

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 3

OSREDNJA TEMA:
NOVOSTI NA PODROCJU
FARMACEVTSKE TEHNOLOGIJE



ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočever Glavač

GOSTUJOČA UREDNICA:
Alenka Zvonar Pobirk

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

IZDAJATELJSKI SVET:
Mateja Cvirn Novak
Mirjana Gašperlin
Alenka Karničar
Sara Kenda
Janez Ilaš
Nina Pisk
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 Farmaceutskega vestnika so prepovedani reproduciranje, distribuiranje, javna priobčitev, predelava in kakršna koli druga uporaba avtorskega dela ali njegovih delov v kakršnem koli obsegu in postopku kot tudi tiskanje in predelava elektronske oblike.

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

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

Farmaceutski 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.

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

Dragi kolegi in bralci Farmaceutskega vestnika,

vsebinska letošnje 3. številke je v skladu z letnim časom razgibana in vas bo popeljala v novosti na področju farmacevtske tehnologije in sorodnih ved. Sledili bomo življenjskemu ciklu zdravila, ki se začne z odkritjem nove zdravilne učinkovine, nadaljuje pa z načrtovanjem ustrezne farmacevtske oblike ali dostavnega sistema in slednjemu prilagojene izbire pomožnih snovi ter proizvodnega procesa.

V uvodnem prispevku predstavljamo konzervanse kot pomožne snovi za zagotavljanje mikrobiološke kakovosti zdravil, s poudarkom na novostih pri označevanju njihove vsebnosti in zgornjih varnih mej uporabe glede na smernice EMA. Drugi in tretji prispevek sta posvečena novostim s področja tehnoloških procesov. Liofilizacija je metoda izbora za pripravo stabilnih zdravil s proteinskimi učinkovinami, ekstrakcija s subkritično vodo pa se uveljavlja kot zelena, okolju prijazna tehnologija za pridobivanje rastlinskih ekstraktov. Premik po časovni lestvici izdelave zdravila nas pripelje do oblikovanja sistemov za ciljno dostavo učinkovin v debelo črevo, bodisi za lokalno zdravljenje bolezni debelega črevesa ali kot alternativna pot vnosa učinkovin. Za vsak napredek je bistveno, da pogled usmerjamo ne le v sedanjost, temveč tudi v prihodnost, zato drugi del te številke Farmaceutskega vestnika zaokrožujemo z novostmi, ki si utirajo pot v prakso. Polimerna nanovlakna imajo velik potencial ne le za dostavo učinkovin, temveč tudi za izdelavo tkivnih nadomestkov. Na področju nanodostavnih sistemov pa se uveljavljajo tudi nanoteranostiki, ki omogočajo posamezniku prilagojeno zdravljenje in neinvazivno zgodnjo diagnostiko bolezni. Čepprav poletje prinaša bolj sproščene počitniške dni, je prav, da ne pozabimo na preventivne ukrepe, ki so tudi ključ do bolj normalne jeseni. Nošenje zaščitnih mask je tako še vedno aktualno, s tem pa tudi prispevek o testiranju učinkovitosti filtrov in razvoju obraznih mask za zaščito pred virusi. Da novosti na tehnoloških področjih ni malo, potrjujejo najnovejši dosežki na področju cepiv na osnovi informacijske RNA proti koronavirusu SARS-CoV-2. V zadnjem prispevku vas tako čaka zanimivo branje o mehanizmih delovanja, načinu proizvodnje in dosedanjih kliničnih izkušnjah s profilaktičnimi cepivi na osnovi te platforme. Morda pridobljeno znanje še koga spodbudi, da cepivo čim prej preskusi tudi v praksi.

Upava, da vam bo poletna številka Farmaceutskega vestnika prinesla obilo zanimivih pa tudi uporabnih informacij, ki naj vam popestrijo počitniške dni.

*Izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm., gostujoča urednica
Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm., odgovorni urednik*



VSEBINA / CONTENT

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 147** Mirjam Gosenca Matjaž, Alenka Zvonar Pobirk
Mikrobiološka zaščita farmacevtskih izdelkov
Antimicrobial preservation of pharmaceuticals
- 159** Maja Bjelošević, Pegi Ahlin Grabnar
Pomen procesa liofilizacije v farmaciji
Importance of lyophilisation in pharmacy
- 167** Katja Schoss, Nina Kočever Glavač
Ekstrakcija s subkritično vodo za pridobivanje rastlinskih ekstraktov
Subcritical water extraction for the production of plant extracts
- 173** Sara Brunec, Mirjana Gašperlin
Tehnološke možnosti za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo s peroralnimi farmacevtskimi oblikami
Approaches to oral colon-specific drug delivery
- 180** Anže Zidar, Julijana Kristl, Alenka Zvonar Pobirk
Nanovlakna za dostavo učinkovin in tkivno inženirstvo
Nanofibers for drug delivery and tissue engineering
- 190** Črt Dragar, Mirjana Gašperlin, Petra Kocbek
Nanoteranostiki in njihov potencial v personalizirani medicini
Nanotheranostics and their potential in personalised medicine
- 199** Maruša Gostiša, Jurij Gostiša, Mirjam Gosenca Matjaž, Julijana Kristl
Filtriranje zraka in razvoj obraznih mask iz nanovlaken za zaščito pred virusi
Air filtration and the development of nanofiber face masks for protection against viruses
- 211** Ana Vencelj, Tomaž Bratkovič
Profilaktična cepiva na osnovi informacijske RNA proti nalezljivim boleznim
Prophylactic messenger RNA-based vaccines against infectious diseases

NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

MIKROBIOLOŠKA ZAŠČITA FARMACEVTSKIH IZDELKOV

ANTIMICROBIAL PRESERVATION OF PHARMACEUTICALS

AVTORICI / AUTHORS:

doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm.
izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: alenka.zvonar-pobirk@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Mikrobiološka kakovost je bistveni del celokupne kakovosti vsakega farmacevtskega izdelka. Vanje jo »vgradimo«
z upoštevanjem dobre proizvodne prakse (DPP) ter smernic, ki zagotavljajo ustrežno kakovost izdelkov tekom celotnega cikla zdravila, od izdelave do njegove uporabe. Predmet tega prispevka so nesterilne in sterilne farmacevtske oblike z vidika specifičnih zahtev glede mikrobiološke kakovosti in uporabe konzervansov. Kriteriji sprejemljivosti za **nesterilne farmacevtske oblike** se razlikujejo glede na način aplikacije zdravila in so podani v Evropski farmakopeji (Eur. Ph.) v poglavjih »Mikrobiološka kakovost nesterilnih farma-

POVZETEK

Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov je eden izmed ključnih aspektov zagotavljanja kakovostnih, varnih in učinkovitih zdravil. Zaradi strogih standardov zagotavljanja kakovosti v farmacevtski industriji jo lahko dojemamo kot samoumevno. Pa vendar, kot smo izkusili v letu pandemije, ni nič samoumevno. V prispevku predstavljamo različne pristope mikrobiološke zaščite farmacevtskih izdelkov z glavnim poudarkom na konzervansih, ki ščitijo izdelek pred sekundarno mikrobiološko kontaminacijo med shranjevanjem, distribucijo in uporabo izdelka. Na primeru konzervansov, katerih varnostno vprašanje je bilo izpostavljeno v zadnjih letih in je v primeru benzilalkohola, benzalkonijevga klorida in benzojske kisline oz. benzoatov tudi vodilo v nedavno revizijo označevanja zdravil s strani Evropske agencije za zdravila, želimo skozi prispevek izpostaviti tudi potrebo po nenehnem skrbnem spremljanju in oceni varnostnega tveganja, zlasti za najranljivejšo pediatrično skupino bolnikov.

KLJUČNE BESEDE:

benzalkonijev klorid, benzilalkohol, konzervansi, mikrobiološka kakovost, parabeni

ABSTRACT

The microbiological quality of pharmaceutical products is one of the key aspects of ensuring quality, safety and effectiveness of medicines. Due to strict quality assurance standards in the pharmaceutical industry, it can be considered as self-evident. Yet, as we experienced in the year of the pandemic, nothing really is. This review presents various approaches to microbiological protection of pharmaceutical products with the main emphasis on preservatives posing protection from secondary microbiological contamination of products during their storage, distribution and usage. Finally, case studies of preservatives which safety concerns have been raised up in recent years, are presented. In the case of benzyl alcohol, benzalkonium chloride and benzoic acid/benzoates, it resulted in a recent revision of medicine labelling by the European Medicines Agency, which highlights the need for continuous careful monitoring and safety risk



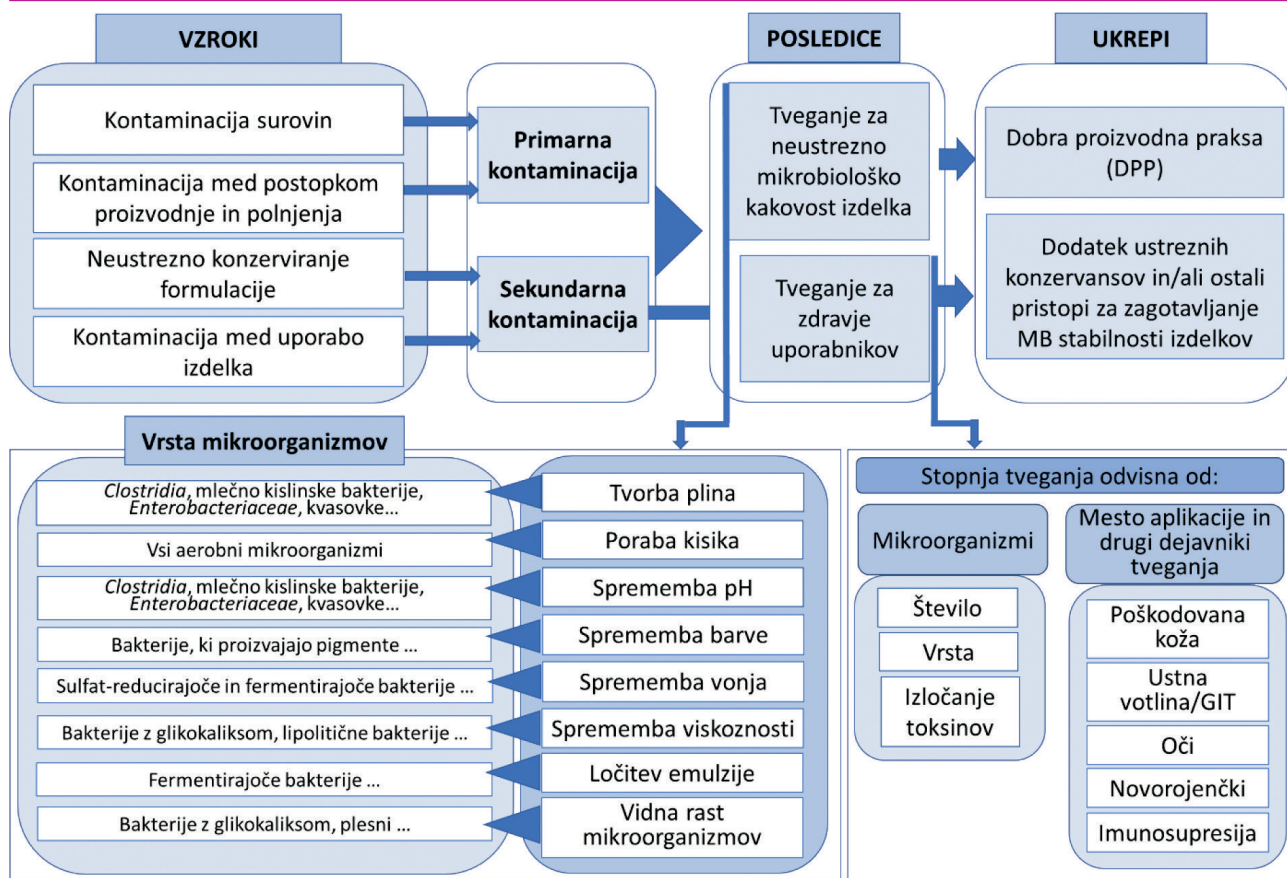
assessment of preservatives and other excipients, especially for the most vulnerable paediatric group of patients.

KEY WORDS:

benzalkonium chloride, benzyl alcohol, microbiological quality, parabens, preservatives

snovi in po postopkih, ki zagotavljajo sterilnost in preprečujejo vnos in rast kontaminantov v skladu z zahtevami v poglavju »Metode priprave sterilnih izdelkov« (5.1.1.) (1). Do mikrobiološke kontaminacije izdelka lahko pride bodisi v fazi izbora sestavin, izdelave in polnjenja izdelka v primarno ovojnino (**primarna kontaminacija**) ali v času shranjevanja, transporta in uporabe (**sekundarna kontaminacija**) (slika 1). Ker je primarna kontaminacija izdelka posledica uporabe surovin neustrezne mikrobiološke kakovosti ali neustrezne proizvodne prakse, je ključno dosledno upoštevanje kriterijev sprejemljivosti za mikrobiološko kakovost substanc za farmacevtsko uporabo ter proizvodnja v skladu z zahtevami dobre proizvodne prakse. Do sekundarne kontaminacije pa pride zaradi kontaminacije in/ali razraščanja mikroorganizmov med shranjevanjem in distribucijo izdelka (npr. zaradi neustreznega konzerviranja/ovojnine) ali v času uporabe. Poznamo različne strategije zaščite izdelkov pred sekundarno kontami-

cevtskih izdelkov in substanc za farmacevtsko uporabo« (5.1.4.) ter »Mikrobiološka kakovost zdravil rastlinskega izvora za peroralno uporabo in ekstraktov za njihovo izdelavo« (5.1.8.). Temeljijo na skupnem številu aerobnih mikroorganizmov in skupnem številu kvasovk in plesni ter odsotnosti specifičnih patogenov. **Sterilne farmacevtske oblike** (vključujoč parenteralne farmacevtske oblike, farmacevtske oblike za oko in dermalne farmacevtske oblike za uporabo na hudo poškodovani koži) pa izdelujemo iz



Slika 1: Vzroki in posledice kontaminacije izdelkov z mikroorganizmi (MO) ter možni ukrepi za zagotavljanje ustrezne mikrobiološke (MB) kakovosti; prirejeno po (2).

Figure 1: Causes, consequences and ways of preventing microbial contamination; adapted from (2).

nacijo. Medtem ko pri **fizikalnem pristopu** omejimo mikrobiološko kontaminacijo v izdelku z izbiro ustrezne ovojnine (npr. zrakotesno zaprti vsebniki z aplikatorjem), pri **fizikalno-kemijskem pristopu** zagotovimo vzpostavitev pogojev, ki so neugodni za preživetje mikroorganizmov. **Kemijski pristop** pa vključuje uporabo konzervansov kot pomožnih snovi, ki preprečujejo rast mikroorganizmov pri normalnih pogojih shranjevanja in uporabe (2, 3).

2 FIZIKALNO-KEMIJSKI PRISTOP MIKROBIOLOŠKE ZAŠČITE

Poleg razpoložljivih hranil sta za rast mikroorganizmov nujni tudi ustrezna temperatura in vsebnost vlage. Fizikalno-kemijski pristop v veliki meri temelji na **znižanju aktivnosti vode** v izdelku. Z aktivnostjo vode (a_w) opišemo vsebnost t. i. proste (*bulk*) vode in se razlikuje od celokupne vsebnosti vode, ki poleg proste vključuje tudi vezano vodo. Ker je mikroorganizmom razpoložljiva le prosta voda, poznavanje a_w nesterilnih formulacij poda pomembno informacijo o dovzetnosti izdelka za sekundarno mikrobiološko kontaminacijo. a_w opisuje enačba:

$$a_w = P/P_0 = n_1/(n_1 + n_2),$$

pri čemer so P delni tlak vodne pare nad izbranim izdelkom in P_0 delni tlak vodne pare nad čisto vodo pri enaki temperaturi, n_1 moli topila (vode) in n_2 moli topljenca. Znano je, da različni mikroorganizmi za svojo rast potrebujejo različne količine proste vode. Na osnovi poznavanja

a_w izdelka in potrebne minimalne a_w za rast posameznih mikroorganizmov (preglednica 1) lahko boljše načrtujemo ustrezno mikrobiološko zaščito izdelka tako s pristopi za znižanje a_w kot tudi z izbiro konzervansa, ki je prilagojena najverjetnejšim kontaminantom izdelka. V formulaciji lahko znižamo a_w z vključitvijo pomožnih snovi, ki vežejo vodo (npr. hidrofilni polimeri, sotopila in soli) ali povečajo osmolarnost izdelka (npr. sladkorji). Tako pri sirupih visoka vsebnost sladkorjev bistveno zmanjša a_w in s tem tudi potrebno koncentracijo konzervansa, ki mora izdelek zaščititi predvsem pred osmotolerantnimi kvasovkami. Določene farmacevtske oblike, kot so praški, tablete, svečke in mazila, pa že v osnovi izkazujejo zelo nizko a_w (tj. < 0,6) (4, 5). Na rast mikroorganizmov v formulaciji vpliva tudi **tip emulzije**. Zaradi prisotnosti vode v notranji fazi so emulzije tipa V/O manj dovzetne za kontaminacijo kot emulzije tipa O/V. K boljši mikrobiološki stabilnosti pripomore tudi velikost kapljic, zato so nanoemulzije v prednosti pred klasičnimi emulzijami. Na zaščito izdelka lahko ugodno vpliva tudi sestava oljne faze (npr. z večjo vsebnostjo fenolnih spojin). Tako tekoče emulzije kot tudi poltrdne emulzijske gele (tj. kreme) obeh tipov dodatno zaščitimo s konzervansi; izjema so sterilne formulacije, napolnjene v zrakotesnih vsebnikih (pogosto z zaporko z aplikatorjem) (2, 3).

Na mikrobiološko odpornost pomembno vpliva tudi pH formulacije. Ker je optimalna vrednost pH za proliferacijo glavnine mikroorganizmov med 5 in 8, predstavljajo izdelki z višjim ali nižjim pH manj ugodno okolje za njihovo rast in razmnoževanje. To še zlasti velja za formulacije s pH pod 3 ali nad 9; pri pH pod 3 lahko rastejo le nekatere odporne plesni. pH vrednost izdelka pa pomembno vpliva tudi na izbiro ustreznega konzervansa, tako z vidika njegove učinkovitosti kot tudi stabilnosti, kot predstavljamo v nadaljevanju (6, 7).

Preglednica 1: Aktivnosti vode (a_w), pri kateri so določeni mikroorganizmi sposobni preživetja; povzeto po (3).

Table 1: Proliferation ability of microorganisms in correlation to water activity (a_w); adapted from (3).

a_w	Mikroorganizmi, zmožni proliferacije
0,96–0,99	G ⁺ in G ⁻ bakterije (npr. <i>Pseudomonas</i> species), kvasovke in plesni
0,90–0,95	Nekatere G ⁻ in večina G ⁺ bakterij (npr. <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Echericchia coli</i> , <i>Bacillus</i> species), kvasovke (npr. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) in plesni
0,80–0,89	G ⁺ bakterije (npr. <i>Staphylococcus aureus</i>), kvasovke in plesni
0,70–0,79	Halofilne bakterije (npr. <i>Halobacterium halobium</i>), kvasovke in plesni (npr. <i>Aspergillus niger</i>)
0,62–0,69	Osmotolerantne kvasovke (npr. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)
pod 0,60	/

G⁺ – po Gramu pozitivne bakterije, G⁻ – po Gramu negativne bakterije

3 KEMIJSKI PRISTOP MIKROBIOLOŠKE ZAŠČITE

Konzervansi so pomožne snovi, ki v izdelku preprečijo rast mikroorganizmov v času roka njihove uporabe, tudi po odprtju. Njihova uporaba je nujna v večodmernih tekočih in poltrdnih izdelkih. Čeprav mikroorganizmi za svoje razmnoževanje potrebujejo vodo, je potrebno ustrezno zaščiti tudi lipidne in trdne formulacije, saj se lahko v slednjih tvorijo področja s prosto vodo, ki omogočajo njihovo rast in razmnoževanje (npr. mikrobiološko kvarjenje mazil in različnih stikov). Vsi konzervansi in njihove koncentracije, dovoljene za uporabo v farmaciji, so navedeni v *Handbook of Pharmaceutical Excipients* in Eur. Ph. Dodatek konzervansov nikoli ne sme nadomestiti postopkov dobre proizvodne prakse, niti jih ne smemo dodajati z namenom, da bi preprečili razraščanje mikroorganizmov v že kontaminiranih surovinah ali izdelkih. Glede na **mehanizem delovanja** (preglednica 2) ločimo konzervanse, ki poškodujejo celično steno in/ali membrano, s čimer vplivajo na permeabilnost in aktivnost (trans)membranskih encimov in ovirajo transport vode in hranilnih snovi. Tretja tarča je citoplazma mikroorganizmov, kjer nekateri konzervansi povzročijo denaturacijo proteinov in encimov ali strukturne spremembe pomembnih komponent celic, zavirajo celični metabolizem ali poškodujejo DNK oz. RNK. Pogosto je težko predvideti točno mesto delovanja konzervansov, saj je slednje odvisno tudi od uporabljene koncentracije (6, 8).

Pri izbiri primerne konzervansa moramo upoštevati tako vrsto farmacevtske oblike kot način aplikacije zdravila (preglednica 3) in starost bolnika. Ker idealen konzervans ne

obstaja, v praksi izbiramo takšne, ki imajo čim več naslednjih lastnosti: 1) delovanje pri čim nižji koncentraciji (pri kateri mora biti tudi netoksičen in nealergen), 2) definirano kemijsko zgradbo, 3) širok spekter delovanja, 4) učinkovitost v širokem pH območju, 5) ustrezno stabilnost (tudi pri povišani temperaturi, na svetlobi, pri različnih vrednostih pH, ki jim je lahko izpostavljen med izdelavo, shranjevanjem in uporabo izdelka), 6) primerno vodotopnost in porazdelitveni koeficient, ki omogoča, da ostane prednostno porazdeljen v vodni fazi, 7) kompatibilnost z drugimi sestavinami izdelka in ovojnino, 8) v primeru (per)oralne in nazalne aplikacije pa so pomembne tudi ustrezne organoleptične lastnosti (okus, vonj) (7, 9).

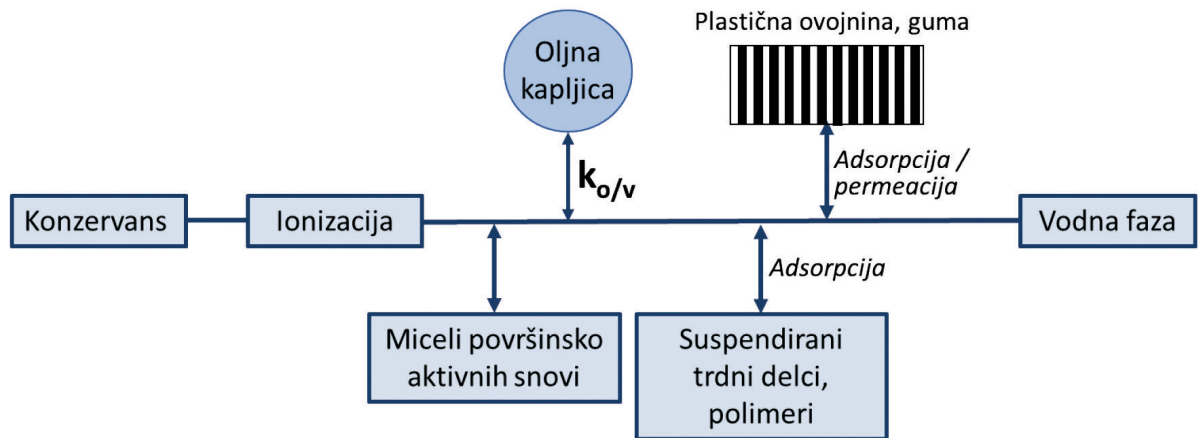
Večina konzervansov le delno ustreza navedenim kriterijem, zato pogosto uporabljamo kombinacije konzervansov oz. konzervansov in drugih sestavin s sinergističnim delovanjem, kar nam omogoča uporabo nižje koncentracije posameznega konzervansa. Učinek slednjih podpirajo npr. kelatorji kovinskih ionov, nekatera topila, higroskopne spojine, zdravilne učinkovine in eterična olja. V praksi pogosto kombiniramo metil- in propilparaben, saj je protimikrobna aktivnost parabenov obratno sorazmerna z vodotopnostjo in narašča z daljšanjem alkilne verige (butil > propil > etil > metil). Veliko se uporablja tudi kombinacija parabenov in EDTA (7, 10, 11).

Pri izbiri konzervansa moramo upoštevati tudi morebitne inkompatibilnosti s sestavinami formulacije (npr. površinsko aktivnimi snovmi) in izbrano ovojnino (možnost adsorpcije konzervansa na nekatere umetne mase in gumijaste zaporce) (preglednica 3). Dodaten izziv predstavlja konzerviranje večfaznih sistemov zaradi **porazdeljevanja konzervansa** med oljno in vodno fazo v skladu z njegovim porazdelitvenim koeficientom (v primeru emulzijskih sistemov) oz. možnosti **adsorpcije konzervansa na trdne**

Preglednica 2: Mesto delovanja izbranih konzervansov v mikrobnih celicah; povzeto po (8).

Table 2: Site of selected preservatives' activity in microbial cell; adapted from (8).

Celična stena	Citoplazemska membrana	Citoplazma
Fenoli	2-fenoksietanol	2-fenoksietanol in drugi organski alkoholi
Alifatske in aromatske karboksilne kisline	parabeni	alifatske in aromatske karboksilne kisline
Organske živosrebrove spojine	organske živosrebrove spojine	halogenirani konzervansi
EDTA	EDTA	/
Klorheksidin, cetrimid	klorheksidin, heksaklorofen	klorheksidin (visoke koncentracije)
Glutaraldehid	spojine, ki sproščajo formaldehid (npr. bronopol, imidurea)	spojine, ki sproščajo formaldehid (npr. bronopol, imidurea)
Anionske površinsko aktivne snovi	benzalkonijev klorid	/



Slika 2: Koncentracija molekule konzervansa v vodni fazi formulacije je odvisna od stopnje ionizacije molekule, porazdeljevanja v oljno fazo ali micelle površinsko aktivnih snovi, možna je tudi adsorpcija na suspendirane delce ter adsorpcija/permeacija v plastične zaporke. Prirejeno po (12).

Figure 2: The concentration of active form of preservative molecules in an aqueous phase of formulations depends on the state of ionisation of the molecule, partitioning into oil droplets or surfactant micelles, as well as adsorption onto suspended solids or adsorption/permeation of plastic closures. Adapted from (12).

delce (v primeru suspenzij) ali **polimere**, ki se uporabljajo kot zgoščevala. Na porazdeljevanje v oljno fazo moramo biti pozorni npr. pri bolj lipofilnih analogih parabenov (propil- in butilparaben), medtem ko je za klorheksidin značilno porazdeljevanje v micelle in adsorpcija na polimerna suspendirajoča sredstva. Oboje vodi v znižanje koncentracije konzervansa v vodni fazi, zato je potrebno ustrezno povečati njegovo koncentracijo v formulaciji (slika 2) (7, 9).

Od pH formulacije ni odvisna le rast mikroorganizmov, ampak tudi interakcije konzervansov s komponentami njihove celične stene in s tem minimalna inhibitorna koncentracija konzervansa. Učinkovitost slednjih je najboljša, ko je pH formulacije znotraj pH območja njihove optimalne aktivnosti (preglednica 3). Od pH odvisna aktivnost je povezana s kemijsko strukturo konzervansov. Kadar so slednji aktivni v neionizirani obliki (npr. kisline, alkoholi ali fenoli), je njihova učinkovitost najboljša, ko je $\text{pH}_{(\text{formulacije})} \leq \text{pK}_{a(\text{konzervansa})}$. Vpliv pH na aktivnost konzervansov je sicer kompleksen, saj je protibakterijsko delovanje benzojske pa tudi propionske in sorbinske kisline veliko bolj odvisno od pH kot njihova aktivnost proti glivam, ki je ohranjena tudi pri višjih vrednostih pH (2, 6, 7).

3.1 VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI KONZERVANSOV

Za vse konzervirane farmacevtske izdelke moramo dokazati upravičenost uporabe in učinkovitost izbranih konzervansov

s farmakopejskim preskusom »Učinkovitost konzervansov« (5.1.3), s katerim vrednotimo celokupno protimikrobno zaščito izdelka (1). K slednji skupno prispevajo značilnosti formulacije, vgrajeni konzervansi in primarna ovojnina. Osnovni princip testa je **masovna** in **namerna** inokulacija izdelka (najbolje v originalnem vsebniku) s standardnimi mikroorganizmi ter spremljanje njihovega števila skozi predpisano časovno obdobje. Protimikrobna zaščita je ustrezna, v kolikor pride po inokulaciji do značilnega (in trajnega) zmanjšanja števila mikroorganizmov.

Eur. Ph. definira inokulacijo testiranih izdelkov s *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ter *Aspergillus brasiliensis* do končnega inokuluma 10^5 (v primeru gliv) oz. 10^6 (v primeru bakterij) kolonizirajočih enot (CFU) na ml oz. g izdelka. Dodatno lahko uporabimo tudi verjetne kontaminante kot *Escherichia coli* za peroralne formulacije ter *Zygosaccharomyces rouxii* za peroralne farmacevtske oblike z visoko koncentracijo sladkorja (sirupe). Količina dodane suspenzije mikroorganizmov pri tem ne sme presežati 1 % volumna izdelka, s čimer se izognemo redčenju izdelka oz. konzervansa. Inokulirano formulacijo shranjujemo zaščiteno pred svetlobo pri 20 do 25 °C in glede na vrsto izdelka spremljamo število mikroorganizmov v časovnem intervalu 0 do 28 dni. Kot rezultat podamo logaritem zmanjšanja koncentracije mikroorganizmov (CFU/ml) glede na začetni inokulum, ki mora glede na zahtevano stopnjo mikrobiološke zaščite farmacevtskih izdelkov ustrezati kriteriju A ali B. Kriterij A izraža priporočljivo



Preglednica 3: Skupine pogosto uporabljenih konzervansov za različne načine aplikacije s pH-območji, pri katerih so optimalno aktivni, ter nekaterimi substrati oz. adsorbenti, ki jih lahko deaktivirajo. Povzeto po (6–8).

Table 3: Common preservatives for pharmaceutical products: pH of optimum activity plus some adsorbents/substrates playing a part in their inactivation. Adapted from (6–8).

Način aplikacije	Konzervans	Kemijska skupina	pH	Adsorbent / substrat
(Per)oralno	Metil-, etil-, propilparaben (in kombinacije)	estri aromatskih karboksilnih kislin	4–8	nekatero plastike, ionsko izmenjevalne smole, želatina
	Na-benzoat in benzojska kislina	aromska karboksilna kislina	≤ 4,5	kaolin
	Sorbinska kislina, K-sorbat propionska kislina	alifatske karboksilne kisline	4,5 3,9	polipropilen (PP), PVC, polietilen (PE)
	Metilparaben + Na-benzoat (kombinacija)		-	
Dermalno (vključno z nazalno)	Benzalkonijev klorid, cetrimonijev bromid, benzetonijev klorid, alkiltrimetilamonijev klorid (tudi v kombinaciji z EDTA)	kvarterne amonijeve spojine; kelator kovinskih ionov	4–10	HPMC
	Metil-, etil-, propil-, butilparabeni (in kombinacije)	estri aromatskih karboksilnih kislin	4–8	nekatero plastike, ionsko izmenjevalne smole, želatina
	Benzilalkohol, cetil- in stearylalkohol	aromatski in alifatski alkoholi	≤ 5	PE, guma
	Benzojska kislina, sorbinska kislina	aromske in alifatske karboksilne kisline	≤ 4,5 4,5	kaolin PP, PVC, PE
	Kloroacetamid, triklorokarbon	alifatski in aromatski amidi	-	
	Tiomersal	organske živosrebrove spojine	Kisel pH	PE/druge plastike, guma
	Imidurea, bronopol	spojine, ki sproščajo formaldehid	3–9 5–8	
	Klorheksidin	bigvanidi	5–7	Na-karbosimetil celuloza
	Klorokrezol, klorooksilenol, diklorofen, heksaklorofen	fenoli	4–9	PVC, celulozni derivati
2-fenoksietanol		3–10		
Parenteralno (vključno s cepivi)	Benzilalkohol, 2-etoksietanol, klorobutanol	aromatski in alifatski alkoholi	≤ 5	PE, gumaPE
	Metil-, etil-, propil-, butilparaben (in kombinacije)	estri aromatskih karboksilnih kislin	4–8	nekatero plastike, ionsko izmenjevalne smole, želatina
	Benzojska kislina, sorbinska kislina	aromske in alifatske karboksilne kisline	≤ 4,5 4,5	kaolin PP, PVC, PE
	Klorheksidin	bigvanidi	5–7	Na-karbosimetil celuloza
	Fenol, m-krezol, 2-fenoksietanol	fenoli	4–9 3–10	PVC, celulozni derivati
	Tiomersal, fenil živosrebrove soli	organske živosrebrove spojine	kisel pH 5–8	PE/druge plastike, gumarazlična suspendirajoča sredstva

Okularno	Kvarterne amonijeve spojine (benzalkonijev klorid in druge); tudi v kombinaciji z EDTA	kvarterne amonijeve spojine; kelator kovinskih ionov	4–10	HPMC
	2-fenoksietanol	fenoli	3–10	PVC, celulozni derivati
	Tiomersal, fenil živosrebrove soli	organske živosrebrove spojine	kisel pH 5–8	PE/druge plastike, gumarazlična suspendirajoča sredstva
	Benzojska kislina, Na-benzoat, sorbinska kislina, K-sorbat	aromske in alifatske karboksilne kisline	≤ 4,5 4,5	kaolin PP, PVC, PE
	Klorheksidin, poliaminoproilbigvanid, poliheksametilbigvanid	bigvanidi	5–7	Na-karbosimetil celuloza
	Imidurea	spojine, ki sproščajo formaldehid	3–9	

učinkovitost, ki jo je potrebno doseči. V utemeljenih primerih, kjer kriterija A ne moremo doseči (na primer zaradi večje možnosti neželenih reakcij), pa mora biti izpolnjen kriterij B (1).

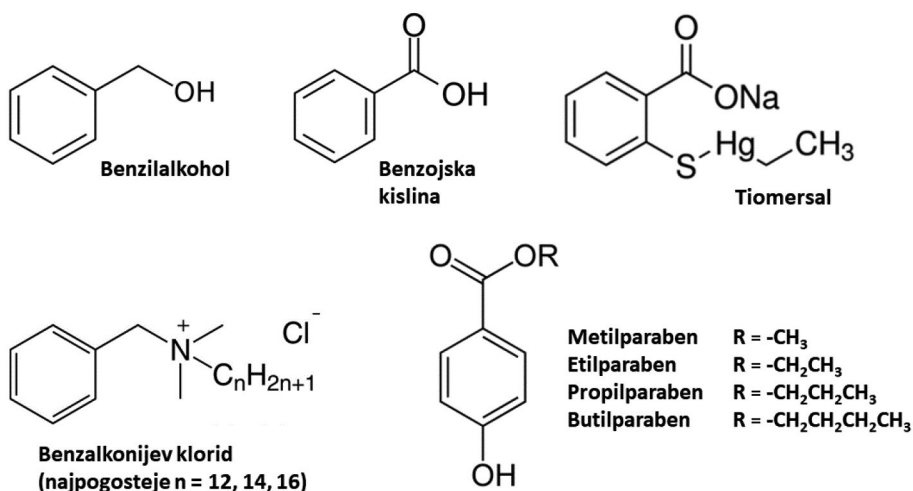
profilu, zlasti za pediatrično populacijo (13). Podrobneje je proučila tudi konzervanse, in sicer benzilalkohol, benzalkonijev klorid in benzojsko kislino oz. benzoate, ki so ob tiomersalu in parabenih (slika 3) tudi sicer pod drobnogledom zaradi potencialnih škodljivih učinkov na zdravje.

4 PRIMERI UPORABE IN OZNAČEVANJE DOLOČENIH KONZERVANSOV V ZDRAVILIH

4.1 BENZILALKOHOL IN TIOMERSAL V VEČODMERNIH PARENTERALNIH FARMACEVTSKIH OBLIKAH

V I. 2017 je EMA revidirala navodila za označevanje zdravil v povezavi z nekaterimi pogosto uporabljanimi pomožnimi snovmi, s posebnim poudarkom na njihovem varnostnem

Poseben izziv za konzerviranje predstavljajo večodmerne vodne parenteralne farmacevtske oblike, ki morajo zaradi možnosti kontaminacije med večkratnim odvzemom nujno



Slika 3: Kemijske strukture izbranih konzervansov.

Figure 3: Chemical structure of selected preservatives.

vsebovati konzervans (razen če sama farmacevtska oblika izkazuje ustrezne protimikrobne lastnosti). Parenteralne farmacevtske oblike s klasičnimi zdravilnimi učinkovinami, t. i. majhnimi molekulami, so najpogosteje konzervirane z benzilalkoholom ali kombinacijo metil- in propilparabena (razmerje 9 : 1 do skupno 0,2 %), pogosto se uporabljajo tudi fenol, klorbutanol, m-krezol, fenoksietanol ter tiomersal, večinoma v zelo nizkih koncentracijah od 0,002 do 1 % (14–16). Konzerviranje parenteralnih farmacevtskih oblik s proteinskimi učinkovinami, vključujoč monoklonska protitelesa, pa je zlasti zahtevno zaradi možnih interakcij s konzervansom, ki lahko vodijo v fizikalno nestabilnost ali oksidacijo proteinske molekule. To je problematično tako z vidika učinkovitosti kot dolgoročne (ne)stabilnosti. Zaradi specifičnih lastnosti so ti pripravki v obliki liofilizatov, kjer je v primeru večodmernih farmacevtskih oblik konzervans (najpogosteje m-krezol, fenol, benzilalkohol ali benzalkonijev klorid) dodan v medij za rekonstitucijo (17).

Benzilalkohol v parenteralnih farmacevtskih oblikah klasično uporabljamo v koncentraciji 0,5 do 2 %, v parenteralnih proteinskih pripravkih pa od 0,9 do 1,1 % (14). Deluje tudi kot lokalni anestetik, zaradi česar je intramuskularna aplikacija manj boleča. Dodajamo ga tudi v peroralne farmacevtske oblike (do 2 %) in kozmetične izdelke (do 1 %). Učinkovit je proti večini po Gramu pozitivnih bakterij, kvasovk in plesni, manj pa proti po Gramu negativnim bakterijam. Izrazito problematičen je za nedonošenčke in novorojenčke po intravenski aplikaciji. Zaradi še nerazvitega encimskega sistema pride do akumulacije benzilalkohola in njegovega metabolita benzojske kisline, ki ob sočasni metabolični acidozi vodi v življenje ogrožajoče stanje z značilnim »sindromom lovljenja sape« (*gasping syndrome*), hudimi nevrološkimi in hematološkimi motnjami ter odpovedjo srca (18). Upošteva nove smernice EMA za označevanje morajo zato navodila za uporabo tako za zdravila za parenteralno pa tudi peroralno dostavo vsebovati opozorilo, da je/se benzilalkohol 1) povezan z nevarnostjo pojava resnih neželenih učinkov, vključujoč »sindrom lovljenja sape«, pri mlajših otrocih; 2) ne uporablja pri novorojenčkih do četrtega tedna starosti, razen po navodilu zdravnika; 3) ne uporablja več kot en teden pri otrocih do tretjega leta starosti, razen po navodilu zdravnika ali farmacevta ter 4) morajo nosečnice in doječe matere ter bolniki z boleznimi ledvic ali jeter posvetovati z zdravnikom ali farmacevtom o uporabi zaradi možnosti akumulacije v telesu in nastanka metabolične acidoze (19).

Tiomersal v cepivih je še vedno aktualna tema, tako kot varnost cepiv v celoti, ki še zlasti v luči trenutne epidemiološke situacije zaradi covid-19 le pridobiva na razsežnosti.

Tiomersal je tako še vedno tema različnih polemik, čeprav njegove morebitne vpletenosti v povečano pojavnost avtizma in ostalih razvojnih motenj niso dokazali v nobeni izmed raziskav, izvedenih s tiomersalom v koncentracijah, ki se uporabljajo v cepivih (20, 21). Metil živo srebro (metil Hg), s katerim najpogosteje pridemo v stik z morskno hrano (npr. tunino), je dejansko nevrotoksična oblika organskega Hg, zlasti za nerojene in majhne otroke. Svetovna zdravstvena organizacija je zato določila zgornjo varno vrednost za dnevno izpostavitvev metil Hg, ki je za majhne otroke, nosečnice, doječe matere in ženske v rodni dobi še bistveno nižja v primerjavi s povprečnim odraslim; v obeh primerih pa so upoštevani veliki varnostni faktorji. Navedene vrednosti se upoštevajo tudi za tiomersal, ki je skupaj s svojim metabolitom etil Hg sicer veliko manj toksičen kot metil Hg. Za razliko od slednjega, ki se nalaga v telesu, je za etil Hg značilna zelo hitra eliminacija. Kljub temu so iz previdnostnih razlogov na začetku 21. stoletja v ZDA umaknili tiomersal iz večine cepiv, čemur je sledila tudi Evropa. Po trenutno dostopnih podatkih v Sloveniji dostopna cepiva ne vsebujejo tiomersala (22).

4.2 BENZALKONIJEV KLORID V PRIPRAVKIH ZA OKO

Za konzerviranje pripravkov za oko priporočajo različne konzervanse (preglednica 3). Po razširjenosti močno izstopa **benzalkonijev klorid**, ki se uporablja že od l. 1950 in je zaradi visoke učinkovitosti, ustreznega varnostnega profila in nizke alergnosti prisoten v treh četrtinah izdelkov. V vlogi konzervansa ga pogosto najdemo tudi v vodnih pripravkih za inhaliranje ali aplikacijo v nos, redko pa v farmacevtskih oblikah za druge poti vnosa (23). Kot konzervans se uporablja v koncentracijah 0,004 do 0,025 %. Deluje fungicidno ter baktericidno predvsem na po Gramu pozitivne bakterije, medtem ko se aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam ojača v kombinaciji z EDTA (0,1 %). Zaradi dolge zgodovine uporabe so dobro raziskani tudi neželeni učinki po nanosu benzalkonijevega klorida, predvsem v povezavi s kapljicami za zdravljenje glavkoma in uporabo umetnih solz za blaženje sindroma suhega očesa, kjer kronična in progresivna narava obeh bolezniju zahteva večletno uporabo pripravkov za oko. V obširnih kliničnih raziskavah so potrdili koncentracijsko in časovno odvisne neželene učinke benzalkonijevega klorida na površino očesa, ki se odražajo v paleti kliničnih znakov, od občutka povečanega nelagodja, suhega očesa, ostrega, bolečega ali srbečega občutka in zmanjšane tvorbe ter obstojnosti solznega filma do vnetnih sprememb. Ker lahko slednji

zelo poslabšajo sodelovanje bolnikov, so zaželene formulacije s podaljšanim delovanjem, ki močno zmanjšajo izpostavljenost očesa benzalkonijevemu kloridu in omilijo navedene sopojavae. Nasprotno pa njegova uporaba ni problematična pri kratkotrajni uporabi, kot je v primeru zdravljenja vnetij ali infekcij (24–26).

Težave, ki lahko spremljajo dolgotrajno uporabo benzalkonijevega klorida v pripravkih za oko, so obšli z enoodmernimi farmacevtskimi oblikami za oko. Slednje imajo izboljšan varnostni profil, a so tudi neprimerljivo dražje (za faktor 5–10) in v primerjavi z večodmernimi konzerviranimi farmacevtskimi oblikami tudi bolj obremenjujejo okolje. Vsebnik vsebuje 0,1 do 1 ml tekočine in naj bi ga po aplikaciji ene do dveh kapljic v posamezno oko ali obe očesi zavrgli skupaj z zaostalo tekočino. V praksi jih ljudje zelo pogosto uporabljajo, dokler ne zmanjka vsebine, kar predstavlja visoko mikrobiološko tveganje. Omeniti velja tudi oteženo rokovanje z enoodmernimi vsebniki pri starejših ali ljudeh z zmanjšano fino motoriko (npr. nerodno odpiranje pokrovčka ter težavno stiskanje vsebnika zaradi trše plastike). Alternativo slednjim predstavljajo inovativni večodmerni vsebniki, ki med uporabo zagotavljajo sterilnost vsebine s pomočjo tehnoloških rešitev, ki vključujejo bifunkcionalno membrano s protimikrobnimi lastnostmi, globinski filter ali posebni enosmerni ventil, ki preprečuje vstop mikroorganizmov v notranjost vsebnika po odprtju (26). Zanimivo inovacijo namenjeno konzerviranim kapljicam pa predstavljajo vsebniki s filtri, na katere se konzervans med aplikacijo adsorbira in tako ne pride v stik z očesno sluznico (24).

V večodernih kapljicah za oko uporabljamo tudi alternativne konzervanse, vendar je nabor relativno majhen zaradi zahtevanih visoke protimikrobne učinkovitosti in netoksičnosti (26). Glede na mehanizem delovanja v osnovi ločimo dve skupini:

a) Oksidirajoči konzervansi, ki oksidirajo posamezne komponente mikroorganizmov in vplivajo na sintezo njihovih proteinov. Po aplikaciji se pod vplivom svetlobe ali v stiku s solzno tekočino razgradijo ne neškodljive produkte. V uporabi so natrijev perborat (GenAqua®, Dequest®), stabiliziran oksiklorokompleks (Purite®, OcuPure®) ter Sofzia®, ki je pufrna raztopina cinkovega klorida, borata, propilen glikola in sorbitola. Natrijev perborat je eden izmed prvih oksidirajočih konzervansov in v skladu z idejo »*disappearing*« konzervansov ob stiku z vodo tvori vodikov peroksid, ki ga v očesni sluznici prisotne katalaze razgradijo na kisik in vodo. Stabiliziran oksiklorokompleks v raztopini tvori radikale klorovega dioksida, po aplikaciji na oko pa se pod vplivom svetlobe razgradi v natrijev klorid, kisik in vodo. Sicer maloštevilne

raziskave potrjujejo značilno manj izražene neželene učinke na očesno površino v primerjavi z benzalkonijevim kloridom (26).

b) Polikvarternij-I (polyquaternium-I, Polyquad®) kot konzervans v tekočinah za leče uporabljamo že več kot 30 let in številne raziskave potrjujejo njegovo učinkovitost ter biokompatibilnost. Čeprav je kvarterna amonijeva spojina, ima v primerjavi z benzalkonijevim kloridom značilno manj izražene neželene učinke na očesni površini. Polikation polikvarternij-I je namreč polimer in kot tak bistveno večja molekula z manjšo sposobnostjo penetracije v tkiva (26, 27).

Zadnje izdano mnenje EMA z leta 2009 glede uporabe konzervansov v pripravkih za oko sicer ne podaja splošnega priporočila o odsotnosti konzervansov, poudarja pa smotrnost uporabe pripravkov brez konzervansov v primeru dolgotrajne terapije ali za ljudi, ki so nanje občutljivi. Ne-konzervirane farmacevtske oblike za oko EMA močno priporoča za uporabo pri otrocih, zlasti novorojenčkih. Konzervansi se morajo uporabljati v najnižji učinkoviti koncentraciji glede na rezultat preskusa »Učinkovitost konzervansov«, izogibati pa se je potrebno Hg spojinam (npr. tiomersalu), tudi z vidika zmanjševanja izpostavljenosti okolja Hg (28). Upošteva aktualne smernice EMA je potrebno v primeru zdravil za oči, ki vsebujejo benzalkonijev klorid, označiti, da 1) se le-ta lahko absorbira v mehke leče in jih obarva; 2) je potrebno pred aplikacijo zdravila leče odstraniti in jih ponovno vstaviti po 15 minutah; 3) benzalkonijev klorid lahko povzroči draženje oči, zlasti v primeru sindroma suhega očesa ali težav z roženico. V primeru izrazitega neugodja, zbadanja ali bolečine po uporabi zdravila se je potrebno posvetovati z zdravnikom (29).

4.3 BENZOJSKA KISLINA IN BENZOATI V PERORALNIH, PARENTERALNIH IN DERMALNIH FARMACEVTSKIH OBLIKAH

Za konzerviranje navedenih farmacevtskih oblik se benzojska kislina in predvsem njene K- ali Na-soli (benzoati) uporabljajo v koncentraciji 0,01 do 0,2 %. Glavno varnostno vprašanje se nanaša na njeno sposobnost sproščanja bilirubina z albumina, varnostno tveganje pa je veliko zlasti za novorojenčke, kar je tudi vodilo v revizijo navodil. Fiziološka zlatenica je pogost pojav pri novorojenčkih, prevelike koncentracije nevezanega oz. prostega bilirubina v serumu pa delujejo nevrotoksično in lahko povzročijo okvaro osrednjega živčevja (kernikerus). Tveganje je povezano tako s



peroralno, parenteralno kot tudi dermalno aplikacijo (obseg dermalne absorpcije benzojske kisline je pri novorojenčkih zelo velik) ter tudi s sočasno aplikacijo benzilalkohola, ki se metabolizira do benzojske kisline. Na navodilih za uporabo zdravil za opisane poti aplikacije je zato potrebno označiti, da lahko benzojska kislina povzroči zlatenico (prepoznavno po rumenem obarvanju kože in oči) pri dojenčkih do četrtega tedna starosti. V primeru dermatikov je zahtevana še navedba dodatnega opozorila o možnosti lokalnega draženja (30).

4.4 PARABENI V PERORALNIH IN DERMALNIH FARMACEVTSKIH OBLIKAH

Parabeni so estri parahidroksibenzojske kisline in njihove natrijeve soli in so zadnjih 80 let eni najpogosteje uporabljenih konzervansov v hrani, kozmetičnih in farmacevtskih izdelkih, ki jih učinkovito zaščitijo proti kvasovkam in plesnim, manj pa proti po Gramu negativnim bakterijam. Medtem ko se po peroralni aplikaciji zelo hitro absorbirajo in metabolizirajo v jetrih ter izločijo z urinom, se po dermalnem nanosu absorbirajo le v manjšem obsegu (za izračun meje varnosti se upošteva 3,7-odstotna dermalna absorpcija). Ker hidroliza do parahidroksibenzojske kisline v koži ni popolna, jih zaradi možnega estrogenega delovanja ne moremo obravnavati kot popolnoma varne spojine. V EU tako sistematično zbiramo in proučujemo podatke o njihovi varnosti, s čimer je povezano tudi redno posodabljanje predpisov, ki urejajo njihovo uporabo v različnih izdelkih, ki smo jim pogosto sočasno izpostavljeni. Z namenom doseganja sinergističnega učinka in s tem čim nižje vsebnosti konzervansov v izdelkih pogosto uporabljamo kombinacijo metil- in propilparabena. V farmaciji je najbolj razširjena v peroralnih farmacevtskih oblikah, kjer je njuna vsebnost največkrat 0,015 do 0,2 % (metilparaben) oz. 0,02 do 0,06 % (propilparaben) (31). EMA sicer maksimalno dovoljeno koncentracijo propilparabena omejuje na 100 mg/kg/dan. Etilparaben in butilparaben se manj uporabljata, slednji predvsem v dermalnih pripravkih.

Parabeni imajo dolgo zgodovino uporabe tudi v kozmetični industriji, kjer so jih povezovali zgolj z možnostjo pojava alergijskih reakcij. Odkar je bila l. 2004 v reviji *Journal of Applied Toxicology* objavljena raziskava, v kateri so poročali o povečani vsebnosti parabenov v tumorjih dojke onkoloških bolnic, v strokovni in širši javnosti poteka intenzivna diskusija o varnosti njihove uporabe v kozmetičnih izdelkih (za pod pazduho) in tveganjem za razvoj raka dojke. Čeprav sta tudi

avtorja raziskave dodatno pojasnila, da parabenov nista označila kot vzrok za pojav raka in da nenazadnje niti ni znano, po kateri poti so parabeni prišli v tumorje oz. kaj je bil njihov izvor, je dvom o varnosti parabenov ostal. Znanstveni odbor za potrošniške izdelke (*Scientific Committee on Consumer products*, SCCP) tako že 15 let intenzivno spremlja varnost parabenov v kozmetičnih izdelkih in je od leta 2005 izdal več mnenj (zadnje v l. 2021). V vseh so prišli do zaključka, da ni znanstvenih dokazov, ki bi kazali na povečano tveganje za razvoj raka dojke ob uporabi konzerviranih kozmetičnih izdelkov za pod pazduho. So pa na podlagi teh raziskav uvrstili parabene med morebitne endokrine motilce, čemur so prilagodili njihove maksimalne dovoljene koncentracije in prepovedali uporabo dolgoveržnih derivatov (izopropil- in izobutil- ter pentil-, fenil- in benzilparabeni niso dovoljeni v kozmetičnih izdelkih, ki so prišli na tržišče po l. 2014). Metil- in etilparaben še naprej veljata kot varna, njuna vsebnost v kozmetičnih izdelkih pa je lahko do 0,4 % (kot posamezen ester) oz. do 0,8 % (za zmesi parabenov). Od leta 2016 je maksimalna dovoljena koncentracija za propil- in butilparaben znižana na 0,14% (posamezno ali v kombinaciji). SCCS je pred kratkim izdal novo mnenje o varnosti propilparabena, ki je potrdilo izsledke iz leta 2016, za butilparaben pa je ponovna presoja varnosti še v teku. Na predlog SCCS je Evropska komisija leta 2016 tudi prepovedala uporabo propil- in butilparabena v kozmetičnih izdelkih, ki se ne spirajo in so namenjeni negi pleničnega področja pri otrocih, mlajših od treh let (32–34).

Pri proučevanju varnosti parabenov sodeluje tudi Evropska agencija za varnost hrane (EFSA), saj parabene v vlogi konzervansov uporabljamo tudi v živilih (maksimalna dovoljena vsebnost v končnem živilu je do 0,2 % oz. 0,1 % v pijačah) (35). EFSA maksimalni skupni dnevni vnos metil- in etilparabena (navajana kot E218 in E214) omejuje na do 10 mg/kg telesne mase, medtem ko je uporaba propilparabena v živilih v EU od l. 2006 prepovedana zaradi potencialnega vpliva na razvoj moških reproduktivnih organov. Pri metilparabenu tovrstnih učinkov niso zaznali in še naprej velja za varnega tudi za celotno pediatrično populacijo. Na podlagi prepovedi uporabe propilparabena v hrani lahko utemeljimo tudi prepoved njegove uporabe v zdravilih za novorojenčke, dojenčke in majhne otroke, tudi v primeru kratkotrajne uporabe (36).

4.5 KONZERVANSI V ZDRAVILIH ZA OTROKE

Primeri zgoraj opisanih konzervansov osvetljujejo zahtevnost in večplastnost oblikovanja zdravil za otroke, kjer sle-

dimo splošnemu vodilu po čim bolj enostavni končni formulaciji z minimalnim številom in vsebnostjo pomožnih snovi, brez nepotrebnih dodatkov. Če je mogoče, se namesto konzervansov raje poslužujemo inovativnih tehnoloških rešitev. Kadar to ni možno, mora biti uporaba konzervansov tehtna in upravičena ter vedno v najnižjih koncentracijah, ki še zagotavljajo ustrezno zaščito. Pomanjkanje relevantnih kliničnih raziskav postavlja ključno vprašanje, ali so varnostni podatki, pridobljeni na odraslih prostovoljcih, relevantni za pediatrično populacijo. Ali naj bo uporaba konzervansov prepovedana v vseh starostnih skupinah ali le za novorojenčke in dojenčke, morda le v primeru dolgotrajne uporabe? Morebiti so lahko dovoljeni za starejše otroke, vendar koliko stare? Ali je vprašljiva tudi kratkotrajna uporaba (36)? Nešteto vprašanj, odgovor pa ni en sam in še zdaleč ne enoznačen. V pomoč glede dolgotrajne izpostavljenosti lahko služijo podatki EFSA ter na novo vzpostavljena podatkovna baza STEP (*Safety and Toxicity of Excipients for Pediatrics* (37)), vsekakor pa je prva izbira vedno uporaba pripravkov brez konzervansov. Izpostavljenost konzervansom lahko zmanjšamo tudi s tem, da tradicionalne večodmerne tekoče pripravke nadomestimo z alternativnimi otrokom prijaznimi farmacevtskimi oblikami, kot so npr. orodisperzibilne tablete, minitablete, oralni filmi in slamice, ki jih praviloma ni potrebno konzervirati (38, 39).

5 SKLEP

Mikrobiološka kakovost je integralni del vsakega farmacevtskega izdelka. Ustrezno načrtovanje pomožnih snovi, vključno s konzervansi, je ključnega pomena za razvoj optimalnega zdravila. Poleg osnovnih informacij o konzervansih, katerih poznavanje je pomembno s tehnološkega vidika, moramo redno spremljati tudi informacije o njihovi varnosti, ki jih z namenom zagotavljanja kakovostnih in varnih zdravil kontinuirano nadgrajujejo. Regulatorni organi namreč nenehno spremljajo varnostni profil pomožnih snovi, vključujoč konzervanse, kar se odraža tudi v prilagajanju zgornjih varnih mej uporabe in reviziji označevanja zdravil na osnovi najnovejših znanstvenih dognanj. Ključno je, da bodo takšnemu trendu sledili tudi v prihodnje, zato so relevantne znanstvene raziskave, predvsem z vidika ocene varnostnega tveganja za različne načine aplikacije in specifične skupine bolnikov, še kako upravičene.

6 LITERATURA

1. *European Pharmacopoeia online 10.0* [Internet]. Council of Europe Edqm 01/2020 [cited 2021 March 15]. 625-27 p. Available from: <https://pheur.edqm.eu/home>
2. Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. *Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies*. *Molecules*. 2018 Jun 28;23(7):1571.
3. Dao H, Lakhani P, Police A, Kallakunta V, Ajjarapu SS, Wu KW, et al. *Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products*. *AAPS PharmSciTech*. 2018 Jan;19(1):60-78.
4. Tapia MS, Alzamora SM, Chirife J. *Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation*. In: Barbosa-Cánovas GV, Fontana Jr. AJ, Schmidt SJ, Labuza TP, editors. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications, Second Edition* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2020 [cited 2021 April 15]. Chapter 14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118765982.ch14>
5. Cundell T. *The role of water activity in the microbial stability of non-sterile drug products*. *Eur Pharm Rev*. 2015 March;20(1):58-63.
6. Anurova MN, Bakhrushina EO, Demina NB, Panteleeva ES. *Modern Preservatives of Microbiological Stability (Review)*. *Pharma Chem J*. 2019 Sept 53, 564-71.
7. *American Pharmaceutical Review™* [Internet]. *Antimicrobial Preservatives Part Two: Choosing a Preservative* [update 2017 October; cited 2021 April 16]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/343543-Antimicrobial-Preservatives-Part-Two-Choosing-a-Preservative/>
8. *American Pharmaceutical Review™* [Internet]. *Antimicrobial Preservatives Part One: Choosing a Preservative System* [update 2012 January; cited 2021 April 16]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38886-Antimicrobial-Preservatives-Part-One-Choosing-a-Preservative-System/>
9. Baumgartner S., Bajramović N. *Varnost in učinkovitost konzervansov v kozmetičnih izdelkih*. V: Kočever Glavač N, Zvonar A (Ur.). *Kozmetologija I: trendi na področju kozmetičnih izdelkov: učinkovitost in varnost sestavin: Fakulteta za farmacijo, Ljubljana; 2011. str. 39-52.*
10. Fransway AF, Fransway PJ, Belsito DV, Warsaw EM, Sasseville D, Fowler Jr JF, DeKoven JG, et al. *Parabens. Dermatitis*. *Jan/Feb 2019;30(1):3-31.*
11. *American Pharmaceutical Review™* [Internet]. *Antimicrobial Preservatives Part Three: Challenges Facing Preservative Systems* [update 2012 January; cited 2021 April 17]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38874-Antimicrobial-Preservatives-Part-Three-Challenges-Facing-Preservative-Systems/>
12. *The solubility of drugs*. In: Florence T, Attwood D, editors. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2006. p. 139-176.
13. EMA [Internet]. *Excipients labelling* [cited 2021 May 5]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/product-information/reference-guidelines/excipients-labelling>



14. Meyer BK, Ni A, Hu B, Shi L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. *J Pharm Sci.* 2007 Dec;96(12):3155-67.
15. Moser CL, Meyer BK. Comparison of compendial antimicrobial effectiveness tests: a review. *AAPS PharmSciTech.* 2011 Mar;12(1):222-6.
16. Nagarsenkar MS, Dhawan VV. Parenteral preparations. In: Adejare A, editor-in-chief. *Remington (Twenty-third Edition) The Science and Practice of Pharmacy* [Internet]. Academic Press; 2020 [cited 2021 May 10]. Chapter 29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128200070000295?via%3Dihub>
17. Gervasi V, Dall Agnol R, Cullen S, McCoy T, Vucen S, Crean A. Parenteral protein formulations: An overview of approved products within the European Union. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018 Oct;131:8-24.
18. EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzyl alcohol and benzoic acid group used as excipients [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/benzyl-alcohol-benzoic-acid-group-used-excipients-report-published-support-questions-answers-benzyl/chmp/508188/2013-t_en.pdf
19. EMA. Excipients labelling [Internet]. Questions and answers on benzyl alcohol used as an excipient in medicinal products for human use. Adopted [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzyl-alcohol-used-excipient-medical-products-human-use_en.pdf
20. DeStefano F, Monk Bodensstab H, Offit PA. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States. *Clin Infect Dis.* 2019 Aug 1;69(4):726-31.
21. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* 2021 Feb;21(2):83-100.
22. NIJZ [Internet]. Tiomersal in cepiva [datum dostopa 2021 May 6]. Dostopno na: https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/tiomersal_in_cepiva.pdf
23. EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzalkonium chloride used as an excipient [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/benzalkonium-chloride-used-excipient-report-published-support-questions-answers-benzalkonium_en.pdf
24. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Jul;29(4):312-34.
25. Steven DW, Alagband P, Lim KS. Preservatives in glaucoma medication. *Br J Ophthalmol.* 2018 Nov;102(11):1497-1503.
26. Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. *Clin Ophthalmol.* 2019 Aug 1;13:1409-25.
27. Rolando M, Crider JY, Kahook MY. Ophthalmic preservatives: focus on polyquaternium-1. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011 Nov;8(11):1425-38.
28. EMEA/622721/2009 [Internet]. EMEA public statement on antimicrobial preservatives in ophthalmic preparations for human use [cited 2021 April 28]. Available from: <http://www.techtran.co.jp/reportd/emea091208.pdf>
29. EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzalkonium Chloride. Adopted questions and answers [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzalkonium-chloride-used-excipient-medical-products-human-use_en.pdf
30. EMA. Excipients labelling [Internet]. Benzoic acid and benzoates. Adopted questions and answers (Q&A). [updated 2017 October 9; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-benzoic-acid-benzoates-used-excipients-medical-products-human-use_en.pdf
31. EMA [Internet]. Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use [updated 2015 October 22; cited 2021 May 7]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-methyl-propylparaben-excipients-human-medical-products-oral-use_en.pdf
32. European Commission [Internet]. Call for data on ingredients with potential endocrine-disrupting properties used in cosmetic products [updated 2021 February 15; cited 2021 May 10]. Available from: https://ec.europa.eu/growth/content/call-data-ingredients-potential-endocrine-disrupting-properties-used-cosmetic-products-0_en
33. European Commission. SCCS [Internet]. OPINION ON Propylparaben (PP) [updated 2021 March 30-31; cited 2021 May 5]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_243.pdf
34. European Commission. SCCS [Internet]. The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 11th revision [updated 2021 March 30-31; cited 2021 May 5]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_250.pdf
35. EUR-Lex [Internet]. UREDBA KOMISIJE (EU) št. 1130/2011 z dne 11. novembra 2011 o spremembah Priloge III k Uredbi (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in Sveta o aditivih za živila z vzpostavitvijo seznama Unije aditivov za živila, odobrenih za uporabo v aditivih za živila, encimih za živila, aromah za živila in hranilih [cited 2021 May 3]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1130>
36. EMA [Internet]. Preservatives. Are they safe? [update 2010 May; cited 2021 April 28]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-preservatives-are-they-safe_en.pdf
37. EuPfu [Internet]. STEP Database [update 2017 September 19; cited 2021 May 4]. available from: <https://step-db.ucl.ac.uk/eupfi/appDirectLink.do?appFlag=login>
38. van Riet-Nales DA, Schobben AFAM, Vromans H, Egberts TCG, Rademaker CMA. Safe and effective pharmacotherapy in infants and preschool children: importance of formulation aspects. *Arch Dis Child.* 2016 Jul;101(7):662-9.
39. Thabet Y, Klingmann V, Breitkreutz J. Drug Formulations: Standards and Novel Strategies for Drug Administration in Pediatrics. *J Clin Pharmacol.* 2018 Oct;58 Suppl 10:26-35.

POMEN LIOFILIZACIJE V FARMACIJI

IMPORTANCE OF LYOPHILISATION IN PHARMACY

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Maja Bjelošević, mag. ind. farm.
izr. prof. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: pegi.ahlingrabnar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Liofilizacija oz. sušenje z zamrzovanjem je široko uporabljana metoda, za katero zanimanje v zadnjih letih strmo narašča. Gre za metodo sušenja, ki jo najpogosteje povežemo s pripravo bioloških in biološko podobnih zdravil za parenteralno dajanje oz. sušenjem proteinskih učinkovin. Omogoča tudi izdelavo farmacevtskih oblik, kot so praški za pripravo kapljic za oči ter peroralnih liofilizatov. Slednji vse bolj pridobivajo na pomenu predvsem z vidika razvoja novih farmacevtskih oblik za otroke in starostnike. Uporabnost liofilizacije se kaže tudi pri izdelavi cepiv in stabilizaciji nanodostavnih sistemov (1). Liofilizacija povečuje stabilnost zdravilnih učinkovin zaradi odstranitve vode, povečuje topnost slabo topnih zdravilnih učinkovin preko njihove amorfizacije, omogoča zmanjšanje mase zdravil in

POVZETEK

Liofilizacija je danes metoda izbora za pripravo stabilnih formulacij s proteinskimi zdravilnimi učinkovinami, njena uporaba in globlje razumevanje pa postajata čedalje bolj pomembna tudi z vidika priprave novih, pacientu prijaznih farmacevtskih oblik. Skladno z intenzivnim povečanjem števila novih bioloških in biološko podobnih zdravil se farmacevtska industrija vse bolj usmerja k razvoju in optimizaciji procesa liofilizacije, z namenom zagotavljanja kakovostnih, varnih in učinkovitih zdravil. Namen članka je predstaviti proces liofilizacije in novosti na tem področju ter izpostaviti njegovo pomembnost na področju farmacije.

KLJUČNE BESEDE:

agresivno sušenje, biološka zdravila, liofilizacija, optimizacija, sušenje z zamrzovanjem

ABSTRACT

Today, lyophilisation is the method of choice for the preparation of stable formulations with protein active ingredients, and its use and deeper understanding have become increasingly important in terms of preparation of new, patient-friendly dosage forms. In line with the intensive increase in the number of new biologic and biosimilar drugs, the pharmaceutical industry is increasingly focusing on the development and optimisation of the lyophilisation process, with the aim of providing quality, safe and effective drugs. The purpose of the article is to present the process of lyophilisation and innovations in this field, and to highlight its importance in the field of pharmacy.

KEY WORDS:

aggressive drying, biopharmaceuticals, freeze-drying, lyophilisation, optimisation;

s tem lažji transport ter zaradi pretvorbe v suho obliko omogoča daljši rok uporabe zdravila.

Farmacevtska industrija se vse bolj usmerja v raziskovanje na področju bioloških zdravil, ki predstavljajo sedem od desetih najbolj prodajanih zdravil v letu 2018 (preglednica 1) (2). Pojav prvega biološkega zdravila sega v začetke osemdesetih let prejšnjega stoletja, ko je farmacevtsko podjetje »Eli Lilly and Company« začelo s prodajo zdravila s proteinsko učinkovino rekombinantnim inzulinom. V sploš-



Preglednica 1: Deset najbolj prodajanih zdravil v svetovnem merilu v letu 2018¹ (2).

Table 1: Ten best-selling drugs worldwide in 2018¹ (2).

ZDRAVILO	INDIKACIJA	PROIZVAJALEC	PRODAJA (mrd. \$)
Humira (adalimumab)	artritis	AbbVie	19,9
Revlimid (lenalidomide)	multipli mielom	Celgene	9,7
Keytruda (pembrolizumab)	rak	Merck & Co.	7,2
Herceptin (trastuzumab)	rak	Roche	7,1
Avastin (bevacizumab)	rak	Roche	7,0
Rituxan (rituximab)	rak	Roche	6,9
Opdivo (nivolumab)	rak	Bristol-Myers Squibb	6,7
Eliquis (apiksaban)	venska tromboza, pljučna embolija	Bristol-Myers Squibb	6,4
Prevnar (cepivo)	pnevmokokne okužbe	Pfizer	5,8
Stelara (ustekinumab)	luskavica	Johnson & Johnson	5,2

¹Odebeljeni tisk se nanaša na biološka zdravila.

nem danes porast v razvoju in prodaji predstavljajo biološko podobna zdravila, ki se pojavljajo kot posledica izteka patentnih pravic originatorskim biološkim zdravilom (3).

Biološka in biološko podobna zdravila imajo številne prednosti v primerjavi s klasičnimi zdravili, a gledano s tehnološkega vidika sta oblikovanje in proizvodnja tovrstnih zdravil zapletena procesa, ki zahtevata veliko znanja in izkušenj. Gre namreč za občutljive in nestabilne, večinoma proteinske ali peptidne molekule, pri katerih preostri tehnološki pogoji izdelave lahko povzročijo izgubo oz. spremembo njihove biološke aktivnosti, kar vodi do pojava resnejših neželenih učinkov (4). Velika molekulska masa bioloških molekul ter njihova fizikalna in kemijska nestabilnost so bistveni parametri, po katerih se biološka zdravila razlikujejo od klasičnih sinteznih zdravil, obenem pa pri razvoju bioloških zdravil naletimo še na težave, kot so encimska razgradnja, imunogenost in kratek razpolovni čas (5). Vse ne-

šteto je razlog za običajno zelo nizko biološko uporabnost bioloških makromolekul po peroralni aplikaciji, zato kot omenjeno med biološkimi zdravili prevladujejo parenteralne farmacevtske oblike v obliki raztopin, suspenzij ali liofilizatov. Ravno slednji predstavljajo najbolj razširjeno farmacevtsko obliko bioloških zdravil, in sicer je bilo v preteklih desetih letih kar 40 do 50 % vseh odobrenih bioloških zdravil v liofilizirani obliki (1).

2 SUŠENJE Z ZAMRZOVANJEM – LIOFILIZACIJA

Liofilizacija (*freeze-drying, lyophilisation*) predstavlja obliko sušenja z uporabo nizkih tlakov in temperatur. Zdravilne učinkovine biološkega izvora so večinoma občutljive na povišano temperaturo, zato pri pretvorbi raztopin v suho obliko ne moremo uporabiti običajnih načinov sušenja. Nizke temperature in tlaki pri sušenju z zamrzovanjem omogočajo odstranitev vode iz vzorca in pretvorbo le-tega v trdno obliko, tj. v liofilizat, ki mora imeti ustrezne kritične lastnosti kakovosti produkta, kot sta izgled in delež rezidualne vode. Proces temelji na fizikalnem pojavu sublimacije, kjer snov iz trdnega agregatnega stanja preide neposredno v plinasto agregatno stanje brez predhodnega prehoda skozi tekočo fazo (slika 1). Liofilizacija sestoji iz treh zaporednih faz, ki so medsebojno odvisne. Na začetku vzorce zamrzujemo, nato sledi faza primarnega sušenja, kjer zaradi uvedbe visokega vakuumu prihaja do sublimacije proste vode. V zadnji fazi sekundarnega sušenja se zaradi desorpcije odstrani še vezana voda in tako končni produkti večinoma vsebujejo manj kot 2 % (m/m) rezidualne vode.



Slika 1: Shematski prikaz poteka liofilizacije.

Figure 1: Schematic representation of the lyophilisation.

Kljub številnim prednostim se je pri izbiri procesa liofilizacije potrebno zavedati, da gre za dolgotrajen in energetsko zelo potraten proces, posledica česar so visoki stroški proizvodnje. Proces liofilizacije mora biti zato ustrezno načrtovan in optimiziran.

2.1 ZAMRZOVANJE

Zamrzovanje je prvi korak procesa liofilizacije, ki omogoča pretvorbo začetne raztopine v trdno stanje. Zamrznjena voda se loči od zdravilne učinkovine in pomožnih snovi, ki so vključene v formulacijo, posledično pride do nastanka intersticijskega prostora med kristali ledu. Zamrzovanje se prične s podhladitvijo raztopine, kjer pride do pojava nukleacije in rasti kristalov ledu. Ko se kristalizacija zaključi, kar označuje konec zamrzovanja v raztopini, temperatura po začetnem dvigu pade proti nastavljeni temperaturi polic, večinoma okrog $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nadaljnje ohlajanje vzorcev povzroči povečanje koncentracije topljencev v nastalem intersticijskem prostoru do kritične koncentracije. Temperaturo, pri kateri je raztopina maksimalno nasičena in le-ta preide iz zmehčanega stanja v steklasto stanje, označujemo kot temperaturo steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine (T_g'), ki je značilna za amorfne sisteme, medtem ko za kristalne sisteme velja temperatura tališča evtektika (T_{eu}) (6).

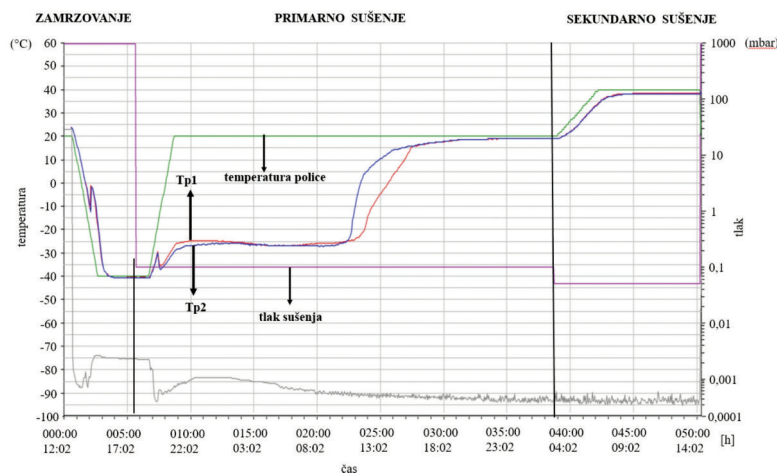
V fazo zamrzovanja pogosto vključimo tudi korak temperiranja (*annealing*), ki zagotavlja kristalizacijo pomožnih snovi in posredno preko tvorbe kristalov ledu vpliva na hitrost

sušenja. Temperiranje izvedemo tako, da vzorce segrejemo nad T_g' , to temperaturo nekaj časa vzdržujemo, nato pa vzorce ponovno zamrznemo na enako temperaturo, kot je bila dosežena pred fazo temperiranja (7).

Zamrzovanje je dehidracijski proces, ki lahko ogrozi stabilnost proteinskih učinkovin v primeru neustrezno izbranih procesnih parametrov. Glavni parametri, ki vplivajo na velikost in morfologijo nastalih kristalov, so temperatura in čas zamrzovanja ter hitrost ohlajanja. Počasno ohlajanje ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) vodi do nastanka večjih homogenih kristalov, ki tvorijo boljše kanale za sublimacijo vodne pare v fazi sušenja, medtem ko za hitro ohlajanje velja ravno obratno (5, 8). Čas zamrzovanja je odvisen od učinkovitosti toplotnega prenosa med polico liofilizatorja in dnom vial, zato morajo biti časi za doseganje popolnoma zamrznjenega vzorca dovolj dolgi.

2.2 PRIMARNO SUŠENJE

Glavni cilj primarnega sušenja je odstranitev nastalega ledu s sublimacijo. Pojav sublimacije omogoča uvedba močno znižanega tlaka v sušilno komoro in izbira ustrezne temperature polic. Čas primarnega sušenja je funkcija temperature polic in tlaka v komori, ki neposredno vplivata na temperaturo produkta med sušenjem in hitrost sublimacije vodne pare. Na začetku primarnega sušenja tlak v komori hitro pada, medtem ko temperatura polic postopoma narašča (slika 2). Ker se produkt zaradi sublimacije hladi, se njegova temperatura postopoma približuje nastavljeni temperaturi polic. Ko temperatura produkta (T_p) doseže tem-



Slika 2: Primer poteka liofilizacijskega cikla. Zelena krivulja predstavlja nastavljeno temperaturo polic, rdeča in modra dejanski temperaturi produkta ter roza nastavljen tlak sušenja.

Figure 2: An example of a lyophilisation cycle. Green curve represents the set shelf temperature, red and blue curves represent actual product temperatures, and pink curve represents the set chamber pressure.

peraturo políc, je sublimacija v celoti zaključena in primarno sušenje se konča.

Z izbiro ustreznih tlaka in temperature sušenja vplivamo tako na trajanje sušenja kot tudi na lastnosti produkta. Izbira tlaka in temperature sušenja je odvisna od specifičnosti sestave formulacije oz. fizikalno-kemijskih parametrov zdravilne učinkovine. Slednje je še posebej pomembno pri proteinskih učinkovinah, kjer morata tlak in temperatura sušenja zagotavljati fizikalno in kemijsko stabilnost proteinskih molekul ter ustrezen videz liofilizata, obenem pa še vedno vzorec posušiti do sprejemljive vsebnosti rezidualne vode. Najpogosteje uporabljamo tlak sušenja v območju med 0,1 in 0,3 mbar. Previsoki tlaki sušenja lahko povzročijo porušitev strukture liofilizata (kolaps), medtem ko lahko prenizki tlaki povzročijo kontaminacijo sušenega materiala z oljem vakuumske črpalke, obenem pa vplivajo na zmanjšanje kapacitete kondenzatorja (9).

Temperatura sušenja mora biti skrbno izbrana z namenom optimizacije trajanja primarnega sušenja. Odvisna je od termičnih lastnosti sušenih formulacij, in sicer sta omejujoča dejavnika temperatura T_g' in temperatura kolapsa (T_c). Slednja je najvišja temperatura vzorca, ki ne povzroči kolapsa liofilizacijske pogače. Kolaps definiramo kot izgubo strukture liofilizacijske pogače, ki se pojavi na makro ali mikro nivoju ter tako lahko vpliva na izgled in kakovost produktov. Porušena struktura povzroči zaporo por znotraj liofilizata, kar predstavlja oviro za sublimacijo vodne pare ter posledično močno upočasni potek sušenja. Kljub dejstvu, da gre za neželen pojav, pa je iz znanstvenih člankov razvidno, da kolaps velikokrat vpliva le na končni izgled liofilizacijske pogače, medtem ko so kritične lastnosti kakovosti produkta, kot sta rekonstitucijski čas in vsebnost rezidualne vode, še vedno ohranjene (10, 11).

Dolgo je veljalo, da mora biti temperatura zamrznjenega vzorca med primarnim sušenjem pod T_c ali celo pod T_g' , z namenom doseganja ustreznega videza liofilizacijske pogače, kar strokovno opišemo kot konzervativno sušenje (12). Naprotno se danes na področju sušenja z zamrzovanjem vse bolj uveljavlja uporaba agresivnih pogojev sušenja, tj. sušenja vzorcev pri temperaturah, višjih

od kritičnih temperatur T_g' in v nekaterih primerih celo T_c ($T_p > T_g'$ in T_c), ki večinoma ne vplivajo negativno na kritične lastnosti kakovosti produkta (slika 3), medtem ko so časi sušenja bistveno krajši kot pri konzervativnem načinu sušenja (13, 14).

2.3 SEKUNDARNO SUŠENJE

Sekundarno sušenje predstavlja zaključno fazo procesa, pri kateri se zaradi povišanja temperature políc (slika 2) in pogosto tudi nekoliko nižjega tlaka preko procesa desorpcije iz vzorca odstrani še preostala vezana voda. Pomembno je, da na začetku sekundarnega sušenja, ko je delež vezane vode velik, temperaturo políc dvigujemo postopoma, da s prehitrim povišanjem temperature ne povzročimo kolapsa pogače, kar je še posebej pomembno za amorfne komponente (15). Pri določanju časa sekundarnega sušenja si lahko pomagamo z neposrednim merjenjem deleža zaostale vlage v vzorcih in ko je le-ta na sprejemljivem nivoju, običajno pod 2 % (m/m), lahko sekundarno sušenje zaključimo. Kljub temu da vsebnost vlage v vzorcih močno znižamo in s tem zagotovimo mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilnost vzorcev, pa deleži vlage, manjši od 0,5 % (m/m), niso priporočljivi (15, 16).

3 OPTIMIZACIJA LIOFILIZACIJE

Optimizacija ciklov se posredno začne že v fazi razvoja formulacije, in sicer preko vključitve ustreznih pomožnih snovi. Poleg tega, da moramo v proteinske formulacije vključiti stabilizatorje, kot sta saharoza ali trehaloza, je priporočljivo, da formulacijam dodamo tudi ustrezna polnila. Namen polnil, med katerimi sta najpogostejša glicin in manitol, je zagotavljati ustrezno strukturo liofilizacijske pogače tudi v primerih, ko je T_c amorfne faze presežena. Polnila med zamrzovanjem oz. temperiranjem kristalizirajo in tvorijo rešetko, ki predstavlja mehansko oporo za amorfne komponente, in s tem preprečujejo kolaps liofilizacijske pogače (17). Dokazali so, da povišanje temperature za 10 °C med temperiranjem skrajša čas primarnega sušenja za do 34 % (18). Uporaba ustreznih pomožnih snovi tako omogoča sušenje pri višjih temperaturah produkta, s čimer vplivamo na skrajšanje časa primarnega sušenja in posledično tudi celotnega cikla, nasprotno vključitev neustreznih pomožnih snovi vodi v porušenje liofilizacijske pogače.

KRITIČNE LASTNOSTI KAKOVOSTI PRODUKTA

izgled
rekonstitucijski čas
delež rezidualne vode

Slika 3: Kritične lastnosti kakovosti produkta.

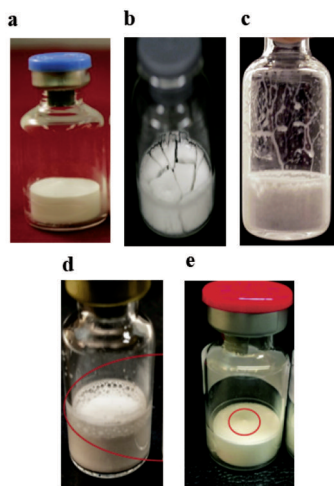
Figure 3: Critical quality attributes of lyophilisates.

3.1 IZGLED LIOFILIZACIJSKE POGAČE

Izgled liofilizacijske pogače po koncu sušenja je eden najbolj kritičnih parametrov kakovosti produkta pri pripravi liofilizatov, ki vpliva na uporabnost končnega izdelka. Nepravilnosti v izgledu liofilizacijske pogače so nezaželene predvsem z vidika uporabnika, ki jih lahko poveže s slabšo kakovostjo produkta. Vendar pa je pomembno ločiti med kolapsom kot »kozmetično« nepravilnostjo in kolapsom, ki vpliva neposredno na kakovost, varnost in učinkovitost zdravila (10). Na pojav kolapsa v veliki meri vplivamo z izbiro ustreznih temperature in hitrosti zamrzovanja ter temperature in tlaka sušenja, kar je še posebej pomembno pri sušenju formulacij s proteini. Najpogostejše nepravilnosti liofilizacijske pogače, ki v večini primerov ne pomenijo neustreznosti izdelka, so skrčenje in manjše pokanje liofilizacijske pogače, t. i. meglenje notranje stene vial, penjenje vzorca ter pojav vulkana kot posledica dviga manjše količine pogače (slika 4).

3.2 UPORABA PROCESNO-ANALIZNIH TEHNOLOGIJ IN MODELIRANJA NA PODROČJU LIOFILIZACIJE

K optimizaciji ciklov danes močno pripomore uporaba sodobnih orodij procesno-analiznih tehnologij (PAT), ki omo-



Slika 4: Nepravilnosti v izgledu liofilizacijske pogače: skrčenje pogače (a), popokanje pogače (b), meglenje vzorca (c), penjenje vzorca (d) in vulkan (e). Prirejeno po 10.

Figure 4: Irregularities in cake appearance: cake shrinkage (a), cake cracking (b), fogging (c), foaming (d) and volcano (e). Adapted after 10.

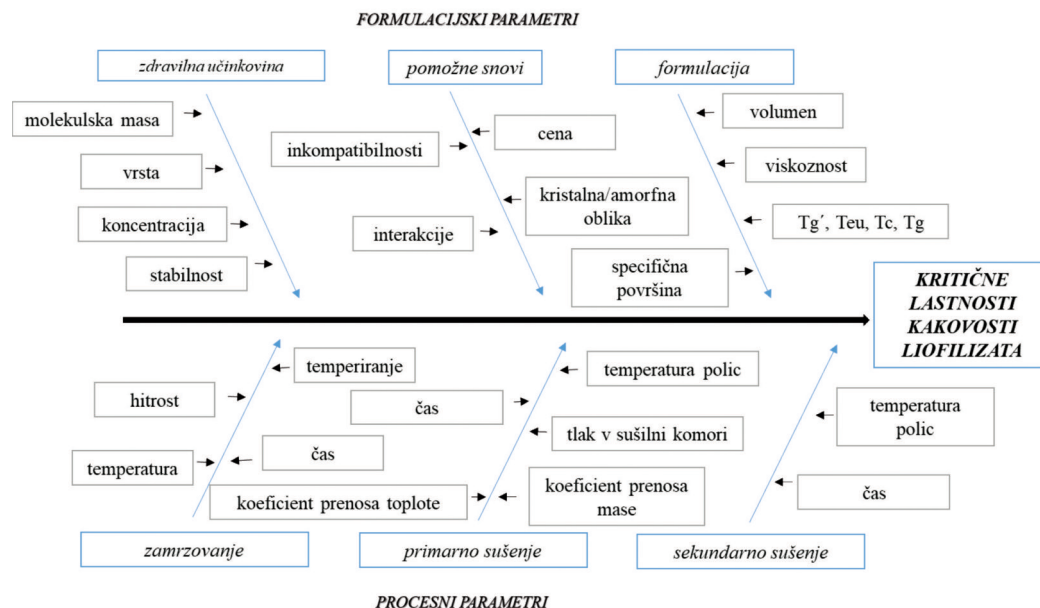
gočajo vpeljavo koncepta načrtovanja kakovostnih izdelkov in procesov »Quality by Design« (QbD). QbD predstavlja novo paradigmo, katere cilj je vgrajevanje kakovosti v proces in proizvod, ki temelji na predhodni identifikaciji ključnih značilnosti izdelka in kritičnih procesnih parametrov (19). Cilj uvedbe QbD je sistematičen pristop k razvoju proizvoda in procesa, njenemu razumevanju in vzpostavitvi procesne kontrole, z namenom pridobivanja kakovostnih proizvodov (20). Pri uvedbi QbD si lahko pomagamo s t. i. diagramom Ishikawa, kjer definiramo glavni problem in parametre, ki vplivajo na definirani problem (slika 5).

S pojavom PAT so se pojavile stroge regulatorne zahteve glede vpeljave teh orodij v farmacevtsko industrijo, kljub temu pa so tovrstna orodja že del vsakodnevnega proizvodnega procesa farmacevtskih izdelkov (21). Tako so se orodja PAT pojavila tudi na področju sušenja z zamrzovanjem.

Sistem TEMPRIS (*temperature remote interrogation system*) sestavlja 8 do 16 temperaturnih senzorjev, ki jih vstavimo neposredno v vzorce v vialah (slika 6a). Senzorji preko oddajnika pošiljajo signal do sprejemne enote, ki signal pretvori v temperaturno vrednost. Slednja se z uporabo ustrezne programske opreme izpiše na računalniku, ki je povezan z liofilizatorjem. Sistem tako omogoča stalen nadzor nad T_p med sušenjem (22). Sistem TrackSense Pro je v osnovi podoben sistemu TEMPRIS, le da senzorje napaja baterija (slika 6b). Sistem ne omogoča sprotnega prikaza temperature, ampak se podatki hranijo in so dostopni šele po koncu procesa (23).

Manometrično določanje temperature (MTM, *manometric temperature measurement*) predstavlja neinvazivno tehnologijo, kjer z razliko od prejšnjih dveh sistemov ne posegamo neposredno v vzorce. Sistem uporabljajo za spremljanje kritičnih lastnosti produktov in procesa sušenja za celotno serijo sušenih vzorcev. MTM temelji na periodičnem dvigovanju tlaka znotraj komore, ki je med meritvijo izolirana od kondenzatorja. Dvig tlaka v komori popišemo z uporabo MTM-enačbe, ki na podlagi toplotnega in masnega prenosa posredno preko parnega tlaka ledu in upornosti trdne plasti proti toku vodne pare omogoča določitev najpomembnejših parametrov produkta in procesa, kot so hitrost sublimacije, temperatura produkta, debelina suhe snovi in koeficient prenosa toplote. V primerih, ko je MTM sklopljen s programsko opremo SMART™, je omogočena neposredna optimizacija primarnega sušenja, preko predhodno izbranih zahtev operaterja in dejanske povratne informacije o izdelku med merjenjem (23).

Uporaba spektroskopskih tehnik (sonde NIR in RAMAN) med procesom sušenja predstavlja neinvazivno in nede-



Slika 5: Diagram Ishikawa, ki opredeljuje bistvene parametre, ki vplivajo na proces liofilizacije. Prirejeno po: http://file.scirp.org/Html/1-4600131_63220.htm. T_g' – temperatura steklastega prehoda maksimalno koncentrirane zamrznjene raztopine; T_{eu} – temperatura tališča evtektika; T_c – temperatura kolapsa; T_g – temperatura steklastega prehoda.

Figure 5: Ishikawa diagram defining the main parameters influencing the lyophilisation process. Adapted after: http://file.scirp.org/Html/1-4600131_63220.htm. T_g' – glass transition temperature of the maximally freeze-concentrated solution; T_{eu} – eutetic temperature; T_c – collapse temperature; T_g – glass transition temperature.

struktivno »in line« metodo. Postavitev sond v sušilno komoro omogoča neprestano spremljanje poteka procesa in nadzor nad spremembami v vzorcih. Podatki se ves čas shranjujejo in v določenih časovnih intervalih izpisujejo v

obliki spektrov. Z uporabo sond lahko dobimo podatke o poteku kristalizacije znotraj vzorcev, iz česar lahko sklepamo o koncu faze zamrzovanja. Prav tako lahko spremljamo potek sublimacije in določimo končno točko primarnega sušenja, obenem pa nam sonde omogočata detekcijo vsebnosti vlage v produktih, kar je pomemben podatek pri določanju časa sekundarnega sušenja (25). Trenutno je najpogosteje uporabljan sistem TDLAS, ki deluje na principu bližnje IR-spektroskopije. LyoTrack predstavlja senzor za določanje vlage oz. količine vodne pare v sušilni komori. Največkrat ga uporabljamo za določanje konca primarnega sušenja, kar senzor zazna kot zmanjšanje deleža vodne pare. Programska oprema omogoča izrisovanje procesnega grafa, kjer spremljamo delež vlage v komori v odvisnosti od temperature in časa (24).

Modeliranje pri liofilizaciji zmanjša število poskusov po principu »poskusi in napake«, kar vodi v povišanje stroškov procesa. S sistemom načrtovanja eksperimentov (DoE, design of experiments) ugotovimo vpliv in interakcije med različnimi faktorji, ki temeljijo na povezavi kritičnih lastnosti vhodnih surovin (CMA), kritičnih procesnih parametrov (CPP) in kritičnih lastnosti kakovosti liofilizatov (CQA). Pri tem lahko v ospredje postavimo modeliranje same formu-



Slika 6: Senzor TEMPRIS za nadzor temperature (a) in senzor TrackSense Pro (b). Prirejeno po: <https://www.tempris.com/>; <http://www.ellab.com/products/find-the-right-data-logger/tracksense-pro>

Figure 6: TEMPRIS sensor for temperature monitoring (a) and TrackSense Pro sensor (b). Adapted after: <https://www.tempris.com/>; <http://www.ellab.com/products/find-the-right-data-logger/tracksense-pro>.

lacije oz. procesa. V literaturi najpogosteje najdemo modeliranje faze primarnega sušenja. V okviru slednjega posledično definiramo eksperimentalni prostor, pri čemer modeliranje najpogosteje temelji na teoriji koeficienta prenosa toplote in upornosti prenosa mase (19, 25).

4 SKLEP

Proizvodnja bioloških zdravil predstavlja enega najzahtevnejših postopkov, ki je sestavljen iz množice zaporednih korakov in katerega glavni cilj je priprava varnega, kakovostnega in učinkovitega zdravila. Liofilizacija je metoda izbora pri sušenju raztopin termolabilnih zdravilnih učinkovin, med katere uvrščamo tudi proteinske molekule. V izogib visokim stroškom liofilizacije so trendi na tem področju usmerjeni v iskanje rešitev za optimizacijo stroškov procesa, pri čemer novost predstavlja agresivno sušenje, torej sušenje nad kritičnimi temperaturami produkta, brez vpliva na izgled liofilizata in stabilnost zdravilne učinkovine. Večjo ekonomičnost procesa danes omogočajo tudi številna orodja PAT, ki zagotavljajo ustrezno kakovost liofiliziranih produktov ter implementacija sodobnih matematičnih modelov za vrednotenje sočasnega vpliva več faktorjev, ki vse bolj nadomeščajo številne empirične ponovitve eksperimentalnih poskusov.

5 LITERATURA

1. Kasper JC, Winter G, Friess W. Recent advances and further challenges in lyophilization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85:162-9.
2. Urquhart L. Top drugs and companies by sales in 2018. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18:245.
3. Štrukelj B. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. In: Štrukelj B, Kos J, editors. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine.* Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007. p. 3-24.
4. Kocbek P. Od klasičnih do sodobnih dostavnih sistemov za biofarmaceutike. In: Kočevar Glavač N, Zvonar A, editors. *Biološka zdravila.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2015. p. 51-64.
5. Fjokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: A formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:298-306.
6. Kasper JK, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78:248-63.
7. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine $T(g)^*$ in pharmaceutical lyophilization. *J Pharm Sci.* 2001;90:872-87.
8. Connolly BD, Le L, Patapoff TW, Cromwell MEM, Moore JMR, Lam P. Protein Aggregation in Frozen Trehalose Formulations: Effects of Composition, Cooling Rate, and Storage Temperature. *J Pharm Sci.* 2015;104:4170-84.
9. Sp scientific. Basic Principles of Freeze Drying [Internet]. Stone Ridge, NY: Sp scientific, 2009 [updated 2020 June 5; cited 2020 June 15]. Available from: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics>
10. Patel SM, Nail SL, Pikal MJ, Geidobler R, Winter G, Hawe A, Davagnino J, Gupta SR. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? *J Pharm Sci.* 2017;106:1706-21.
11. Wang DQ, Hey JM, Nail SL. Effect of collapse on the stability of freeze-dried recombinant factor VIII and alpha-amylase. *J Pharm Sci.* 2004;93:1253-63.
12. Depaz RA, Pansare S, Patel SM. Freeze-Drying Above the Glass Transition Temperature in Amorphous Protein Formulations While Maintaining Product Quality and Improving Process Efficiency. *J Pharm Sci.* 2016;105:40-9.
13. Bjelošević M, Bolko Seljak K, Trstenjak U, Logar M, Brus B, Ahlin Grabnar P. Aggressive conditions during primary drying as a contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2018;122:292-302.
14. Johnson R, Lewis L. Freeze-Drying Protein Formulations above their Collapse Temperatures: Possible Issues and Concerns. *American Pharmaceutical Review.* 2011;14:50-4.
15. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res.* 2004;21: 191-200.
16. Remmele RL, Krishnan S, Callahan WJ. Development of stable lyophilized protein drug products. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:471-96.
17. Bjelošević M, Zvonar Pobirk A, Planinšek O, Ahlin Grabnar P. Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int J Pharm.* 2020;576.
18. Smith G, Arshad MS, Polygalov E, Ermolina I. Through-vial impedance spectroscopy of the mechanisms of annealing in the freeze-drying of maltodextrin: the impact of annealing hold time and temperature on the primary drying rate. *J Pharm Sci.* 2014;103:1799-810.
19. Koganti VR, Shalaev EY, Berry MR, Osterberg T, Youssef M, Hiebert DN, Kanka FA, Nolan M, Barrett R, Scalzo G, Fitzpatrick G, Fitzgibbon N, Luthra S, Zhang L. Investigation of design space for freeze-drying: use of modeling for primary drying segment of a freeze-drying cycle. *Pharm Sci Tech.* 2011; 12:854-61.
20. Yu LX. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharm Res.* 2008;25:781-91.
21. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. [Internet]. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA), 2004 [cited 2020 June 20]. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf>



22. Schneid S. *Investigation of Novel Process Analytical Technology (PAT) Tools for Use in Freeze-Drying Processes*. Doktorsko delo. Nürnberg: der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2009.
23. Gieseler H, Kramer T, Pikal MJ. *Use of manometric temperature measurement (MTM) and SMART freeze dryer technology for development of an optimized freeze-drying cycle*. *J Pharm Sci*. 2007;96:3402-18.
24. De Beer TR, Vercruyse P, Burggraeve A, Quinten T, Ouyang J, Zhang X, Vervaet C, Remon JP, Baeyens WR. *In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy as complementary process analytical technology (PAT) tools*. *J Pharm Sci*. 2009;98:3430-46.
25. Preskar M, Videc D, Vrečer F, Gašperlin M. *Investigation of design space for freeze-drying injectable ibuprofen using response surface methodology*. *Acta Pharm*. 2021; 71:81-98.

EKSTRAKCIJA S SUBKRITIČNO VODO ZA PRIDOBIVANJE RASTLINSKIH EKSTRAKTOV SUBCRITICAL WATER EXTRACTION FOR THE PRODUCTION OF PLANT EXTRACTS

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Katja Schoss, mag. ind. farm.
izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: katja.schoss@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Ekstrakcija s subkritičnimi tekočinami je med sodobnimi, okolju prijaznimi tehnologijami ekstrakcije pritegnila veliko pozornosti zaradi njihovih edinstvenih lastnosti, ki omogočajo različne možnosti uporabe. Uporaba subkritične vode

POVZETEK

Zmanjšana poraba energije, učinkovita pretvorba reaktantov v produkte, manj stranskih odpadkov, možnost vpetosti v krožno gospodarstvo ter večja kakovost in varnost končnih izdelkov so ključne zahteve pri razvoju novih tehnologij in tehnologija s subkritičnimi tekočinami po optimizaciji ekstrakcijske metode v splošnem ustreza vsem naštetim kriterijem. Pogosto uporabljano topilo je voda, saj je okolju prijazna, lahko dostopna in ekonomsko opravičljiva. Subkritična voda ima v primerjavi z vodo pri normalnih pogojih posebne lastnosti, kot so manjša gostota, manjša dielektrična konstanta, večja ionizacijska konstanta in nižja površinska napetost. V članku predstavljamo proces ekstrakcije s subkritično vodo ter možnosti njene uporabe za pridobivanje rastlinskih izvlečkov.

KLJUČNE BESEDE:

ekstrakcija, rastlinski izvlečki, subkritična voda

ABSTRACT

Reduced energy consumption, efficient conversion of reactants into products, less by-products and higher quality and safety of finished products are key requirements in the development of new technologies, and subcritical fluid technology generally meets all these conditions after optimisation of the method. A frequently used solvent is water, as it is environmentally friendly, easily accessible and economically justifiable. Subcritical water has specific properties compared to water under normal conditions, such as lower density, lower dielectric constant, higher ionization constant and lower surface stress. In the article, we present the process of extraction with subcritical water and the possibilities of its use in the production of plant extracts.

KEY WORDS:

extraction, plant extracts subcritical water

je še posebej zanimiva, ker je voda kot topilo netoksična, nevnetljiva in dostopna (1, 2). V nadaljevanju bomo predstavili lastnosti subkritične vode, postopek, prednosti in slabosti ekstrakcije s subkritično vodo ter primere uporabe te tehnologije za pridobivanje rastlinskih izvlečkov, ki nakazujejo obetavne možnosti tudi za farmacevtsko, kozmetično in prehransko industrijo.



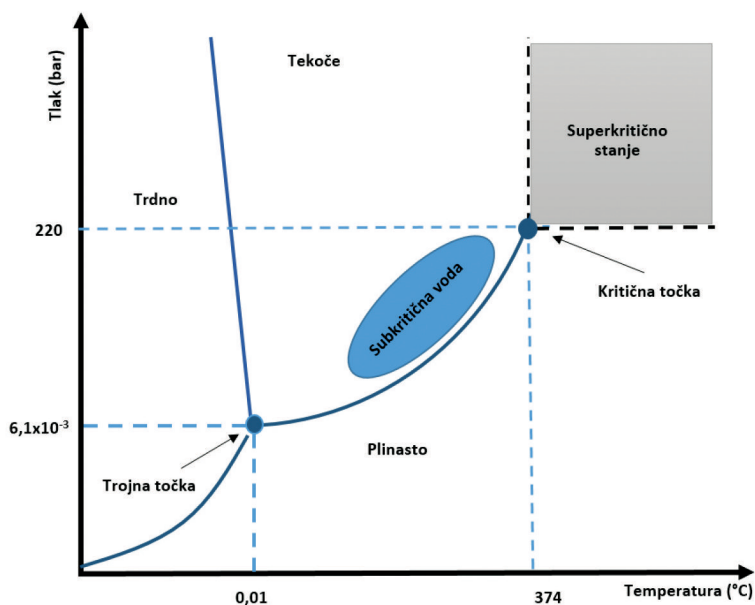
2 LASTNOSTI SUBKRITIČNE VODE

Subkritična voda je učinkovito topilo, katalizator in reaktant za hidrolizne pretvorbe in ekstrakcije. Ekstrakcija poteka pri temperaturah med 100 in 374 °C in pri tlaku v območju do 220 bar, da vodo vzdržuje v tekočem stanju (slika 1). Pri temperaturi nad 374 °C in tlaku nad 220 barov pa voda preide v superkritično stanje. Lastnosti vode pri normalnih pogojih ter v subkritičnem in superkritičnem stanju so predstavljene v preglednici 1 (3, 4, 5).

S spremembo temperature ekstrakcije in tlaka se spremenijo lastnosti vode kot ekstrakcijskega topila. Voda je polarno topilo z dielektrično konstanto (ϵ) 78,5 pri normalnih pogojih. Odgovorna je za dobro topnost in ekstrakcijo polarnih spojin

pri sobnih pogojih. Pri temperaturi med 100 in 374 °C (pod dovolj visokim pritiskom, da voda ostane v tekočem stanju) pa se dielektrična konstanta vode močno zniža in posledično voda postane primerna za ekstrakcijo tako polarnih kot nepolarnih spojin. Na primer, v subkritičnem stanju se dielektrična konstanta vode zmanjša na približno 33 pri temperaturi 200 °C (15 bar). Ta vrednost je primerljiva dielektrični konstanti nekaterih organskih topil, na primer metanola ($\epsilon = 32,6$; normalni pogoji), ki ga pogosto uporabljamo za ekstrakcijo spojin zmerne polarosti. Pri temperaturi 250 °C znaša dielektrična konstanta vode 27, z nadaljnjim višanjem temperature na 300 °C pa pade na 20 (3, 4).

Z doseganjem nižje polarosti pri povišanih temperaturah lahko tehnologija ekstrakcije s subkritično vodo ustvari visoke izplete ekstrakcije in hiter čas ekstrakcije številnih hidrofolbnih organskih snovi (npr. eteričnih olj, maščobnih kislin in karotenoidov) (3).



Slika 1: Fazni diagram vode z označenim predelom, kjer je voda v subkritičnem stanju; povzeto po viru (36).

Figure 1: Water phase diagram with a marked area, where water is in subcritical state; adapted from (39).

Preglednica 1: Lastnosti vode pri različnih pogojih (3).

Table 1: Water properties under different conditions (3).

Lastnost	Voda pri normalnih pogojih	Voda blizu kritičnega stanja	Superkritična voda
Temperatura (°C)	25	350	400
Tlak (bar)	1	250	500
Gostota (kgm ⁻³)	997,45	625,45	577,79
Dielektrična konstanta (ϵ)	78,5	14,86	12,16
Disociacijska konstanta (ϵ)	14,0	11,5	11,5

Pri povišanih temperaturah v subkritičnem stanju se poleg polarnosti znatno zmanjšajo tudi gostota vode (preglednica 1), površinska napetost in viskoznost. Zmanjšanje površinske napetosti omogoča povečano omočenje ekstrakcijskega materiala z vodo in hitrejše raztapljanje ciljnih spojin. Zmanjšana viskoznost vode poveča njeno prodiranje (difuzijo) v ekstrakcijski material, kar prav tako pospeši ekstrakcijo (3).

Z višanjem temperature pa se pojavijo tudi oksidacijske lastnosti vode. Najmočnejše so prav ob prehodu v superkritično stanje, kar lahko povzroči kemijske spremembe snovi, ki se lahko odrazijo v zmanjšani topnosti (npr. fenolov) (3).

Poleg omenjenih lastnosti se spreminjajo tudi ionizacijske lastnosti vode glede na temperaturo. Disociacijska konstanta (K_w) vode se poveča od $1,0 \times 10^{-14}$ pri 25°C do $1,2 \times 10^{-12}$ pri 350°C . To pomeni, da se pH spremeni s približno 7,0 na 5,5 (3).

Te edinstvene lastnosti subkritične vode skupaj z dejstvom, da je voda kot topilo lahko dostopna, poceni, nestrupena, nevljudna in okolju prijazna, vodijo do uveljavljanja številnih načinov uporabe za ekstrakcijo, ločevanje in izolacijo različnih spojin (3). Možnosti uporabe podrobneje opisujemo v podpoglavju 5.

3 POSTOPEK EKSTRAKCIJE

3.1 PARAMETRI

Glavni parameter ekstrakcije s subkritično vodo je temperatura, saj se z njo spreminjajo glavne kemijsko-fizikalne lastnosti, opisane v podpoglavju 2. Tlak ima omejen vpliv na lastnosti topila, pomembno pa je, da ohranja topilo v tekočem stanju. Ostali pomembni parametri ekstrakcije so razmerje topila in ekstrakcijskega materiala, pretok topila, velikost delcev ekstrakcijskega materiala, čas ekstrakcije, mešanje in uporaba sotopila. Izbira ustreznih delovnih pogojev je lažje določljiva, ko je znana narava spojin, ki jih bomo ekstrahirali (3, 5).

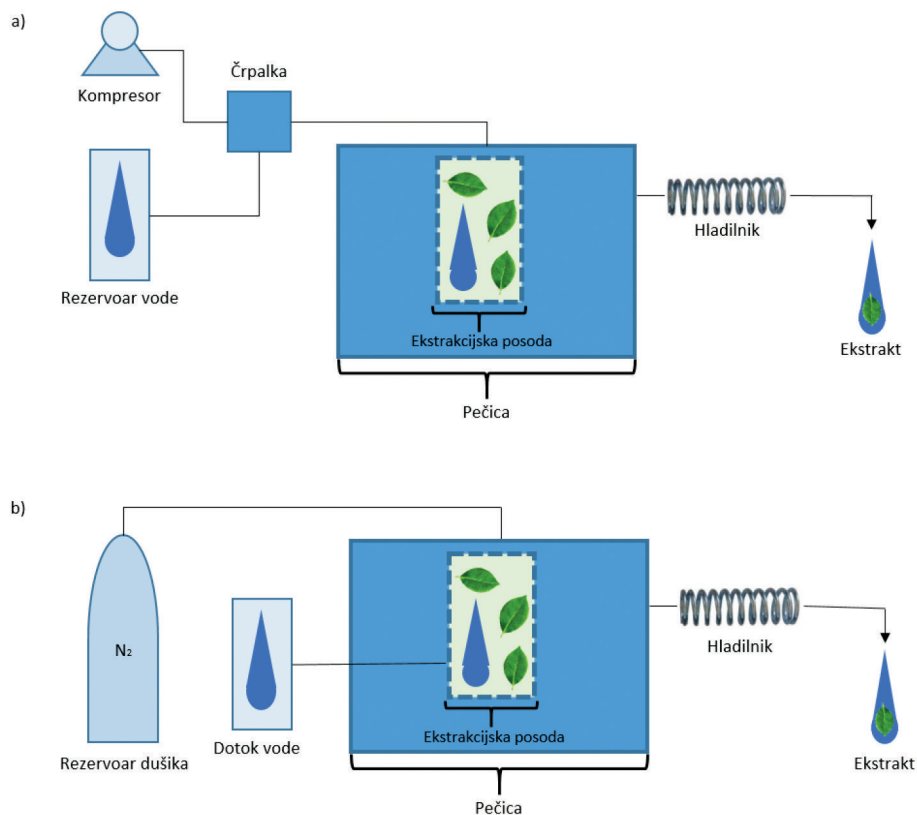
3.2 NAPRAVA

Za ekstrakcijo s subkritično vodo obstajata dve vrsti opreme: dinamični (neprekinjeni pretočni) sistem in statični (serijski) sistem (slika 2). Črpalka dinamičnega sistema do-

vaja vodo skozi grelno tuljavo do ekstrakcijske posode. Na ta način se voda predhodno segreje na temperaturo ekstrakcije. Voda nato prehaja skozi ekstraktor do hladilne tuljave, kjer se zbira. Tlak sistema nadzoruje zračna tekočinska črpalka s tlakom od 2 do 200 bar, ogrevanje pa pečica. Da preprečimo odtekanje vzorca oz. njegovo izgubo in morebitno zamašitev cevi, mora imeti posoda za ekstrakcijo sintrane filtre iz nerjavečega jekla vsaj pri izstopu vode iz ekstraktorja. Dinamičen in statičen sistem sta si zelo podobna glede postavitve peči, cevi in ventilov. V nasprotju z dinamičnim sistemom pa statični nima črpalke in je pod podtlakom dušika, da preprečimo oksidacijo vzorca. Čas zadrževanja subkritične vode v dinamični opremi je krajši kot v statični opremi, kar ima za posledico manjšo razgradnjo termolabilnih komponent. Največja pomanjkljivost dinamičnega sistema za ekstrakcijo s subkritično vodo je, da je zaradi večje kompleksnosti naprave dražji od statičnega sistema. Omeniti velja še, da je poraba vode večja pri dinamičnem sistemu. Glavne prednosti dinamičnega sistema pa so krajši čas zadrževanja ekstrakcijskega topila ter posledično manjša razgradnja termolabilnih snovi in večji izplen (5).

4 PREDNOSTI IN SLABOSTI EKSTRAKCIJE S SUBKRITIČNO VODO

Pri subkritični ekstrakciji z vodo je čas ekstrakcije navadno krajši in poraba topila je manjša v primerjavi z običajnimi metodami ekstrakcije za pridobivanje sorodnih ekstraktov, kar vodi do manjših obratovalnih stroškov. Poleg tega je subkritična ekstrakcija z uporabo vode namesto organskih topil varen ter okolju prijazen postopek s široko uporabnostjo za pridobivanje funkcionalnih živil ter kozmetičnih in farmacevtskih sestavin. Ekstrakti so v splošnem bolj kompleksni z vidika kemizma, saj ekstrahiramo polarne in tudi manj polarne spojine, subkritična voda pa je v subkritičnih pogojih tudi bolj difuzivna, zato daje večje izplene. Vendar pa je pri uvajanju te metode izredno pomembna optimizacija ekstrakcijskih razmer. Predolg čas segrevanja lahko povzroči termično razgradnjo spojin. Prav tako je večja možnost za potek drugih kemijskih reakcij, kot je Maillardova reakcija. Če želimo končni produkt v suhi obliki, je slabost tudi dodatni korak sušenja oz. koncentriranja, ki ga moramo izvesti po ekstrakciji, saj iz naprave po izvedeni ekstrakciji dobimo vodni ekstrakt. Zato je treba pred uvedbo ekstrakcije s subkritično vodo v industrijskem obsegu sestaviti natančen protokol, da zagotovimo stroško-



Slika 2: Shematski prikaz ekstraktorja s subkritično vodo; a) dinamični ekstraktor, b) statični ekstraktor.

Figure 2: Schematic representation of a subcritical water extractor; a) dynamic extractor, b) static extractor.

vno učinkovitost postopka. Velik strošek pa predstavlja tudi nakup take opreme (4, 6, 7).

5 MOŽNOSTI UPORABE

Tehnologija s subkritično vodo je v zadnjih letih zelo raziskovano področje in v prihodnosti pričakujemo več novih možnosti uporabe. Trenutno so najbolj aktualne uporaba produktov v farmaciji, predvsem pri proizvodnji pripravkov rastlinskega izvora, v kozmetični industriji ter v živilstvu.

5.1 EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJIN

Večina trenutno objavljenih raziskav o ekstrakciji s subkritično vodo je osredotočena na antioksidante, predvsem fenolne spojine iz različnih virov. Fenoli so razmeroma polarne spojine in spojine z različno termično stabilnostjo, kar je treba upo-

števati pri izbiri ustreznih ekstrakcijskih razmer (3). Antioksidativne fenolne spojine so s subkritično vodo ekstrahirali iz semen granatnega jabolka (*Punica granatum*) (8), grozdnih tropin (*Vitis vinifera*) (9), korenike ingverja (*Zingiber officinale*) (10), olupkov krompirja (*Solanum tuberosum*) (11), cvetov rumene žametnice (*Tagetes erecta*) (12) in plodov vrste papaje (*Vasconcellea pubescens*) (13).

Povečanje izplena ekstrakcije antioksidativnih spojin so v nekaterih primerih dosegli z dodatkom sotopila, kot je etanol, kislina ali baza. Ugotovili so, da sta temperatura nad 175 °C in dolg čas ekstrakcije povezana z večjo antioksidativno aktivnostjo v primeru cvetov rumene žametnice (12).

Glede na kemijsko naravo antioksidativnih spojin, prisotnih v rastlini, lahko razmere ekstrakcije prilagodimo tako, da nekatere spojine selektivno ekstrahiramo. Antocijanidini in fenolne kisline so primeri rastlinskih sekundarnih metabolitov z antioksidativnim delovanjem, ki jih je možno selektivno ekstrahirati (14), saj lahko temperaturo, tlak in čas ekstrakcije optimiziramo glede na število prostih hidroksilnih skupin v molekuli (14, 15). Na ta način so proučevali ekstrakcijo fenolnih spojin iz oplodja manga (*Mangifera indica*)

(3), zeli vednozelenega gornika (*Arctostaphylos uva-ursi*) (3) in lubja cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) (3), ekstrakcijo mircetina, kvercetina in kemferola iz črnega čaja (3), rutina iz ajde (*Fagopyrum esculentum*) (4), izoksantohumola iz hmelja (*Humulus lupulus*) (16) ter hesperidina in narirutina iz lupin citrusov (17), pri čemer so v tej raziskavi štirikrat povečali izplen v primerjavi s klasično ekstrakcijo.

5.2 PRIPRAVA DRUGIH OBOGATENIH EKSTRAKTOV

Spreminjanje pogojev ekstrakcije s subkritično vodo v odvisnosti od temperature, tlaka, pretoka in dodanega sotočila so proučevali tudi za pripravo ekstraktov, obogatenih z laktoni iz korenine kave kave (*Piper methysticum*) (18), ter sladilnih spojin steviozidov iz listov stevije (*Stevia rebaudiana*) (19, 20).

5.3 EKSTRAKCIJA POLISAHARIDOV

Polisaharidi so velika skupina strukturno raznolikih polimerov, ki vključujejo npr. škrob, celulozo, sluzi in pektine. Zaradi visoke polarnosti so dobri kandidati za ekstrakcijo s subkritično vodo. Tako so s to metodo pridobili pektine iz jabolčnih tropin in lupin citrusov (22), polisaharide iz navadne kustovnice ali goji (*Lycium barbarum*) (6), hemiceluloze iz listov oljne palme (23) ter mono- in oligosaharide iz kokosove moke (24).

5.4 PRIDOBIVANJE ALKALOIDOV

Alkaloidi so rastlinski sekundarni metaboliti s širokim spektrom bioloških aktivnosti, ki vsebujejo dušik. Ugotavljanje njihove vsebnosti je pogosto potrebno za vrednotenje in zagotavljanje ustrezne kakovosti rastlinskih drog. Ekstrakcijo s subkritično vodo so uporabili za ekstrakcijo kinolizidinskih alkaloidov citizina, sofokarpina, matrina, soforidina in oksimatrina iz vrste sofore *Sophora flavescens* (25) ter za ekstrakcijo izokinolinskih alkaloidov hidrastina in berberina iz kanadskega hidrasta (*Hydrastis canadensis*) (26).

5.5 PRIDOBIVANJE ETERIČNIH OLJ

Ekstrakcijo s subkritično vodo kot metodo pridobivanja eteričnih olj opredelujeta krajši čas ekstrakcije in večji odstotek vsebnosti kisikovih spojin v primerjavi z eteričnimi olji, pridobljenimi s parno destilacijo. Metodo so uporabili za pridobivanje eteričnih olj zeli rožmarina (*Rosmarinus of-*

ficinalis) (27), lista origana in bazilike (28), iz listov rastline *Thymbra spicata*, znane tudi pod imenom sredozemski timijan (29), zeli vrtnega šetraja (*Satureja hortensis*) (30), zeli poprove mete (*Mentha × piperita*) (30), listov modrega evkalipta (*Eucalyptus globulus*) (31), zeli navadnega komarčka (*Foeniculum vulgare*) (32), semen koriandra (*Coriandrum sativum*) (33) in korenine ingverja vrste *Zingiber cassumunar* (34). V vseh primerih so sestavo eteričnega olja, ki so ga proizvedli z ekstrakcijo s subkritično vodo pri različnih temperaturah, primerjali s sestavo eteričnega olja, pridobljenega z destilacijo. Na splošno so z ekstrakcijo s subkritično vodo v krajšem času pridobili večji odstotek hlapnih polarnih spojin (21).

6 SKLEP

Metoda ekstrakcije s subkritično vodo sodi med uveljavljajoče se zelene, okolju prijazne tehnologije za pridobivanje ekstraktov iz rastlinskega materiala. Ključna ekstrakcijska parametra sta temperatura (>100 °C), saj z višanjem temperature znižujemo dielektrično konstanto vode, in tlak, ki je potreben, da vodo vzdržujemo v tekočem stanju. Bistvenega pomena je tudi čas ekstrakcije, saj ob daljšanju časa pogosto pride do razgradnje zelenih produktov. Glavna razlika v sestavi tako pridobljenih ekstraktov glede na klasične metode je širši nabor ekstrahiranih spojin zaradi posebnih lastnosti vode v subkritičnem stanju. Metodo že uporabljajo za izdelavo izvlečkov v kozmetični industriji, najverjetneje pa ji bosta kmalu sledili tudi farmacevtska in prehrabna industrija. Predvsem v slednji bi lahko ekstrakcija s subkritično vodo v prihodnosti še dodatno pridobila na pomenu zaradi možnosti uporabe v krožnem gospodarstvu.

7 LITERATURA

1. Maroun RG, Rajha HN, El Darra N, El Kantar S, Chacar S, Debs E, et al. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. In: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier; 2018. p. 265–93.
2. Chakraborty S, Shaik L, Gokhale JS. Subcritical Water: An Innovative Processing Technology. In: *Innovative Food Processing Technologies*. Elsevier; 2021. p. 552–66.



3. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. Vol. 109, *Food and Bioprocess Processing*. Institution of Chemical Engineers; 2018. p. 52–73.
4. Essien SO, Young B, Baroutian S. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. Vol. 97, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 156–69.
5. Jokić S, Aladić K, Šubarić D. Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Environ Sci*. 2018;
6. Chao Z, Ri-Fu Y, Tai-Qiu Q. Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. *Sep Purif Technol*. 2013 Dec 13;120:141–7.
7. Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Barroso MF, Soares C, Moreira MM, et al. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. Vol. 111, *Industrial Crops and Products*. 2018. p. 579–89.
8. He L, Zhang X, Xu H, Xu C, Yuan F, Knez Ž, et al. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS + assay. *Food Bioprod Process*. 2012 Apr 1;90(2):215–23.
9. Monrad JK, Suárez M, Motilva MJ, King JW, Srinivas K, Howard LR. Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. *Food Res Int*. 2014 Dec 1;65(PA):77–87.
10. Anisa NI, Azian N, Sharizan M, Iwai Y. Temperature effects on diffusion coefficient for 6-gingerol and 6-shogaol in subcritical water extraction. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2014. p. 012009.
11. Singh PP, Saldaña MDA. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Res Int*. 2011 Oct 1;44(8):2452–8.
12. Xu H, Wang W, Jiang J, Yuan F, Gao Y. Subcritical water extraction and antioxidant activity evaluation with on-line HPLC-ABTS+ assay of phenolic compounds from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower residues. *J Food Sci Technol [Internet]*. 2015 Jun 29 [cited 2020 Oct 23];52(6):3803–11.
13. Uribe E, Delgadillo A, Giovagnoli-Vicunã C, Quispe-Fuentes I, Zura-Bravo L. Extraction techniques for bioactive compounds and antioxidant capacity determination of chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) fruit. *J Chem*. 2015;2015.
14. Ko MJ, Cheigh CI, Chung MS. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem*. 2014 Jan 15;143:147–55.
15. Lekar A V, Borisenko SN, Vetrova E V, Sushkova SN, Borisenko NI. Extraction of quercetin from *Polygonum hydropiper* L. by subcritical water. *Am J Agric Biol Sci*. 2013 Nov 23;9(1):1–5.
16. Gil-Ramírez A, Mendiola JA, Arranz E, Ruiz-Rodríguez A, Reglero G, Ibáñez E, et al. Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2012 Oct;16:54–60.
17. Cheigh CI, Chung EY, Chung MS. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *J Food Eng*. 2012 Jun 1;110(3):472–7.
18. Kubátová A, Miller DJ, Hawthorne SB. Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. *J Chromatogr A*. 2001 Jul 20;923(1–2):187–94.
19. Teo CC, Tan SN, Yong JWH, Hew CS, Ong ES. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J Sep Sci*. 2009;32(4):613–22.
20. Yildiz-Ozturk E, Tag O, Yesil-Celiktas O. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *J Supercrit Fluids*. 2014 Nov 1;95:422–30.
21. Abdelmoez W, Abdelfatah R. Therapeutic Compounds From Plants Using Subcritical Water Technology. In: *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*. Elsevier; 2017. p. 51–68.
22. Wang X, Chen Q, Lü X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocoll*. 2014 Jul 1;38:129–37.
23. Norsyabilah R, Hanim SS, Suhaila N, Noraishah A, Kartina S. Subcritical water extraction of monosaccharides from oil palm fronds hemicelluloses (Pengekstrakan Air Subgenting Daripada Monosakarida Dari Hemiselulosa Pelepah Kelapa Sawit). Vol. 17, *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2013.
24. Khuwijiitjaru P, Pokpong A, Klinchongkon K, Adachi S. Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *Int J Food Sci Technol*. 2014 Aug 1;49(8):1946–52.
25. Wang H, Lu Y, Chen J, Li J, Liu S. Subcritical water extraction of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. and determination by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Jan 25;58(1):146–51.
26. Mokgadi J, Turner C, Torto N. Pressurized Hot Water Extraction of Alkaloids in Goldenseal. *Am J Anal Chem*. 2013;04(08):398–403.
27. Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J Chromatogr A*. 2010 Apr;1217(16):2512–20.
28. Yang Y, Kayan B, Bozer N, Pate B, Baker C, Gizir AM. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *J Chromatogr A*. 2007 Jun 8;1152(1–2):262–7.
29. Ozel MZ, Gogus F, Lewis AC. Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chem*. 2003 Aug 1;82(3):381–6.
30. Kubatova A, Lagadec AJM, Miller DJ, Hawthorne SB. Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour Fragr J*. 2001 Jan 1;16(1):64–73.
31. Jiménez-Carmona MM, Luque de Castro MD. Isolation of eucalyptus essential oil for GC-MS analysis by extraction with subcritical water. *Chromatographia*. 1999;50(9–10):578–82.
32. Gámiz-Gracia L, Luque de Castro MD. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: Comparison with conventional techniques. *Talanta*. 2000 May 5;51(6):1179–85.
33. Eikani MH, Golmohammad F, Rowshanzamir S. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *J Food Eng*. 2007 May 1;80(2):735–40.
34. Chienthavorn O, Poonsukcharoen T, Pathrakorn T. Pressurized Liquid and Superheated Water Extraction of Active Constituents from *Zingiber cassumunar* Roxb. Rhizome. *Sep Sci Technol*. 2011 Feb 25;46(4):616–24.

TEHNOLOŠKE MOŽNOSTI ZA DOSTAVO ZDRAVILNIH UČINKOVIN V DEBELO ČREVO S PERORALNIMI FARMACEVTSKIMI OBLIKAMI

APPROACHES TO ORAL COLON-SPECIFIC DRUG DELIVERY

AVTORICI / AUTHORS:

Sara Brunec, mag. farm.^{1,2}

prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.²

¹ Krka, d. d., Novo mesto,

Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,

Katedra za farmacevtsko tehnologijo,

Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: sara.brunec@gmail.com

1 UVOD

Peroralne farmacevtske oblike so namenjene dostavi zdravilnih učinkovin v določene dele prebavil bodisi za lokalno

POVZETEK

Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem so po peroralnem vnosu na poti do debelega črevesja izpostavljene različnim dejavnikom. Za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo morajo biti dostavni sistemi zasnovani tako, da omogočijo sproščanje zdravilnih učinkovin šele v debelem črevesju, kjer lahko le-te delujejo bodisi lokalno bodisi sistemsko po absorpciji. V prispevku predstavljamo prednosti in slabosti dostave zdravilnih učinkovin v debelo črevo po peroralni poti.

KLJUČNE BESEDE:

debelo črevo, dostava zdravilnih učinkovin, peroralne farmacevtske oblike, prebavni trakt

ABSTRACT

After ingestion, controlled release oral dosage forms are exposed to different physiological factors. Colon-specific drug delivery systems have to be designed to enhance drug delivery to the colon. Oral route of drug administration can be used for both the systemic drug delivery and treating local gastrointestinal diseases. This review describes the physiological, pathophysiological and pharmaceutical considerations regarding drug delivery to the colon for the oral route of administration, as well as conventional and novel drug delivery approaches.

KEY WORDS:

colon, drug delivery gastrointestinal tract, oral dosage forms

bodisi za sistemsko zdravljenje bolezni (1). Ob porastu primerov bolezni debelega črevesja v zadnjih desetletjih je aktualna tema razvoj farmacevtskih oblik za ciljno dostavo v debelo črevo, predvsem zaradi učinkovitosti zdravljenja ob sočasnem zmanjšanju pojava sistemskih neželenih učinkov (1, 2). Ciljana dostava v debelo črevo pa je zanimiva tudi za sistemsko zdravljenje z zdravilnimi učinkovinami, občutljivimi na pogoje v zgornjih delih prebavnega trakta (2). Pri načrtovanju farmacevtskih oblik za ciljno dostavo v debelo črevo je potrebno poleg lastnosti zdravilnih učinkovin upoštevati več dejavnikov, ki vplivajo na sproščanje zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik in na absorpcijo v krvni obtok v primeru želenega sistemskega delovanja (1, 2). Pomembni dejavniki so čas zadrževanja farmacevtske oblike v posameznem delu prebavnega trakta, spre-



minjanje pH vrednosti, encimska aktivnost, prisotnost mikroorganizmov, hrane in sočasno apliciranih zdravilnih učinkovin, površina za absorpcijo in prekrvavljenost dela prebavnega trakta, kjer poteka absorpcija zdravilne učinkovine v krvni obtok, razpoložljivost vode za raztapljanje zdravilne učinkovine, prisotnost receptorjev ali prenašalcev za transport zdravilne učinkovine ter bolezenska stanja (1–5).

2 DOSTAVA ZDRAVILNIH UČINKOVIN V DEBELO ČREVO PO PERORALNI APLIKACIJI

Glavne funkcije prebavnega trakta so prebava zaužite hrane, absorpcija hranil in izločanje odpadnih produktov (1). Zaužita hrana po požiralniku, ob delovanju peristaltike, preide v želodec, kjer je podvržena mehanskim vplivom, pod vplivom klorovodikove kisline in encimov (predvsem peptidaz) pa poteka kemijska razgradnja hranil do manjših gradnikov. Tanko črevo je najdaljši del prebavil, ki ima veliko površino zaradi izrastkov, imenovanih resice oz. vili (6). Glavna funkcija tankega črevesja je prebava in absorpcija hranilnih snovi, soli in vode (6). V debelem črevesju potekajo absorpcija, sekrecija in transport (6). Skozi usta zaužite farmacevtske oblike potujejo po prebavnem traktu po isti poti kakor hrana in so prav tako podvržene različnim dejavnikom in spreminjajočim se pogojem v različnih delih prebavil. Dostava zdravilnih učinkovin v debelo črevo je uporabna tako za lokalno zdravljenje bolezni debelega črevesja, kot so kolorektalni rak, sindrom razdražljivega črevesja in kronična vnetna črevesna bolezen (7), kot tudi za sistemsko zdravljenje z zdravilnimi učinkovinami, ki niso stabilne v kislih pogojih (želodec) ali so podvržene encimski razgradnji v zgornjih delih prebavnega trakta (na primer proteini in peptidi) (2). Sluznica debelega črevesja je gladka in v primerjavi s tankim črevesjem nima resic. Prav tako ne vsebuje Panethovih celic, ki v tankem črevesju izločajo različne produkte, pomembne za vzdrževanje črevesne flore in obrambne funkcije črevesja (6). Med epitelijskimi celicami debelega črevesja so čašaste celice, ki izločajo zaščitno sluz (6). Sluznico debelega črevesja naseljuje veliko število različnih vrst bakterij; med najbolj zastopanimi so bakterije iz rodov *Bacteroides*, *Bifidumbacteria*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacteria* in *Peptostreptococcus* (1, 8).

Glavne prednosti peroralnih farmacevtskih oblik za ciljno dostavo v debelo črevo so:

- dostava zdravilne učinkovine neposredno na mesto delovanja za lokalno zdravljenje,
- boljši terapevtski učinek lokalnega zdravljenja zaradi minimiziranja izgub ob prehodu zgornjega dela prebavnega trakta,
- zaradi manjših izgub je možen manjši odmerek, kar zmanjšuje tveganje za pojav sistemskih neželenih učinkov,
- manj interakcij z zdravilnimi učinkovinami, ki se sproščajo na drugih mestih v prebavilih,
- manjši vpliv na zdravilne učinkovine (npr. proteinske in peptidne zdravilne učinkovine), občutljive na kisline in encime, prisotne v večji meri v zgornjem delu prebavnega trakta, in posledično večja biološka uporabnost teh zdravilnih učinkovin v primeru sistemskega zdravljenja,
- boljša sodelovalnost bolnikov pri zdravljenju s peroralnimi farmacevtskimi oblikami v primerjavi s parenteralnimi ali rektalnimi (2, 7, 9, 10).

Pri oblikovanju dostavnih sistemov za ciljno dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo po peroralni poti se soočamo z različnimi izzivi. Zdravilne učinkovine so ob prehodu skozi prebavni trakt izpostavljene metabolizmu prvega prehoda in različnim dejavnikom, ki vplivajo na stabilnost, topnost in absorpcijo (npr. vplivi na pH – del prebavnega trakta, hrana, zdravila, starost; vplivi na čas prehoda vzdolž prebavnega trakta – hrana, pomožne snovi, viskoznost črevesne vsebine; adsorpcija zdravilne učinkovine na molekule iz hrane – pektini in vlaknine; vezava zdravilne učinkovine na kovinske ione; encimska razgradnja zdravilne učinkovine) (1, 11). Primarno je potrebno preprečiti neželeno sproščanje zdravilne učinkovine iz dostavnega sistema že v zgornjih delih prebavnega trakta, pri čemer moramo upoštevati fiziološke in patofiziološke značilnosti prebavnega trakta (2). Fiziološke značilnosti se nanašajo predvsem na spreminjajoče se pH vrednosti vzdolž prebavnega trakta, čas zadrževanja zaužite vsebine v posameznih delih prebavnega trakta in gibljivost črevesja, prisotnost vode, encimov, mikroorganizmov in zaužite hrane ter permeabilnost barier (2). Patofiziološke značilnosti so povezane s specifičnimi pogoji ob različnih boleznih – tako so npr. pri bolnikih s črevesnimi boleznimi ravni reaktivnih kisikovih zvrsti in vnetnih citokinov višje v primerjavi z zdravimi posamezniki, izraženo je neravnovesje pomembnih antioksidantov v telesu, sluznica prebavil je prizadeta in ima posledično spremenjeno permeabilnost (2). Pri peroralnih farmacevtskih oblikah je nastop učinka zaradi potrebnega časa za absorpcijo zdravilne učinkovine kasnejši v primerjavi z nekaterimi drugimi farmacevtskimi oblikami (npr. intravenske injekcije). Peroralne farmacevtske oblike so zato manj primerne za zdravljenje pri nujnih stanjih (1). Slabost peroralnih

farmacevtskih oblik je lahko tudi neprijeten okus zdravilne učinkovine ali draženje želodčne sluznice (1).

Debelo črevo predstavlja poseben izziv za dostavo zdravilnih učinkovin, saj je vode v lumnu zaradi obsežne absorpcije malo, prisotna pa je zelo viskozna zaščitna sluz, ki otežuje solubilizacijo zdravilnih učinkovin (3, 12). Ciljano dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo lahko zagotovimo z izbiro primerne dostavne sistema, ki ga je potrebno načrtovati na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine, lastnosti polimerov in ostalih pomožnih snovi, ki sestavljajo dostavni sistem ter patofiziologije same bolezni (4, 13).

Dodatno omejujoč dejavnik je v nekaterih primerih zahtevna tehnologija izdelave dostavnih sistemov, ki je povezana z visokimi stroški (1–3, 5, 14). Za nekatere dostavne sisteme obstaja tudi premalo podatkov o njihovi varnosti (15).

3 PRISTOPI ZA OBLIKOVANJE DOSTAVNIH SISTEMOV ZA DOSTAVO ZDRAVILNIH UČINKOVIN V DEBELO ČREVO

Izbira primerne sistema za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo je odvisna od kemijske strukture, stabilnosti, porazdelitvenega koeficienta, funkcionalnih skupin in drugih lastnosti zdravilne učinkovine, patofiziologije bolezni ter fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi (1–3). Različni naravni, sintezni in polysintezni polimeri lahko zdravilno učinkovino v dostavnem sistemu ustrezno zaščitijo pred spremembami pH in encimsko aktivnostjo vzdolž prebavnega trakta.

Polimeri so pomembne sestavine različnih dostavnih sistemov – od klasičnih ogrodnih do kompleksnejših osmotsko nadzorovanih sistemov (8). Dodatne možnosti dostave zdravilnih učinkovin v debelo črevo v zadnjem času omogoča tudi nanotehnologija (8). Z izbranimi pomožnimi snovmi lahko nadzorujemo čas začetka sproščanja zdravilne učinkovine, medtem ko je mesto sproščanja lahko pogojeno tudi s prisotnostjo določenih mikroorganizmov in reaktivnih kisikovih zvrsti ter tlaka v prebavni cevi (13). V nadaljevanju bomo predstavili naslednje primere dostavnih sistemov za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo:

- na pH občutljive dostavne sisteme,
- časovno odvisne dostavne sisteme,
- dostavne sisteme, odvisne od mikroorganizmov oz. njihovih encimov (biorazgradljivi polimeri, predzdravila),
- dostavne sisteme, odvisne od tlaka v prebavni cevi,

- osmotsko nadzorovane dostavne sisteme,
- bioadhezivne dostavne sisteme.

3.1 NA pH OBČUTLJIVI DOSTAVNI SISTEMI

Vrednosti pH se razlikujejo glede na odsek prebavnega trakta, kar lahko izkoristimo pri načrtovanju dostavnih sistemov. V želodcu je pH na tešče med 1,5 in 2 (1), po obroku ali ob določenih bolezenskih stanjih pa lahko znatno poraste (16). V dvanajstniku je pH okrog 6, najvišji pH – okrog 7,4 – pa je normalno v končnem delu tankega črevesja (ileumu) (1). Na začetku debelega črevesja v navzgorjem kolonu lahko pH pade malo pod 6 (1), v danki pa so vrednosti okrog 6,7 (1). Znižanje pH ob prehodu iz tankega črevesja v debelo črevo je posledica prisotnosti kratkoveržnih maščobnih kislin, ki nastajajo ob bakterijski razgradnji polisaharidov ter oligosaharidov in vplivajo tudi na peristaltično aktivnost (9, 17–19).

Mehanizem sproščanja zdravilne učinkovine iz na pH občutljivih dostavnih sistemov temelji na strukturnih spremembah polimerov v določenem območju pH (nevtralni ali rahlo alkalni pH). Tovrstne polimere lahko pri tabletah in kapsulah uporabimo v oblogah, ki nadzorujejo sproščanje bodisi pri enoenotnih bodisi pri večnoten farmacevtskih oblikah, in morajo biti odporne na nizke vrednosti pH v želodcu in v proksimalnem delu tankega črevesja; v terminalnem delu ileuma in na prehodu v debelo črevo pa pod vplivom višjega pH pride do strukturnih sprememb polimerov in sproščanja zdravilne učinkovine. Primerni so kopolimeri metakrilne kisline in derivati hidroksipropilmetilceluloze (1, 2). Pri nižjem pH netopna obloga ob prehajanju zgornjega dela prebavnega trakta ščiti zdravilno učinkovino pred želodčnimi sokovi, žolčem in mikroorganizmi, medtem ko višje vrednosti pH sprožijo raztapljanje obloge in posledično sproščanje zdravilne učinkovine iz dostavnega sistema in s tem zagotavljajo prirejeno sproščanje (1). Druga možnost je vgradnja na pH občutljivih polimerov v ogrodne sisteme, pri katerih prihaja v določenem pH območju do erozije oz. raztapljanja polimera in s tem do difuzije zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike (1, 3, 8, 20). Ključni dejavniki pri načrtovanju na pH občutljivih dostavnih sistemov so uporaba kombinacij različnih polimerov, upoštevanje količino uporabljenega polimera, uporaba plastifikatorjev, variabilnost vrednosti pH prebavnega trakta pri posamezniku in med posamezniki, koncentracija elektrolitov in čas prehoda črevesne vsebine (1, 17).

Slabost na pH občutljivih dostavnih sistemov je, da se pH med posamezniki ali celo pri isti osebi na istem mestu v prebavni cevi lahko spreminja (npr. zaradi prisotnosti hrane,



bolezni, starosti, cirkadianega ritma in drugih sočasno zaužitih zdravil) (1, 7). Posledično lahko padec vrednosti pH na začetku debelega črevesja prepreči sproščanje zdravilne učinkovine ali pa se zdravilna učinkovina iz dostavnega sistema začne sproščati že v spodnjem delu tankega črevesja, (2, 3, 7, 13, 17, 21).

3.2 ČASOVNO ODVISNI DOSTAVNI SISTEMI

Časovno odvisni dostavni sistemi sprostijo zdravilno učinkovino po določenem času ali v več časovnih točkah. Takšni dostavni sistemi so uporabni v primerih, ko je zaželeno, da se zdravilna učinkovina sprostí iz farmacevtske oblike ob točno določenem času ali na določenem mestu v prebavni cevi glede na predviden čas prehoda črevesne vsebine (14). Mehanizem časovno odvisnega sproščanja je možno doseči z uporabo hidrofilnih polimerov (etilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza), ki postopoma nabrekajo in omogočajo zakasnitev sproščanja zdravilne učinkovine (1). Sproščanje zdravilne učinkovine je nadzorovano z nabrekanjem polimera, ki v stiku z vodo tvori gel, vdiranjem vode v ogrodje, raztapljanjem zdravilne učinkovine in njenim prehajanjem skozi nabreklo polimerno plast ter erozijo ogrodja (1). Patentirani so tudi naprednejši sistemi, ki imajo dodatne mehanizme sproščanja – npr. od pH in časovno odvisno sproščanje (1, 3, 22). Primer sistema s kombiniranim mehanizmom sproščanja je sistem, sestavljen iz nerazgradljivega telesa kapsule, čepa iz hidrogela, ki zapira odprti del telesa kapsule, in v vodi topne kapice kapsule, ki pokriva čep iz hidrogela. Cela kapsula ima še gastrorezistentno oblogo, ki se pod vplivom pH okolja razgradi v tankem črevesju. Kapica kapsule se ob stiku z vodo raztopi, nato začne hidrogel nabrekati in se po določenem času iztisne iz telesa kapsule, zdravilna učinkovina, ki se nahaja v telesu kapsule, pa se sprostí. Čas nabrekanja hidrogela določa časovni zamik sproščanja zdravilne učinkovine (1, 3, 22). Slabost časovno odvisnih dostavnih sistemov je velika variabilnost v času prehoda vzdolž posameznih delov prebavnega trakta, še zlasti v prisotnosti zaužite hrane. Čas prehajanja je odvisen od fizioloških in patofizioloških dejavnikov (npr. pospešeno prehajanje skozi debelo črevo pri razdražljivem črevesju) (1).

3.3 OD MIKROORGANIZMOV ODVISNI DOSTAVNI SISTEMI

Ti sistemi temeljijo na specifičnih encimskih reakcijah, ki lahko potekajo v debelem črevesju zaradi prisotnosti mikroorganizmov. Encimi mikroorganizmov lahko razgradijo

vezi v ogljikovih hidratih in proteinih. V debelem črevesju so določili preko 400 različnih rodov bakterij, od katerih jih je 20 do 30 % iz rodu *Bacteroides*. Druge pomembne anaerobne bakterije so še iz rodov *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* in *Clostridium*. Encimi, ki jih izločajo, v glavnem katalizirajo hidrolize (esteraze, amidaze, glikozidaze, glukuronidaze, sulfataze) in redukcije (nitroreduktaze, azoreduktaze, sulfoksid reduktaze, hidrogenaze) (1–3, 17, 20). Prvi možni pristop je načrtovanje predzdravil, kjer lahko z vezavo ustreznih funkcionalnih skupin na molekulo zdravilne učinkovine dosežemo farmakološko aktivno obliko po encimski razgradnji v debelem črevesju (1, 3, 14). Predmet proučevanja je bila predvsem azoreduktazna aktivnost bakterij v debelem črevesju (1). Pri tem pristopu lahko poleg ciljane dostave zdravilne učinkovine v debelo črevo izboljšamo tudi njene topnost, permeabilnost in stabilnost (1). Ta pristop izkoriščajo npr. farmacevtske oblike s predzdravili 5-aminosalicilne kisline (sulfasalazin, olsalazin), ki jih uporabljamo za zdravljenje kroničnih vnetnih črevesnih bolezni. Sulfasalazin se slabo absorbira v zgornjih delih prebavnega trakta, v debelem črevesju pa se v prisotnosti azoreduktaz razgradi do 5-aminosalicilne kisline, ki deluje pri zdravljenju kroničnih vnetnih črevesnih bolezni (1). Drug pristop vključuje uporabo polimerov v ogrodnih ali rezervoarnih dostavnih sistemih. Polisaharidi so lahko rastlinskega (gvarjev gumi, inulin) ali živalskega izvora (hitosan, hondroitin sulfat), pridobljeni iz alg (alginati) ali s pomočjo mikroorganizmov (dekstran) (3, 14, 20). Neškrobni polisaharidi so odpornejši na razgradnjo v tankem črevesju in se razgradijo v debelem črevesju (1). Hidrofilni polimeri privzamejo vodo in nabrekajo med pomikanjem po prebavnem traktu. Omogočajo prehajanje bakterij in/ali encimov skozi hidratirano plast, kar sproži razgradnjo polimera in sprostitev zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike (1). Slabost dostavnih sistemov, odvisnih od mikroorganizmov, je premajhna specifičnost sproščanja zdravilne učinkovine, predvsem zaradi prisotnosti velikega števila vrst bakterij vzdolž celotnega prebavnega trakta in variabilnosti v zastopanosti posameznih rodov bakterij pri posameznikih in odvisnosti od fizioloških in patofizioloških sprememb. Patofiziološke spremembe v črevesni mikroflori lahko nastajajo npr. zaradi bolezni črevesja ali uporabe antibiotikov. Posledica spremembe v številu in zastopanosti bakterij je spremenjeno izločanje encimov, ki so pomembni za sproščanje zdravilne učinkovine iz dostavnega sistema. V nekaterih primerih pa zaradi hitrega prehoda farmacevtske oblike skozi prebavni trakt encimi nimajo na voljo dovolj časa za delovanje (npr. v primeru diareje) (1). Pri dostavnih sistemih z močno hidrofilnimi polimeri lahko v prisotnosti vode pride

tudi do neželenega predčasnega sproščanja zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike, zato so raziskovalci proučevali možnosti kemijskih modifikacij polisaharidov in kombiniranja s hidrofobnimi polimeri (1). Za optimalno sproščanje zdravilne učinkovine je ključno ravnotežje med hidrofilnimi in hidrofobnimi lastnostmi polimerov. Polimeri, ki so manj vodotopni, lahko sicer dlje zadržijo zdravilno učinkovino znotraj dostavnega sistema, vendar se lahko tudi prepozno razgradijo. Pri načrtovanju takšnih sistemov je pomembno, da preprečimo predčasno sproščanje zdravilne učinkovine v želodcu ali tankem črevesju in prepozno sproščanje v samem debelem črevesju (1–3, 14).

3.4 TLAČNO NADZOROVANI DOSTAVNI SISTEMI

Presnovo hrane v prebavni cevi spremlja ritmično krčenje gladkega mišičja vse od požiralnika do konca debelega črevesja. Za razliko od pogostejših peristaltičnih valov v drugih delih prebavne cevi se le-ti v debelem črevesju izrazijo na kratko in le tri- do štirikrat dnevno, vendar so močnejši in tako pomembno zvišajo tlak v lumnu debelega črevesja. Primer dostavnega sistema, ki ima vgrajen mehanizem sproščanja zdravilne učinkovine glede na okoliški tlak, je kapsula z ovojnico iz etilceluloze, netopne v vodi (14). Polimerna kapsula razpade pod vplivom visokega tlaka v lumnu debelega črevesja, ključni dejavniki pri oblikovanju pa so debelina ovojnice kapsule in velikost kapsule (3, 14).

Izziv pri načrtovanju tlačno nadzorovanih dostavnih sistemov je doseči ustrezno raztapljanje zdravilne učinkovine, kar je v normalnih pogojih oteženo zaradi obilne reabsorpcije vode in posledično velike viskoznosti črevesne vsebine v debelem črevesju. V opisanem dostavnem sistemu v obliki kapsule z ovojnico iz etilceluloze je možna rešitev tekoča vsebina z raztopljeno zdravilno učinkovino (14).

3.5 OSMOTSKO NADZOROVANI DOSTAVNI SISTEMI

Osmotsko nadzorovani sistemi so sestavljeni iz jedra z zdravilno učinkovino in osmotsko aktivne pomožne snovi (osmogen). Obdani so s polprepustno membrano, ki nadzoruje vstopanje vode v jedro. S hidratacijo in nabrekanjem osmogeno narašča osmotski pritisk znotraj farmacevtske oblike in povzroča sproščanje zdravilne učinkovine skozi eno ali več odprtih (3, 4, 17).

Tudi osmotsko nadzorovane sisteme je zaradi različnih časov prehoda skozi prebavno cev izziv načrtovati tako, da se zdravilna učinkovina sprosti na izbranem mestu. Teh-

nologija je zahtevna in povezana z višjimi proizvodnimi stroški (3, 14).

3.6 BIOADHEZIVNI DOSTAVNI SISTEMI

Cilj načrtovanja bioadhezivnih sistemov je podaljšati čas stika dostavnega sistema s površino sluznice debelega črevesja, da se lahko sprosti čim več zdravilne učinkovine (14, 23). Polimeri, ki so jih uporabili v raziskavah bioadhezivnih dostavnih sistemov, so polikarbofilli, poliuretani in polietilen oksid (3). Ahmad in sodelavci (3, 24) so uporabili škrob iz sorte riža *Assam Bora* za dostavo metronidazola v debelo črevo v obliki bioadhezivnih mikrododelcev. Bioadhezivni sistemi omogočajo podaljšan stik zdravilne učinkovine z mestom delovanja oz. absorpcije, so manj podvrženi encimskim reakcijam in zaradi manj pogostega jemanja zdravila omogočajo večje sodelovanje bolnikov pri zdravljenju (3, 25). Izzivi pri oblikovanju tovrstnih dostavnih sistemov so doseganje bioadhezije na želenem mestu delovanja in izbira biokompatibilnih polimerov (3, 25).

4 TRENDI RAZVOJA DOSTAVNIH SISTEMOV ZA DOSTAVO ZDRAVILNIH UČINKOVIN V DEBELO ČREVO

Zaradi premajhne specifičnosti oziroma neželenega sproščanja zdravilnih učinkovin tudi na drugih mestih v prebavnem traktu in s tem povezanimi neželenimi učinki zdravil raziskovalci proučujejo nove možnosti za načrtovanje peroralnih dostavnih sistemov za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo. Alternativni pristopi vključujejo načrtovanje dostavnih sistemov, ki so v organizmu odvisni od dveh ali več dejavnikov (npr. vrednost pH in časovna odvisnost, vrednost pH in prisotnost določenih mikroorganizmov) (1). Patentirani so različne sisteme, ki so tehnološko rezervoarni ali ogrodni sistemi, na voljo kot eno- ali večletne farmacevtske oblike (1). Skupna značilnost teh sistemov je izbira pomožnih snovi, ki zagotavljajo vsaj dvojni nadzor sproščanja zdravilne učinkovine iz dostavnega sistema in s tem doseganje mestno specifičnega delovanja v debelem črevesju (1, 3, 4, 13, 14, 21). Nekatere pomembne prednosti imajo dostavni sistemi, osnovani na nanotehnologiji. Nanodelci lahko zaradi manjše velikosti lažje in hitreje prodrejo v vnetno tkivo, ki je značilno za kronične vnetne črevesne bolezni, v primerjavi z večjimi dostavnimi sistemi bodisi zaradi večje permeabilnosti patoloških tkiv bodisi jih privza-



mejo vnetne celice imunskega sistema (1, 7). Majhnost dostavnega sistema je v primeru hitrega privzema v vnetna tkiva ali celice prednost tudi v primeru driske, ki pri večjih farmacevtskih oblikah lahko povzroči prehitro izločanje le-teh iz telesa (1). Nanodelci v primerjavi z večjimi dostavnimi sistemi teoretično lahko dosežejo enak ali boljši terapevtski učinek že pri nižjih odmerkih vgrajene zdravilne učinkovine (1). Pri inovativnih pristopih oblikovanja dostavnih sistemov na osnovi nanotehnologije pa je potrebno še dodatno vrednotenje varnosti, saj so tovrstni podatki omejeni (1).

5 SKLEP

Predstavljeni dostavni sistemi so iztočnica za razmišljanje o novih možnih pristopih načrtovanja dostavnih sistemov za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo, ki postaja vse pomembnejše mesto delovanja zdravilnih učinkovin – po eni strani zaradi optimizacije lokalnega zdravljenja bolezni debelega črevesja, po drugi strani kot raziskovanje novih možnosti dostave zdravilnih učinkovin za sistemsko zdravljenje. Izzivi za oblikovanje učinkovitih dostavnih sistemov za dostavo zdravilnih učinkovin v debelo črevo segajo vse od fizioloških preprek (pH, čas prehoda črevesne vsebine, prisotnost encimov in mikroorganizmov) do zagotovitve varnosti ter ne nazadnje ekonomske industrijske proizvodnje. Pristopi kombiniranja več mehanizmov sproščanja zdravilnih učinkovin (npr. s pomočjo mikroorganizmov in različne vrednosti pH) so učinkovitejši od pristopov s samo enim mehanizmom.

6 LITERATURA

- Hua S. *Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors*. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 Apr 28 [cited 2021 Mar 9];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7212533/>
- Lee SH, Bajracharya R, Min JY, Han J-W, Park BJ, Han H-K. *Strategic Approaches for Colon Targeted Drug Delivery: An Overview of Recent Advancements*. *Pharmaceutics*. 2020 Jan 15;12(1).
- Amidon S, Brown JE, Dave VS. *Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches*. *AAPS PharmSciTech*. 2015 Aug;16(4):731–41.
- Philip AK, Philip B. *Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches*. *Oman Med J*. 2010 Apr;25(2):79–87.
- Abuהלwa AY, Williams DB, Upton RN, Foster DJR. *Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption*. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2017 Mar;112:234–48.
- Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M, Andoljšek D, et al. *Interna medicina*. 4th ed. Ljubljana: Littera picta: Slovensko medicinsko društvo; 2011. 563–69, 595–96 p.
- Naeem M, Awan UA, Subhan F, Cao J, Hlaing SP, Lee J, et al. *Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions*. *Arch Pharm Res*. 2020 Jan;43(1):153–69.
- Arévalo-Pérez R, Maderuelo C, Lanao JM. *Recent advances in colon drug delivery systems*. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2020 Nov 10;327:703–24.
- Wilson CG. *The transit of dosage forms through the colon*. *Int J Pharm*. 2010 Aug 16;395(1–2):17–25.
- Banerjee A, Pathak S, Subramaniam VD, G D, Murugesan R, Verma RS. *Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives*. *Drug Discov Today*. 2017 Aug;22(8):1224–32.
- Martinez MN, Amidon GL. *A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals*. *J Clin Pharmacol*. 2002 Jun;42(6):620–43.
- Schiller C, Fröhlich C-P, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, et al. *Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Nov 15;22(10):971–9.
- Teruel AH, Gonzalez-Alvarez I, Bermejo M, Merino V, Marcos MD, Sancenon F, et al. *New Insights of Oral Colonic Drug Delivery Systems for Inflammatory Bowel Disease Therapy*. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 5;21(18).
- Ratnaparkhi MP, Somvanshi FU, Pawar SA, Chaudhari SP, Gupta JP, Budhavant KA. *Colon Targeted Drug Delivery System*. *International Journal of Pharma Research & Review* [Internet]. 2013 Aug [cited 2019 Jul 26];2(8):33-42. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/3ba7/61bc9065317dbbbfb5adf81bd32494d30680.pdf>.
- Zhu W, Chuah YJ, Wang D-A. *Bioadhesives for internal medical applications: A review*. *Acta Biomater*. 2018 Jul 1;74:1–16.
- Arévalo-Pérez R, Maderuelo C, Lanao JM. *Recent advances in colon drug delivery systems*. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2020 Nov 10;327:703–24.
- Prasanth VV, Jayaprakash. R, Mathew ST. *Colon specific drug delivery systems: a review on various pharmaceutical approaches*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [Internet]. 2012 Jan. [cited 2019 May 11];02 (01)163-169. Available from: https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/363_pdf.pdf.
- Cuche G, Cuber JC, Malbert CH. *Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Nov;279(5):G925-930.
- Cherbut C. *Motor effects of short-chain fatty acids and lactate in the gastrointestinal tract*. *Proc Nutr Soc*. 2003 Feb;62(1):95–9.
- Patel MM. *Formulation and development of di-dependent microparticulate system for colon-specific drug delivery*. *Drug Deliv Transl Res*. 2017 Apr;7(2):312–24.
- Kang J-H, Hwang J-Y, Seo J-W, Kim H-S, Shin US. *Small intestine- and colon-specific smart oral drug delivery system with controlled release characteristic*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Oct 1;91:247–54.

22. *Shahdadi Sardo H, Saremnejad F, Bagheri S, Akhgari A, Afrasiabi Garekani H, Sadeghi F. A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted oral drug delivery systems. Int J Pharm. 2019 Mar 10;558:367–79.*
23. *Phuong HLT, Thao TDT. Mucoadhesive Formulation Designs for Oral Controlled Drug Release at the Colon. Curr Pharm Des. 2021 Jan 31;27(4):540–7.*
24. *Ahmad MZ, Akhter S, Ahmad I, Singh A, Anwar M, Shamim M, et al. In vitro and in vivo evaluation of Assam Bora rice starch-based bioadhesive microsphere as a drug carrier for colon targeting. Expert Opin Drug Deliv. 2012 Feb;9(2):141–9.*
25. *Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. J Pharm Bioallied Sci. 2011 Jan;3(1):89–100.*



NANOVLAČNA ZA DOSTAVO UČINKOVIN IN TKIVNO INŽENIRSTVO

NANOFIBERS FOR DRUG DELIVERY AND TISSUE ENGINEERING

AVTORJI / AUTHORS:

Anže Zidar, mag. farm.

prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: alenka.zvonar-pobirk@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Na področju zdravil se v zadnjem času pojavlja vse več naprednih dostavnih sistemov, ki pogosto omogočajo doseganje boljše biološke uporabnosti in nadzorovano sproščanje učinkovin ter imajo nekatere druge prednosti v primerjavi s tradicionalnimi farmacevtskimi oblikami. Med napredne dostavne sisteme sodijo poleg različnih nanodelcev tudi nanovlakna, ki so jih prvič opisali leta 1934, ko

POVZETEK

Nanovlakna so edinstven inovativen sistem za dostavo zdravilnih učinkovin in za tkivno inženirstvo. V zadnjih letih so doživela izjemen razvoj, kar bo omogočilo izdelavo novodobnih zdravil in tkivnih nadomestkov za zdravljenje mnogih bolezni in poškodb. Nanovlakna so izdelana z elektrostatskim sukanjem iz naravnih in/ali sinteznih polimerov z različno sestavo in strukturo (enoslojna, večslojna in večplastna) ter izkazujejo edinstveno kombinacijo strukturnih, funkcionalnih in mehanskih lastnosti. Prilagodljivost nanovlaken je privedla do razvoja širokega nabora dostavnih sistemov za različne učinkovine in podpornih struktur za obnovo tkiv. V preglednem članku predstavljamo pripravo nanovlaken z elektrostatskim sukanjem, doseganje različnih profilov sproščanja vgrajenih majhnih molekul in biofarmaceutikov za zdravljenje ter obnovo tkiv. Polimerna nanovlakna v tkivnem inženirstvu podpirajo razmnoževanje in rast celic ter na ta način spodbudijo obnovo tkiva. Nanovlakna kljub mnogim prednostim predvsem zaradi nezadostnih podatkov o njihovi varnosti in omejitvev v industrijski proizvodnji še niso v klinični uporabi, jih pa lahko pričakujemo kmalu.

KLJUČNE BESEDE:

dostavni sistemi, elektrostatsko sukanje, nanovlakna, polimer, sproščanje učinkovin, tkivno inženirstvo

ABSTRACT

Nanofibers provide unique systems for drug delivery and tissue engineering. In recent years, major advances have been made towards the formulation of innovative medicines and tissue replacements for the treatment of disease and injury. Nanofibers are made by electrospinning of natural and/or synthetic polymers, and as such, they can have a range of different compositions and structures (e.g., monolayers, multilayers, 'sandwich'). They also show unique combinations of structural, functional and mechanical properties. This flexibility has led to the development of a wide assortment of nanofibers as drug-delivery systems and tissue-regeneration structures. This review covers the preparation of nanofibers by electrospinning and provides the details on their release kinetics for small

molecules and biopharmaceuticals, and their use for treatment and tissue engineering. Polymeric nanofibers in tissue engineering support proliferation and growth of cells, hence encouraging tissue regeneration. Despite the many advantages of nanofibers, they are not yet in clinical use. This is mainly due to insufficient data on their safety and limitations in their industrial production, but these aspects are expected to be overcome soon.

KEY WORDS:

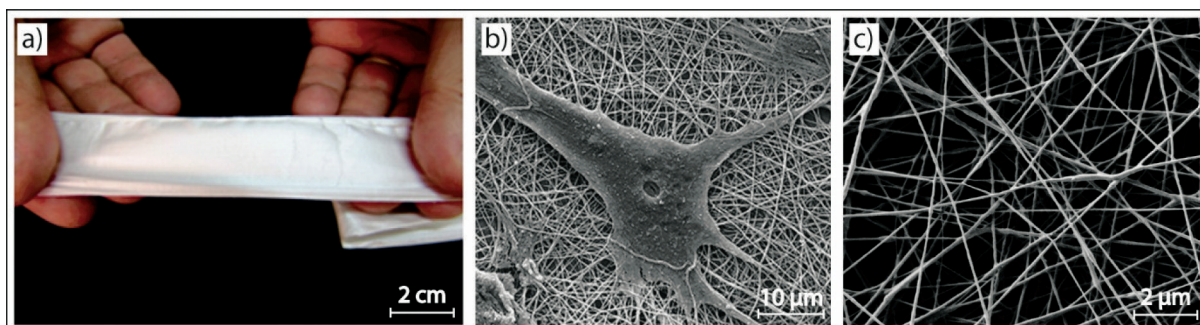
drug delivery, drug release, electrospinning, nanofibers, polymer, tissue engineering

so patentirali postopek njihove izdelave. Zaradi pomanjkanja ustrezne tehnologije je razvoj na tem področju v večji meri zastal do konca dvajsetega stoletja, ko so se možnosti za izdelavo in posledično tudi interes industrije močno povečali (1). Nanovlakna so zelo tanka in teoretično neomejeno dolga. Premer nanovlaken je največkrat od 10 do 1000 nm, imajo veliko specifično površino glede na maso in raznovrstne površinske lastnosti. Za njihovo uporabo so zelo pomembne ustrezne strukturne, funkcionalne in mehanske lastnosti, kot sta visok Youngov modul in posledično visoka natezna trdnost (2–4). Za biomedicinske namene danes raziskujejo nanovlakna za uporabo v dostavnih sistemih učinkovin in tkivnem inženirstvu, za izdelavo filtrov za filtracijo zraka in preprečevanje okužb (kot del obraznih mask), kot sestavine pametnih ovojnin za shranjevanje živil, sestavine gradbenih materialov, pa tudi v sistemih za pridobivanje,

prenos in shranjevanje električne energije (3, 5–7). Nanovlakna z zdravilno učinkovino lahko vgradimo v farmacevtske oblike z različnimi profili sproščanja učinkovin ali pa jih uporabimo pri tkivnem inženirstvu za spodbujanje obnove tkiv (8–10). V nanovlakna lahko vgrajujemo male molekule učinkovin, peptide in proteine, nukleinske kisline in celice (11, 12). V literaturi tako zasledimo raziskave o nanovlaknih kot dostavnih sistemih za učinkovine z raznovrstnim farmakološkim delovanjem (protivnetnim, protimikrobnim, antineoplastičnim, analgetičnim, antialergijskim ali kontracepcijskim učinkom). Ena izmed aktualnih tehnologij za inženirstvo in izdelavo nanovlaken je elektrostatsko sukanje, ki omogoča preoblikovanje izbrane koloidne raztopine pod vplivom elektrostatskih sil v tanek curek in nastanek nanovlaken z želenima debelino in morfologijo. V prispevku predstavljamo izdelavo in uporabo nanovlaken za dostavo zdravilnih učinkovin ali pripravo tkivnih nadomestkov (slika 1).

2 ELEKTROSTATSKO SUKANJE

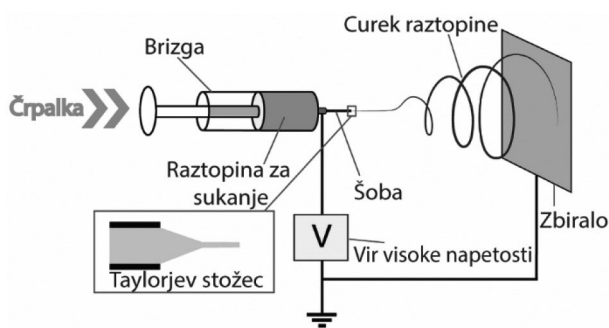
Najpomembnejša metoda za izdelavo nanovlaken za biomedicinske namene je elektrostatsko sukanje, ki omogoča izdelavo vlaken farmacevtske kakovosti (4, 13). To je proces, pri katerem se curek raztopine polimera zaradi močnega električnega polja na poti od šobe do zbirala podaljša, stanjša, posuši in posledično naloži na zbiralu (slika 2). Značilnosti slednjih so odvisne od lastnosti koloidne raztopine polimera (viskoznost, električna prevodnost in površinska



Slika 1. Videz nanovlaken v različnih merilnih skalah: a) množica plasti nanovlaken tvori belo membrano, kot jo vidimo s prostim očesom; b) posnetek nekaj plasti nanovlaken s keratinocitom, pritrjenim na površini, v mikrometrskem območju; c) posnetek nanovlaken z vrstičnim elektronskim mikroskopom v nanometrskem območju.

Figure 1. Appearance of nanofibers on different scales a) many layers of nanofibers form white membrane that is seen with a naked eye, b) a few layers of nanofibers with an attached keratinocyte in a micrometre scale c) nanofibers captured with an electron microscope in a nanometre scale.





Slika 2: Shema naprave za elektrostatsko sukanje z glavnimi elementi.
Figure 2: Schematic representation of a nanofiber electrospinning set-up.

napetost), procesnih (velikost in oblika šobe, napetost in razdalja med šobo in zbiralom ter vrsta zbirala) in okoljskih parametrov (relativna zračna vlaga in temperatura) (3, 14, 15). Nanovlakna izdelamo bodisi iz koloidne raztopine ali taline enega ali več polimerov (t. i. kompozitna nanovlakna) bodisi iz taline lipidov (v tem primeru mora biti sistem za dovajanje tekočine skozi šobo opremljen z dodatno grelni enoto). V nadaljevanju bomo podrobneje prikazali elektrostatsko sukanje koloidne raztopine polimera (2, 4, 7, 9). Medtem ko je naprava za elektrostatsko sukanje na videz enostavna (slika 2), je izdelava nanovlaken zahteven in od številnih zgoraj omenjenih parametrov odvisen proces. Napravo sestavljajo rezervoar s šobo, vir visoke napetosti, črpalka za uravnavanje pretoka raztopine in zbiralna elektroda (zbiralo). Napetost med šobo in zbiralom je lahko enosmerna (stalna) ali izmenična (običajno nastavimo med 10 in 100 kV) (13). Poznamo tudi več izvedb šobe, ki je lahko enokanalna (enostavna), dvokanalna (koaksialna) ali večkanalna; iz nje izhaja eden ali več curkov hkrati. Prav tako so razpoložljiva različna zbirala (ravna ploskev, vrteč valj, mrežasto zbiralo). Vrsta zbirala vpliva na nastanek naključno ali vzporedno urejenih nanovlaken (3, 4). Elektrostatsko sukanje temelji na ionizaciji koloidne raztopine v električnem polju. Na izhodu šobe se nastajajoča kapljica pod vplivom tlaka, električne sile, površinske napetosti tekočine in njene viskoznosti oblikuje v t. i. Taylorjev stožec, ki se nadaljuje v vse tanjši polimerni curek. V prvi fazi gibanja potuje curek naravnost proti zbiralu in se medtem podaljšuje in tanjša. Ko se curek tanjša, se na površini povečuje gostota naboja in s tem odbojne sile, zaradi katerih se začne curek vrtinčiti proti zbiralu. To vodi še v nadaljnje tanjšanje curka in povečanje njegove specifične površine, kar še pospeši izhlapevanje topila. Proces izdelave se zaključi z naganjem posušenega nanovlakna na zbiralo (3, 4, 7).

Ena glavnih značilnosti elektrostatskega sukanja je možnost vgradnje najrazličnejših učinkovin v vlakna z namenom, da se jim izboljša biološka uporabnost, pospeši raztapljanje ali doseže nadzorovano sproščanje. Poleg tega je mogoča neprekinjena proizvodnja z nizko porabo energije, zaradi česar je lahko alternativa široko uporabljanemu zamrzovalnemu sušenju in sušenju z razprševanjem (16). Doslej je nizka stopnja proizvodnje laboratorijsko prilagojenih naprav omejevala industrijsko uporabo te tehnologije, a danes so na trgu že različne rešitve, razvite za razširjeno proizvodnjo vlaken s poudarkom na farmacevtskih izdelkih (12, 16).

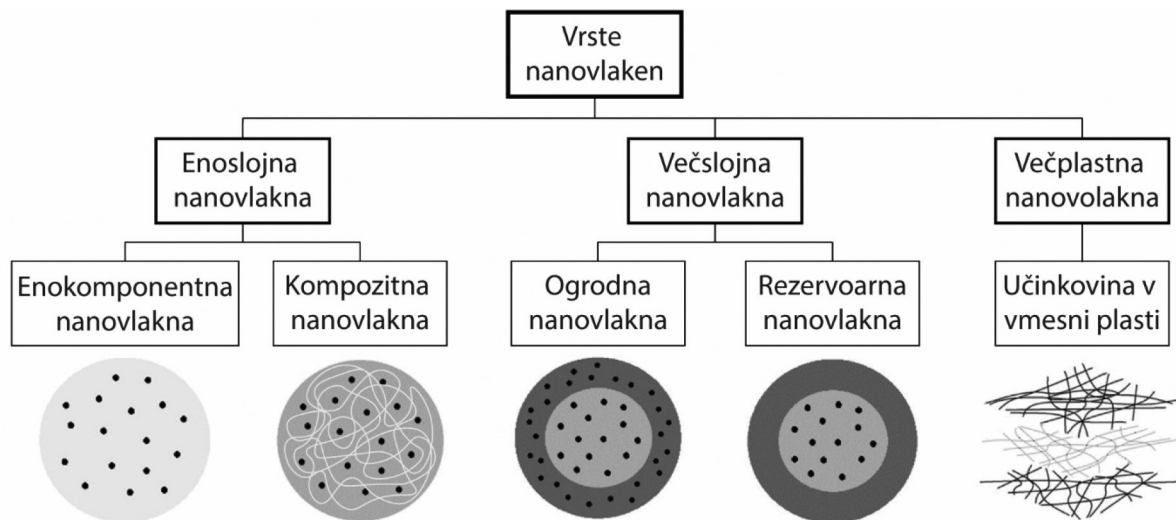
3 NANOVLAKNA KOT DOSTAVNI SISTEMI

3.1 VRSTE NANOVLAKEN

Glede na morfologijo in mesto vgradnje učinkovine ločimo tri glavne kategorije nanovlaken: enoslojna, večslojna ter večplastna nanovlakna (slika 3).

V **enoslojnih nanovlaknih** je učinkovina enakomerno razporejena po celotnem vlaknu, ki ga sestavlja en polimer (**enokomponentna vlakna**) ali mešanica več polimerov (**večkomponentna ali kompozitna nanovlakna**), ki zagotavljajo načrtovano sproščanje učinkovine, mehansko trdnost in elastičnost vlaken. Obnašanje enoslojnih nanovlaken v telesu je odvisno od topnosti polimera. Nanovlakna iz hidrofilnih polimerov se v bioloških tekočinah hitro raztopijo in omogočajo takojšnje sproščanje učinkovine. Pri nanovlaknih s podaljšanim sproščanjem pa je sproščanje učinkovine odvisno od erodiranja ali razgradnje uporabljenih polimerov v biološkem okolju oziroma difuzije učinkovine. Za izdelavo nanovlaken lahko uporabimo tudi mukoadhezivne polimere, ki omogočajo daljši stik s sluznico ali tkivom (4, 17).

Večslojna nanovlakna so zgrajena iz dveh ali več slojev (jedro in zunanji sloj/i) z učinkovino v enem ali več slojih (18). Izdelamo jih s pomočjo koaksialne šobe, ki ima več kanalov in omogoča nastanek več slojev hkrati. Pri takšnem načinu izdelave lahko za notranjo plast nanovlakna uporabimo tudi polimere, ki sami po sebi niso zmožni tvoriti nanovlaken, a s svojimi značilnostmi pomembno prispevajo k lastnostim izdelanih nanovlaken (npr. vpliv na stabilnost in profil sproščanja učinkovine). Glede na strukturo so večslojna nanovlakna lahko ogrodna ali rezervoarna. Pri **ogrodnih večslojnih** nanovlaknih nadzoruje sproščanje



Slika 3: Prečni prerez različnih vrst nanovlaken z vgrajeno učinkovino. Različni odtenki sive predstavljajo različne polimere oz. različne sloje/plasti, učinkovina pa je označena s črnimi pikami.

Figure 3: Cross section of different types of nanofibers with incorporated drugs. Different shades of grey represent different polymers or layers of nanofibers, and drug is represented by black dots.

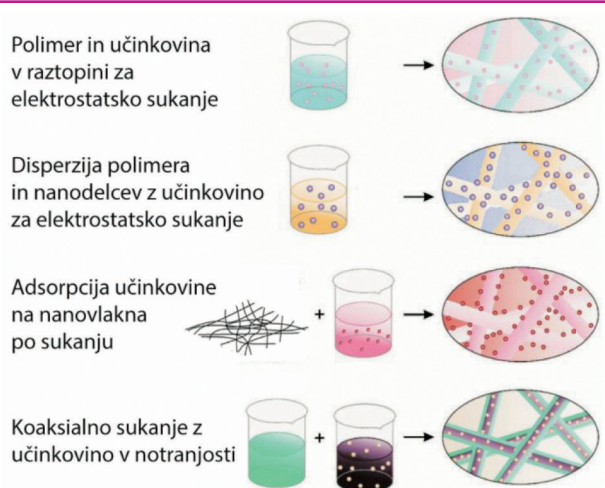
polimerno ogrodje, v katerem je učinkovina enakomerno porazdeljena. V odvisnosti od ogrodnega polimera lahko dosežemo takojšnje ali prirejeno sproščanje učinkovine. Z ustrezno kombinacijo polimerov lahko dosežemo dvojni profil sproščanja, pri čemer se učinkovina iz zunanega sloja sprosti takoj, iz notranjega pa počasneje (4, 19). Večslojna nanovlakna lahko oblikujemo tudi v obliki **rezervoarnih nanovlaken**, kjer zunanji sloj tvori prepustno pregrado, ki nadzoruje sproščanje učinkovine, vgrajene v notranjem sloju. Rezervoarni tip nanovlaken je primeren predvsem za podaljšano sproščanje učinkovin (4, 19, 20). **Večplastna nanovlakna** dobimo z zaporednim elektrostatskim sukanjem plasti raztopin polimera ali polimera z učinkovino na zbiralo. Pri tem nastane sistem, v katerem spodnja in zgornja plast nanovlaken predstavljata pregrado za sproščanje učinkovine, ki je vgrajena v sredinski plasti nanovlaken (t. i. »sendvič tip« nanovlaken). Za izdelavo tovrstnih sistemov so primerni predvsem nabrekajoči hidrofilni polimeri (21).

3.2 POLIMERI

Za izdelavo nanovlaken uporabljamo številne biokompatibilne naravne in sintezne polimere, ki se razlikujejo po vrsti, številu in ureditvi monomernih enot, ki določajo fizikalno-kemijske lastnosti (molekulska masa, polarnost, vodotopnost in prisotnosti različnih funkcionalnih skupin) (3). V preglednici 1 so zbrani najpomembnejši polimeri za oblikovanje različnih vrst nanovlaken.

3.3 VGRAJEVANJE UČINKOVIN

Učinkovino dodamo v raztopino polimera in jo tako neposredno vgradimo v nanovlakna med samim procesom elektrostatskega sukanja ali pa jo adsorbiramo na že oblikovana nanovlakna (slika 4) (8, 17). V obeh primerih je lahko učin-



Slika 4: Načini vgrajevanja učinkovine v nanovlakna. Barva raztopine pred sukanjem se ujema s slojem nanovlakna po sukanju. Barve predstavljajo različne polimere.

Figure 4: Different drug loading techniques in nanofibers. Colours of original dispersions correlate with nanofiber layers after electrospinning. Colours represent different polymers.

Preglednica 1: Pregled nanovlaken glede na kinetiko sproščanja in primeri polimerov za njihovo izdelavo.

Table 1: Summary of nanofibers with different release kinetics and polymers for their formulation.

Nanovlakna s takojšnjim sproščanjem	
Enokomponentna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Sintezni polimeri: polietilenglikol (PEG) (22), polivinilalkohol (PVA) (23), polimlečna kislina (PLA), polivinilpirolidon (PVP) (24), poliakrilati, Soluplus® (polivinil kaprolaktam-polivinil acetat-polietilenglikol razvejan kopolimer) (8, 23, 24) Naravni in polysintezni polimeri: hitosan, alginat, dekstran, kolagen, želatina, fibroin (protein svile) (25)
Večkomponentna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Soluplus® in PVA; poloksameri in PEG; alginat in PEG (15); hitosan in PEG (26); PVP in PVA (27)
Nanovlakna s podaljšanim sproščanjem	
Enoslojna ogrodna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Polikaprolakton (PCL) (28), hidroksipropilmetilceluloza, kopolimer mlečne in glikolne kisline (PLGA) (3) Polikaprolakton in želatina, polikaprolakton in hitosan, PVA in etilhidroksietilceluloza, natrijev alginat in gelan (8)
Večslojna ogrodna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Polikaprolakton (zunanji sloj) in PVA (jedro) (20), PMMA (zunanji sloj) in PVA (jedro) (18); PLGA (zunanji sloj) in PVP (jedro) (19)
Večslojna rezervoarna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Polimlečna kislina (PLA) in tiohitosan (zunanji sloj) in PEG (jedro) (8, 29) Glicerol monostearat (zunanji sloj) in etilceluloza (jedro) (30)
Večplastna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Želatina (zunanji plasti) in želatina z učinkovino (notranja plast) (21)
Nanovlakna z večfaznim sproščanjem	
Večslojna ogrodna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> PEG (zunanji sloj) in PLA (jedro) (31)
Nanovlakna z zakasnelim sproščanjem	
Temperaturno odzivna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Poli(N-izopropilakrilamid) in etilceluloza (32)
pH odzivna nanovlakna	<ul style="list-style-type: none"> Eudragit RS100, Eudragit S100 (derivata polimetilakrilne kisline) (33)

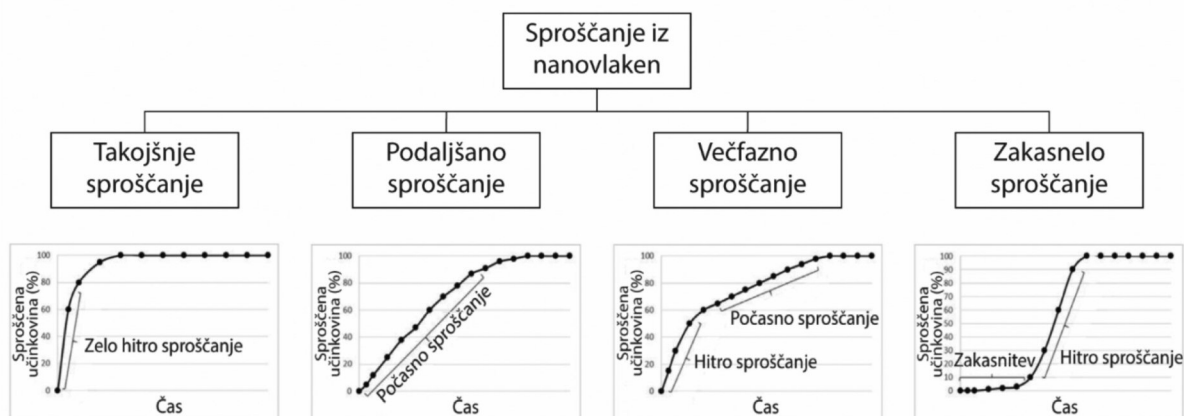
kovina v tekoči disperziji (raztopina, emulzija ali suspenzija) raztopljena, emulgirana ali suspendirana. Učinkovino (samo ali vgrajeno v nanodelce) lahko tudi adsorbiramo na nanovlakna (slika 4). Z adsorpcijo specifičnih ligandov (npr. protitelesa, folna kislina) lahko povečamo funkcionalnost nanovlaken. V nanovlakna lahko vgrajujemo male molekule učinkovin, peptide in proteine, nukleinske kisline in celice (11, 12, 34). Aktualno je vgrajevanje celic in bakterijskih spor v nanovlakna za namen obnove in podpore mikrobiote na mestu delovanja (34). Nanovlakna izdelujemo z namenom doseganja lokalnega ali systemskega delovanja vgrajene učinkovine (4).

3.4 PROFILI SPROŠČANJA UČINKOVIN IZ NANOVLAKEN

Poleg morfoloških lastnosti je zelo pomembna lastnost nanovlaken tudi sposobnost dostave učinkovine z izbrano

kinetiko sproščanja. Sproščanje učinkovin iz nanovlaken je lahko takojšnje ali prirejeno (slika 5), kar je odvisno od vrste polimera oz. njihovih zmesi ter od strukture nanovlaken (4). Primeri polimerov in struktur nanovlaken za doseganje določene kinetike sproščanja so navedeni v preglednici 1.

Iz nanovlaken s **takojšnjim sproščanjem** se učinkovina sprosti zelo hitro. Pri učinkovinah z dobro vodotopnostjo in hitro absorpcijo lahko s takšnimi nanovlakni hitro dosežemo terapevtski učinek (npr. v nekaj minutah). K hitremu sproščanju učinkovin pomembno prispeva tudi velika specifična površina nanovlaken. Ob ustrezni izbiri polimera lahko takojšnje sproščanje dosežemo z enoslojnimi ali večslojnimi nanovlakni z učinkovino le v zunanjem sloju (8, 28). Pri slabo vodotopnih učinkovinah je izziv večji; hitrost raztapljanja slednjih lahko med drugim izboljšamo s pravo stabilne amorfne oblike učinkovine v nanovlaknu (11). Za pripravo slednjih je pomembno, da za raztapljanje



Slika 5: Različni profili sproščanja učinkovine iz nanovlaknen: neprirejeno oz. takojšnje sproščanje in prirejeno (podaljšano, večfazno in zakasnelo) sproščanje.

Figure 5: Different profiles of drug release from nanofibers: immediate release and modified release (prolonged release, multiphase release and delayed release).

polimera in učinkovine izberemo topilo, ki zelo hitro in v celoti izhlapi. Sam proces elektrostatskega sukanja mora biti dovolj hiter, da preprečimo kristalizacijo učinkovine med oblikovanjem nanovlakna (8).

Farmacevtske oblike s **prirejenim sproščanjem**, ki vključujejo podaljšano, večfazno in zakasnelo sproščanje, se od oblik s takojšnjim sproščanjem razlikujejo v hitrosti in/ali mestu sproščanja učinkovine. V primerjavi s takojšnjim sproščanjem je za tovrstne sisteme značilno počasnejše sproščanje učinkovine ali z določenim časovnim zamikom, možno pa je tudi podaljšano sproščanje učinkovine skozi daljše časovno obdobje. Ti sistemi so primerni za nadzorovano dostavo učinkovine na izbrano mesto aplikacije (4, 8).

Za **podaljšano sproščanje** je značilna počasna kinetika sproščanja učinkovine skozi določen čas (več dni, tednov ali mesecev), bolj konstantna koncentracija učinkovine v krvi in s tem povezana manjša možnost neželenih učinkov (8). Primerna so predvsem enoslojna nanovlakna iz hidrofobnih polimerov, pa tudi rezervoarna ter večplastna nanovlakna (slika 3). Torej je poleg strukture nanovlaknen bistvena tudi izbira primerne polimera (preglednica 1). Sproščanje učinkovine iz takšnih nanovlaknen je nadzorovano z difuzijo učinkovine skozi polimerno ogrodje (PCL), erozijo (hitosan) ali razgradnjo polimernega ogrodja (PLGA) (4, 8, 35).

Za farmacevtske oblike z **večfaznim sproščanjem** je značilno sproščanje učinkovine z različnimi kinetikami sproščanja v različnih časovnih intervalih. To najlažje dosežemo z večslojnimi nanovlakni, pri katerih zunanji sloj

zagotovi takojšnje sproščanje, notranji pa zakasnelo ali podaljšano sproščanje. Tudi v tem primeru velja, da je poleg strukture nanovlaknen bistvena izbira primernih polimerov, ki omogočajo različne kinetike sproščanja (31).

Zakasnelo sproščanje lahko dosežemo z večslojnimi nanovlakni ali z nanovlakni iz polimerov, odzivnih na dražljaje (t. i. inteligentni polimeri). Slednji vsebujejo funkcionalne skupine, ki se odzivajo na določene dejavnike v okolju (npr. na majhne spremembe vrednosti temperature, pH, ionske moči ali elektromagnetnega polja) in na ta način spreminjajo lastnosti polimera. S tem uravnavajo sproščanje vgrajene učinkovine iz nanovlaknen. Takšni polimeri so zelo aktualni za načrtovanje dostavnih sistemov, namenjenih ciljani dostavi učinkovine in sproščanju na točno določenem mestu v prebavnem traktu ali drugje v telesu (4, 8, 32).

Temperaturno odzivna nanovlakna se spremenijo in sprostijo učinkovino ob spremembi temperature zaradi segrevanja pod vplivom telesne temperature ali pa zaradi umetnega povišanja s segrevanjem z infrardečo svetlobo (32). **pH odzivna nanovlakna** uporabljamo za dostavo učinkovine na določeno mesto v prebavnem traktu. Primer tovrstnega sistema so gastrozistentna nanovlakna, ki sprostijo učinkovino v dvanajstniku, ter nanovlakna, ki sprostijo učinkovino na začetku debelega črevesja (33). Velika prednost nanovlaknen, ki sicer predstavljajo relativno novo obliko dostavnih sistemov, je njihova vsestranska uporabnost. Z izbiro ustreznih polimerov, strukture nanovlaknen ter parametrov elektrostatskega sukanja lahko dosežemo praktično vse uveljavljene kinetike sproščanja učin-



kovine. Omogočajo tudi vgradnjo učinkovine v amorfni obliki in njeno stabilnost skozi daljše časovno obdobje. Končne farmacevtske oblike za nanovlakna so tablete, kapsule in orodisperzibilne farmacevtske oblike (nanovlakna pred polnjenjem ali stiskanjem zmeljejo) ter vsadki in zdravilni obliži (4, 8, 12).

4 TKIVNO INŽENIRSTVO

Tktivno inženirstvo je del regenerativne medicine, ki celicam zagotavlja umetno zunajcelično ogrodje (*scaffold*). Omogoča pritrjevanje, naseljevanje, diferenciacijo, rast in razmnoževanje celic. Tako pripravljen tkivni nadomestek prenesemo na poškodovano tkivo, kjer spodbuja njegovo obnovo. Tktivni nadomestek sestavljajo ogrodje iz polimernih nanovlaken, tkivno specifične celice in rastni dejavniki ali učinkovine (9). Za izdelavo takšnih nanovlaken pogosto uporabljamo naravno pridobljene polimere zaradi dobre tkivne biokompatibilnosti, podobnosti z zunajceličnim ogrodjem in možnostjo pristinih interakcij s celicami (6). Tudi sintezne polimere lahko zasnujemo tako, da posnemajo zunajcelično ogrodje in dostavijo ter sproščajo rastne dejavnike in sorodne spojine kot odziv na fiziološke signale. S tem posnemajo naravni proces celjenja, spodbujanja obnove tkiva in zmanjšujejo brazgotinjenje. Tktivni nadomestki služijo kot opora za razrast celic in obnovo tkiva. Nadomestki morajo posnemati specifične biokemijske, strukturne in mehanske lastnosti biološkega tkiva, a ne smejo povzročati negativnega imunskega odgovora (36, 37). Nanovlakna morajo zagotavljati podporo in spodbujati naseljevanje ter razmnoževanje celic toliko časa, dokler se tkivo ne obnovi. Poleg intrinzičnih lastnosti nanovlaken pa lahko obnovo tkiva izboljšamo z vgrajevanjem rastnih dejavnikov v nanovlakna, ki spodbujajo deljenje celic in njihovo naseljevanje na območje poškodbe (38). Z vidika odstranitve tkivnega nadomestka z mesta obnove tkiva je pri načrtovanju zelo pomembno, da se hitrost razgradnje nanovlaken ujema s hitrostjo obnove tkiva (39). Raziskave kažejo boljše rezultate tkivnih nadomestkov iz naravnih materialov (40). Na možnost infiltracije celic in njihovo razrast imata velik vpliv debelina nanovlaken in velikost por, zato je priprava tridimenzionalne zgradbe podpornega ogrodja zelo pomembna. S pripravo slednjega z elektrostatskim sukanjem lahko dosežemo primerne strukturne lastnosti in hkrati nadzorovano sproščanje vgrajene učin-

kovine. Nanovlakna kot tkivni nadomestki so v obliki različno velikih poroznih membran ali vsadkov in služijo kot podlaga za gojenje tkivnih celic in omogočajo njihov prenos z gojišča v kliniko in samo aplikacijo (41, 42).

4.1 KOŽA IN CELJENJE RAN

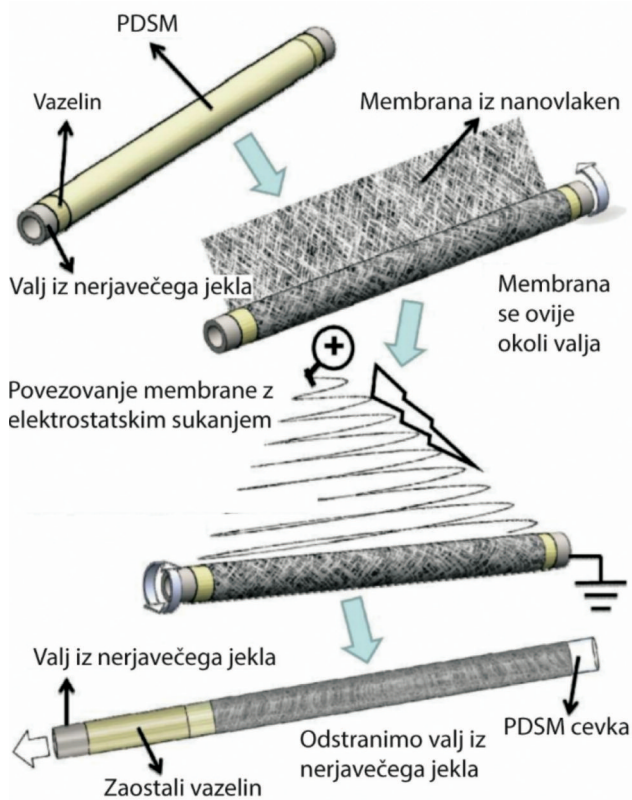
Tktivni nadomestki sodelujejo pri celjenju ran in nadomeščajo fiziološke funkcije kože. Omogočati morajo dostop kisika ter spodbujati keratinocite k naseljevanju in razmnoževanju ter strukturiranju posameznih kožnih plasti. Po drugi strani pa imajo tudi zaščitno vlogo, saj preprečujejo vdor mikroorganizmov v poškodovano tkivo. Glavne celice, ki sodelujejo pri obnovi kože, so keratinociti. Na membrano naselimo keratinocite, ki se pritrdijo in razmnožujejo na nanovlaknih. Če tkivni nadomestek s keratinociti dodamo na poškodovani del kože, ti pospešijo njeno obnovo s sproščanjem rastnih dejavnikov. Podporna membrana iz nanovlaken keratinocitom nudi tudi ustrezno zaščito pred zunanjim okoljem. Polimeri, ki jih uporabljamo za izdelavo kožnih tkivnih nadomestkov na osnovi nanovlaken, so poliuretani, kopolimer mlečne in glikolne kisline in derivati ter polikaprolakton (6, 9, 38, 43).

4.2 PODPORNNA MEMBRANA ŽILNE STENE

Žile so sestavljene iz več tkivnih plasti. Takšni morajo biti tudi žilni nadomestki na osnovi nanovlaken, saj želimo, da je obnovljena žila primerljiva ostalim. Poleg strukturne podobnosti z žilno steno mora žilni nadomestek vzdržati tudi pulziranje krvnega tlaka zaradi bitja srca. Shema izdelave podporne membrane žilne stene je prikazana na sliki 6. Podporna membrana iz nanovlaken za žilno steno je sestavljena iz več plasti, ki vključujejo različne kombinacije polimerov glede na funkcijo plasti: protein svile fibroin, želatino, kolagen, polikaprolakton, polimlečno kislino in poliuretane (9, 43).

4.3 DRUGE MOŽNOSTI UPORABE

Nanovlakna uporabljamo tudi za obnovo in delno nadomestitev funkcije v kostnem tkivu, hrustancu, ligamentih, tetivah in za gojenje perifernih nevronov. Za nadomestitev oporne funkcije kostnega tkiva morajo imeti tkivni nadomestki ustrezno mehansko trdnost, kar bolnikom omogoča



Slika 6: Prikaz izdelave podporne membrane za žilno steno; PDSM (polidimetilsiloksan).

Figure 6: Illustrative scheme of preparation method for supportive tubular scaffold membrane; PDSM (polydimethylsiloxane).

povrnitev fiziološke funkcije. Glavne celice za obnovo kostnega tkiva so osteoblasti in hondrociti, ki jih nasadimo na podporno ogrodje iz nanovlaken. Ogrodje mora omogočati infiltracijo hondrocitov in osteoblastov, ki po določenem času nadomestijo organski del kostnine in spodbujajo kalcifikacijo kosti (26, 41, 44). Za izdelavo kostnih vsadkov uporabljamo kombinacije biološko razgradljivih naravnih in sinteznih polimerov, najpogosteje polimlečno kislino, kopolimer mlečne in glikolne kisline, polikaprolakton in kolagen (9).

Nevronov trenutno še ne moremo nadomestiti z nanovlakni, lahko pa izdelamo podlago za njihovo rast in obnovo. Podlaga iz nanovlaken mora omogočati rast celic v isto smer, kot so nevroni usmerjeni v perifernem živcu. Za to uporabljamo vzporedno urejena nanovlakna iz polianilina in polikaprolaktona, izdelana z elektrostatskim sukanjem na zbiralo v obliki vrtečega valja. Za spodbujanje rasti vgradimo v nanovlakna nevrotrofične in rastne dejavnike glia celic, ki usmerjajo rast in pospešujejo delitev (9).

Za obnovo hrustanca potrebujemo prozen, mehansko stabilen vsadek, ki omogoča infiltracijo in pritrjevanje hondrocitov (45). Za obnovo ligamentov in tetiv so potrebne podobne lastnosti, vendar je treba zagotoviti tudi vzporedno usmerjenost nanovlaken, ki zagotavlja dobro natezno trdnost. Nanovlakna iz polikaprolaktona, kolagena tipa 2 in hitosana ustrezajo lastnostim za obnovo navedenih tkiv (9).

5 POGLED V PRIHODNOST

Kljub velikim prednostim, ki jih prinašajo nanovlakna, jih na evropskem in ameriškem trgu regulatorni organi še niso odobrili za uporabo v zdravilih. Prve materiale z nanovlakni je odobrila ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) za zobne zalivke (46). Zaradi nanovelikosti so regulatorni organi previdni pri odobritvi nanomaterialov, saj ima vsak material nanovelikosti specifične lastnosti, zato je treba izvesti več biokompatibilnostnih raziskav kot za delce iz enakega materiala večjih velikosti. Sestava in tehnološki postopek odločilno vplivata na fizikalno-kemijske lastnosti nanovlaken in sproščanje učinkovine v primeru dostavnega sistema, poleg tega v primeru tkivnih nadomestkov tudi na strukturne in mehanske lastnosti. Razvoj in izdelava kompozitnih nanovlaken, ki temeljijo na združevanju različnih polimerov, obetata zelo natančno prilagajanje lastnosti nanovlaken določenemu namenu uporabe in širita nabor dostavnih sistemov in tkivnih nadomestkov za zdravljenje raznih bolezni. Kljub velikemu znanstvenemu napredku na tem področju pa razvoj industrijske proizvodnje takšnih dostavnih sistemov le počasi napreduje. Potrebno je še več kliničnih raziskav in razvoj novih pristopov za izdelavo in vrednotenje dostavnih sistemov in vsadkov iz nanovlaken. V bližnji prihodnosti pričakujemo uspešnejši prenos izsledkov iz raziskovalnih in razvojnih laboratorijev v proizvodnjo in klinično uporabo.

6 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za finančno podporo programa P1-0189 in projekta J1-9194.



7 LITERATURA

1. Barhoum A, Bechelany M, Makhoulf ASH. *Handbook of Nanofibers*: Springer International Publishing; 2019. 1170 p.
2. Rošic R, Pelipenko J, Kristl J, Kocbek P, Bešter-Rogač M, Baumgartner S. Physical characteristics of poly (vinyl alcohol) solutions in relation to electrospun nanofiber formation. *Eur Polym J*. 2013;49(2):290-8.
3. Barhoum A, Pal K, Rahier H, Uludag H, Kim IS, Bechelany M. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. *Appl Mater Today*. 2019;17:1-35.
4. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm*. 2015;484(1-2):57-74.
5. Szentivanyi A, Chakradoo T, Zernetsch H, Glasmacher B. Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Adv Drug Del Rev*. 2011;63(4):209-20.
6. Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B, Rošic R, Baumgartner S, Kristl J. The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;84(2):401-11.
7. Wei Q, Tao D, Xu Y. *Functional Nanofibers and Their Applications - 1. Nanofibers: Principles and Manufacture*: Woodhead Publishing Limited; 2012. 1-21 p.
8. Kajdič S, Planinšek O, Gašperlin M, Kocbek P. Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;51:672-81.
9. Rodriguez IA, McCool JM, Bowlin GL. *Functional nanofibers for tissue engineering applications*: Woodhead Publishing Limited; 2012. 171-96 p.
10. Zupančič Š, Casula L, Rijavec T, Lapanje A, Luštrik M, Fadda AM, et al. Sustained release of antimicrobials from double-layer nanofiber mats for local treatment of periodontal disease, evaluated using a new micro flow-through apparatus. *Journal of Controlled Release*. 2019;316:223-35.
11. Yu DG, Li JJ, Williams GR, Zhao M. Electrospun amorphous solid dispersions of poorly water-soluble drugs: A review. *Journal of Controlled Release*. 2018;292:91-110.
12. Casian T, Borbás E, Ilyés K, Démuth B, Farkas A, Rapi Z, et al. Electrospun amorphous solid dispersions of meloxicam: Influence of polymer type and downstream processing to orodispersible dosage forms. *Int J Pharm*. 2019;569:118593.
13. Farkas B, Balogh A, Cselkó R, Molnár K, Farkas A, Borbás E, et al. Corona alternating current electrospinning: A combined approach for increasing the productivity of electrospinning. *Int J Pharm*. 2019;561:219-27.
14. Rošic R, Pelipenko J, Kristl J, Kocbek P, Baumgartner S. Properties, engineering and applications of polymeric nanofibers: Current research and future advances. *Chem Biochem Eng Q*. 2012;26(4):417-25.
15. Mirtič J, Balažič H, Zupančič Š, Kristl J. Effect of solution composition variables on electrospun alginate nanofibers: Response surface analysis. *Polymers*. 2019;11(4).
16. Vass P, Szabó E, Domokos A, Hirsch E, Galata D, Farkas B, et al. Scale-up of electrospinning technology: Applications in the pharmaceutical industry. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2020;12(4):e1611.
17. Wei Q, Wei A. *Functional nanofibers for drug delivery applications*: Woodhead Publishing Limited; 2012. 153-70 p.
18. Zupančič Š, Sinha-Ray S, Sinha-Ray S, Kristl J, Yarin AL. Controlled Release of Ciprofloxacin from Core-Shell Nanofibers with Monolithic or Blended Core. *Mol Pharm*. 2016;13(4):1393-404.
19. He P, Zhong Q, Ge Y, Guo Z, Tian J, Zhou Y, et al. Dual drug loaded coaxial electrospun PLGA/PVP fiber for guided tissue regeneration under control of infection. *Mater Sci Eng, C*. 2018;90:549-56.
20. Song W, Seta J, Chen L, Bergum C, Zhou Z, Kanneganti P, et al. Doxycycline-loaded coaxial nanofiber coating of titanium implants enhances osseointegration and inhibits *Staphylococcus aureus* infection. *Biomed Mater*. 2017;12(4):045008.
21. Laha A, Sharma CS, Majumdar S. Sustained drug release from multi-layered sequentially crosslinked electrospun gelatin nanofiber mesh. *Mater Sci Eng, C*. 2017;76:782-6.
22. Krstić M, Radojević M, Stojanović D, Radojević V, Uskoković P, Ibrić S. Formulation and characterization of nanofibers and films with carvedilol prepared by electrospinning and solution casting method. *Eur J Pharm Sci*. 2017;101:160-6.
23. Nam S, Lee J-J, Lee SY, Jeong JY, Kang W-S, Cho H-J. Angelica gigas Nakai extract-loaded fast-dissolving nanofiber based on poly(vinyl alcohol) and Soluplus for oral cancer therapy. *Int J Pharm*. 2017;526(1):225-34.
24. Poller B, Strachan C, Broadbent R, Walker GF. A minitablet formulation made from electrospun nanofibers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;114:213-20.
25. Lancina MG, 3rd, Shankar RK, Yang H. Chitosan nanofibers for transbuccal insulin delivery. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(5):1252-9.
26. Singh YP, Dasgupta S, Nayar S, Bhaskar R. Optimization of electrospinning process & parameters for producing defect-free chitosan/polyethylene oxide nanofibers for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2020;31(6):781-803.
27. Sebe I, Szabó B, Nagy ZK, Szabó D, Zsidai L, Kocsis B, et al. Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique. *Int J Pharm*. 2013;458(1):99-103.
28. Potrč T, Baumgartner S, Roškar 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;75:101-13.
29. Meng J, Agrahari V, Ezoulin MJ, Zhang C, Purohit SS, Molteni A, et al. Tenofovir Containing Thiolated Chitosan Core/Shell Nanofibers: In Vitro and in Vivo Evaluations. *Mol Pharm*. 2016;13(12):4129-40.
30. Hai T, Wan X, Yu D-G, Wang K, Yang Y, Liu Z-P. Electrospun lipid-coated medicated nanocomposites for an improved drug sustained-release profile. *Mater Des*. 2019;162:70-9.
31. Kuang G, Zhang Z, Liu S, Zhou D, Lu X, Jing X, et al. Biphasic drug release from electrospun polyblend nanofibers for optimized local cancer treatment. *Biomaterials Science*. 2018;6(2):324-31.
32. Elashnikov R, Slepčička P, Rimpelova S, Ulbrich P, Švorčík V, Lyutakov O. Temperature-responsive PLLA/PNIPAM nanofibers for switchable release. *Mater Sci Eng, C*. 2017;72:293-300.
33. Akhgari A, Heshmati Z, Afrasiyabi Garekani H, Sadeghi F, Sabbagh A, Sharif Makhmalzadeh B, et al. Indomethacin electrospun nanofibers for colonic drug delivery: In vitro dissolution studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;152:29-35.

34. Zupančič Š, Rijavec T, Lapanje A, Petelin M, Kristl J, Kocbek P. Nanofibers with Incorporated Autochthonous Bacteria as Potential Probiotics for Local Treatment of Periodontal Disease. *Biomacromolecules*. 2018;19(11):4299-306.
35. Zupančič Š, Baumgartner S, Lavrič Z, Petelin M, Kristl J. Local delivery of resveratrol using polycaprolactone nanofibers for treatment of periodontal disease. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2015;30:408-16.
36. Da Silva GR, Lima TH, Fernandes-Cunha GM, Oréface RL, Da Silva-Cunha A, Zhao M, et al. Ocular biocompatibility of dexamethasone acetate loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;142:20-30.
37. Balusamy B, Senthamizhan A, Uyar T. 6 - In vivo safety evaluations of electrospun nanofibers for biomedical applications. In: Uyar T, Kny E, editors. *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications*: Woodhead Publishing; 2017. p. 101-13.
38. Bertoncej 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;88(1):64-74.
39. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. *Eur J Pharm Sci*. 2015;66:29-35.
40. Huang S, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J Control Release*. 2010;142(2):149-59.
41. R Z, P.X M. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res*. 1999;44:446-55.
42. Janković B, Pelipenko J, Škarabot M, Mušević I, Kristl J. The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *Int J Pharm*. 2013;455(1-2):338-47.
43. Al-Enizi AM, Zagho MM, Elzatahry AA. Polymer-based electrospun nanofibers for biomedical applications. *Nanomaterials*. 2018;8(4):1-22.
44. De Witte TM, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA, Peppas NA. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regen Biomater*. 2018;5(4):197-211.
45. Fu L, Yang Z, Gao C, Li H, Yuan Z, Wang F, et al. Advances and prospects in biomimetic multilayered scaffolds for articular cartilage regeneration. *Regenerative Biomaterials*. 2020;7(6):527-42.
46. Gawel R. FDA Approves Nanofiber Flowable Composite 2015 [cited 2020 28.12.2020]. Available from: <https://www.dentistrytoday.com/news/industrynews/item/477-fda-approves-nanofiber-flowable-composite>.



NANOTERANOSTIKI IN NJIHOV POTENCIAL V PERSONALIZIRANI MEDICINI

NANOTHERANOSTICS AND THEIR POTENTIAL IN PERSONALISED MEDICINE

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Črt Dragar, mag. farm.
prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.
izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: petra.kocbek@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Farmacija je visokoinovativno področje, za katerega je značilen hiter napredek, o čemer priča podatek, da je ameriška Uprava za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration*, FDA) v zadnjih dveh desetletjih vsako leto odobrila 20 do 25 novih zdravil; to število pa se je v zadnjih letih povzpelo

POVZETEK

Z uspešnim razvojem številnih nanodostavnih sistemov za vnos zdravilnih učinkovin in diagnostikov v zadnjih šestdesetih letih se je uveljavilo tudi področje nanoteranostikov. Ti multifunkcionalni sistemi, ki vsebujejo terapevtsko in diagnostično komponento, omogočajo bolj učinkovito in posamezniku prilagojeno zdravljenje ter neinvazivno zgodnjo diagnostiko bolezni in/ali spremljanje zdravljenja. Zaradi številnih prednosti predstavljajo nanoteranostiki pomemben korak od pristopa »enega zdravila, ki ustreza vsem« k posamezniku prilagojenemu zdravljenju. Kljub bliskovitemu razvoju pa ostajajo določeni izzivi, s katerimi se bo treba soočiti, če želimo, da bodo nanoteranostiki uspešno prešli iz raziskav v klinično uporabo.

KLJUČNE BESEDE:

diagnostika, nanodostavni sistemi, personalizirana medicina, teranostika, zdravljenje

ABSTRACT

Successful development of numerous nanodelivery systems for drugs and diagnostics in the past 60 years has introduced also the field of nanotheranostic. These multifunctional systems, which combine therapeutic and diagnostic components, enable more efficient, individually adjusted therapy, and non-invasive and rapid early diagnostics or allow monitoring of the treatment progress. Due to the number of advantages nanotheranostics represent an important step from the concept of »one medicine fits all« towards patient-tailored therapy. Despite the rapid development of nanotheranostics, there are still some challenges to be addressed in the future, to enable their successful translation from research to clinical practice.

KEY WORDS:

diagnostics, nanosized drug delivery systems, personalized medicine, theranostics, therapy

na 40 do 50 (1). Le v letu 2019 je Evropska agencija za zdravila (*European Medicines Agency*, EMA) odobrila kar 66 novih zdravil, med katerimi jih je 30 vsebovalo nove učinkovine (2). O hitrem razvoju farmacije pričajo tudi številne nove farmacevtske oblike in novi dostavni sistemi, ki so bili razviti v zadnjih 70 letih. Nekaj pomembnih mejnikov

na področju farmacije med drugim predstavljajo regulatorna odobritev farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem (1952), inhalatorjev (1956), transdermalnih obližev (1979), rekombinantnih inzulinov (1982), mikrosfer (1984), liposomov (1995), nanodelcev (2005), tridimenzionalno natisnjenih zdravil (2015), genskega zdravljenja in digitalnih zdravil (2017) (3).

Razvoj farmacije se iz pristopa »enega zdravila, ki ustreza vsem« (»one medicine fits all«) preusmerja v t. i. personalizirano medicino, ki temelji na pristopu posamezniku prilagojenega zdravljenja na osnovi genetskih preiskav in odkrivanja bioloških označevalcev bolezni. Poleg tega tak pristop zagotavlja spremljanje in napovedovanje terapevtskih učinkov z uporabo različnih slikovnih tehnik (4). Ob množici inovativnih pristopov personalizirane medicine se poraja vprašanje, kaj sledi. Bi lahko pomemben korak k personalizirani medicini naredili nanoteranostiki?

2 NANOTEHNOLOGIJA IN RAZVOJ ZDRAVIL

Zametke nanotehnologije je na zemljevid znanosti leta 1959 v svojem znamenitem predavanju z naslovom »There's Plenty of Room at the Bottom« postavil Richard Feynman, ki je napovedal, da bomo v prihodnosti izdelovali izdelke visoke kompleksnosti – nanoizdelke (5). Danes, šest desetletij pozneje, je nanotehnologija eno izmed ključnih področij napredka, tako v znanosti nasploh kot v farmaciji.

Vse od raziskav in razvoja prvih nanodelcev za dostavo učinkovin, ki so jih razvili v skupini Petra Paula Speiserja v poznih šestdesetih letih prejšnjega stoletja, pa do danes je bilo razvitih mnogo nanozdravil (6). Pogosto prihaja do zmotnega enačenja celotne skupine nanozdravil z le eno tehnolo-



Slika 1: Prednosti nanodostavnih sistemov pred dostavnimi sistemi večjih velikosti.

Figure 1: Advantages of nano drug delivery systems compared to larger drug delivery systems.



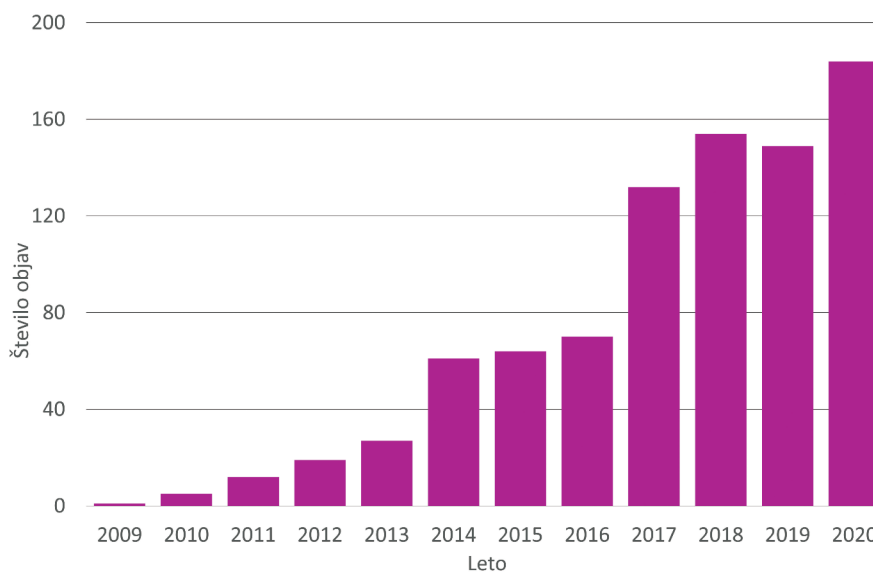
loško obliko, in sicer z nanodelci, ki so definirani kot delci s premerom v nanometriškem območju (7). Velja pa poudariti, da nanozdravila ne temeljijo vedno na nanodelcih, ampak so lahko njihova osnova tudi nanomateriali drugačnih oblik. Nanozdravila predstavljajo zdravila, ki izkoriščajo edinstvene fizikalne, kemijske in biološke lastnosti nanomaterialov in so izdelana s pomočjo nanotehnologije z namenom preprečevanja, diagnosticiranja ali zdravljenja bolezni (8). Ravno zaradi omenjenih edinstvenih lastnosti izkazujejo nanodostavni sistemi številne prednosti v primerjavi z dostavnimi sistemi večjih velikosti (slika 1) in imajo zato velik potencial za uporabo na različnih področjih v biomedicini (9–11).

V zadnjem desetletju so izsledki raziskav na področju farmacevtske nanotehnologije posegli na številna področja biomedicine, kot so dostava učinkovin v možgane, zdravljenje bolezni tretjega sveta (tuberkuloze, malarije, okužb z virusom HIV), regenerativna medicina, zdravljenje diabetesa, nevrodegenerativnih, avtoimunskih, vnetnih, srčno-žilnih in pljučnih bolezni. Največ raziskav je trenutno na področju uporabe nanodostavnih sistemov za zgodnje odkrivanje in zdravljenje rakavih bolezni. Poleg tega nanodostavni sistemi veljajo za obetavne tudi na drugih aktualnih področjih, kot so dostava bioloških makromolekul (nukleinskih kislin, peptidov in proteinov), boj proti bakterijski odpornosti na antibiotike in nenazadnje razvoj nanoteranostikov (12, 13).

Kljub hitremu razvoju farmacevtske nanotehnologije pa danes na trgu ni veliko nanozdravil. Glavni razlogi, ki ovirajo hitrejši preboj inovativnih nanozdravil na trg, so zapleteni tehnološki postopki, omejena učinkovitost *in vivo* ter pomankljivo poznavanje njihove varnosti (12). Poleg načrtovanja in razvoja novih nanodostavnih sistemov ter tehnologij njihove izdelave je prav proučevanje njihovih lastnosti, s poudarkom na varnosti in učinkovitosti, ključnega pomena za njihov prehod iz raziskav v klinično uporabo.

3 NANOTERANOSTIKI

Pogost izziv, s katerim se srečujejo zdravniki v vsakdanji klinični praksi, so razlike med posameznimi bolniki, kar posledično vodi do različnega porazdeljevanja zdravilnih učinkovin, različne učinkovitosti zdravljenja in različnih neželenih učinkov. Personalizirana medicina, ki se ukvarja s prilaganjem zdravljenja posameznemu bolniku in katere cilj je dostava ustrezne učinkovine ustreznemu bolniku ob ustreznem času (13), vključuje uporabo inovativnih dostavnih sistemov, med katerimi so tudi nanoteranostiki. Le-ti so zelo aktualni v raziskavah, kar kaže tudi število objav na temo nanoteranostikov v zadnjem desetletju (slika 2).



Slika 2: Število objav na temo nanoteranostikov v letih 2009–2020 (vir: podatkovna baza PubMed; iskalni niz: »nanotheranostics«; datum dostopa 22. 12. 2020).

Figure 2: The publication record on nanotheranostics in years 2009–2020. The search was performed on 22th of December 2020 with the following query »nanotheranostics« (database: PubMed archive).

Kot teranostični pristop se pogosto pojmuje že samo prilagajanje zdravljenja na podlagi rezultatov različnih diagnostičnih testov *in vitro* s področja genomike, epigenomike, transkriptomike, proteomike, metabolomike in proučevanja bioloških označevalcev. Nanoteranostika gre še korak dlje in poleg zdravljenja omogoča tudi diagnostiko *in vivo*, ki jo izvajamo pred, med ali po zdravljenju in na podlagi rezultatov tudi ustrezno prilagajamo potek zdravljenja bolnika (4, 14, 15). Nanoteranostik tako predstavlja multifunkcionalen nanodostavni sistem, v katerem sta združeni diagnostična in terapevtska komponenta (13), zato omogoča sočasno zdravljenje in spremljanje dostave učinkovine, sproščanja učinkovine ali učinkovitosti zdravljenja (4).

3.1 SESTAVA NANOTERANOSTIKOV

Osnovna gradnika vsakega nanoteranostika sta terapevtska in diagnostična komponenta, ki sta vgrajeni v ustrezen dostavni sistem ali obdani z ustrežno oblogo (slika 3) (12). Terapevtsko komponento v večini primerov predstavlja zdravilna učinkovina, ki je na dostavni sistem vezana (ne)kovalentno, fizikalno ujeta v ogrodje dostavnega sistema ali pa je kovalentno vezana neposredno na diagnostično komponento in skupaj z njo vključena v ogrodje dostavnega sistema. V organizmu se lahko učinkovina iz dostavnega sistema sprosti brez ali pod vplivom specifičnih dražljajev (npr. pH, temperatura, ionska moč, prisotnost encimov, radiofrekvenčno elektromagnetno valovanje, magnetno polje) in z vezavo na tarčno mesto sproži farmakološki učinek (12, 16). Najpogosteje so zdravilne učinkovine, ki so vgrajene v nanoteranostike, protitumorne učinkovine ali nukleinske kisline (npr. DNA, siRNA). Za doseganje terapevtskega učinka pa lahko izkoristimo tudi edinstvene lastnosti samega nanoteranostika brez vgrajene učinkovine (16). Primer takšnega sistema so nanoteranostiki, osnovani na superparamagnetnih nanodelcih železovega oksida (*su-*

perparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs), ki ob izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju povzročijo segrevanje okoliškega tkiva na temperaturo $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar imenujemo magnetna hipertermija. Ta učinek lahko izkoristimo za selektivno uničenje rakavih celic, saj so le-te na povišano temperaturo bolj občutljive kot zdrave celice (17). Nekateri dostavni sistemi lahko terapevtski učinek brez dostave učinkovine sprožijo tudi kot fotosenzibilizatorji v fotodinamičnem zdravljenju, npr. SPIONi, kvantne pike in nanodelci zlata (17, 18).

Diagnostična komponenta omogoča neinvazivno spremljanje mesta nahajanja dostavnega sistema v organizmu. Tako lahko spremljamo bodisi porazdeljevanje dostavnega sistema v organizmu, sproščanje učinkovine iz sistema v tarčnem tkivu (kovalentna vezava diagnostične komponente z učinkovino) ali učinkovitost zdravljenja (3, 11). V odvisnosti od izbrane metode vizualizacije se v nanoteranostikih kot diagnostične komponente uporabljajo različne snovi (preglednica 1) (12, 19).

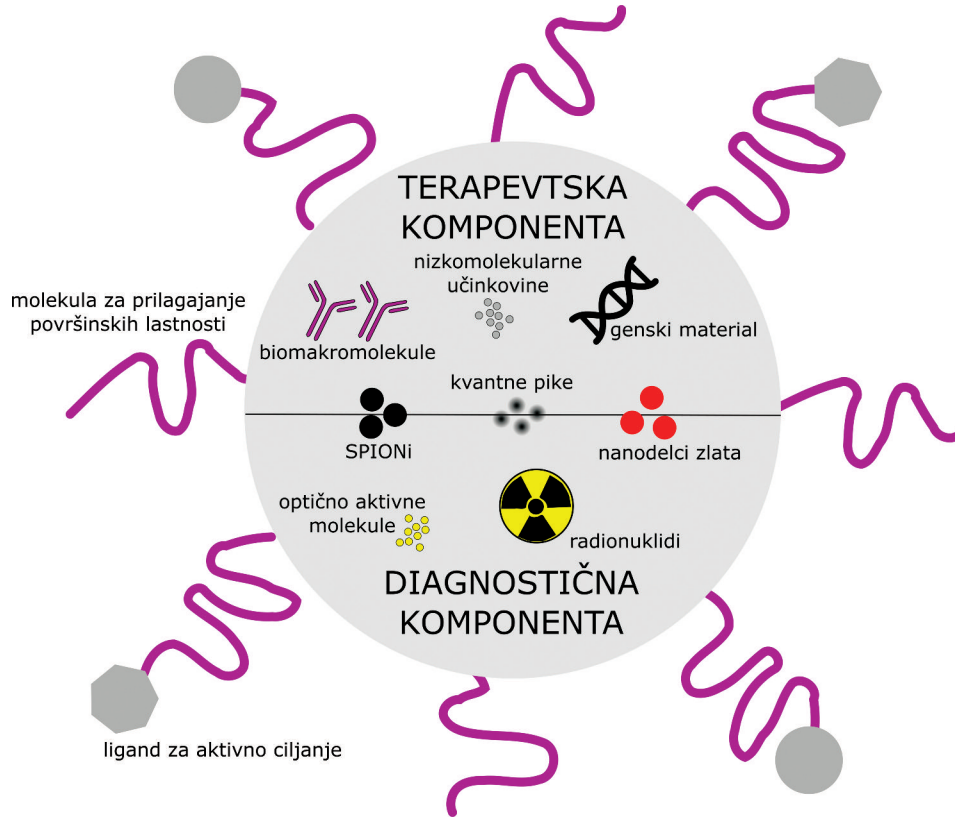
Ker ima vsaka metoda vizualizacije svoje prednosti in pomanjkljivosti, je pogosto smiselno, da v enem sistemu združimo več različnih diagnostičnih komponent in tako izboljšamo diagnostiko z uporabo komplementarnih metod vizualizacije. Tak primer so kombinacije nanodelcev železovega oksida s cianobarvilom (20), nanokapsulami zlata (21), kvantnimi pikami (22), fluoroforom (23) ali radionuklidom (24). Bistveno pri izboru diagnostične komponente je, da le-ta omogoča zgodnje odkrivanje bolezni, spremljanje farmakokinetike dostavljene zdravilne učinkovine ali spremljanje odziva na zdravljenje (15).

Tretja komponenta nanoteranostika je dostavni sistem, katerega glavna naloga je sočasna dostava terapevtske in diagnostične komponente do ustreznega tarčnega mesta, v ustrezni koncentraciji in ob ustreznem času. Dostavni sistem je pomemben tudi za zagotavljanje funkcionalnih skupin za vezavo ligandov za ciljno dostavo ali učinkovine.

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljane diagnostične komponente v nanoteranostikih. *PET – pozitronska emisijska tomografija, SPECT – enofotonska emisijska računalniška tomografija (12, 19).

Table 1: The most commonly used diagnostic components in nanotheranostics. *PET – positron emission tomography, SPECT – single-photon emission computed tomography (12, 19).

Diagnostična komponenta	Metoda vizualizacije
Optično aktivne majhne molekule	merjenje fluorescence ali bioluminescence
Kovinski oksidi	magnetno resonančno slikanje
Ultrazvočna kontrastna sredstva (npr. mikromehurčki)	sonografija
Radionuklidi	γ -scintigrafija (npr. PET, SPECT)
Zlato	računalniška tomografija
Jod	računalniška tomografija



Slika 3: Shematski prikaz nanoteranostika.

Figure 3: Schematic representation of nanotheranostic.

Poleg tega površinske lastnosti dostavnega sistema močno vplivajo na stabilnost koloidne disperzije nanoteranostika. Dostavni sistem je lahko z diagnostičnega in terapevtskega vidika inerten ali pa že sam predstavlja diagnostično in/ali terapevtsko komponento (npr. nanodelci zlata, SPIONI, kvantne pike) (19). Najpogosteje za izdelavo nanoteranostikov uporabljamo materiale, ki so že dobro raziskani in poznani za izdelavo nanodostavnih sistemov. Tako je pri izdelavi nanoteranostika potrebna le nadgradnja obstoječega nanodostavnega sistema z vgradnjo diagnostične komponente. Med drugim kot gradnike dostavnih sistemov uporabljamo kovinske okside, kovine, zlato, silicijev dioksid, ogljik, polimere, lipide, proteine in peptide (17, 19). Dodati velja še, da lahko učinkovino oz. terapevtsko komponento vgradimo tudi v oblogo, ki obdaja jedro z diagnostično komponento (npr. obloga silicijevega dioksida, ki obdaja skupke SPIONov) (25).

Pri razvoju nanoteranostika, torej združevanju diagnostične in terapevtske komponente v en sam (dostavni) sistem, moramo dobro poznati lastnosti posameznih komponent in njuno kompatibilnost. Zgodi se lahko, da se lastnosti

komponent zaradi vgradnje v nanoteranostik spremenijo ali celo »izgubijo« (npr. zdravilna učinkovina ni več farmakološko aktivna, zdravilna učinkovina prepreči učinek kontrastnega sredstva) ali pa ob združevanju komponent v en sistem ne dosežemo želenega sinergističnega učinka zdravljenja in zato razvoj takšnega sistema ni smiseln (19). Poleg tega lahko vključevanje kakršnih koli drugih komponent v osnovni dostavni sistem pomembno spremeni njegovo farmakokinetiko (16).

3.2 RAZDELITEV NANOTERANOSTIKOV

Nanoteranostiki se med seboj razlikujejo v številnih lastnostih, kot so oblika, velikost, sposobnost in način ciljanja tarčnega tkiva, vrsta vgrajene diagnostične komponente in posledično metoda vizualizacije v organizmu ter nena zadnje osnovni material, iz katerega je izdelan dostavni sistem (12). V literaturi najdemo različne delitve nanoteranostikov na osnovi njihove strukture (19), metode vizualizacije sistema (13, 19) in osnovnega materiala za izdelavo dostavnega sistema (17, 26, 27) (slika 4).



Slika 4: Različne razdelitve nanoteranostikov.

Figure 4: Different classifications of nanotheranostics.

3.3 PREDNOSTI NANOTERANOSTIKOV

Zaradi svoje velikosti izkazujejo nanoteranostiki, tako kot drugi nanomateriali, edinstvene fizikalne, kemijske in biološke lastnosti (slika 1). Glavni prednosti nanoteranostikov sta učinkovita diagnostika in zdravljenje bolezni, kar je tudi poglaviti cilj personalizirane medicine.

Nanoteranostiki so multifunkcionalni sistemi, ki omogočajo prilagajanje zdravljenja posamezniku (16). Z vključeno diagnostično komponento takšni sistemi omogočajo neinvazivno, hitro in učinkovito zgodnjo diagnostiko, poleg tega pa s kombinacijo več različnih tehnik vizualizacije omogočajo zaznavo in odkrivanje majhnih tumorskih lezij, ki so za konvencionalne metode vizualizacije nezaznavne (13, 27). Z vidika diagnostike in prilagajanja zdravljenja bolniku je izrednega pomena tudi dejstvo, da nanoteranostiki omogočajo spremljanje učinkovitosti zdravljenja hitreje in neodvisno od tradicionalnih izidov zdravljenja, ki se običajno pokažejo šele po določenem času. Tako lahko na primer z nanoteranostiki na osnovi SPIONov

preko magnetnoresonančnega slikanja spremljamo bodisi uspešnost dostave učinkovine do tarčnega tkiva takoj po aplikaciji (28) ali pa ugotavljamo uspešnost predhodnega zdravljenja sočasno z aplikacijo naslednjega odmerka, ki ga na podlagi rezultata diagnostike lahko ustrezno prilagodimo (13).

Zaradi velike kapacitete za vgrajevanje učinkovin, možnosti spreminjanja površine nanoteranostikov in pripenjanja ligandov (ne)posredno na njihovo površino, omogočajo nanoteranostiki sočasno dostavo več različnih učinkovin in diagnostičnih komponent ter vizualizacijo z več različnimi oz. komplementarnimi metodami (12).

Diagnostična komponenta omogoča spremljanje nahajanja ali porazdeljevanja nanoteranostika pri ciljni dostavi, bodisi s pasivnim ciljanjem (povečana prepustnost tumorskega tkiva za nanodostavne sisteme in povečano zadrževanje v njem; magnetno ciljanje pod vplivom zunanega magnetnega polja) ali aktivnim ciljanjem (prepoznavanje tarčnih mest na površini celic in vezava nanje preko specifičnih ligandov na površini nanoteranostika) (13, 16).

Pomembna prednost pri izdelavi nanoteranostikov je ta, da lahko določene vrste nanodelcev, ki jih danes že intenzivno raziskujejo, uporabimo tudi kot kontrastna sredstva (npr. SPIONE, kvantne pike, nanodelce zlata) ali pa se že sami po sebi (tj. brez da bi vanje vgradili ali nanje vezali učinkovino) uporabljajo v terapevtske namene (npr. SPIONI za magnetno hipertermijo, kvantne pike v fotodinamičnem zdravljenju) (17, 18, 26). Z uporabo takšnih nanodelcev izdelamo nanoteranostike brez dodatnega vgrajevanja diagnostične in/ali terapevtske komponente.

3.4 PRIMERI NANOTERANOSTIKOV V RAZISKAVAH

Materiali, iz katerih so nanoteranostiki, bistveno vplivajo na njihove lastnosti in posledično na njihov potencial za uporabo na različnih terapevtskih področjih. Najbolj razširjene so raziskave nanoteranostikov na osnovi SPIONov, ki jih je FDA odobrila kot kontrastno sredstvo za magnetno resonančno slikanje (17, 29). Nanodelci železovega oksida izkazujejo superparamagnetne lastnosti (tj. magnetna odzivnost v prisotnosti zunanega magnetnega polja in magnetna neodzivnost v odsotnosti zunanega magnetnega polja), če je njihova velikost manjša od 20 nm, in tako omogočajo magnetno vodenje dostavnega sistema do tarčnega tkiva ter ciljano dostavo različnih učinkovin, genov in fluoroforov (17, 27). Vse navedene vrste aktivnih komponent lahko vgradimo v oblogo nanoteranostika na osnovi SPIONov (npr. oblogo iz silicijevega dioksida) (25). V terapevtske namene lahko takšne nanoteranostike uporabimo tudi za doseganje magnetne hipertermije (17). SPIONom lahko načrtovano spreminjamo površino in tako izboljšamo njihove fizikalno-kemijske in biološke lastnosti ali pa jih združimo z drugimi nanodostavnimi sistemi, kar razširi njihovo teranostično uporabnost. Vgradimo jih lahko na primer v peptidne nanodelce z radioaktivnimi izotopi (31) ali jih združimo s kvantnimi pikami v nanodostavni sistem (26). Kvantne pike so manj pogoste v raziskavah kot SPIONI, saj njihov toksikološki profil ni dovolj jasen in je relativno problematičen (17).

Kvantne pike so nanokristali polprevodnih materialov (npr. CdTe/CdSe, InAs/ZnSe, InAs/InP/ZnSe, Cd₃P₂), katerih optične lastnosti lahko natančno prilagajamo s spreminjanjem velikosti in sestave delcev (32). Kvantne pike predstavljajo diagnostično komponento, saj ob osvetlitvi s svetlobo določene valovne dolžine fluorescirajo (33). Lahko jih obdamo z ustrezno oblogo, v katero vgradimo učinkovine, gene ali oboje hkrati oz. jih vgradimo v druge nanodostavne sisteme (34). Tak primer je sočasna vgradnja fluorescenčne

učinkovine doksorubicina, RNA in kvantnih pik v liposome. Takšen nanoteranostični sistem omogoča spremljanje nje-gove lokacije *in vivo* (na osnovi fluorescence kvantnih pik) in sočasno spremljanje sproščanja učinkovine (na osnovi fluorescence doksorubicina) (35). Za izboljšanje diagnostičnih lastnosti sistema lahko vanj poleg kvantnih pik vgradimo še SPIONE. Kvantne pike lahko predstavljajo tudi samostojno terapevtsko komponento kot fotosenzibilizatorji v fotodinamičnem zdravljenju (18).

V raziskavah pogosto proučujejo tudi nanoteranostike na osnovi nanodelcev zlata. Nanodelci zlata predstavljajo kontrastno sredstvo za računalniško tomografijo, površinsko plazmonsko resonanco in fotoakustično slikanje (17). Za dostavo terapevtskih komponent izkoriščamo površino nanodelcev zlata, ki je običajno spremenjena tako, da ima vezane tiolne skupine, kar omogoča vezavo različnih zdravilnih učinkovin (tudi genov), ki se nato v celicah izmenjajo z glutationom in tako sprostijo s površine nanodelcev (17, 26). Takšni nanodelci so stabilni, varni, iz telesa jih odstranijo makrofagi ali se izločijo z urinom in omogočajo nadaljnje spremembe površinskih lastnosti nanodostavnega sistema; njihova slabost pa je predvsem relativno visoka cena (17). Kot terapevtska komponenta nanodelci zlata izkazujejo velik potencial predvsem kot fotosenzibilizatorji v fotodinamičnem zdravljenju in za doseganje hipertermije ob izpostavitvi bližnji infrardeči svetlobi (17, 33).

Tudi nanodelci silicijevega dioksida se v raziskavah proučujejo kot osnova nanoteranostikov. Ti nanodelci izkazujejo veliko kapaciteto za vgradnjo ali vezavo širokega spektra učinkovin in diagnostikov (17), vanje pa lahko vgradimo tudi druge nanomaterialne, npr. SPIONE (25), nanodelce zlata (36) ali kvantne pike (37). Nanodelci silicijevega dioksida (žargonsko tudi nanodelci silike) se po vnosu v organizem izločijo iz telesa v relativno kratkem času preko ledvic in niso reaktivni niti toksični (17). Podobno kot nanodelci silicijevega dioksida se uporabljajo tudi polimerni nanodelci in polimerni miceli, ki služijo kot dostavni sistemi za različne učinkovine in kontrastna sredstva, npr. SPIONE (38), kvantne pike (26), gadolinij (26), nanodelce zlata (39). Med drugimi nanomateriali, ki jih še proučujejo za pripravo nanoteranostikov, velja omeniti še ogljikove nanocevice, ki omogočajo vgradnjo in dostavo učinkovin ter jih *in vivo* lahko zaznamo s fotoakustičnim slikanjem in Ramansko spektroskopijo (17). Kljub navedenemu potencialu za uporabo v teranostiki pa je varnost uporabe ogljikovih nanocevkv vprašljiva, saj imajo z obliko pogojeno toksičnost in se v organizmu razgrajujejo izredno počasi, njihovi zaostanki pa lahko vodijo tudi do dolgoročnih poškodb celic (27, 40).

4 SKLEP

V času, ko se obravnava bolnikov vse bolj preusmerja na področje personalizirane medicine, potekajo številne raziskave na področju nanoteranostikov. Kljub številnim prednostim, ki jih obeta uporaba nanoteranostikov pred tradicionalnimi pristopi zdravljenja in diagnostike, ti sistemi danes (še) niso na ustrezni stopnji razvoja za prehod v klinično uporabo. Glavni izziv raziskav ostaja dokazovanje njihove varnosti in biokompatibilnosti, ki sta ključna vidika za klinično uporabo nanoteranostikov. Poleg omenjenih raziskav bo v prihodnje izrednega pomena tudi razvoj nanoteranostikov v smeri, da bodo omogočali enostavno in hitro prilagajanje potrebam bolnika. Uporaba nanoteranostikov ne bo postavila obstoječih medicinskih praks na glavo in pahnila konvencionalnih načinov zdravljenja ter diagnostike v pozabo, vsekakor pa lahko pomeni pomemben korak v smeri personalizirane medicine in tako pripomore k večji učinkovitosti, kakovosti in varnosti zdravljenja.

5 LITERATURA

1. Jarvis LM. *The new drugs of 2018*. *Chem Eng News* 2019; 3 (97): 32–35.
2. Victoria Rees. *Summarising 2019: a year of firsts for the EMA*. <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/110598/summarising-2019-a-year-of-firsts-for-the-ema/>. Dostop: 9-4-2021.
3. Zhong H, Chan G, Hu Y, Hu H, Ouyang D. *A Comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products*. *Pharmaceutics*. 2018; 10 (4): 263-281.
4. Lammers T, Aime S, Hennink WE, Storm G, Kiessling F. *Theranostic nanomedicine*. *Acc Chem Res*. 2011; 44 (10): 1029–1038.
5. Feynman RP. *There's plenty of room at the bottom*. *Annu Meet Am Phys Soc*. 1959. 29; 1–13.
6. Kreuter J. *Nanoparticles - a historical perspective*. *Int J Pharm*. 2007; 331 (1): 1–10.
7. *The European Commission: Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU)*. *Official Journal of the European Union* 2011; 275: 38-40.
8. *European Medicine Agency (CHMP): Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use (EMA/CHMP/79769/2006)*.
9. Prijic S, Sersa G. *Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology*. *Radiol Oncol*. 2011; 45 (1): 1–16.
10. Kristl J. *Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil*. *Farm Vestn*. 2012; 63:67–72.
11. Markides H, Rotherham M, El Haj AJ. *Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine*. *J Nanomater*. 2012; 1–11.
12. Kocbek P. *Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije*. *Farm Vestn*. 2012; 63: 75–81.
13. Mura S, Couvreur P. *Nanotheranostics for personalized medicine*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 64 (13): 1394–1416.
14. Pene F, Courtine E, Cariou A, Mira J-P. *Toward theragnostics*. *Crit Care Med*. 2009; 37 (Supplement): S50–58.
15. Chen X, Wong STC. *Chapter 1 - Cancer theragnostics: An introduction*. In: Chen X, Wong S. *Cancer Theragnostics*. Oxford: Academic Press; 2014: 3–8.
16. Fang C, Zhang M. *Nanoparticle-based theragnostics: Integrating diagnostic and therapeutic potentials in nanomedicine*. *J Controlled Release*. 2010; 146 (1): 2–5.
17. Xie J, Lee S, Chen X. *Nanoparticle-based theranostic agents*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62 (11): 1064–1079.
18. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Ishikawa M, Baba Y. *Quantum dots as photosensitizers? Nat Biotechnol*. 2004; 22 (11): 1360–1361.
19. Janib SM, Moses AS, MacKay JA. *Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62 (11): 1052–1063.
20. Santra S, Kaitanis C, Grimm J, Perez JM. *Drug/dye-loaded, multifunctional iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and dual optical/magnetic resonance imaging*. *Small*. 2009; 5 (16): 1862–1868.
21. Bardhan R, Chen W, Perez-Torres C, Bartels M, Huschka RM, Zhao LL, et al. *Nanoshells with targeted simultaneous enhancement of magnetic and optical imaging and photothermal therapeutic response*. *Adv Funct Mater*. 2009; 19 (24): 3901–3909.
22. Park J-H, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. *Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008; 47 (38): 7284–7288.
23. Veisheh O, Sun C, Fang C, Bhattarai N, Gunn J, Kievit F, et al. *Specific targeting of brain tumors with an optical/magnetic resonance imaging nanoprobe across the blood-brain barrier*. *Cancer Res*. 2009; 69 (15): 6200–6207.
24. Choi J, Park JC, Nah H, Woo S, Oh J, Kim KM, et al. *A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008; 47 (33): 6259–6262.
25. Kralj S, Drogenik M, Makovec D. *Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups*. *J Nanoparticle Res*. 2010; 13: 2829–2841.
26. Ho JA, Wang L-S, Chuang M-C. *Nanotheranostics - a review of recent publications*. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 4679–4695.
27. Sonali, Viswanadh MK, Singh RP, Agrawal P, Mehata AK, Pawde DM, et al. *Nanotheranostics: Emerging strategies for early diagnosis and therapy of brain cancer*. *Nanotheranostics*. 2018; 2 (1): 70–86.
28. Abd Elrahman AA, Mansour FR. *Targeted magnetic iron oxide nanoparticles: Preparation, functionalization and biomedical application*. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019; 52: 702–712.
29. Drude N, Tienken L, Mottaghy FM. *Theranostic and nanotheranostic probes in nuclear medicine*. *Methods*. 2017; 130: 14–22.
30. Medarova Z, Pham W, Farrar C, Petkova V, Moore A. *In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors*. *Nat Med*. 2007; 13 (3): 372–377.



31. Lee H-Y, Li Z, Chen K, Hsu AR, Xu C, Xie J, et al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2008; 49 (8): 1371–1379.
32. Ranjbar-Navazi Z, Omid Y, Eskandani M, Davaran S. Cadmium-free quantum dot-based theranostics. *TrAC Trends Anal Chem*. 2019; 118: 386–400.
33. Misra R, Kandoi S, Varadaraj S, Vijayalakshmi S, Nanda A, Verma RS. Nanotheranostics: A tactic for cancer stem cells prognosis and management. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020; 55: 101457.
34. Chen AA, Derfus AM, Khetani SR, Bhatia SN. Quantum dots to monitor RNAi delivery and improve gene silencing. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33 (22): e190.
35. Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, Jon S, Kantoff PW, Langer R, et al. Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Lett*. 2007; 7 (10): 3065–3070.
36. Vivero-Escoto JL, Slowing II, Wu C-W, Lin VS-Y. Photoinduced intracellular controlled release drug delivery in human cells by gold-capped mesoporous silica nanosphere. *J Am Chem Soc*. 2009; 131 (10): 3462–3463.
37. Koole R, van Schooneveld MM, Hilhorst J, Castermans K, Cormode DP, Strijkers GJ, et al. Paramagnetic lipid-coated silica nanoparticles with a fluorescent quantum dot core: a new contrast agent platform for multimodality imaging. *Bioconjug Chem*. 2008; 19 (12): 2471–2479.
38. Guthi JS, Yang S-G, Huang G, Li S, Khemtong C, Kessinger CW, et al. MRI-visible micellar nanomedicine for targeted drug delivery to lung cancer cells. *Mol Pharm*. 2010; 7 (1): 32–40.
39. Umeda Y, Kojima C, Harada A, Horinaka H, Kono K. PEG-Attached PAMAM Dendrimers encapsulating gold nanoparticles: growing gold nanoparticles in the dendrimers for improvement of their photothermal properties. *Bioconjug Chem*. 2010; 21 (8): 1559–1564.
40. Jain N, Tiwari S. Biomedical application of carbon nanotubes (CNTs) in vulnerable parts of the body and its toxicity study: A state-of-the-art-review. *Materials Today: Proceedings*. 2021; članek v tisku – dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785321009925>.

FILTRIRANJE ZRAKA IN RAZVOJ OBRAZNIH MASK IZ NANOVLAKEN ZA ZAŠČITO PRED VIRUSI

AIR FILTRATION AND THE DEVELOPMENT OF NANOFIBER FACE MASKS FOR PROTECTION AGAINST VIRUSES

AVTORJI / AUTHORS:

Maruša Gostiša¹, mag. farm.

Jurij Gostiša², mag. str.

doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž³, mag. farm.

prof. dr. Julijana Kristl⁹, mag. farm.

¹ Lekarna Ljubljana, Komenskega 11, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo,
Katedra za energetsko strojništvo,
Aškerčeva 6, 1000 Ljubljana

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: julijana.kristl@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Onesnaženje zraka z delci in pandemija covid-19 sta povzročila svetovno potrebo po učinkovitih ukrepih za zaščito zdravja ljudi. Membranska filtracija velja danes za najučinkovitejšo in najzanesljivejšo fizikalno metodo za zaščito pred vsemi vrstami delcev iz zraka, čeprav so obrazne maske s filtri z visokim kakovostnim koeficientom in protinfektivnimi lastnostmi še vedno izziv za proizvajalce mask in potrošnike. Prispevek nudi bralcem osnovni opis za širše razumevanje zaščite dihal, ki zajema vrste delcev v zraku, filtracijske mehanizme in testiranje učinkovitosti filtrov ter vrste obraznih mask in njihovo stopnjo zaščite. Nato se ozremo v bližnjo prihodnost, kjer je največ zanimanja za razvoj novih filtrov in obraznih mask za odstranjevanje virusov, kar je možno doseči predvsem z nanotehnološkimi pristopi.

KLJUČNE BESEDE:

delci v zraku, nanotehnologija, obrazna maska, učinkovitost filtriranja delcev, virus

ABSTRACT

Air-particle pollution and the covid-19 pandemic have resulted in a huge global need for specific and effective measures to protect human health. Membrane filtration is now considered the most efficient and reliable physical method against air pollutants, although face masks with filters with high quality factors and antiinfective properties are still a challenge for mask manufacturers and consumers. Here we provide a basic description for a broader understanding of respiratory protection, covering types of particles in the air, filtration mechanisms and testing of the filter effectiveness, along with the types of face masks and offered protection performance. We then look into the near future, where the greatest interest is for the development of new filters and face masks to remove viruses, which can be achieved above all through nanotechnological approaches.

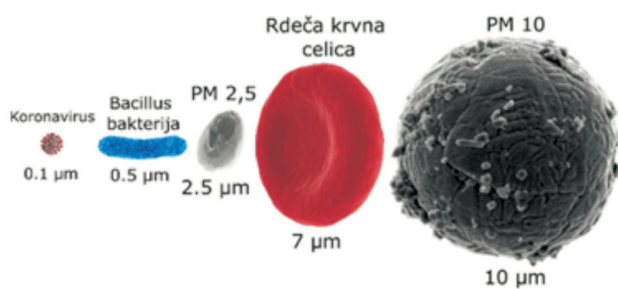
KEY WORDS:

face mask, nanotechnology, particle filtration efficiency, particulate matter, virus



1 UVOD

Naraščanje svetovne populacije in razvoj družbe neizogibno povečujeta obseg industrije in migracij, kar vodi v večjo onesnaženost zraka s plini in delci, ki predstavljajo veliko nevarnost za zdravje (1). Delci v zraku fizikalno predstavljajo aerosol, ki je opredeljen kot disperzni sistem inertnih in bioloških trdnih in tekočih delcev različnih velikosti. Po najnovejšem poročilu Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) živi danes 91 % svetovnega prebivalstva v krajih, kjer kakovost zraka ne dosega njenih smernic (2). Raziskava o kakovosti zraka v Pekingu januarja 2013 je pokazala, da predstavljajo mikroorganizmi med vdihanimi delci v velikosti od 2,5 do 10 μm več kot 80-odstotni delež (3). Med njimi so najpogostejše bakterijske in glivne vrste, ki so odgovorne za različne alergije ter širjenje dihalnih in drugih bolezni. Število znanstvenih objav in védenje o atmosferskih delcih (*particulate matter*, PM) se je strmo povečevalo v zadnjih dveh desetletjih, skokovito pa ob izbruhu bolezni covid-19 leta 2020, ki jo povzroča virus SARS-CoV-2 (4). Vedno več je dostopnih podatkov o kakovosti zraka, številne znanstvene raziskave pa potrjujejo vpliv aerosolov na zdravje ljudi (4). Medtem ko so fizikalno-kemijske lastnosti anorganskih onesnaževal že relativno dobro raziskali, pa vemo o mikroorganizmih v zraku bistveno manj, še najmanj pa o virusih. Raziskovalci ugotavljajo, da vsi zelo majhni delci človeku niso nevarni, če le ne pridejo v organizem v prevelikem številu. Topni in razgradljivi delci se po vdihu počasi izločijo, medtem ko je pri težko topnih (npr. kovinski oksidi, azbest) in bioloških delcih situacija precej bolj zapletena. Virusi so mnogo manjši kot številni drugi delci v zraku, zato zahteva njihovo odstranjevanje poseben pristop (slika 1).



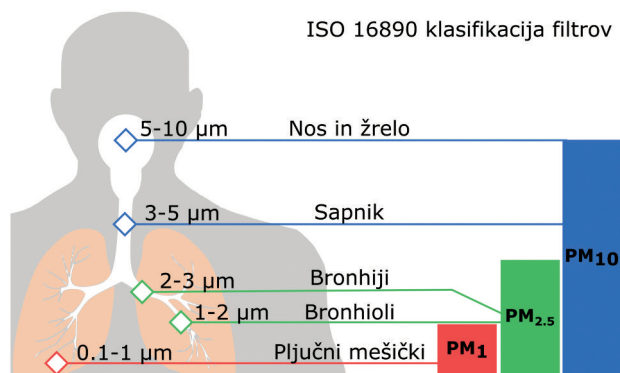
Slika 1: Relativna primerjava velikosti virusa z drugimi vrstami delcev v zraku; PM - atmosferski delci (prirejeno po 4).

Figure 1: Relative comparison size of a virus with other particle types in air; PM - particulate matter (adapted from 4).

Znanih je nekaj več kot 5.000 virusnih vrst, ki lahko okužijo vse vrste organizmov, od arhej in bakterij do gliv, rastlin in živali in ljudi. Virus SARS-CoV-2 je okrogle oblike s premerom 60 do 140 nm in negativnim nabojem na površini. Notranjost virusne kroglice izpolnjuje predvsem RNA, ki je virusni genom, obdan z zaščitno lipidno-beljakovinsko ovojnico, iz katere štrlijo »izrastki« proteina S, ki predstavljajo vezavno regijo, preko katere se virus veže na določene receptorje v membrani gostiteljskih celic. Virusi se razmnožujejo le v živih celicah, ker sami nimajo mehanizmov za lastno reprodukcijo. Mnogo virusov povzročata nalezljive bolezni, saj s svojim delovanjem negativno vplivajo na gostiteljske celice (5, 6).

Virusi se prenašajo preko dotikalnih površin in z vnosom v dihala preko rok ter s kapljičnim prenosom, pri čemer delež respiratornih kapljic, ki nastajajo med govorjenjem, kihanjem in kašljanjem, vsebuje viruse (6). Respiratorne kapljice s premeri nad 20 μm se odstranijo iz zraka zaradi gravitacije tako, da padejo na tla ali se prilepijo na površine in ne potujejo dlje kot 1 do 2 m, manjše kapljice pa lahko ostanejo v zraku mnogo daljši čas, tudi do več ur. V procesu trkov z drugimi delci in molekulami zraka privzamejo njegovo termično energijo, ki jim omogoči naključno gibanje v različnih smereh. Na tak način večajo območje, po katerem se gibljejo. K širitvi okuženega zraka prispevajo tudi zračni tokovi v prostoru in termika, pri kateri se toplejši zrak dviga. Ko tak zrak z okuženimi kapljicami vdihnemo, aerosoli potujejo vzdolž dihalne poti. Kje se ustavijo, je odvisno predvsem od njihove velikosti in gostote. Delci, večji od 10 μm , se običajno odložijo že na začetku dihalne poti, delci, manjši od 1 μm , pa prispejo do pljučnih mešičkov (slika 2) (7). Z zmanjševanjem velikosti kapljic zaradi izhlapevanja vode, odvisno od relativne vlage in temperature, se podaljšuje trajanje njihovega lebdenja v zraku (8). Kako se torej zaščititi pred tem? Dokazano je, da je uporaba fizičnih ovir, kot so zaščitne maske za dihala, učinkovit pristop za zmanjšanje širjenja bakterijskih in tudi virusnih infekcij z izdihanimi kapljicami, predvsem kadar jih posamezniki uporabljajo v zaprtih prostorih in je razdalja med njimi majhna (9). Kot odziv na izbruh virusa SARS-CoV-2 se je uporaba obraznih mask močno povečala (8). Danes je na voljo malo podatkov o zmogljivosti tkanin in drugih membran, ki jih uporabljajo za izdelavo obraznih zaščitnih mask, zlasti o njihovi učinkovitosti filtriranja delcev z velikostjo od nekaj 10 nm do 1 μm (2, 9, 10).

Pogosto so maske sestavljene iz več različnih slojev netkanih materialov, pri čemer ima vsak sloj določeno lastnost in funkcijo. Skozi medicinsko obrazno masko zrak vstopa in izstopa. Zunanji sloj (običajno moder ali črn) je nepre-



Slika 2: Nalaganje delcev iz zraka vzdolž dihalne poti glede na velikost; PMx – velikost delcev (prirejeno po 7).

Figure 2: Deposition of air particles along the airway according to size; PMx – particule size (adapted after 7).

močljiv in odbija tekočino. Srednji sloj preprečuje delcem ali patogenom nad določeno velikostjo prodiranje v katero koli smer. Sloj najbližje koži ujame vdihane delce z zunanje strani, z notranje pa izdihane kapljice. Več slojev skupaj učinkovito ščiti tako uporabnika kot okolico s filtriranjem delcev in patogenov. Ideja in namen medicinskih mask za obraz je filtriranje zraka in s tem preprečevanje prenosa vseh vrst kapljic in delcev v pljuča, vključno bakterij in virusov. Dobri filtri so tisti, ki učinkovito odstranjujejo delce vseh velikosti, povzročijo na filtru nizek padec zračnega tlaka, imajo visoko mehansko trdnost, so lahki in udobni za nošenje ter tudi poceni (2, 9).

2 MEHANIZMI FILTRIRANJA ZRAČNIH DELCEV IN OMEJITVE ZA VIRUSE

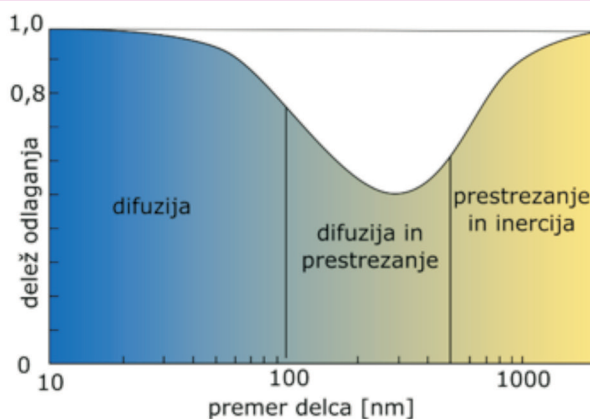
Filtre za filtracijo delcev iz zraka sestavljajo tkanine ali drugi vlaknasti materiali, ki s svojo strukturo in lastnostmi ovirajo prehod delcev skozi. V zadnjem času so predmet raziskav predvsem filtrirne vreče (*fabric filter*) in vlaknaste membrane (9, 11). Osnova filtrirnih vreč temelji na filtriranju delcev po načelu velikosti (*size-exclusion principle*). V primerjavi z njimi lahko vlaknaste membrane, ki so pripravljene iz naključno razporejenih vlaken eno na drugo, ujamejo delce tudi po drugih mehanizmih, predvsem preko elektrostatičnega naboja. Na učinkovitost odstranjevanja delcev iz zraka vplivajo lastnosti delcev samih, kot so kemijska sestava delcev, velikost in oblika, ter hitrost pretoka

zraka in lastnost površine, kamor se delci odlagajo. V splošnem velja, da učinkovitost filtra narašča z naraščanjem mase čistega filtra, se pa zmanjšuje z naraščanjem hitrosti gibanja zraka (11).

Filtrirne vreče večinoma uporabljajo v velikih industrijskih obratih za izločanje trdnih delcev iz plinov. Vlaknasti filtri so namenjeni uporabi v delavnem okolju, skozi katerega prehaja zrak. Za razliko od filtrirnih vreč prihaja pri slednjih do nalaganja delcev vzdolž celotne debeline filtra in ne le na površini. Kateri mehanizmi nastopajo pri odstranjevanju delcev iz zraka, prikazuje slika 3 (12).

Do prestrežanja pride, ko se delec, ki potuje s tokom zraka, zaleti v vlakno in tam naloži. Verjetnost, da se delec zaleti v vlakno filtra, se veča z večanjem premera delca (slika 4) (12). Zaradi vpliva inercije oz. vztrajnostnih sil delca, se leta ne giblje po tokovnici zraka, temveč v svoji smeri gibanja, dokler se ne zaleti ob vlakno in se na njem deponira. Vpliv mehanizma inercije se veča s povečevanjem mase in hitrosti delca. V primeru tipične hitrosti zraka pri filtraciji postane mehanizem inercije prevladujoč za delce s premerom, večjim od 1 µm. Difuzija delcev je posledica Brownovega gibanja molekul zraka. Zelo majhni delci, ki potujejo z zračnim tokom, so ob gibanju skozi vlakna podvrženi trkanju z molekulami zraka, kar povzroči naključno spreminjanje smeri in je lahko razlog, da se delec zaleti ob vlakno in na njem deponira. Učinek tega mehanizma se povečuje z manjšanjem velikosti delcev in zmanjševanjem hitrosti gibanja zraka. Tako se skoraj vsi nanodelci s premerom < 100 nm v filtru naložijo z difuzijo (11, 12).

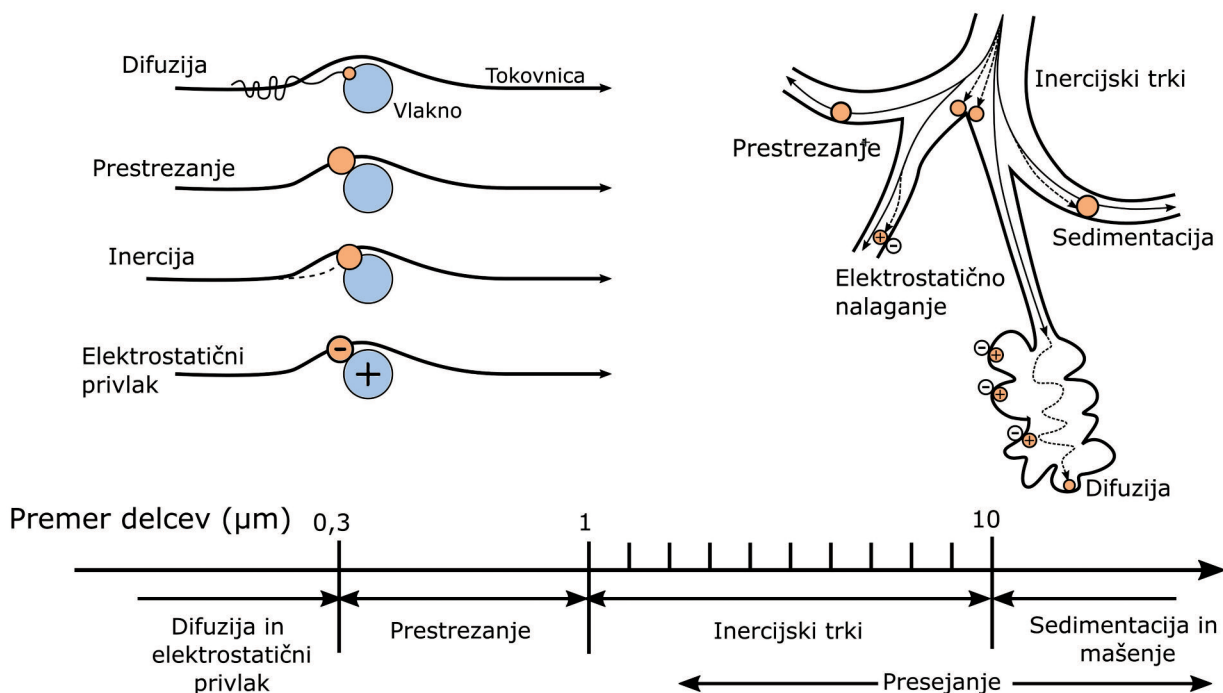
V določenih primerih lahko poleg navedenih mehanizmov na zadrževanje delcev vplivajo še elektrostatične interakcije,



Slika 3: Mehanizmi zadrževanja delcev na filtru v odvisnosti od njihovega premera (prirejeno po 12).

Figure 3: Mechanisms of particle retention on a filter depending on their diameter (adapted after 12).





Slika 4: Osnovni mehanizmi filtriranja delcev iz zraka na filtru, nalaganje v pljučih ter prevladujoč mehanizem pri določeni velikosti delca (12).

Figure 4: Basic mechanisms of air particle filtration at filters, deposition in the lungs, and the predominant mechanism at a certain particle size (12).

ki povzročijo, da se delec in vlakno z nasprotnim nabojem privlačita (slika 4). Če je nabit samo delec ali samo vlakno, pa za medsebojni privlak zadostuje že, da je nenabit element polariziran. Zbiranje delcev na vlaknu zaradi elektrostatične sile se z večanjem hitrosti zraka zmanjšuje. Ker elektrostatična polja povečajo učinkovitost filtracije brez povečanja upora zračnemu toku in hkrati ne povečajo padca tlaka, so taki filtrirni sistemi še posebej energetsko učinkoviti. Po daljši uporabi lahko nastopi senčenje nabojev, kar zmanjša sposobnost elektrostatičnih interakcij.

Mehanizmi filtracije si sledijo od večjih k manjšim delcem: sedimentacija, inercijski trki, prestrezanje, difuzija in nazadnje elektrostatični privlak (12). Za delce s premerom več kot 10 µm prevladuje sedimentacija zaradi gravitacije, od 1 do 10 µm prevladujeta prestrezanje in inercija, pri aerosolih velikosti do 100 nm prevladujeta mehanizma prestrezanja in difuzije, za še manjše delce pa je možno učinkovito prestrezanje le z elektrostatičnim privlakom. Slednji je še posebej učinkovit pri nizkih hitrostih zraka, ki so značilne za dihanje skozi obrazne maske.

Učinkovitost naštetih mehanizmov filtracije je odvisna predvsem od velikosti delcev, hitrosti pretoka zraka in gostote vlaken. Zanimivo je, da so pri preverjanju učinkovitosti filtracije nanodelcev dokazali, da obstaja med 100 in 500

nm »interakcijsko okno«, v katerem učinkovitost filtracije opazno pade (slika 3). Tu je skupni učinek difuzije in prestrezanja najmanjši, torej je tudi odstotek delcev, ki se v filtru zadržijo, najmanjši (2). Ta ugotovitev ima velik vpliv na filtriranje virusov in nanodelcev samih, tudi če so agregirani ali hidratirani. Pomembno je natančno poznavanje fizikalnih načel filtracije, saj relativna učinkovitost filtrov za zadrževanje virusov ni popolnoma znana, še zlasti odstranjevanje v območju njihovih velikosti (13).

3 STANDARDI IN NORMATIVI ZA ZRAČNE FILTRE IN OBRAZNE MASKE

3.1 ZAKONODAJA ZRAČNIH FILTROV PRI SPLOŠNEM PREZRAČEVANJU

Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO) je postavila svetovni standard ISO 16890 za klasifikacijske in preizkusne postopke za določitev glavnih značilnosti zračnih filtrov v splošnih prezračevalnih sistemih (7). Ameriška agencija za okolje, Svetovna zdravstvena organizacija in Evropska unija so prvič skupaj določile tri razrede delcev v

Preglednica 1: Velikostni razredi delcev v zraku, njihova standardna oznaka, območje filtriranja, primeri delcev in mesto nalaganja vzdolž dihalne poti po standardu ISO 16890.

Table 1: Air particle size classes, their standard designation, filtration area, particle examples and place of loading in the lungs according to ISO 16890 standard.

Premer delcev	Oznaka	Območje filtriranja [μm]	Primeri delcev v skupini	Mesto nalaganja v dihalih
$\leq 10 \mu\text{m}$	PM ₁₀	$0,3 \leq x \leq 10$	prašni delci, bakterije, glive, mikro- in nanodelci, virusi	centralni dihalni sistem (nos in grlo)
$\leq 2,5 \mu\text{m}$	PM _{2,5}	$0,3 \leq x \leq 2,5$	manjši delci, bakterije, glive, mikro- in nanodelci, virusi	periferni dihalni sistem (sapnik, bronhialne cevi)
$\leq 1 \mu\text{m}$	PM ₁	$0,3 \leq x \leq 1$	virusi, delci, nastajajoči pri nepopolnem izgorevanju, nanodelci	pljučni mešički, lahko tudi v krvni obtok

zraku z velikostjo med $0,3 \mu\text{m}$ in $10 \mu\text{m}$ (preglednica 1). Standard ISO 16890 temelji na tem, kje se delci iz zraka, ki ga dihamo, odložijo vzdolž dihalne poti. Zračne filtre po tem standardu vrednotijo v laboratoriju glede na njihovo zmožnost odstranjevanja delcev iz zraka, kar podaja učinkovitost filtracije (7).

Zaradi škodljivosti, dolgotrajnosti lebdenja v zraku in pogostosti potrebuje največ pozornosti delci, ki so manjši ali enaki $1 \mu\text{m}$. Najlažji in najmanjši delci so najštevilnejši in najnevarnejši, ostanejo v zraku najdlje, ker lebdi, in se širijo skupaj z gibajočim se zrakom. Ti delci po vdihu prodrejo najgloblje v pljuča. Delci z velikostjo $1 \mu\text{m}$ prispevajo k skupni masi zraka le nekaj odstotkov, k skupnemu številu vseh delcev pa več kot 90 %. Za izboljšanje kakovosti zraka v zaprtih prostorih in preprečevanje okužb so učinkoviti filtri v medicinskih maskah za obraz. Standard ISO 16890 podaja učinkovitost filtracije za PM₁, PM_{2,5} in PM₁₀, torej pokriva mikrometrsko področje, kamor sodijo po velikosti bakterije in glive, virusi in nanodelci pa v tem standardu niso omenjeni (7).

3.2 STANDARDI IN ZAHTEVE ZA MEDICINSKE MASKE ZA OBRAZ

Pri dihanju, govorjenju, kašljanju, kihanju in podobno nastanejo manjše ali večje kapljice, večinoma velikosti med $0,5 \mu\text{m}$ in $12 \mu\text{m}$, ki pa se na zraku hitro sušijo in manjšajo (10). Zahteve za medicinske maske za obraz ureja evropska zakonodaja v standardu EN 14683:2019+AC:2019: Medicinske maske za obraz (14). V splošnih zahtevah je navedeno, da so medicinske maske za obraz medicinski pripomočki, običajno sestavljeni iz filtrirne plasti, ki je nameščena, vezana oz. oblikovana med plastmi tkanine. Medicinske maske med namensko uporabo ne smejo razpasti, se razcepiti ali raztrgati. Pri izbiri filtrskih in slojnih

materialov je pomembna mikrobnost čistost. Maske morajo biti narejene iz materialov, ki omogočajo prileganje preko nosu, ust in brade uporabnika ter morajo zagotoviti tesno prileganje ob straneh. Lahko so različnih oblik in imajo dodatne elemente, ki zaščitijo uporabnika pred brizganjem in kapljicami. Zahteve za delovanje respiratornih mask so dodatno opredeljene v standardu EN 149:2001+A1:2009: Pripomočki za zaščito dihal (15). Funkcionalne zahteve za medicinske maske vključujejo podpoglavja za naslednje preizkuse:

- *Splošno* velja, da je vse preizkuse treba izvesti na končnih izdelkih ali vzorcih, odvzetih iz serije končnih izdelkov.
- *Učinkovitost bakterijske filtracije (bacterial filtration efficiency, BFE)* – medicinske maske za obraz morajo ustrezati minimalni vrednosti BFE za določeno vrsto mask.
- *Zračnost (breathability)* – medicinske maske za obraz morajo ustrezati minimalni vrednosti zračnosti (tlačna razlika) za določeno vrsto maske.
- *Odpornost proti prodiranju tekočine* – medicinske maske za obraz morajo po preizkusu na odpornost proti prodiranju tekočine ustrezati najmanjši vrednosti, ki je navedena za tip maske IIR.
- *Mikrobna obremenitev (bioburden)* – medicinske maske morajo biti skladne s standardom ($\leq 30 \text{ CFU/g}$).
- *Biokompatibilnost* medicinskih mask za obraz kot površinskih pripomočkov z omejenim stikom mora biti dokazana in dokumentirana v skladu s standardom.

V preglednici 2 so predstavljene vrste medicinskih mask za obraz po standardu EN 14683:2019. Maske so razvrščene v tri kategorije, tip I, tip II in tip IIR, glede na učinkovitost filtracije bakterij z zahtevanimi vrednostmi za posamezno razvrstitev (14).

Poimenovanje mask na trgu in v medijih je različno (npr. zaščitne, medicinske, kirurške, obrazne), kar pogosto povzroča zmedo. Priporočljivo je, da pred odločitvijo za nakup



Preglednica 2: Funkcionalne zahteve za medicinske maske za obraz različnih vrst (14).

Table 2: Functional requirements for medical face masks of different types (14).

Test	Tip I ^a	Tip II	Tip IIR
Učinkovitost filtracije bakterij (%)	≥ 95	≥ 98	≥ 98
Tlačna razlika (Pa/cm ²)	< 29,4	< 29,4	< 49,0
Odpornost na prodiranje tekočin (kPa)	Ni zahtevano	Ni zahtevano	≥ 16,0
Mikrobna obremenitev (CFU/g)	≤ 30	≤ 30	≤ 30

^a Medicinske maske za obraz tipa I smejo uporabljati samo pacienti in druge osebe za zmanjšanje tveganja za širjenje okužb, zlasti v epidemičnih ali pandemičnih razmerah. Maske tipa I niso namenjene zdravstvenim delavcem v operacijski dvorani ali v drugih zdravstvenih okoljih s podobnimi zahtevami, pač pa se v ta namen uporabljajo maske tipov II in IIR. Obrazne maske tipa IIR so odporne tudi na prodiranje tekočine; CFU/g – (colony forming units/g) je enota za ocenitev števila živih bakterij, ki tvorijo kolonije v 1 g vzorca.

maske poiščemo podatek o njeni učinkovitosti filtracije in tlačni razliki ali še bolje njen kakovostni količnik (podpoglavje 3.4.5). Različne vrste obraznih mask se razlikujejo po izgledu in izvedbi ter običajno zagotavljajo različno zaščito (slika 5). Medicinske maske za obraz zagotavljajo zaščito pred vdihavanjem zračnih patogenov mikrometrskih velikosti, veliko slabše pa virusov. Le obrazne maske, ki ustrezajo navedenim funkcionalnim zahtevam, spadajo med osebno zaščitno opremo, ki potencialno zagotovi zaščito pred virusnimi okužbami oz. zmanjšajo širjenje virusov SARS-CoV-2 v svetu (16).



3.3 STANDARDI IN ZAHTEVE ZA RESPIRATORNE MASKE

Zahteve za respiratorne maske (*respirators*) ureja evropski predpis s standardom EN 149:2001+A1:2009: Pripomočki za zaščito dihal (15). V skladu s tem standardom so maske razvrščene v tri razrede glede na njihovo učinkovitost: FFP1, FFP2 in FFP3 (*filtering face piece*) (slika 5). Bistvena razlika med medicinskimi maskami za obraz in respiratornimi maskami je v velikosti odfiltriranih delcev, in sicer prve odfiltrirajo delce ≥ 3 μm, respiratorne maske pa ≥ 0,3 μm (16, 17). Slednje imajo izpopolnjeno filtrirno površino na sredini in odprtine za izdihan zrak ob straneh ter se tesno prilegajo obrazu. Za uporabnika so bolj neudobne kot medicinske maske, otežujejo dihanje in pospešujejo znojenje. Respiratorne maske se po označevanju in filtracijskih parametroh razlikujejo po posameznih regulatornih področjih. Maske FFP1 predstavljajo prvi razred mask z najnižjo filtrirno učinkovitostjo, večinoma jih uporabljamo za delo v prašnem okolju. Maske FFP2 uporabljamo za zaščito pred vdihavanjem v industrijskih obratih in kot zaščito pred virusom gripe, SARS-a in bakterijskimi sevi kuge ter tuberkuloze. Maske FFP3 imajo največjo filtrirno sposobnost in omogočajo odstranitev 99 % zelo majhnih delcev (11).

Na sliki 5 so prikazane zahteve za posamezne vrste medicinskih in respiratornih mask z oznakami za različne trge: kitajski, ameriški in evropski. Usklajeno poimenovanje zaenkrat ne obstaja kakor tudi ne zahtevane enotne vrednosti parametrov. Na vseh trgih najdemo zaščitne maske treh vrst, a so poimenovanje in standardne vrednosti različne. Vedno raste učinkovitost filtracije od prve do tretje kategorije. Med geografskimi področji je največje odstopanje pri respiratornih maskah, tako po poimenovanju kot učinkovitosti filtracije. Le maske z visoko učinkovitostjo filtracije tudi izredno majhnih delcev bodo prispevale k izboljšanju kakovosti vdihanega zraka. Ob poznavanju mehanizmov filtracije lahko zaključimo, da sedanji medicinski pripomočki za filtracijo zraka dobro zaščitijo pred mikrometrskimi aerosoli, manj pa pred nanodelci in virusi.

3.4 TESTIRANJE KAKOVOSTI FILTROV IN MASK

Glavni preizkusi, ki jih uporabljamo za oceno učinkovitosti obraznih mask, so filtracija, zračnost in dihalna odpornost (*filtration, breathability, breathing resistance*) (11, 15, 17). Pri medicinskih maskah za obraz morajo testirati materiale za izdelavo, medtem ko pri respiratornih maskah opravijo preizkuse na izdelanih maskah. Preizkuse izvajajo pri definiranih pogojih (temperatura, relativna vlaga in pretok zraka) (18). Na učinkovitost filtra pri ločevanju delcev iz zračnega toka vplivajo sestava in oblika delcev, pretok in vrsta filtrirne površine. Znani so različni preizkusi, s katerimi dokažemo učinkovitost filtracije (10, 16, 17). Glede na vrsto in velikost delcev poznamo učinkovitost filtracije delcev (*particulate filtration efficiency, PFE*), učinkovitost bakterijske filtracije (*BFE*) in učinkovitost virusne filtracije (*virus filtration efficiency, VFE*). Številne znanstvene raziskave kažejo, da se anorganski in biološki delci ujamejo s podobnimi mehanizmi (18). Sama učinkovitost filtracije se večja z večanjem mase filtra in manjša z večanjem hitrosti gibanja zraka (18).

Tip maske	Standard	Učinkovitost filtracije		
Medicinska maska 	KITAJSKA: YY 0469	3,0 µm ≥ 95 % 0,1 µm ≥ 30 %		
	ZDA: ASTM F2100	Level 1	Level 2	Level 3
		3,0 µm ≥ 95 %	3,0 µm ≥ 98 % 0,1 µm ≥ 98 %	3,0 µm ≥ 98 % 0,1 µm ≥ 98 %
	EVROPA: EN 14683	Tip I	Tip II	Tip III
3,0 µm ≥ 95 % 0,1 µm: ✗		3,0 µm ≥ 98 % 0,1 µm: ✗	3,0 µm ≥ 98 % 0,1 µm: ✗	
Respiratorna maska 	ZDA: NIOSH (42 CFR 84)	N95/KN95	N99/KN99	N100/KN100
	KITAJSKA: GB2626	0,3 µm ≥ 95 %	0,3 µm ≥ 99 %	0,3 µm ≥ 99,97 %
	EVROPA: EN 149:2001+A1:2009	FFP1	FFP2	FFP3
		0,3 µm ≥ 80 %	0,3 µm ≥ 94 %	0,3 µm ≥ 99 %

Slika 5: Zahteve za posamezne vrste mask za obraz za trg Evrope, Združenih držav Amerike ali Kitajske in njihova učinkovitost filtracije; X – brez zahtev (14).

Figure 5: Requirements for individual types of face masks for the European, United States or Chinese market and their particle filtration efficiency; X – no requirements (14).

Tako za izvedbo preizkusov kot omejevanje okužb je pomembno poznati relativno vlažnost okolja, ki različno vpliva na preživetje mikroorganizmov. Mehanizem, na katerem temelji ta odnos, ni znan, zlasti ne za viruse. S tradicionalnimi pristopi na osnovi celičnih kultur so raziskali učinke relativne vlage na sposobnost preživetja bakterij in virusov tako v aerosolih kot v mirujočih kapljicah. Rezultati so pokazali, da je sposobnost preživetja bakterij na splošno manjša z nižanjem relativne vlage. Virusi relativno dobro ohranijo biološko aktivnost pri nizki (pod 33 %) in visoki vlagi (nad 80 %), medtem ko se njihova aktivnost zmanjša pri vmesnih vrednostih (19). Najpogostejši preizkusi za vrednotenje filtrov so navedeni spodaj.

3.4.1 Učinkovitost filtracije delcev

Standard učinkovitosti filtracije delcev (PFE) predstavlja frakcijo delcev, ki jih filter ali maska zadrži pri konstantni hi-

trosti pretoka zraka. Za kvantitativno opredelitev učinkovitosti filtracije materialov za maske uporabljajo 0,1-mikrometerske polistirenske delce ali delce natrijevega klorida določenih velikosti pri hitrostih zračnega toka 0,5 do 25 cm/s. S števčcem delcev preštejejo tiste delce, ki sipajo svetlobo v območju velikosti 0,1 do 5,0 µm. Učinkovitost filtracije delcev, E_{PM} , izračunamo kot razmerje delcev pred in po filtriranju skladno z enačbo:

$$E_{PM} (\%) = \frac{c_0 - c_1}{c_0} \times 100,$$

kjer c_0 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) in c_1 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) predstavljata masno koncentracijo ali povprečno število delcev pred in po uporabi zračnega filtra (14–18).

3.4.2 Učinkovitost filtracije bakterij

Medicinskim maskam določijo učinkovitost filtracije bakterij po standardu EN 14683:2019 (15). Za simulacijo bakterij-

ske okužbe uporabljajo aerosol *Staphylococcus aureus*. Nadzorovano črpajo suspenzijo bakterijske kulture s 5×10^5 CFU/ml skozi razpršilec s stalnim pretokom in tlakom zraka. Višji odstotek učinkovitosti filtracije označuje višjo raven zaščite za pacienta in zdravstveno osebje pred boleznimi, ki se prenašajo z aerosoli (18).

3.4.3 Učinkovitost filtracije virusov

Učinkovitost filtracije virusov ni standardna metoda, vendar jo sedaj uporabljajo proizvajalci mask. Za preizkus uporabljajo enak postopek in nastavitve, kot jih priporoča standard EN 14683 za učinkovitost filtracije bakterij, s to razliko, da uporabijo virusni aerosol in ne bakterijskega. Virusni aerosol so v zraku razpršene kapljice vode, ki vsebujejo viruse in ne posameznih delov virusa (17).

3.4.4 Padec tlaka na filtru

Poleg učinkovitosti filtracije je izredno pomembna tudi dobra permeabilnost filtra za zrak. To opredelimo kot razliko tlaka (med dovodnim in odvodnim tlakom zraka v napravi, ki tehnično posnema nošenje maske) (13, 16). Padec tlaka se povečuje z večanjem debeline filtra ali z manjšanjem njegove prepustnosti (20). Merilo dihalnega upora ocenijo po standardu EN 149:2009 (14), predstavlja pa značilen parameter, ki ga je treba oceniti in navesti na izdelku.

3.4.5 Kakovostni količnik

S kakovostnim količnikom (*quality factor*, QF) ovrednotimo celotno lastnost filtracijskih materialov, kjer za izračun upoštevamo eksperimentalne podatke: E predstavlja učinkovitost odstranjevanja delcev, ΔP pa padec tlaka zaradi filtra:

$$QF = -\ln(1 - E)/\Delta P$$

Višji kakovostni količnik je povezan tudi z boljšim filtriranjem. Definicija QF pokaže večjo učinkovitost filtracije pri manjšem padcu tlaka. Če povečamo količino vlaken v filtru oz. maski, se zmanjša velikost por (prosta pot za zrak in delce) in izboljša učinkovitost odstranjevanja, a žal hkrati poveča zračni upor. Posledično je izredno pomembno, da najdemo ravnovesje med učinkovitostjo odstranjevanja delcev in zračnim uporom. Za večji QF je možno tehnološko optimirati razmerje med površino in debelino vlaken ter prostor med njimi, da čim manj ovira pretok zraka.

Preglednica 3: Parametri in lastnosti obraznih mask.
Table 3: Parameters and properties of face masks.

- Učinkovitost odstranjevanja delcev
- Primeren padec tlaka
- Kakovostni količnik
- Protiinfektivne lastnosti
- Biokompatibilnost
- Udobno nošenje
- Izgled
- Večkratna uporaba
- Toplotna stabilnost
- Možnost recikliranja
- Sprejemljiva cena
- Negorljivost

4 FILTRI IN MASKE V RAZVOJU

Pomanjkljivost konvencionalnih obraznih mask je vezana na nezadostno zadrževanje delcev $\leq PM_{10}$, velik padec tlaka ter visoko osnovno maso (2, 10, 11, 15, 20). El-Atab in sod. poročajo, da obrazna maska N95 zagotavlja visoko raven zaščite pred bakterijami, a je učinkovitost filtracije za delce, manjše od 300 nm, le približno 85-odstotna. Ker znaša premer virusa, ki povzroča bolezen covid-19 65 do 125 nm, širina por v filtru pa približno 300 nm, obstaja potreba po razvoju učinkovitejših mask (21). Poleg navedenih parametrov je pomemben vidik dobre zaščitne maske, ki ga je vredno upoštevati pri razvoju, nabavi ali uporabi vseh vrst obraznih mask, udobno nošenje (22). Ugotovili so, da je udobnost maske oz. njena nosljivost neposredno odvisna od sposobnosti maske za prepustnost vodne pare in zraka ter učinkovit prenos toplote (10, 18). Ocenjujejo, da je treba razviti filtre z nižjo porabo energije za premagovanje upora maske, hkrati pa doseči visoko učinkovitost filtriranja. Dokazano je, da višja učinkovitost mask dobro korelira z zmanjšanjem premera vlaken, kar dosežejo z različnimi nanotehnološkimi pristopi, ki še niso v celoti izkoriščeni, kot ugotavljajo znanstveniki. Nanomateriale lahko uporabimo za izboljšanje filtracijskih sposobnosti in zračnosti z namenom, da izboljšamo kakovost mask (18). K celovitemu udobju prispevajo tudi povečanje prostora med masko, nosom in ustnicami, zadostna prožnost ušesne zanke in masa maske.

Med procesom filtracije prehaja skozi masko zrak, ki je topel, vlažen in poln mikroorganizmov, zato obstaja velika

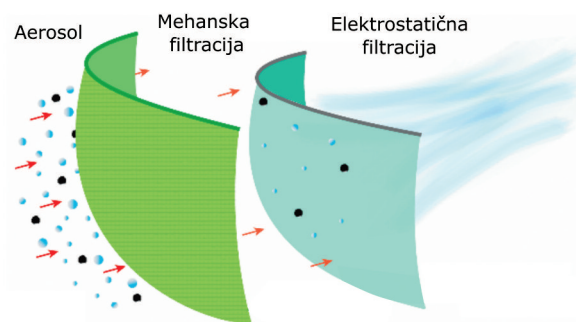
verjetnost za razrast bakterij in plesni v njih. Za zmanjšanje števila mikroorganizmov so pričeli v vlakna vgrajevati snovi s protimikrobnim delovanjem (22). Za izboljšanje filtracije razvijajo in preizkušajo nove materiale in nove tehnologije.

4.1 MATERIALI ZA PRIPRAVO FILTROV IN ZAŠČITNIH MASK

Glede na izvor razdelimo polimerne materiale v tri skupine: naravne, sintezne in biotehnološke (23). Naravni materiali, vključno s polisaharidi, kot so celuloza, škrob in hitozan, in beljakovinski materiali, kot so kolagen, elastin in svila, so idealni biološko razgradljivi polimeri. Celuloza je naravni material, ki omogoča le mehansko zajetje delcev, ker sama po sebi ne poseduje elektrostatičnega naboja. Nasprotno hitozan, kolagen, elastin in svila posedujejo naboj in lahko dosežejo zajetje delcev tudi z elektrostatičnim mehanizmom (24, 25). Tovrstni naravni materiali so sorazmerno težko predvidljivi, imajo šibke mehanske lastnosti in nizko obstojnost v vlažnem okolju. V izogib navedenim pomanjkljivostim naravne materiale običajno spremenijo s fizikalnimi, kemičnimi in encimskimi reakcijami (26). V praksi so danes bolj zastopani sintezni polimerni materiali, kot so polipropilen, polikaprolakton, polivinil alkohol, polimlečna kislina, kopolimer mlečne in glikolne kisline in drugi (27). Med nove materiale, ki ustrezajo postopku elektrostatskega sukanja, sodijo tudi poliviniliden fluorid, poliakrilonitril, polikarbonat in acetilceluloza. Proučujejo tudi kompozitno sestavo, kot je npr. hitozan/polivinil alkohol, ki zaradi zmernega elektrostatičnega naboja izkazujejo boljše učinkovitost (27, 28). Filtri iz acetilceluloznih nanovlaknen z različnimi povprečnimi premeri izkazujejo boljše rezultate kot komercialni filtri.

Na tržišču najdemo kemijsko enake polimere različnih molekulskih mas in substitucijskih stopenj, zato jih je vredno raziskati. Larsen in sod. so proučevali polipropilen (PP) treh različnih vrst in poiskali tisto, ki izkazuje najboljšo filtracijsko učinkovitost na primeru mask N95 (29).

Navedeni materiali, ki jih uporabljajo za izdelavo filtrov za obrazne maske, omogočajo pripravo vlaken različnih premerov (10 do 50 μm) (30, 31). Ker so debelina teh vlaken in pore med njimi relativno velike, so vlakna ustrezna za prestrezanje bakterij, za prestrezanje virusov in drugih submikronskih delcev pa ne. Rešitev predstavljajo tehnologije, s katerimi pripravimo na osnovi teh vlaken dodatno plast ultratankih vlaken z mnogo manjšimi vmesnimi prostori, ki zgolj malenkostno spremenijo upor zraka v filtru. Zaradi vseh lastnosti, ki jih želimo doseči pri izdelavi obraznih mask, je smiselno uporabiti več slojev iz različnih materialov, ki omogočijo zajetje delcev tako zaradi mehanske pregrade



Slika 6: Primer filtracije skozi dvoslojno obrazno masko, ki vključuje različne mehanizme filtracije (16).

Figure 6: Example of a two-layer face mask filtration approach involving different filtration mechanisms (16).

kot tudi elektrostatičnega naboja, in hkrati zadostiti pričakovanjem potrošnikov; koncept je predstavljen na sliki 6 (16).

Pri izboru materialov in postopkov ne smemo prezreti usmerjenosti v alternativno (zeleno) tehnologijo, ki je prijaznejša do okolja z vidika varstva okolja v primerjavi s funkcijsko enakimi tehnologijami, ki prevladujejo v današnji praksi. Z vidika polimerov in topil izbiramo med tistimi, ki so biološko razgradljivi in topni v okolju prijaznih topilih, izdelane maske pa je možno reciklirati (2, 32).

4.2 IZDELAVA ZRAČNIH FILTROV IZ NANOVLAKEN Z METODO ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

Najpogostejši postopek za izdelavo ultratankih polimernih vlaken (nanovlaken) je elektrostatsko sukanje raztopine polimera ali kombinacije polimerov (30). Z besedo nanovlakna imenujemo zelo tanka in dolga vlakna, s premerom manj kot 1000 nm in veliko specifično površino. Elektrostatsko sukanje je metoda za izdelavo membran z vlakni različnih premerov, morfologij, polarnosti in poroznosti. Nanovlakna omogočajo nastanek mehkih in prožnih membran z dobrimi mehanskimi lastnostmi, kot sta natezna trdnost in elastičnost (33–35).

Osnovne komponente elektrostatskega sukanja so visokonapetostni vir energije, črpalka z brizgo, šoba ter zbiralo. Proces sukanja se prične, ko vzpostavimo vir električne napetosti med šobo in zbiralom. Nato se v raztopini polimera ustvari električni naboj, ki povzroči, da sferična kapljica, ki nastane na izstopu šobe, spremeni svojo obliko v Taylorjev stožec. Slednji nastane zaradi prisotnosti naraščajočih odbojnih sil med istovrstnimi naboji na površini ka-



pljice in privlačnih sil med nasprotno nabitim zbiralom. Ko sila električne napetosti preseže silo površinske napetosti kapljice, se z vrha Taylorjevega stožca tvori curek, ki potuje proti zbiralu. Na tej poti topilo odpareva, curek se tanjša ter se prične vrtnčiti, kar je posledica skupnega vpliva električnega polja in odboja med površinskimi naboji. Na zbiralu se naberejo suha in izredno lahka nanovlakna, urejena naključno. Na morfologijo elektrosukanih nanovlaken vplivajo različni dejavniki, še posebej vrsta in koncentracija polimera v raztopini, topilo, električna napetost, hitrost toka raztopine skozi šobo, razdalja med šobo in zbiralom, lastnosti raztopine (polarnost, površinska napetost, električna prevodnost) ter vpliv okolja, kjer se izvaja elektrostatsko sukanje (temperatura, relativna vlažnost, premikanje zraka) (34).

Z ozaveščanjem o varovanju okolja se hkrati razvija elektrostatsko sukanje polimernih talin, torej tehnologija brez uporabe topil, ki sicer pogosto predstavljajo probleme (toksičnost topil, zaostanek topil v vlaknih in med njimi). V literaturi omenjajo kot primerne polimere, ki jih lahko uspešno oblikujemo v filtre preko talin, polietilen, polipropilen, polikaprolakton, poliuretan, polimlečno kislino in druge (31,2). Učinkovitost filtracije delcev in padec tlaka sta najpomembnejša parametra zračnih filtrov. Raziskave so pokazale, da so filtri iz nanovlaken bolj učinkoviti za filtriranje aerosolov zaradi njihove večje specifične površine kot filtri iz mikrovlaken, ker prvi zagotavljajo boljši stik med delci v zraku in vlakni (32). Za pripravo vlaken v nanometrskem območju so razvili pristop samosestavljanja molekul s specifično molekularno zasnovo, ki omogoča ustrezno strukturno ureditev (princip »LEGO«) (36). Torej že s skrbno izbranim materialom in tehnološkim postopkom lahko pripravimo filtre in obrazne maske, ki zadostijo vsem predpisanim standardom za odstranjevanje delcev iz zraka (37). Velik napredek je pričakovati tudi na področju odstranjevanja virusov in nanodelcev, saj raziskovalci intenzivno raziskujejo v smeri izbora in vgrajevanja varnih aktivnih sestavin.

4.3 MEMBRANE IZ NANOVLAKEN ZA VGRAJEVANJE V OBRAZNE MASKE IN UČINKOVITO ZADRŽEVANJE MIKROBOV

Velikost virusov redko presega 100 nm, kar je razlog za njihovo neučinkovito zadrževanje na filtrih. Da bi zagotovili ustrezno zadrževanje virusov, bi bila smiselna izdelava filtrov z velikostjo por 10 do 100 nm in z vgrajeno učinkovino, ki

izkazuje protimikrobno ali protivirusno delovanje (2, 10, 28, 38). Natančno bi bilo treba določiti debelino vlaken in por z vrstično elektronsko mikroskopijo, mehansko trdnost (Youngov modul), protiinfektivno učinkovitost, sposobnost adsorpcije virusov ter protivirusno delovanje nanovlaken (38–40).

V literaturi najdemo članke, v katerih opisujejo razvoj kompozitnih nanovlaken s protimikrobnimi ali protivirusnimi učinkovinami, ki so jih izdelali z metodo elektrostatskega sukanja ter jim določili učinkovitost filtracije, tlačni padec in kakovostni količnik (2, 13, 27, 28, 38, 40, 41). Dokazali so, da so vlakna z manjšim premerom privedla do večjega mehanskega zajema z difuzijo in prestrezanjem predvsem zaradi velike specifične površine nanovlaken. Za zajemanjem aerosolov velikosti delcev pod 100 nm, ki simulira koronavirus in nanoaerosolna onesnaževala, je difuzija postala pomemben mehanizem. Elektrostatični zajem že sam po sebi nekoliko izboljša zajem, prisotnost številnih tankih nanovlaken pa ga še poveča.

Kot aktivne spojine v nanovlaknih proučujejo delce cinkovega, titanovega, magnezijevega, aluminijevega ali bakrovega oksida, srebra in zlata ter protimikrobno delovanje dokazujejo s preizkusi inhibicije rasti na celičnih gojiščih. Za nanodelce srebra in zlata so dokazali, da izkazujejo protivirusno delovanje proti različnim vrstam virusov: virusu influence, HIV-1, virusu herpesa simpleksa tipa 1 (HSV-1) in virusu hepatitisa B (HBV) (14). Slednje kaže na smiselnost vgrajevanja kovinskih ionov v materiale za izdelavo membran za obrazne maske (2, 13, 28).

V večini drugih člankov izdelanim filtrom niso določili in definirali velikosti njihovih por ter s preizkusi določili njihovega protivirusnega delovanja, zato težko sklepamo o njihovi učinkovitosti za odstranjevanje virusov. Ravno zato bi bilo treba razviti metode in preizkuse za določitev vezave virusov na filtre. Smiseln bi bil razvoj metode, s katero bi lahko kvalitativno in kvantitativno določili, ali se je virus zadržal na filtrih in v kakšnem obsegu. Ena izmed možnosti je razvoj metode, s katero bi lahko določili, ali se virus veže na vlakna filtra in ali vgrajene protivirusne učinkovine sploh učinkujejo nanje. Druga možnost pa je merilna tehnika po analogiji kot za druge delce, ki bi omogočala določitev, koliko virusov je prešlo filter in se na njem ni zadržalo. S tem bi omogočili razvoj standardnih metod in posledično omogočili lažje interpretiranje rezultatov raziskav.

Nedavna pandemija in spodbujene številne raziskave po vsem svetu so pokazale potrebo po razvoju ustrežnejših mask, na osnovi inovativnih materialov in nanotehnoloških postopkov. Pričakujemo lahko razvojni prehod od sedanjih

relativno enostavnih do naprednih zaščitnih mask. Nekateri napredni filtri z odličnim kakovostnim količnikom imajo tudi posebne lastnosti, kot so toplotna stabilnost, antibakterijske lastnosti, so samočistilni, negorljivi in biološko razgradljivi. Dodatno najdemo v literaturi prve filtre za filtriranje zraka in učinkovito odstranjevanje delcev PM 0,1 (42).

5 ZAKLJUČEK

V zadnjih letih narašča prizadevanje za razvoj naprednih strategij za odstranjevanje aerosolov v vdihanem zraku. Z uvajanjem elektrostatskega sukanja v proces izdelave nanovlaken je možno izdelati električno nabite, ultralahke filtre. Membrane iz nanovlaken s svojimi lastnostmi omogočajo reševanje prenekaterih omejitev, ki jih predstavlja uporaba konvencionalnih materialov. Izdelava membran iz nanovlaken omogoča nadzor velikosti por, premera vlaken in s tem doseganje velike specifične površine in hkrati zagotavlja vse mehanizme filtracije. Take membrane znatno izboljšajo učinkovitost filtriranja virusov in drugih submikronskih delcev v zraku, pri tem pa le malo vplivajo na pretok zraka (majhen padec tlaka). Če povzamemo, je le uporaba ustrezne maske učinkovito sredstvo za zaščito delovnega okolja in posameznika pred virusi in drugimi kontaminanti. Pri izbiri maske moramo biti previdni, da izberemo ustrezno za določen namen uporabe. Ob prihodnjih pandemijah, povezanih z dihali, pričakujemo dostopnost učinkovitejših obraznih mask.

Danes opažamo potrebo za razvoj filtrov s kombiniranim mehanizmom odstranjevanja virusov s filtriranjem aerosolov ter vključevanjem spojin s protivirusnim delovanjem. Ne glede na to se je treba še vedno zavedati vseh dejavnikov, ki vplivajo na ustreznost filtrov. Ključnega pomena pri vlaknastih filtrih je njihova sposobnost za učinkovito odstranjevanje virusov iz zraka, nizek upor zračnega toka ter sposobnost prenosa toplote in vodne pare. Poseben poudarek je treba nameniti udobnosti mask, ker neudobne obrazne maske pri uporabnikih povzročajo nelagodje in povečajo verjetnost, da jih ne uporabljajo v skladu z navodili. V prihodnosti lahko pričakujemo večje poenotenje izrazov in standardnih vrednosti za enake vrste zračnih filtrov in mask na svetovnem nivoju. S tem bi značilno olajšali njihovo prepoznavnost, osebno uporabo, svetovanje v lekarnah in zdravstvenih ustanovah, pa tudi trgovanje.

6 VIRI

1. Fuzzi S, Baltensperger U, Carslaw K, Decesari S, Denier van der Gon H, et al. Particulate matter, air quality and climate: lessons learned and future needs. *Atmos. Chem. Phys.*, 2015, 15, 8217–8299.
2. Lv Dan, et al. Ecofriendly electrospun membranes loaded with visible-light-responding nanoparticles for multifunctional usages: highly efficient air filtration, dye scavenging, and bactericidal activity. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11.13: 12880-12889.
3. Cao C, Jiang W, Wang B, Fang J, Lang J, Tian G, Jiang J, Zhu TF. Inhalable Microorganisms in Beijing's PM2.5 and PM10 Pollutants during a Severe Smog Event. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48 (3): 1499–507.
4. Slika 1- Primerjeva velikosti različnih delcev in snovi: Dostop (april 2020) <https://smartairfilters.com/en/blog/comparison-mask-standards-rating-effectiveness/>
5. Tomašič T. Korona virus SARS-CoV-2 in bolezen covid-19. *Farm. Vestn.* 2020; 71 (2): 107-111.
6. Morawska, L.; Cao, J. Airborne Transmission of SARS-Cov-2: The World Should Face the Reality. *Environ. Int.* 2020, 139, 105730.
7. ISO 16890: Air Filters for General Ventilation 2016; ISO Geneva, Switzerland, 2016. <https://www.scribd.com/document/415141099/ISO-16890-Pocket-Guide-english-final>
8. Kutter JS, Spronken Ml, Fraaij PL, Fouchier RA, Herfst S. Transmission Routes of Respiratory Viruses Among Humans. *Curr. Opin. Virol.* 2018; 28, 142–51.
9. Maedler L., Friedlander S. K.: Transport of Nanoparticles in Gases: Overview and Recent Advances. *Aerosol and Air Quality Research*, 2007; 7 (3): 304-42.
10. Chua MH, Cheng W, Goh SS, Kong J, Li B, Lim JYC, et al. Face Masks in the New COVID-19 Normal: Materials, Testing, and Perspectives. *AAAS Research*, 2020 Article ID 7286735
11. Liu H, Cao C, Huang J, Chen Z, Chen G, Lai Y. Progress on particulate matter filtration technology: basic concepts, advanced materials, and performances. *Nanoscale.* 2020; 2(2):437-453.
12. Colbeck I, Lazaridis M. Filtration Mechanisms. In *Aerosol Science: Technology and Applications*, 1st ed.; Colbeck, I. Lazaridis, M., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 2014; pp 89–118.
13. Leung W W F, Sun Q. Electrostatic Charged Nanofiber Filter for Filtering Airborne Novel Coronavirus (COVID-19) and Nano-Aerosols. *Sep. Purif. Technol.* 2020, 250, 116886.
14. European Standards. UNE EN 14683:2019+AC: 2019. *Medical Face Masks - Requirements and Test Methods (2019)* <https://www.en-standard.eu/>
15. EN 149:2001+A1:2009: Respiratory Protective Devices. *Filtering Half Masks to Protect against Particles. Requirements, Testing, Marking.* <https://www.en-standard.eu/bs-en-149-2001-a1-2009-respiratory-protective-devices>.
16. Konda A, Prakash A, Moss GA, Schmoldt M, Grant GD, Guha S. Correction to aerosol filtration efficiency of common fabrics used in respiratory cloth masks. *ACS Nano*, 2020; 14 (5): 6339–47.
17. European Medicines Agency. Alofisel product information. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/alofisel-epar-product-informationen.pdf>



18. Lee Shu-An, Dong-Chir Hwang, He-Yi Li, Chieh-Fu Tsai, Chun-Wan Chen, Jen-Kun Chen. Particle size-selective assessment of protection of European standard FFP respirators and surgical masks against particles-tested with human subjects. *J Healthcare Eng.* 2016, 2016:8572493.
19. Lin K, Marr LC. Humidity-dependent decay of viruses, but not bacteria, in aerosols and droplets follows disinfection kinetics. *Environ. Sci. Technol.* 2020; 54 (2): 1024–1032.
20. Anja Pogačnik Krajnc A, Pirker L, Gradišar Centa U, Gradišek A, Mekjavic IB, Godnič M, Cebašek M, Bregant T, Remškar M. Size- and time-dependent particle removal efficiency of face masks and improvised respiratory protection equipment used during the COVID-19 pandemic. *Sensors* 2021; 21: 1567.
21. El-Atab N, Qaiser N, Badghaish H, Shaikh SF, Hussain MM. Flexible nanoporous template for the design and development of reusable anti-COVID-19 hydrophobic face masks. *ACS Nano* 2020, 14 (6), 7659–7665.
22. WANG, Na, et al. Electret nanofibrous membrane with enhanced filtration performance and wearing comfortability for face mask. *Journal of colloid and interface science*, 2018, 530: 695–703.
23. Armenrano I, Barbanera M, Carota E, Crognale S, Marconi M, Rossi S, Rubino G, Scungio M, Taborri J, Calabro G. Polymer materials for respiratory protection: processing, end use, and Testing Methods. *ACS Appl. Polym. Mater* 2021; 3 (2): 531–548.
24. Stefens B. Evaluating the sensitivity of the mass-based particle removal calculations for HVAC filters in ISO 16890 to assumptions for aerosol distributions. *Atmosphere* 2018; 9:85.
25. Zhu M, Xiong R, Huang C. Bio-based and photocrosslinked electrospun antibacterial nanofibrous membranes for air filtration. *Carbohydr Polym.* 2019 Feb 1;205:55-62.
26. Junter, G.-A.; Lebrun, L. Cellulose-Based Virus-Retentive Filters: A Review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2017, 16 (3), 455–489.
27. Bortolassi AC, Guerra VG, Aguiar ML, Soussan L, Cornu D, Miele P, Bechelany M. Composites Based on Nanoparticle and PAN Electrospun Nanofiber Membranes for Air Filtration and Bacterial Removal. *Nanomaterials (Basel).* 2019 Dec 6;9(12):1740. doi: 10.3390/nano9121740
28. Li, Y.; Yin, X.; Si, Y.; Yu, J.; Ding, B. All-Polymer Hybrid Electret Fibers for High-Efficiency and Low-Resistance Filter Media. *Chem. Eng. J.* 2020, 398, 125626.
29. Larsen SG, Cheng Y, Daermen LL, Lamichhane NT, Hensley KD, Hong K et al. Polymer, Additives, and Processing Effects on N95 Filter Performance. *ACS Appl. Polym. Mater.* 2021, 3, 2, 1022–1031.
30. Barhoum A, et al. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. *Applied Materials Today*, 2019, 17: 1-35.
31. Noushini A, Samali B, Vessalas Ki. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) fibre on dynamic and material properties of fibre reinforced concrete. *Construction and Building Materials*, 2013, 49: 374-383.
32. Lv D, Zhu M, Jiang Z, Jiang S, Zhang Q, Xiong R, Huang C. Green electrospun nanofibers and their application in air filtration. *Macromol. Mater. Eng.* 2018, 303, 1800336.
33. Rosic R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S. Nanofibers and their biomedical use. *Acta Pharm* 2013; 63: Issue: 3, 295-304.
34. Pelipenko J, Kocbek J, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm*, 2015; 484: 57–74.
35. Janković B, Pelipenko J, Škarabot M, Mušević I, Kristl J. The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *Int J Pharm* 2013; 455 (1–2), 338-347.
36. Singh KV, Ravi KS, Sun W, Tan CS. Transparent nanofibrous mesh self-assembled from molecular LEGOs for high efficiency air filtration with new functionalities. *Small* 2016, DOI: 10.1002/sml.201601924
37. Jiajia, et al. Electrospun nanofibers: new concepts, materials, and applications. *Accounts of chemical research*, 2017, 50.8: 1976-1987.
38. Zhou J, Hu Z, Zabih F, Chen Z, Zhu M. Progress and perspective of antiviral protective material. *Advanced Fiber Materials*, 2020, 2 (3), 123–139. <https://doi.org/10.1007/s42765-020-00047-7>
39. Zhua M, Huaa D, Zhongc M, Zhanga L, Wanga F, Gaod B, et al. Antibacterial and Effective Air Filtration Membranes by “Green” Electrospinning and Citric Acid Crosslinking. *Colloid and Interface Science Communications* 2018; 23 (3): 52-58.
40. Wang B, Wang Q, Wang Y, Di J, Miao S, Yu J. Flexible multifunctional porous nanofibrous membranes for high-efficiency air filtration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11, 43409–43415.
41. Zhou J, Hu Z, Zabih F, Chen Z, Zhu M. Progress and perspective of antiviral protective material. *Advanced Fiber Materials*, 2020, 2 (3), 123–139.
42. Chen R, Gan Z, et al. Thermoplastic Polyurethane Nanofiber Membrane Based Air Filters for Efficient Removal of Ultrafine Particulate Matter PM0.1. *ACS Appl. Nano Mater.* 2021, 4 (1), 182–189.

PROFILAKTIČNA CEPIVA NA OSNOVI INFORMACIJSKE RNA PROTI NALEZLJIVIM BOLEZNIM

PROPHYLACTIC MESSENGER RNA-BASED VACCINES AGAINST INFECTIOUS DISEASES

AVTORJA / AUTHORS:

Ana Vencelj

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

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

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

1 UVOD

Cepiva (vaccine) so praviloma profilaktična zdravila, s katerimi preprečujemo nalezljive bolezni, a razvijajo tudi terapevtske vaccine za zdravljenje (kroničnih) virusnih okužb

POVZETEK

Cepiva na osnovi informacijske RNA (mRNA) predstavljajo izjemno obetavno platformo cepiv, saj omogočajo hiter odziv na grožnje novih patogenov. Temeljijo na vnosu genskega zapisa za enega ali več antigenov povzročitelja nalezljive bolezni neposredno v celice vakcinirane osebe. Na podlagi genske informacije transfecirane celice prehodno izrazijo proteinski antigen in ga predstavijo na svoji površini v obliki peptidov, vezanih na poglobitni kompleks tkivne skladnosti. Tako predstavljene jih zaznajo limfociti T. Če usmerimo antigen na celično membrano ali v zunajcelični prostor, pride tudi do robustnega humoralnega imunskega odziva. V zadnjem desetletju beležimo precejšen napredek na področjih encimske sinteze mRNA, razumevanja imunomodulatornih lastnosti same eksogene mRNA in dostavnih sistemov mRNA-cepiv ter doseganja učinkovite transfekcije in translacije *in vivo*, kar je omogočilo nedavno odobritev prvih tovrstnih cepiv v Evropski uniji in ZDA. V prispevku predstavljamo mehanizme delovanja, način proizvodnje in dosedanje klinične izkušnje s profilaktičnimi mRNA-cepivi proti nalezljivim boleznim.

KLJUČNE BESEDE:

cepivo, klinične raziskave, mehanizem delovanja, mRNA

ABSTRACT

Messenger RNA (mRNA) vaccines are an extremely promising vaccine platform, as they allow for immediate response to new pathogen threats. mRNA vaccines are based on introducing genetic information for one or more antigens of a pathogen directly into cells of a vaccinated individual. The transfected cells use this genetic information to transiently express the encoded protein antigen and display it on the cell surface in the form of antigenic peptides bound to major histocompatibility complex, thereby activating T lymphocytes. If the encoded intact antigen is directed to the cell surface or the extracellular space, robust humoral response is also observed. In the last decade, important progress has been made in the areas of enzymatic mRNA synthesis, understanding im-



munomodulatory properties of exogenous mRNA as well as materials for mRNA delivery, and optimizing transfection and *in vivo* translation efficiency, leading to approval of first mRNA-based vaccines in the European Union and United States. Here, we review the mechanisms of actions, production technologies and current clinical experience with prophylactic mRNA vaccines against infectious diseases.

KEY WORDS:

clinical trials, mechanism of action, mRNA, vaccine

in rakavih boleznih. V članku se osredotočamo izključno na profilaktična cepiva na osnovi informacijske RNA (mRNA). Ta relativno nova platforma je zelo obetavna, saj omogoča izjemno hiter odziv na grozeče epidemije virusnih boleznih, kot se je izkazalo v aktualnem primeru covid-19 – vsega deset mesecev po tem, ko je Svetovna zdravstvena organizacija razglasila pandemijo, sta prejeli pogojno dovoljenje za promet v EU in ZDA že dve cepivi na osnovi mRNA, še 14 takih cepiv proti covid-19 pa trenutno po svetu vrednotijo v kliničnih raziskavah (1). mRNA-cepiva so privlačna tudi, ker dobro posnemajo proces naravne okužbe z vidika procesiranja in predstavljanja virusnih antigenov (za razliko od konvencionalnih inaktiviranih ali proteinskih vakcin), kar je ključnega pomena za proženje tako humoralnega kot celičnega imunskega odziva (2).

Leta 1989 so prvič poročali o uspešnem izražanju modelnega proteina luciferaze po transfekciji evkariontskih celic z mRNA, pripravljeno s transkripcijo *in vitro* (3). Leto kasneje je ista raziskovalna skupina potrdila tudi izražanje več poročevalskih genov po vnosu pripadajočih mRNA v mišje skeletne mišične celice *in vivo* (4). Od takrat je tehnologija terapevtikov na osnovi nukleinskih kislin močno napredovala: kopičilo se je znanje o potrebnih regulatornih elementih, ki vplivajo na biološko razpolovno dobo mRNA v celicah in na nivo izražanja kodiranega proteina, strukturnih modifikacijah, ki uravnavajo imunomodulatorne lastnosti eksogene mRNA, ter dostavnih sistemih. V zadnjem desetletju so številni raziskovalci pokazali, da vnos primerno izbranega genskega zapisa za proteinski antigen patogena intradermalno, subkutano ali intramuskularno izzove oblikovanje imunskega spomina, ki živali zaščiti pred okužbo, čemur je sledilo tudi vrednotenje varnosti in imunogenosti mRNA-cepiv na človeških prostovoljcih (2, 5).

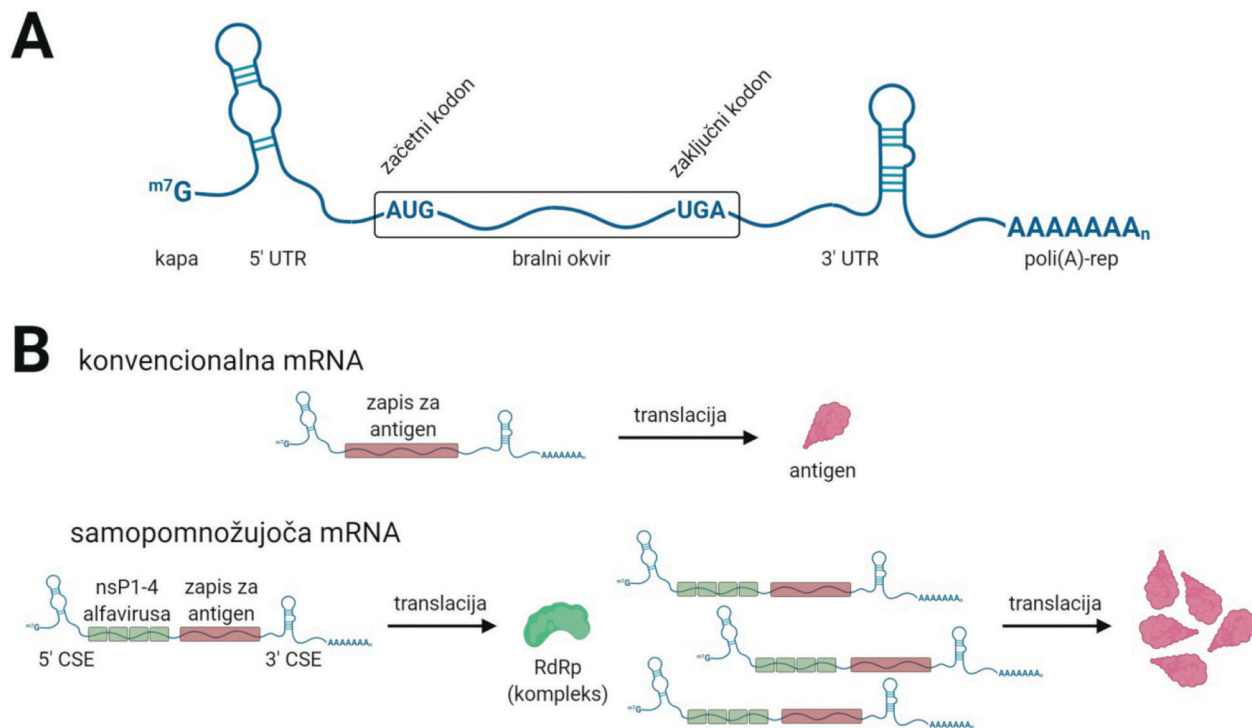
2 KAJ SO CEPIVA NA OSNOVI mRNA IN KAKO DELUJEJO?

Najenostavnejša mRNA-cepiva kot učinkovino vsebujejo mRNA, ki nosi zgolj genski zapis za proteinski antigen patogena. Zaradi kemijske in encimske nestabilnosti molekul RNA ter za doseganje učinkovitejše dostave v celice mRNA običajno vgradijo v lipidne nanodelce, redkeje nanodelce iz kationskih polimerov, ali tvorijo komplekse s pozitivno nabitimi proteini, kakršen je protamin (podpoglavje 3.3). mRNA sintetizirajo encimsko v procesu transkripcije *in vitro* na osnovi lineariziranega plazmida, ki nosi genski zapis za antigen pod nadzorom bakteriofagnega promotorja (T7, T3 ali SP6) (2, 5). Minimalne strukturne zahteve za mRNA so predstavljene na sliki 1A. Transkript posnema zrelo mRNA, kakršna se nahaja v citosolu evkariontskih celic, in je sestavljen iz bralnega okvirja (kodirajoče regije), ki ga obdajata neprevedeni regiji (*untranslated regions*, UTR), na 5'-koncu mRNA je prisotna kapa iz 7-metilgvanozina, povezanega s prvim nukleotidom prek 5'-trifosfatne skupine, na 3'-koncu pa rep iz 100 do 250 adenzinskih ostankov. Ti regulatorni neokodirajoči elementi ščitijo mRNA pred razgradnjo z nukleazami in so ključni za proces translacije (sinteze kodiranega proteina). Encimska sinteza mRNA je izjemno učinkovita (poročajo o donosih, višjih od 2 g mRNA/L), neodvisna od nukleotidnega zaporedja in njen obseg je mogoče razmeroma enostavno povečati (2). Način proizvodnje, ki za razliko od konvencionalnih vakcin na proteinski osnovi (atenuiranih, inaktiviranih in rekombinantnih proteinskih cepiv) ali virusnih vektorskih cepiv ne zahteva uporabe celičnih kultur ali jajc, omogoča hitro in cenovno ugodno pripravo učinkovine ter zagotavlja odsotnost vsakršnih kontaminantov, kot so virusi ali proteini ekspresijskega sistema. Po transkripciji *in vitro* matrično DNA razgradijo z DNazo, mRNA pa kromatografsko prečistijo, da odstranijo encime, proste nukleotide, fragmente DNA in nepopolno sintetizirano RNA. Sledi še sterilizacija s filtracijo in vgradnja v ustrezen dostavni sistem (2, 5). Poleg t. i. konvencionalnih mRNA-cepiv nekatera podjetja razvijajo tudi samopomnožujoča mRNA-cepiva (slika 1B, preglednica 1) (2, 6). Ta so osnovana na genomu alfavirusov in so kot taka pravzaprav vektorska cepiva, ki jih proizvajamo s transkripcijo *in vitro* ali pomnoževanjem in pakiranjem v virusne delce s pomočjo posebnih pakirnih celičnih linij, ki izražajo alfavirusne strukturne proteine. Pri načrtovanju samopomnožujočih mRNA-cepiv iz genoma alfavirusov odstranijo gene za strukturne proteine in jih nado-

mestijo z zapisom za želeni antigen, ohranijo pa regulatorne elemente (5'-kapa, 5'- in 3'-cis elemente (CSE) in poli(A)-rep) ter gene za nestrukturane proteine nsP1-4, ki tvorijo replikazni kompleks (od RNA odvisno RNA-polimerazo, *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp). Po vstopu v celico se tako najprej tvori RdRp, ki ustvari kopije virusnega vektorja, kar omogoča uporabo bistveno nižjih odmerkov cepiva in daljše izražanje antigena.

Ribonukleinske kisline so izrazito nestabilne molekule, kar zelo zaplete in posledično podraži logistiko (shranjevanje, transport in organizacijo) cepljenja s cepivi na osnovi mRNA. Osnovni razlog kemijske nestabilnosti RNA je nukleofilna narava hidroksilne skupine na položaju 2' riboze

(ta je v sicer strukturno sorodni molekuli DNA odsotna), ki – zlasti v alkalnem okolju, ko se deprotonira – napade fosforjev atom v sosednji fosfodiestrski vezi. Proces poteka predvsem na izpostavljenih 2'-hidroksilnih skupinah nestrukturirane (tj. enoverižne) RNA. Posledica je cepitev estrske vezi in nastanek 2',3'-cikličnega fosfatnega intermedija, ki hidrolizira do 2'- ali 3'-fosfata (7). Dolgoročno kemijsko stabilnost RNA v splošnem zagotavljamo s shranjevanjem RNA pri ekstremno nizkih temperaturah in nevtralnem pH ali z liofilizacijo. Izpopolnjene formulacije mRNA-cepiv lahko pomembno prispevajo k večji stabilnosti mRNA in ji hkrati nudijo zaščito pred hidrolizo z RNazami *in vivo* (8).



Slika 1: Močno poenostavljena struktura mRNA za vnos genskega zapisa za proteinski antigen (prirejeno po (6)). **A.** Splošni funkcijski elementi zrele evkariontske mRNA: 5'-kapa (7-metilgvanozin, m7G), 5'-neprevedena regija (5'-UTR), bralni okvir, ki ga omejujeta začetni in zaključni kodon, 3'-UTR in 3'-poliadenozinski (poli(A)) rep. **B.** Primerjava konvencionalnih in samopomnožujočih mRNA-cepiv. Prva nosijo le zapis za antigen, druga (osnovana na alfavirusnem vektorju) pa tudi gene za proteine nsP1-4, ki skupaj tvorijo replikazni kompleks, ki v celicah ustvarja kopije virusnega vektorja. CSE – cis-regulatorni element, RdRp – od RNA odvisna RNA-polimeraza. Sliko smo pripravili z BioRenderjem.

Figure 1: A simplified depiction of mRNA for delivery of genetic information encoding a protein antigen (adapted from (6)). **A.** General functional elements of mature eukaryotic mRNA: 5' cap (7-methyl guanosine, m7G), 5' untranslated region (UTR), open reading frame flanked by start and stop codons, 3' UTR and polyadenosine (poly(A)) tail. **B.** Comparison of conventional and self-amplifying mRNA vaccines. The former only encode an antigen, whereas the latter (based on alphavirus) in addition harbour genes encoding proteins nsP1-4 which form the replicase complex responsible for amplifying the viral vector. CSE – cis-acting element, RdRp – RNA-dependent RNA polymerase. Graphics made with BioRender.

Preglednica 1: Nekatere prednosti in pomanjkljivosti/slabosti konvencionalnih in samopomnožujočih mRNA-cepiv (povzeto po (9)).

Table 1: Advantages and disadvantages of conventional and self-amplifying mRNA vaccines (adopted from (9)).

Platforma	Prednosti	Pomanjkljivosti/slabosti
Konvencionalna in samopomnožujoča mRNA-cepiva	<ul style="list-style-type: none"> - encimska sinteza, ne uporabljamo jajc ali celičnih kultur za proizvodnjo - možnost hitre in obsežne proizvodnje - cepiva neinfektivna, ne prihaja do integracije v genom prejemne celice, razgradnja mRNA z endogenimi celičnimi mehanizmi - izražanje <i>in situ</i>: nativen proteinski antigen - aktivacija mehanizmov prirojene imunosti okrepi humoralno in celično imunost 	<ul style="list-style-type: none"> - nestabilnost RNA - v nekaterih primerih opažena nižja imunogenost pri ljudeh v primerjavi s poskusnimi živalmi (prenosljivost rezultatov; poglavje 4), nova tehnologija - vnetni proces zaradi sproščanja IFN tipa I - težave, povezane z učinkovito dostavo v celice
Konvencionalna mRNA-cepiva	<ul style="list-style-type: none"> - mRNA krajša v primerjavi s samopomnožujočo mRNA - možna vgradnja spremenjenih nukleozidov - neposredno izražanje antigena iz mRNA - imunski odziv proti vektorju ni prisoten 	<ul style="list-style-type: none"> - potrebni višji odmerki - izražanje antigena časovno krajše - morebitna toksičnost spremenjenih nukleotidov, nova tehnologija - višja cena in zapletena logistika cepljenja v primerjavi s »klasičnimi« (inaktiviranimi ali oslavljenimi) cepivi
Samopomnožujoča mRNA-cepiva	<ul style="list-style-type: none"> - močnejše in časovno daljše izražanje antigena - potrebni nižji odmerki - intrinzično adjuvantno delovanje - apoptoza transfeciranih celic vodi do okrepljenega prevzema proteinskih antigenov s strani APC in predstavljanja antigenov z MHC I - možnost dostave več antigenov z enim vektorjem 	<ul style="list-style-type: none"> - vnetni proces zaradi pomnoževanja vektorja - mRNA daljša v primerjavi s konvencionalnimi mRNA (težavnejša proizvodnja) - morebitna toksičnost proteinov nsP - možen imunski odziv proti vektorju

APC – antigen predstavljena celica, IFN – interferon, MHC – poglobitni kompleks tkivne skladnosti

2.1 PREVZEM mRNA IN SPROŠČANJE IZ ENDOSOMOV

RNA so velike in na račun fosfatnih skupin v sladkorno-fosfatnem ogrodju izrazito negativno nabite molekule, kar otežuje njihovo učinkovito dostavo v celice. Z mRNA-cepivi lahko transfeciramo antigen predstavljene celice, zlasti dendritične celice, *ex vivo* ali pa vakcino injiciramo neposredno, največkrat v mišično tkivo (2). Transfekcija dendritičnih celic *ex vivo* in njihova avtologna infuzija je oblika celičnega zdravljenja, ki jo razvijajo za boj proti rakavim boleznim, zato je v prispevku ne obravnavamo podrobno. mRNA-cepiva največkrat formulirajo v obliki nanodelcev (premera približno 100 nm) iz kationskih lipidov (2, 5). Ce-

lična površina je namreč negativno nabita; kationski lipidi tako omogočijo ne le nevtralizacijo negativnih nabojev na mRNA, temveč so ključnega pomena tudi za tvorbo elektrostatskih interakcij med celično površino in nanodelci ter za kasnejše sproščanje iz endosomov. Kationskim lipidom so praviloma dodani še naravni fosfolipidi, ki pomagajo pri tvorbi lipidnega dvosloja, holesterol kot stabilizator membran in na lipide vezan polietilenglikol (PEG) za izboljšanje koloidne stabilnosti nanodelcev (lipopleksov; podpoglavje 3.3) (5). Raziskave na živalih so pokazale, da sistemska aplikacija lipopleksov vodi do kopičenja mRNA v hepatocitih (na račun vezave na apolipoprotein E in posledične receptorsko posredovane endocitoze) (10), medtem ko subkutana, intradermalna in intramuskularna aplikacija zagota-

vljajo lokalno in nekoliko daljše izražanje kodiranih proteinov, kar je ugodno z vidika proženja imunskih odzivov (11, 12). Lipopleksi vstopajo v celice v zapletenem procesu endocitoze, pri čemer pride do uvihanja celične membrane, ki se odcepi in tvori endosomske vezikle. Ti zorijo in se zlivajo z lizosomi, ki dostavljajo presnovne hidrolitične encime, zato mora mRNA še pravočasno zapustiti endosome in vstopiti v citosol, s čimer se izogne razgradnji (5). Ni povsem jasno, kakšen je mehanizem sproščanja mRNA iz endosomov, a verjetno zajema zlitje membrane lipopleksa in sistema pogojuje učinkovitost transfekcije.

mRNA sama po sebi deluje imunostimulatorno, saj aktivira številne endosomske (TLR7 in TLR8) in citosolne receptorje (RIG-I in MDA-5) prirojene imunosti, kar vodi do sproščanja interferonov tipa I (IFN-I) in nekaterih drugih vnetnih citokinov (2, 13). Po eni strani je to dobrodošlo, saj aktivira antigen predstavitevne celice in okrepi imunski odziv proti kodiranemu antigenu, a interferonska signalizacija nespecifično zavre tvorbo proteinov v celicah, kar oslabi proces izražanja antigena. Nekatera cepiva na osnovi mRNA zato vsebujejo spremenjene nukleozide, ki so manj imunostimulatorni (podpoglavje 3.1). Samopomnoževalna mRNA-cepiva, ki se namnožujejo v celicah, seveda vsebujejo le običajne nukleotide, hkrati pa se med pomnoževanjem tvori dvovertična struktura RNA, ki je izrazito imunostimulatorna, zato imajo močan adjuvantni učinek (2). Proteini, ki tvorijo replikazni kompleks, za organizem predstavljajo neoantigene, zato lahko pride do imunskega odziva proti samemu vektorju, kar utegne voditi do manj učinkovitega imunskega odziva pri nadaljnjih cepljenjih z enako platformo, saj bi predhodno senzitivirani citotoksični limfociti uničili transfecirane celice, še preden bi te izdelale proteinski antigen cepiva.

2.2 TRANSLACIJA

mRNA se ne prenese v celično jedro (kot to velja za gensko informacijo DNA-vektorskih cepiv) in v citosolu vstopa neposredno v ribosome, ki na osnovi predstavljenega nukleotidnega zaporedja sintetizirajo polipeptidno verigo antigena. Čeprav v celice vnašamo tujo gensko informacijo, veljajo cepiva na osnovi mRNA z vidika insercijske mutageneze za nadvse varna, torej ni nikakršne možnosti za integracijo v genom. Antigen se zaradi takojšnjega začetka translacije tvori izjemno hitro in ker je sintetiziran *in situ*, je polipeptidna veriga pravilno zvita, protein je deležen vseh ustreznih posttranslacijskih modifikacij in je usmerjen na ustrezno mesto v celici (npr. v celično membrano) (2).

mRNA ima razmeroma kratko življenjsko dobo in se sčasoma razgradi, zato je izražanje antigena prehodne narave.

2.3 PROCESIRANJE IN PREDSTAVLJANJE ANTIGENA

mRNA-cepiva z izražanjem antigena neposredno v transfecirani celici posnemajo proces virusne okužbe (2). Mišične celice izdelajo kodiran virusni membranski protein in ga izrazijo na svoji površini, kjer ga zaznajo limfociti B (slika 2). Del nastalega antigena celice razgradijo s specializiranimi proteaznimi kompleksi v citosolu, imenovanimi proteasomi. Nastali peptidi se prenesejo v lumen endoplazemskega retikuluma, kjer se vežejo na poglavitni kompleks tkivne skladnosti I (MHC I), od tam pa z vezikularnim transportom potujejo prek Golgijevega aparata na celično površino. Antigenske peptide, vezane na MHC I, prepoznajo citotoksični limfociti T (CD8⁺). mRNA prvenstveno vstopa v antigen predstavitevne celice (dendritične celice in makrofage), ki so sposobne tudi alternativnega procesiranja antigenov (slika 2), pri čemer antigenske peptide izrazijo na MHC II. V tej obliki antigen zaznajo T-celice pomagalke (CD4⁺), ki uravnavajo aktivacijo in diferenciacijo limfocitov B in citotoksičnih limfocitov T. Upoštevajoč še imunomodulatorno delovanje same sintezne mRNA so mRNA-cepiva sposobna izzvati širok spekter imunskih odzivov.

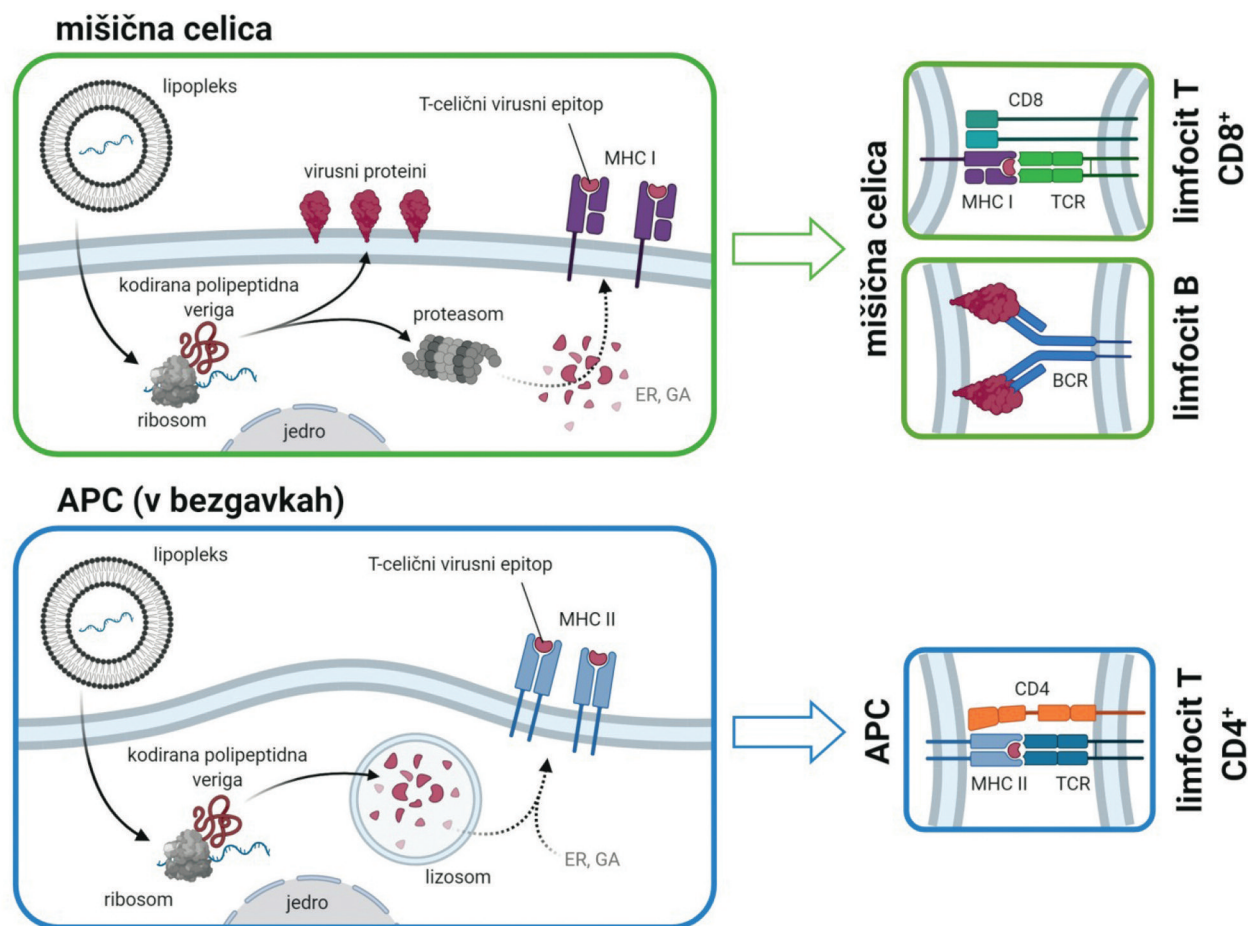
3 POMEMBNEJŠE INOVACIJE NA PODROČJU mRNA-CEPIV

Poglavitne težave, ki so ovirale klinični razvoj mRNA-cepiv, so nestabilnost RNA, neučinkovita dostava mRNA v celice in dejstvo, da transfekcija z eksogeno RNA lahko izzove vnetne procese. Optimizacija procesov formulacije, zlasti vgradnja mRNA v lipidne nanodelce, nudi zaščito RNA pred zunanjimi vplivi in omogoča učinkovito dostavo v celice, medtem ko z optimizacijo strukture mRNA lahko odločilno vplivamo na njeno zaznavanje s celičnimi receptorji prirojene imunosti in izboljšamo učinkovitost translacije *in vivo*.

3.1 OPTIMIZACIJA STRUKTURE mRNA

Endogena mRNA v jedru evkariontskih celic doživi posttranskripcijske modifikacije, kot sta pripenjanje 5'-kape in 3'-poli(A)-repa. Pri transkripciji *in vitro* je ta funkcionalna



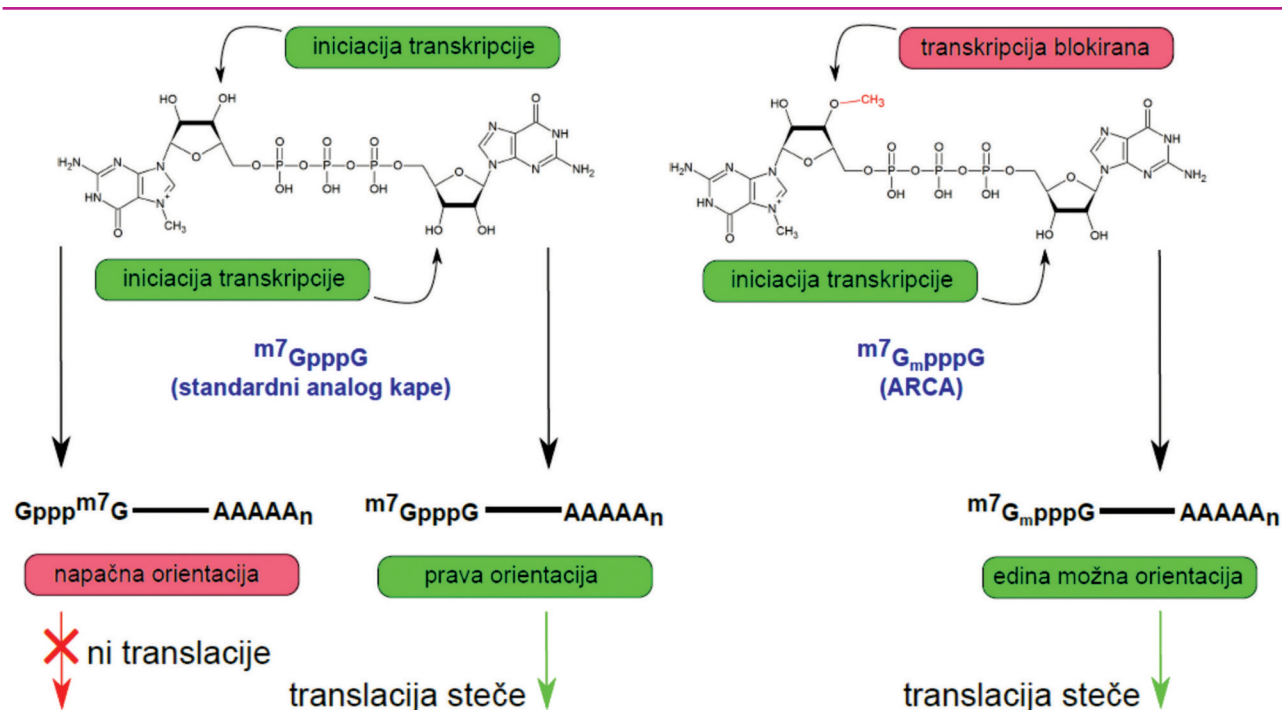


Slika 2: Procesiranje in predstavljanje antigenov po vstopu sintezne mRNA v celice (prirejeno po (14)). Zgoraj: Mišične celice na površini izražajo nativne membranske virusne proteine, ki jih prepoznajo limfociti B, in pripadajoče antigenske peptide (nastale pri razgradnji s proteasomom), vezane na poglavitni kompleks tkivne skladnosti I (MHC I), ki jih prepoznajo citotoksični limfociti T (CD8+). Spodaj: Antigen predstavitevne celice (APC) procesirajo proteinske antigene na enak način (ni prikazano), hkrati pa jih delno razgradijo tudi v endosomskih vezikliah. Antigenski peptidi se nato vežejo na MHC II in z vezikularnim transportom potujejo v celično membrano, kjer jih prepoznajo T-celice pomagalke (CD4+). BCR – B-celični receptor, ER – endoplazemski retikulum, GA – Golgijev aparat, TCR – T-celični receptor. Sliko smo pripravili z BioRenderjem.

Figure 2: Antigen processing and presentation after synthetic mRNA entry into cells (adapted from (14)). Upper panel: Muscle cells display native viral membrane proteins on their surface, allowing antigen recognition by B lymphocytes. A fraction of synthesized antigens is degraded in the cytosol by proteasomes and the resulting antigenic peptides are displayed on cell surface bound to type I major histocompatibility complex (MHC I), allowing recognition by cytotoxic lymphocytes T (CD8+). Lower panel: In addition to mechanisms of antigen processing described above (not shown) specialized antigen presenting cells also degrade proteins in endosomal vesicles. The antigenic peptides are bound to MHC II and transferred to cell surface via vesicular transport, where they are recognized by helper T cells (CD4+). BCR – B cell receptor, ER – endoplasmic reticulum, GA – Golgi apparatus, TCR – T cell receptor. Graphics made with BioRender.

elementa zrele mRNA potrebno dodati naknadno (2, 5). Kapo na 5'-konec sinteznih transkriptov dodajo encimsko (tj. z uporabo rekombinantnega encimskega kompleksa virusa vakcinije) ali pa že med transkripcijo uporabijo analoge kape (*anti-reverse cap analogue*, ARCA; slika 3), pri katerih je 3'-hidroksilna skupina 7-metilgvanozina metili-

rana, kar zagotavlja pravilno orientacijo kape (15). Tudi poli(A)-rep je mogoče dodati po zaključeni transkripciji z rekombinantnim encimom poli(A)polimerazo iz bakterije *E. coli*, a je bolj ekonomična uporaba matrične DNA z zapisom za dolgo zaporedje adenzinov, tako nastala mRNA pa ima tudi bolj definirano dolžino poli(A)-repa.



Slika 3: Transkripcija *in vitro* z uporabo standardnega analoga 7-metilgvanozinske kape (levo) in analoga ARCA (anti-reverse cap analogue; desno), katerega 3'-hidroksilna skupina je metilirana (povzeto po (16)). Če pri encimski sintezi uporabijo dinukleotid m7GpppG, približno polovica transkriptov nosi 5'-kapo v napačni orientaciji. Nanje se iniciacijski dejavnik translacije eIF-4E ne veže, zato je translacija *in vivo* bistveno manj učinkovita. Če uporabijo dinukleotid ARCA (m7GmpppG), nastanejo le transkripti s 5'-kapo ustrezne orientacije in učinkovitost translacije je visoka. **Figure 3:** *In vitro* transcription using the standard 7-methylguanosine cap analogue (left) and the anti-reverse cap analogue (ARCA; right) with 3' hydroxyl group methylated (adopted from (16)). If the standard dinucleotide m7GpppG is used in enzymatic synthesis, about a half of transcripts harbours the 5' cap in reverse orientation. As the translation initiation factor eIF-4E does not bind reverse capped products, the *in vivo* translation is fairly inefficient. On the other hand, the use of ARCA dinucleotide (m7GmpppG) leads to a single correctly capped product, significantly increasing the extent of translation.

Optimizacija kodirajočega zaporedja je smiselna z vidika uporabe pogostejših alternativnih kodonov za isti aminokislinski ostanek in odstranitev višjih struktur mRNA (kot posledice lokalnega zvitja, npr. tvorbe zank ali lasnic), kar pripomore k učinkovitosti procesa translacije (2, 5). 5'-UTR je vpletena v iniciacijo translacije, 3'-UTR pa uravnava stabilnost mRNA in obseg izražanja proteina. Pomembni dejavniki, ki določajo funkcionalnost neprevedenih regij, so nukleotidno zaporedje, dolžina in sekundarna struktura (2, 5), zato je racionalno načrtovanje teh funkcionalnih elementov nemogoče. Praviloma uporabijo neprevedene regije genov, za katere je znano, da povečajo stabilnost in okrepijo izražanje mRNA. Orlandini von Niessen in sodelavci (17) so pripravili knjižnico 3'-UTR dolgoživih mRNA in s poročevalskim celičnim testom izbrali več funkcijskih elementov, ki so omogočali do trikrat višjo produkcijo kodiranih proteinov *in vivo* v primerjavi s konvencionalno 3'-UTR iz človeškega gena za β -globin. Optimizacija izražanja antigena

je v vakciniranih miših pričakovano izzvala tudi močnejši imunski odziv.

Pomemben napredek pri optimizaciji delovanja mRNA-cepiv je tudi zmanjševanje imunostimulatornih lastnosti sintezne mRNA. Znano je, da določena, zlasti z uridinom bogata nukleotidna zaporedja v RNA aktivirajo t. i. vzorčno prepoznavne receptorje TLR7 in TLR8 (18, 19), zato z zamenjavo uridinov za njegove analoge, ki se sicer naravno pojavljajo v RNA kot posledica posttranskripcijskih modifikacij (kot sta pseudouridin ali N1-metilpseudouridin), lahko močno omejijo vnetne procese po vakcinaciji z mRNA in omogočijo boljše izražanje antigena.

3.2 OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE mRNA

Uvedba 5'-kape in 3'-poli(A)-repa med postopkom transkripcije *in vitro* (podpoglavje 3.1) je stroškovno učinkovita,



ker ne zahteva ločenih encimskih reakcij z vmesno izolacijo in čiščenjem RNA s precipitacijo. Tako so izgube med procesom proizvodnje učinkovine manjše. Končno čiščenje sintezne mRNA s HPLC je potrebno za odstranitev nečistot, ki izhajajo iz encimske sinteze; zlasti je problematična dvoverižna RNA, ki aktivira receptorja TLR3 in RIG-I. Čiščenje s HPLC ima omejeno kapaciteto, zato so Baidersdorfer in sodelavci razvili alternativni način čiščenja, ki je osnovan na selektivni adsorpciji dvoverižne RNA na celulozo (20). Metoda je enostavna, cenovno zelo ugodna in učinkovita primerljivo s HPLC.

3.3 OPTIMIZACIJA DOSTAVNIH SISTEMOV ZA mRNA

Ustrezna formulacija mRNA je osrednjega pomena tako za učinkovito dostavo *in vivo* kot za zagotavljanje stabilnosti cepiva, obenem pa mora biti dostavni sistem biokompatibilen in netoksičen. Verjetno največji napredek pri razvoju mRNA-cepiv beležimo ravno na področju razvoja dostavnih sistemov (21), a so podrobnosti (kvantitativna sestava in način formulacije) poslovna skrivnost proizvajalcev cepiv. V obeh odobrenih mRNA-cepivih proti SARS-CoV-2 (preglednica 2) je mRNA, ki kodira virusni protein S, vgrajena v lipidne nanodelce, ki vsebujejo kationske lipide (ALC-0315 (((4-hidroksibutil)azandiil)bis(heksan-6,1-diil)bis(2-heksildekanoat); Comirnaty (Pfizer/BioNTech)) ali SM-102 (heptadekan-9-il 8-((2-hidroksietil)(6-okso-6-(deciloksi)heksil); COVID-19 Vaccine Moderna (Moderna)), ob tem pa še PEGilirane lipide (ALC-0159 (2-[PEG-2000]-N,N-ditetradecilacetamid; Comirnaty) ali PEG2000 DMG (1,2-dimiristol-*rac*-glicero-3-metoksiPEG-2000; COVID-19 Vaccine Moderna) ter DSPC (1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin) in holesterol. Nekatera od mRNA-cepiv, ki so do sedaj dosegla fazo predkliničnega in zgodnjega kliničnega razvoja, so slonela tudi na uporabi protamina, amfipatičnih peptidov, ki prehajajo lipidne membrane, ali kationskih polimerov (npr. polietilenimina, PEI) (21). Ker je PEI razmeroma citotoksičen, ga zamenjujejo za acilirane analoge (npr. funkcionalizirane s stearinsko kislino), ki izkazujejo boljši varnostni profil (npr. (22)). Zelo obetaven dostavni sistem predstavljajo tudi oligo(karbonat-*b*- α -amino estri), t. i. CART (*charge-altering releasable transporters*). Ti kot kationski polimeri sprva tvorijo nekvalentne komplekse z mRNA, ki učinkovito vstopajo v celice, ob spontani razgradnji do nevtralnih amidov v endosomih pa izgubijo pozitiven naboj in tako olajšajo sproščanje mRNA v citosol (23).

4 KLINIČNE IZKUŠNJE S CEPIVI NA OSNOVI mRNA

Cepiva na osnovi mRNA niso popolna novost, saj prva klinična raziskava s konvencionalnim mRNA-cepivom sega v leto 2013, že pred tem pa so človeškim prostovoljcem injicirali tudi samopomnožujočo alfavirusno RNA, pakirano v virusne delce (preglednica 2). Dosegljiva poročila kliničnih raziskav potrjujejo varnost takšnih profilaktičnih vakcin, vendar pa imunogenosti, ki so jo potrdili v predkliničnih raziskavah, niso vselej opazili tudi pri človeških prostovoljcih. V kliničnih raziskavah prve faze, v katerih so vrednotili varnost in imunogenost mRNA-cepiv s spremenjenimi nukleotidi, formuliranih v obliki lipidnih nanodelcev, proti virusu gripe sevov H10N8 (NCT03076385) in H7N9 (NCT03345043) (24), so v nasprotju s poskusi na živalih (miših, dihurjih in makakih) po cepljenju ljudi zabeležili razmeroma šibko in kratkotrajno imunost. Zanimiva so tudi opažanja iz klinične raziskave prve faze, v kateri so vrednotili imunogenost mRNA-cepiva z nespremenjenimi nukleotidi v kompleksu s protaminom proti steklini (NCT02241135) (25). Cepivo je po intradermalnem injiciranju uspešno zaščitilo miši pred okužbo ter izzvalo močan in dolgotrajen imunski odziv pri prašičih (26). Človeškim prostovoljcem so cepivo injicirali intramuskularno ali intradermalno, bodisi z uporabo brizg in igel ali z brezigelnim injektorjem. Nepričakovano so le prostovoljci, vakcinirani z brezigelnim injektorjem, razvili nevtralizirajoča protitelesa, a je bil imunski odziv razmeroma variabilen in je izzvenel po enem letu (25). Ta opažanja nakazujejo, da obstajajo pomembne medvrstne razlike v imunogenosti mRNA-cepiv, ki so verjetno posledica razlik v zaznavanju eksogene mRNA ali komponent dostavnih sistemov z receptorji nespecifične imunosti, ob tem pa velja veliko pozornost v kliničnih raziskavah posvetiti ne le višini odmerka in časovnim intervalom med ponovljenimi cepljenji, temveč tudi načinu aplikacije.

Največ podatkov o učinkovitosti in varnosti mRNA-cepiv so seveda zbrali za obe pogojno že odobreni cepivi proti virusu SARS-CoV-2. Obsežni klinični raziskavi tretje faze sta zajeli tudi starejše odrasle, ljudi z raznolikim genetskim ozadjem (etnično poreklo) in bolnike z boleznimi, ki so znan dejavnik tveganja za hujši potek covid-19 (astma, kronične pljučne bolezni, indeks telesne mase ≥ 30 , sladkorna bolezen, hipertenzija). Učinkovitost cepiv (zaščita pred covid-19) je ocenjena na visokih 95 % (95-odstotni interval zaupanja: 90,0–97,9; Comirnaty (Pfizer/BioNTech) (27)) oz.

94,1 % (95-odstotni interval zaupanja: 89,3–96,8; COVID-19 mRNA Vaccine (Moderna) (28)). Tudi če je pri cepljenih posameznikih prišlo do okužbe s SARS-CoV-2, je bolezen potekala v blagi obliki. Med zdravimi prostovoljci in kroničnimi bolniki bistvenih razlik v učinkovitosti cepiv niso opazili, podobno velja za različne starostne skupine. Reaktogenost je bila nekoliko bolj izražena pri mlajših udeležencih klinične raziskave, neželeni učinki so bili pretežno blagi in so hitro izzveneli. Najpogosteje so poročali o bolečinah na mestu vnosa cepiva, utrujenosti, glavobolu, bolečinah v mišicah ali sklepah in pireksiji. Pri redkih prostovoljcih (4/21.720 (NCT04368728); 3/15.210 (NCT04470427)), ki so prejeli cepivo (in pri enem udeležencu iz skupine, ki je prejela placebo (1/15.210 (NCT04470427)) se je pojavila prehodna paraliza obraznega živca (Bellova pareza), po začetku množičnega cepljenja pa poročajo o sicer izjemno redkih alergijskih reakcijah. Pri tem velja izpostaviti, da aler-

gijske bolezni dihal in kože, anafilaksija po pikih žuželk, hrani ali zdravilih niso kontraindikacije za cepljenje s tema cepivoma (29). Cepijo se lahko tudi imunokompromitirani posamezniki in bolniki, ki prejemajo imunosupresivna zdravila, a je učinkovitost cepljenja pri teh verjetno nižja. Pregled dosedanjih kliničnih vrednotenj profilaktičnih cepiv na osnovi mRNA proti nalezljivim boleznim je zbran v preglednici 2. Večina raziskav zajema uporabo mRNA, ki po cepljenju izzovejo nastajanje enega ali več (gliko)proteinskih antigenov virusnih patogenov in s tem sprožijo aktivno imunizacijo proti povzročitelju nalezljive bolezni. Nasprotno v eni manjši klinični raziskavi prve faze vrednotijo varnost, farmakokinetiko in farmakodinamiko mRNA, ki kodira nevtralizacijsko monoklonsko protitelo (CHKV-24), usmerjeno proti virusu čikungunje. V tem primeru ne govorimo o cepivu, temveč posegajo po drugačni terapevtski strategiji, t. i. pasivni imunizaciji.

Preglednica 2: Pregled kliničnih raziskav profilaktičnih mRNA-cepiv proti nalezljivim boleznim (vir: clinicaltrials.gov).

Table 2: Clinical trials of prophylactic mRNA vaccines for infectious diseases (source: clinicaltrials.gov).

Patogen	Učinkovina/ formulacija	Režim	Začetek klinične raziskave	Število udelež.	Podjetje	Status klinične raziskave	Faza kliničnega vrednotenja, identifikacijska številka
HIV-1	AVX101, alfavirusna RNA, ki kodira protein Gag virusa HIV- 1, pakirana v virusne delce	10 ⁵ –10 ⁸ virusnih delcev, s. c., en odmerek, primerjava s placebom	2004	96	AlphaVax	zaključena	faza I (NCT00097838) (30)
Virus gripe A/Wyoming/ 03/2003	AVX502, alfavirusna RNA, ki kodira hemaglutinin virusa gripe A/Wyoming/ 03/2003, pakirana v virusne delce	2 × 10 ⁷ ali 2 × 10 ⁸ virusnih delcev, s. c. ali i. m., en ali dva odmerka, razporejena na tedna 0 in 8, primerjava s placebom	2007 2008	216 28	AlphaVax	zaključena	faza I/II (NCT00440362) faza I/II (NCT00706732) (31)
CMV	AVX601, alfavirusna RNA, ki kodira glikoprotein gB in fuzijski protein pp65/IE1 CMV, pakirana v virusne delce	2 × 10 ⁷ ali 2 × 10 ⁸ virusnih delcev, s. c. ali i. m., trije odmerki, razporejeni na tedne 0, 8 in 24, primerjava s placebom	2007	40	AlphaVax	zaključena	faza I (NCT00439803) (31, 32)



Virus stekline	mRNA CV7201, ki kodira glikoprotein RABV-G, kompleksirana z bazičnim proteinom protaminom	80–640 µg, i. m. ali i. d., odmerki razporejeni na dneve 0-7-28, 0-28 ali 0-28-56	2013	101	CureVac	zaključena	faza I (NCT02241135) (25)
Virus stekline	nekodirajoča RNA CV8102 kot adjuvant (agonist receptorjev TLR 7/8 in aktivator signalne poti RIG I), kompleksirana z majhnim kationskim peptidom CR12C	25–250 µg, i. m., samostojno ali v kombinaciji z inaktiviranim cepivom (Rabipur), odmerka razporejena na dneva 0 in 21	2014	72	CureVac	zaključena	faza I (NCT02238756) (33)
Virus gripe H10N8	mRNA-1440 (VAL-506440), ki kodira hemaglutinin 10, vgrajena v lipidne nanodelce	25–400 µg, i. m. ali i. d., odmerka razporejena na dneva 0 in 21, primerjava s placebom	2015	201	Moderna	zaključena	faza I (NCT03076385) (12, 24)
Virus zika	mRNA-1325, ni podatka o formulaciji	ni podatka o odmerjanju, primerjava s placebom	2016	90	Moderna	zaključena	faza I/II (NCT03014089)
Virus gripe H7N9	mRNA-1851 (VAL-339851), ki kodira hemaglutinin 7, vgrajena v lipidne nanodelce	10–50 µg, i. m., primerjava s placebom	2017	156	Moderna	zaključena	faza I (NCT03345043) (12, 24)

CMV	mRNA-1647* ali mRNA-1443, vgrajena v lipidne nanodelce	30–300 µg, odmerki razporejeni na mesece 0, 2 in 6, primerjava s placebom	2017	181	Moderna	zaključena	faza I (NCT03382405)
Virus stekline	mRNA CV7202, ki kodira glikoprotein RABV-G, vgrajena v lipidne nanodelce	naraščajoči odmerki, i. m., en ali dva odmerka (na dneva 0 in 28), primerjava z inaktiviranim cepivom (Rabipur)	2018	53	CureVac	v teku	faza I (NCT03713086)
Virusa hMPV in PIV3	mRNA-1653 (dve različni mRNA), ki kodirata proteina paramiksovirusov, vgrajeni v lipidne nanodelce	ni podatka o odmerjanju (dve roki: odrasli in otroci; primerjava s placebom)	2019	114	Moderna	v teku (poteka novačenje prostovoljcev)	faza Ib (NCT04144348)
Virus zika	mRNA-1893, ki kodira strukturni protein prME (tvori VLP), vgrajena v lipidne nanodelce	10–250 µg, i. m., odmerka razporejena na dneva 0 in 28, primerjava s placebom	2019	120	Moderna	zaključena	faza I (NCT04064905)
Virus čikungunje	mRNA-1944, ki kodira protitelo (CHKV-24), usmerjeno proti virusu čikungunje (<u>pasivna imunizacija</u>), vgrajena v lipidne nanodelce	naraščajoči odmerki, i. v. (infuzija), primerjava s placebom	2019	39	Moderna	v teku	faza I (NCT03829384)



CMV	mRNA-1647* (šest različnih mRNA), ki kodirajo membranski pentamerni kompleks in glikoprotein gB CMV, vgrajene v lipidne nanodelce	50–150 µg, odmerki razporejeni na mesece 0, 2 in 6, primerjava s placebom	2020	452	Moderna	v teku (poteka novačenje prostovoljcev - tako seropozitivnih kot seronegativnih - dve roki)	faza II (NCT04232280)
SARS-CoV-2	mRNA BNT162b2 (in druge), ki kodirajo protein Sp ali RBD, vgrajene v lipidne nanodelce	10–100 µg, i. m., odmerki razporejeni na dneva 0 in 21, primerjava s placebom	2020/2021	144 456 120 160 960 43998 4644 (otroci, 5-12 let) 4000 (nosečnice 18 let in več)	Pfizer/ BioNTech	v teku v teku v teku v teku v teku v teku (poteka novačenje prostovoljcev) v teku (poteka novačenje prostovoljcev) v teku (poteka novačenje prostovoljk)	faza I (NCT04523571) faza I/II (NCT04380701) (34) faza I/II (NCT04537949) faza I/II (NCT04588480) (35) faza II (NCT04649021) faza II/III (NCT04368728) (27) faza I/II/III (NCT04816643) faza II-III (NCT04754594)
pogojna odobritev COMIRNATY							



SARS-CoV-2	mRNA-1273, ki kodira protein Sp, vgrajena v lipidne nanodelce	25–250 µg, i. m., odmerki razporejeni na dneva 0 in 28, primerjava s placebom	2020/2021	120	Moderna	v teku	faza I (NCT04283461) (36, 37)
				600		v teku	faza IIa (NCT04405076)
				30000		v teku	faza III (NCT04470427) (28)
				3000 (otroci 12-18 let)		v teku	faza II/III (NCT04649151)
				7050 (otroci 0,5-12 let)		v teku (poteka novačenje prostovoljcev)	faza II/III (NCT04796896)
pogojna odobritev COVID-19 Vaccine Moderna							
SARS-CoV-2	mRNA CVnCoV, ki kodira protein Sp, vgrajena v lipidne nanodelce	6–12 µg, i. m., odmerka razporejena na dneva 0 in 28 (+180), primerjava s placebom (tudi cepivoma proti hepatitisu A ali pnevmokokom)	2020/2021	280	CureVac	v teku	faza I (NCT04449276)
				660		v teku	faza II (NCT04515147)
				36500		v teku	faza IIb/III (NCT04652102)
				2520		v teku (poteka novačenje prostovoljcev)	faza III (NCT04674189)

CMV – citomegalovirus, hMPV – človeški metapneumovirus, i.d. – intradermalno, i.m. – intramuskularno, i.v. – intravensko, PIV3 – virus parainfluenze tipa 3, protein Sp – predfuzijska oblika proteina S (spike), RBD – receptor vezavna domena proteina S, s.c. – subkutano, VLP – virusu podobni delci (virus-like particles)

5 SKLEP

Cepiva na osnovi mRNA predstavljajo eno najobetavnejših platform, saj zaradi možnosti hitre in obsežne proizvodnje, neodvisne od strukture kodiranega proteinskega antigena, omogočajo izjemno hiter odziv na grožnje novih patogenov in jih je moč razmeroma enostavno prilagajati potencialnim mutacijam, ki spremljajo širitev patogenov v populaciji. Kljub izjemnemu napredku pri razvoju mRNA-cepiv proti infektivnim in rakavim boleznim v zadnjih dveh desetletjih ostaja nekaj pomembnih vprašanj odprtih. Tako trenutno ni znano, ali posamezni formati mRNA-cepiv (npr. modifikacije 5'-kape in regulatornih regij mRNA, uporaba spremenjenih nukleozidov) sprožajo različne vrste imunskih odzivov oz. ali so primernejši za določen nabor terapevtskih aplikacij. Ključnega pomena bo razumevanje imunostimulatornih učinkov same sintezne mRNA, ki prek indukcije sproščanja citokinov in kemokinov domnevno pomembno vpliva na obseg in kakovost odzivov limfocitov T in B z aktivacijo in novačenjem različnih celic imunskega sistema (21). Življenjska doba mRNA *in vivo* ter nivo izražanja antigena (kar pomembno določa tudi interferonski odziv) pomembno vplivata na kinetiko in obseg predstavljanja antigenskih peptidov na MHC I in MHC II (21). Rezultati nedavnih raziskav na živalih nakazujejo, da mRNA-cepiva s spremenjenimi nukleotidi, formulirana v obliki lipidnih nanodelcev, izzovejo močan odziv folikularnih T-celic pomagalk in limfocitov B v germinalnih centrih bezgavk, kar vodi do robustne tvorbe nevtralizacijskih protiteles (38, 39). Manj je podatkov o tem, kako spremenjeni nukleotidi v mRNA-cepivih vplivajo na odziv citotoksičnih limfocitov T. Znano je, da nespremenjena mRNA izzove robustne odzive citotoksičnih limfocitov T proti tumorskim antigenom (40, 41), a v tovrstnih raziskavah praviloma ne spremljajo humoralnega imunskega odziva. V prihodnosti si obetamo tudi nadaljnji napredek v razvoju dostavnih sistemov, s čimer bi npr. selektivno transfecirali posamezne vrste celic *in vivo*, povečali stabilnost cepiv (omogočili enostavnejše shranjevanje) in optimizirali njihov imunomodulatorni učinek.

6 LITERATURA

1. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines [Internet]. WHO; 2021 [cited 2021 May 25]; Available from:

- <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Apr;17(4):261-79.
 - Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(16):6077-81.
 - Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8.
 - Gomez-Aguado I, Rodriguez-Castejon J, Vicente-Pascual M, Rodriguez-Gascon A, Solinis MA, Del Pozo-Rodriguez A. Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 Feb 20;10(2).
 - Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther*. 2020 Oct 22.
 - Mikkola S, Lonnberg T, Lonnberg H. Phosphodiester models for cleavage of nucleic acids. *Bellstein J Org Chem*. 2018;14:803-37.
 - Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the cold reality of mRNA vaccine stability. *J Pharm Sci*. 2021 Mar;110(3):997-1001.
 - Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Mol Ther*. 2019 Apr 10;27(4):757-72.
 - Akinc A, Querbes W, De S, Qin J, Frank-Kamenetsky M, Jayaprakash KN, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther*. 2010 Jul;18(7):1357-64.
 - Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015 Nov 10;217:345-51.
 - Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychev A, Brito LA, Hassett KJ, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol Ther*. 2017 Jun 7;25(6):1316-27.
 - Iavarone C, O'Hagan D T, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017 Sep;16(9):871-81.
 - Ciaramella G. Shedding light on our prophylactic vaccines' mechanism of action [Internet]. Moderna; 2017 [cited 2021 May 25]; Available from: <https://www.modernatx.com/moderna-blog/shedding-light-our-prophylactic-vaccines-moa>.
 - Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *RNA*. 2001 Oct;7(10):1486-95.
 - Organic Chemistry > Organic Molecules > Biomolecules > RNA > RNA processing > Capping [Internet]. [cited 2021 May 25]; Available from: <https://sites.google.com/site/learnorganicchem/organic-molecules/biomolecules/rna/rna-processing>.
 - Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol Ther*. 2019 Apr 10;27(4):824-36.
 - Diebold SS, Massacrier C, Akira S, Paturel C, Morel Y, Reis e Sousa C. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol*. 2006 Dec;36(12):3256-67.
 - Forsbach A, Samulowitz U, Volp K, Hofmann HP, Noll B, Tluk S, et al. Dual or triple activation of TLR7, TLR8, and/or TLR9 by

- single-stranded oligoribonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2011 Dec;21(6):423-36.
20. Baiersdorfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, et al. A facile method for the removal of dsRNA contaminant from in vitro-transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Apr 15;15:26-35.
 21. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol.* 2020 Aug;65:14-20.
 22. Zhao M, Li M, Zhang Z, Gong T, Sun X. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Deliv.* 2016 Sep;23(7):2596-607.
 23. McKinlay CJ, Vargas JR, Blake TR, Hardy JW, Kanada M, Contag CH, et al. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jan 24;114(4):E448-E56.
 24. Feldman RA, Fuhr R, Smolenov I, Mick Ribeiro A, Panther L, Watson M, et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine.* 2019 May 31;37(25):3326-34.
 25. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet.* 2017 Sep 23;390(10101):1511-20.
 26. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jun;10(6):e0004746.
 27. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020 Dec 31;383(27):2603-15.
 28. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med.* 2020 Dec 30.
 29. Košnik M, Avčin T, Zidar M. Stališča glede obravnave alergijskih boleznih med covid epidemijo [Internet]. NIJZ; 2021 [cited 2021 May 25]; Available from: https://www.njz.si/sites/www.njz.si/files/uploaded/alergoloska_staliska_covid_feb_2021.pdf.
 30. Wecker M, Gilbert P, Russell N, Hural J, Allen M, Pensiero M, et al. Phase I safety and immunogenicity evaluations of an alphavirus replicon HIV-1 subtype C gag vaccine in healthy HIV-1-uninfected adults. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Oct;19(10):1651-60.
 31. Mogler MA, Kamrud KI. RNA-based viral vectors. *Expert Rev Vaccines.* 2015 Feb;14(2):283-312.
 32. Bernstein DI, Reap EA, Katen K, Watson A, Smith K, Norberg P, et al. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine.* 2009 Dec 11;28(2):484-93.
 33. Doener F, Hong HS, Meyer I, Tadjalli-Mehr K, Daehling A, Heidenreich R, et al. RNA-based adjuvant CV8102 enhances the immunogenicity of a licensed rabies vaccine in a first-in-human trial. *Vaccine.* 2019 Mar 22;37(13):1819-26.
 34. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature.* 2020 Oct;586(7830):594-9.
 35. Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature.* 2020 Oct;586(7830):589-93.
 36. Anderson EJ, Roupael NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2020 Dec 17;383(25):2427-38.
 37. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary report. *N Engl J Med.* 2020 Nov 12;383(20):1920-31.
 38. Lindgren G, Ols S, Liang F, Thompson EA, Lin A, Hellgren F, et al. Induction of robust B cell responses after influenza mRNA vaccination is accompanied by circulating hemagglutinin-specific ICOS+ PD-1+ CXCR3+ T follicular helper cells. *Front Immunol.* 2017;8:1539.
 39. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, Parkhouse K, Cain DW, Jones L, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med.* 2018 Jun 4;215(6):1571-88.
 40. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Lower M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature.* 2015 Apr 30;520(7549):692-6.
 41. Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature.* 2016 Jun 16;534(7607):396-401.



NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

NAPREDNE KLINIČNE STORITVE V LEKARNAH – HITRI TESTI

Doc. dr. Nejc Horvat, asist. dr. Urška Nabergoj
Makovec, asist. dr. Jasna Omersel

Hitri testi niso novost, temveč so že več desetletij prisotni v laboratorijski medicini. Izvajajo se izven medicinskih laboratorijev kot testiranje ob preiskovancu, t. i. *point of care test* (POCT), saj omogočajo hitro pridobljen rezultat, ki lahko neposredno vpliva na postavitve diagnoze, napoved zdravstvenega izida ali spremljanje zdravljenja. Mnoge pa uporabljamo kot teste za samotestiranje (npr. test nosečnosti, merjenje glukoze z glukometrom).

Napredne klinične storitve v lekarnah, ki ponujajo testiranje ob preiskovancu za presejanje in nadzor bolezni, so razširjene predvsem v ZDA, kjer lekarne ponujajo širok nabor možnih testov ob preiskovancu. Rezultati ankete Farmaceutске skupine Evropske unije (PGEU) so pokazali, da 77 % lekarn izvaja merjenje glukoze v krvi in 73 % merjenje holesterola (1).

Skozi primer študije iz Severne Irske je razviden potencial racionalizacije predpisovanja antibiotikov ob podpori uporabe hitrih testov za C-reaktivni protein (CRP) in streptokok A (2). Storitve je potekala v petih zunanjih lekarnah, s podporo lokalnih zdravnikov, farmacevti so bili deležni izobraževanja za izvedbo hitrih testov. Vključeni so bili pacienti s simptomi kašlja, prehlada ali gripe. Pacientom s produktivnim kašljem so pomerili CRP v kapilarni krvi. Tisti, ki so imeli visoko koncentracijo CRP (nad 80 mg/L), so bili napoteni k zdravniku za nadaljnjo obravnavo. Pacientom, ki so imeli vneto grlo, pa so ponudili test za streptokok A. Na podlagi pozitivnega rezultata je farmacevt izdal antibiotik. Od 425 vključenih pacientov jih je bilo le 14 pozitivnih na

streptokok A in so prejeli antibiotike. Od 286 pacientov s produktivnim kašljem sta le 2 imela CRP nad 80 mg/L. Tema je zdravnik predpisal antibiotike. Med pacienti, ki jih niso napotili k zdravniku, jih je 50 kljub temu odšlo k zdravniku. 49 od tega jih je dobilo antibiotike navkljub odsotnosti kliničnih indicev, kar kaže na močno usidrano navado predpisovanja antibiotikov. Glede na enako obdobje v prejšnjem letu se je predpisovanje antibiotikov v povprečju znižalo za kar 45 %.

Vsi udeleženci so izkazovali zadovoljstvo s storitvijo in željo, da se jo implementira na nacionalni ravni. Prihranke storitve, v katero je bilo vključenih 425 pacientov, so ocenili na približno £ 3800, pri čemer so upoštevali tudi stroške opreme, materiala in izobraževanja (2).

Vira:

1. PGEU. *Annual report 2017: Measuring health outcomes in community pharmacy*. Brussels; 2017.
2. Kulwicki BD, Brandt KL, Wolf LM, Weise AJ, Dumkow LE. *Impact of an emergency medicine pharmacist on empiric antibiotic prescribing for pneumonia and intra-abdominal infections*. *Am J Emerg Med*. 2019 May;37(5):839-844. doi: 10.1016/j.ajem.2018.07.052.

NANOTEHNOLOGIJA IN CEPIVA PROTI KORONAVIRUSU

Izr. prof. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ste vedeli, da ima nanotehnologija zelo pomembno vlogo pri razvoju mRNK-cepiv proti novemu koronavirusu? mRNA-cepiva proizvajalcev BioNTech/Pfizer in Moderne namreč vsebujejo lipidne nanodelce, v katere je vključena informacijska ribonukleinska kislina (mRNK), ki predstavlja navodila za izdelavo proteina virusa SARS-CoV-2, ki povzroča covid-19. Sama mRNA je sicer zelo nestabilna molekula, ki se hitro razgradi z ribonukleazami, ki so prisotne v zunajceličnem okolju. Poleg tega, da lipidni nanodelci prispevajo k stabilnosti mRNA, predstavljajo tudi dostavni sistem, ki omogoča, da lahko molekule vstopijo v celice. mRNA je namreč velika molekula z negativnim nabojem, zato je njeno prehajanje membran oteženo. Po intramuskularni aplikaciji lipidni nanodelci omogočajo sprejem mRNA v celice gostitelja in dostavo v citosol, kjer v ribosomih pride do translacije sekvence mRNA v protein, ki se sicer nahaja na površini virusa. Lipidni nanodelci imajo premer 60 do 100 nm in vsebujejo štiri glavne sestavine: fosfolipid, holesterol, pegiliran lipid in kationski lipid. Slednji



vsebuje amino skupine, ki stopajo v interakcije z anionskimi skupinami mRNK, tako da so lipidi prisotni tudi v notranjosti nanodelcev, za razliko od liposomov, pri katerih je v notranjosti voda. Trenutna pomanjkljivost mRNK-cepiv je potreba po shranjevanju pri nizkih temperaturah (Moderna: med -15 in -25 °C; BioNTech/Pfizer: med -60 in -90 °C), kar otežuje njihov transport. Njihova prednost pa je zagotovo relativno hiter razvoj, saj mRNK-lipidni nanodelci predstavljajo tehnološko platformo, kar pomeni, da proces izdelave novih mRNK-cepiv poteka po enakem postopku.

Vira:

1. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, Crommelin DJA. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm.* 2021 May 15;601:120586. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.
2. Thi TTH, Suys EJA, Lee JS, Nguyen DH, Park KD, Truong NP. Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel).* 2021 Apr 8;9(4):359. doi: 10.3390/vaccines9040359.



DRUŠTVENA NOVICA

Član Slovenskega farmacevtskega društva, zaslužni prof. dr. Franc Kozjek, mag. farm., je bil mnogim generacijam farmacevtov v Sloveniji profesor na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, a nekaterim našim članom je dobro poznan tudi kot ljubitelj likovne umetnosti in lastnik bogate zbirke slik. Po diplomi na Farmaceutski fakulteti v Zagrebu in doktoratu na Medicinsko-farmaceutski fakulteti v Lyonu je na univerzitetnem študiju farmacije v Ljubljani uvajal nove vsebine in jih je podprl tudi z ustreznimi učbeniki. Izredno piščo tudi po upokojitvi ni počival. Leta 2019 je tako v samozaložbi izdal knjigo »Od slike do zbirke«. Kot lastnik preko 200 likovnih del 150-ih avtorjev vseh ni mogel predstaviti v eni knjigi, zato je letos izdal še nadaljevanje. Tudi v novi knjigi spominov na srečanja z likovnimi umetniki »Od slike do zbirke II« se avtor pogablja v sliko, jo razume

Izšel je drugi del spominov prof. dr. Franca Kozjeka na srečanja z likovnimi umetniki.



200 strani zanimivega branja.

*Cena **24,99 €***

*Seniorji in študenti **15,00 €***

Naročila na: franc.kozjek@telemach.net ali tel. 031 598 058

in razloži. Vsak opis je zgodba zase. Tista, ki je obogatena z obiskom slikarja, ima še dodatno vrednost. V vsaki čutimo slikarjevo dušo in njegovo pripoved, kar je avtor spretno prepletel v komentar k posamezni sliki iz zbirke.





Pot do zdravja

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

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si

