatskega sukanja izdelala nanovlakna iz kopolimera mlečne in glikolne kisline z vgrajenim zavircem DNA-topoizomeraze tipa II, davnorubicinom, se je dokopala do zanimivih izsledkov. Ugotovili so, da davnorubicin, vgrajen v polimerna nanovlakna, izkazuje večjo citotoksičnost *in vitro* na humanih epidermoidnih celicah A431 v primerjavi z učinkovino v prosti obliki. Prav tako so rezultati testiranj na miših pokazali, da vgradnja davnorubicina v nanovlakna v primerjavi z njegovo prosti obliko deluje antiangiogeno, tj. zmanjša vaskularizacijo tkiva. V okviru testiranj *in vivo* so tudi potrdili, da sistem nanovlaken z vgrajenim davnorubicinom ne povzroča vnetnega odziva (21).

V zadnjem času pridobivajo na pomenu tudi dvo- ali več-slojna vlakna. Sestavljena so iz jedra ter ene ali več ovojnici. Predstavljajo velik potencial na področju razvoja dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem, tkivnega inženirstva in izdelave nanovlaken z modificirano površino. Tovrstna vlakna omogočajo vgrajevanje težko topnih učinkovin in biomakromolekul (npr. DNA, proteinov in rastnih dejavnikov) v notranji sloj vlaken, kar preprečuje neposredni stik učinkovine z dejavniki iz okolja, ki lahko vplivajo na njeno bio-



loško aktivnost ali jo inaktivirajo (22–26). Pridobivamo jih s prirejeno metodo elektrostatskega sukanja, pri kateri uporabljamo koaksialno šobo (27, 28).

Raziskovalna skupina Yan in sod. je izdelala dvoslojna nanovlakna iz polivinilalkohola v jedru in hitosana v ovojnici nanovlaken. Če sta tako jedro kot ovojnica dvoslojnih nanovlaken zgrajena iz hidrofilnih polimerov, velja, da nanovlakna ne omogočajo nadzorovanega sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine. Tak sistem začne takoj po stiku z medijem nabrekati ter s tem sproščati vgrajeno zdravilno učinkovino. Z ozirom na dejstvo, da sta tako polivinilalkohol kot tudi hitosan hidrofilna polimera, so Yan in sod. rešili težavo s prehitrim sproščanjem doksorubicina tako, da so uporabili modificiran hitosan, ki je bil premrežen z glutaraldehidom, s čimer so učinkovito zmanjšali nabrekanje polimernih verig. Kot modelno zdravilno učinkovino so uporabili antraciklinski antibiotik doksorubicin, ki so ga vgradili v jedro nanovlaken. S pomočjo testa MTS, ki omogoča kolormetrično vrednotenje mitohondrijske aktivnosti ter s tem posredno vrednotenje celične proliferacije, so dokazali, da so polimerna nanovlakna brez vgrajene zdravilne učinkovine biokompatibilna (26). Primerjava učinka doksorubicina v nanovlakih in doksorubicina v prosti obliki je pokazala, da ima slednji v prosti obliki značilno večjo citotoksičnost za proučevane celice raka jajčnika SKOV3. V klinični praksi zdravljenja raka visoka koncentracija učinkovine na mestu delovanja, dosežena v zelo kratkem času, ni vedno zaželena, saj se lahko kot posledica prehitrega in neselektivnega sproščanja zdravilne učinkovine pojavijo številni sistemski neželeni učinki. Raziskave predstavljenega nanodostavnega sistema so pokazale, da lahko s spremnjanjem debeline zunanjega sloja, tj. ovojnice iz hitosana, na enostaven način spremnjamo profil sproščanja vgrajene učinkovine, da dosegemo takšnega, ki bo zagotavljal učinkovitost dostavnega sistema in čim manj neželenih učinkov glede na specifičnost posamezne rakave bolezni. Učinkovitost sproščenega doksorubicina iz dvoslojnih nanovlaken na preizkušenih celičnih linijah je bila zadovoljiva, saj sta se zmanjšali tako adhezija kot proliferacija rakavih celic. Dvoslojna nanovlakna tako ponujajo širok spekter možnosti uporabe v biomedicini. Velik potencial se kaže predvsem na področju razvoja formulacij kemoterapevtikov z nadzorovanim sproščanjem (26).

Zhang s sod. je razvil večplastna nanovlakna za implantiranje na obolelo mesto po operativni odstranitvi raka z namenom preprečevanja ponovitve bolezni. Izdelali so štiriplastna vlakna. Spodnjo plast, ki je bila v stiku z obolelim mestom, so predstavljala vlakna iz polimlečne kisline z vgrajenim dikloroacetatom, nad njo je bila plast praznih

nanovlaken iz polimlečne kisline, temu je sledila plast vlaken z vgrajenim oksaliplatinom ter povrhu še plast iz polimlečne kisline. Učinkovini sta se iz sistema sproščali v dveh pulzih, sam učinek pa je bil še dodatno okrepljen zaradi njunega sinergističnega delovanja. Po implantiranju na obolelo mesto se je iz sistema najprej sprostil dikloroacetat, ki zavira delovanje encima piruvat dehidrogenaza kinaza in selektivno sproža apaptozo rakavih celic. V določenem časovnem zamiku, ki so ga ustrezno prilagodili z debelino plasti praznih vlaken iz polimlečne kisline, se je iz sistema sprostil še oksalipatin, ki je sprožil celično smrt preostalih rakavih celic. Slednji je sicer toksičen tudi za zdravo tkivo, vendar je zaradi lokalne aplikacije ter sinergističnega delovanja z dikloroacetatom potreben bistveno manjši odmerek, kot če bi uporabili samo oksalipatin, kar posledično povzroča manj sistemskih neželenih učinkov. Učinkovitost sistema večplastnih nanovlaken z vgrajenima učinkovinama, ki deluje na sinergistično pri zdravljenju raka materničnega vratu po operativni odstranitvi raka, so dokazali s pomočjo testov *in vitro* na humanih celičnih linijah raka materničnega vratu in testov *in vivo* na miših (29).

2.1.1 Podporno zdravljenje raka z mukoadhezivnimi dostavnimi sistemi na osnovi nanovlaken za aplikacijo na ustno sluznico

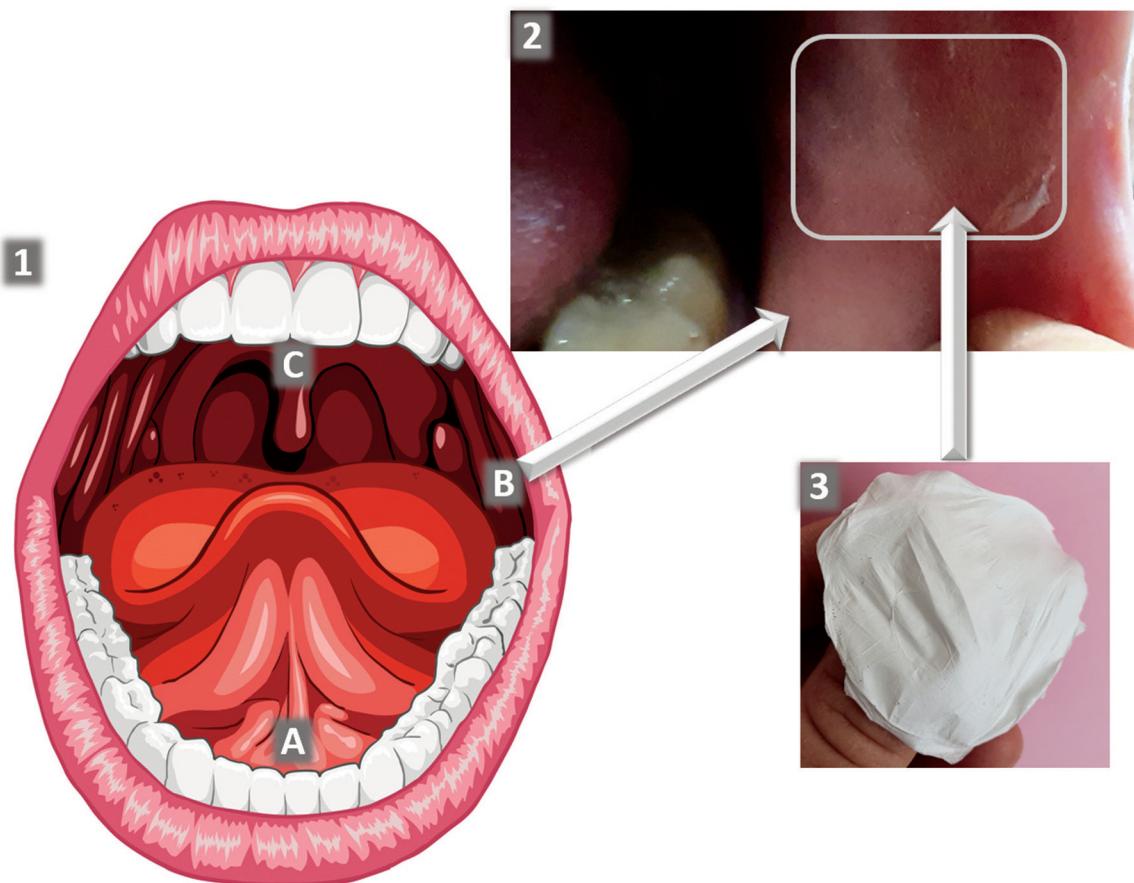
Narava nanovlaken in njihove specifične lastnosti omogočajo razvoj mukoadhezivnih dostavnih sistemov. Velika specifična površina nanovlaken lahko tvori interakcije s tkivi. Ob stiku z mukusom takoj nastopi absorpcija vlage v pore nanovlaken, kar je razlog za intezivno adhezijo na površino sluznic (11), kot so npr. vaginalna, nosna, očesna sluznica ter sluznica ustne votline (30). Z vidika osnovnega in podpornega zdravljenja raka ter nekaterih drugih bolezni predstavlja zlasti sluznica ustne votline ugodno mesto za aplikacijo mukoadhezivnih dostavnih sistemov (31). V primerjavi s peroralno aplikacijo, ki še vedno velja za najpogosteji in s strani bolnikov najbolj sprejemljiv način vnosa zdravilnih učinkovin, zagotavlja aplikacija na ustno sluznico bolj konstantne ter manj agresivne pogoje. Zraven tega se z vnosom zdravilnih učinkovin preko sluznice ustne votline izognemo metabolizmu prvega prehoda, ki je v veliki meri odgovoren za inaktivacijo nekaterih zdravilnih učinkovin ter posledično njihovo neprimernost za peroralni vnos (30, 31). Sluznica ustne votline je dobro prekrvljena, kar omogoča absorpcijo učinkovin v sistemski krvni obtok. Zaradi enostavne in neboleče aplikacije bolniki tak način aplikacije dobro sprejmejo, kar je izrednega pomena na poti do uspešne ozdravitve (32). Takšni mukoadhezivni dostavni sistemi

so primerni tudi za otroke (32), starejše in druge bolnike, ki imajo težave s požiranjem (33).

Pri načrtovanju dostavnega sistema za aplikacijo v ustih se moramo zavedati tudi določenih omejitvev, ki veljajo pri aplikaciji zdravil v ustno votlino. Pomembno je, da imajo zdravilne učinkovine, ki jih želimo vnašati v ustno votlino, ustrezeno fizikalno-kemijske lastnosti. Pri tem igra zelo pomembno vlogo molekulska masa zdravilne učinkovine, ki naj ne bi presegala 800 Da, njena priporočena vrednost log P (voda/oktan) pa mora biti okrog 2 (32). To pomeni, da mora biti učinkovina relativno dobro vodotopna oz. vgrajena v ustrezen (nano)dostavni sistem, ki izboljša njen topnost. Učinkovina ne sme povzročati iritacije po nanosu (32). Zaradi relativno majhne površine ustne votline, ki je ustrezena za absorpcijo zdravilnih učinkovin, je ta način vnosa primeren le za visokopotentne zdravilne učinkovine.

Velik izziv pri aplikaciji zdravilnih učinkovin na ustno sluznico predstavlja tudi prisotnost slino (32). Slina ima vlogo lubrikanta, omogoča požiranje, tvori protibakterijsko proteinsko zaščitno oblogo na zobe ter preprečuje demineralizacijo zob, sodeluje pa tudi pri razgradnji ogljikovih hidratov. Predstavlja pa tudi medij za raztapljanje učinkovin. Njen volumen pri odraslem človeku znaša le 1,1 mL (30). Pri načrtovanju dostavnih sistemov za aplikacijo na ustno sluznico se moramo zavedati, da prihaja zaradi spiranja s slino do izgub učinkovine, preden se le-ta absorbira skozi ustno sluznico (32, 34).

Sluznico ustne votline v grobem delimo na podježično oz. sluznico ustnega dna, bukalno oz. lična sluznica ter trdo nebo (slika 2) (30). Za aplikacijo farmacevtskih oblik ima najbolj ugodne lastnosti bukalna sluznica, saj je lahko dostopna, skorajda nepremična in dobro prekrnjena (30, 34).



Slika 2: (1) Shematski prikaz ustne votline: (A) podježična oz. sluznica ustnega dna, (B) bukalna oz. lična sluznica in (C) trdo nebo; (3) makroskopski izgled nanovlaken pred aplikacijo.

Figure 2: (1) Schematic representation of the oral cavity: (A) sublingual, (B) buccal and (C) palatal mucosa (C); (2) macroscopic appearance of nanofibers before application.



Prav tako je najmanj podvržena motnjam, ki so posledica govorjenja, prehranjevanja in premikanja jezika. Zaradi nekeratiniziranega večskladnega ploščatega epitelija je bistveno bolj permeabilna kot trdo nebo, ki je zgrajeno iz keratiniziranega večskladnega ploščatega epitelija (31). Permeabilnost bukalne sluznice je v primerjavi s podjezično sluznico nekoliko slabša, vendar je pri aplikaciji na sluznico ustnega dna bistveno bolj izražena izguba učinkovine zaradi spiranja s slino, saj je na tem območju največje število izvodil žlez slinavk (30).

Ustna votlina predstavlja zelo priročno mesto za aplikacijo dostavnih sistemov na osnovi nanovlaken. Takšni dostavni sistemi so lahko namenjeni bodisi lokalnemu zdravljenju raka ustne votline bodisi zdravljenju neželenih učinkov, ki se pojavljajo kot posledica kemoterapije (npr. glivične okužbe in lezije v ustih, slabost) (5). Rak ustne votline in ustnega dela žrela predstavlja približno 3 % rakov, ki jih letno odkrijejo v Sloveniji. Navkljub precejšnjemu napredku pri zdravljenju karcinomov ustne votline, je preživetje teh bolnikov še vedno relativno nizko, saj podatki kažejo, da znotraj petletnega obdobja preživi zgolj 55 % obolelih (35). Slednje lahko v veliki meri pripišemo slabemu poznavanju bolezni, pogosto pozni diagnostiki ter začetku zdravljenja bolezni.

Osnovni namen zdravljenja malignih tumorjev ustne votline je v prvi vrsti popolna odstranitev rakavega tkiva, prav tako pa mora biti v najbolji možni meri zagotovljena rekonstrukcija, torej obnovitev oblike in funkcije ustne votline. Pri zdravljenju karcinoma ustne votline še vedno ni enotnih merit in protokolov, zaželeno pa je, da se pri načrtovanju zdravljenja osredotočimo na eno samo metodo. Trenutno najpogosteje posegajo po kirurškem zdravljenju ter obsevanju, vendar sta obe metodi precej invazivni ter s tega vidika slabše sprejeti pri bolnikih (35).

Mukoadhezivna nanovlakna z vgrajenim citostatikom za aplikacijo na obolelo sluznico ustne votline predstavljajo dobro alternativo trenutno razpoložljivim postopkom zdravljenja. Takšno zdravljenje bi bilo lokalno, zato bi bili neželeni učinki, do katerih zelo pogosto prihaja pri sistemski kemoterapiji ali obsevanju, bistveno manj izraženi, bi pa bilo tovrstno zdravljenje omejeno na bolnike, pri katerih karcinom ustne votline odkrijejo v zgodnjem stadiju. Raziskovalna skupina Singha se je ukvarjala z razvojem mukoadhezivnih nanovlaken iz polivinilalkohola za vnos protitumorne učinkovine iz družine taksanov (docetaksela) skozi sluznico ustne votline. Na podlagi testiranj *in vitro* na celični liniji raka dojke T47D so dokazali večjo citotoksičnost docetaksela, vgrajenega v nanovlakna, v primerjavi s samo učinkovino. Večja citotoksičnost daje možnost razvoja dostav-

nega sistema, kamor bi lahko vgradili manjši odmerek učinkovine, s čimer bi bili bistveno manj izraženi tudi neželeni učinki (36).

Pri velikem številu bolnikov, ki se zdravijo s kemoterapijo, pride zaradi zmanjšanja imunske odpornosti tudi do pojava kandidoze v ustni votlini (37). Bolezen se največkrat izraža z bolečimi razjedami v ustni votlini ter ustnicah. Zaradi pogostih krvavitev ter prisotne bolečine, ki je lahko bodisi blaga ali pa zelo huda, kar je odvisno predvsem od razsežnosti bolezni ter od splošnega zdravstvenega stanja bolnika, prihaja do težav pri negi ustne votline, govorjenju, zaradi oteženega požiranja pa tudi pri prehranjevanju in pitju (37, 38). Vse to vodi v izgubo telesne mase, k še večji oslabitvi imunskega sistema ter bistveno slabši kakovosti življenja bolnikov (39).

Tonglarium s sod. je raziskoval različne možnosti uporabe nanovlaken na osnovi hitosana in polivinilalkohola z vgrajenim Klotrimazolom za lokalno zdravljenje oralne kandidoze. Z uporabo različnih testov so proučevali protigliivično delovanje nanovlaken in njihovo morebitno citotoksičnost. Izkazalo se je, da imajo preskušana nanovlakna bistveno hitrejše ter učinkovitejše protigliivično delovanje kot komercialno dostopne pastile s Klotrimazolom. Ugotovili so tudi, da dostavni sistem na humane fibroblaste, izolirane iz dlesni zdravih prostovoljcev, ni deloval toksično (40).

Ista skupina raziskovalcev je izdelala tudi dvoplastna nanovlakna s Klotrimazolom, s pomočjo katerih so žeeli izboljšati mukoadhezivnost sistema ter podaljšati čas sproščanja učinkovine. Izdelali so notranjo plast vlaken iz polivinilpirolidona ter hidroksipropil-β-ciklodekstrina z vgrajenim Klotrimazolom in nato dodali še zunanjо plast iz polivinilalkohola ter sintezno spremenjenega hitosana z vezanim cisteinom. Ugotovili so, da je v primeru vlaken z večjo debelino zunanje plasti prišlo do počasnejšega sproščanja učinkovine zaradi podaljšane difuzije Klotrimazola čez plast polimerov, obenem pa je zunanjо plast nanovlaken izboljšala njihovo mukoadhezivnost na sluznico ustne votline. Na sevu kandidate (*Candida albicans* ATCC 90028) je bilo potrjeno boljše protigliivično delovanje nanovlaken s Klotrimazolom v primerjavi s komercialno dostopnimi pastilami, test *in vitro* citotoksičnosti na humanih fibroblastih gingive pa je potrdil varnost uporabe izdelka. Obe formulaciji nanovlaken izkazujeta velik potencial za nadaljnje raziskave *in vivo* za namen zdravljenja kandidoze ustne votline (41).

Tudi slabost in bruhanje spadata med vodilne neželene učinke pri rakavih bolnikih, ki se zdravijo s kemoterapijo. Po podatkih iz literature prizadeneta kar med 60 in 80 % vseh onkoloških bolnikov. Pri bolnikih povzročata še do-

daten stres, hkrati pa bistveno zmanjšujeta sodelovanje bolnikov pri predpisanim zdravljenju (42). Težava se pojavi tudi pri vnosu antiemetikov. Pri bolnikih s slabostjo klasične peroralne farmacevtske oblike (tablete in kapsule) namreč niso ustrezne za vnos antiemetikov, saj jih večina bolnikov izbruha, še preden nastopijo sproščanje in absorpcija zdravilne učinkovine iz gastrointestinalnega trakta ter sistemski učinek. Zaradi tega so zelo aktualne raziskave orodisperzibilnih filmov, ki omogočajo takojšnje sproščanje vgrajene učinkovine. Orodisperzibilni filmi na osnovi nanovlaken izkazujejo zaradi svojih specifičnih lastnosti velik potencial za izboljšanje absorpcije zdravilnih učinkovin tako iz ustne votline kot iz gastrointestinalnega trakta.

Na tem področju deluje raziskovalna skupina Vuddanda, ki je izdelala nanovlakna iz polivinilalkohola z vgrajenim ondasetronom. Le-ta je selektivni antagonist receptorjev 5HT₃ in je eden najpogosteje uporabljenih antiemetikov. Zahvaljujoč svoji nanometrski strukturi ter hidrofilnim lastnostim uporabljenega polimera omogoča izdelani dostavni sistem zelo hitro sproščanje (90 s) vgrajene učinkovine. Tako predstavljajo polivinilalkoholna nanovlakna alternativo vsem že obstoječim farmacevtskim oblikam, namenjenim oralni aplikaciji antiemetičnih zdravilnih učinkovin (43).

Tudi naša raziskovalna skupina se ukvarja z razvojem nanovlaken za uporabo na bukalni sluznici. Dokazali smo, da lahko z vgradnjo slabo topnih zdravilnih učinkovin v nanovlakna, kamor uvrščamo tudi številne antiemetike, izboljšamo njihovo hitrost raztopljanja. S tem se odpira možnost uporabe takšnega tehnološkega pristopa za številne učinkovine, ki sicer izkazujejo velik terapevtski potencial, vendar je njihova glavna omejitev slaba vodo-topnost ter posledično majhna biološka uporabnost (17, 44, 45).

2.1.2 Elektrostatsko sukanje nanovlaken s celicami in njihov potencial pri zdravljenju raka

Večina človeških organov in tkiv je na mikro- in nanometrski ravni hierarhično organiziranih vlaknatih struktur, ki jih s svojo topografijo, debelino in mehanskimi lastnostmi lahko posnemajo nanovlakna (14). Z vgradnjo živih celic v mrežo nanovlaken ter njihovo tridimenzionalno porazdelitvijo v polimerem ogrodju pa se razširi potencial uporabe takšnih nanovlaken na področje regenerativne medicine ter razvoja dostavnih sistemov za ciljano zdravljenje. Z ustrezeno izbiro biokompatibilnih polimerov, kot so šelak, ksantan in karagenani, lahko izdelamo nanovlakna kot dostavne sisteme z želenim profilom sproščanja, ki zagotavljajo optimalno zdravljenje glede na značilnosti posamezne bolezni (46).

Vgradnja celic v takšne nanodostavne sisteme pa predstavlja eno izmed zelo perspektivnih področij raziskav v biomedicini, kjer je odprtih še veliko vprašanj in raziskovalnih izzivov. Metodo elektrostatskega sukanja nanovlaken s celicami sta šele pred dobrim desetletjem začela razvijati Townsend-Nicholson ter Jayasinghe (47). To so bili prvi poskusi vključevanja živih celic v biokompatibilno polimerno ogrodje, danes pa ima ta metoda vodilno mesto na področju vgradnje celic v nanovlakna. V večini primerov v ta namen uporabljamo elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe (47). K uspešnosti in razširjenosti uporabe metode je zagotovo v veliki meri prispevalo dejstvo, da sam proces, če je ustrezeno nadzorovan, ne vpliva na biološko aktivnost uporabljenih celic (48).

Raziskovalna skupina Chena je na osnovi elektrostatskega sukanja polivinilalkohola in matičnih celic izdelala bioaktivno membrano, namenjeno uporabi na področju regenerativne terapije. Matične celice, vgrajene v vlakna, so dali v petrijevko z ustreznim medijem ter spremljali proliferacijo in preživetje celic. Ugotovili so večjo proliferacijo in preživetje matičnih celic, ki so bile vgrajene v vlakna, v primerjavi s samimi matičnimi celicami v kulturi. Tako so potrdili potencial in uporabnost elektrostatskega sukanja celic za uporabo na področju obnove tkiv (49).

3 SKLEP

Razvoj novih zdravil za zdravljenje raka je zaradi kompleksnosti bolezni in specifičnih lastnosti protirakovih učinkovin velik tehnološki iziv. Med novejše in perspektivne nanodostavne sisteme, ki ponujajo ogromno možnosti za napredno in učinkovitejše zdravljenje raka z bistveno manj neželenimi učinki v primerjavi s konvencionalnim zdravljenjem, sodijo polimerna nanovlakna. Biokompatibilna polimerna nanovlakna omogočajo vgradnjo relativno velike količine zdravilne učinkovine in so zaradi svojih specifičnih lastnosti, ki so odraz nanometrske velikosti, primerna tudi za aplikacijo na sluznico ustne votline. Uporaba nanovlaken na sluznici ustne votline bi zdravljenje približala bolniku, saj je bolniku prijazna, ker je neboleča in neinvazivna, izvede pa jo lahko bolnik sam. Prav tako lahko z uporabo različnih polimerov razvijemo dostavni sistem, ki zagotavlja optimalni oz. želeni profil sproščanja učinkovine. Edina omejitev pri izbiri ogrodnega materiala je mukoadhezivnost, ki je potrebna zaradi aplikacije in zadrževanja nanodostavnega si-



stema na sluznici ustne votline. Dostavne sisteme na osnovi nanovlaken bi lahko s pridom izkoriščali za zdravljenje lokaliziranih oblik raka ustne votline ter za zdravljenje raznih lezij na ustni sluznici, ki se pogosto pojavijo kot posledica zmanjšane imunske odpornosti pri zdravljenju raka s kemoterapijo. Z aplikacijo nanovlaken na bukalno sluznico pa lahko dosežemo tudi sistemski učinek, s čimer lahko blažimo slabost in bruhanje, ki sta zelo pogosta neželena učinka pri kemoterapiji. S takim inovativnim načinom zdravljenja bi lahko bistveno prispevali k dvigu kakovosti življenja onkoloških bolnikov.

4 LITERATURA

1. WHO. Cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Gmeiner WH, Ghosh S. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnol Rev* [Internet]. 2014 Jan 1;3(2). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ntrv-2013-0013/html>
3. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett* [Internet]. 2010 Sep 8;10(9):3223–30. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl102184c>
4. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. Vol. 200, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2015. p. 138–57.
5. Chen Z, Chen Z, Zhang A, Hu J, Wang X, Yang Z. Electrospun nanofibers for cancer diagnosis and therapy. *Biomater Sci* [Internet]. 2016;4(6):922–32. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6BM00070C>
6. Kristl J. Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farm Vestn*. 2021;63(2):67–73.
7. Jain V, Jain S, Mahajan SC. Nanomedicines Based Drug Delivery Systems for Anti-Cancer Targeting and Treatment. *Curr Drug Deliv* [Internet]. 2015 Apr 23;12(2):177–91. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=12&issue=2&spage=177>
8. Obreza A, Šmid - Korbar J, Humar M, Janeš D, Lunder M, Razinger B, et al. Farmacevtski terminološki slovar [Internet]. Humar M, Šmid - Korbar J, >Obreza A, editors. ZRC SAZU, Založba ZRC; 2011. (Terminologiše). Available from: <https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski/#v>
9. Cegnar M, Kerč J. Nanozdravila. *Farm Vestn*. 2012;63(2):82–7.
10. Sebe I, Szabó P, Kállai-Szabó B, Zelkó R. Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. Vol. 494, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier; 2015. p. 516–30.
11. Kocbek P. Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije. *Farm Vestn*. 2012;63(2):75–81.
12. Sridhar R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Ravichandran R, Ramalingam B, Ramakrishna S. Electrospun nanofibers for pharmaceutical and medical applications. Vol. 21, *Journal of Drug Delivery Science and Technology. Editions de Sante*; 2011. p. 451–68.
13. Hu X, Liu S, Zhou G, Huang Y, Xie Z, Jing X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. Vol. 185, *Journal of Controlled Release*. Elsevier; 2014. p. 12–21.
14. Rošč R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S. Nanofibers and their biomedical use. *Acta Pharm* [Internet]. 2013 Sep 1;63(3):295–304. Available from: <https://content.sciendo.com/doi/10.2478/acph-2013-0024>
15. Širc J, Hobzová R, Kostina N, Munzarová M, Jukličková M, Lhotka M, et al. Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *J Nanomater* [Internet]. 2012;2012:1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/327369/>
16. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. Vol. 484, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier; 2015. p. 57–74.
17. Potrč T, Baumgartner S, Roščar R, Planinšek O, Lavrič Z, Kristl J, et al. Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2015 May 26;75:101–13.
18. Frenot A, Chronakis IS. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. Vol. 8, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. Elsevier BV; 2003. p. 64–75.
19. Ma G, Liu Y, Peng C, Fang D, He B, Nie J. Paclitaxel loaded electrospun porous nanofibers as mat potential application for chemotherapy against prostate cancer. *Carbohydr Polym*. 2011 Aug 15;86(2):505–12.
20. Amna T, Barakat NAM, Hassan MS, Khil MS, Kim HY. Camptothecin loaded poly(ϵ -caprolactone)nanofibers via one-step electrospinning and their cytotoxicity impact. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2013 Aug 20;431:1–8.
21. Guimarães PPG, Oliveira MF, Gomes ADM, Gontijo SML, Cortés ME, Campos PP, et al. PLGA nanofibers improves the antitumoral effect of daunorubicin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015 Dec 1;136:248–55.
22. Yan S, Xiaoqiang L, Lianjiang T, Chen H, Xiumei M. Poly(l -lactide-co- D -caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating and sustained releasing proteins. *Polymer (Guildf)* [Internet]. 2009 Aug;50(17):4212–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386109005540>
23. Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. Vol. 59, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier; 2007. p. 1392–412.
24. Kim TG, Lee DS, Park TG. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene oxide). *Int J Pharm*. 2007 Jun 29;338(1–2):276–83.
25. Jiang H, Hu Y, Li Y, Zhao P, Zhu K, Chen W. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J Control Release*. 2005 Nov 28;108(2–3):237–43.
26. Yan E, Fan Y, Sun Z, Gao J, Hao X, Pei S, et al. Biocompatible core-shell electrospun nanofibers as potential application for chemotherapy against ovary cancer. *Mater Sci Eng C*. 2014 Aug 1;41:217–23.
27. Szentivanyi A, Chakradeo T, Zernetsch H, Glasmacher B. Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. Vol. 63, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier; 2011. p. 209–20.
28. Yu DG, Williams GR, Gao LD, Bligh SWA, Yang JH, Wang X. Coaxial electrospinning with sodium dodecylbenzene sulfonate

- solution for high quality polyacrylonitrile nanofibers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2012 Feb 20;396:161–8.
29. Zhang Z, Liu S, Qi Y, Zhou D, Xie Z, Jing X, et al. Time-programmed DCA and oxaliplatin release by multilayered nanofiber mats in prevention of local cancer recurrence following surgery. *J Control Release.* 2016 Aug 10;235:125–33.
 30. Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. Vol. 153, *Journal of Controlled Release.* Elsevier; 2011. p. 106–16.
 31. Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. Vol. 64, *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier; 2012. p. 16–28.
 32. Lam JKW, Xu Y, Worsley A, Wong ICK. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. Vol. 73, *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier; 2014. p. 50–62.
 33. Illangakoon UE, Gill H, Shearman GC, Parhizkar M, Mahalingam S, Chatterton NP, et al. Fast dissolving paracetamol/caffeine nanofibers prepared by electrospinning. *Int J Pharm.* 2014 Dec 30;477(1–2):369–79.
 34. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. Vol. 114, *Journal of Controlled Release.* Elsevier; 2006. p. 15–40.
 35. Dovšak D. Odkrivanje in zdravljenje predstopenj raka ter raka ustne votline in ustnega dela žrela. *Radiol Oncol Assoc Radiol Oncol.* 2006;40(Supplement 1):S9–17.
 36. Singh H, Sharma R, Joshi M, Garg T, Goyal AK, Rath G. Transmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2015 Jul 4;43(4):263–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2014.885442>
 37. Millisop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol.* 2016 Jul 1;34(4):487–94.
 38. De Sanctis V, Bossi P, Sanguineti G, Trippa F, Ferrari D, Bacigalupo A, et al. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus statements. Vol. 100, *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 147–66.
 39. Al-Ansari S, Zecha JAEM, Barasch A, de Lange J, Rozema FR, Raber-Durlacher JE. Oral Mucositis Induced By Anticancer Therapies. *Curr Oral Heal Reports* [Internet]. 2015 Dec 19;2(4):202–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40496-015-0069-4>
 40. Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of a novel scaffold of clotrimazole-microemulsion-containing nanofibers using an electrospraying process for oral candidiasis applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015 Feb 1;126:18–25.
 41. Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Panomsuk S, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication of mucoadhesive chitosan coated polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin/clotrimazole sandwich patches for oral candidiasis. *Carbohydr Polym.* 2015 Jul 6;132:173–9.
 42. Sommariva S, Pongiglione B, Tarricone R. Impact of chemotherapy-induced nausea and vomiting on health-related quality of life and resource utilization: A systematic review. Vol. 99, *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 13–36.
 43. Vuddanda PR, Mathew AP, Velaga S. Electrospun nanofiber mats for ultrafast release of ondansetron. *React Funct Polym.* 2016 Feb 1;99:65–72.
 44. Kajdič S, Vrečer F, Kocbek P. Preparation of poloxamer-based nanofibers for enhanced dissolution of carvedilol. *Eur J Pharm Sci.* 2018 May 30;117:331–40.
 45. Kajdič S, Zupančič Š, Roškar R, Kocbek P. The potential of nanofibers to increase solubility and dissolution rate of the poorly soluble and chemically unstable drug lovastatin. *Int J Pharm.* 2020 Jan 5;573:118809.
 46. Jayasinghe SN. Cell electrospinning: a novel tool for functionalising fibres, scaffolds and membranes with living cells and other advanced materials for regenerative biology and medicine. *Analyst* [Internet]. 2013;138(8):2215. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3an36599a>
 47. Townsend-Nicholson A, Jayasinghe SN. Cell Electrospinning: a Unique Biotechnology for Encapsulating Living Organisms for Generating Active Biological Microthreads/Scaffolds. *Biomacromolecules* [Internet]. 2006 Dec;7(12):3364–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm060649h>
 48. Bertoncelj V, Pelipenko J, Kristl J, Jeras M, Cukjati M, Kocbek P. Development and bioevaluation of nanofibers with blood-derived growth factors for dermal wound healing. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014 Sep 1;88(1):64–74.
 49. Chen H, Liu Y, Hu Q. A novel bioactive membrane by cell electrospinning. *Exp Cell Res.* 2015 Nov 1;338(2):261–6.

SEMAGLUTID – PRVI PERORALNI AGONIST RECEPTORJEV GLP-1 ZA ZDRAVLJENJE SLADKORNE BOLEZNI TIPA 2

SEMAGLUTIDE – THE FIRST ORAL GLP-1 RECEPTOR AGONIST FOR THE TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES

AVTORJI / AUTHORS:

Marija Jovanović¹

Eva Jančič¹

doc. dr. Miodrag Janić, dr. med.^{1,2}

prof. dr. Andrej Janež, dr. med.^{1,2}

doc. dr. Mojca Lunder, dr. med.^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in
presnovne bolezni,
Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: mojca.lunder@kclj.si

POVZETEK

Ključnega pomena za obvladovanje sladkorne bolezni tipa 2 sta čim boljša urejenost glikemije in nadzor pridruženih bolezni, kjer je poleg nefarmakoloških ukrepov potreben pravočasno ter pravilno stopnjevanje farmakološkega zdravljenja. Ena izmed dosedanjih ovir pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 z agonisti receptorjev glukagonu podobnega peptida 1 (GLP-1) je bil način aplikacije, saj so bili zaradi polipeptidne sestave le v obliki injektabilnega zdravljenja. Od leta 2019 je v klinični uporabi na voljo prvi in edini agonist receptorjev GLP-1 v peroralni obliki – semaglutid. Molekula je zaradi strukturnih sprememb in tehnološke obdelave tablete odporna na razgradnjo v kislem okolju želodca, ima pa primerljivo delovanje kot v obliki injektabilnega zdravljenja. Peroralni semaglutid učinkovito izboljša urejenost glikemije ter zniža telesno maso, izkazal se je za srčno-žilno varno zdravilo. Prispevek opisuje mehanizem delovanja agonistov receptorjev GLP-1, razvoj peroralnega semaglutida, navodila za njegovo odmerjanje ter podatke raziskav njegovih učinkovitosti in varnosti.

KLJUČNE BESEDE:

agonisti receptorjev GLP-1, antidiabetično zdravljenje, peroralni semaglutid, sladkorna bolezen tipa 2

ABSTRACT

Optimal glycemic control and multifactorial treatment are important for type 2 diabetes control. Non-pharmacological treatment is the mainstay of antihyperglycemic treatment, but it usually merits timely escalation of pharmacological intervention. One of the barriers to pharmacological treatment with GLP-1 receptor agonists was injectable treatment due to their polypeptide composition. In 2019, the first and only oral GLP-1 receptor agonist – semaglutide, was introduced to clinical use. Due to structural modifications and technological processing of the tablet, the molecule is resistant to degradation in the acidic gastric environment and has a comparable effect as in the form of injectable treatment. Oral semaglutide was effective in improving glycemic control and reducing body weight, and proven for its cardiovas-



cular safety. The present article describes the mechanism of action of GLP-1 receptor agonists, the development of oral semaglutide, dosing instructions and data from studies of its efficacy and safety.

KEY WORDS:

antihyperglycaemic treatment, GLP-1 receptor agonists, oral semaglutide, type 2 diabetes

1 UVOD

Sladkorna bolezen tipa 2 predstavlja velik javnozdravstveni problem, incidenca in prevalenca tako v Sloveniji kot tudi v svetu naraščata (1, 2). Zaradi sladkorne bolezni tipa 2 in njenih zapletov letno umre štiri milijone ljudi, med njimi je vsaj polovica mlajših od 60 let (1). Ključnega pomena za obvladovanje sladkorne bolezni sta njeno zgodnje odkrivanje in zdravljenje z namenom doseganja ciljne urejenosti glikemije.

Temelj zdravljenja, od postavitve diagnoze sladkorne bolezni tipa 2 dalje, je sprememba življenjskega sloga (nefarmakološki ukrepi). Če s slednjimi ne dosežemo ustrezne urejenosti glikemije, je potrebno stopenjsko uvajanje zdravljenja z zdravili (farmakološko zdravljenje). Učinkovina prvega izbora je metformin, ki pa ga je pogosto potrebno nadgraditi z uvedbo dodatnih antidiabetičnih zdravil v dvo-tinem ali večtinem zdravljenju (3–6). V zadnjem času zaradi svojih dokazanih srčno-žilnih in ledvičnih dobrobiti na pomenu pridobivajo zdravila iz skupin zaviralcev natrij-glukognega koprenašalnega sistema 2 (SGLT-2, sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors) in agonistov receptorjev glukagonu podobnega peptida 1 (GLP-1, glucagon-like peptide 1). Najnovejša priporočila Ameriškega diabetološkega združenja (ADA, American Diabetes Association) iz leta 2022 svetujejo, da navedena zdravila lahko pridružimo metforminu v zdravljenju prvega izbora pri bolnikih s sladkorno boleznično tipa 2 in pridruženimi stanji (srčno popuščanje, kronična ledvična bolezen, aterosklerotična srčno-žilna bolezen oz. prisotnost dejavnikov tveganja za razvoj srčno-žilnih in ledvičnih bolezni) (3).

Zdravila iz skupine agonistov receptorjev GLP-1 so bila zaradi svoje polipeptidne sestave do nedavnega dostopna le v obliki podkožnega injektabilnega zdravljenja. Od leta 2019 je raziskovalni preboj omogočil farmacevtsko obliko

agonista receptorjev GLP-1 v obliki tablete, to je peroralnega semaglutida (7, 8).

Prispevek opisuje mehanizem delovanja agonistov receptorjev GLP-1, razvoj prvega peroralnega agonista receptorjev GLP-1, njegovo učinkovitost na glikemične in druge parametre, podatke o njegovi varnosti in neželene učinke, ki so bili na voljo do objave prispevka.

2 MEHANIZEM DELOVANJA AGONISTOV RECEPTORJEV GLP-1

Agonisti receptorjev GLP-1 so polipeptidi, ki posnemajo delovanje endogenega inkretina GLP-1. Inkretini so skupina polipeptidnih hormonov enteroendokrinskih celic tankega črevesa, ki po hranjenju spodbujajo izločanje inzulina. Med njimi sta najpomembnejša GLP-1 in od glukoze odvisni inzulinotropni peptid (GIP). Odgovorni so za t. i. inkretinski učinek, za katerega je značilno večje izločanje inzulina iz β -celic trebušne slinavke po peroralnem zaužitju glukoze v primerjavi z venskim injiciranjem glukoze. Pri bolnikih s sladkorno boleznično tipa 2 je inkretinski učinek oslabljen, kar prispeva k pojavi postprandialne hiperglikemije. Inkretini vplivajo na več kot 70 % celotnega izločanja inzulina iz trebušne slinavke pri posameznem obroku, zavirajo tudi izločanje glukagona. Dodatno povečajo privzem glukoze v mišice in zmanjšajo glukoneogenezo v jetrih, zavirajo praznjenje želodca in z neposrednim učinkom na hipotalamus povečajo občutek sitosti ter zmanjšajo občutek lakote, kar vodi do manjšega vnosa hrani in zmanjšanja telesne mase (9, 10).

Ko je raven sladkorja v krvi nizka, agonisti receptorjev GLP-1 prenehajo spodbujati izločanje inzulina, zato ne povečajo tveganja za hipoglikemije. Agonisti receptorjev GLP-1 imajo tudi druge ugodne učinke, in sicer znižajo koncentracijo trigliceridov in lipoproteinov zelo nizke gostote (VLDL, very low density lipoproteins) ter blago znižajo sistolni krvni tlak. Nekateri imajo tudi dokazan učinek na zmanjšanje umrljivosti zaradi srčno-žilnih dogodkov (8, 11). Zato so glede na zadnja priporočila ADA agonisti receptorjev GLP-1 pri bolnikih z aterosklerotično srčno-žilno boleznično oz. kronično ledvično boleznično priporočeni kot učinkovine izbora v zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2, ne glede na predhodno zdravljenje z metforminom (3).

Agonisti receptorjev GLP-1 so zaradi sprememb v aminokislinski sestavi v peptidični verigi odporni na razgradnjo z



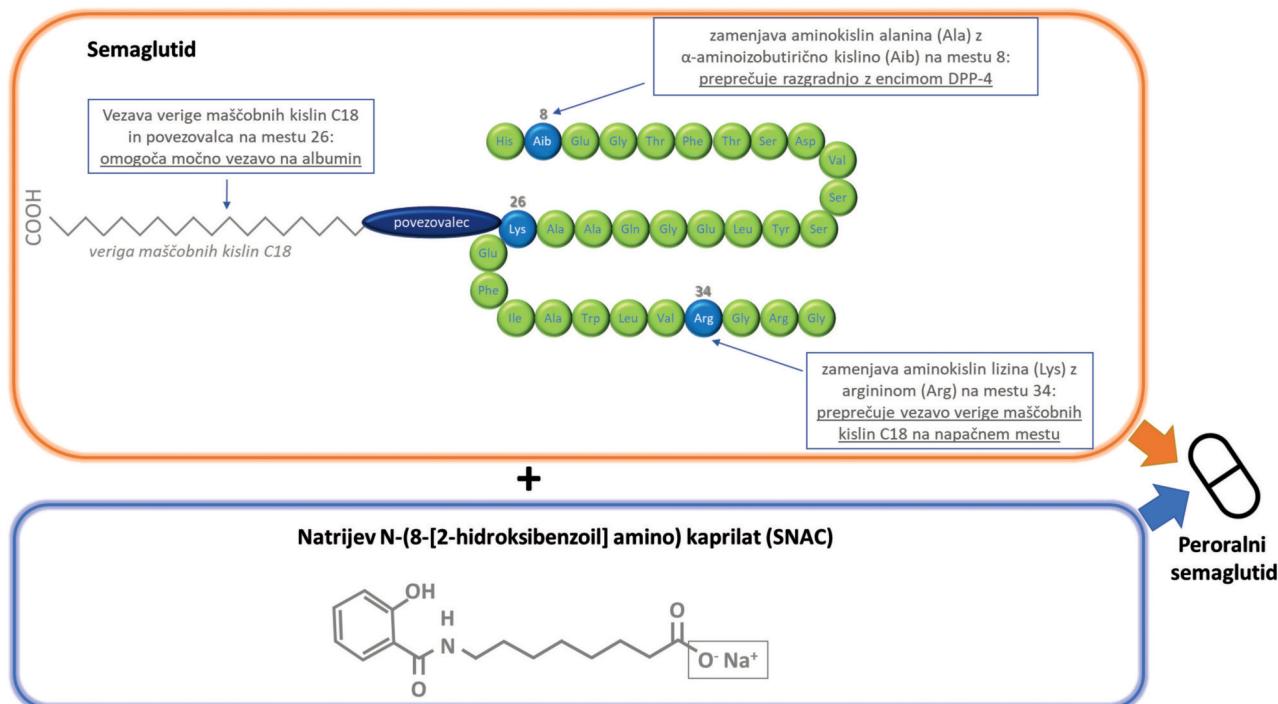
encimom dipeptidil peptidazo 4 (DPP-4). Medsebojno se razlikujejo po strukturi in farmakokinetičnih lastnostih (7). V uporabi je že šest agonistov receptorjev GLP-1, ki pa jih apliciramo v obliki injektabilnega zdravljenja. V letu 2019 so za klinično uporabo odobrili tudi prvi peroralni agonist receptorjev GLP-1 – peroralni semaglutid, ki je bil pred tem na voljo le v obliki enkrat tedenskega podkožnega injektabilnega zdravljenja (12).

3 STRUKTURA MOLEKULE PERORALNEGA SEMAGLUTIDA

Semaglutid je dolgodeljujoči analog humanemu GLP-1, ki je dostopen v obliki podkožnega injektabilnega zdravljenja, od leta 2019 pa tudi v obliki za peroralno uporabo. Peroralna aplikacija peptidov, kamor spada tudi semaglutid, predstavlja velik iziv za farmacevtsko industrijo, saj v prebavilih prihaja do njihove encimske in kislinske razgradnje, prav tako je omejena prepustnost preko epitelija prebavil (13).

Struktura semaglutida je v 30 aminokislinah identična človeškemu, endogenemu GLP-1 (94-odstotna homologija z nativnim GLP-1), razlikuje pa se v treh strukturnih prilagoditvah, ki omogočajo podaljšano delovanje. Prva je zamenjava alanina (Ala) z α -aminoizobutirično kislino (Aib) na mestu 8, kar prepreči njegovo razgradnjo z DPP-4. Naslednja je dodatek povezovalca in C18 verige maščobnih kislin na lizin (Lys) na mestu 26, kar omogoča močno vezavo na albumin. Povečana afiniteta za vezavo na albumin omogoča dolg razpolovni čas (7 dni) in upočasni izločanje preko ledvic. Tretja prilagoditev molekule je zamenjava lizina (Lys) z argininom (Arg) na mestu 34, kar izboljša stabilnost molekule semaglutida, s tem da prepreči napačno vezavo C18 verige maščobnih kislin na lizin (Lys). Omenjene strukturne spremembe ustvarijo učinkovit in dolgodeljujoč analog receptorjev GLP-1. Molekularna struktura semaglutida je prikazana na sliki 1 (12, 14).

Za izboljšanje biološke uporabnosti peroralnega semaglutida mu je dodana molekula natrijevega N-(8-[2-hidroksibenzoil] amino) kaprilata (SNAC), v odmerku 300 mg. Slednji ima pufrsko sposobnost, ki v želodcu lokalno na mestu razgradnje tablete zviša pH in tako zaščiti semaglutid pred proteolitno razgradnjo in denaturacijo zaradi kislega okolja



Slika 1: Molekularna struktura semaglutida v tableti. Povzeto po (7, 18).

Figure 1: Molecular structure of semaglutide in a tablet. Adopted from (7, 18).

želodca. Poleg tega SNAC pospeši absorpcijo semaglutida preko želodčne sluznice (14). Peptidi, kot je semaglutid, so hidrofilne molekule, ki fosfolipidnega dvosloja membran v prebavilih ne morejo prečkat s transceličnim transportom. SNAC je hidrofobna molekula, ki je nekovalentno vezana na semaglutid in zviša njegovo lipofilnost ter spodbuja transcelularno absorpcijo preko želodčne sluznice in vstop semaglutida v sistemski krvni obtok. Po prihodu v krvni obtok se molekuli semaglutida in SNAC ločita, kar peroralnemu semaglutidu omogoči podobno delovanje, kot če bi ga injicirali podkožno (12, 14–17).

Absorpcija peroralnega semaglutida poteka v želodcu (14). Razpolovni čas molekule je en teden in je enak ob injektabilnem ali peroralnem zdravljenju. Podkožne aplikacije semaglutida so zato potrebne enkrat tedensko. Pri peroralni aplikaciji je zaradi nizke biološke uporabnosti (ocenjena znaša 1 %) in visokih interindividualnih razlik po izpostavitvi semaglutidu potreбno tableto zaužiti vsak dan. Stanje ravnotežne koncentracije je ob zdravljenju s peroralnim semaglutidom običajno doseženo v prvih štirih do petih tednih zdravljenja, ko se dnevna nihanja izpostavljenosti semaglutidu zmanjšajo (14–16).

4 ODMERJANJE PERORALNEGA SEMAGLUTIDA

V klinični uporabi so na voljo trije odmerki peroralnega semaglutida, in sicer 3, 7 in 14 mg, večanje odmerka pa izvajamo na štiri ali več tednov. Kot uvajalni odmerek uporabljamo odmerek 3 mg dnevno, ki nima zadostnega terapevtskega učinka, namenjen pa je omejevanju neželenih učinkov. V terapevtske namene in kot vzdrževalno terapijo uporabljamo odmerka 7 in 14 mg. Uvajanje peroralnega semaglutida poteka s počasnim stopnjevanjem. Začetni uvajalni odmerek (3 mg enkrat dnevno) po enem mesecu povišamo na 7 mg enkrat dnevno. Če urejenost glikemije po enem mesecu še vedno ni optimalna, lahko odmerek dodatno zvišamo na 14 mg dnevno (15, 19). Prilaganje odmerka peroralnega semaglutida ni potrebno pri osebah s kronično ledvično boleznijo blage do zmerne stopnje. Njegovo uporabo zaenkrat odsvetujemo pri napredovali ledvični okvari (ocenjena glomerulna filtracija (oGF) < 15 mL/min/1,73 m²) ali pri končni ledvični odpovedi, saj zdravilo pri tej skupini bolnikov ni bilo preskušeno (15). Glede na podatke iz raziskave, v katero so bile vključene osebe z različnimi stopnjami ledvične okvare, je zdravilo

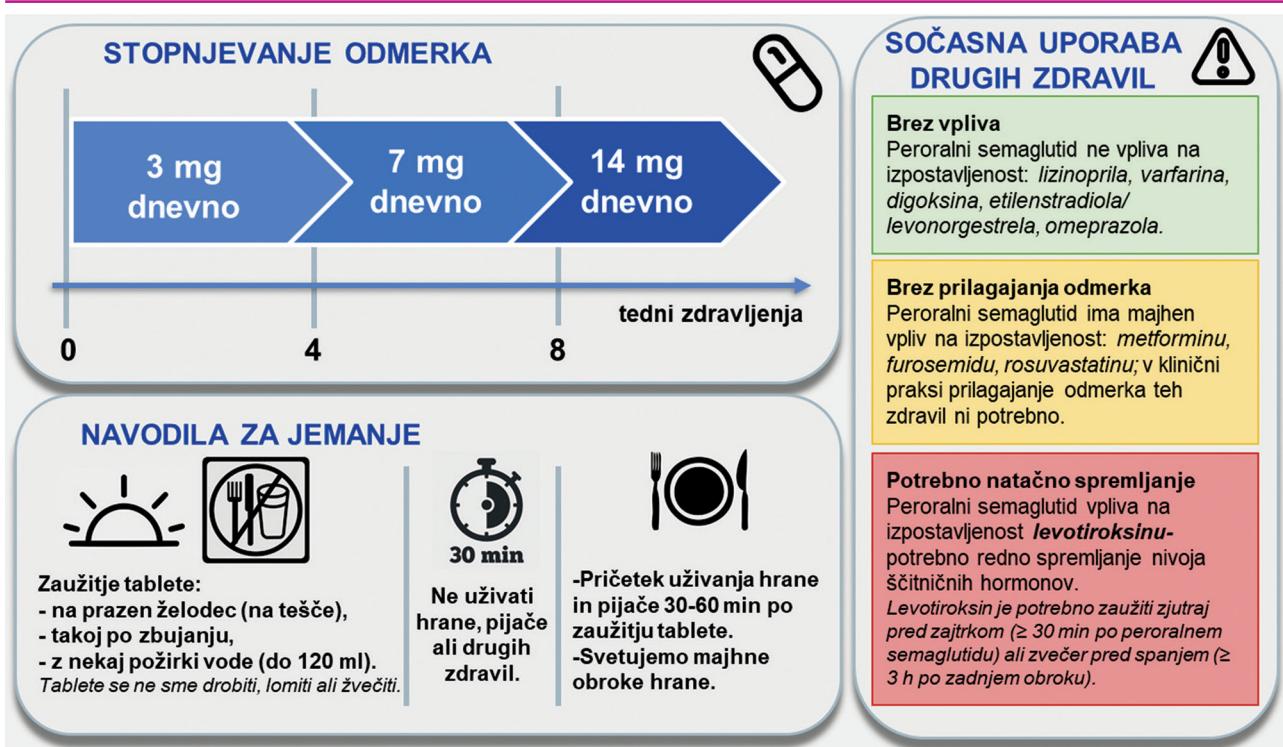
najverjetneje varno tudi pri napredovali ledvični okvari (20). Ob jetni okvari odmerka peroralnega semaglutida ni potrebno prilagajati (15, 19).

5 NAVODILA ZA JEMANJE PERORALNEGA SEMAGLUTIDA

Tableto peroralnega semaglutida je potrebno zaužiti enkrat dnevno, običajno zjutraj, po šestih do desetih urah teščosti. Zaužitje tablete je priporočeno z le nekaj požirkri navadne vode, katere količina ne sme presegati 120 mL. Tableto je potrebno pogolniti celo (brez žvečenja, lomljenja ali drobljenja). Po zaužitju tablete semaglutida mora bolnik počakati vsaj 30 minut in v tem času ne sme zaužiti hrane, pijače ali drugih peroralnih zdravil (19, 21). Način odmerjanja in navodila za jemanje prikazuje slika 2. Raziskave so namreč pokazale, da je absorpcija peroralnega semaglutida slabša, če bolnik zaužije hrano ali pijačo v prvih 30 minutah po zaužitju tablete. Poleg hrane na absorpcijo peroralnega semaglutida vpliva tudi prisotnost drugih zdravil v želodcu. V izogib neželenim učinkom na prebavila (npr. slabost, bruhanje) po uvedbi zdravljenja s peroralnim semaglutidom svetujemo zaužitje manjših količin hrane ob obrokih, priporočena je tudi takojšnja prekinitev hranjenja ob prvih znakih sitosti, saj lahko nadaljevanje privede do bruanja (15). Ko so proučevali vpliv bolezni zgornjih prebavil (npr. gastritis) na izpostavljenost peroralnemu semaglutidu, razlik v absorpciji niso zaznali (14, 19).

6 INTERAKCIJE

Zdravljenje s peroralnim semaglutidom v raziskavah ni vplivalo na izpostavljenost lizinoprilu, varfarinu, digoksinsa (22) ali etinilestradiolu/levonorgestrelu (23). Zdravljenje s peroralnim semaglutidom je povečalo izpostavljenost metforminu (22), furosemidu in rosuvastatinu (23), vendar glede na podatke iz raziskav večja izpostavljenost navedenim zdravilom ni bila klinično pomembna. Peroralni semaglutid poveča izpostavljenost levotirokeksinu, zato sta ob zdravljenju z levotirokeksinom po uvedbi peroralnega semaglutida potrebna pogostejše spremljanje ravnih ščitničnih hormonov in morebitna prilagoditev odmerka levotirokeksina glede na laboratorijske izvide (15, 24).



Slika 2: Stopnjevanje odmerka peroralnega semaglutida, navodila za jemanje in možne interakcije z drugimi zdravili. Povzeto po (15, 19).

Figure 2: Dose escalation of oral semaglutide, instructions for patients and possible interactions with other concomitant medications.

Adopted from (15, 19).

7 UČINKOVITOST

Učinkovitost in varnost peroralnega semaglutida so sistematyczno proučili v raziskavah PIONEER (*Peptide InnOvation for Early diabEtes tRreatment*); rezultati o učinkovitosti so prikazani v preglednici 1. Rezultati raziskav kažejo, da zdravljenje z najvišjim odmerkom peroralnega semaglutida prispeva k pomembnemu zmanjšanju glikiranega hemoglobina (HbA1c), in sicer tako v primerjavi s placebo kot v primerjavi z drugimi peroralnimi antidiabetičnimi učinkovinami (25–30). Raziskave PIONEER so bile zasnovane, da proučijo učinkovitost peroralnega semaglutida na zmanjšanje HbA1c in telesno maso ter njegovo varnost pri bolnikih s sladkorno boleznično tipa 2 različnega trajanja in z različnim predhodnim antidiabetičnim zdravljenjem. V večino raziskav so bili vključeni bolniki, stari 18 let ali več, z dokazano sladkorno boleznično tipa 2 s trajanjem več kot tri meseca; izhodiščni HbA1c je bil med 7,0 in 9,5 %. Vsi bolniki so bili zdravljeni po standardnem protokolu stopnjevanja odmerka peroral-

nega semaglutida, kjer so odmerek z izhodiščnih 3 mg povečevali v štiritedenskih intervalih na 7 in največ 14 mg dnevno. Šlo je za raziskave faze 3a, ki so bile randomizirane in kontrolirane, primerjale pa so peroralni semaglutid z drugimi učinkovinami ali placeboom (31).

V raziskavi PIONEER 1 so bili bolniki s kratkotrajno sladkorno boleznično tipa 2, zdravljeni le z nefarmakološkimi ukrepi, primerjalna skupina je prejemala placebo; trajanje raziskave je bilo 26 tednov (25). V raziskavah PIONEER 2, 3 in 4 so primerjali učinkovitost in varnost peroralnega semaglutida z zavircem SGLT-2 empagliptinom (25 mg dnevno) (26), zavircem DPP-4 sitagliptinom (100 mg dnevno) (27) ali injektabilnim agonistom receptorjev GLP-1 liagliptidom (1,8 mg dnevno) (32) pri bolnikih s sladkorno boleznično tipa 2, ki so že prejemali eno ali dve drugi peroralni antidiabetični zdravili; čas opazovanja je znašal 52 do 78 tednov. V raziskavi PIONEER 7 so uporabili fleksibilno prilagoditev odmerka peroralnega semaglutida: pri posameznem bolniku so prilagodili odmerek glede na glikemično učinkovitost in prenosljivost (pojav neželenih učinkov na prebavila). Peroralni semaglutid so primerjali s sitagliptinom v odmerku 100 mg; čas opazovanja je bil 52 tednov (29).

V raziskavah PIONEER 5 in 8, ki sta trajali 26 oz. 52 tednov, so bili vključeni bolniki s sladkorno boleznično tipa 2 trajanja 14 do 15 let; prejemali so peroralni semaglutid ali placebo kot dodatek predhodnemu antidiabetičnemu zdravljenju (28, 30). V raziskavi PIONEER 8 so vsi bolniki v osnovi prejemali inzulin, odmerke katerega so ob randomizaciji znižali za 20 %, nadaljnje prilagajanje odmerka pa je potekalo med raziskavo (30). V raziskavi PIONEER 5 so imeli bolniki zmersno ledvično okvaro z oGF 30–59 mL/min/1,73 m² (28). Raziskavi PIONEER 9 in 10 sta potekali pri Japoncih. V raziskavi PIONEER 9 so primerjali zdravljenje s peroralnim semaglutidom proti placebou ali liragutidu, medtem ko so v raziskavi PIONEER 10 primerjali zdravljenje s peroralnim semaglutidom ali dulaglutidom kot dodatek predhodnemu peroralnemu antidiabetičnemu zdravljenju. Obe raziskavi sta trajali 52 tednov (33, 34). Raziskavo PIONEER 6 zaradi njenih posebnosti opisujemo v poglavju 9 o srčno-žilni varnosti peroralnega semaglutida.

Skozi celotni opisani spekter raziskav programa PIONEER se je peroralni semaglutid izkazal kot učinkovit tako v zmanjšanju HbA1c kot telesne mase, z dodatnimi ugodnimi vplivi tudi na druge opazovane parametre, kot so znižanje ravni glukoze na tešče, znižanje krvnega tlaka in indeksa telesne mase (31).

Trenutno je v teku ali že zaključenih, vendar še neobjavljenih, še nekaj raziskav iz skupine PIONEER, in sicer PIONEER 11 (NCT04109547) in PIONEER 12 (NCT04017832), ki proučuje učinkovitost in varnost peroralnega semaglutida pri Kitajcih, PIONEER PLUS (NCT04707469), ki proučuje dva večja odmerka peroralnega semaglutida (25 in 50 mg), PIONEER TEENS (NCT04596631), ki proučuje učinkovitost in varnost peroralnega semaglutida pri otrocih in najstnikih, ter PIONEER REAL, ki proučuje učinkovitost in varnost peroralnega semaglutida v vsakdanji klinični praksi, pri čemer gre za nabor podatkov bolnikov, ki per se niso bili vključeni v nobeno raziskavo (11, 25–30, 32–34).

Preglednica 1: Učinkovitost peroralnega semaglutida v raziskavah PIONEER (Peptide InnOvatioN for Early diabEtes tRreatment). Prikazane so spremembe pri terapevtskih odmerkih semaglutida in pri primerjalnih skupinah. Prikazana je stopnja učinkovitosti po 26 tednih opazovanja, saj je bila to pri večini raziskav primarna točka opazovanja, razen pri PIONEER 7, kjer so prikazani podatki po 52 tednih opazovanja. Prirejeno po (31).

Table 1: Efficacy of peroral semaglutide in PIONEER (Peptide InnOvatioN for Early diabEtes tRreatment) clinical trials. Changes for the therapeutic doses of peroral semalutide and comparators are shown. The level of efficacy is shown after 26 weeks of observation, as this was the primary efficacy end point, except for the PIONEER 7, where this point was after 52 weeks of observation. Adopted from (31).

Trajanje sladkorne bolezni	Kratko		Srednje								Dolgo				Srednje										
	3,5 let		7–9 let								14–15 let				6,5–9,5 let										
Ime raziskave/ primerjalno zdravilo	PIONEER 1 (25)		PIONEER 2 (26)		PIONEER 3 (27)		PIONEER 4 (32)		PIONEER 7 (29)		PIONEER 5 (28)		PIONEER 8 (30)		PIONEER 9 (33)		PIONEER 10 (34)								
	monoterapija		empagliflozin		sitagliptin		liraglutid		fleksibilno odmerjanje		kronična ledvična bolezen		dodatek inzulīnu		liraglutid Japonska		dulaglutid Japonska								
Število vključenih bolnikov	703		822		1864		711		504		324		731		243		458								
Izhodiščni HbA1c (%)	8,0		8,1		8,3		8,0		8,3		8,0		8,2		8,2		8,3								
Primerjana zdravila	Sema		P		Sema		Sema		Sita		Sema		Lira		P		Sema								
Odmerek (mg)	7	14	/	14	25	7	14	100	14	1,8	/	14	100	14	/	7	14	/	7	14	0,9	/	7	14	0,75
Zmanjšanje HbA1c (%)	-1,2*	-1,4*	-0,3	-1,3*	-0,9	-1,0*	-1,3*	-0,8	-1,2	-1,1	-0,2	-1,3*	-0,8	-1,0*	-0,2	-0,9*	-1,3*	-0,1	-1,6	-1,8*	-1,4	-0,4	-1,4	-1,7*	-1,4
Zmanjšanje telesne mase (kg)	-2,3	-3,7*	-1,4	-3,8	-3,7	-2,2*	-3,1*	-0,6	-4,4*	-3,1	-0,5	-2,6*	-0,7	-3,4*	-0,9	-2,4*	-3,7*	-0,4	-1,1*	-2,4*	-0,0	-1,1	-0,9*	-1,6*	-1,0

HbA1c – glikirani hemoglobin; Sema – peroralni semaglutid; P – placebo; Empa – empagliflozin; Sita – sitagliptin; Lira – liraglutid; Dula – dulaglutid; * statistično pomembne spremembe

8 VARNOST IN NEŽELENI UČINKI

Peroralni semaglutid je varna učinkovina, z varnostnim profilom, podobnim ostalim agonistom receptorjev GLP-1. Najpogosteje opisani neželeni učinki so prebavne motnje: slabost, driska, bruhanje, občasno zaprtje, pa tudi dispepsijska in bolečina v zgornjem delu trebuha. Delež neželenih učinkov raste z večanjem odmerka in z neupoštevanjem intervala stopnjevanja zdravljenja. Večino neželenih učinkov bolniki sicer opišejo kot blage do zmerne in prehodne narave in ne botrujejo prenehanju zdravljenja; bolniki so v raziskavah PIONEER prenehali z zdravljenjem v manj kot 15 % (31). Neželeni učinki na prebavila so se pri zdravljenju s semaglutidom 1,0 mg v obliki injektabilnega zdravljenja pojavili pri primerljivem deležu bolnikov (14–16). Med drugimi neželenimi učinki sta najpogosteje nazofaringitis in simptomi, podobni kot pri gripi, ki pa so se v raziskavah PIONEER pojavljali v enakih deležih pri bolnikih, zdravljenih s peroralnim semaglutidom ali primerjano učinkovino (31). Frekvenco neželenih učinkov v raziskavah skupine PIONEER prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Pregled pojavnosti neželenih učinkov peroralnega semagliutida v raziskavah PIONEER (Peptide InnOvatioN for Early diabEtes tReatment). Prirejeno po (31).

Table 2: Summary of adverse side effects in PIONEER (Peptide InnOvatioN for Early diabEtes tReatment) clinical trials. Adapted from (31).

Ime raziskave (število vključenih bolnikov)	Skupina zdravljenja (število vključenih bolnikov v posamezno skupino)	Število bolnikov z neželenimi učinki (delež bolnikov)	Število bolnikov s hudimi neželenimi učinki (delež bolnikov)	Število bolnikov z resnimi neželenimi učinki (delež bolnikov)	Neželeni učinki, ki so vodili do prekinitev zdravljenja (delež bolnikov)		Število bolnikov, ki so doživelji hipoglikemijo (delež bolnikov)
					Celokupno	Prebavni	
PIONEER 1 (703) (25)	Sema 3 mg (175)	101 (58 %)	8 (5 %)	5 (3 %)	4 (2 %)	3 (2 %)	5 (3 %)
	Sema 7 mg (175)	93 (53 %)	1 (1 %)	3 (2 %)	7 (4 %)	4 (2 %)	2 (1 %)
	Sema 14 mg (175)	99 (57 %)	3 (2 %)	2 (1 %)	13 (7 %)	9 (5 %)	1 (1 %)
	Placebo (178)	99 (56 %)	5 (3 %)	8 (4 %)	4 (2 %)	1 (1 %)	1 (1 %)
PIONEER 2 (822) (26)	Sema 14 mg (410)	289 (70 %)	24 (6 %)	27 (7 %)	44 (11 %)	33 (8 %)	7 (2 %)
	Empa 25 mg (409)	283 (69 %)	23 (6 %)	37 (9 %)	18 (4 %)	3 (1 %)	8 (2 %)
PIONEER 3 (1864) (27)	Sema 3 mg (466)	370 (79 %)	47 (10 %)	64 (14 %)	26 (6 %)	11 (2 %)	23 (5 %)
	Sema 7 mg (464)	363 (78 %)	37 (8 %)	47 (10 %)	27 (6 %)	16 (3 %)	24 (5 %)
	Sema 14 mg (465)	370 (80 %)	40 (9 %)	44 (9 %)	54 (12 %)	32 (7 %)	36 (8 %)
	Sita 100 mg (466)	388 (83 %)	53 (11 %)	58 (12 %)	24 (5 %)	12 (3 %)	39 (8 %)

PIONEER 4 (711) (32)	Sema 14 mg (285)	229 (80 %)	23 (8 %)	31 (11 %)	31 (11 %)	22 (8 %)	2 (1 %)
	Lira 1,8 mg (284)	211 (74 %)	22 (8 %)	22 (8 %)	26 (9 %)	17 (6 %)	7 (2 %)
	Placebo (142)	95 (67 %)	7 (5 %)	15 (11 %)	5 (4 %)	3 (2 %)	3 (2 %)
PIONEER 5 (324) (28)	Sema 14 mg (163)	120 (74 %)	10 (6 %)	17 (10 %)	24 (15 %)	19 (12 %)	9 (6 %)
	Placebo (161)	105 (65 %)	15 (9 %)	17 (11 %)	8 (5 %)	3 (2 %)	3 (2 %)
PIONEER 7 (504) (29)	Sema 3, 7 ali 14 mg (253)	197 (78 %)	16 (6 %)	24 (9 %)	22 (9 %)	14 (6 %)	14 (6 %)
	Sita 100 mg (250)	172 (69 %)	18 (7 %)	24 (10 %)	8 (3 %)	2 (1 %)	14 (6 %)
PIONEER 8 (731) (30)	Sema 3 mg (184)	137 (74 %)	17 (9 %)	25 (14 %)	13 (7 %)	9 (5 %)	52 (28 %)
	Sema 7 mg (181)	142 (78 %)	17 (9 %)	19 (10 %)	16 (9 %)	12 (7 %)	47 (26 %)
	Sema 14 mg (181)	151 (83 %)	13 (7 %)	12 (7 %)	24 (13 %)	19 (10 %)	48 (27 %)
	Placebo (184)	139 (76 %)	9 (5 %)	17 (9 %)	5 (3 %)	1 (1 %)	54 (29 %)
PIONEER 9 (243) (33)	Sema 3 mg (49)	37 (76 %)	1 (2 %)	2 (4 %)	1 (2 %)	17 (35 %)	0
	Sema 7 mg (49)	37 (76 %)	2 (4 %)	3 (6 %)	1 (2 %)	18 (37 %)	0
	Sema 14 mg (48)	34 (71 %)	0	0	2 (4 %)	16 (33 %)	0
	Lira 0,9 mg (48)	32 (67 %)	0	0	0	18 (38 %)	2 (4 %)
	Placebo (49)	39 (80 %)	0	3 (6 %)	0	10 (20 %)	0
PIONEER 10 (458) (34)	Sema 3 mg (131)	101 (77 %)	3 (2 %)	9 (7 %)	4 (3%)	40 (31 %)	3 (2 %)
	Sema 7 mg (132)	106 (80 %)	1 (1 %)	4 (3%)	8 (6 %)	51 (39 %)	3 (2 %)
	Sema 14 mg (130)	111 (85 %)	1 (1 %)	7 (5 %)	8 (6 %)	70 (54 %)	4 (3 %)
	Dula 0,75 mg (65)	53 (82 %)	0	1 (2 %)	2 (3 %)	26 (40 %)	0

Sema – peroralni semaglutid; Empa – empagliflozin; Sita – sitagliptin; Lira – liraglutid; Dula – dulaglutid

9 SRČNO-ŽILNA VARNOST

Ateroskleroza in z njo povezani zapleti so vodilni vzrok umrljivosti pri bolnikih s sladkorno bolezni tipa 2 (38). Zato je pomembno, da smo pri posamezniku pozorni na tveganje za srčno-žilne zaplete ter prisotnost srčno-žilnih bolezni in to upoštevamo pri izbiri antidiabetičnega zdravila (3, 39). Srčno-žilno varnost peroralnega semaglutida so proučevali v raziskavi PIONEER 6, ki je bila zasnovana

tako, da dokaže neinferiornost peroralnega semaglutida proti placebo (11). Vključenih je bilo 3183 bolnikov s sladkorno boleznijsko tipa 2, ki so bili starejši od 50 let in so že imeli razvito srčno-žilno ali ledvično bolezen, oz. so bili starejši od 60 let in so imeli veliko tveganje za srčno-žilne zaplete. Enakomerno so bili randomizirani v skupino združenih s peroralnim semaglutidom in skupino, ki je prejemala placebo. V raziskavi, katere srednja vrednost spremeljanja je bila 15,9 mesecev, so potrdili neinferiornost peroralnega semaglutida, kot dodatka standardnemu zdravljenju sladkorne bolezni, na pojavnost pomembnih srčno-žilnih dogodkov (MACE, *major adverse cardiovascular*

events; izhod sestavljen iz srčno-žilne smrti, neusodnega miokardnega infarkta, neusodne možganske kapi) v primerjavi s placeboom ($p < 0,001$). Delež dogodkov je bil 3,8 % v skupini, zdravljeni s peroralnim semaglutidom, in 4,8 % v skupini, ki je prejemala placebo (11). S tem so potrdili primarni opazovani dogodek raziskave, da je peroralni semaglutid srčno-žilno varen. Dodatno so ugotovili, da je bila pojavnost MACE v skupini zdravljenih s peroralnim semaglutidom za 21 % manjša glede na placebo, vendar razlika ni dosegla ravni statistične značilnosti ($p = 0,17$ za superiornost). Pri pregledu posameznih komponent sestavljenega dogodka so ugotovili, da je peroralni semaglutid znižal umrljivost zaradi srčno-žilnih dogodkov za 51 % ter umrljivost zaradi katerega koli vzroka za 49 % v primerjavi s placeboom (11). Po drugi strani je semaglutid v injektabilni obliki statistično pomembno zmanjšal tveganje za pojav MACE za 26 % (36).

V teku je raziskava SOUL (NCT03914326), ki bo poskusila dokazati superiornost peroralnega semaglutida pri zmanjševanju pojavnosti velikih srčno-žilnih dogodkov v primerjavi s placeboom, kot je bilo to dokazano za njegovo injektabilno obliko (7, 15).

10 SKLEP

Na področju zdravljenja sladkorne bolezni imamo v zadnjih letih več novih terapevtskih možnosti. Zadnjo večjo novost predstavlja peroralni semaglutid, ki je prvi agonist receptorjev GLP-1 v obliki tablete in omogoča peroralno zdravljenje. Do nedavnega so bili namreč agonisti receptorjev GLP-1 na voljo le v obliki injektabilnega zdravljenja, ki pa je nemaločas predstavljalo oviro pri njihovi uvedbi. Tableta peroralnega semaglutida je oblikovana tako, da omogoča absorpcijo učinkovine kljub kislemu okolju želodca. Pri njegovem jemanju morajo bolniki upoštevati določena navodila, kar omogoča dobro absorpcijo. Pri uvajanju je v izogib pojava neželenih učinkov na prebavila priporočeno postopno stopnjevanje odmerka. Peroralni semaglutid učinkovito zniža vrednost HbA1c in ima ugoden vpliv tudi na druge glikemične in presnovne parametre. Najpogostejši neželeni učinki so prebavne težave, ki pa so blage do zmerne in prehodne narave. Zdravljenje s peroralnim semaglutidom je srčno-žilno varno. Peroralni semaglutid je od 28. marca 2022 na voljo tudi v Sloveniji, in sicer kot možnost izbire v drugi vrsti zdravljenja sladkorne bolezni tipa 2, neposredno za met-

forminom, oz. v primeru kontraindikacij ali neprenašanja metformina v obliki monoterapije. Zaradi enostavne aplikacije in učinkovitosti pričakujemo, da bodo kmalu možne tudi nove indikacije za njegovo uporabo v zdravljenju debelosti in drugih presnovnih motenj.

11 LITERATURA

1. Global picture. *IDF Diabetes Atlas*. 9 ed: International Diabetes Federation; 2019. p. 34-61.
2. Sladkorna bolezen. *Zdravstveni statistični letopis Slovenije 2019: Nacionalni inštitut za javno zdravje*; 2019, p. 1-21.
3. American Diabetes Association Professional Practice C, American Diabetes Association Professional Practice C, Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Supplement_1):S125-S43.
4. Hedrington MS, Davis SN. Oral semaglutide for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(2):133-41.
5. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C, et al. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2020;43(2):487-93.
6. Zaletel J, Ravnik Oblak M. Slovenske smernice za klinično obravnavo sladkorne bolezni tipa 2 Ljubljana: Nonparel doo; 2016.
7. Kalra S, Sahay R. A Review on Semaglutide: An Oral Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonist in Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Ther*. 2020;11(9):1965-82.
8. Cornell S. A review of GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes: A focus on the mechanism of action of once-weekly agents. *J Clin Pharm Ther*. 2020;45 Suppl 1:17-27.
9. Collins L, Costello RA. Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists. *StatPearls. Treasure Island (FL)*2021.
10. Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(6):525-36.
11. Husain M, Birkenfeld AL, Donsmark M, Dungan K, Eliaschewitz FG, Franco DR, et al. Oral Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2019;381(9):841-51.
12. Buchet JD, Pamulapati LG, Carter N, Malloy K, Dixon DL, Sisson EM. Oral Semaglutide: A Review of the First Oral Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonist. *Diabetes Technol Ther*. 2020;22(1):10-8.
13. Buckley ST, Baekdal TA, Vegge A, Maarbjerg SJ, Pyke C, Ahnfelt-Ronne J, et al. Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist. *Sci Transl Med*. 2018;10(467).
14. Andersen A, Knop FK, Vilsbøll T. A Pharmacological and Clinical Overview of Oral Semaglutide for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Drugs*. 2021;81(9):1003-30.



15. Kane MP, Triplitt CL, Solis-Herrera CD. Management of type 2 diabetes with oral semaglutide: Practical guidance for pharmacists. *Am J Health Syst Pharm.* 2021;78(7):556-67.
16. Clements JN, Isaacs D, Hartman RE, Gambill K. Pharmacokinetics and Clinical Implications of Oral Semaglutide for Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Pharmacokinet.* 2021;60(2):153-63.
17. Rasmussen MF. The development of oral semaglutide, an oral GLP-1 analog, for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetol Int.* 2020;11(2):76-86.
18. Thomas RL, Hallim S, Gurudas S, Sivaprasad S, Owens DR. IDF Diabetes Atlas: A review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107840.
19. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Rybelsus [Internet]. 2021 [cited 02.03.2022].
20. Granhall C, Sondergaard FL, Thomsen M, Anderson TW. Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of Oral Semaglutide in Subjects with Renal Impairment. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57(12):1571-80.
21. Baekdal TA, Breitschta A, Donsmark M, Maarbjerg SJ, Sondergaard FL, Borregaard J. Effect of Various Dosing Conditions on the Pharmacokinetics of Oral Semaglutide, a Human Glucagon-Like Peptide-1 Analogue in a Tablet Formulation. *Diabetes Ther.* 2021;12(7):1915-27.
22. Baekdal TA, Borregaard J, Hansen CW, Thomsen M, Anderson TW. Effect of Oral Semaglutide on the Pharmacokinetics of Lisinopril, Warfarin, Digoxin, and Metformin in Healthy Subjects. *Clin Pharmacokinet.* 2019;58(9):1193-203.
23. Jordy AB, Albayaty M, Breitschta A, Anderson TW, Christiansen E, Houshamand-Oregaard A, et al. Effect of Oral Semaglutide on the Pharmacokinetics of Levonorgestrel and Ethynodiol in Healthy Postmenopausal Women and Furosemide and Rosuvastatin in Healthy Subjects. *Clin Pharmacokinet.* 2021;60(9):1171-85.
24. Hauge C, Breitschta A, Hartoft-Nielsen ML, Jensen S, Baekdal TA. Effect of oral semaglutide on the pharmacokinetics of thyroxine after dosing of levothyroxine and the influence of co-administered tablets on the pharmacokinetics of oral semaglutide in healthy subjects: an open-label, one-sequence crossover, single-center, multiple-dose, two-part trial. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17(9):1139-48.
25. Aroda VR, Rosenstock J, Terauchi Y, Altuntas Y, Lalic NM, Morales Villegas EC, et al. PIONEER 1: Randomized Clinical Trial of the Efficacy and Safety of Oral Semaglutide Monotherapy in Comparison With Placebo in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2019;42(9):1724-32.
26. Rodbard HW, Rosenstock J, Canani LH, Deerochanawong C, Gumprecht J, Lindberg SO, et al. Oral Semaglutide Versus Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes Uncontrolled on Metformin: The PIONEER 2 Trial. *Diabetes Care.* 2019;42(12):2272-81.
27. Rosenstock J, Allison D, Birkenfeld AL, Blicher TM, Deenadayalan S, Jacobsen JB, et al. Effect of Additional Oral Semaglutide vs Sitagliptin on Glycated Hemoglobin in Adults With Type 2 Diabetes Uncontrolled With Metformin Alone or With Sulfonylurea: The PIONEER 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2019;321(15):1466-80.
28. Mosenzon O, Blicher TM, Rosenlund S, Eriksson JW, Heller S, Hels OH, et al. Efficacy and safety of oral semaglutide in patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment (PIONEER 5): a placebo-controlled, randomised, phase 3a trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(7):515-27.
29. Pieber TR, Bode B, Mertens A, Cho YM, Christiansen E, Hertz CL, et al. Efficacy and safety of oral semaglutide with flexible dose adjustment versus sitagliptin in type 2 diabetes (PIONEER 7): a multicentre, open-label, randomised, phase 3a trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(7):528-39.
30. Zinman B, Aroda VR, Buse JB, Cariou B, Harris SB, Hoff ST, et al. Efficacy, Safety, and Tolerability of Oral Semaglutide Versus Placebo Added to Insulin With or Without Metformin in Patients With Type 2 Diabetes: The PIONEER 8 Trial. *Diabetes Care.* 2019;42(12):2262-71.
31. Thethi TK, Pratley R, Meier JJ. Efficacy, safety and cardiovascular outcomes of once-daily oral semaglutide in patients with type 2 diabetes: The PIONEER programme. *Diabetes Obes Metab.* 2020;22(8):1263-77.
32. Pratley R, Amod A, Hoff ST, Kadowaki T, Lingvay I, Nauck M, et al. Oral semaglutide versus subcutaneous liraglutide and placebo in type 2 diabetes (PIONEER 4): a randomised, double-blind, phase 3a trial. *Lancet.* 2019;394(10192):39-50.
33. Yamada Y, Katagiri H, Hamamoto Y, Deenadayalan S, Navarria A, Nishijima K, et al. Dose-response, efficacy, and safety of oral semaglutide monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes (PIONEER 9): a 52-week, phase 2/3a, randomised, controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(5):377-91.
34. Yabe D, Nakamura J, Kaneto H, Deenadayalan S, Navarria A, Gislum M, et al. Safety and efficacy of oral semaglutide versus dulaglutide in Japanese patients with type 2 diabetes (PIONEER 10): an open-label, randomised, active-controlled, phase 3a trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(5):392-406.
35. Abd El Aziz M, Cahyadi O, Meier JJ, Schmidt WE, Nauck MA. Incretin-based glucose-lowering medications and the risk of acute pancreatitis and malignancies: a meta-analysis based on cardiovascular outcomes trials. *Diabetes Obes Metab.* 2020;22(4):699-704.
36. Marso SP, Bain SC, Consoli A, Ellaschewitz FG, Jodar E, Leiter LA, et al. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1834-44.
37. Wang F, Mao Y, Wang H, Liu Y, Huang P. Semaglutide and Diabetic Retinopathy Risk in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin Drug Investig.* 2022;42(1):17-28.
38. Dal Canto E, Ceriello A, Ryden L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(2_suppl):25-32.
39. Marx N, Davies MJ, Grant PJ, Mathieu C, Petrie JR, Cosentino F, et al. Guideline recommendations and the positioning of newer drugs in type 2 diabetes care. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(1):46-52.

PROTIBAKTERIJSKE SPOJINE Z MULTIPLIM DELOVANJEM

ANTIBACTERIAL COMPOUNDS WITH MULTIPLE MODE OF ACTION

AVTORJA / AUTHORS:

asist. Martina Durcik, mag. farm.
prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: janez.ilas@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Odkritje antibiotikov je bilo ena največjih prelomnic sodobne medicine. V t. i. zlati dobi antibiotikov je odkritje protibakterijskih spojin, kot so eritromicin, kloramfenikol, vankomicin, kanamicin in gentamicin, močno zmanjšalo smrtnost zaradi bakterijskih okužb, poleg tega pa tudi omogočilo napredek na drugih področjih medicine, kot so presaditve organov, zdravljenje raka itd. (1,2). Že od odkritja penicilina leta 1928 bakterijsko odpornost povezujemo z rabo antibiotikov (3). Pojav odpornosti je

POVZETEK

Odkritje antibiotikov, ki jih včasih imenujemo kar »čudežna zdravila«, je močno pripomoglo k manjši smrtnosti in pozitivno vplivalo na medicinski napredek. V odgovor na rabo antibiotikov so bakterije razvile različne mehanizme odpornosti in tako narašajoča bakterijska odpornost proti znanim protibakterijskim učinkovinam v 21. stoletju predstavlja globalni problem. Bakterije lahko razvijejo odpornost na vsa znana protimikrobnna zdravila in kljub velikemu številu raziskav ter veliko spojinam v kliničnih preskušanjih je potreba po odkrivanju novih učinkovin in terapevtskih pristopov vedno večja. Spojine, ki zavirajo več bakterijskih tarč, multitarčni ligandi, so ena od strategij boja z bakterijsko odpornostjo. Simultano zaviranje več tarč v bakteriji namreč pomeni, da bi mutacije za pridobitev odpornosti morale poteči na več mestih hkrati, kar je manj verjetno. Četudi spojine z multiplim delovanjem ne predstavljajo absolutne rešitve, pa lahko znatno pripomorejo k upočasnitvi pojava odpornih sevov.

KLJUČNE BESEDE:

bakterijska odpornost, konjugati, multipli zaviralci, protibakterijske spojine

ABSTRACT

The discovery of antibiotics, the so-called »wonder drugs«, contributed significantly to the reduction of mortality rates and had a positive impact on medical progress. After the introduction of antibiotics, bacteria started to develop various mechanisms of resistance, and so increasing bacterial resistance to known antibacterial agents is a global problem in the 21st century. Bacteria can develop resistance to all known antimicrobials, and despite a large number of studies and many compounds in clinical trials, the need to discover new active ingredients and therapeutic approaches is growing. Compounds that inhibit multiple bacterial targets, known as multitarget ligands, are one of the strategies to fight bacterial resistance. Simultaneous inhibition of multiple targets in bacteria means that mutations leading to resistance should originate in several sites at the same time, which is less likely. Although multiple-acting compounds do not represent an absolute solution, they can contribute



significantly to slowing down the emergence of resistant strains.

KEY WORDS:

antibacterial compounds, bacterial resistance, conjugates, multitarget inhibitors

neizbežen, vendar se zaradi nepravilne uporabe ter pretirane rabe tako v medicini kot veterini in kmetijstvu problem bakterijske odpornosti (pre)hitro stopnjuje (4). Pojavile so se večkratno odporne (*multidrug resistant, MDR*) bakterije. Mednje spada skupina bakterij, imenovana »ESKAPE« (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter spp.*) (2), ki je odgovorna za večino bolnišničnih okužb in večjo smrtnost. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je bakterije iz skupine »ESKAPE« uvrstila na seznam patogenov, za katere sta nujna odkrivanje novih učinkovin in uvedba le-teh v terapijo (5).

Eden od pristopov k zmanjšanju oz. upočasnitvi pojava bakterijske odpornosti je zaviranje več različnih tarč v bakteriji. Mutacije, ki vodijo v odpornost bakterij, morajo namreč v tem primeru poteči na več mestih hkrati, kar pa je manj verjetno oz. se zgodi počasneje (6). V nadaljevanju podajamo pregled glavnih skupin protibakterijskih spojin s poudarkom na spojinah, ki imajo možnost delovanja na več tarč.

2 SKUPINE PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN

Poznamo več vrst razdelitve protibakterijskih učinkovin. Delimo jih bodisi na bakteriostatične, torej takšne, ki zavirajo rast bakterij, ali baktericidne, ki ubijejo bakterije. Protibakterijske spojine imajo lahko širokospektralno ali ozkospetralno delovanje, glede na kemijski tip pa poznamo majhne molekule, peptide, nukleinske kisline in ostale tipe protibakterijskih učinkovin (7). Glede na mehanizem delovanja protibakterijske učinkovine delimo na pet glavnih razredov. Prvi razred so spojine, ki zavirajo celični metabolizem, npr. sulfonamidi (sulfametoksazol) in trimetoprim, ki zavirajo sintezo folne kisline. Sulfametoksazol je antimetabolit *p*-aminobenzojske kisline in z njim tekmuje za vezavo na dihidropteroat sintazo, trimetoprim pa je zaviralec dihidrofolat reduktaze (slika 1A) (7). Drugi razred so spojine, ki zavirajo biosintezo bakterijske celične stene. To so β -laktamski antibiotiki, ki zavirajo transpeptidaze – penicilin vezuje pro-

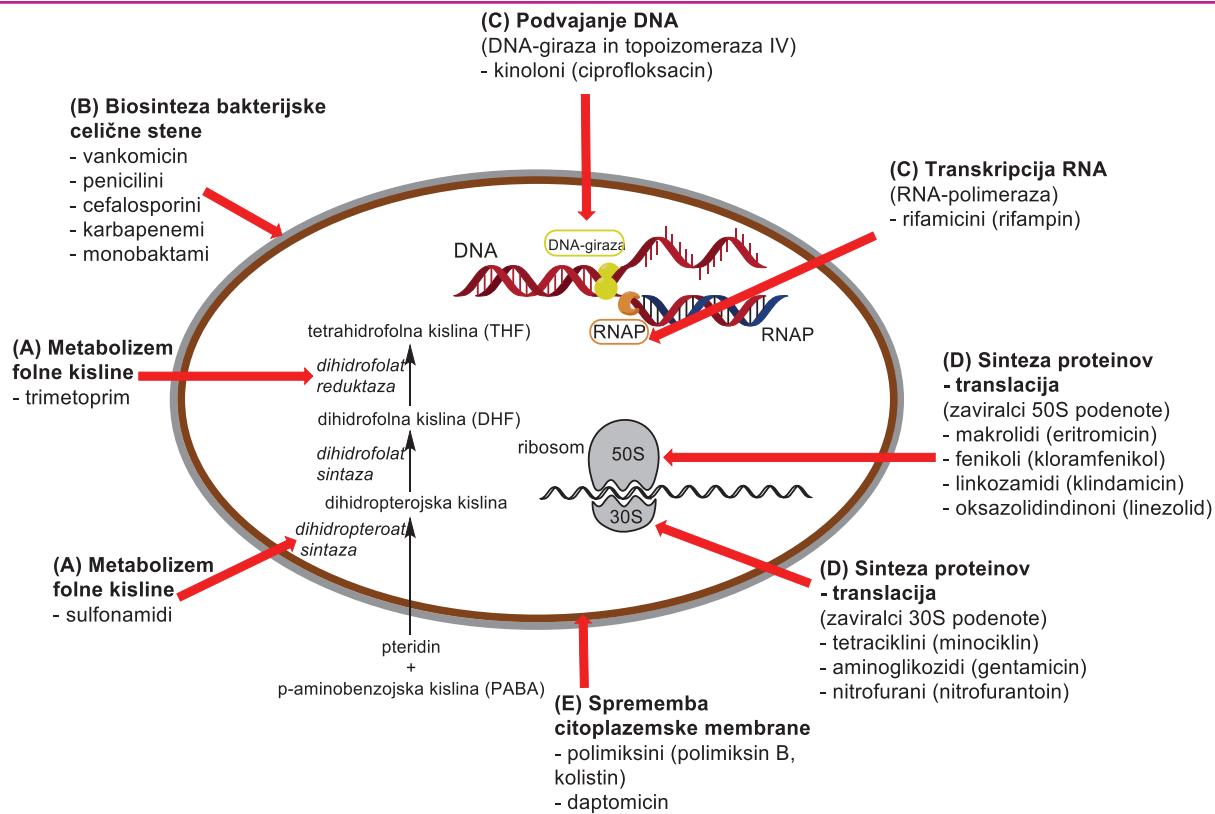
teine (PBP), in vankomicin, ki se z vodikovimi vezmi veže na terminalne *D*-Ala-*D*-Ala ostanke peptidoglikanske verige in prepreči navzkrižno povezovanje s transpeptidazami (slika 1B). Tretji razred so spojine z delovanjem na nuklein-ske kisline (DNA in RNA), npr. kinoloni, z zaviranjem DNA-giraze in topoizomeraze IV preprečijo sintezo DNA, rifampin pa z vezavo na β -podenoto od DNA-odvisne RNA-polimeraze prepreči začetek transkripcije RNA (slika 1C). Četrти razred so spojine, ki ovirajo sintezo proteinov z vezavo na podenoto bakterijskega ribosoma 30S ali 50S (slika 1D), npr. makrolidi, aminoglikozidi, nitrofurantoin itd. (8). Nitrofurantoin bakterijske nitroreduktaze pretvorijo v reducirani intermediati, ki se veže na ribosome in prepreči sintezo proteinov, poleg tega pa zavira tudi bakterijske encime, udeležene v sintezi DNA, RNA in proteinov, in druge prenovne encime (9). Peti razred so spojine, ki interagirajo s celično membrano (8). Sprememba integrirate celične membrane vodi v depolarizacijo celice in izgubo membranskega potenciala. Zaradi tega je zavrta sinteza proteinov, DNA in RNA. Polimiksini, ki delujejo kot kationski detergenti, in daptomicin (linopeptidni antibiotik) spremenijo strukturo membrane celic (slika 1E) (7).

Bakterije lahko razvijejo odpornost proti vsem tipom antibiotikov. Odpornost je lahko intrinzična oz. naravna, lahko pa jo bakterije pridobijo bodisi s spontano mutacijo genov, povezanih z odpornostjo, bodisi pridobijo genetski zapis za odpornost od drugih bakterij s procesi konjugacije, transformacije in transdukcije (10).

Poznamo štiri glavne mehanizme odpornosti. Bakterije izločajo encime, ki kemijsko razgradijo oz. spremenijo antibiotike (slika 2A). Tovrstni encimi so β -laktamaze, ki hidrolizirajo amidno vez β -laktamskih antibiotikov. Z mutacijo tarče bakterije razvijajo odpornost npr. proti fluorokinolonom in rifampinu, ki se na spremenjen protein ne morejo več vezati (slika 2B). Veliko bakterij, posebej po Gramu negativnih, ima izlivne črpalke, ki po prehodu antibiotika v celico le-tega aktivno prečrpajo iz nje (slika 2C). Z modifikacijo proteinov celične stene pa bakterije preprečijo vstop antibiotikov v celico, npr. spremembu porinov povzroči odpornost proti antibiotikom, ki vstopajo v celico skozi porine, npr. fluorokinoloni in β -laktami (slika 2D) (10, 11).

3 UČINKOVINE Z DELOVANJEM NA VEČ TARČ

Pri protibakterijskih spojinah je delovanje na več tarč pomembna prednost, saj se morajo zgoditi mutacije na več



Slika 1: Mehanizmi delovanja različnih skupin protibakterijskih učinkovin.

Figure 1: Mechanism of action of different types of antibacterial compounds.

mestih, da bi bakterije postale odporne, kar pa se zgodi redko. Mutacije, ki vodijo v odpornost na posamezni tarči, se pojavljajo s frekvenco od 10^{-6} do 10^{-9} , z multitarčnim pristopom pa se lahko frekvanca pojava odpornosti precej zniža (12).

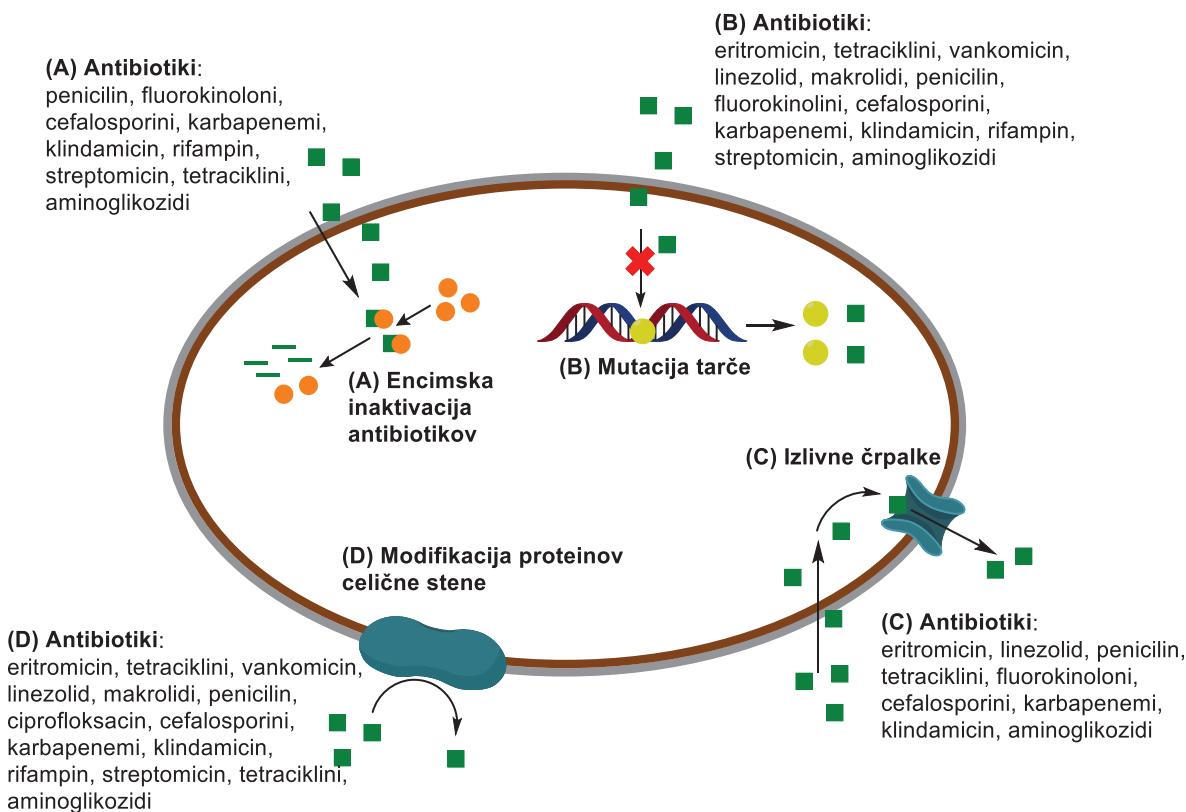
Multitarčna terapija lahko širše pomeni a) terapijo s kombinacijo več posamičnih učinkovin, ki delujejo sinergistično, a se vežejo na različne biološke tarče (slika 3a), ali b) terapijo z eno spojino, ki modulira farmakološki odziv več različnih tarč (multitarčni ligand; en ligand – več tarč) (slika 3b). Ligandi z multiplim delovanjem so produkt dveh ali več spojin, ki so bodisi povezane preko dodatnega linkerja, ki je lahko cepljiv ali ne (konjugati; slika 3b1), ali spojene brez linkerja (slika 3b2). Lahko pa so tudi združene v eno spojino (slika 3b3), ki vsebuje specifične strukturne značilnosti, ki so pomembne za tvorbo interakcij z več različnimi biološkimi tarčami (spojina ima en farmakofor) (6). Pri protibakterijskih spojinah najdemo večinoma ligande zadnjega tipa, in sicer v primerih, kjer imata biološki tarči strukturno podobno vezavno mesto ali imata sorodne substrate (z istim farmakoforom). Prednosti takih združenih ligandov

pred povezanimi ali spojenimi so njihova manjša molekulska masa in bolj zaželene fizikalno-kemijske in farmakokinetične lastnosti (12).

3.1 ZAVIRALCI PODVAJANJA DNA

3.1.1 Zaviralci topoizomeraz

DNA-giraza in topoizomeraza IV sta bakterijska encima iz družine topoizomeraz tipa II, ki spreminjata topologijo DNA med njenim podvajanjem. DNA-giraza uvaja dodatne negativne zavoje v molekulo DNA pred podvojevalne vilice, pri čemer se sprosti torzilska napetost med podvajanjem, topoizomeraza IV pa sodeluje pri dekatenaciji hčerinskih kromosomov po koncu podvajanja DNA (13). Obe sta heterotetramerne proteini, DNA-giraza je zgrajena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB (A_2B_2), topoizomeraza IV pa iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE (C_2E_2), ki so homologne GyrA in GyrB. Encima se v 40 % ujemata v sekvenci aminokislin in njuna strukturno podobna vezava mesta omogočajo razvoj zaviralcev z dvoj-



Slika 2: Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom.

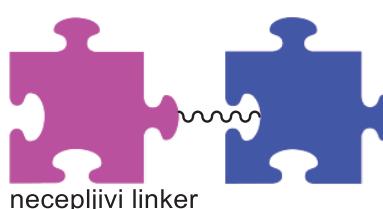
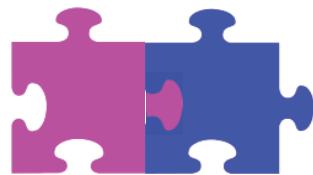
Figure 2: Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics.

a) dva liganda - dve tarči**b) en ligand - dve tarči**

1) Povezana liganda (konjugati)



2) Spojena liganda



Slika 3: Shematski prikaz multitarčne terapije in ligandov z multiplim delovanjem.

Figure 3: Schematic representation of multitarget therapy and multitarget ligands.



nim delovanjem (13). Zaviralci bakterijskih topoizomeraz so med najbolj reprezentativnimi spojinami z multiplim delovanjem.

Poznamo zaviralce podenot GyrA in ParC, ki so eni od najbolj uporabljenih antibiotikov – to so kinoloni in fluorokinoloni (slika 4a). Zavirajo katalitično aktivnost DNA-giraze in topoizomeraze IV, tako da stabilizirajo kompleks med encimom in DNA, kar prepreči združitev dveh verig DNA med podvajanjem. Delujejo baktericidno in jih uvrščamo v skupino najbolj širokospektralnih antibiotikov (14).

Proti fluorokinolonom bakterije razvijajo odpornost in kljub novejšim smernicam, ki priporočajo omejitev predpisovanja, odpornost še vedno narašča. Glavni mehanizmi razvoja odpornosti so mutacije tarčnega mesta, s plazmidi posredovana odpornost, prisotnost izlivnih črpalk ter spremenjena permeabilnost bakterijske membrane zaradi mutacij, ki vodijo v manjšo prisotnost porinov (15).

Incidenca neželenih učinkov pri fluorokinolonih, kot so gastrointestinalne težave, genotoksičnost, fototoksičnost, motnje centralnega živčnega sistema in blažji neželeni učinki, je veljala za relativno nizko (14). Zaradi naraščanja resnih, onesposabljaljajočih in potencialno dolgotrajnih neželenih učinkov, povezanih z mišicami, kitami, kostmi ter živčnim sistemom, je leta 2018 EMA predlagala omejitev uporabe fluorokinolonskih antibiotikov (16). Eden najbolj znanih fluorokinolonov je ciprofloksacin iz druge generacije fluorokinolonov, ki ga uporabljamo za zdravljenje številnih bakterijskih okužb, med drugim okužb spodnjih dihal, sečil, spolovil, prebavil, kosti in sklepov. Med novejše (četrta generacija) sodi moksifloksacin, ki ga v glavnem uporabljamo za zdravljenje okužb dihalnih poti. V zadnjem času je bilo odobrenih oz. prišlo v klinična preskušanja še veliko drugih fluorokinolonskih antibiotikov, npr. delafloksacin, zabofloksacin (slika 4a) in ostali, ki pa jih v Sloveniji še ne uporabljamo (14).

Drugi tip zaviralcev so t. i. novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (*novel bacterial topoisomerase inhibitors*, NBTI) med katere spadata gepotidacin (NBTI tipa 1) in zoliflodacin (NBTI tipa 2) (slika 4b) (17). Vezavno mesto gepotidacina je na podenoti A DNA-giraze, zoliflodacina pa na podenoti B DNA-giraze. Njun mehanizem delovanja je drugačen kot pri ostalih zaviralcih teh podenot (17). Na trgu ni še nobenega zavirala NBTI, sta pa omenjena zavirala v kliničnih preskušanjih za zdravljenje okužb z bakterijo *Neisseria gonorrhoeae* (18).

V tretji tip zaviralcev topoizomeraz spadajo zaviralci podenot GyrB in ParE. To so ATP-kompetitivni zavirali, saj temujojo z molekulo ATP za vezavo na svojo tarčo. Za katalitičen proces podvajanja DNA, posredovan s podenotama

GyrA in ParC je potrebna energija, ki jo encim pridobi s hidrolizo molekule ATP na podenoti GyrB (13). Ob vezavi zavirala tako encim nima energije za delovanje. Edini ATP-kompetitivni zaviralec, ki je bil v klinični rabi, je novobiocin (slika 4c), in sicer za zdravljenje okužb z odpornimi sevi *Staphylococcus aureus*. Zaradi toksičnosti in razvoja bakterijske odpornosti so ga umaknili iz uporabe (19). Na tem področju so razvili veliko različnih strukturnih razredov spojin, med katerimi so le nekatere prišle v zgodnja klinična preskušanja, na trgu pa ni nobene (19).

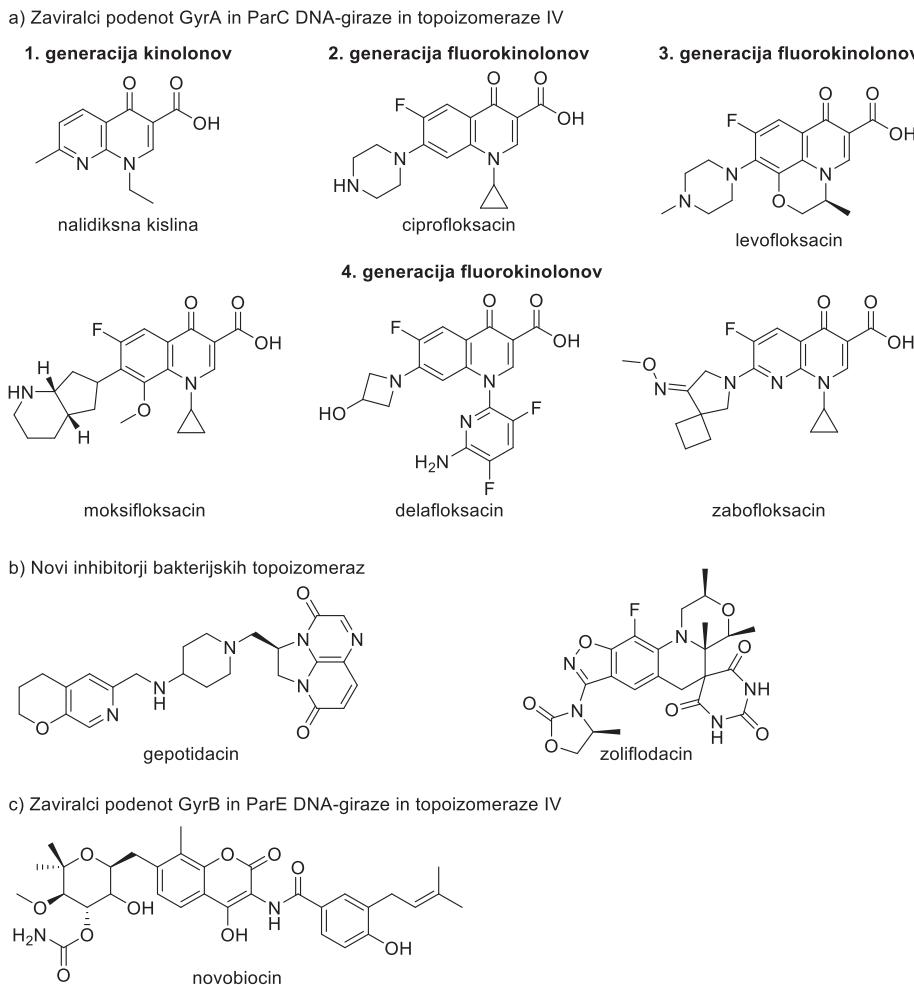
3.1.2 Zaviralci DNA-polimeraz III

Encim DNA-polimeraza III sodeluje v biosintezi bakterijske DNA, in sicer se aktivnost encima prične ob ločitvi verig DNA na mestu začetka podvajanja. DNA-polimeraza III na osnovi matrične verige katalizira sintezo nove komplemetarne verige DNA od 5'-konca proti 3'-koncu. Encim ima tudi eksoneukleazno aktivnost, s katero od 3'-konca proti 5'-koncu odstrani napačno vstavljene nukleotide (20). Poznamo DNA-polimerazi IIIC (pol IIIC) in IIIE (pol IIIE). DNA-pol IIIC je bolj raziskana, odkrili pa so tudi dvojne zaviralec obeh encimov (slika 5a) z delovanjem na po Gramu pozitivne bakterije (21). Trenutno na trgu še ni zavirala DNA-polimeraz III, je pa v letu 2018 spojina ibezapolstat (ACX-362E) (22) (sicer monotarčna) (slika 5b) kot prvi zaviralec DNA-pol IIIC vstopila v klinična preskušanja in v letu 2019 tudi uspešno zaključila 1. fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje okužb z bakterijo *Clostridium difficile* (23), trenutno pa poteka faza testiranja 2a.

3.2 ZAVIRALCI SINTEZE CELIČNE STENE

Pomemben gradnik bakterijske celične stene tako pri po Gramu pozitivnih kot pri po Gramu negativnih bakterijah je peptidoglikan. Sestavlja ga glikanska veriga, ki je prečno premrežena s peptidi. Celici daje obliko, trdnost in zaščito pred vstopom snovi v celico oz. iz nje. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je plast peptidoglikana debelejša kot pri po Gramu negativnih bakterijah (24).

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, v katerem sodelujejo mnogi encimi in zato predstavlja veliko možnosti za zaviranje posameznih korakov tega procesa. Čeprav je plast peptidoglikana pri po Gramu negativnih bakterijah tanjsa, pa je pri teh bakterijah celična stena kompleksnejša, saj imajo še zunanjou membrano, ki varuje celico in vsebuje lipopolisaharide (LPS). Glavni gradnik lipopolisaharidov je lipid A, ki deluje kot endotoksin, ki sproži imunski sistem in lahko vodi tudi v sepso (25). Lipid A je ključen za preživetje



Slika 4: Strukture zaviralcev topoizomeraz.

Figure 4: Structures of topoisomerase inhibitors.

po Gramu negativnih bakterij, zato zaviranje encimov, ki sodelujejo v njegovi biosintezi, predstavlja nove terapevtske možnosti.

3.2.1 Zaviralci penicilin vezičih proteinov

Penicilin veziči proteini (*penicillin-binding proteins*, PBP) sodelujejo v kasnejših stopnjah biosinteze bakterijske celične stene. Sodijo v skupino encimov transpeptidaz in katalizirajo tvorbo prečnih peptidnih vezi med molekulami peptidoglikana (26).

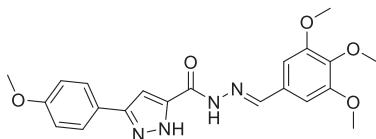
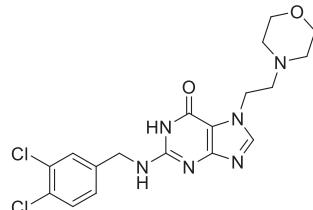
Različne bakterije vsebujejo različne kombinacije PBP. V posamezni bakteriji najdemo med tri do osem encimov te vrste, med katerimi so nekateri esencialni, drugi pa ne (27). Pri po Gramu negativnih bakterijah so esencialni PBP1a, PBP1b, PBP2 in PBP3. Zaviranje enega ali več encimov

lahko vodi v smrt bakterije. Ker pa ni nujno, da zaviranje enega samega encima vodi v smrt celice, je multitarčno delovanje dobrodošlo. Npr. pri bakteriji *Escherichia coli*, ki ima skupno 12 PBP, morata biti za preživetje bakterije aktivna vsaj dva encima, in sicer PBP1a ali PBP1b, poleg enega od njiju pa še PBP2 ali PBP3. Za učinkovito protibakterijsko delovanje je torej potrebno zaviranje vsaj dveh ali več različnih PBP (14).

Zaviralci PBP so β -laktamski antibiotiki, ki so nasprotno med najbolj raziskanimi in klinično uporabljenimi antibiotiki. Poleg kinolonov (pod poglavje 3.1.1) so edini zaviralci z multiplim delovanjem z veliko spojinami v klinični rabi. β -laktami so baktericidni antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene bakterij s tem, ko se kovalentno vežejo na aminokislino serin v aktivnem mestu penicilin vezičih proteinov. Delimo jih v



a) dvojni zaviralec DNA polimeraz IIIC in IIIE

b) ACX-362E, zaviralec DNA polimeraze IIIC v kliničnih testiranjih za zdravljenje infekcij s *C. difficile*

Slika 5: Prima zaviralcev DNA-polimeraz III.

Figure 5: Examples of DNA polymerase III inhibitors.

štiri razrede: penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi (slika 6a) (28).

Tudi pri β -laktamih se je že kmalu po uvedbi penicilina v terapijo pojavila in razširila odpornost nanje. Glavni mehanizem je encimsko posredovana odpornost, saj bakterije izločajo encime – β -laktamaze, ki razgradijo antibiotik. Delno rešitev problema je predstavljala uvedba terapije s kombinacijo β -laktamskega antibiotika in zavirala β -laktamaz (npr. klasična kombinacija amoksicilina in klavulanske kisline ali novejša kombinacija ceftazidima in avibaktama), vendar so se bakterije prilagodile z razvojem encimov, odpornih proti zaviralcem (t. i. β -laktamaze širokega spektra; *extended-spectrum β -lactamase*, ESBL) (29, 30).

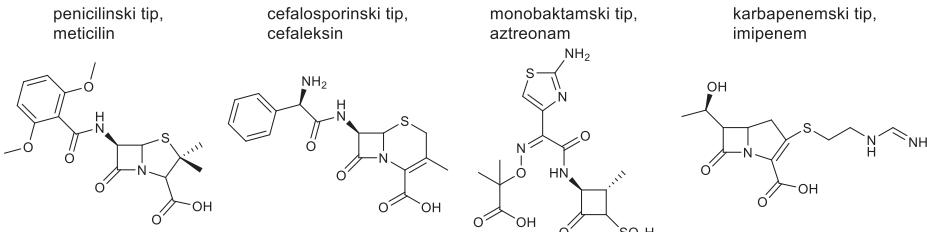
Raziskujejo tudi možnost zaviranja PBP z reverzibilnimi zaviralcji, ki ne vsebujejo β -laktamskega fragmenta in zato niso podvrženi razgradnji z β -laktamazami (12). Primeri takih zaviralcev z multitarčnim delovanjem na različne PBP so prikazani na sliki 6b.

3.2.2 Zavirali ligaz Mur

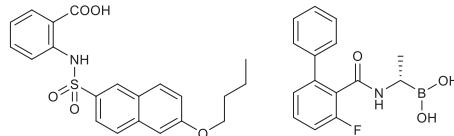
Encimi MurA-F katalizirajo prvi šest korakov biosinteze peptidoglikana, ki se zaključijo z nastankom UDP-*N*-acetilmuramoil pentapeptida. Ligaze MurC-F katalizirajo tvorbo peptidne vezi z vezavo molekule ATP in substrata UDP-*N*-acetilmuramoila in tako predstavljajo privlačne možnosti za sintezo multitarčnih ligandov (31). Medtem ko je vezavno mesto za ATP dobro ohranjeno pri vseh štirih encimih, pa so vezavna mesta za UDP-*N*-acetilmuramoil podobna v parih MurC/D in MurE/F (31). Odkrili so več multitarčnih zaviralcev encimov Mur, kar potrjuje dejstvo, da je možno zaviranje več encimov, vendar pa zaenkrat ti niso imeli obetavne protibakterijske aktivnosti (12, 32).

3.2.3 Zavirali biosinteze lipida A

Prve tri stopnje biosinteze lipida A katalizirajo encimi LpxA, LpxC in LpxD. Zaviralec encima LpxC, ACHN-975 (33) (slika 7a), ki se sicer veže na eno tarčo, je prvi in tudi

a) β -laktamski zavirali

b) Nekovalentni zavirali PBP-jev

Slika 6: a) β -laktamski zavirali PBP in b) nekovalentni zavirali PBP.Figure 6: a) β -lactam PBP inhibitors and b) non-covalent PBP inhibitors.

edini, ki je prišel v klinična preskušanja med zaviralci biosinteze lipida A. Klinične raziskave s tem zaviralcem so zaradi toksičnosti leta 2017 prekinili. Možnost dvojnega zaviranja pa nudita LpxA in LpxD, aciltransferazi, ki ju zavira spojina RJPXD33 (34, 35) (slika 7b). Ta spojina je dodekapeptid in glede na to, da je razvoj dolgih peptidnih verig kot protibakterijskih učinkovin zahteven, so raziskave še v začetnih fazah. Kljub temu izboljšanje razumevanja potrebnih farmakofornih značilnosti predstavlja možnosti za odkritje majhnih molekul, ki bi delovale kot dvojni zaviralci (12).

3.3 DRUGI ZAVIRALCI Z MULTIPLIM DELOVANJEM

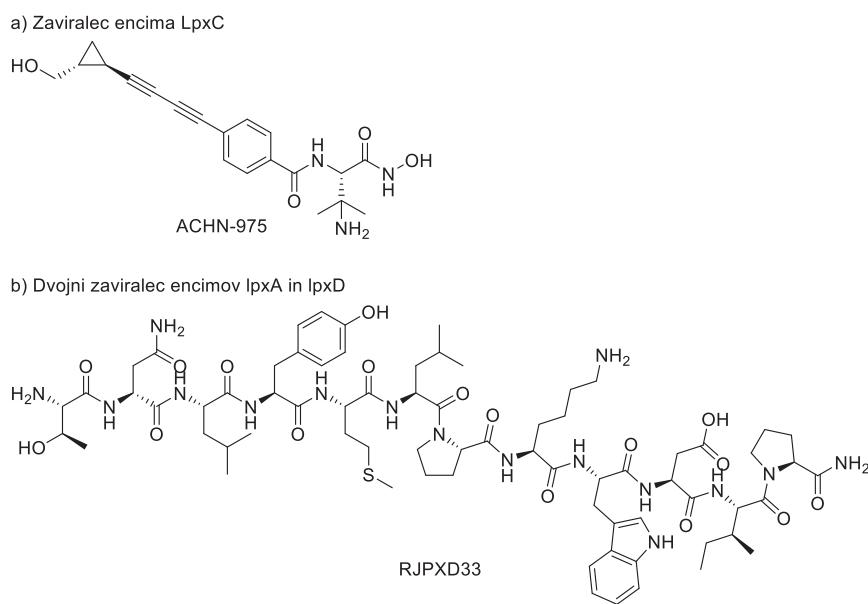
Čeprav so v literaturi opisali tudi primere drugih zaviralcev z multiplim delovanjem, je informacij o njih zelo malo. Med njimi so npr. spojine, ki motijo biosintezo folne kisline (spojina MANIC (36), ki je dvojni zaviralec dihidropteroat sintaze (DHPS) in dihidrofolat reduktaze (DHFR); slika 8a), in spojine, ki zavirajo biosintezo maščobnih kislin v bakterijah. V biosintezi maščobnih kislin sodelujejo npr. encimi FabI, FabF in FabH. FabI je validirana tarča, saj nanjo delujeta učinkovini triklosan (antiseptik) in izoniazid (antituberkulotik) (37). Encima FabF in FabH sta dobro ohranjena med različnimi patogeni, zavira pa ju naravna spojina platencin (slika

8b) s širokim spektrom delovanja na po Gramu pozitivne bakterije (38).

3.4 KONJUGATI

Poleg spojin, opisanih v podpoglavljih 3.1 do 3.3, ki vsebujejo en farmakofor, s katerim se lahko vežejo na več bioloških tarč, pa razvijajo tudi spojine, t. i. konjugate, ki vsebujejo dva farmakofora, ki sta med seboj povezana (slika 3b1) (32). Zaradi njihove velike molekulske mase in dveh različnih farmakoforov je težje odkriti spojino z ustrezнимi lastnostmi zdravilnih učinkovin. Ker sta v tem primeru dve spojini povezani, ne moremo prilagajati njune koncentracije, kar lahko vodi v omejitve pri odmerjanju zaradi potencialne toksičnosti ene od komponent molekule (32). Vseeno pa lahko ob optimizaciji vseh omejitev odkrivanja novih spojin tudi konjugati predstavljajo obetaven pristop k zmanjšanju bakterijske odpornosti, kar dokazujejo nekatere spojine, ki vstopajo v klinična preskušanja.

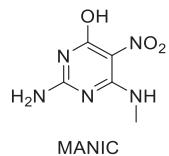
Odkrili so veliko konjugatov s fluorokinolonskimi zaviralci topoizomeraz (GyrA/ParC), npr. a) fluorokinolone in anilinouracilne zaviralce DNA-polimeraze IIIC (slika 9a), ki izkazujejo uravnoteženo delovanje na več tarč in obetavno protibakterijsko aktivnost tako na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije (39), b) fluorokinolone in ok-sazolidinonske zaviralce sinteze proteinov, kot je spojina



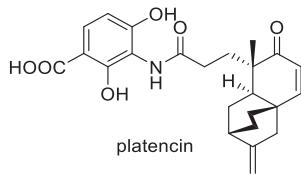
Slika 7: Zaviralci encimov LpxC, LpxA in LpxD.
Figure 7: LpxC, LpxA and LpxD inhibitors.



a) Zaviralec DHPS in DHFR



b) Zaviralec FabF in FabH



Slika 8: Drugi zaviralci z multiplim delovanjem.

Figure 8: Other multitarget ligands.

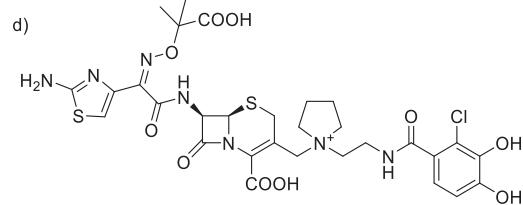
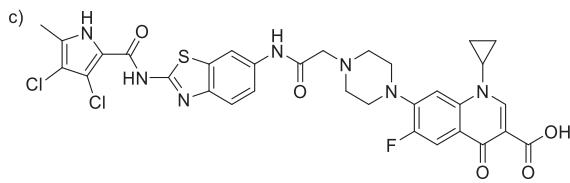
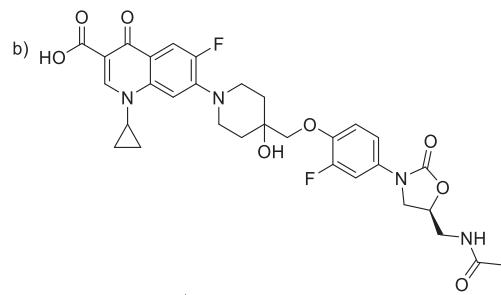
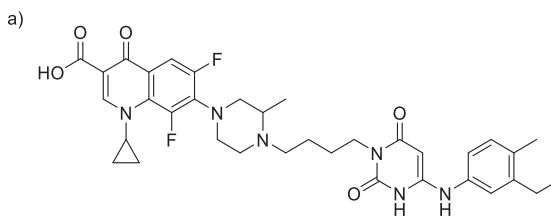
DNV3837 (slika 9b), ki je trenutno v 2. fazi kliničnih preiskovanj za zdravljenje okužb z bakterijo *C. difficile* (14, 40) in c) fluorokinolone in benzotiazolne ATP-kompetitivne zaviralce topoizomeraz (GyrB/ParE) (slika 9c) (41).

Kot zanimiv primer konjugatov omenimo še cefiderokol, ki je sestavljen iz cefalosporina (ceftazidim) in kateholu (2-kloro-3,4-dihidroksibenzojska kislina) (slika 9d). Tu sicer ne gre za spojino s klasičnim delovanjem na dve tarči, temveč za enega od pristopov k zmanjšanju odpornosti oz. pristop za prehajanje spojine v bakterijsko celico. Ta spojina za vstop v bakterijo uporablja princip »trojanskega konja«, saj kateholni fragment deluje kot siderofor. Siderofori so molekule, ki jih bakterije izločajo v okolico, tam kelirajo ione Fe^{3+} , nastali kompleks pa bakterije prepozna in spet privzamejo v celico preko svojih transportnih sistemov. Na ta način pridobijo železo, ki ga za svoje delovanje nujno potrebujejo. Če torej na protibakterijsko spojino

pripnemo mimetik siderofora, ki kelira železo, lahko bakterija ta kompleks prepozna in z aktivnim transportom privzame v celico, pri tem pa pride v celico tudi antibiotik (42). Cefiderokol so novembra 2019 v ZDA odobrili za zdravljenje komplikiranih okužb sečil s po Gramu negativimi bakterijami (43).

4 SKLEP

Odkrivanje novih protibakterijskih spojin je nujno za uspešen boj z vedno bolj odpornimi patogeni iz skupine ESKAPE. Uspešnih protibakterijskih učinkovin primanjkuje in kljub številnim raziskavam na trg vstopi le malo novih



Slika 9: Konjugati: a) fluorokinolon in zaviralec DNA pol IIC, b) fluorokinolon in zaviralec ribosomske podenote 50S, c) fluorokinolon in zaviralec ATP-vezavnga mesta topoizomeraz in d) cefalosporin in mimetik siderofora.

Figure 9: Conjugates: a) fluoroquinolone and DNA pol IIC inhibitor, b) fluoroquinolone and ribosome 50S subunit inhibitor, c) fluoroquinolone and ATP-competitive topoisomerase inhibitor, and d) cephalosporin and siderophore mimetic.

spojin z novimi mehanizmi delovanja. Pristop zaviranja več tarč z multitarčnimi ligandi je ena od možnosti razvoja spojin, ki lahko upočasnijo pojav bakterijske odpornosti. DNA giraza/topoizomeraza IV in penicilin vezovi proteini so tarče klinično validiranih učinkovin z multiplim delovanjem in predstavljajo obetavne možnosti razvoja novih kemijskih razredov spojin, npr. ATP-kompetitivnih zaviralcev GyrB in ParE ali nekovalentnih zaviralcev penicilin vezovi proteinov. Z multitarčnimi ligandi lahko zaviramo tudi encime, kot so aciltransferaze v biosintezi lipida A, ligaze Mur in DNA polimeraze III. Konjugati, tj. spojine z dvema povezanimi farmakoforoma, so še en zanimiv način delovanja na več tarč. Bakterijska odpornost je sicer kompleksen problem in multipli ligandi so še vedno lahko podvrženi mehanizmom odpornosti, kot so npr. izlivne črpalki ali bakterijska razgradnja spojine. Vseeno pa tudi zmanjšanje in upočasnitev pojava tarčnih mutacij, kar taki ligandi omogočajo, pomembno pripomore k reševanju tega problema.

5 LITERATURA

- Lyddiard D, Jones GL, Greatrex BW. Keeping it simple: lessons from the golden era of antibiotic discovery. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(8).
- Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079–81.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, idr. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457–61.
- Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, idr. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*. 2019;365(6459):1944.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, idr. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27.
- Oldfield E, Feng X. Resistance-resistant antibiotics. *Trends in Pharmacol Sci*. 2014;35(12):664–74.
- Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(6):631–50.
- McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*. 1997;54(12):1420–33.
- McOsker CC, Fitzpatrick PM. Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother*. 1994;33:23–30.
- Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*. 2018;9:2928.
- Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Res Int*. 2016;2016:1–8.
- East SP, Silver LL. Multitarget ligands in antibacterial research: progress and opportunities. *Expert Opin Drug Discov*. 2013;8(2):143–56.
- Tomašič T, Mašič L. Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Curr Top Med Chem*. 2013;14(1):130–51.
- Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *MedChemComm*. 2019;10(10):1719–39.
- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 2014;22(8):438–45.
- Fluoroquinolone and quinolone antibiotics: PRAC recommends restrictions on use [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2021 Nov 1]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/fluoroquinolone-quinolone-antibiotics-prac-recommend-s-restrictions-use_en.pdf
- Badshah SL, Ullah A. New developments in non-quinolone-based antibiotics for the inhibition of bacterial gyrase and topoisomerase IV. *Eur J Med Chem*. 2018;152:393–400.
- Fernandes P, Martens E. Antibiotics in late clinical development. *Biochem Pharmacol*. 2017;133:152–63.
- Bisacchi GS, Manchester JL. A New-Class Antibacterial—Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infect Dis*. 2015;1(1):4–41.
- Barnes MH, Miller SD, Brown NC. DNA Polymerases of Low-GC Gram-Positive Eubacteria: Identification of the Replication-Specific Enzyme Encoded by dnaE. *J Bacteriol*. 2002;184(14):3834–8.
- Butler M. Antibacterial Pyrazole Carboxylic Acid Hydrazides. WO2004094370.
- Xu W-C, Silverman MH, Yu XY, Wright G, Brown N. Discovery and development of DNA polymerase IIIC inhibitors to treat Gram-positive infections. *Bioorg Med Chem*. 2019;27(15):3209–17.
- FDA Grants QIDP Designation to Acurx's Lead Antibiotic Product Candidate, ACX-362E for Clostridium difficile Infection [Internet]. [cited 2020 Feb 1]. Available from: <https://www.acurxpharma.com/news-media/press-releases/detail/5/fda-grants-qidp-designation-to-acurxs-lead-an-tibiotic>
- Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):149–67.
- Steimle A, Autenrieth IB, Frick J-S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2016;306(5):290–301.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):234–58.
- Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8).
- Silver LL. Multi-targeting by monotherapy antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(1):41–55.
- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, idr. β -Lactamases and β -Lactamase



- Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472–500.
30. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care.* 2020;8(1):13.
 31. Smith CA. Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J Mol Biol.* 2006;362(4):640–55.
 32. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):71–109.
 33. Kalinin DV, Holl R. LpxC inhibitors: a patent review (2010–2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27(11):1227–50.
 34. Ma X, Prathapam R, Wartchow C, Chie-Leon B, Ho C-M, De Vicente J, idr. Structural and Biological Basis of Small Molecule Inhibition of Escherichia coli LpxD Acyltransferase Essential for Lipopolysaccharide Biosynthesis. *ACS Infect Dis.* 2019;acsinfectdis.9b00127.
 35. González-Bello C. The Inhibition of Lipid A Biosynthesis-The Antidote Against Superbugs? *Adv Ther.* 2019;2(3):1800117.
 36. Bennett BC, Xu H, Simmerman RF, Lee RE, Dealwis CG. Crystal Structure of the Anthrax Drug Target, *Bacillus anthracis* Dihydrofolate Reductase †. *J Med Chem.* 2007;50(18):4374–81.
 37. Lu H, Tonge PJ. Inhibitors of FabI, an Enzyme Drug Target in the Bacterial Fatty Acid Biosynthesis Pathway. *Acc Chem Res.* 2008;41(1):11–20.
 38. Wang J, Kodali S, Lee SH, Galgoci A, Painter R, Dorso K, idr. Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proc Natl Acad Scis.* 2007;104(18):7612–6.
 39. Butler MM, LaMarr WA, Foster KA, Barnes MH, Skow DJ, Lyden PT, idr. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of a Novel Anilinouracil-Fluoroquinolone Hybrid Compound. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):119–27.
 40. An Exploratory, Open-Label, Oligo-Center Study to Evaluate the Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Intravenous DNV3837 in Subjects With Clostridium difficile Infection [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03988855>
 41. Fois B, Skok Ž, Tomašić T, Ilaš J, Zidar N, Zega A, idr. Dual *Escherichia coli* DNA Gyrase A and B Inhibitors with Antibacterial Activity. *ChemMedChem.* 2020;15(3):265–269.
 42. Domalaon R, Idowu T, Zhanel GG, Schweizer F. Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *Clin Microbiol Reviews.* 2018;31(2).
 43. FDA news release; FDA approves new antibacterial drug to treat complicated urinary tract infections as part of ongoing efforts to address antimicrobial resistance [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-complicated-urinary-tract-infections-part-ongoing-efforts>

ANALIZNE TEHNIKE ZA VREDNOTENJE (NE)STABILNOSTI PROTEINOV

ANALYTICAL TECHNIQUES FOR EVALUATION OF PROTEIN (IN)STABILITY

AVTORJA / AUTHORS:

Nika Osel, mag. farm.

prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: robert.roskar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Zaradi razvoja na področju biotehnologije, ugotovitev bazičnih raziskav o tarčah in mehanizmih delovanja ter učinkovitosti pri terapiji številnih bolezni so proteini v zadnjih desetletjih postali hitro rastuča skupina zdravilnih učinkovin. Gre za velike in kompleksne molekule, ki imajo številne funkcionalne skupine in več nivojev strukture. Za svoje delovanje morajo imeti ohranjeno tridimenzionalno strukturo,

POVZETEK

Proteinske učinkovine so v zadnjih desetletjih močno preoblikovale trg zdravil. Gre za velike molekule z zapleteno strukturo, ki so nagnjene k različnim oblikam nestabilnosti. Posledice nestabilnosti so lahko zmanjšanje biološke aktivnosti ali povečanje imunogenosti, zato je izbira ustreznih analiznih tehnik za vrednotenje stabilnosti proteinov ključnega pomena za zagotavljanje kakovosti, učinkovitosti in varnosti zdravila. V primerjavi z nizkomolekularnimi učinkovinami je vrednotenje stabilnosti proteinov kompleksen in večplasten analizni izziv. Pri tem moramo vključiti tri glavne vidike stabilnosti: fizikalno, kemijsko in biološko stabilnost. Za celovito kvalitativno in kvantitativno oceno nestabilnosti proteinov je nujna uporaba kombinacije različnih analiznih tehnik. Poleg tega moramo vsak protein obravnavati individualno. V tem prispevku podajamo pregled analiznih tehnik, ki jih uporabljamo za vrednotenje najrazličnejših sprememb, ki so posledica nestabilnosti proteinov. Pri tem imajo glavno vlogo masna spektrometrija ter separacijske, spektroskopske in imunokemijske tehnike.

KLJUČNE BESEDE:

analizne tehnike, masna spektrometrija, nestabilnost, proteini

ABSTRACT

Therapeutic proteins have significantly transformed the pharmaceutical market in recent decades. These large molecules with complex structures are susceptible to various degradation pathways. Their instability may result in a decrease in biological activity or an increase in immunogenicity. Therefore, the selection of appropriate analytical techniques for the evaluation of protein stability is crucial to ensure quality, efficacy and safety of the medicine. Compared to small molecules, the evaluation of protein stability is a complex and multifaceted analytical challenge. Three main stability aspects have to be considered: physical, chemical and biological stability. A combination of different analytical techniques is necessary for a comprehensive qualitative and quantitative evaluation of protein instability. Moreover, an individual approach is required for each protein. This article reviews analytical tech-



niques used for the evaluation of various changes resulting from protein instability, with mass spectrometry, separation, spectroscopic and immunochemical techniques playing a major role.

KEY WORDS:

analytical techniques, instability, mass spectrometry, proteins

ki se lahko pod vplivom različnih dejavnikov hitro poruši (1, 2).

Nestabilnost proteinov delimo na fizikalno in kemijsko. Pri slednji pride do nastanka nove kemijske entitete zaradi ceptive ali nastanka kovalentnih vezi. Pri tem se spremeni primarna struktura proteina, posledično pa se lahko spremenijo tudi višji nivoji strukture (1–3). Pri fizikalni nestabilnosti molekula proteina kemijsko ostane nespremenjena, pride pa do sprememb v sekundarni, terciarni ali kvartarni strukturi proteina (3, 4). Med fizikalne oblike nestabilnosti uvrščamo denaturacijo, agregacijo, adsorpcijo proteinov na površine in obarjanje (1, 3, 5). Fizikalna in kemijska nestabilnost sta pogosto medsebojno povezani, ena oblika nestabilnosti lahko vodi do druge, tako pa se potencira verjetnost za pretvorbo proteina (1,3).

Posledice nestabilnosti so lahko zmanjšana aktivnost ali povečana imunogenost proteina, kar je neposredno povezano z učinkovitostjo in varnostjo zdravila (1, 6, 7). Zato je izbira kombinacije ustreznih analiznih tehnik za vrednotenje stabilnosti proteinov ključnega pomena za uspešen razvoj zdravila.

2 VREDNOTENJE NESTABILNOSTI PROTEINOV

V primerjavi z nizkomolekularnimi učinkovinami je vrednotenje stabilnosti proteinov precej bolj zapleteno. Stabilnosti proteina namreč ne moremo opredeliti izključno na podlagi njegove koncentracije ali odsotnosti razgradnih produktov (4). Za razumevanje nestabilnosti proteinov in njihovo ustrezeno stabilizacijo v zdravilih je potrebno podrobno analizno ovrednotenje posameznega proteina (8).

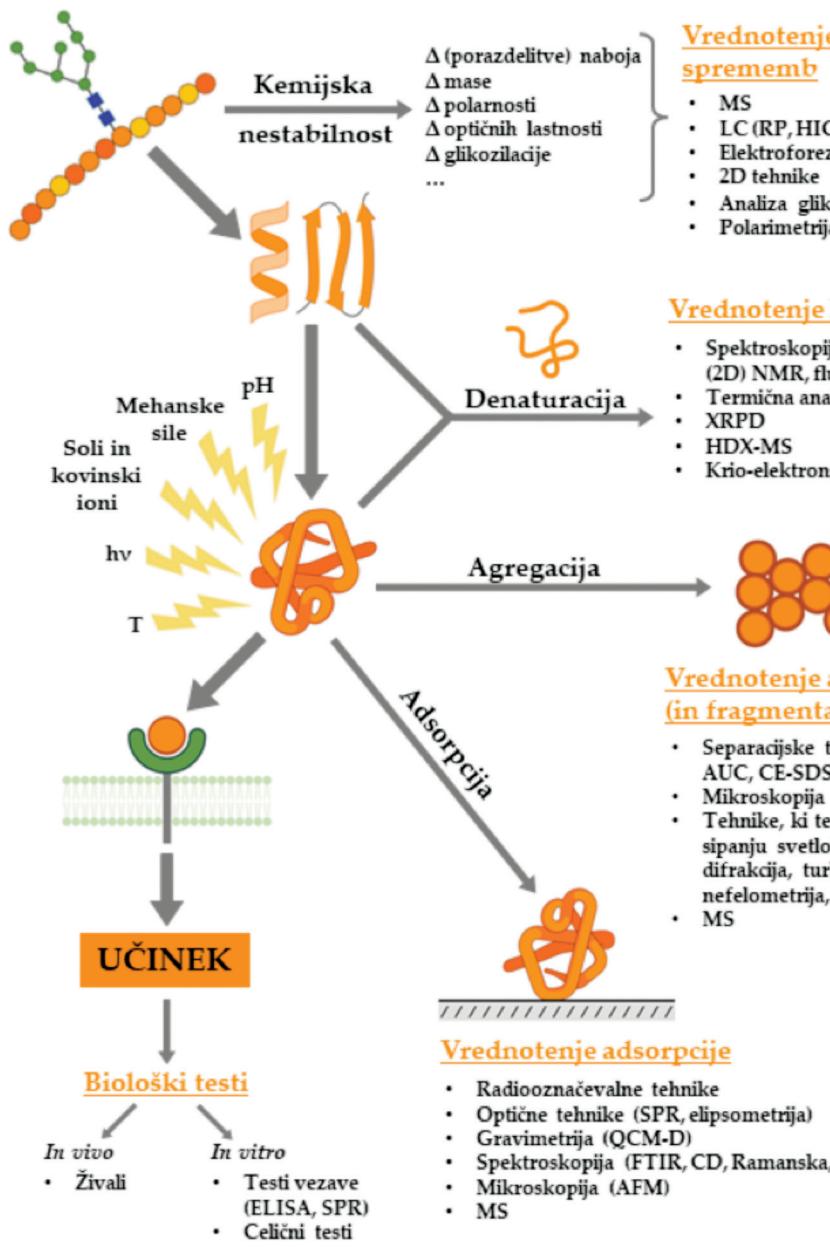
Zaradi velike raznolikosti možnih strukturnih sprememb je vrednotenje stabilnosti proteinov kompleksen in večplasten analizni izzik, ki zahteva uporabo širokega spektra analiznih pristopov (slika 1) (5, 8). Pri tem moramo vključiti tri glavne

vidike stabilnosti: ovrednotiti moramo fizikalno stabilnost z vidika strukture proteina in agregacije, proučiti kemijske spremembe proteina in rezultate podkrepiti z ovrednotenjem biološke aktivnosti proteina (4).

Izbira analiznih tehnik je odvisna od lastnosti proteina, formulacije, mehanizma razgradnje, destruktivnosti analizne metode in priprave vzorca (5). Trenutno ima le malo terapevtskih proteinov svoje monografije v farmakopejah (9). Splošne usmeritve za vrednotenje stabilnosti proteinov podajajo smernice Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH) Q5C in Q6B. Smernica ICH Q5C podaja usmeritve proizvajalcem glede stabilnostnih študij, ki jih morajo izvesti za pridobitev dovoljenja za promet z biološkim zdravilom, saj služijo kot podpora predlaganim pogojem shranjevanja in roku uporabnosti (10). Smernica ICH Q6B pa podaja glavne principe za izbiro in utemeljitev specifikacij za biološka zdravila (11). Obe smernici naslavljata tudi problematiko analiznega vrednotenja stabilnosti proteinskih učinkovin. Za celovito kvalitativno in kvantitativno oceno stabilnosti proteinov moramo uporabiti kombinacije ustreznih stabilnostno-indikativnih analiznih tehnik, največkrat spektroskopskih, separacijskih in imunokemijskih tehnik ter masne spektrometrije (MS), s katerimi ovrednotimo fizikalno-kemijske lastnosti, vsebnost in biološko aktivnost, v nekaterih primerih pa tudi imunokemijske lastnosti proteina (10, 11). Ovrednotiti moramo tudi čistost proteinske učinkovine, saj lahko nečistote vplivajo na stabilnost in imunogenost proteina (2, 7). Poleg tega morebitno prisotne nečistote otežijo analizno vrednotenje proteina. Za vrednotenje čistosti uporabljamo kombinacije specifičnih metod, kot so elektroforezne in kromatografske metode ter peptidno kartiranje, rezultat analize pa je odvisen od izbrane metode (10, 11).

2.1 VREDNOTENJE KEMIJSKE NESTABILNOSTI

Kemijska nestabilnost povzroči spremembe v primarni strukturi proteina zaradi reakcij, kot so deamidacija, oksidacija, hidroliza, izmenjava disulfidne vezi, izomerizacija, racemizacija, β -eliminacija, glikacija in deglikozilacija (1–3). Obseg kemijske spremembe je odvisen od formulacije, razmer shranjevanja in intrinzičnih lastnosti proteina, njene posledice pa so odvisne od lokacije sprememb (4, 12). Kemijska nestabilnost povzroči spremembe v fizikalno-kemijskih lastnostih proteina, kot so polarnost, masa, naboj in optične lastnosti (8, 13). Za vrednotenje teh sprememb najpogosteje uporabljamo kromatografske, elektroforezne in spektroskopske tehnike ter MS (12).



Slika 1: Prikaz kompleksnosti vrednotenja nestabilnosti proteinov.

Figure 1: Demonstration of the complexity of the evaluation of protein instability.

MS je v zadnjih desetletjih postala nepogrešljivo orodje pri analitiki proteinov. Najpogosteje jo uporabljamo za pridobivanje informacij o aminokislinskem zaporedju in točni molekulski masi, za določevanje mesta in narave posttranslacijskih modifikacij ter tudi za proučevanje višjih nivojev strukture in agregacije (14–16). Pomembno vlogo ima pri stresnih študijah, kjer jo uporabljamo za identifikacijo razgradnih poti in potencialnih kritičnih atributov kakovosti

(16). Vse to omogočajo različne izvedbe in načini delovanja masnih spektrometrov, različni načini ionizacije, fragmentacije in detekcije (8, 16). Za strukturno vrednotenje proteinov rutinsko uporabljamo tri strategije: MS intaktnih proteinov (*top-down approach*), MS po delni fragmentaciji proteinov (*middle-down / middle-up approach*) in peptidno kartiranje (*bottom-up approach*) (14–16). MS lahko uporabljamo samostojno ali pa je sklopljena z različnimi kro-



matografskimi tehnikami ali kapilarno elektroforezo (CE) (16).

Številne kemijske reakcije povzročijo spremembe v naboju ali porazdelitvi naboja, kar lahko proučujemo z ionsko-izmenjevalno kromatografijo (IEC), (kapilarnim) izoelektričnim fokusiranjem in kapilarno consko elektroforezo (4, 8, 12, 13). Za proučevanje deamidacije kot ene najpogostejših reakcij, pri katerih pride do sprememb naboja, obstajajo tudi specifične tehnike, kot so visokozmogljivostna bioluminiscenčna metoda (17), jedrska magnetna resonanca (NMR), 2D NMR in določitev nastalega amoniaka z encimskim testom ali selektivno elektrodo (12, 13).

Kemijska nestabilnost lahko povzroči tudi spremembe v hidrofobnosti proteinov, kar najpogosteje vrednotimo s kromatografskimi tehnikami, kot sta reverznofazna in hidrofobnointerakcijska kromatografija v kombinaciji z različnimi načini detekcije (8, 9, 14, 18). Pomembno orodje pri proučevanju kemijske nestabilnosti proteinov so tudi dvo- ali večdimenzionalne tehnike, kot sta 2D-gelska elektroforeza in dvo- ali večdimenzionalna tekočinska kromatografija (8). Slednja se je v zadnjih letih zelo razvila predvsem zaradi možnosti kombiniranja ortogonalnih separacijskih principov, izboljšane selektivnosti, ločljivosti in občutljivosti v primerjavi z enodimenzionalno kromatografijo, poleg tega pa omogoča uporabo MS-detekcije tudi pri vrstah kromatografije (npr. IEC), ki niso združljive s tem načinom detekcije (8, 15).

Fragmentacija proteinov je najpogosteje posledica hidrolize peptidne vezi ali redukcije intermolekularnih disulfidnih vezi. Poleg nekaterih tehnik, ki jih uporabljamo za vrednotenje agregacije proteinov (podpoglavlje 2.2.3), za vrednotenje fragmentacije uporabljamo tudi CE in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV- ali elektrokemijsko detekcijo (8, 13). Enake tehnike uporabljamo tudi pri proučevanju sprememb zaradi tvorbe, cepitve ali izmenjave disulfidne vezi. Za proučevanje β -eliminacije uporabljamo voltametrijo s katodnim raztopljanjem, za proučevanje racemizacije pa uporabljamo polarimetrijo, MS pa le, ko do racemizacije pride v devteriranem mediju (13).

Vrednotenje sprememb v glikozilacijskih vzorcih je zaradi njihove kompleksnosti in heterogenosti zelo zahtevno in obsega štiri glavne analizne pristope: i) z analizo mase intaktnega proteina dobimo informacije o različnih glikoforah posameznega glikoproteina; ii) analiza glikopeptidov nam omogoča določitev mesta in stopnje glikozilacije; iii) oligosaharidne profile proteina določimo z analizami sproščenih glikanov; iv) z določanjem monosaharidov identificiramo in kvantificiramo posamezne monosaharide (9, 16). Pri tem ima glavno vlogo MS v kombinaciji z različnimi se-

paracijskimi tehnikami in uporabo reagentov za označevanje (9, 14, 16).

2.2 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI

2.2.1 Vrednotenje višjih nivojev strukture

Zaradi delovanja različnih stresnih dejavnikov lahko pride do sprememb na vseh nivojih strukture proteina (5, 8). Pri fizikalni nestabilnosti se primarna struktura proteina ne spremeni, spremenijo pa se višji nivoji strukture (1). V ta namen uporabljamo kombinacije različnih ortogonalnih analiznih tehnik, ki se med seboj razlikujejo po količini pridobljenih informacij, ločljivosti, dostopnosti, enostavnosti, zmogljivosti ter potrebi po specializirani in dragi opremi (8).

Za proučevanje višjih nivojev strukture primarno uporabljamo različne spektroskopske tehnike, ki jih v splošnem uvrščamo med tehnike z nizko ločljivostjo (8, 12, 19). To so cirkularni dikroizem (CD), infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR), ramanska, UV- in fluorescenčna spektroskopija, v nekaterih primerih tudi NMR (4, 8, 15, 20, 21). S temi tehnikami lahko za molekulo proteina pridobimo značilne spektroskopske prstne odtise in opazimo večje spremembe v sekundarni, terciarni ali kvarterni strukturi proteina, ki morajo biti prisotne pri relativno velikem deležu molekul v vzorcu (8, 9). Slabost teh tehnik pa je, da ne moremo zaznati majhnih razlik v konformaciji proteinov in pridobiti specifičnih informacij o lokaciji sprememb in njihovi dinamiki, zato jih uporabljamo v t. i. primerjalnih študijah (*comparability studies*) (8, 15). Med nizkoločljivostne tehnike uvrščamo tudi metode termične analize, kot so diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC), diferenčna dinamična fluorimetrija in izotermična kalorimetrija (4, 9, 19, 20, 22). Tudi s temi tehnikami lahko pridobimo le informacije, ki odsevajo globalne spremembe v strukturi proteinov (9).

Z nekaterimi tehnikami pa lahko pridobimo specifične strukturne in prostorske informacije za posamezne domene, funkcionalne skupine ali celo atome v molekuli proteina. Temeljna visokoločljivostna tehnika za določanje strukture proteinov je rentgenska praškovna difrakcija (XRPD). Krioelektronska mikroskopija nam omogoča opazovanje nativne strukture proteinov s skoraj atomsko ločljivostjo (8). NMR je uveljavljena tehnika za proučevanje strukturnih sprememb z visoko ločljivostjo, vendar je zaradi kompleksnosti, relativno slabe občutljivosti, omejene prisotnosti aktivnih jeder v naravi in omejitve pri velikosti proteinov (do 25 kDa) rutinsko ne uporabljamo za vrednotenje višjih nivojev strukture (9, 21).

Občutno izboljšanje omenjenih pomanjkljivosti je omogočil razvoj 2D NMR (2D ^{13}C NMR in 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR). S to tehniko lahko pridobimo NMR prstne odtise proteinov z ločljivostjo na nivoju posameznih aminokislín, kar lahko neposredno uporabimo v primerjalnih študijah (8, 21). Sodobnejša tehnika, s katero lahko pridobimo komplementarne informacije o višjih nivojih strukture, je MS (8, 16). Uporabljamo različne pristope MS, in sicer MS ionske mobilnosti, kemično premreženje v kombinaciji z MS-analizo ter izmenjavo vodika in devterija v kombinaciji z MS (HDX-MS) (16). Predvsem slednja postaja v zadnjih letih vedno bolj priljubljena, saj je občutljiva, neomejena z velikostjo proteina, potrebna je majhna količina vzorca, možna je tudi avtomatizacija (8, 9, 16). S HDX-MS lahko ovrednotimo konformacijske spremembe, jih lokaliziramo in proučujemo dinamiko zvijanja proteina na nivoju 3–10 aminokislín velikih regij proteina (9, 16, 21). Pri tem moramo uporabiti vodne raztopine vzorcev in mehke metode ionizacije (npr. elektrorazprševalna ionizacija), da se nekovalentne interakcije ne porušijo (16).

Alternativa uporabi tehnik z visoko ločljivostjo je izdelava empiričnih faznih diagramov. Pri tem z več različnimi nizkoločljivostnimi tehnikami izvedemo analize pri številnih pogojih, da pridobimo veliko količino podatkov, v katerih z matematično analizo iščemo vzorce, ki kažejo na strukturne spremembe (21).

Denaturacijo proteina lahko (kvantitativno) vrednotimo tudi z reverznofazno HPLC, saj se pri denaturaciji izpostavijo hidrofobne skupine iz notranjosti proteina, posledično pa se spremeni hidrofobnost proteina. Da je prišlo do razvitja proteinske strukture, lahko ugotavljamo tudi z imunoķemiskimi metodami, kot je encimskoimunski test (ELISA). Za proučevanje kvinarne strukture, ki je značilna za nekatera monoklonska protitelesa, pa lahko uporabimo izključitveno kromatografijo (SEC) in ^1H NMR spektroskopijo z multivariantno analizo (4).

2.2.2 Vrednotenje strukture v trdnem agregatnem stanju

Eden od načinov stabilizacije proteinov je izbira trdnih farmacevtskih oblik, med katerimi so najpogosteje liofilizati (1, 23). Na ta način proteine stabiliziramo, upočasnimo njihovo razgradnjo, izboljšamo odpornost proteinov proti temperaturnim spremembam in mehanskemu stresu, podaljšamo rok uporabnosti zdravila in se izognemo hladni verigi (1, 5). Po drugi strani pa so proteini med sušenjem izpostavljeni ostrim pogojem, kar je prav tako problematично z vidika stabilnosti (5, 23).

Čeprav je že skoraj polovica zdravil s proteini v trdnih oblikah, je na voljo relativno malo analiznih tehnik za vredno-

tenje proteinov v trdnem agregatnem stanju (23). Z izbranimi tehnikami lahko proučujemo lokalne in globalne spremembe v strukturi proteinov (24). Za proučevanje sekundarne in terciarne strukture proteinov najpogosteje uporabljamo spektroskopske metode, kot so FTIR, bližnja infrardeča in ramanska spektroskopija, CD ter fluorescenčna in UV-VIS-spektroskopija v trdnem stanju. DSC uporabljamo za vrednotenje mobilnosti molekul, kinetike kristalizacije, stopnje kristalizacije in denaturacije ter za določanje temperature steklastega prehoda, ki jo rutinsko določamo pri razvoju trdnih formulacij. XRPD nam omogoča ugotavljanje kristalnosti oziroma amorfnosti praška. S HDX-MS proučujemo strukturo proteinov v trdnem stanju z visoko ločljivostjo in tako odkrivamo spremembe v konformaciji proteinov, ki kažejo na fizikalno nestabilnost. S proteolizo devteriranih proteinov pa lahko te spremembe ovrednotimo tudi na lokalnem nivoju (23, 24). Za proučevanje interakcij med proteini in pomožnimi snovmi uporabljamo fotolitsko označevanje v trdnem stanju in NMR v trdnem stanju (23). Slednjo poleg ozkokotnega nevronskega sisanja uporabljamo tudi za vrednotenje strukturnih in dinamičnih sprememb (24).

2.2.3 Vrednotenje agregacije

Najpogosteje, najkompleksnejša in najbolj raznolika oblika fizikalne nestabilnosti proteinov je nastanek agregatov (4, 12). Agregati so skupki nativnih ali denaturiranih proteinskih molekul (monomerov), ki so med sabo povezane s kovalentnimi ali šibkimi nespecifičnimi nekovalentnimi vezmi (4, 5). Pri tem nastanejo topni dimeri ali oligomeri ali pa večji skupki nevidnih ali celo vidnih delcev (21, 25). Agregati se razlikujejo po velikosti, morfologiji, proteinski strukturi, vrsti medmolekulskih vezi, topnosti, mehanizmu nastanka in reverzibilnosti, nastanejo pa lahko tako v tekočih kot tudi trdnih formulacijah (4–6, 8, 25). Trenutno sprejeta meja za prisotnost topnih agregatov v proteinskih formulacijah je 5–10 % (5).

Največji iziv pri analizi agregatov predstavlja neznana narava nastalih agregatov in ogromen razpon njihovih velikosti, ki sega od nekaj nm do nekaj mm (25, 26). Z nobeno tehniko ne moremo določiti vseh želenih parametrov v celotnem območju velikosti, zato moramo za celovito ovrednotenje agregacije uporabiti kombinacijo komplementarnih in ortogonalnih tehnik (12, 25, 26).

Na voljo je velik nabor analiznih tehnik, ki se razlikujejo po fizikalnem principu meritve, posledično pa nam omogočajo ovrednotenje različnih vidikov agregacije (preglednica I) (8, 25, 26). Nekatere tehnike so farmakopejske (npr. vizualni pregled), druge, predvsem robustne kvantitativne tehnike,



so primerne za uporabo v kontroli kakovosti (npr. SEC), tretje so namenjene podpori pri razvoju izdelka ali pa potrditi ustreznosti metod za kontrolo kakovosti (npr. dinamično sisanje svetlobe), nekatere tehnike, kot so samointerakcijska in navzkrižnointerakcijska kromatografija ter izotermična kalorimetrija, pa uporabljamo za napovedovanje agregacije (4, 21, 25). Analizne tehnike za vrednotenje aggregatov temeljijo na osnovi določanja velikosti, zato je večina primerna tudi za vrednotenje fragmentacije proteinov (8).

2.2.4 Vrednotenje adsorpcije proteinov

Proteini so površinsko aktivne molekule, ki se zlahka adsorbirajo na hidrofobne površine in medfaze. Adsorpcija vodi v zmanjšanje koncentracije proteina, lahko pa vpliva tudi na stabilnost, povzroči strukturne spremembe ali izzove agregacijo proteina (4, 5, 28). Proučevanje adsorpcije proteinov je zahtevno zaradi povezanosti proteina s površino in majhne količine adsorbiranega proteina. Izbera analizne tehnike je odvisna od površine, količine adsorbiranega proteina, kompleksnosti vzorca in želenih informacij (kinetika adsorpcije, konformacija, orientacija in količina adsorbiranega proteina).

S posameznimi tehnikami ne moremo opisati celotnega procesa adsorpcije, zato tudi v tem primeru uporabljamo kombinacije najrazličnejših tehnik, kot so radiooznačevalne, imunokemijske (npr. ELISA), gravimetrične (npr. kvarčna mikrotehntica z meritvami disipacije), optične (npr. površinska plazmonska resonanca (SPR), elipsometrija), spektroskopske (npr. FTIR, CD, ramanska in fluorescenčna spektroskopija) in mikroskopske (npr. mikroskopija na atomsko silo) tehnike ter MS in metoda izpraznitve (28–30).

2.3 VREDNOTENJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Vzporedno s fizikalno-kemijskim vrednotenjem je treba ovrednotiti tudi biološko aktivnost proteina (4, 9, 22). Biološke teste uporabljamo le kot komplementarne teste, saj ohranjena biološka aktivnost ne pomeni, da je struktura proteina nespremenjena in torej niso zadosten dokaz za stabilnost proteina (4). Uporabni pa so za oceno pomembnosti ugotovitev iz študij stabilnosti z vidika kliničnih učinkov (9).

Biološke teste delimo na teste *in vivo* in teste *in vitro*. Pri testih *in vivo* učinkovino apliciramo živali in spremljamo njen odziv (31, 32). Pomanjkljivosti testov *in vivo* so visoki

stroški, slabi specifičnost in občutljivost, visoka variabilnost rezultatov med živalmi, časovna potratnost ter etični vidiki, prednost pa boljša klinična relevantnost rezultatov, poleg tega pa lahko opazimo tudi morebitne neželene učinke (32).

S testi *in vitro* spremljamo in merimo odziv specifičnega receptorja ali mikrobiološke ali tkivne celične linije po dodatku proteinske učinkovine (31). Prednosti testov *in vitro* pred testi *in vivo* so manjša variabilnost ter cenejša in hitrejša izvedba. Po drugi strani pa so testi *in vitro* le nadomestni kazalec biološke aktivnosti in ne odražajo dejanskih razmer v okolju *in vivo*, predvsem kadar pri njihovi izvedbi uporabimo spremenjene celice, poleg tega pa so lahko podvrženi številnim interferencam (32).

Biološke teste *in vitro* delimo na celične teste in na teste vezave. Slednji temeljijo na ELISA ali SPR in jih pogosto uporabljamo pri razvoju bioloških zdravil (8). S številnimi in raznolikimi celičnimi testi spremljamo vpliv učinkovine na proliferacijo, diferenciacijo in adhezijo celic, citotoksičnost, izražanje genov, sintezo DNA, sproščanje citokinov, aktivacijo kinaznih receptorjev, izražanje in sintezo različnih proteinov, ki jih sekundarno določamo z imunokemijskimi testi, ter vrednotimo genotoksične učinke učinkovine (8, 31, 32). Z uporabo pristopa reporterskih genov se je razvoj bioloških testov bistveno poenostavil (8).

3 SKLEP

Stabilnost proteina je temeljna lastnost, ki določa, pod katерimi pogoji je protein pravilno zvit in zato aktivен. Zaradi prepletanja različnih dejavnikov in velike raznolikosti možnih sprememb je opredelitev strategij za vrednotenje stabilnosti proteinov ključnega pomena za uspešen razvoj zdravila in predstavlja velik izviv za strokovnjake s področja analitike. Poleg tega moramo analizne pristope zaradi raznolikosti teh učinkovin individualno prilagoditi posameznim proteinom. Izbiramo lahko med številnimi tehnikami, kot so separacijske, spektroskopske, imunokemijske in mikroskopske tehnike, biološki testi, metode termične analize in druge. Nepogrešljivo orodje za analitiko proteinov in vrednotenje njihove stabilnosti pa je v zadnjih desetletjih postala MS, saj zaradi različnih izvedb in načinov delovanja masnih spektrometrov ter možnosti sklopitve z drugimi tehnikami omogoča proučevanje najrazličnejših sprememb, ki so posledica tako kemijske kot tudi fizikalne nestabilnosti. Zaradi

Preglednica 1: Pregled analiznih tehnik za vrednotenje agregacije proteinov (4, 5, 8, 12, 25–27).

Table 1: Overview of analytical techniques used for the evaluation of protein aggregation (4, 5, 8, 12, 25–27).

Tehnika	Opazovana lastnost	Velikostni razred
Vizualni pregled	ocenitev bistrosti, opalescence, motnosti	> 50 µm – mm
Optična mikroskopija	velikost in morfologija delcev, štetje delcev	> 1 µm – mm
Metoda zatemnitve svetlobe (<i>Light obscuration</i>)	koncentracija in velikost delcev	1–150 µm ⁽⁴⁾ 2–100 µm ⁽²⁵⁾
Pretočna mikroskopija (MFI)	koncentracija, velikost in morfologija delcev (oblika, transparentnost, kompaktnost)	1–100 µm ⁽¹²⁾ 1–400 µm ⁽²⁵⁾ > 1 µm ⁽⁴⁾
Fluorescenčna mikroskopija	velikost in oblika (delci, amiloidni proteini)	> 1 µm–mm
Coulterjev števec (EZS)	koncentracija in velikost delcev	0,4–1200 µm
Laserska difrakcija*	koncentracija in velikost delcev	20 nm – 2 mm
Dinamično sisanje svetlobe (DLS)	hidrodinamska velikost, homogenost vzorca	0,3 nm – 10 µm ⁽⁴⁾ 1 nm – 5 µm ⁽²⁵⁾ 10 nm – 5 µm ⁽⁵⁾
Metoda sledenja nanodelcem (NTA)	hidrodinamska velikost, koncentracija delcev (semikvantitativno)	20 nm – 1 µm ⁽²⁵⁾ 30 nm – 0,8 µm ⁽⁸⁾ 30 nm – 1 µm ⁽⁴⁾ 40 nm – 1 µm ⁽¹²⁾
Resonančno merjenje mase (RMM)	koncentracija in velikost delcev, gostota delca	50 nm – 5 µm ⁽⁴⁾ 200 nm – 2 µm ⁽⁸⁾ 300 nm – 5 µm ⁽¹²⁾
Pretočna citometrija	štetje delcev, relativna velikost, intenziteta fluorescence, notranja kompleksnost (struktura) delca	0,2–150 µm ⁽⁸⁾ > 500 nm ⁽¹²⁾
Večkotno sisanje laserske svetlobe (MALLS)	molekulsa masa, velikost (polmer vrtenja)	kDa – MDa
Nefelometrija, turbidimetrija	optična gostota ali intenziteta sisanja svetlobe je odvisna od razmerja med velikostjo delcev in koncentracijo	Ni relevantno
Izklučitvena kromatografija (SEC)	molekulsa masa, oblika, hidrodinamska velikost	1–50 nm
Nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza	elektroforetska mobilnost	kDa – MDa
Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE)	navidezna molekulsa masa, prisotnost disulfidnih vezi, čistost	kDa – MDa
Kapilarna SDS elektroforeza (CE-SDS)	navidezna molekulsa masa, prisotnost disulfidnih vezi, čistost	kDa – MDa
Pretočni sistem z asimetričnim prečnim pretokom (AF4)	hidrodinamska velikost	1 nm – nekaj µm
Elektronska mikroskopija (TEM, SEM, CryoEM)	velikost in morfologija delcev (oblika, površinske lastnosti, sestava, atomska struktura)	nm – mm
Mikroskopija na atomsko silo (AFM)	velikost in morfologija delcev	nm območje
Ozkokotno rentgensko / nevronsko sisanje (SAXS / SANS)	velikost in oblika molekul / agregatov v raztopini	nm območje
Nativna masna spektrometrija	razmerje med maso in nabojem	atomska ločljivost do območja MDa
Spektrometrija ionske mobilnosti (IMS-MS)	masa, štetje delcev	3–65 nm
Analitsko ultracentrifugiranje (AUC)	molekulsa masa, velikost, oblika	1–100 nm
Taylorjeva disperzijska analiza (TDA)	hidrodinamska velikost, ocenjevanje polidisperznosti vzorca	0,1 nm – nekaj 100 nm
Vodna ¹ H jedrska magnetna resonanca (wNMR)	kvantifikacija topnih in netopnih agregatov ter nevidnih delcev	nekaj nm – nekaj µm

* Novejša različica te tehnike je kvantitativna laserska difrakcija, s katero lahko ocenjujemo koncentracijsko porazdelitev proteininskih delcev premerom med 0,2 in 10 µm (12).

nenehnega razvoja pričakujemo, da bo MS v prihodnosti še bolj uveljavila vlogo nenadomestljive tehnike za vrednotenje stabilnosti proteinov.

4 LITERATURA

1. Temova Rakuša Ž, Roškar R. Stabilnost terapevtskih proteinov. *Farm Vestn.* 2018;69:236–42.
2. Banga AK. *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*. 3rd ed. Taylor & Francis Group; 2015.
3. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharm Res.* 2010;27(4):544–75.
4. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):169–90.
5. Butreddy A, Janga KY, Ajjarapu S, Sarabu S, Dudhipala N. Instability of therapeutic proteins — An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021;167:309–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.188>
6. Staub A, Guillarme D, Schappeler J, Veuthey JL, Rudaz S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(4):810–22.
7. Bratkovič Tomaž. Imunogenost bioloških zdravil. *Farm Vestn.* 2017;68:345–54.
8. Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology*. 5th editio. Springer Nature Switzerland AG; 2019.
9. Parr MK, Montacir O, Montacir H. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2016;130:366–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpbba.2016.05.028>
10. ICH. Q5C - Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological / biological products [Internet]. [cited 2021 Feb 22]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnological/biological-products_en.pdf
11. ICH International Conference on Harmonization. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B [Internet]. 1999 [cited 2021 Oct 26]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotec hnological/biological-products-step-5_en.pdf
12. Patke S. Current Status of Analytical Techniques for Characterization of Protein Stability [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 29]. p. 1–7. Available from: <https://biopharma-asia.com/featured-article/current-status-of-analytical-technique s-for-characterization-of-protein-stability/>
13. Reubaet JLE, Beijnen JH, Bult A, Van Maanen RJ, Marchal JAD, Underberg WJM. Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: Physical instability. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17(6–7):979–84.
14. Fekete S, Guillarme D, Sandra P, Sandra K. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal Chem.* 2016;88(1):480–507.
15. Graf T, Heinrich K, Grunert I, Wegele H, Haberger M, Bulau P, et al. Recent advances in LC–MS based characterization of protein-based bio-therapeutics – mastering analytical challenges posed by the increasing format complexity. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2020;186:113251. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113251>
16. Rathore D, Faustino A, Schiel J, Pang E, Boyne M, Rogstad S. The role of mass spectrometry in the characterization of biologic protein products. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2018;15(5):431–49. Available from: <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1469982>
17. Hsiao K, Alves J, Patel R, Adams M, Nashine V, Goueli S. A High-Throughput Bioluminescent Assay to Monitor the Deamidation of Asparagine and Isomerization of Aspartate Residues in Therapeutic Proteins and Antibodies. *J Pharm Sci* [Internet]. 2017;106(6):1528–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.022>
18. Osel N, Parfant TP, Kristl A, Roškar R. Stability-indicating analytical approach for stability evaluation of lactoferrin. *Pharmaceutics.* 2021;13(7).
19. Hamborg L, Horsted EW, Johansson KE, Willemoës M, Lindorff-Larsen K, Teilmum K. Global analysis of protein stability by temperature and chemical denaturation. *Anal Biochem.* 2020;605(July).
20. Jeong SH. Analytical methods and formulation factors to enhance protein stability in solution. *Arch Pharm Res.* 2012;35(11):1871–86.
21. Federici M, Lubiniecki A, Manikwar P, Volkin DB. Analytical lessons learned from selected therapeutic protein drug comparability studies. *Biologicals.* 2013;41(3):131–47.
22. Ma H, Ó'Fágáin C, O'Kennedy R. Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement. *Biochimie.* 2020;177:213–25.
23. Chen Y, Mutukuri TT, Wilson NE, Zhou Q (Tony). Pharmaceutical protein solids: Drying technology, solid-state characterization and stability. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2021;172:211–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.016>
24. Bolje A, Gobec S. Analytical techniques for structural characterization of proteins in solid pharmaceutical forms: An overview. *Pharmaceutics.* 2021;13(4).
25. Den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S, et al. Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res.* 2011;28(4):920–33.
26. Khodabandehloo A, Chen DDY. Particle sizing methods for the detection of protein aggregates in biopharmaceuticals. *Bioanalysis.* 2017;9(3):313–26.
27. Taraban MB, Depaz RA, Lobo B, Yu YB. Use of Water Proton NMR to Characterize Protein Aggregates: Gauging the Response and Sensitivity. 2019;
28. Martins MCL, Sousa SR, Antunes JC, Barbosa MA. Protein Adsorption Characterization. In: Navarro M, Planell JA, editors. *Nanotechnology in Regenerative Medicine Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press; 2012. p. 141–61.
29. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(3):233–44.

30. Hlady V, Buijs J, Jennissen HP. Methods for studying protein adsorption. *Methods Enzymol.* 1999;309:402–29.
31. Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology*. 3rd editio. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008.
32. Tang L, Persky AM, Hochhaus G, Meibohm B. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *J Pharm Sci.* 2004;93(9):2184–204.

PREGLED RAZVOJA METOD ZA DOLOČANJE VITAMINA D V KRVI

DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE MEASUREMENT OF VITAMIN D IN BLOOD – REVIEW

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Katarina Mlekuš Kozamernik, dr. med.^{1,2}
izr. prof. dr. Tomaž Kocjan, dr. med.^{1,2}
prof. dr. Tea Lanišnik Rizner, dr. med.³

¹ UKC Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelki za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

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

³ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Laboratorij za proučevanje molekularnih osnov in bioznačevalcev hormonsko odvisnih bolezni, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: katarina.mlekuskozamernik@kclj.si

POVZETEK

Vitamin D je maščobotopen vitamin, ki ima številne pomembne vloge v telesu in omogoča zdravo delovanje več organskih sistemov. Zanimanje za vitamin je D poraslo v prvem desetletju 21. stoletja, ko se je pričelo raziskovanje njegove vloge v različnih bolezniških procesih. Takrat se je strmo povečalo povpraševanje po laboratorijskem določanju 25-hidroksivitamina D, ki ga uporabljamo za določanje zalog vitamina D v telesu, zato je morala večina kliničnih laboratorijskih opustiti dolgotrajne ročne metode in uvesti avtomatizirane. Zaradi različnih metodologij se je povečala medlaboratorijska variabilnost meritev, kar je tudi na raziskovalnem področju vodilo do nekonistentnih zaključkov raziskav in metaanaliz. V zadnjih letih se tako uveljavlja program standardizacije meritev vitamina D, katerega glavni cilj je zmanjšanje variabilnosti meritev in spodbujanje primerjav meritev posameznih laboratorijskih z referenčno metodo.

KLJUČNE BESEDE:

25-hidroksivitamin D, imunološki testi, masna spektrometrija, standardizacija, vitamin D

ABSTRACT

Vitamin D is a fat-soluble vitamin that plays an important role in the human body and enables the proper functioning of several organ systems. Interest in vitamin D grew especially in the first decade of the 21st century when its role in the pathogenesis of various diseases was first recognised. At that time, a demand for laboratory measurements of 25-hydroxyvitamin D that is used to assess the vitamin D body stores rose sharply, so most clinical laboratories had to abandon laborious manual methods and had to introduce various automated techniques. Due to different methodologies, the inter-laboratory variability of measurements increased, which led to inconsistent conclusions in studies and meta-analyses in this research field. The Vitamin D Standardization Program has been established in recent years. The main goal is to reduce the variability of measurements and to promote comparisons of individual laboratories' measurements to the reference method.

KEY WORDS:

25-hydroxyvitamin D, immunological assay, mass spectrometry, standardization, vitamin D



1 UVOD

Vitamin D je ime za skupino sekosteroidov, med katerimi sta najpomembnejša holekalciferol (vitamin D₃) in ergokalciferol (vitamin D₂). Holekalciferol (vitamin D₃) lahko tvorimo endogeno ali vnesemo s hrano živalskega izvora (npr. z ribami, kot so sardine in losos, jajčnim rumenjakom, maslom, rdečim mesom ...), z obogatenimi živili in farmacevtskimi pripravki, vključno s prehranskimi dopolnilmi. Ergokalciferol (vitamin D₂) se sintetizira iz ergosterola, ki nastaja v glivah. V telo ga vnašamo izključno s hrano (npr. z gobami) oz. prehranskimi dopolnilmi. Medtem ko v Evropi za dodajanje vitamina D uporabljamo predvsem holekalciferol, so v ZDA v preteklosti uporabljali izključno ergokalciferol (1).

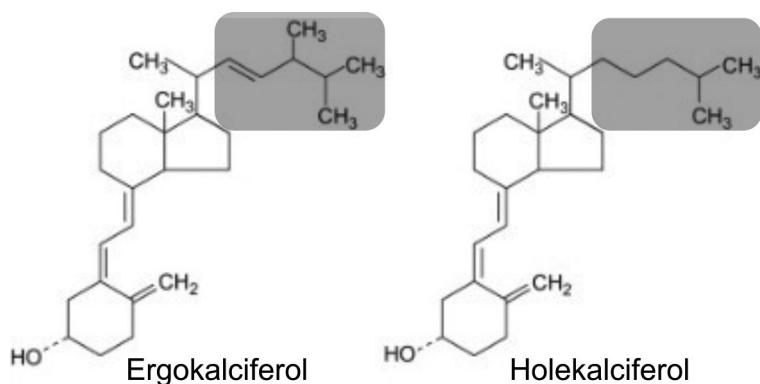
Strukturno se ergokalciferol in holekalciferol razlikujeta po dvojni vezi na mestih C22–C23 in po metilaciji na mestu C24 (slika 1). Zaradi drugačne stranske verige se ergokalciferol šibkeje veže na vezavno beljakovino za vitamin D (DBP, vitamin D binding protein) in hitreje metabolizira, zato njegova serumska koncentracija upada hitreje kot pri holekalciferolu (2). Večina raziskav je pokazala, da je ergokalciferol nekoliko manj učinkovit za nadomeščanje vitamina D in povišanje ravni 25-hidroksivitamina D (25(OH)D) kot holekalciferol (3), obstajajo pa tudi temu nasprotujoče študije (1).

Pri ljudeh vitamin D nastaja v koži pod vplivom sončne svetlobe. 7-dehidroholesterol se z ultravijoličnimi B (UV-B) žarki v koži pretvarja v provitamin D₃, ki se nato preko termične izomerizacije pretvori v vitamin D₃ (holekalciferol). Ta se v krvi prenaša vezan na DBP in albumin. Vitamina D₂

in D₃, ki ju v organizem vnesemo s hrano, se do jeter preneseta z lipoproteini (večinoma hilomikroni) (4). V jetrih poteka hidroksilacija, pri kateri nastajata 25-hidroksivitamin D₃ (25(OH)D₃ ali kalcidiol) in 25-hidroksivitamin D₂ (25(OH)D₂). Razmerje med 25(OH)D₃ in 25(OH)D₂ je pri osebah, ki ne prejemajo ergokalciferola približno 19 : 1 (5). V ledvicah (nekoliko tudi v drugih tkivih) s pomočjo encima 1α-hidroksilaze nastajata biološko aktivni metaboliti 1α,25-dihidroksivitamin D₃ (1α,25-(OH)₂D₃ ali kalcitriol) in 1α,25-dihidroksivitamin D₂. V shemi (slika 2) prikazujemo stopnje v sintezi 1α,25-dihidroksivitamina D₃ oz. kalcitriola. 1α-hidroksilacija je natančno uravnovan korak v sintezi kalcitriola. Izražanje gena za 1α-hidroksilazo stimulira paratiroidni hormon (PTH), zavirata pa ga fibroblastni rastni faktor 23 (FGF23) in sam kalcitriol (6, 7).

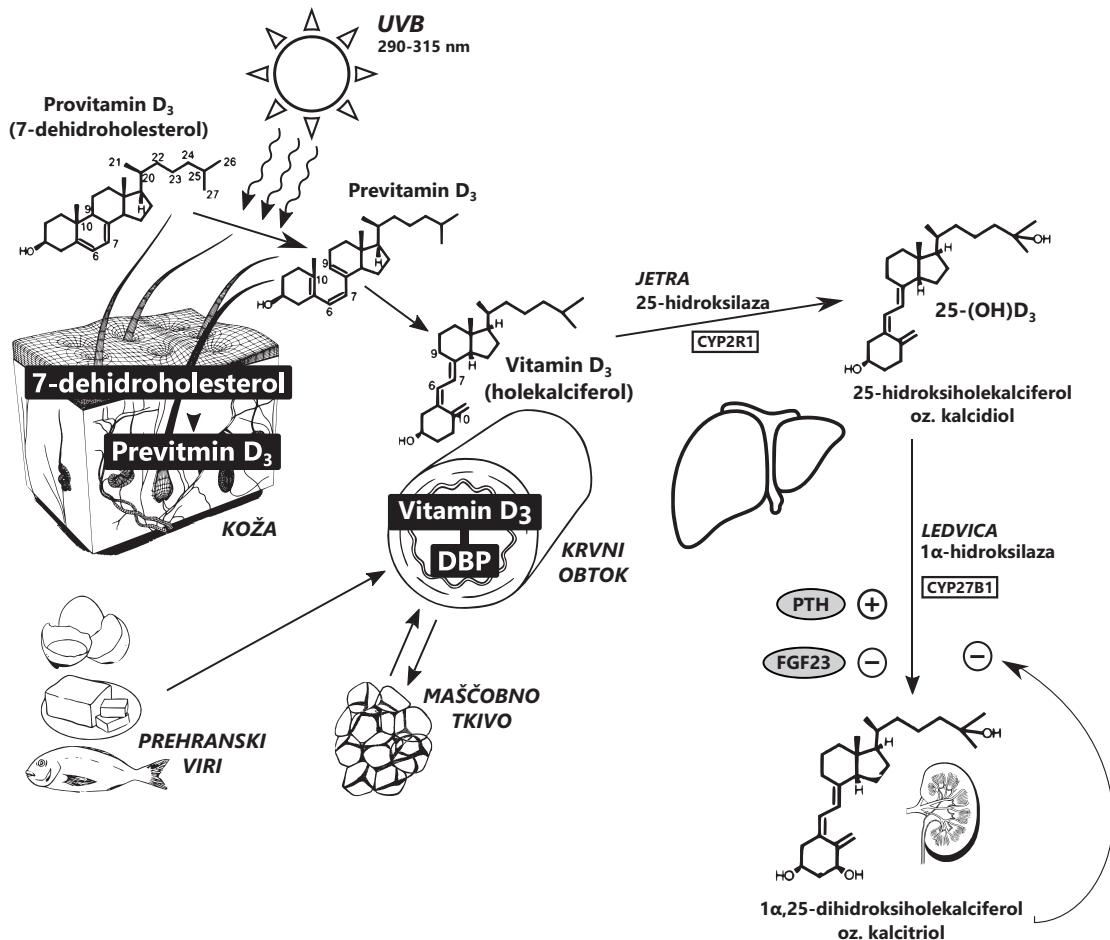
2 DOLOČANJE RAVNI VITAMINA D V TELESU

Vitamin D ima pomembno vlogo pri homeostazi kalcija v telesu. Uporabljamo ga za preprečevanje rahitisa in osteomalacije. V zadnjem desetletju so objavili številne raziskave, ki proučujejo vlogo vitamina D v različnih patofizioloških procesih, pri čemer so rezultati nekonsistentni. Zaradi možnih ugodnih učinkov vitamina D na srčno-žilne, maligne in avtoimmune bolezni in celo na smrtnost uporaba prehranskih dopolnil, ki vsebujejo vitamin D, narašča (9). S tem narašča tudi pomen meritev vitamina D, saj želimo pri posameznikih zagotoviti zadostne ravni vitamina D in preprečiti na eni strani pomanjkanje vitamina D in na drugi strani toksične učinke.



Slika 1: Strukturi ergokalciferola in holekalciferola.

Figure 1: Structures of ergocalciferol and cholecalciferol.



DBP – vezavna beljakovina za vitamin D, PTH – paratiroidni hormon, FGF23 – fibroblastni rastni faktor 23, CYP2R1 – gen za 25-hidroksilazo, CYP27B1 – gen za 1α-hidroksilazo

Slika 2: Nastanek in aktivacija vitamina D v človeškem organizmu; povejeno po (6, 8).

Figure 2: Synthesis and activation of vitamin D in the human body; adopted from (6, 8).

Za določanje zaloge vitamina D uporabljamo merjenje celokupnega 25(OH)D (vključuje 25(OH)D₂ in 25(OH)D₃) v serumu. 25(OH)D ima dolg razpolovni čas v serumu (približno tri tedne), pri čemer se praktično ves v koži sintetiziran ali zaužit vitamin D₃ pretvori v 25(OH)D₃, dokler količina sintetiziranega oz. zaužitega vitamina D₃ ne preseže 2000 IE (50 µg) na dan (1 µg = 40 IE = 2,6 nmol vitamin D₃). 25(OH)D zato najboljše odraža tvorbo oz. vnos vitamina D₃ v telo (11).

Serumska raven 25(OH)D nam pove tudi, koliko substrata je na razpolago za ledvično in izvenledvično 1α-hidroksilazo. V nasprotju s 25-hidroksilacijo, je 1α-hidroksilacija zelo natančno uravnavan proces. Kadar je raven 25(OH)D prenizka, poraste raven paratiroidnega hormona, ki povlači

izražanje gena za ledvično 1α-hidroksilazo (CYP27B1) (7). Tako je lahko ob pomanjkanju vitamina D raven 1α,25-(OH)₂D₃ nizka, normalna ali celo visoka (12). Merjenje 1α,25-(OH)₂D₃ je zato klinično uporabno le pri hudi ledvični bolezni, pri granulomatoznih boleznih in pri nekaterih redkih boleznih, kot je na vitamin D odporen rahiatis (13). Drugi hidroksilirani metaboliti vitamina D, kot so npr. 24,25-(OH)₂D₃, 25,26-(OH)₂D₃ in 23,25-(OH)₂D₃, so v krvi prisotni običajno v zelo nizkih koncentracijah. Kadar so njihove koncentracije višje, kot npr. koncentracija 25,26-(OH)₂D₃ pri dializnih bolnikih in pri bolnikih z idiosfatsko infantilno hiperkalcemijo, lahko pride do interference pri določanju ravni 25(OH)D z imunskimi metodami (14).

Z vidika metodologij določanja vitamina D je pomemben 3-epimer $25(\text{OH})\text{D}_3$ ($3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$). Ta molekula se od $25(\text{OH})\text{D}_3$ razlikuje le v konfiguraciji hidroksilne skupine na atomu C3. Zaradi enake molekulske mase ga tudi metode, ki temeljijo na masni spektrometriji, lahko lažno zaznajo kot $25(\text{OH})\text{D}_3$. V visokih koncentracijah je $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$ prisoten pri dojenčkih, v nizkih koncentracijah pa so ga zaznali tudi pri nekaterih odraslih (15, 16).

Večina celic v telesu je izpostavljenih prostemu $25(\text{OH})\text{D}$ (razen celic v ledvicah in obščitnicah, v katere lahko vstopa vezan na DBP preko mehanizma megalin/kubilin), ki pri zdravih zelo dobro korelira s celokupnim $25(\text{OH})\text{D}$. Pomembne razlike se pojavljajo pri ljudeh z bistveno spremenjeno ravnjo DBP (17). V bodoče bo potrebno meritve serumskega DBP in neposredne meritve prostega $25(\text{OH})\text{D}$ standardizirati, da jih bo mogoče uporabljati v klinični praksi (18).

3 ZGODOVINSKI PREGLED RAZVOJA METOD DOLOČANJA VITAMIINA D V KRVI

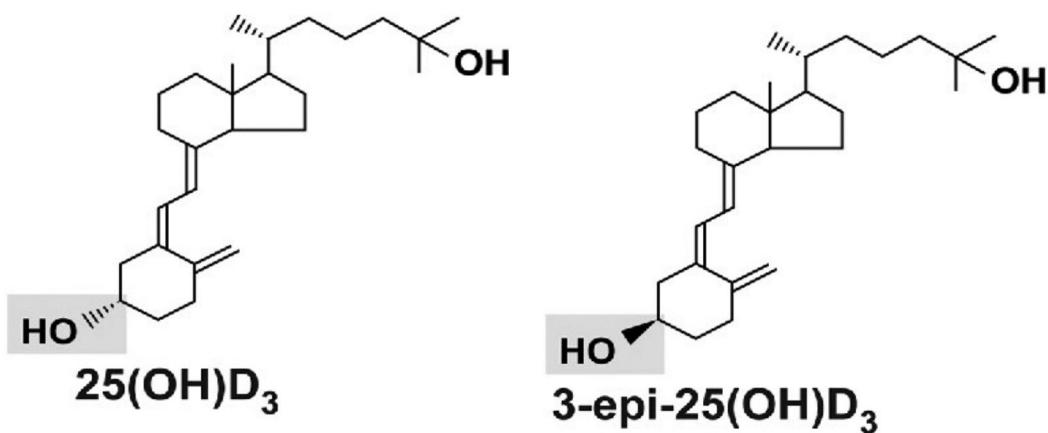
Že leta 1932 so Askew in sod. izolirali vitamin D_2 , vendar so šele v času med 1965 in 1995 bolj podrobno raziskali sintezo vitamina D (19). Povsem novo obdobje v raziskovanju se je začelo po letu 1967, ko so razjasnili metabolne poti vitamina D_3 in njegovo pretvorbo v hormonsko aktivno obliko (20). Od takrat je bilo na temo vitamina D (npr. o pogostosti pomanjkanja, o dodajanju vitamina D in o vplivu pomanjkanja na bolezenske procese) objavljenih okrog

60.000 člankov, pri čemer so v raziskavah uporabljali zelo različne načine merjenja ravni $25(\text{OH})\text{D}$ (21).

Haddad in sod. so prvi opisali ročno metodo s kompetitivno vezavo na beljakovino (CBPA, *competitive binding-protein assays*) za določanje $25(\text{OH})\text{D}$ (22). Leta 1977 so razvili prvo metodo za določanje plazemske koncentracije vitamina D s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) (23). Leta 1981 so Parviaainen in sod. razvili metodo, ki vključuje ločevanje metabolitov vitamina D s HPLC in določevanje njihove koncentracije s CBPA (24). Ta metoda je bila dolgotrajna in zato ni prešla v rutinsko uporabo. Zaradi razvoja polikloninskih protiteles proti $25(\text{OH})\text{D}$, ki je vodil do razvoja radioimmunskih metod (RIA, *radioimmunoassay*) in posodobitve aparatur za HPLC so ročne metode CBPA do sredine 80-ih let postale zastarele (25).

V začetku 80-ih so se tako pričele razvijati metode RIA. Leta 1984 so Bouillon in sod. prvi opisali poenostavljeni RIA, ki ni potrebovala predhodnega ločevanja s kromatografijo (26). Osnovana je bila na zajčjih polikloninskih protitelesih. Uporabnost metode je bila omejena, saj z njo ni bilo možno razlikovati med $25(\text{OH})\text{D}_2$ in $25(\text{OH})\text{D}_3$ (takrat so v ZDA za nadomeščanje vitamina D večinoma uporabljali ergokalciferol).

Konec 80-ih let je bilo tudi v slovenskem prostoru opravljeno obsežnejše delo na področju analitike vitamina D (27, 28). Leta 1993 so Hollis in sodelavci opisali RIA za določitev tako $25(\text{OH})\text{D}_3$ kot tudi $25(\text{OH})\text{D}_2$ na osnovi kozjih polikloninskih protitelesih in ^{125}I (29). Na podlagi te metode so razvili prvo komercialno metodo RIA (tržil jo je DiaSorin) za določitev tako $25(\text{OH})\text{D}_2$ kot tudi $25(\text{OH})\text{D}_3$ (25).



Slika 3: 3-epimer 25 hidroksivitamina D_3 ($3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$).
Figure 3: 3-epimer 25 hydroxyvitamin D_3 ($3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$).



V prvem desetletju 21. stoletja se je pričelo raziskovanje vloge vitamina D v različnih bolezenskih procesih. Zaradi velikega povpraševanja po določanju vitamina D, je morala večina kliničnih laboratoriјev opustiti ročne metode CBPA in RIA, ki so jih uporabljali v 80-ih in zgodnjih 90-ih, in preiti na avtomatizirane CBPA, klasične encimsko-imunske metode (ELISA, *enzyme-linked immunoassays*) ali kemiluminiscenčne imunološke metode (CLIA, *chemiluminescent immunoassays*) (25).

Te avtomatizirane metode so relativno enostavne in hitre, vendar imajo pomembne pomanjkljivosti. Glavno težavo predstavlja zelo lipofilna narava 25(OH)D in njegova močna vezava na transportne beljakovine, kot so DBP in albumin, ter na lipoproteine. Pri ročnih CBPA in RIA za sproščanje 25(OH)D z vezavnih beljakovin uporabljamo organska topila, ki pa z imunološkimi metodami in metodami avtomatizirane CBPA niso kompatibilna (30). Za ekstrakcijo pri različnih avtomatiziranih tehnikah uporabljamo različne pristope, kar vpliva na končne rezultate (30). Razlike med rezultati ob uporabi avtomatiziranih metod se še povečajo pri posameznikih, ki imajo zaradi svojega fiziološkega stanja ali bolezni bistveno spremenjeno raven DBP. Taki skupini sta npr. nosečnice in bolniki s kronično ledvično boleznijo (30). Prav tako se ravni DBP razlikujejo pri različnih rasnih skupinah (31). Poleg tega tudi pri avtomatiziranih tehnikah, kot pri vseh imunoloških testih, heterofilna protitelesa povzročajo napake in predstavljajo interferenco (32). Avtomatizirane metode morajo biti tudi zelo občutljive, saj je serumski koncentracija 25(OH)D zelo nizka; njihova meja kvantifikacije mora biti vsaj 10 ng/ml oz. 25 nmol/L (33).

Leta 1994 so v Mednarodnem programu za zunanjocenocakovosti določanja vitamina D (DEQAS, *International vitamin D External Quality Assessment Scheme*) ugotovili, da se rezultati ravni 25(OH)D med različnimi laboratorijskimi lahko razlikujejo celo do 32 % (25). Če torej uporabljamo tradicionalne meje za opredeljevanje zaloge vitamina D (30, 50 in 75 nmol/L) kot pomanjkljivo, zadostno in optimalno, lahko z nekaterimi metodami bolnikovo zalogo ocenimo narobe in se tudi napačno odločimo glede nadomeščanja ($1 \text{ nmol/L} = 1 \text{ ng/mL} \times 2,5$; v literaturi pogosto zasledimo tudi sledeče meje 20 ng/mL, kar je ekvivalent 50 nmol/L, in 30 ng/mL, kar je ekvivalent 75 nmol/L) (25). Nadgradnja na področju določanja vitamina D so metode tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS, *liquid chromatography with tandem-mass spectrometry*). Prednosti te metode so, da omogoča merjenje vseh metabolitov, je relativno hitra ter ima visoki občutljivost in specifičnost. Slabosti pa so predvsem visoka cena inštrumentov in njihova kompleksnost,

ki zahteva visoko usposobljeno osebje za upravljanje in vzdrževanje (25). Leta 1991 so Watson in sod. opisali metodo LC-MS/MS za določanje vitamina D₃ in vitamina D₂ ter njunih mono- in dihidroksiliranih metabolitov (34). Uporaba LC-MS/MS v klinične namene od takrat stalno narašča. V poročilu DEQAS iz leta 2013 so ugotovili, da je koeficient variacije med vsemi laboratorijskimi ($n = 437$) med 11 do 25 %, medtem ko je koeficient variacije med laboratorijskimi, ki uporabljajo LC-MS/MS ($n = 147$), le med 9,7 in 11,3 % (35). Takrat je LC-MS/MS uporabljalo 25 % sodelujočih laboratorijskikh (35).

Trenutno so v kliničnih laboratorijskih v uporabi različne avtomatizirane metode (npr. Abbott Architect, DiaSorin Liaison, IDS ISYS, Roche Elecsys in Cobas, Siemens Advia Centaur) in tudi metode LC-MS/MS (npr. ClinMass) (36, 37). Ob tem avtorji opozarjajo, da se kakovost avtomatiziranih metod lahko bistveno razlikuje, pri čemer ne dosegajo vse ciljnega koeficiente variacije, ki je do 10 % (38). Večina proizvajalcev priporoča, da vsak laboratorij za posamezno metodo sam določi referenčne vrednosti, kar pa je v praksi pogosto težko izvedljivo (39). Za Slovenijo je bila postavitev metode in pridobitev referenčnih vrednosti opravljena v dveh diplomskih delih (40, 41).

V bodoče pričakujemo večjo standardizacijo in analitično zmogljivost avtomatiziranih metod in pogostejo uporabo LC-MS/MS, ob čemer pričakujemo boljšo kakovost in primerljivost rezultatov.

4 STANDARDIZACIJA DOLOČANJA VITAMINA D

Zaradi vseh težav pri določanju 25(OH)D in za zmanjšanje posledic, ki jih te težave povzročajo, so leta 2010 uvedli program standardizacije meritev vitamina D (VDSP, *The Vitamin D Standardization Program*), v katerega so vključeni: Ameriški Nacionalni inštitut za zdravje (oddelek za prehranska dopolnila), Center za preprečevanje in obvladovanje bolezni in Center za okolje in zdravje iz ZDA, Nacionalni inštitut za standardizacijo in tehnologijo iz ZDA in Referenčni laboratorij za vitamin D univerze v Gentu (21, 42). Glavni cilj tega programa je zmanjšanje medlaboratorijske variabilnosti meritev koncentracije 25(OH)D in spodbujanje primerjav meritev posameznih laboratorijskih z referenčno metodo.

Po uvedbi standardizacije so v Ameriki opravili retrospektivne analize rezultatov meritev 25(OH)D. Pred retrospektivno

standardizacijo so npr. podatki raziskav NHANES III (1988–1994) in NHANES 2005–2006 kazali, da je v tem obdobju prišlo do bistvenega upada ravni 25(OH)D v populaciji. Po standardizaciji rezultatov pa so dokazali, da se ravni 25(OH)D v teh petnajstih letih niso bistveno spremenile (43).

5 SKLEP

Vitamin D je dostopen širokemu krogu ljudi v farmacevtskih pripravkih. Zaradi učinkov na kosti in potencialno ugodnih drugih učinkov vitamina D poraba teh pripravkov v zadnjem času narašča. S tem se veča tudi število določitev ravni 25(OH)D in tudi število različnih laboratorijskih metod. Ob tem raziskovalci opozarjajo, da vse metode niso enako kakovostne in ne omogočajo vedno zanesljivega ločevanja med pomanjkljivo, zadostno, optimalno in toksično ravnjo vitamina D v telesu. Zato je pomembno dobro poznavanje posamezne metode in upoštevanje njenih omejitev pri interpretaciji rezultatov. Ob heterogenosti laboratorijskih metod, ki se uporabljajo v raziskovalnem delu, je omejena tudi primerljivost rezultatov posameznih raziskav.

V Mednarodni shemi za zunanjo oceno kakovosti določitev vitamina D (DEQAS) in v Programu za standardizacijo meritvevitamina D (VDSP) spodbujajo uporabo kakovostnih laboratorijskih metod, kar je ključno tako v kliničnem delu kot tudi z vidika raziskovalnega dela, saj omogoča boljšo primerljivost med različnimi raziskavami in zanesljivejše izsledke metaanaliz. Vedno več laboratorijev je vključenih v DEQAS, zato lahko v bodoče pričakujemo večjo primerljivost laboratorijskih metod in boljše podatke iz raziskav, ki proučujejo vpliv vitamina D na boleznske procese pri ljudeh.

6 LITERATURA

- Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et. al. Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):677–81.
- Gallagher JC, Bikle DD. Vitamin D: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2017;46(4):xvii–xviii.
- Trang HM, Cole DE, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. Evidence that vitamin D₃ increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D₂. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(4):854–8.
- Trifiletti RR. Vitamin D. V: Aminoff MJ, Daroff RB, uredniki. *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2021 Sep 4]. 719–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123851574001184>
- Clemens TL, Zhou XY, Myles M, Endres D, Lindsay R. Serum vitamin D₂ and vitamin D₃ metabolite concentrations and absorption of vitamin D₂ in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63(3):656–60.
- Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;25(4):531–41.
- Brenza HL, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381(1):143–52.
- Jäpel RB, Silvestro D, Smedsgaard J, Jensen PE, Jakobsen J. Quantification of vitamin D₃ and its hydroxylated metabolites in waxy leaf nightshade (*Solanum glaucophyllum* Desf.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chem.* 2013;138(2–3):1206–11.
- Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whittfield K, Wetterslev J, Simonetti RG, idr. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 4];(1). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD007470.pub3/full>
- Yu CL, Falk RT, Kimlin MG, Rajaraman P, Sigurdson AJ, Horst RL, idr. The impact of delayed blood centrifuging, choice of collection tube, and type of assay on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Cancer Causes Control.* 2010;21(4):643–8.
- Heaney RP, Armas LAG, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D₃: relation to circulating vitamin D₃ under various input conditions. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(6):1738–42.
- Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev.* 2008;13(1):6–20.
- Lips P. The relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements. *Endocrine Abstracts* [Internet]. 2009 [cited 2021 Avg 1];20. Available from: <https://www.endocrine-abstracts.org/ea/0020/ea0020me11>
- Carter GD, Jones JC, Shannon J, Williams EL, Jones G, Kaufmann M, idr. 25-Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;164:134–8.
- Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):163–8.
- Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SKG. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3055–61.
- Fraser WD, Tang JCY, Dutton JJ, Schoenmakers I. Vitamin D Measurement, the Debates Continue, New Analytes Have Emerged. Developments Have Variable Outcomes. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(1):3–13.
- Bikle D, Bouillon R, Thadhani R, Schoenmakers I. Vitamin D metabolites in captivity? Should we measure free or total



- 25(OH)D to assess vitamin D status? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:105–16.
19. Askew FA, Bourdillon RB, Bruce HM, Jenkins RGC, Webster TA, Dale HH. The distillation of vitamin D. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character.* 1930;107(748):76–90.
20. Norman AW, Henry HL. *Hormones.* Academic Press; 2014. p. 430.
21. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM, idr. Vitamin D measurement standardization: The way out of the chaos. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:117–21.
22. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971;83(6):992–5.
23. Eisman JA, Shepard RM, DeLuca HF. Determination of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1977;80(1):298–305.
24. Parviaainen MT, Savolainen KE, Korhonen PH, Alhava EM, Visakorpi JK. An improved method for routine determination of vitamin D and its hydroxylated metabolites in serum from children and adults. *Clin Chim Acta.* 1981;114(2–3):233–47.
25. Le Goff C, Cavalier E, Souberbielle JC, González-Antuña A, Delvin E. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. *Pract Lab Med.* 2015;21:1–14.
26. Bouillon R, Van Herck E, Jans I, Tan BK, Van Baelen H, De Moor P. Two direct (nonchromatographic) assays for 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem.* 1984;30(11):1731–6.
27. Osredkar J, Vrhovec I. A method for determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human serum by using high-performance liquid chromatography with gradient elution and radioimmunologic detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.* 1989;12(10):1897–907.
28. Osredkar J, Vrhovec I. Vitamin D in presnovki : fiziologija, patofiziologija in metode določanja = Vitamin D and its metabolists : physiology, pathophysiology and determination methods. *Farmacevtski vestnik.* 1989;40(1):5–26.
29. Hollis BW, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an ¹²⁵I-labeled tracer. *Clin Chem.* 1993;39(3):529–33.
30. Depreter B, Heijboer AC, Langlois MR. Accuracy of three automated 25-hydroxyvitamin D assays in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta.* 2013;415:255–60.
31. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, idr. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med.* 2013;369(21):1991–2000.
32. Cavalier E, Carliši A, Bekaert AC, Rousselle O, Chapelle JP. Human anti-animal interference in DiaSorin Liaison total 25(OH)-vitamin D assay: towards the end of a strange story? *Clin Chim Acta.* 2012;413(3–4):527–8.
33. Ofenloch-Haehnle B. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:50–3.
34. Watson D, Setchell KD, Ross R. Analysis of vitamin D and its metabolites using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 1991;5(4):153–60.
35. Carter GD, Berry J, Durazo-Arvizu R, Gunter E, Jones G, Jones J, idr. Hydroxyvitamin D assays: An historical perspective from DEQAS. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2018;177:30–5.
36. Arneson WL, Arneson DL. Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. *Lab Med.* 2013;44(1):e38–42.
37. Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, Worf E, Halwachs-Baumann G. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. *Biochem Med (Zagreb).* 2015;25(2):203–12.
38. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clinica Chimica Acta.* 2009;408(1):8–13.
39. Osredkar J, Marc J. Vitamin D in presnovki: fiziologija, patofiziologija in referenčne vrednosti. *Medicinski razgledi.* 1996;35:543–65.
40. Kokalj T. Določanje orientacijskih referenčnih vrednosti vitamina D in njegovih presnovkov v človeškem krvnem serumu = Determination of reference values of vitamin D and its metabolites in human blood serum : diplomsko delo. Ljubljana; 1995.
41. Gros K.. Določitev orientacijskih referenčnih vrednosti vitamina D (25-OH) v serumu = Determination of reference values of vitamin D in human blood serum : diplomska naloga,. Ljubljana; 2008
42. Hormone and Vitamin D Standardization Programs (HoSt/VDSCP) | CDC [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/labstandards/hs.html>
43. Schleicher RL, Sternberg MR, Lacher DA, Sempos CT, Looker AC, Durazo-Arvizu RA, idr. The vitamin D status of the US population from 1988 to 2010 using standardized serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D shows recent modest increases. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(2):454–61.

DRUŠTVENE VESTI

ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

SIMPOZIJ OB 47. SKUPŠČINI SFD

Andrijana Tivadar

Slovensko farmacevtsko društvo organizira ob svoji letni skupščini osrednji društveni dogodek, ki združuje strokovno srečanje, podelitev društvenih priznanj in prijetna druženja. Letos je tradicionalni simpozij ob 47. skupščini po dveh letih spet potekal v Portorožu, in sicer od 12. do 14. maja 2022 v Kongresnem centru Bernardin. Simpozij je bil zelo dobro obiskan in ves čas je bilo čutiti pozitivno energijo ter povezanost.

Osrednje teme strokovnega dela simpozija SFD so bile:

**Izbrane novosti na področju zdravljenja z zdravili
Ali lahko sladkorno bolezen zdravimo še bolje?
Oskrba ran**

V četrtek, 12. maja 2022, smo se posvetili izbranim novostim na področju zdravljenja z zdravili. Predavali so magistri farmacije, ki sodelujejo pri razvoju zdravil na različnih področjih. Spoznali smo zdravila za napredno zdravljenje, novosti pri zdravljenju povisanega holesterola, monoklonska protitelesa za preprečevanje migrene in nove možnosti zdravljenja spinalne mišične atrofije. Zadnji dve leti je bilo veliko raziskav, ki naj bi nam prinesle zdravila za zdravljenje covid-19, zato smo se seznanili tudi s pregledom tovrstnih zdravil. Hvaležni pa smo bili tudi direktorju Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pomočke, da nam je predstavil novosti na področju regulative, s podarkom na pomenu kliničnih preskušanj. S predstavitvijo mednarodnih aktivnosti naše študentske sekcije smo zaključili četrtkovo izpopolnjevanje.

V petek, 13. maja 2022, smo se spraševali, ali lahko sladkorno bolezen zdravimo še bolje. Dobili smo precej odgovorov, še posebej navdihujoca pa je bila osebna izkušnja bolnika. Predavateljem farmaceutom sta se pridružili dve predavateljici iz zdravninskih vrst ter predstavili dve temi:

Kako varno in učinkovito zdravimo sladkorno bolezen tipa 2 ter Sladkorna bolezen in covid-19 – sindemija ali le medsebojna opazovalca. Specialisti klinične farmacie so vedno zaželeni kot predavatelji, lekarniški strokovni delavci pa se srečujejo tudi z vprašanji o izbiri najprimernejšega medicinskega pomočka za merjenje glukoze v krvi, zato je pomembno, da na takih strokovnih dogodkih delimo izkušnje in predstavimo primere dobrih praks.

Na simpoziju SFD smo imeli v petek popoldan priložnost prisluhniti častni predavateljici prof. dr. Julijani Kristl, mag. farm., ki nam je pokazala svet nanodelcev in nanovlaken. Začutili smo, kako strastno je ta svet raziskovala zadnjih 30 let.

Satelitska predavanja so bila na programu v petek popoldan. V več kot dvournem programu se je zvrstilo 7 izjemno kakovostnih predavanj, ki se jih na simpoziju SFD res ne izplača izpustiti. Naj se na tem mestu zahvalimo vsem sponzorjem, ki so nas podprli in sodelovali bodisi z razstavnimi prostori, oglasi, sateliti ali kako drugače.

V soboto, 14. maja 2022, smo s polno paro nadaljevali naše strokovno izpopolnjevanje, kjer smo slišali zanimive podatke o oskrbi ran. Spoznali smo, da na tem področju potrebujemo tudi v prihodnje dodatna izobraževanja. Predsednica Lekarniške zbornice Slovenije (LZS) Darja Potočnik Benčič nam je na koncu predstavila še cepljenje v lekarni kot novo storitev, ki lahko vpliva na izboljšanje precepljenosti populacije v naši državi.

Za udeležbo na simpoziju so magistri in magistre farmacie z licenco prejeli 9 licenčnih točk.

Bogat strokovni in družabni program je udeležence simpozija navdušil in prepričani smo, da dober obisk tudi naslednje leto ne bo izostal. Z organizacijskim odborom, ki mu predseduje izr. prof. dr. Tomaž Vovk, smo že opravili prvo sejo, na kateri smo pregledali rezultate anket in naredili načrt za





delo odbora za naslednji simpozij. Glede na zbrane ocene je bil simpozij odlično organiziran, predavatelji so dobili lepe ocene (povprečje 4,58 od 5). Udeleženci simpozija so v zbranih ankетah podali zelo različne predloge za tematike prihodnjih simpozijev, težko je izluščiti, kaj jih najbolj zanima, saj se predlogi skoraj ne ponavljajo. Člani organizacijskega odbora: izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm., predsednik OO, prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm., mag. Matjaž Tuš, mag. farm., Vladka Češek Bizjak, mag. farm., Janez Toni, mag. farm., Katja Razinger, mag. farm., Mojca Prah Klemenčič, mag. farm., mag. Alenka Rutar Pariš, mag. farm., dr. Gašper Marc, mag. farm., prof. dr. Borut Štrukelj,

mag. farm., in dr. Andrijana Tivadar, mag. farm., bomo zato imeli v prihajajočih mesecih veliko dela z oblikovanjem strokovnega programa simpozija ob 48. skupščini SFD, ki bo najverjetneje od 11. do 13. maja 2023 v Portorožu. Privoščite si sproščajoč poletni oddih in ostanite zdravi. Septembra pa se vidimo na 9. mednarodni BBBB konferenci in oktobra na jubilejnem, že 20. simpoziju Sekcije farmacevtov javnih lekarn. Spremljajte tudi aktivnosti ob dnevu slovenskih lekarn, ki bo letos praznoval svojo polnoletnost, saj gre za 18. po vrsti. Več informacij o aktivnostih društva je objavljenih sproti na spletni strani www.sfd.si.

47. SKUPŠČINA SFD

Andrijana Tivadar

47. skupščina SFD je potekala v soboto, 14. maja 2022, v Kongresnem centru Bernardin v Portorožu.

Prisotnih je bilo 130, tj. 76 % delegatov. Na predlog predsednika SFD prof. dr. Marka Anderluha so delegati najprej imenovali organe 47. skupščine:

Delovna predsednica: Saša Zaviršek Mikolič, član: Matjaž Tuš, članica: Alenka Anđelić Dolžan, zapisnikarica: Andrijana Tivadar, overovateljici zapisnika: Vesna Farič Tuš in Zrinka Abramović, verifikacijska komisija: Nina Janežič in Eva Štefanec.

Predsednik SFD Marko Anderluh je predstavil poročilo o delu društva v letu 2021, povzel je dogodke, ki jih je SFD organiziralo v minulem letu. Naj izpostavimo samo 7 izvedenih simpozijev, 7 e-izobraževanj, 65 strokovnih izpolnjevanj po podružnicah, 4 digitalne srede ter 3 četrtke klinične farmacije, pa tudi 1 strokovno predavanje Homopatske sekcijske. Za člane je večina dogodkov brezplačnih, kotizacije so predvidene za simpozije in nekatera e-izobraževanja. Generalna sekretarka SFD Andrijana

Tivadar je predstavila poročilo o poslovanju v letu 2021. Povedala je, da je društvu kljub izrednim razmeram uspelo ohraniti skoraj vse tradicionalne aktivnosti, kar se pozna tudi na številkah. Društvo je poslovalo uspešno, kar je potrdila tudi predsednica nadzornega odbora Vladka Češek Bizjak. Na skupščini so delegati potrdili poročila o delu in poslovanju društva, poročilo nadzornega odbora za leto 2021 in sprejeli plan dela za letošnje leto. Potrdili smo tudi članarino za leto 2023, ki bo enaka kot letos: članarina zaposleni farmacevti 39 €, članarina tehnični 27 €, članarina seniorji 22 €, članarina študenti 16 €. Na skupščini smo sprejeli novo besedilo temeljnega akta društva. Besedilo temeljnega akta je potrdil izvršni odbor SFD na svoji 4. seji dne 19. 4. 2022, nato je bilo besedilo v javni razpravi (objavljeno na spletni strani) do 11. 5. 2022. V okviru javne razprave ni bilo pripomb. Prisotni delegati so imeli možnost za razpravo in postavljanje vprašanj, vendar v tej točki ni bilo razpravljalcev, na besedilo temeljnega akta ni bilo pripomb.

PODELITEV DRUŠTVENIH PRIZNANJ 2022

Andrijana Tivadar

V četrtek, 12. maja 2022, smo se zvečer ob 20.00 zbrali v Gledališču Tartini na slavnostni podelitvi društvenih priznanj. SFD je podelilo 4 Minařikova priznanja ter eno Minařikovo odličje. Minařikovo odličje predstavlja najvišje priznanje Slovenskega farmacevtskega društva, ki ga društvo podeljuje za izjemne dosežke na področju farmacije. V letu 2022 ga je prejela Tajda Miharija Gala, mag. farm., spec. Minařikova priznanja 2022 so prejeli: izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm., Brigita Mavšar Najdenov, mag. farm., spec., Danica Novak Malnar, mag. farm., in izr. prof. dr. Matej Štuhec, mag. farm., spec. Vseh 5 društvenih priznanj sta podelila prof. dr.

Marko Anderluh, mag. farm., predsednik SFD, in mag. Vojmir Urlep, mag. farm., predsednik odbora za podeljevanje društvenih priznanj. Oba predsednika sta zbranim gostom tudi spregovorila in dodala še košček v mozaiku svečane prireditve. Vmes so nas glasbeno osvežili Nevergreen Brothers, prireditev pa je povezovala Valentina Plaskan.

Po svečanosti nas je tudi letos Kemofarmacija prijazno povabila na druženje v sosednji Caffe Tartini, kjer smo se poveselili in se spomnili, kako radi smo v živo skupaj. Objavljamo utemeljitve priznanj in odličja ter ČESTITAMO vsem nagrajencem.



Od leve proti desni: Marko Anderluh, predsednik SFD, Matej Štuhec in Danica Novak Malnar, prejemnika Minařikovega priznanja 2022, Tajda Miharija Gala, prejemnica Minařikovega odličja 2022, Mojca Kerec Kos in Brigita Mavšar Najdenov, prejemnici Minařikovega priznanja 2022, ter Vojmir Urlep, predsednik odbora za podeljevanje društvenih priznanj.



V pričakovanju svečane prireditve se gostje zbirajo pred Gledališčem Tartini.

Prejemnica **Minařikovega odličja 2022** je
Tajda Miharija Gala, mag. farm., spec.

Prejemniki **Minařikovih priznanj 2022** so:

Izr. prof. dr. MOJCA KEREC KOS, mag. farm. – na predlog Ljubljanske podružnice

BRIGITA MAVSAR NAJDENOV, mag. farm., spec. – na predlog Gorenjske podružnice

DANICA NOVAK MALNAR, mag. farm. – na predlog Dolenjske podružnice

Izr. prof. dr. MATEJ ŠTUHEC, mag. farm., spec. – na predlog Sekcije kliničnih farmacevtov

POHVALE 2022

Celjska podružnica:

Lidija Vrbovšek, Sanja Gominšek, Rok Cerovšek

Gorenjska podružnica:

Valentina Kosmač Bukovec

Mariborska podružnica:

Urška Lučev

Primorska podružnica:

Samo Mahovič

Posavska podružnica:

Maša Koritnik Zadravec, Petra Majcen, Metka Bogović, Tadeja Pavlin, Darja Bostič

Sekcija seniorjev:

Slavica Šešek

Sekcija farmacevtskih tehologov:

Alenka Zvonar Pobirk, Klemen Korasa, Zrinka Abramović, Nejc Horvat, Natalija Škrbina Zajc, Mitja Kos

Sekcija kliničnih farmacevtov:

Rok Antolič

Sekcija za zgodovino farmacije:

Ivan Remškar

Sekcija farmacevtov javnih lekarn:

Miroslava Abazović, Marjetka Korpar, Mojca Kerec Kos, Milan Balaban, Patricija Dolinar, Iva Horvat



KRATKE UTEMELJITVE MINAŘIKOVIH PRIZNANJ (PREBRANE NA SLAVNOSTNI PODELITVI)

Prejemnica MINAŘIKOVEGA PRIZNANJA 2022, izredna profesorica dr. **MOJCA KEREC KOS**, mag. farm., je diplomirala leta 1999 in čez 4 leta doktorirala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, kjer je zaposlena na učiteljskem mestu. Pedagoško in raziskovalno deluje na področju biofarmacije, farmakokinetike in klinične farmacije. Pri tem uspešno sodeluje s številnimi kolegi v zunanjih lekarnah in bolnišnicah in jih s tem spodbuja k raziskovalnemu delu v njihovem kliničnem okolju. Številnim je mentorica pri magistrskih nalogah, doktorskih disertacijah in specialističnih nalogah iz lekarniške in klinične farmacije. Je predsednica Komisije za strokovna vprašanja na Fakulteti za farmacijo ter Razširjenega strokovnega kolegija za lekarniško farmacijo na Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije. Od leta 2018 je vodja Kluba alumnov Univerze v Ljubljani, Fakultete za farmacijo. Kot članica izvršnega odbora Študentske sekcije SFD je bila odgovorna za kontakt z mednarodno organizacijo International Pharmaceutical Students Federation. Tri mandate je bila tudi članica Izdajateljskega sveta SFD. Svoje organizacijske sposobnosti dokazuje kot predsednica organizacijskega odbora simpozija Sekcije farmacevtov javnih lekarn od leta 2016 naprej in gostujoča urednica sedmih številk Farmacevtskega vestnika. Pri pripravi knjižic O pravilni in varni uporabi zdravil, izdanih ob dnevuh slovenskih lekarn, sodeluje kot recenzentka. Od leta 2016 je področna urednica revije Acta Pharmaceutica. Za izjemno uspešno organizacijsko in strokovno delo na področju farmacije Slovensko farmacevtsko društvo Mojca Kerec Kos podeljuje Minařikovo priznanje 2022.



Prejemnica Minařikovega priznanja 2022
izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm.

Prejemnica MINAŘIKOVEGA PRIZNANJA 2022, **BRIGITA MAVSAR NAJDENOV**, spec. klin. farm., je smer svoje poklicne poti nakazala že s svojim diplomskim delom, ki ga je opravila v sodelovanju z Inštitutom za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani. Strokovno delo nadaljuje v lekarni Splošne bolnišnice Jesenice, kjer je 18 let vodila Komisijo za zdravila, od leta 2001 tudi Komisijo za antibiotike in sodelovala v ožji skupini Komisije za obvladovanje bolnišničnih okužb. Že kot specializantka klinične farmacije je pričela z delom na kliničnih oddelkih, s čimer je Splošna bolnišnica Jesenice postala ena prvih bolnišnic v Sloveniji s tovrstno dejavnostjo. Rezultate svojega raziskovalnega dela je uspešno objavila v 7 izvirnih in 1 preglednem znanstvenem članku. Svoje znanje rada deli s kolegi, je mentorica številnim študentom farmacije na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in s strani LZS imenovana za glavno in področno mentorico specializantom iz klinične farmacije. Svoje znanje o zdravljenju z zdravili predaja tudi izven farmacevtske stroke, na Fakulteti za zdravstvo Angele Boškin na Jesenicah kot nosilka predmeta Farmakologija. Svojo prepoznavnost v stroki gradi na področju klinične farmacije v bolnišničnem okolju, še zlasti na področju obvladovanja bolnišničnih okužb in zdravljenja s protimikrobнимi učinkovinami. Strokovnost, povezovalnost in predanost raziskovalnemu delu so tiste lastnosti in dosežki Brigite Mavšar Najdenov, s katerimi pripomore k uveljavitvi farmacije v zdravstvenem timu, zato ji Slovensko farmacevtsko društvo podeljuje Minařikovo priznanje 2022.



Prejemnica Minařikovega priznanja 2022
Brigita Mavšar Najdenov, spec. klin. farm.



Prejemnica MINAŘIKOVEGA PRIZNANJA 2022, **DANICA NOVAK MALNAR**, mag. farm., je svojo poklicno kariero posvetila proizvodnji farmacevtskih izdelkov v Krki, tovarni zdravil, d. d., Novo mesto. Vseskozi verjame v idejo, da je ključen dejavnik za izdelavo varnih, učinkovitih in kakovostnih zdravil ustrezno izobraženo in usposobljeno osebje. Zato je bila sopodpisnica pobude za izdelavo kataloga standardov strokovnih znanj in spremnosti za pridobitev dveh poklicnih kvalifikacij, Upravljalec v farmacevtski industriji in Proizvodni procesničar v farmacevtski industriji, ki sta bili v letu 2001 sprejeti na Strokovnem svetu Republike Slovenije za poklicno in strokovno izobraževanje. Prvotnima dvema poklicnima kvalifikacijama so se priključile še 4. Od leta 2004 je bilo izdanih že 1781 certifikatov, od tega 1639 zaposlenim v Krki in 142 zaposlenim v drugih podjetjih in lekarnah. Prispevala je k vzpostavitvi Krkinih Učnih centrov in sistema permanentnega usposabljanja, ki zagotavlja dobro usposobljene mentorje in izvajalce usposabljanj. S svojim entuziazmom vseskozi navdušuje mlade diplomante Fakultete za farmacijo za delo v proizvodnji, odgovorna je za organizacijo počitniškega dela bodočih magistrov farmacije in inženirjev ostalih naravoslovno tehničnih smeri, kakor tudi za obvezno delovno prakso farmacevtskih tehnikov. Njeno delo je tudi skrb za kakovost v proizvodnji zdravil. V Krki je Danica Novak Malnar promotorka za članstvo v SFD, saj nenehno vzpodbuja mlade tehnologe in tehnike k včlanitvi in sodelovanju v društvu. Že tri zaporedne mandate pa je tudi delavska direktorica in članica uprave družbe. Slovensko farmacevtsko društvo podeljuje Danici Novak Malnar Minařikovo priznanje 2022, ker je s svojo samoiniciativnostjo, prodornostjo, vztrajnostjo in doslednostjo prispevala k razvoju in napredku na področju proizvodne farmacevtske dejavnosti.



Prejemnica Minařikovega priznanja 2022
Danica Novak Malnar, mag. farm.

Prejemnik MINAŘIKOVEGA PRIZNANJA 2022, izr. prof. dr. **MATEJ ŠTUHEC**, mag. farm., spec. klin. farm., je na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani diplomiral leta 2010. Od takrat je zaposlen v Psihiatrični bolnišnici Ormož. Izvaja tudi pedagoško delo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, Medicinski fakulteti v Mariboru in na ljubljanski podružnici dunajske Univerze Sigmunda Freuda. Njegov prispevek farmacevtski stroki se kaže v dolgoletni aktivnosti v Sekciji kliničnih farmacevtov pri Slovenskem farmacevtskem društvu. V zdravstvenem sistemu sodeluje pri številnih pomembnih projektih implementacije klinične farmacije v slovenski zdravstveni sistem. Kot specialist klinične farmacije se dnevno srečuje z optimizacijo farmakoterapije v bolnišnicu in ambulanti kliničnega farmacevta. Neposredno je sodeloval tudi pri implementaciji novega zdravstvenega programa Psihogerijatrija, kjer je klinični farmacevt specialist obvezen član tima. Za Farmacevtski vestnik je napisal 5 člankov, je pa tudi avtor 34 znanstvenih prispevkov v revijah s faktorjem vpliva. Na področju psihiatrije je že leta med najuspešnejšimi slovenskimi raziskovalci v skupnih točkah iz objav. V mednarodnem prostoru je aktiven kot član uredniških odborov revij ter član uredniškega odbora International Journal of Clinical pharmacy ter voljen sekretar Sekcije za psihofarmakologijo pri Evropskem psihiatričnem združenju. V letu 2020 prejel mednarodno znanstveno nagrado Medis Award. S strani Lekarniške zbornice Slovenije je imenovan kot glavni mentor pri specializaciji iz klinične farmacije. Kot predavatelj je sodeloval na več kot 30 vabičenih zdravniških in farmacevtskih kongresih v Sloveniji in tujini. Z navedenimi predavanji je približal delo klinične farmacije zdravnikom in prispeval k prepoznavanju farmacije, zato Mateju Štuhelu Slovensko farmacevtsko društvo podeljuje Minařikovo priznanje 2022.



Predsednik SFD prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm., podeljuje Minařikovo priznanje izr. prof. dr. Mateju Štuhelu, mag. farm., spec. klin. farm.

PREJEMNICA MINAŘIKOVEGA ODLIČJA 2022 TAJDA MIHARIJA GALA, MAGISTRA FARMACIJE, SPECIALISTKA IZ OBLIKOVANJA ZDRAVIL



Prejemnica Minaříkovega odličja 2022 Tajda Miharija Gala, mag. farm., spec.

Tajda Miharija Gala je študirala farmacijo v Ljubljani. Že v času študija je sodelovala pri znanstveno raziskovalnem delu na Inštitutu za farmakologijo Medicinske fakultete. Pod mentorstvom prof. dr. Franca Erjavca je opravila raziskovalno nalogo, za katero je prejela 1. Krkino nagrado. Na Farmakološkem inštitutu Medicinske fakultete je leta 1979 opravila tudi diplomsko nalogo. Po diplomi se je zaposlila v javni lekarni, nato pa leta 1981 v lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, kjer je več kot 38 let posvetila bolnišnični farmaciji. Leta 1990 je zaključila specializacijo iz oblikovanja zdravil. Več kot 13 let je bila vodja lekarne v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. V študijskem letu 2005/2006 se je vpisala na Univerzitetni znanstveni podiplomski študij biomedicine na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin.

V času od 1995 do 1997 je bila predsednica Slovenskega farmacevtskega društva, od leta 2006 do 2013 pa predsednica Sekcije bolnišničnih farmacevtov pri Slovenskem farmacevtskem društvu. S prevzemom vodenja Sekcije je uvedla letne mednarodne simpozije za bolnišnične farmacevte in redno gostila pomembne strokovnjake iz tujine ter tako poskrbela za širitev znanja na področju bolnišnične farmacije.

Aktivno je sodelovala pri projektih Lekarniške zbornice in Ministrstva za zdravje. V Lekarniški zbornici je bila članica številnih komisij. Sodelovala je v projektu: Strateške in procesne smernice delovanja bolnišničnih lekarn, ki se je pričel v letu 2007 in je prinesel sodoben pogled in koncept razvoja

bolnišnične farmacije v Sloveniji. Na Ministrstvu za zdravje je sodelovala pri projektu: priprava centraliziranega javnega razpisa za zdravila, ki je trajal dve leti. Sodelovala je tudi v projektu: priprava modela za zagotavljanje varne uporabe zdravil v slovenskih bolnišnicah, ki je pokazal stanje v slovenskih bolnišnicah na področju varnosti pri uporabi zdravil.

Kot predsednica SFD je navezala številne stike s kolegi v tujini, predvsem z bolnišničnimi farmaceuti, kar ji je omogočilo spoznavanje novih pristopov v bolnišnični farmaciji, ki jih je uporabljala pri svojem delu in vpeljala v slovensko stroko in zdravstveni sistem, na primer: oskrba na domu za otroke s popolno parenteralno prehrano in centralizirana priprava citostatične terapije v bolnišnični lekarni. Leta 1996 je vključila slovenske bolnišnične farmacevte v Evropsko združenje bolnišničnih farmacevtov EAHP, kjer je imela tudi vodstvene funkcije in je vodila vrsto pomembnih projektov. V Evropskem združenju bolnišničnih farmacevtov je aktivno delovala več kot 20 let, sprva kot delegatka slovenskih bolnišničnih farmacevtov, 11 let kot članica odbora EAHP in 6 let kot podpredsednica EAHP.

V odboru EAHP je vodila vrsto pomembnih projektov: v letu 2004 raziskavo o izobraževanju in profesionalnih kvalifikacijah bolnišničnih farmacevtov v evropskih državah, v letu 2005 o varnosti bolnikov pri zdravljenju z zdravili v bolnišnicah Evrope, od leta 2004 do 2006 je vodila evropsko raziskavo o bolnišnični farmaciji (Survey EAHP 2005), ki je potekala v 22 evropskih državah, in v letu 2009 do



2010 Survey EAHP 2010, ki je potekal v 31 državah. Motivirala je tudi kolege v slovenskih bolnišničnih lekarnah, da so aktivno sodelovali v teh raziskavah, ki dajo natančen vpogled v aktivnosti bolnišničnih farmacevtov po Evropi. Rezultati raziskav so bili predstavljeni na kongresih EAHP leta 2007 in leta 2012 ter na www.eahp.eu. Napredno metodologijo, uporabljeno v teh raziskavah, je predstavila na svetovnem kongresu farmacevtov (*Federation International Pharmaceutique – FIP*) v Istanbulu septembra 2009. Kot priznan strokovnjak je sodelovala pri pripravi Evropskih standardov bolnišnične farmacije (*European Statements on Hospital Pharmacy*), ki so bili sprejeti maja 2014, pa tudi pri oblikovanju strategije razvoja EAHP in bolnišnične farmacije v Evropi. Več let je bila tudi članica uredniškega odbora uradnega časopisa EAHP, European Journal of Hospital Pharmacy. Skrbela je, da so bili v rubrikah News ter Focus Slovenia redno objavljeni prispevki z novostmi v stroki in zdravstvenem sistemu v Sloveniji.

Sodelovala je tudi z Evropskim centrom za preprečevanje in obvladovanje bolezni ECDC pri pripravi Navodil za smotno rabo protimikrobnih zdravil ECDC leta 2016 in Evropskim društvom farmacevtov v onkologiji ESOP pri pripravi standardov v onkološki farmacevtski praksi QuapoS.

Aktivno vključevanje v evropska združenja (EAHP, ESCP, ESOP, ECDC) ji je omogočalo spoznavanje evropskih smernic za razvoj bolnišnične farmacije, ki jim je sledila in jih postopno uvajala v praks. Stroki pa je sledila tudi glo-

balno. V mednarodnem farmacevtskem združenju FIP je bila članica bolnišnične sekcije več let in v času 2000 do 2001 vršila funkcijo pomočnice sekretarja bolnišnične sekcije FIP. V letu 2007 do 2008 je sodelovala na globalni konferenci o bolnišnični farmaciji v sklopu FIP-a v delovni skupini »Distribucija in izdelava zdravil v bolnišnični lekarni« in s tem pri postavitvi standardov stroke, ki so veljavni na vseh kontinentih. Zaradi aktivnega dela na mednarodnem področju je bila povabljena k sodelovanju v misiji Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) v Makedoniji leta 2009, ki je delovala na področju racionalne rabe in uporabe zdravil v bolnišnicah.

Zavzetost za stroko in njeno delovanje na mednarodni ravni se je odražalo tudi pri delovanju sekcije v slovenskem okolju. Poskrbela je za udeležbo naših članov na mednarodnih kongresih ter za njihovo aktivno sodelovanje v projektih in odborih EAHP. Zavzemala se je za brezplačno izobraževanje in izmenjave mladih farmacevtov iz manjših in manj razvitih držav na področju bolnišnične farmacije v okviru EAHP. Za slovenske bolnišnične farmacevte pa je organizirala daljše delovne prakse v naprednejših bolnišničnih lekarnah v različnih evropskih državah.

Leta 2001 je prejela Minaříkovo priznanje, leta 2017 pa priznanje Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov. Za prispevek k razvoju bolnišnične farmacije ji Slovensko farmacevtsko društvo podeljuje Minaříkovo odličje 2022.

ZAHVALA PREJEMNICE ODLIČJA V IMENU VSEH NAGRAJENCEV

Tajda Miharija Gala

V imenu letosnjih Minaříkovih nagrajencev in v svojem imenu se zahvaljujem Slovenskemu farmacevtskemu društvu in Odboru za podeljevanje društvenih priznanj za izkazano priznanje. Vsak od nas se je na svojem področju trudil za napredok stroke in s tem za dobrobit naših bolnikov. Sama sem delovala v bolnišnici in se vedno zavzemala za bolnišnično farmacijo. Verjela sem, da se tudi v bolnišničnem okolju, kjer je farmacevtska stroka v manjšini, lahko strokovno napreduje in razvija, vendar pa je zato potrebno veliko truda, energije in vztrajnosti. V lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKC LJ), kjer sem delovala skoraj celo svoje delovno obdobje, smo se lotevali in so-

delovali v številnih projektih, in za dosežke gre zahvala tedanjemu vodstvu UKC LJ, predvsem pa mojim bivšim so-delavcem (nekateri so z nami tu v dvorani), ki so me dolga leta podpirali pri tem; tako pri projektih v okviru UKC LJ kot tudi v okviru Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov EAHP. Tudi veliko prostega časa je bilo potrebno posvetiti delu in zahvaliti se moram svoji družini, ki mi je vedno stala ob strani in me vzpodbjala.

Prepričana sem, da podobno razmišljajo in čutijo tudi kolegi – letosnji prejemniki Minaříkovih priznanj. Še enkrat hvala Slovenskemu farmacevtskemu društvu in lep večer vam želim.

SIMPOZIJ SEKCIJE FARMACEVTSKIH TEHNIKOV NA ROGLI

Slavica Ozmec

Po dveh letih, okuženih z epidemijo covid-19 in vsemi pripadajočimi ukrepi, smo se farmacevtski tehniki spet srečali na simpoziju v živo. Trdencialno na Rogli in trdencialno zadnji vikend v mesecu maju – ta pripada farmacevtskim tehnikom.

Še v času epidemije, ko smo lahko le upali in si žeeli, da nam bo srečanje v živo uspelo, smo pričeli s pripravami na simpozij. Izbrali smo aktualno temo, za katero smo upali, da bo zanimiva za vse in bo pritegnila kar največ farmacevtskih tehnikov: Samozdravljenje med in po virozi. Virusi so v zadnjih dveh letih gotovo ena najbolj pogosto uporabljenih besed in tem pogovora v strokovnih in laičnih krogih, vendar je v zvezi z njimi še vedno veliko vprašanj. Odlično uvodno predavanje doc. dr. Marka Pokorna, dr. med., z naslovom Vse, kar ste vedno žeeli vedeti o virozah, pa si niste upali vprašati, pri katerem smo izvedeli veliko o vseh vrstah virusov, s katerimi živimo in bomo živel še naprej, je napovedovalo zanimivo nadaljevanje. Slišali smo nekaj o virusu opičjih koz, ki se je pojavil tudi že pri nas. Z zanimanjem smo prisluhnili prof. dr. Tatjani Lejko Zupanc, dr. med., saj je covid-19 podrobno razložila od izvora okužbe do trenutnega stanja epidemije. Eminentna predavateljica nam je predstavila zaplete pri okužbi z virusom, aktualna zdravila in težave, s katerimi se srečujejo pacienti še dolgo po tem, ko so covid-19 preboleli.

V nadaljevanju je sledilo predavanje o virusnih okužbah dihal mag. Nine Pisk, mag. farm., in o trebušnih virozah, ki jih je predstavila Andrea Šetina, mag. farm. To sta področja, kjer smo farmacevtski tehniki največkrat v prvi bojni vrsti,

ker se pacienti s tovrstnimi težavami najprej oglasijo v le-karni.

Prvi dan simpozija je potekal tudi občni zbor Sekcije farmacevtskih tehnikov. V poročilih predsednice Karmen Grom je bil pregled dela v letu 2021. Zastavljeni program je bil zaradi že večkrat omenjenih vzrokov nekoliko okrnjen, vendar še vedno zadovoljiv. Zelo smo veseli, da nam je v septembru 2021 navkljub vsem težavam zaradi epidemije uspelo izpeljati enodnevni simpozij v Zrečah, z naslovom Samozdravljenje starejše populacije.

Sledil je zaključek prvega dne z večerjo in družabnim programom, v katerem je odličen DJ dvignil na noge večino udeležencev.

Drugi dan simpozija je s svojim predavanjem začela doc. dr. Alenka Kovačič, mag. farm., spec. Samozdravljenje pred in po okužbi s koronavirusom je razložila poljudno, razumljivo, zanimivo. Stres management dr. Željka Čurića, dr. med., nas je opomnil, da je zdravilo počitek in užitek. Naše zadnje predavanje strokovnjakinje za kulturo vedenja in poslovni bonton Bojane Košnik Čuk o pravilih lepega vedenja je na videz tema, ki jo obvladamo, a je porodila kar nekaj vprašanj, dvomov ... ali res obvladamo? Z nekoliko časovne zamude, ki ni zmotila prav nikogar, smo zaključili simpozij.

Veseli in zadovoljni, oboroženi z novimi znanji in veščinami smo zaposlili Roglo. Pa ne samo zato, ker smo poslušali odlična predavanja, pač pa tudi zato, ker smo se ponovno srečali, stisnili roko, videli nasmeh na obrazu. Zdaj vemo, da je to velik privilegij.



Na občnem zboru Sekcije farmacevtskih tehnikov je o delu v letu 2021 poročala predsednica sekcije Karmen Grom.



Med predavanji je bila dvorana polna, saj so zavzete udeležence simpozija pritegnili odlični predavatelji.



OB 50-LETNICI SMRTI MAGISTRA FRANCA MINAŘIKA

Lovro Dermota

Franc Minařik je umrl na svoj rojstni dan, 9. junija 1972, v Mariboru. Rodil se je 1887. leta v Smolniku na Pohorju kot sin upravnika steklarne Jožefa Minařika. Ljudsko šolo je obiskoval v Rušah, gimnazijo v Mariboru, šesto gimnazijo v Moedlingu pri Dunaju, farmacevtsko prakso v Chlodovu pri Karlovičih Varih, Univerzo pa v Gradcu in leta 1909 diplomiiral. Do leta 1916 je deloval kot asistent deželne lekarne Trnkoczy-Zackal v Gradcu, med prvo svetovno vojno je delal v laboratoriju zdravilišča za tuberkulozo v Horgasu, od leta 1916 do 1920 je vodil lekarno na Bledu, ki jo je po smrti Huga Robleka prevzel od njegove vdove. Leta 1927 se je preselil v Maribor. Kupil je najstarejšo lekarno na Glavnem trgu, Mestna lekarna pri Orlu, od lekarnarja Miroslava Prula. Lekarno so leta 1949 nacionalizirali, magister Minařik je bil sprejet v Mariborske lekarne in se do svoje smrti posvetil zgodovini farmacije.

Ob njegovih življenjskih jubilejih so se mu priznani strokovnjaki, domači in tui, prijateljsko oddolžili za njegove zgodovinsko pomembne prispevke.

Ob njegovi sedemdesetletnici so leta 1957 v Pokrajinskem muzeju v Mariboru odprli stalno lekarniško zbirko, dve leti prej je postal predavatelj zgodovine farmacije na novi farmacevtski fakulteti v Ljubljani. Tedaj ga je Mednarodno društvo za zgodovino farmacije odlikovalo s Schelenzevo plaketo. Profesor dr. Hrvoje Tartalja iz Zagreba ga je imenoval »nestorja jugoslovanskih zgodovinarjev farmacije«.

Zelo svečano je bilo tudi leta 1967 ob njegovi osemdesetletnici. Predsednik Mednarodnega društva za zgodovino farmacije prof. dr. E. G. Dann mu je takole izrekel priznanje: »Leta 1926 se je zbral 30 mož, da bi ustanovili današnje Mednarodno društvo za zgodovino farmacije. Med njimi je bil tudi lekarnar Franc Minařik, ki je letos izpolnil 80 let.« Omenil je bibliografijo njegovih 32 naslovov, več kot 100 publikacij, izdanih v več jezikih, o zgodovini samostanskih lekarn, ki niso samo dragoceni prispevki za zgodovinarje, temveč tudi gradivo za kulturo obravnavanih področij. Ob 80. obletnici mu je prof. Dann izročil Winklerjevo plaketo, mariborski župan visoko državno odlikovanje, prof. dr. Vitolo z Univerze v Pisi Lauri di Palatino, dekan Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pa pismo o nameri, da ga bo fakulteta imenovala za izrednega profesorja za zgodovino medicine. Ganljiva je njegova zahvala sodelavcem v mariborskih lekarnah: »Lepi dnevi praznovanja moje osemdesetletnice so mimo. Bili so zame pravljični in le počasi se vživiljam zo-

pet v vsakdanjost. Ti enkratni doživljaji mi bodo ostali v trajnem spominu kot vaše jubilejno darilo.«

Minařikov prijatelj, pesnik Janko Glazer, ga je takole opisal: »Bil je človek, pripravljen dajati več, kot je zahteval zase: nesebičen, uslužen, tenkočuten, obziren, dober. Izjemni človek: človek, ki je znal in si upal biti tudi zadovoljen, čeprav seveda (kakor nikomur) tudi njemu ni bilo prizaneseno z udarci. A imel je nekaj, česar nima vsak: več kot uspehi v denarju mu je bilo zadoščenje, ki mu ga je prinašalo delo. Živet je pomenilo zanj delati!«

Nemško društvo za zgodovino farmacije ga je odlikovalo s Ferchlovo medaljo, ki jo je Minařikovima hčerkama na priložnostni prireditvi v Mariboru izročil prof. dr. Hagen Hein, predsednik Mednarodnega društva za zgodovino farmacije (to odlikovanje se podeljuje po smrti).

Pripis: Franc Minařik je bil človekoljub in dejaven samaritan. V mladosti je napisal veliko pacifističnih prispevkov. Do petdesetih let je svoja dela objavljala v tujini, saj našega strokovnega časopisa še nismo imeli. V tujini so ga bolj cenili in spoštovali kot doma. Dolgo si je prizadeval za ohranitev in obnovo Olimske lekarne. Danes je znana kot biser Slovenije. Narod, ali stroka, ki si ne prizadeva slediti svojim zgodovinskih dogodkom in svojem razvoju, ni kultiviran. Strokovne delavke in delavci Mariborskih lekarn se vsako leto na soboto, blizu 9. junija, rojstnega dne magistra Franca Minařika, predstavijo ljudem s svojimi izdelki za ohranjanje dobrega telesnega in duševnega zdravja. Letos na Trgu svobode.



Člani Mariborske podružnice s predsednico Vesno Farič Tuš, mag. farm., 9. junija 2022 ob spominski plošči, posvečeni Francu Minařiku.

ŠPORTNE IGRE SFD

Peter Demšar, mag. farm., predsednik Ljubljanske podružnice SFD

V soboto, 11. 6. 2022, so po dvoletnem premoru zaradi epidemije covid-19 ponovno potekale Športne igre SFD, ki jih za vse člane Slovenskega farmacevtskega društva že tradicionalno organizira Ljubljanska podružnica. Udeleženci so se v dopoldanskih urah zbrali na idilični lokaciji poleg jezera Črnava v Preddvoru. Pohodniki so se odpravili k cerkvi svetega Jakoba nad Preddvorom, kolesarji pa na kolesarski krog s ciljem pri Trbojskem jezeru. Po približno treh urah sta se obe skupini brez poškodb in dobre volje vrnili na izhodišče in porabljene kalorije nadomestili z obilnim kisilom. Ker na farmacevtskih druženjih ne gre brez strokovnih vsebin, smo udeleženci z zanimanjem prisluhnili krajšemu predavanju doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm., s Fakultete za farmacijo, ki je razkril nekaj zanimivih podrob-

nosti o mineralu magneziju in uporabi pri športnih aktivnostih. Druženje smo nadaljevali s športnimi igrami, pri katerih se je pri lokostrelstvu in raznih igrah z žogo pokazala tudi tekmovalna plat farmacevtov. Vse sodelujoče ekipe so za svoj trud prejele praktične nagrade, predvsem pa ni manjalo obilo smeha in zabave.

Športne igre so vedno predvsem priložnost za druženje farmacevtov z različnih delov Slovenije in različnih področij farmacie. Tako je dogodek minil v prijetnih izmenjavah mnenj tako s strokovnega kot tudi zasebnega področja. Udeleženci smo se strinjali, da so tudi takšni dogodki za člane Slovenskega farmacevtskega društva pomembni, saj utrjujejo vezi med farmacevti, ki delujejo na različnih področjih in imajo različna znanja in izkušnje.



Predsednik Ljubljanske podružnice SFD Peter Demšar in zmagovalci popoldanskih farmacevtskih iger.



Dopoldansko druženje so nekateri začeli na kolesu.



Udeležence Športnih iger SFD 2022 je nagradilo tudi vreme.



Med pohodom na Sv. Jakoba smo se učili tudi nordijske hoje.



Tekmovalno vzdušje na popoldanskih farmacevtskih igrah.



član skupine Sandoz



Zahvaljujemo se našim podpornikom.



NAPOVEDUJEMO, VABIMO, OBVEŠČAMO

DOGODKI SFD

Dan slovenskih lekarn

26. september 2022
ZDRAVILA ZA OTROKE

20. simpozij Sekcije farmacevtov javnih lekarn

25. oktober 2022, Ljubljana
NOVOSTI NA PODROČJU MAGISTRALNIH ZDRAVIL

Jesenski homeopatski simpozij

19. november 2022, Ljubljana
PRIMERJAVA HOMEOPATSKIH ZDRAVIL TREH KRALJESTEV

Vabljeni.

Več informacij na
www.sfd.si



Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo


SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO
SLOVENIAN PHARMACEUTICAL SOCIETY



9. mednarodna BBBB konferenca farmacevtskih znanosti *Pharma sciences of tomorrow*

Ljubljana, 15. – 17. september 2022



Glavna področja:

- Farmacevtska tehnologija & nanotehnologija
- Farmacevtska kemija
- Farmacevtska biologija
- Klinična farmacija in laboratorijska biomedicina
- Farmacevtska analitika



SCAN ME

Rok za oddajo povzetkov

30. junij 2022

Vse informacije o prijavi in zahtevah za prispevke:
<http://bbbb2022.sfd.si>

Če še niste, je zadnji čas, da aktivirate svoje pohodne čevlje,
saj vas **Gorenjska podružnica SFD** v sklopu projekta



vabi na tradicionalno druženje, ki bo
v **soboto, 10. septembra 2022.**

Sprehodili se bomo po netradicionalni turi:

Koča pri Savici - Dom na Komni.

Zasledujte podrobnosti, da vam ne pobegnejo.



V PRIMERU SLABEGA VREMENA POHOD ODPADE.

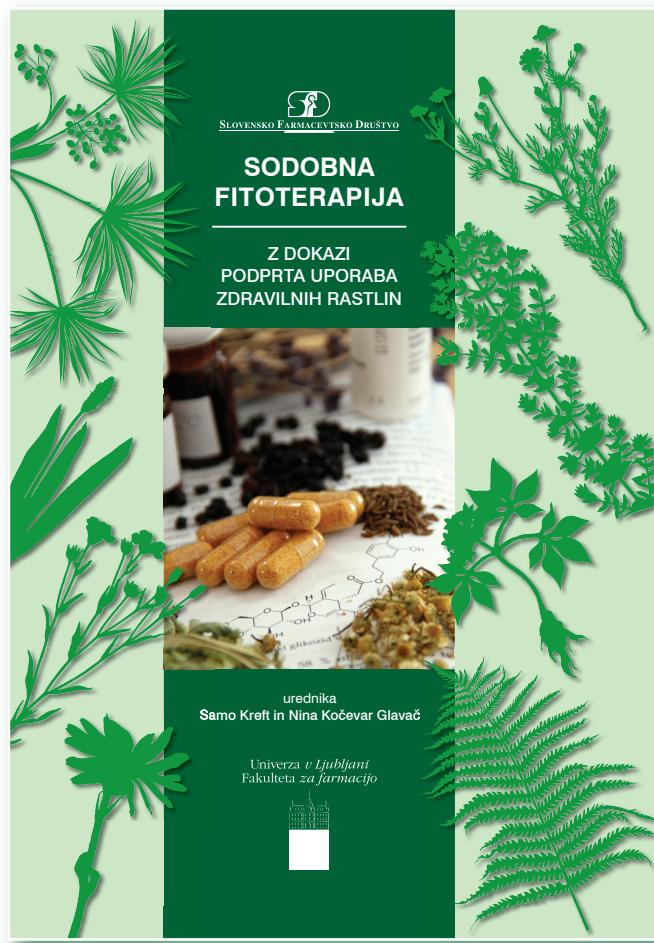
Sponzor dogodka:



PONOVNO NA VOLJO

SODOBNA FITOTERAPIJA –

Z DOKAZI PODPRTA UPORABA ZDRAVILNIH RASTLIN



PONATIS 2021

Naročila: tajnistvo@sfd.si



SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO

MINERALI, VITAMINI in druge izbrane snovi



Uredniki
Lucija Peterlin Mašič,
Aleš Obreza,
Tomaž Vovk

BELEŽKE:



Infiniti MRM

Pot do zdravja

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

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si

