

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1





Roche

Praznujmo prihodnost.
Praznujmo življenje.

Roche praznuje 125 let.

Obiščite našo spletno stran www.roche.si

125 YEARS
Celebrate Life

25 let v Sloveniji



STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1 | marec 2022 | letnik 73

ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočever Glavač

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

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

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

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

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

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

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

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

Na osnovi epidemioloških podatkov lahko vendarle pričakujemo upad okužb z virusom SARS-CoV-2 v mesecu marcu. To smo napovedovali, kot tudi izvedli številna druga obveščanja, ki smo jih v Slovenskem farmacevtskem društvu skupaj s Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani pripravili v tem težkem dveletnem obdobju. S tem smo opravili našo temeljno dolžnost in poslanstvo: izobraževati in širiti znanje na področju farmacije. Obenem smo strokovni in laični javnosti pokazali, da je slovenska farmacija nepogrešljiv del znanosti in zdravstva. In to poslanstvo vršimo tudi preko znanstvenih in strokovnih člankov v Farmacevtskem vestniku.

Prva letošnja številka vsebuje pester nabor informacij. V izvirnem znanstvenem članku kolegica Lidija Gradišnik s soavtorji ugotavlja vpliv slovenske termalne vode na kožne celice, gojene *in vitro*, čemur sledita dva članka o zdravljenju glioblastomov z imunoterapijo ter znanima učinkovinama metforminom in valprojsko kislino. Zanimiv pristop tarčnega zdravljenja kronične limfocitne levkemije z antagonisti antiapoptotičnih proteinov opisuje Damjan Avsec s sodelavci. V zadnjih nekaj letih je veliko znanstvenih dognanj usmerjenih v celično senescenco, povezano s starostnimi patofiziološkimi stanji, o čemer pišejo sodelavci skupine Andreja Perdiha. S strokovnega vidika so nanizane pomembne informacije v članku o prilaganju odmerjanja protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih, kolegica Kristina Groti Antonić pa opisuje vpliv črevesne mikrobiote na metabolni sindrom pri moških.

Nova številka Farmacevtskega vestnika nam prinaša torej obilo novih spoznanj na raznoterih področjih farmacije in zdravstva. Vabim vas, da se z njimi seznanite in še dodatno nadgradite svoje znanje.

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



VSEBINA / CONTENT

IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 3 Lidija Gradišnik, Danica Železnik, Boštjan Krajnc, Uroš Maver, Andrej Eržen, Marko Milojević, Tomaž Velnar
Učinki slovenske termalne vode na kožne celice, gojene *in vitro*
The influence of thermal water from Slovenia on in vitro cultured skin cells

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 13 Lea Knez, Eva Krivec, Alja Zottel, Neja Šamec
Imunoterapija pri zdravljenju glioblastoma: kako daleč (še) do klinične uporabe?
Immunotherapy in the treatment of glioblastoma: How far (yet) to clinical use?
- 23 Zala Žužek, Lara Bolčina, Ana Kump, Ivana Jovčevska
Repozicioniranje zdravil: metformin in valprojska kislina za zdravljenje glioblastoma
Drug repurposing: metformin and valproic acid for glioblastoma treatment
- 31 Damjan Avsec, Helena Podgornik, Irena Mlinarič-Raščan
Tarčno zdravljenje kronične limfocitne levkemije z antagonisti antiapoptotičnih proteinov
Antagonists of antiapoptotic proteins in the targeted therapy of chronic lymphocytic leukemia
- 40 Eva Prašnikar, Jure Borišek, Andrej Perdih
Celična senescenca: nova terapevtska tarča pri zdravljenju s starostjo povezanih boleznih
Cell senescence: a new therapeutic target for the treatment of age-related diseases
- 54 Maja Cviki Knehtl
Prilagajanje odmerjanja protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih
Dose adjustments of antimicrobial drugs in critically ill patients
- 65 Kristina Groti Antonić
Vpliv črevesne mikrobiote na metabolni sindrom pri moških
Impact of gut microbiota on metabolic syndrome in men

73 NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

UČINKI SLOVENSKE TERMALNE VODE NA KOŽNE CELICE, GOJENE IN VITRO

THE INFLUENCE OF THERMAL WATER FROM SLOVENIA ON *IN VITRO* CULTURED SKIN CELLS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Lidija Gradišnik, mag. soc. gerontol., ing. živ. teh.^{1,2}

prof. dr. Danica Železnik, prof. zdr. vzg.^{2,3}

Boštjan Krajnc, mag. farm.¹

prof. dr. Uroš Maver, mag. farm.¹

Andrej Eržen, univ. dipl. prav.⁴

Asist. Marko Milojević, mag. lab. biomed.¹

prof. dr. Tomaž Velnar, dr. med.⁵

¹ Medicinska fakulteta Maribor, Taborska 8, 2000 Maribor

² AMEU Maribor, Slovenska 17, 2000 Maribor

³ Visoka šola za zdravstvene vede Slovenj Gradec,
Glavni trg 1, 2380 Slovenj Gradec

⁴ IARMR Terme Dobrna, Dobrna 50, 3204 Dobrna

⁵ Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinika za nevrokirurgijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tvelnar@hotmail.com

POVZETEK

Termalna voda ima zdravilne učinke na različne kožne bolezni, kot so protibolečinski, protivnetni in regenerativni učinki. V raziskavi smo testirali učinke slovenske termalne vode iz Term Dobrna na gojenih kožnih celicah *in vitro*, in sicer neobdelano termalno vodo, z UV-svetlobo sterilizirano termalno vodo, filtrirano termalno vodo ter ultračisto vodo in vodovodno vodo kot kontroli. Živost oz. viabilnost celic v celičnih kulturah smo določali s kolorimetričnim testom MTT. Termalna voda je rast keratinocitov statistično značilno najbolj spodbudila pri redčitvah 1 : 8 in 1 : 16. Rast fibroblastov je spodbudila pri vseh redčitvah (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16), vendar učinki niso dosegli meje statistično značilnih vrednosti. Pri obeh celičnih kulturah in pri vseh redčitvah je bil vpliv termalne vode na rast celic *in vitro* podoben vplivu termalne vode, predhodno sterilizirane z UV-svetlobo. Ugotovili smo, da ima termalna voda iz Dobrne koristne učinke na rast in regeneracijo človeških kožnih celic *in vitro*, zato menimo, da je priporočljiva za preventivno in terapevtsko uporabo pri določenih kožnih boleznih.

KLJUČNE BESEDE:

celične kulture, fibroblasti, keratinociti, koža, termalna voda

ABSTRACT

Thermal water exerts healing effects on various skin diseases such as antinociceptive, anti-inflammatory and regenerative effects. The effects of thermal water from Dobrna springs, Slovenia, were tested in *in vitro* skin cell models, including untreated thermal water, UV-sterilised thermal water, filtered thermal water, and ultrapure water and tap water as controls. Cell viability in cell cultures was determined using the MTT test. Thermal water stimulated the growth of keratinocytes statistically significantly, at 1:8 and 1:16 dilutions. At all dilutions (1:2, 1:4, 1:8 and 1:16), it stimulated the growth of fibroblasts, however, values were not statistically significant. In both cell cultures and at all dilutions, the effects of thermal water and UV-sterilised thermal water on the cell growth were similar. To conclude, thermal water from Dobrna has a beneficial effect on the growth and regeneration of skin cells



in vitro. It can therefore be recommended for preventive and therapeutic use for various skin diseases.

KEY WORDS:

cell culture, fibroblasts, keratinocytes, skin, thermal water

1 UVOD

S staranjem se spreminjajo vsi organski sistemi v telesu, tudi koža, vendar zelo različno (1). Človeški organizem ima različne obrambne in reparativne mehanizme, s katerimi ščiti in obnavlja kožo. Epitelijske kožne celice oz. keratinociti se hitro delijo, rastejo in odpadajo s poroženelih povrhnjih plasti, s čimer se koža obnavlja. Obstajajo pa tudi različni načini, s katerimi lahko vplivamo na zdravje kože od zunaj in jih uporabljamo v preventivne in kurativne namene. Znano je, da ima termalna voda blagodejne učinke na kožo pri različnih kožnih boleznih, kot so alergije, luskavica in dermatitis (2, 3).

Zgodovinsko gledano ima voda v medicini zelo pomembno vlogo. Tudi danes je glavna komponenta različnih vrst zdravljenj, ki jih imenujemo spa terapije. Ime izhaja iz latinskega jezika in pomeni zdravje skozi vodo (*sanus per aquam*). Pri spa terapijah uporabljamo vodo enteralno kot vehikel za trdne komponente z zdravilnim učinkom ali pa dermalno v obliki kopeli v vodi z zdravilnimi učinki, kar imenujemo balneoterapija (3, 4). To je starodavna metoda, namenjena preventivi, zdravljenju in rehabilitaciji, saj ima dokazane blagodejne učinke na človeško telo (2, 5). Tako naj bi tovrstna voda po stiku z obolelo kožo omogočila njeno regeneracijo in izboljšano zaščitno funkcijo ter delovala protibolečinsko in protivnetno (3, 4).

2 PREGLED DOSEDANJIH RAZISKAV

Kljub široki terapevtski uporabi termalnih vod je na voljo le malo raziskav, ki bi proučevale njihove pozitivne učinke in mehanizme delovanja na celičnih modelih *in vitro* (2, 4). Objavljena so poročila, ki potrjujejo ugodne učinke mineralne sladke in morske vode, pa tudi različnih vrst blata,

pogosto v kombinaciji z morskim zrakom oz. morskimi klimo in soncem, na kožo bolnikov z luskavico, atopijskim dermatitisom in revmatoidnim artritisom s prizadetostjo kože ter različnimi vrstami alergij (3–5).

Pri vnetnih kožnih boleznih, ki kožo okvarijo na mikroskopski in makroskopski ravni, so patogenetski procesi, ki se izražajo v kožnih plasteh in vplivajo tako na celice kot na druge organske sisteme, posledica imunskih interakcij, v katerih sodelujejo keratinociti, celice vezivnega tkiva (fibroblasti), celice prirojene in pridobljene imunosti ter številni topni mediatorji (3, 6). Za blaženje in zdravljenje tovrstnih bolezni pogosto uporabljamo balneoterapijo oz. kopanje v termalni izvirski ali morski vodi, kar kombiniramo z ustreznimi zdravili in drugimi vrstami naravnih snovi (7).

Mehanizem delovanja mineralne in morske vode na kožne celice je podoben, a specifičen, glede na sestavo topljenec, hitrost učinkovanja, indikacije za zdravljenje in terapevtske učinke. Pri tovrstnem zdravljenju prevladujejo lokalni učinki številnih ionov, npr. natrijevih in kloridnih (4). Voda in ioni, ki pridejo v stik z vrhnjimi plastmi kože, prodirajo skozi in nato v kožnih celicah spremenijo osmotski tlak, preko celičnih membranskih ionskih kanalčkov pa stimulirajo živčne receptorje. Zdravilno delovanje mineralnih vod je torej posledica mehanizma, ki ga pogojujeta koncentracija in vrsta soli, ki jih vsebujejo. V kožnih celicah se s pomočjo celične osmoze sproži bodisi aktivacija ali zaviranje celičnih apoptoznih ali nekroznih procesov. Osmotski mehanizem nato vpliva tudi na mehansko občutljive celične transmembranske kanalčke oz. proteine, ki so vključeni v proces signalizacije. V osnovi gre torej predvsem za učinke adsorpcije/absorpcije in penetracije v mineralnih vodah raztopljenih ionov skozi kožo (8).

Proliferacija in migracija keratinocitov in fibroblastov sta bistveni za popravilo in obnovo kožne bariere po različnih poškodbah kože (8, 9). Termalne vode, ki vsebujejo številne različne soli in elemente v sledovih, kot sta npr. bor in mangan (v nekaterih termalnih izvirih sta prisotna v visokih koncentracijah), lahko pripomorejo k boljšemu in hitrejšemu celjenju ran (9). Z uporabo celičnih modelov *in vitro* so ugotovili, da imata omenjena mikroelementa pozitivne učinke na kulturo človeških keratinocitov (8). Opazili so namreč, da je že po 24-urni inkubaciji kulture keratinocitov v mediju z dodatkom termalne vode, ki je vsebovala borove soli v koncentracijah od 0,5 µg/ml do 10 µg/ml in manganeve soli v koncentracijah od 0,1 µg/ml do 1,5 µg/ml, prišlo do pospešenega zapiranja oz. preraščanja mehansko povzročene vrzeli (rane) v primerjavi s kontrolno kulturo, kjer je bil prisoten le gojitveni medij. Pri tem pa zaprtje vrzeli oz. rane ni bilo posledica pospešene celične proliferacije.

racije. Opažene učinke hitrejšega preraščanja namerno povzročene vrzeli v kulturi keratinocitov so zato pripisali delovanju bora in mangana, ki ugodno vplivata na celjenje ran tako, da pospešita migracijo kožnih epitelijskih celic, ki rano zato hitreje epitelizirajo in zaprejo (8, 9). Proučevali so tudi vplive drugih ionov, kot so kalcijevi, cinkovi in manganovi (10, 11). Ti spodbujajo proliferacijo in diferenciacijo keratinocitov ter modulirajo izražanje njihovih integrinskih receptorjev. To so transmembranski proteini, ki so povezani s celičnim citoskeletom. Vključeni so v procese celičnega signaliziranja in omogočajo pritrjevanje celic ter njihovo povezovanje z zunajceličnim ogrodjem. Prisotnost integrinov omogoča hiter, spremenljiv in prilagodljiv odziv celice na površinske dražljaje, kar je ključno za celično migracijo in adhezijo v procesih obnove kože in celjenja ran (11–13). O ugodnem delovanju mineralne termalne izvirske vode na človeške keratinocite, gojene *in vitro*, so poročali tudi Tacheau in sod. (14). Pokazali so, da se je povečalo izražanje genov, povezanih s homeostazo kože. Pomembne spremembe so tako opazili na nivoju uravnavanja epidermalne kohezije in medcelične komunikacije, v bolj uravnoteženi celični proliferaciji, v učinkovitejših mehanizmih popravljanja napak dednega zapisa ter v večjem obsegu izražanja antioksidantov in posledični odpornosti na oksidativni stres (14, 15). Na celičnem in subceličnem nivoju mineralne vode spodbujajo izražanje genov, ki so vključeni v zaščito celic, delovanje celičnega cikla, dolgoživost in uravnavanje hidracije človeških keratinocitov (16). Rezultati raziskav kažejo tudi na to, da lahko termalno vodo uporabljamo kot pomembno sestavino za zmanjševanje ali zaviranje nekaterih škodljivih učinkov, ki povzročajo staranje kože (14, 17–19). Mineralne vode poleg pospeševanja proliferacije in diferenciacije keratinocitov ugodno učinkujejo tudi na fibroblaste, pri čemer različno delujejo na različno zrele celice (20). Ugotovili so, da je dodatek mineralne vode v celično kulturo izzval predvsem množenje mladih, nekoliko manj pa povečal proliferacijo starih fibroblastov (20, 21). Povečanje celične proliferacije so pripisali prisotnosti kalcija in magnezija v testiranih vzorcih vode, saj spodbujata proliferativno aktivnost celic preko aktivacije transmembranskih receptorjev, prenosa znotrajceličnih in medceličnih signalov ter povečanja učinkov topnih rastnih dejavnikov. Za obnovo kože, predvsem po poškodbah, so pomembni predvsem mladi fibroblasti, ki se lahko razrastejo v dermisu (20–22). Mineralne in termalne vode ne učinkujejo ugodno le na kožne, ampak tudi na druge vrste celic, še posebej na vnetne, endoteljske in celo celice respiratornega trakta (7, 16). Termalne vode lahko tako uporabljamo za spodbujanje oz. vzdrževanje zdravja, preprečevanje in zdravljenje ne-

katerih vnetnih in degenerativnih boleznih kože in sklepov, pri metabolnih boleznih, boleznih ožilja, dihal ter pri rehabilitaciji (23–25). Vse pogosteje jih vgrajujejo tudi v kozmetične izdelke (2, 24).

Namen naše raziskave je bil proučiti delovanje termalne vode iz Term Dobrna na kulture kožnih celic *in vitro*, saj njenih učinkov na človeške keratinocite in kožne fibroblaste do sedaj še niso raziskali. Predpostavili smo, da ima ta termalna voda ugoden učinek na rast obeh vrst celic v celičnih kulturah.

3 MATERIALI IN METODE

Raziskavo smo izvedli v skladu z uveljavljenimi etičnimi načeli, ki veljajo pri delu s celičnimi kulturami. Eksperimentalni del raziskave je potekal na Medicinski fakulteti v Mariboru, v laboratoriju za delo s celičnimi kulturami Inštituta za biomedicinske vede.

3.1 GOJENJE KERATINOCITOV IN FIBROBLASTOV

Celice celičnih linij človeških keratinocitov HaCaT (keratinociti) in kožnih fibroblastov Detroit 551 (ATCC CCL-110), smo kupili pri organizaciji ATCC (American Type Culture Collection, ZDA). Celične kulture smo vzpostavili in jih vzdrževali po priporočilih ATCC. Keratinocite HaCaT smo gojili v mediju Advanced DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA) s 5 % FBS (serum govejega zarodka; Thermo Fisher Scientific, ZDA), 100 E/ml penicilina (Merck, Nemčija), 0,1 mg/mL streptomocina (Merck, Nemčija) in 2 mM L-glutamina (Merck, Nemčija), fibroblaste pa v mediju Advanced DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA) s 5 % FBS (Thermo Fisher Scientific, ZDA), 100 E/ml penicilina (Merck, Nemčija), 0,1 mg/mL streptomocina (Merck, Nemčija) in 2 mM L-glutamina (Merck, Nemčija).

3.2 TESTNI IN KONTROLNI VZORCI VOD

Preiskovali smo termalno vodo iz izvira v Termah Dobrna, kjer smo jo odvezli v sterilno 500-mililitrsko steklenico in jo takoj prenesli v celični laboratorij. Testirali smo naslednje vzorce: I) naravno termalno vodo, II) termalno vodo, ki smo jo predhodno 30 minut sterilizirali z UV-svetlobo, in III) termalno vodo, ki smo jo sterilizirali s filtracijo skozi filter z ve-



likostjo por 0,22 μm (MF-Millipore, Merck, Nemčija). Za kontrolna vzorca smo uporabili z aparatom MilliQ (Millipore, Merck, Nemčija) prečiščeno vodo (ultračisto vodo) in vodovodno vodo. Vse omenjene vzorce smo razredčili v razmerjih 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16 v ustreznem mediju, ki smo ga uporabili za gojenje posamezne vrste celic.

3.3 VZPOSTAVITEV CELIČNIH KULTUR IN UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI GOJENIH CELIC

Keratinocite in kožne fibroblaste smo naselili na mikrotitrsko ploščico P96 (Falcon, Merck, Nemčija), in sicer po 10.000 celic na vdolbinico. Po 24 urah inkubacije v inkubatorju pri 37 °C, 5 % CO₂ v zraku ter 95-odstotni vlagi smo v kvadruplikatih k obema vrstama celic dodali različne redčitve posameznega vzorca termalne in kontrolnih vod. Dodatno (pozitivno) kontrolo so predstavljali keratinociti in fibroblasti, ki smo jih gojili izključno v prisotnosti ustreznega medija. Živost kožnih celic v kulturah smo nato po dodatnih 24 urah inkubacije določali s kolorimetričnim testom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Sigma-Aldrich, Merck, Nemčija). Žive celice s pomočjo mitohondrijskega NADPH reducirajo tetrazolijevo sol v modro-vijolično obarvan formazan, katerega intenziteto, ki je sorazmerna količini metabolno aktivnih celic, izmerimo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 570 nm. Meritve smo opravili s pomočjo spektrofotometra Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in izračunali in podali rezultate živosti celic relativno na kontrolne celice, ki so bile gojene samo v ustreznem celičnem mediju.

Z invertnim optičnim mikroskopom Axiovert 40 (Zeiss, Nemčija) smo spremljali učinke dodatkov različnih vzorcev in koncentracij termalnih in kontrolnih vod na morfologijo celic v kulturah, posneli mikrofotografije z digitalno kamero AxioCam (Zeiss, Nemčija) ter rezultate kvalitativno ovrednotili in jih primerjali z izsledki meritev testa MTT.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Vse numerične vrednosti so podane kot aritmetična srednja vrednost \pm standardni odklon. Normalno porazdelitev podatkov smo preverili z uporabo testa Shapiro-Wilk, na podlagi testa Lavene pa smo ocenili enakost varianc med skupinami. Na podlagi tega smo opravili enosmerno analizo variance (ANOVA), ki ji je sledil post-hoc test Bonferroni. P-vrednosti, manjše kot 0,05 ($p < 0,05$), smo obravnavali kot statistično značilne. Statistično analizo podatkov smo opravi-

vili s programsko opremo SPSS Statistics 25 (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Za izris grafov smo uporabili programsko opremo Excel (Microsoft Corp. Redmon, WA, USA).

4 REZULTATI

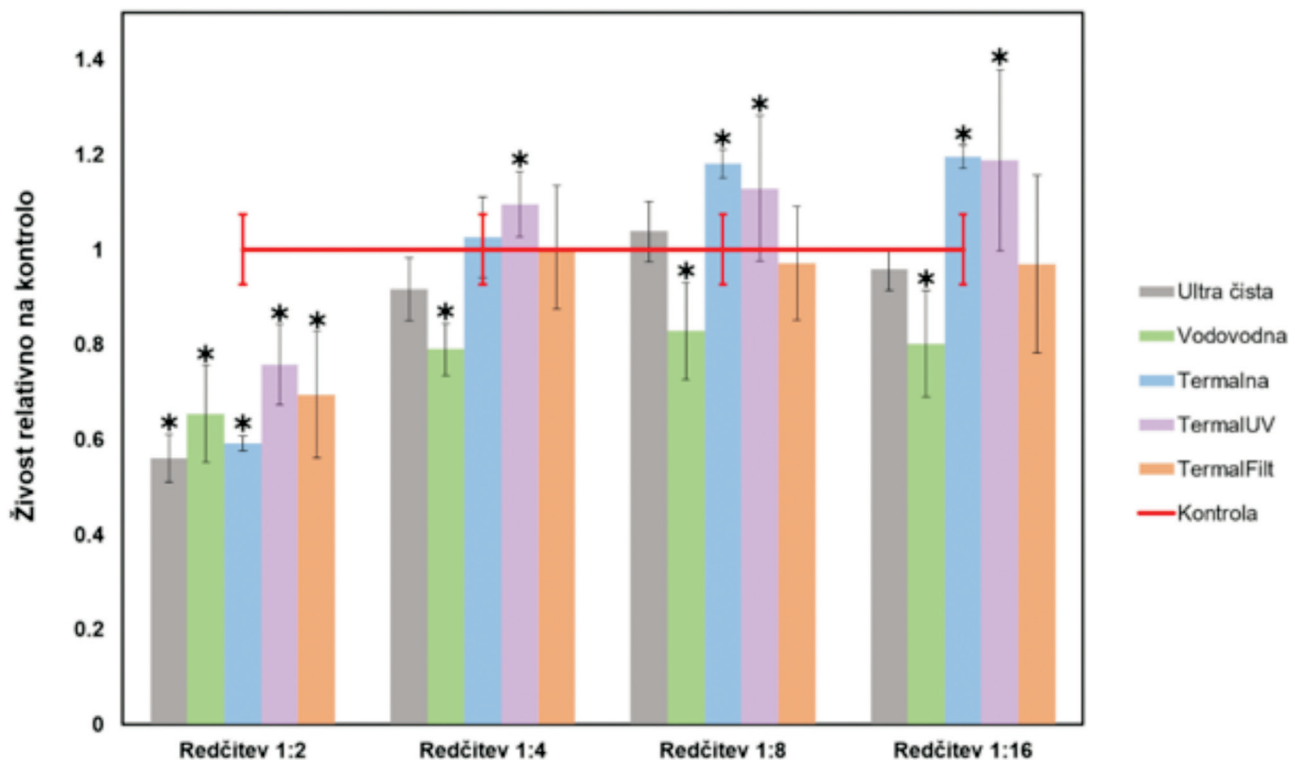
4.1 VPLIV TERMALNE VODE NA ŽIVOST GOJENIH KERATINOCITOV

Rast keratinocitov je naravna termalna voda v mediju Advanced DMEM/F12 statistično značilno najbolj spodbudila pri redčitvi 1 : 16, nekoliko manj (vendar še vedno statistično značilno bolj kot v primerjavi s kontrolnimi celicami) pa pri redčitvah 1 : 8 in 1 : 4. Od treh testiranih vzorcev termalnih vod (naravna, sterilizirana z UV-svetlobo in sterilizirana s filtracijo) sta imeli na rast keratinocitov intaktna naravna termalna voda in voda, sterilizirana z UV-svetlobo, pri redčitvah 1 : 16 in 1 : 8 statistično značilno najboljši učinek med vsemi testiranimi vzorci. To kaže tudi na dejstvo, da sterilizacija z UV-svetlobo ne vpliva na pozitivne učinke termalnih vod. Rezultati nakazujejo, da je filtracija manj primerna metoda za sterilizacijo termalnih vod, saj pri redčitvah 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16 filtrirana termalna voda ni izkazovala statistično značilno boljšega vpliva na rast keratinocitov v primerjavi s kontrolo. Vodovodna voda je ne glede na redčitev statistično značilno negativno vplivala na živost keratinocitov, medtem ko ultračista voda ni imela značilnega vpliva na živost celic pri redčitvah 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16. Vse vode so značilno znižale rast celic pri redčitvi 1 : 2, kar je najverjetneje posledica prevelike redčitve rastnega medija. Analiza vpliva termalnih vod na živost keratinocitov je prikazana na sliki 1.

4.2 VPLIV TERMALNE VODE NA ŽIVOST GOJENIH KOŽNIH FIBROBLASTOV

Čeprav rezultati niso dosegli statistično značilne vrednosti, zaznan pozitiven trend nakazuje, da naravna termalna voda in termalna voda, sterilizirana z UV-svetlobo, spodbujata rast fibroblastov. Rezultati, pridobljeni na kožnih fibroblastih, se skladajo z rezultati, pridobljenimi na keratinocitih. Za manj primerno metodo sterilizacije se je ponovno izkazala filtracija termalne vode. Tudi vodovodna voda je negativno vplivala na rast kožnih fibroblastov ne glede na redčitev. Vse vode, razen naravne in z UV-svetlobo sterilizirane ter-

Citotoksičnost termalne vode na keratinocitih



Slika 1: Rezultati testa MTT v keratinocitnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti štirih meritev za vsak vzorec in kontrolno, s pripadajočimi standardnimi odkloni. Živost keratinocitov je podana relativno na kontrolne celice keratinocitov (rdeča črta s pripadajočimi standardnimi odkloni), ki so bile gojene samo v rastnem mediju Advanced DMEM/F12. Zvezdica označuje vzorce, kjer je bila celična živost bodisi statistično značilno ($p < 0.05$) višja oziroma nižja v primerjavi s kontrolnimi celicami.

Figure 1: MTT test results in keratinocyte cell cultures. The mean values of the four measurements for each sample and the control are shown with the corresponding standard deviations. Keratinocyte viability was given relative to the keratinocyte control cells (the red line with the corresponding standard deviations) grown only in the Advanced DMEM/F12 medium. Asterisk indicates samples in which cell viability was either significantly ($p < 0.05$) higher or lower than that of the control cells.

malne vode, so zavrle rast kožnih fibroblastov pri redčitvi 1 : 2, vendar je bil učinek manjši kot pri keratinocitih. Prav tako so na kožnih fibroblastih manj izraziti pozitivni učinki termalnih vod, kar kaže na dejstvo, da je ta celična kultura manj občutljiva na dodatek termalnih vod celičnemu mediju. Analiza vpliva termalnih vod na živost kožnih fibroblastov je prikazana na sliki 2.

4.3 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI KERATINOCITOV IN KOŽNIH FIBROBLASTOV V CELIČNIH KULTURAH

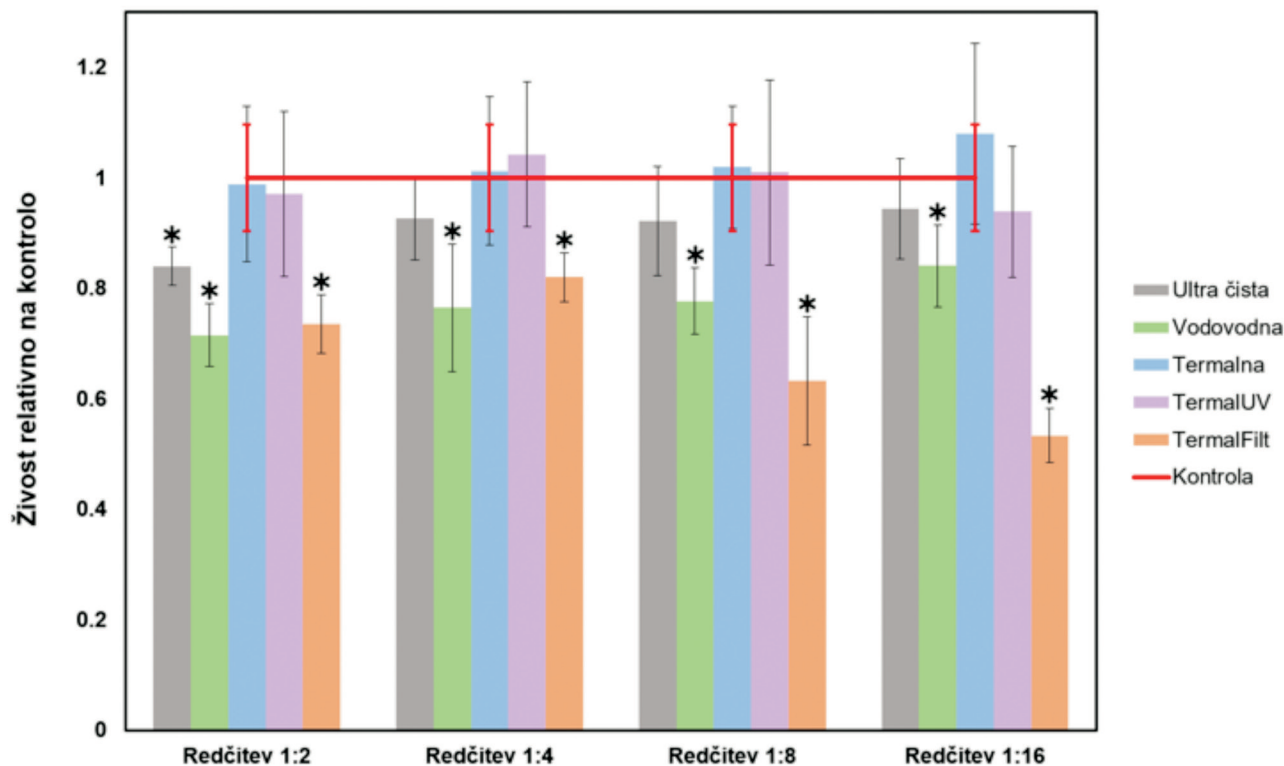
Z invertnim optičnim mikroskopom smo pri 50-kratni povečavi opazovali in posneli keratinocite in kožne fibroblaste

po 24-urni inkubaciji s preiskovanimi vzorci vod, ki so bili dodani celičnim kulturam v redčitvi 1 : 16 v ustreznem mediju za gojenje posamezne vrste celic (sliki 3 in 4).

Na mikrofotografijah vidimo, da je bila kultura človeške keratinocitne linije HACAT v vdolbinici mikrotitrne plošče po dodatku neobdelane naravne termalne vode v redčitvi 1 : 16 (slika 3D) po 24 urah inkubacije povsem konfluentna (preraščena). Rast celic je bila torej boljša kot pri pozitivni kontroli, kjer so celice rasle samo v gojitvenem mediju (slika 3A). Tudi dodatek vzorcev termalne vode, predhodno sterilizirane z UV-svetlobo (slika 3E) in sterilizirane s filtracijo (slika 3F), v redčitvi 1 : 16 v gojitvenem mediju, je spodbujal rast keratinocitov v večji meri kot sam medij (pozitivna kontrola). Nasprotno pa je bila rast celic HaCaT po dodatku ultračiste vode (slika 3B) in vodovodne vode (slika 3C) v redčitvi 1 : 16 slabša kot v kontrolni kulturi (slika 3A).



Citotoksičnost termalne vode na kožnih fibroblastih



Slika 2: Rezultati testa MTT v kulturah kožnih fibroblastov. Prikazane so povprečne vrednosti štirih meritev za vsak vzorec in kontrolo, s pripadajočimi standardnimi odkloni. Živost kožnih fibroblastov je podana relativno na kontrolne celice kožnih fibroblastov (rdeča črta s pripadajočimi standardnimi odkloni), ki so bile gojene samo v rastnem mediju Advanced DMEM. Zvezdica označuje vzorce, kjer je bila celična živost bodisi statistično značilno ($p < 0.05$) višja oziroma nižja v primerjavi s kontrolnimi celicami.

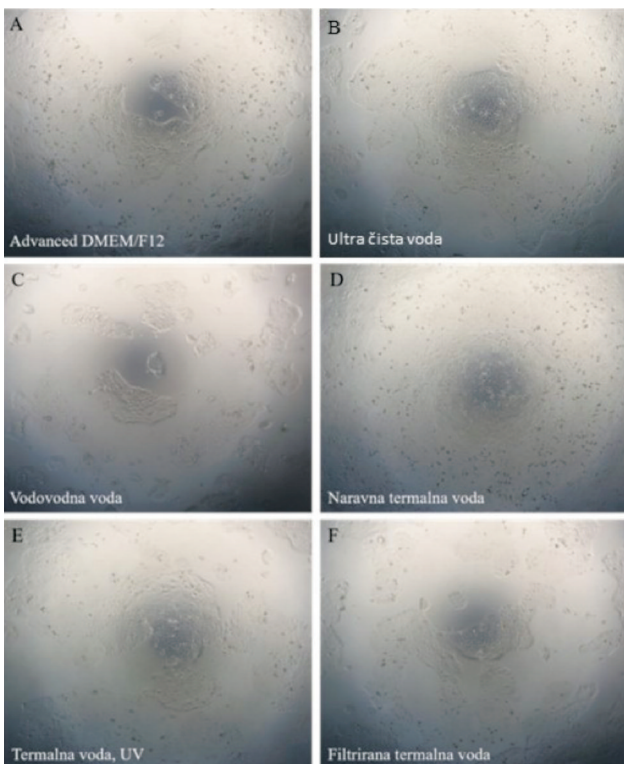
Figure 2: MTT test results in skin fibroblast cultures. The mean values of the four measurements for each sample and the control are shown with the corresponding standard deviations. The viability of skin fibroblasts is given relative to the skin fibroblast control cells (the red line with the corresponding standard deviations) grown only in the Advanced DMEM growth medium. Asterisk indicates samples where cell viability was either significantly ($p < 0.05$) higher or lower compared to the control cells.

Izsledki, ki smo jih razbrali iz mikrofotografij kultur kožnih fibroblastov celične linije Detroit 551, so sovpadali z rezultati meritev živosti celic. Po dodatku neobdelane naravne termalne vode v redčitvi 1 : 16 v gojitvenem mediju so celice v kulturi po 24 urah inkubacije dosegle 100-odstotno konfluenco (slika 4D), kar je bil boljši rezultat od tistega, ki smo ga opazili pri pozitivni kontroli, kjer smo fibroblaste gojili izključno v mediju (slika 4A). Dodatek ultračiste vode v redčitvi 1 : 16 (slika 4B) je izzval celično rast, ki je bila primerljiva s pozitivno kontrolo (slika 4B). Nekoliko slabšo rast fibroblastov kot v pozitivni kontroli smo opazili po dodatku termalne vode v redčitvi 1 : 16, ki smo jo predhodno sterilizirali z UV-svetlobo (slika 4E). Dodatka vodovodne vode (slika 4C) in filtrirane termalne vode (slika 4F) v redčitvi 1 : 16 v gojitvenem mediju sta celično rast v primerjavi s pozitivno kontrolo (slika 4A) zmanjšala.

4.4 POVZETEK EKSPERIMENTALNIH REZULTATOV

Z merjenjem živosti gojenih keratinocitov in kožnih fibroblastov s testom MTT smo pokazali, da ima termalna voda iz Term Dobrna statistično značilno pozitiven učinek na rast keratinocitov in kožnih fibroblastov *in vitro*. Ugotovili smo, da sta imeli intaktna naravna termalna voda in voda, sterilizirana z UV-svetlobo, statistično značilno največji pozitiven učinek na rast obeh vrst kožnih celic glede na ustrezno kontrolo, pri čemer je bil učinek odvisen od koncentracije vode v gojitvenem mediju in od vrste celic.

Rast keratinocitov v kulturi je intaktna termalna voda, ki smo jo dodali gojitvenemu mediju, statistično značilno najbolj spodbudila pri redčitvah 1 : 8 in 1 : 16, nekoliko manj, vendar še vedno statistično značilno, pa pri redčitvi 1 : 4 v

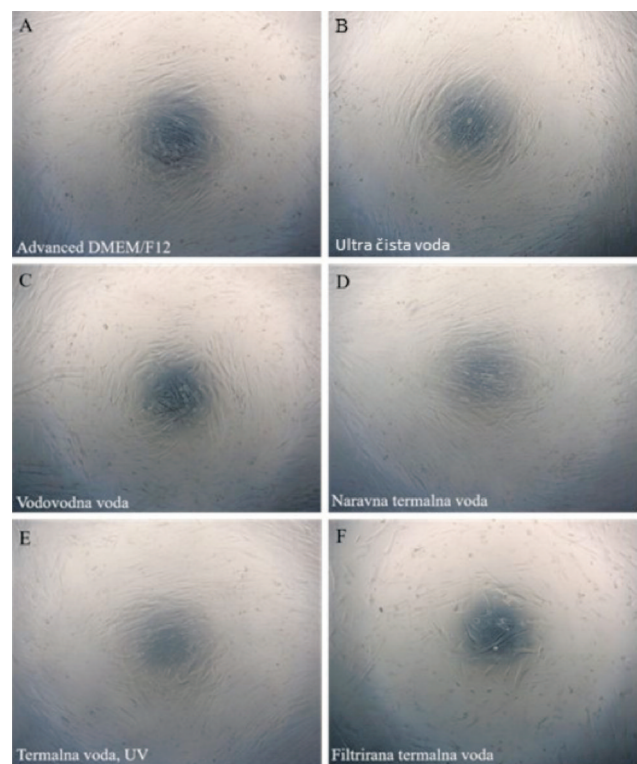


Slika 3: Digitalne mikrofotografije kultur kožnih keratinocitov HaCaT po 24-urni inkubaciji z različnimi vzorci vod, dodanih k mediju v redčitvi 1 : 16; invertni optični mikroskop Axiovert 40 Zeiss, opremljen z digitalno kamero Axioacam Zeiss. Vse slike so bile posnete pri 50-kratni povečavi.

Figure 3: Micrographs of the HaCaT skin keratinocyte cultures after 24 hours of incubation with various water samples added to the medium at a dilution of 1:16; Axiovert 40 Zeiss invert optical microscope equipped with the Axioacam Zeiss digital camera. All images were taken at a 50x magnification.

primerjavi s kontrolnimi celicami, gojenimi samo v ustreznem rastnem mediju. V kulturah kožnih fibroblastov je imela največji spodbujevalni učinek na celično rast, glede na kontrolne fibroblaste, redčitev naravne termalne vode v gojitvenem mediju v razmerju 1 : 16, vendar rezultat ni dosegel statistično značilne vrednosti. Tudi pri ostalih redčitvah (1 : 2, 1 : 4 in 1 : 8) je zaznaven trend pozitivnega vpliva intaktne termalne vode na rast fibroblastov, vendar rezultati niso presegli meje statistične značilnosti v primerjavi s kontrolnimi celicami, gojenimi v ustreznem mediju brez dodatka vod.

Vzorec termalne vode, ki smo ga predhodno sterilizirali z UV-svetlobo, je izkazoval statistično značilne pozitivne učinke na rast keratinocitov, medtem ko trend pozitivnega učinka na živost kožnih fibroblastov ni dosegel meje stati-



Slika 4: Digitalne mikrofotografije kultur kožnih fibroblastov po 24-urni inkubaciji z različnimi vzorci vod, dodanih k mediju v redčitvi 1 : 16; invertni optični mikroskop Axiovert 40 Zeiss, opremljen z digitalno kamero Axioacam Zeiss. Vse slike so bile posnete pri 50-kratni povečavi.

Figure 4: The micrographs of the skin fibroblast cultures after 24-hours of incubation with various water samples added to the medium at a dilution of 1:16; Axiovert 40 Zeiss invert optical microscope equipped with the Axioacam Zeiss digital camera. All images were taken at a 50x magnification.

stične značilnosti. Med vzorcema naravne termalne vode in vode, obdelane z UV-svetlobo, glede na redčitev in vrsto celic ni bilo značilnih razlik. Oba vzorca sta na živost celic najboljše vplivala pri večjih redčitvah (1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16). Za manj primerne se je izkazal vzorec termalne vode, ki je bil filtriran skozi filter z velikostjo por 0,22 µm, saj je značilno negativno vplival na rast kožnih fibroblastov pri vseh redčitvah. Statistična primerjava obeh obdelanih vzorcev vode je pokazala, da je bila rast keratinocitov in kožnih fibroblastov značilno boljša po dodatku termalne vode, obsevane z UV-svetlobo. Vodovodna voda je značilno negativno vplivala na živost obeh celičnih kultur ne glede na redčitev. Ultračista voda ni izkazovala značilnega vpliva na rast keratinocitov in fibroblastov v primerjavi s kontrolnimi celicami, razen pri redčitvi 1 : 2. Rast obeh vrst celic je bila



tako v prisotnosti ultračiste vode in vodovodne vode slabša v primerjavi z dodatkom naravne in z UV-svetlobo sterilizirane termalne vode. Značilnih razlik med filtrirano termalno vodo in ultračisto vodo pri keratinocitih ni bilo, medtem ko je imela filtrirana termalna voda značilno slabši vpliv na rast kožnih fibroblastov kot ultračista voda.

5 RAZPRAVA

Zaradi številnih blagodejnih učinkov na organizem je voda že od nekdaj neločljivo povezana s človekovim življenjem (3). S številnimi raziskavami so potrdili koristne učinke različnih mineralnih in termalnih vod na izboljšanje delovanja posameznih organskih sistemov pri ljudeh (16, 26). Med objavljenimi rezultati raziskav pa je takih, ki bi vsebovali podatke o neposrednem delovanju termalnih in mineralnih vod na celične modele *in vitro*, razmeroma malo, in to kljub dejstvu, da so zdraviliške vode zelo pomembne za zdravljenje različnih kožnih bolezni (2, 4). Predpostavili smo, da ima termalna voda iz Term Dobrna ugoden učinek na rast celic človeških celičnih linij HaCaT (keratinociti) in Detroit 551 (dermalni fibroblasti), gojenih *in vitro*, s čimer bi potrdili njene ugodne vplive na regeneracijo kože in podprli priporočila za njeno uporabo pri podpornem zdravljenju kožnih bolezni (14–16). Poleg tega pa je izraba koristnih učinkov posameznih zdraviliških mineralnih in termalnih vod eden od načinov, s katerimi lahko ugodno vplivamo na zaviranje starostnih sprememb v koži, ki so poleg samega procesa staranja organizma tudi posledica številnih škodljivih vlivov okolja in sprememb oz. okvar genetskega materiala v kožnih celicah (27–29).

5.1 IZBIRA TERMALNE VODE ZA TESTIRANJE

Termalnih izvirov je na geografskem območju Slovenije veliko, vode iz njih pa se med seboj razlikujejo glede na svoje značilnosti (30). Te so odvisne od zemeljskih plasti, kjer se voda nahaja, njihove globine in sestave. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na lastnosti tovrstnih vod, so temperatura in vrste raztopljenih snovi, ki opredeljujejo njihove fizikalne in kemijske značilnosti (16, 31). Termalno vodo iz Term Dobrna smo izbrali iz več razlogov, med katerimi je najpomembnejši ta, da ima specifično sestavo. Je alkalna in vsebuje primerne količine kalcija, magnezija in hidrogenkarbo-

nata. Deluje protivnetno ter proti alergijam (30, 31). Glede na to, da jo uporabljamo v balneoterapiji, se nam je zdelo smiselno proučiti njeno delovanje na epidermalne in dermalne kožne celice. Poleg tega so Terme Dobrna najstarejše zdravilišče na Slovenskem, kjer do sedaj še ni bilo opravljenih nobenih raziskav termalne vode v pogojih *in vitro* na način, kot smo ga načrtovali (30). V prihodnostibi bilo smiselno raziskati tudi ostale termalne vode v naši državi in rezultate primerjati med seboj.

5.2 UPORABA FUNKCIONALNIH KULTUR ČLOVEŠKIH KERATINOCITOV IN KOŽNIH FIBROBLASTOV ZA PROUČEVANJE UČINKOV TERMALNE VODE IN VITRO

Celične kulture smo izbrali skladno z naravo načrtovanih eksperimentov in fiziološkim pomenom uporabljenih kožnih celic. Za testiranje smo pripravili štiri zaporedne dvakratne razredčitve vzorcev izbranih vod, ki smo jih nato dodajali ustreznemu gojitvenemu mediju, ki je nujno potreben za normalno rast celic v kulturi. Redčitve vzorcev testiranih vod smo pripravili tako, da smo jih dodajali ustreznemu mediju za gojenje celic v naslednjih razmerjih: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16. Opažena slabša rast obeh vrst kožnih celic pri visokih začetnih koncentracijah testiranih vzorcev vod je bila najverjetneje posledica pomanjkanja potrebnih hranilnih substanc zaradi manjšega deleža gojitvenega medija v kulturah ter vplivov neustrezne osmolarnosti.

Z določanjem živosti celic, gojenih v prisotnosti in odsotnosti različnih koncentracij testiranih vzorcev vod, smo potrdili naše raziskovalne hipoteze, kjer smo predpostavili, da ima termalna voda ugoden učinek na rast obeh izbranih vrst kožnih celic. Termalna voda iz Term Dobrna je značilno pospešila rast keratinocitov in pozitivno vplivala na viabilnost kožnih fibroblastov v kulturah, pri čemer je bil ta učinek koncentracijsko odvisen. Tudi izsledki drugih raziskav potrjujejo, da termalne vode različno učinkujejo na različne vrste celic, kar je najverjetneje posledica občutljivosti posameznih celičnih vrst in njihovih osnovnih fizioloških značilnosti (14, 16, 32). Keratinociti in fibroblasti potrebujejo za rast v kulturah *in vitro* poleg hranil tudi določene mikroelemente, katerih koncentracija se ob dodatku termalnih vod v gojitveni medij zviša (9, 10, 11). Mehanizmi pozitivnih učinkov termalnih vod na celice so kompleksni in potekajo preko spreminjanja transmembranske propustnosti, uravnavanja delovanja celičnih kanalčkov in signalnih molekul ter vplivov na celični cikel z izražanjem genov, ki so vključeni v zaščito in dolgoživost celic (8, 12, 16).

Zanimiva je bila tudi ugotovitev, da je od vseh testiranih vzorcev vod na gojene kožne celice najbolj delovala naravna, neobdelana termalna voda. Statistično značilno primerljiv učinek izkazuje tudi voda, predhodno sterilizirana z UV-svetlobo, medtem ko voda, filtrirana skozi 0,22 µm mikrobiološki filter, na celično rast ni imela dobrega učinka. Uporaba termalne vode, obsevane z UV-svetlobo, je za rast keratinocitov in fibroblastov značilno boljša kot dodatek filtrirane termalne vode, pri čemer je bila ta razlika največja pri največji redčitvi 1 : 16. Tudi vzorca vodovodne in ultračiste vode, v primerjavi z neobdelano in obdelano (sterilizirano z UV-svetlobo) termalno vodo, nista pokazala tako ugodnega učinka na rast celic. Sestavo vode lahko namreč spremenimo z različnimi kemijskimi in fizikalnimi postopki (2). Na ta način vplivamo tudi na vsebnost snovi, kot so različni ioni, ki jih celice potrebujejo za normalne fiziološke procese, to pa se negativno odraža tudi v celičnih kulturah *in vitro* (9, 20). Podobno je tudi v pogojih *in vivo*, kjer se koža ob površinski uporabi neobdelane termalne vode hitreje obnavlja, tudi celjenje ran je boljše, poleg tega pa se opazno počasni procesi staranja v povezavi z genskimi okvarami in različnimi bolezenskimi spremembami (7, 33). Makroskopsko je to vidno kot zmanjševanje ali zaviranje določenih zunanjih škodljivih učinkov na kožo, hitrejšo celjenje ran in ugodni kozmetični učinki (12, 13, 20, 22). Glede na rezultate naših eksperimentov lahko zaključimo podobno: delovanje termalne vode iz Term Dobrna na keratinocite in kožne fibroblaste, gojene *in vitro*, je bilo pozitivno, saj je ta pospešila njihovo rast pri vseh testiranih redčitvah, še posebej pa pri največji (1 : 16). Vpliv termalne vode je na živost in rast keratinocitov statistično značilno pozitiven, medtem ko opažen pozitiven trend ni dosegel statistično značilne vrednosti pri kožnih fibroblastih. Z izsledki naše raziskave se tako pridružujemo ugotovitvam do sedaj sicer redkih raziskav, ki so v celičnih kulturah *in vivo* podobno potrdili ugodne učinke različnih termalnih vod (23, 24).

Uporaba celičnih kultur v laboratorijskih pogojih je eden izmed najuporabnejših, najzanesljivejših in ekonomičnih načinov testiranja različnih snovi *in vitro* (34, 35). Celične kulture, ki smo jih vzpostavili, so dobro uspevale, poleg tega pa smo z njihovo uporabo nadzorovali eksperimentalne pogoje. Pri nadaljnjih raziskavah *in vitro* na področju uporabnosti termalnih vod bi lahko uporabili tudi druge vrste celic ali tkiv, različne vrste celičnih modelov, drugačne eksperimentalne pogoje in dodajanje znanih rastnih dejavnikov. Poleg tega pa bi lahko v prihodnje na gojenih celicah primerjalno preizkusili učinke delovanja različnih termalnih in mineralnih vod, morske vode in tudi vodnih ekstraktov zdravilnega blata.

6 SKLEP

V raziskavi smo potrdili, da je delovanje termalne vode iz Term Dobrna na keratinocite in kožne fibroblaste v pogojih *in vitro* ugodno, saj pospešuje rast obeh vrst celic. Na osnovi teh ugotovitev sklepamo, da ima pozitiven učinek na rast in regeneracijo poglavitnih tipov kožnih celic, zato menimo, da je njena uporaba priporočljiva tudi za preventivno in terapevtsko uporabo pri kožnih boleznih.

7 LITERATURA

1. Hubbard RE, Lang IA, Llewellyn DJ, Rockwood K. Frailty, body mass index, and abdominal obesity in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Apr;65(4):377-81.
2. Morer C, Roques CF, Françon A, Forestier R, Maraver F. The role of mineral elements and other chemical compounds used in balneology: data from double-blind randomized clinical trials. *Int J Biometeorol*. 2017 Dec;61(12):2159-73.
3. Riyaz N, Arakkal FR. Spa therapy in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011 Mar-Apr;77(2):128-34.
4. Zöllner N, Valesky E, Hofmann M, Bereiter-Hahn J, Bernd A1, Kaufmann R, et al. Impact of Different Spa Waters on Inflammation Parameters in Human Keratinocyte HaCaT Cells. *Ann Dermatol*. 2015 Dec;27(6):709-14.
5. Burns E, Nair S. New horizons in care home medicine. *Age Ageing*. 2014 Jan;43(1):2-7.
6. Messinger-Rapport B. What's new in treating older adults? *Cleve Clin J Med*. 2010 Nov;77(11):770-90.
7. Lee HP, Choi YJ, Cho KA, Woo SY, Yun ST, Lee JT, et al. Effect of Spa Spring Water on Cytokine Expression in Human Keratinocyte HaCaT Cells and on Differentiation of CD4(+) T Cells. *Ann Dermatol*. 2012 Aug;24(3):324-36.
8. Carbajo JM, Maraver F. Salt water and skin interactions: new lines of evidence. *Int J Biometeorol*. 2018 Aug;62(8):1345-60.
9. Chebassier N, Oujiya el H, Viegas I, Dreno B. Stimulatory effect of boron and manganese salts on keratinocyte migration. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(3):191-4.
10. Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp Dermatol*. 2000 Dec;9(6):407-16.
11. Tenaud I, Saïagh I, Dreno B. Addition of zinc and manganese to a biological dressing. *J Dermatolog Treat*. 2009;20(2):90-3.
12. Grinnell F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci*. 1992 Jan;101 (Pt 1):1-5.
13. Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Modulation in vitro of keratinocyte integrins by interferon-alpha and interferon-gamma. *Int J Dermatol*. 2002 Dec;41(12):836-40.
14. Tacheau C, Weisgerber F, Fagot D, Bastien P, Verdier MP, Liboutet M, et al. Vichy Thermal Spring Water (VTSW), a cosmetic ingredient of potential interest in the frame of skin



- ageing exposome: an in vitro study. *Int J Cosmet Sci*. 2018 Aug;40(4):377-87.
15. Karagülle MZ, Karagülle M, Kılıç S, Sevinç H, Dündar C, Türkoğlu M. In vitro evaluation of natural thermal mineral waters in human keratinocyte cells: a preliminary study. *Int J Biometeorol*. 2018 Sep;62(9):1657-61.
 16. Spilioti E, Vargiami M, Letsiou S, Gardikis K, Sygouni V, Koutsoukos P, et al. Biological properties of mud extracts derived from various spa resorts. *Environ Geochem Health*. 2017 Aug;39(4):821-33.
 17. Birch-Machin MA, Bowman A. Oxidative stress and ageing. *Br J Dermatol*. 2016 Oct;175 Suppl 2:26-9.
 18. Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci*. 2017 Mar;85(3):152-61.
 19. Labarrade F, Bergeron L, Serre C, Lebleu A, Busuttill V, Botto JM, et al. Modulating the expression of survivin and other basal epidermal proteins protects human skin from UVB damage and oxidative stress. *J Cosmet Dermatol*. 2015 Sep;14(3):191-203.
 20. Collober I, Noel-Hudson MS, Wepierre J, Montastier C. Activity of Vittel water on proliferation of human fibroblasts, proliferation and differentiation of human keratinocytes. *Int J Cosmet Sci*. 1994 Aug;16(4):149-60.
 21. Bikle DD, Pillai S. Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr Rev*. 1993 Feb;14(1):3-19.
 22. Sasaki H, Itoh T, Akamatsu H, Okamoto H, Horio T. Effects of calcium concentration on the SOD activity and UVB-induced cytotoxicity in cultured human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005 Feb;21(1):9-14.
 23. Elkhyat A, Courderot-Masuyer C, Mac-Mary S, Courau S, Gharbi T, Humbert P. Assessment of spray application of Saint GERVAIS water effects on skin wettability by contact angle measurement comparison with bidistilled water. *Skin Res Technol*. 2004 Nov;10(4):283-6.
 24. Ghersetich I, Brazzini B, Hercogova J, Lotti TM. Mineral waters: instead of cosmetics or better than cosmetics? *Clin Dermatol*. 2001 Jul-Aug;19(4):478-82.
 25. Gin H, Demeaux JL, Grelaud A, Grolleau A, Droz-Perroteau C, Robinson P, et al. Observation of the long-term effects of lifestyle intervention during balneotherapy in metabolic syndrome. *Therapie*. 2013 May-Jun;68(3):163-7.
 26. Maeda T, Kudo Y, Horiuchi T, Makino N. Clinical and anti-aging effect of mud-bathing therapy for patients with fibromyalgia. *Mol Cell Biochem*. 2018 Jul;444(1-2):87-92.
 27. Hanson MA, Cooper C, Aihie Sayer A, Eendebak RJ, Clough GF, Beard JR. Developmental aspects of a life course approach to healthy ageing. *J Physiol*. 2016 Apr 15;594(8):2147-60.
 28. McLeod RP, Horowitz P, Fowler JF Jr, Eichenfield LF, Elias PM. The basics of skin care: cleanse, moisturize, protect. *Semin Cutan Med Surg*. 2013 Jun;32(2 Suppl 2):30-2.
 29. Ramos-e-Silva M, Carneiro SC. Cosmetics for the elderly. *Clin Dermatol*. 2001 Jul-Aug;19(4):413-23.
 30. Terme Dobrna: Zdravilna termalna voda. 2019. Dostopno na: <http://www.terme-dobrna.si/wellness-zdravje/zdravilna-termalna-voda> (14. marec 2019).
 31. Matheson-Shedrick K. Spas unwrapped. *J Med Pract Manage*. 2008 Nov-Dec;24(3):166-9.
 32. Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int J Cosmet Sci*. 2008 Dec;30(6):413-34.
 33. Huang A, Seité S, Adar T. The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol*. 2018 May - Jun;36(3):363-8.
 34. Soo JY, Jansen J, Masereeuw R, Little MH. Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Jun;14(6):378-93.
 35. Truskey GA. Human Microphysiological Systems and Organoids as in Vitro Models for Toxicological Studies. *Front Public Health*. 2018 Jul 10;6:185.

IMUNOTERAPIJA PRI ZDRAVLJENJU GLIOBLASTOMA: KAKO DALEČ (ŠE) DO KLINIČNE UPORABE?

IMMUNOTHERAPY IN THE TREATMENT OF GLIOBLASTOMA: HOW FAR (YET) TO CLINICAL USE?

AVTORICE / AUTHORS:

Lea Knez, dipl. biokem.^{1, 2}

Eva Krivec, mag. bioteh.^{1, 3}

asist. dr. Alja Zottel, mag. biokem.¹

asist. dr. Neja Šamec, dipl. uni. biokem.¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Medicinski center za molekularno biologijo,
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani,
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,
Večna pot 113, 1000 Ljubljana

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: neja.samec@mf.uni-lj.si

POVZETEK

Glioblastom je najpogostejši primarni maligni tumor možganov in hkrati tudi najbolj smrtonosna in agresivna oblika tumorja, ki se pojavlja v možganih. Povprečno preživetje bolnikov z glioblastomom je kljub prejetju standardne terapije le 12 do 15 mesecev. V zadnjih letih se kot napredna možnost zdravljenja glioblastoma pojavlja imunoterapija, ki je pri zdravljenju nekaterih drugih rakov doživela izjemen uspeh. Posebnost glioblastoma je visoka stopnja imunosupresije, ki je predvsem posledica povečanega izražanja PD-1, PD-L1, TGF- β in metaloproteaz ter znižanega izražanja MHCI. Imunoterapevtski pristopi za zdravljenje glioblastoma, ki so prešli v tretjo fazo kliničnih preskušanj, so peptidna cepiva proti EGFRvIII, ki pa se na koncu niso izkazala kot najbolj uspešna. Podobno tudi celična terapija z dendritičnimi celicami in s citokini induciranimi celicami ubijalkami ter terapija z zaviralci imunskih kontrolnih točk (npr. nivolumab) ni prinesla zelenih rezultatov. Znanstveniki so za zdravljenje glioblastoma razvili tudi celice CAR-T, usmerjene proti HER2, IL-13Ra2 in EGFRvIII, a niso imele znatnega dolgotrajnega učinka na paciente. Prihodnost imunoterapije pri zdravljenju glioblastoma je predvsem v izboljšanju trenutnih terapij in kombinaciji več pristopov.

KLJUČNE BESEDE:

CAR-T, glioblastom, imunoterapija, klinična raziskava

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common primary malignant brain tumor, and at the same time the most aggressive and deadliest form of tumor occurring in the brain. The average survival of patients with glioblastoma, despite receiving standard therapy, is only 12-15 months. In recent years, immunotherapy has emerged as an advanced treatment option for glioblastoma and has been extremely successful in treating some other cancers. A special feature of glioblastoma is a high level of immunosuppression, which is mainly due to increased expression of PD-1, PD-L1, TGF- β and metalloproteases and decreased expression of MHCI. Immunotherapeutic approaches for the treatment of glioblastoma that have passed into the third phase of clinical trials are peptide vaccines



against EGFRvIII, which in the end did not prove to be the most successful. Similarly, cell therapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells and therapy with immune checkpoint inhibitors (eg nivolumab) did not produce the desired results. Scientists have also developed CAR-T-targeted HER2, IL-13Rα2, and EGFRvIII for the treatment of glioblastoma but they did not have a significant long-term effect on patients. The future of immunotherapy in the treatment of glioblastoma lies primarily in the improvement of current therapies and the combination of several approaches.

KEY WORDS:

CAR-T, clinical trials, glioblastoma, immunotherapy

1 UVOD

Glioblastom je najpogostejši primarni tumor centralnega živčnega sistema in je tudi eden izmed najbolj smrtonosnih rakov, saj petletno preživetje po diagnozi znaša le 5,5 %. Glioblastom je redek rak in se v Združenih državah Amerike pojavlja s pogostostjo 3,2 primera na 100.000 prebivalcev (1). Pogosteje se pojavlja pri starejši populaciji z mediano povprečne starosti 64 let (2). Po razdelitvi Svetovne zdravstvene organizacije glioblastom spada v četrto, najbolj maligno stopnjo gliomov. Vzrokov za nastanek gliomov v veliki meri ne poznamo. Med dejavnike tveganja sodijo izpostavljenost ionizirajočemu sevanju in nekateri redki družinski sindromi, kot je npr. Li-Fraumenijev sindrom (3). Prvi znaki bolezni so povezani predvsem z mestom tumorja in so lahko zelo jasni, kot je npr. izguba vida, spremembe pri sporazumevanju ali otrplost. Lahko pa so tudi blagi, npr. utrujenost, blage težave s spominom in motnje razpoloženja (2). Značilnosti tumorskih celic so netipična jedra, celični pleomorfizem, visoka mitotska aktivnost, nekroza in mikrovaskularna proliferacija (1). Zdravljenje bolnikov, mlajših od 70 let, obsega največjo možno odstranitev tumorja, radioterapijo in kemoterapijo s temozolomidom (2). Kljub zdravljenju večina bolnikov umre 15 mesecev po diagnozi (4). Neuspešnost klasične terapije je med drugim posledica izražanja proteinov, ki izločajo protitumorske učinkovine iz celice, in izražanje encima O-6-metilgvanin-DNA metiltransferaze (MGMT). Ta namreč odstrani poškodbe, ki jih je povzročil temozolomid. Poleg tega so v tumorju prisotne

tudi glioblastomske matične celice (5), ki so še posebno odporne na zdravljenje s temozolomidom in radioterapijo (4, 6). Za glioblastom je značilna tudi visoka stopnja heterogenosti tako znotraj tumorja kot tudi med tumorji različnih bolnikov, kar dodatno otežuje načrtovanje novih zdravil (4). Zaradi izjemno visoke stopnje smrtnosti bolnikov so nova, učinkovitejša zdravila nujno potrebna.

Eden izmed trenutno najbolj obetavnih načinov zdravljenja raka so imunoterapevtski pristopi, ki temeljijo na izboljšanju imunskega odziva telesa na tumor ali pa na ciljanju specifičnih tumorskih antigenov (7). Leta 2018 so raziskovalcema Jamesu Allisonu in Tasuku Honju podelili Nobelovo nagrado na področju imunoterapije, in sicer za odkritje zaviralcev imunskih kontrolnih točk (8, 9). Imunske kontrolne točke so namreč ključen del imunskega sistema, saj skrbijo za natančno uravnavanje imunskega odziva. Rakave celice med drugim izražajo tarče imunskih kontrolnih točk (10). S tem preprečijo njihovo prepoznavanje in odstranitev z naravnimi celicami ubijalkami oz. citotoksičnimi limfociti T ter tako zavrejo delovanje imunskega odziva. Prvi imunoterapevtik, ipilimumab, so odobrili leta 2011 za zdravljenje metastatskega melanoma. Kmalu zatem so odobrili več zdravil za zdravljenje različnih rakov, kot so npr. majhnocelični rak pljuč, nemajhnocelični rak pljuč in rak materničnega vratu (8). V tem članku bomo najprej na kratko opisali posebnosti imunskega sistema pri glioblastomu in predstavili imunoterapevtske pristope za njegovo zdravljenje, ki so se izkazali kot najbolj obetavni in so prešli v tretjo klinično fazo preskušanj. Nato bomo predstavili ostale obetajoče imunoterapevtske načine zdravljenja glioblastoma.

2 IMUNSKI SISTEM V GLIOBLASTOMU

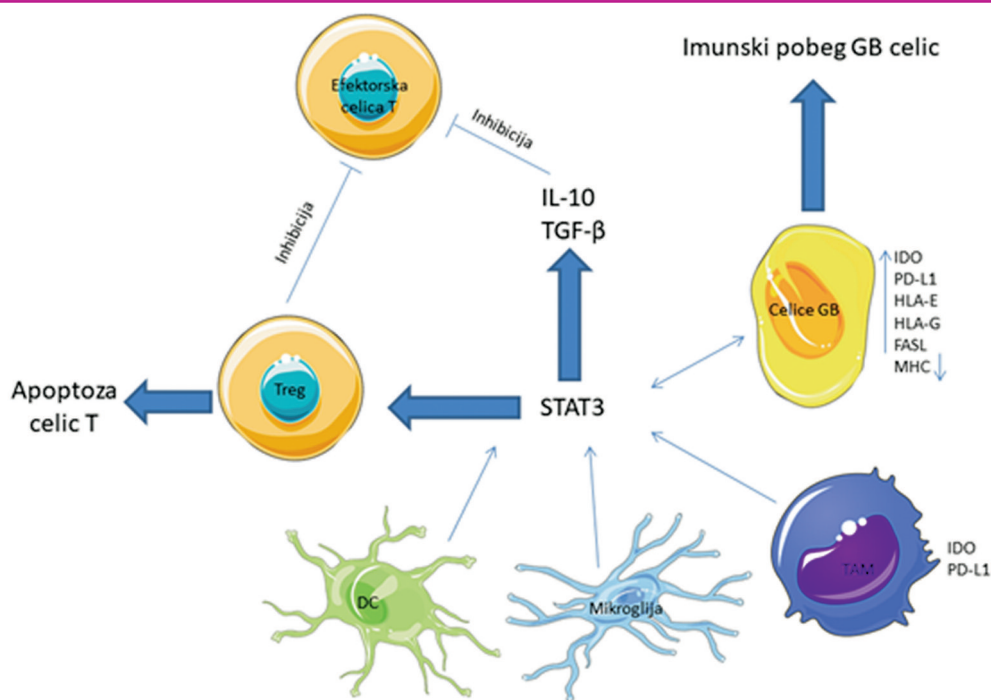
Dolgo časa je veljalo prepričanje, da je centralni živčni sistem organ v imunološkem mirovanju, ki ga vzdržujejo izključno celice mikroglije. Le-te pa pred vsemi interakcijami perifernega imunskega sistema ščiti krvno-možganska pregrada. V zadnjih dvajsetih letih so ugotovili, da se znotraj centralnega živčnega sistema prepletajo elementi prirojenega in pridobljenega imunskega sistema. Poleg tega je krvno-možganska pregrada pri poškodbah in vnetjih ter pri razvoju tumorjev propustna in tako dostopna imunskim celicam (11). Kot primer, aktivirani limfociti T, ki se nahajajo v vratnih bezgavkah, lahko prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado in vstopijo iz limfnega sistema v centralni živčni sistem (12, 13).

Čeprav ima centralni živčni sistem edinstveni imunski mehanizem, je za glioblastom značilna visoka stopnja imunosupresije (slika 1). Na sliki so prikazani posamezni mehanizmi, ki v tumorju glioblastoma delujejo imunosupresivno. Fonseca je s sodelavci raziskoval zbiranje celic mikroglije in makrofagov v glioblastomu in dokazal, da mikroglija z uravnavanjem transformirajočega rastnega faktorja beta (TGF- β) preko stika s tumorskimi celicami spodbuja napredovanje tumorja (12, 14). Maligne glioblastomske celice izražajo in izločajo imunosupresivne dejavnike, kot so prostaglandini E2 in citokini (TGF- β in IL-10), ki rekrutirajo regulatorne celice T, inhibirajo proliferacijo in aktivnost efektorskih celic T in antigen predstavitevni celic ter zavirajo zorenje dendritičnih celic (12, 13). V začetni fazi razvoja tumorja infiltracija regulatornih celic T z izražanjem ligandov imunskih kontrolnih točk, ki citotoksičnim limfocitom T preprečijo proliferacijo in sprostitvev imunsko aktiviranih citokinov, prispeva k zaščiti tumorja (11). S tumorjem povezani makrofagi (TAM M2), ki imajo imunosupresivni fenotip, izločajo faktorje, kot je npr. TGF- β , in s tem zaustavijo citotoksične celice T ter rekrutirajo metaloproteazo MMP14. V pozitivni povratni zanki s tumorjem povezani makrofagi izločajo MMP14, ki stimulira tumorske ce-

lice, da pričnejo izločati MMP2 in MMP9, in s tem pospešijo uničenje zunajceličnega ogrodja in odstranitev apoptotičnih celice, kar oboje vodi k razširitvi tumorja (11).

Bloch je poročal, da makrofagi, izolirani iz periferne krvi bolnikov z glioblastomom, izražajo povišano raven liganda programirane celične smrti (PD-L1), ki aktivira receptor PD-1 in s tem omeji delovanje citotoksičnih limfocitov T (14, 15).

Celice glioblastoma se lahko z izražanjem receptorjev FASL, B7 in PD-L1 vežejo na negativne regulatorne faktorje imunskih funkcij in tako inhibirajo aktivnost citotoksičnih limfocitov T in spodbudijo »imunski pobeg« glioblastoma (16). Znižano izražanje klasičnih molekul pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) in prekomerno izražanje določenih neklasičnih molekul MHC (HLA-G, HLA-E) lahko inhibirata citotoksičnost citotoksičnih limfocitov T in citotoksičnost celic T, kar prav tako prispeva k imunskemu pobegu tumorja (12, 17). Središče imunskega pobega so med drugim tudi glioblastomske matične celice, saj predstavljajo samoobnavljajočo se populacijo tumorskih celic, ki so odgovorne za širjenje glioblastoma, angiogenezo, odpornost na kemo- oz. radioterapijo in imunsko slabljenje.



Slika je narejena s programom SMART – Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) pod licenco Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Slika 1: Imunski pobeg celic glioblastoma (GB).

Figure 1: Immune escape of glioblastoma (GB) cells.

Glioblastomske matične celice prispevajo k spremenjeni imunogenosti, zmanjšanemu izražanju kompleksa MHC I in ekspresiji PD-L1. Slednja sproži indukcijo T-celične anergije in prepreči imunski odgovor. Glioblastomske matične celice na svoji površini nimajo kostimulatornih molekul CD80 in CD86, ki sta potrebni za aktivacijo antigen specifičnih citotoksičnih limfocitov T (18, 19). Izločajo tudi TGF- β , ki stimulira rast tumorja, galektin-3, ki sproži citotoksično T-celično apoptozo, in arginazo ter periostin, ki spodbujata diferenciacijo okoliških s tumorjem povezanih makrofagov M2. Z izločanjem vseh teh dejavnikov lahko glioblastomske matične celice usmerjajo in nadzorujejo svoje imunsko mikrookolje (11, 20).

3 IMUNOTERAPIJA PRI ZDRAVLJENJU GLIOBLASTOMA

3.1 KLINIČNE FAZE

Zdravila morajo prestati številna dolgotrajna in zahtevna preskušanja pred njihovo odobritvijo na trgu. Klinična preskušanja zdravil razdelimo v štiri faze (21–23). V prvi klinični fazi zdravilo testiramo na manjši skupini (do 100) zdravih posameznikov ali pa na rakavih bolnikih z napredujočo boleznijo, kjer določimo varen odmerek zdravila in identificiramo možne neželene učinke (21, 22). V drugi klinični fazi zdravilo testiramo na večjemu številu rakavih bolnikov (100 do 500) in določimo učinkovitost zdravila in dodatne neželene učinke (21, 22). V tretji klinični fazi, ki je običajno randomizirana, pa zdravilo testiramo na še večjem številu bolnikov (1000 do 5000), da določimo učinkovitost zdravila ter možne neželene učinke in nato uspešnost primerjamo z obstoječimi zdraviljenji (21, 22). Četrta faza obsega ovrednotenje zdravila, ko je to že na trgu.

3.2 KLINIČNE RAZISKAVE V DRUGI IN TRETJI FAZI PRESKUŠANJA

V tretjo fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje glioblastoma so prešli imunoterapevtski pristopi, kot so peptidna cepiva in cepiva iz dendritičnih celic, celična terapija ter inhibitorji imunskih kontrolnih točk (preglednica 1).

3.2.1 Peptidna cepiva

Peptidna cepiva so lahko usmerjena proti enemu ali več antigenom. Peptidno cepivo, usmerjeno proti mutiranemu

receptorju za epidermalni rastni faktor (EGFR), NCT01480479, je sestavljeno iz 14 aminokislin dolgega neoplazemskega epitopa, vezanega na hemocianin iz morskih polžev, in granulocitne in monocitne kolonije spodbujajočega dejavnika. EGFR je namreč obetajoča tarča glioblastoma, saj je prekomerno izražen pri 34 do 63 % bolnikov. Od teh jih ima 25 do 64 % delež 801 baznih parov, ki zapisujejo 267 aminokislin zunanje domene receptorja, in jo označujemo z EGFRvIII. Mutacija povzroči konstitutivno aktivacijo receptorja, neodvisno od vezave liganda (24). Klinično raziskavo so izvedli na bolnikih s primarnim glioblastomom z izraženim EGFRvIII, ki so prejeli standardno zdravljenje (kirurško odstranitev tumorja ter radio- in kemoterapijo), pri čemer med zaključkom standardne terapije in začetkom imunoterapije bolezen ni napredovala. Raziskavo so predčasno prekinili, saj vmesna analiza rezultatov skupine bolnikov z minimalnim ostankom rakavih celic (*minimal residual disease*) ni pokazala razlike med smrtnostjo bolnikov v kontrolni skupini in bolnikov, ki so prejeli cepivo (25). Med razvojem in kliničnimi preskušnji so ugotovili, da ekspresija EGFRvIII ni stabilna, saj 50 % ponavljajočih se glioblastomskih tumorjev spontano preneha izražati EGFRvIII (26). Prav tako neuspešna je bila raziskava personaliziranega peptidnega cepiva, UMIN000006970, usmerjenega proti večjemu številu antigenov (dvem do štirim), izbranih na podlagi analize bolnikovih protiteles IgG (27). Kljub neuspešnosti teh raziskav so v trenutnem razvoju še drugi terapevtski pristopi, med drugimi celice CAR-T, mikrobnna cepiva in protitelesa z vezanim toksinom, usmerjena proti EGFR ali EGFRvIII (28, 29).

3.2.2 Celična terapija z dendritičnimi celicami

Dendritične celice so pomembna povezava med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom. Njihova vloga je zajetje, procesiranje in predstavitev potencialnih antigenov celicam T in z usmerjanjem diferenciacije naivnih celic T vplivajo na delovanje celične imunosti. Učinkovito cepivo iz dendritičnih celic sproži imunski odziv, pri katerem pride do eliminacije oz. inaktivacije regulatornih celic T, propada imunosupresivnega tumorskega okolja in aktivacije učinkovitih citotoksičnih limfocitov T in celic pomagalk (30). Raziskave tretjih kliničnih faz preskušanj dendritičnih celic za zdravljenje glioblastoma še niso zaključene. Na voljo so le vmesni rezultati oz. rezultati sekundarnega cilja raziskave NCT00045968. Med klinično raziskavo je 90 % vseh bolnikov, izbranih za sodelovanje, prejelo cepivo, zato rezultate primerjajo s preteklimi raziskavami in kliničnimi praksami. Mediana preživetja vseh bolnikov je bila

Preglednica 1: Seznam imunoterapij za zdravljenje glioblastoma v drugi in tretji klinični fazi.

Table 1: List of immunotherapies for glioblastoma treatment in the second and third phases of clinical trials.

IME IN OZNAKA KLINIČNIH RAZISKAV	FAZA KLINIČNE RAZISKAVE	BOLEZEN	ŠT. UDELEŽENCEV	TERAPIJA	KONTROLA	TARČA	REZULTAT
ACT IV NCT01480479	III	primarni GB EGFRvIII+	745	peptidno cepivo – rindopepimut/ GM- CSF + TMZ	TMZ + KHL	EGFRvIII	neuspešna
ITK-1 UMIN000006970	III	ponavljajoči se GB HLA-A24 pozitivni	78	peptidno cepivo ITK-1	placebo	različni tumorski antigeni	neuspešna
NCT00045968	III	primarni GB	331	cepivo DC z avtolognim tumorskim lizatom + TMZ	placebo + TMZ	različni tumorski antigeni	vmesni rezultati nakazujejo na izboljšanje preživetja
DEN-STEM NCT03548571	II/III	GB nemutiran IDH, MGMT- metiliran promotor	60	cepivo DC	ST	različni tumorski antigeni	ni podatka (v pridobivanju kandidatov)
ADCTA NCT04277221	III	ponavljajoči se GB	118	cepivo DC, bevacizumab kot ST	placebo, bevacizumab kot ST	različni tumorski antigeni	ni podatka (V pridobivanju kandidatov)
INNOCELL NCT00807027	III	primarni GB	180	CIK + ST	ST	tumor	izboljša preživetje brez napredovanja bolezni
CheckMate 143 NCT02017717	III	ponavljajoči se GB	626	nivolumab	bevacizumab	PD-1	neuspešna
CheckMate 498 NCT02617589	III	ponavljajoči se GB MGMT- nemetiliran	550	Radioterapija + nivolumab	ST	PD-1	neuspešna
CheckMate 548 NCT02667587	III	primarni GB MGMT metiliran promotor	693	nivolumab + ST	placebo + ST	PD-1	ne izboljša preživetja brez napredovanja bolezni, celokupno preživetje še testirajo

GB – glioblastom, ST – standardna terapija (temozolomid in radiacija), KHL – hemocianin iz morskih polžev (keyhole limpet hemocyanin), CIK – s citokini inducirani citotoksični limfociti T, EGFRvIII – epidermalni rastni faktor z delecijo 267 aminokislin zunanje domene receptorja, GM-CSF – granulocitne in monocitne kolonije stimulirajoči faktor, TMZ – temozolomid, HLA-A24 – humani levkocitni antigen A24, DC – dendritične celice, MGMT – metil-gvanin metiltransferaza, IDH – izocitrat dehidrogenaza, PD-1 – receptor programirane celične smrti 1. Podatki za vse klinične raziskave, razen UMIN000006970, so pridobljeni s spletne strani www.clinicaltrials.org (dostop: junij 2020). Podatki za klinično raziskavo UMIN000006970 so pridobljeni na spletni strani <https://rctportal.niph.go.jp> (dostop: junij 2020).



23,1 meseca v primerjavi z od 15 do 17 mesecev pri kontrolnih bolnikih v preteklih kliničnih raziskavah in 34,7 mesecev v primeru bolnikov z metiliranim promotorjem MGMT (31). V statusu pridobivanja kandidatov sta še dve klinični raziskavi s cepivi iz dendritičnih celic. Pri klinični raziskavi NCT03548571 so bolnikove nezrele dendritične celice, pridobljene iz monocitov, transficirali z mRNA, ki so jo izolirali iz bolnikovih rakavih matičnih celic. Poleg bolnikovih dendritičnih celic, transficiranih z mRNA, so cepivu dodali tudi dendritične celice, transficirane z mRNA survivina in telomeraze (hTERT, *human telomerase reverse transcriptase*). Mediana preživetja dvajsetih bolnikov brez napredovanja bolezni, ki so prejeli cepivo z dendritičnimi celicami z mRNA rakavih matičnih celic, je bila v prvi in drugi klinični fazi (NCT00846456) 694 dni, v primerjavi s kontrolno skupino, kjer je bila mediana preživetja 236 dni. Tretja klinična faza NCT03548571 je namenjena bolnikom z glioblastomom divjega tipa in nemetiliranim promotorjem MGMT (32). Drugo cepivo (klinična raziskava NCT04277221) so pripravili iz avtolognih dendritičnih celic in avtolognih celic tumorja. Namenjeno je bilo bolnikom s ponavljajočim se glioblastomom. Cepivo so v fazi kliničnih preskušanj I/II preizkusili na 17 bolnikih s primarnim ali ponovnim glioblastomom, ki so prestali kirurško odstranitev tumorja, pri čemer so bolniki s primarnim glioblastomom po operaciji prejeli še radioterapijo. Za kontrolno skupino so služili predhodno obravnavani bolniki z glioblastomom, ki so prejeli standardno terapijo, in so se s preiskovano skupino ujeli po spolu in starosti. Glede na kontrolo se je mediana preživetja povečala s 380 dni na 520 dni za bolnike z glioblastomom, preživetje po treh letih se je povečalo s 3,2 % na 37,5 % bolnikov in 18,8 % bolnikov je živel več kot pet let po terapiji. Delež preživetja bolnikov kontrolne populacije po petih letih je bil 0 % (33).

3.2.3 Celična terapija s s citokini induciranimi celicami ubijalkami

Za zdravljenje glioblastoma so testirali tudi celično terapijo (klinična raziskava NCT00807027), pri kateri so uporabili s citokini inducirane celice ubijalke (CIK, *cytokine induced killer cells*). To so od poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa neodvisni citotoksični limfociti T, pridobljeni iz perifernih monocitov bolnikov, ki so gojeni *in vitro* z dodatkom interleukina 2 in protitelesa proti CD3. Terapijo so preizkusili na bolnikih s primarnim glioblastomom. Rezultati so pokazali, da terapija ni izboljšala celokupnega preživetja bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino, izboljšala pa je preživetje brez napredovanja bolezni (34).

3.2.4 Zaviralci imunskih kontrolnih točk

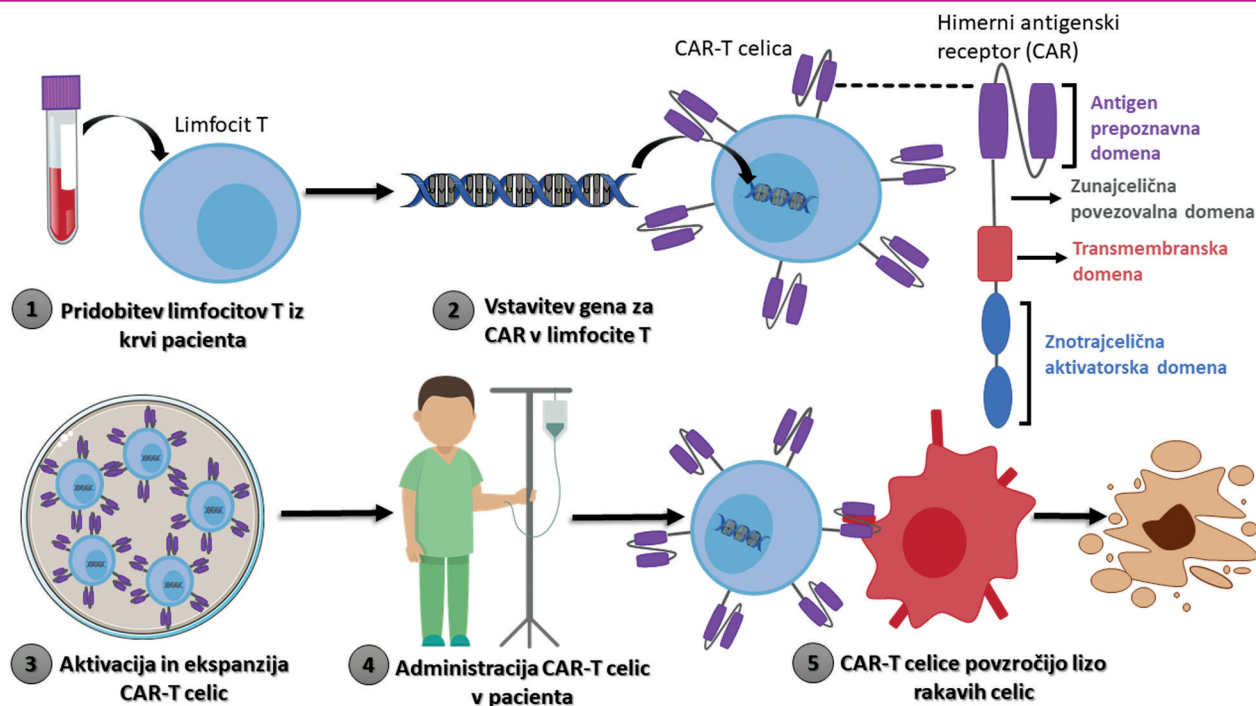
Zaviralci imunskih kontrolnih točk so najpogosteje protitelesa, ki se vežejo na specifične receptorje ali ligande kontrolnih točk z namenom prekinitve zaviralnih signalov. Za glioblastom je značilno izražanje liganda PD-L1 v različnem obsegu. Dokazali so nadizražanje PD-L1 pri 88 % bolnikov s primarnim glioblastomom in 72,2 % bolnikov s ponavljajočim se glioblastomom (35). V klinični raziskavi NCT02017717 so primerjali učinkovitost nivolumaba v primerjavi z bevacizumabom. Razlik v celokupnem preživetju med skupinama bolnikov ni bilo (36). Nivolumab klinično preskušajo tudi pri bolnikih z nemetiliranim promotorjem MGMT, ki so manj odzivni na zdravljenje s temozolomidom. V raziskavi NCT02617589 bodo primerjali celokupno preživetje bolnikov, ki bodo poleg radioterapije prejeli nivolumab, in bolnikov, ki bodo poleg radioterapije prejeli temozolomid. Prav tako poteka raziskava, kjer nivolumab preskušajo na bolnikih s primarnim glioblastomom in metiliranim promotorjem MGMT.

4 TERAPIJA S T-CELICAMI S HIMERNIMI RECEPTORJI ZA TUMORSKE ANTIGENE ZA ZDRAVLJENJE GLIOBLASTOMA

Eden izmed najbolj obetavnih imunoterapevtskih pristopov v zadnjih letih je terapija z modificiranimi celicami T, ki izražajo himerne receptorje za tumorske antigene (CAR, *chimeric antigen receptor*). Celična terapija CAR-T je razmeroma nova terapija v onkologiji, ki pa je že splošno priznana za zdravljenje B-celičnega limfoma in levkemije (37).

Avtologne celice T iz bolnikov lahko z genskim inženirstvom modificiramo tako, da izražajo himerne receptorje – CAR za tumorske antigene. Uspešno modificirane celice po ekspanziji vnesemo nazaj v bolnika, kjer povzročajo tarčno uničenje tumorskih celic, ki izražajo specifičen antigen (slika 2). Na sliki je prikazan način uporabe celic CAR-T pri bolniku in sestava receptorja CAR.

CAR so fuzijski proteini, sestavljeni iz zunajcelične domene, ki specifično veže tarčno molekulo, izraženo na površini tumorskih celic, zunajcelične povezovalne in transmembranske domene ter znotrajcelične aktivatorske domene, ki omogoča aktivacijo limfocitov T (slika 2). Zunajcelična domena je v večini primerov antigen prepoznavni enoveržni variabilni fragment protitelesa (scFv), znotrajcelična pa ζ -veriga T-celičnega receptorja CD3. Glavna prednost tehnologije CAR-T je ravno modularnost, saj omogoča za-



Slika je narejena s programom SMART – Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) pod licenco Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Slika 2: Potek celične terapije CAR-T in sestava CAR.
 Figure 2: The course of CAR-T cell therapy and the composition of CAR.

menjive in strukturno različne možnosti za vsako funkcionalno domeno ter posledično izgradnjo raznovrstnih receptorjev z različnimi strukturnimi lastnostmi in specifičnostmi za antigene. Novejše generacije receptorjev vsebujejo tudi znotrajcelične kostimulacijske domene iz receptorjev CD28 in 4-1BB, ki ojačajo aktivacijo limfocitov T. Posledično ob vezavi antigena na zunajcelično domeno pride do povečane produkcije citokinov, proliferacije in diferenciacije ter obstojnosti celic T, kar še izboljša delovanje terapije (38). Učinkovitost in uspešnost tehnologije CAR-T temelji na tem, da zaobide dva ključna koraka, ki sta sicer nujno potrebna za aktivacijo pridobljenega imunskega odziva: potrebo po predstavitvi antigenov v kontekstu molekul poglobitvenega histokompatibilnostnega kompleksa in potrebo po kostimulacijskih signalih (14, 37). Antigen prepoznavne domene dajejo celicam CAR-T specifičnost za antigene, ki se pogosto izražajo v tumorskih celicah. Tumorski antigeni, ki so doslej najbolj raziskani kot možne tarče CAR za zdravljenje glioblastoma, so IL-13Ra2 (receptor za interlevkin-13 z alfa 2-verigo), EGFRvIII in HER2 (receptor človeškega epidermalnega rastnega de-

javnika 2) (14, 37). Povečano izražanje IL-13Ra2 spodbuja napredovanje tumorja in poveča stopnjo malignosti, zato je receptor tudi negativni prognostični indikator bolezni (39). V prvi klinični fazi, kjer so preskušali varnost in učinkovitost celične terapije CAR-T za IL-13Ra2, so odkrili, da je terapija varna in da obstaja le majhno tveganje za sicer pogoste zaplete tovrstnih terapij, kot je sindrom sproščanja citokinov (40, 41). Pri enem od treh testiranih bolnikov je prišlo do regresije tumorja in povečane koncentracije citokinov v cerebrospinalni tekočini, a se je po 7,5 mesecih tumor ponovno pojavil (40, 42). Najbolj raziskan tumor specifični antigen je EGFRvIII (43). Raziskave infiltracije celic CAR-T v tumorsko tkivo pri desetih bolnikih, so pokazale, da je pri večini bolnikov prišlo do zmanjšanja izražanja EGFRvIII v odstranjenih tumorjih po enkratni periferni infuziji EGFRvIII celic CAR-T. Pri nobenem bolniku ni prišlo do recesije tumorja, kljub temu pa je potrebno poudariti, da je bila to skupina s sicer slabo prognozo (44). Tirozin-kinazni receptor HER2, ki je povečano izražen pri določenih oblikah glioblastoma, je potencialna tarča celic CAR-T (45). Periferna infuzija celic HER2 CAR-T je pokazala relativno

varnost te metode tako kot tudi obstojnost celic CAR-T skozi čas (meritve so bile opravljene v časovnem obdobju enega leta). Sedmim od 16 bolnikov se je bolezen stabilizirala za obdobje osmih tednov do 29 mesecev, pri enem bolniku je prišlo do delne regresije tumorja (46).

Rezultati prvih kliničnih raziskav s celicami CAR-T dokazujejo, da je terapija varna, poleg tega pa se modificirane celice T lahko infiltrirajo v glioblastomsko tkivo, kjer so obstojne in se aktivirajo, in pri enem bolniku so celo odstranile precejšnjo količino malignega tkiva (14, 40). Kljub temu pa je bilo pri številnih raziskavah očitno, da imajo terapije, ki vključujejo samo celice CAR-T, nezadostno protitumorsko aktivnost. Natančni vzroki ostajajo še neznani, predpostavljajo pa, da ciljanje samo enega antigena pri zelo heterogenem tumorju, kot je glioblastom, ni zadostno za odstranitev vseh rakavih celic. To teorijo potrjuje tudi dejstvo, da so bili najboljši rezultati terapije CAR-T doseženi pri rakah, ki so zelo klonalni, kot so levkemije in limfomi. Zato bo v prihodnjih kliničnih raziskavah potrebno preiskati učinke terapije CAR-T, ki ciljajo na več različnih tumorskih antigenov hkrati (14, 37, 47). Trivalentne celice CAR-T, ki ciljajo tri pogoste glioblastomske antigene (HER2, IL-13R α 2, EphA2) so že zasnovane (48). Eden izmed glavnih razlogov za nepopolno učinkovitost terapije bi lahko bil ta, da do sedaj ustvarjene celice CAR-T ne prepoznajo in posledično ne uničijo glioblastomskih matičnih celic, ki lahko nato povzročijo ponovitev bolezni (49). V drugih raziskavah so ugotovili, da so celice CAR-T, ki ciljajo na IL13R α 2, HER2 in EGFRvIII, sposobne odpraviti diferencirane celice glioblastoma in glioblastomske matične celice, kar kaže, da citotoksičnost, ki jo posreduje CAR ni odvisna od matičnosti celic glioblastoma (45, 50–52). Vendar se kljub temu raziskave osredotočajo tudi na celice CAR-T, usmerjene proti antigenom, ki so specifični za glioblastomske matične celice. Eden izmed takih markerjev je transmembranski glikoprotein CD133, pri katerem so CD133-CAR-T pokazale spodbudne rezultate v predkliničnih raziskavah (49). T-celice CD133-CAR so pokazale predklinično citotoksičnost proti glioblastomskim matičnim celicam, pridobljenim iz bolnikov, pa tudi protitumorski odziv pri bolnikih s tumorji v jetrih, trebušni slinavki in debelem črevesu. Vendar pa se CD133 izraža tudi v nevralnih matičnih celicah, s čimer se porajajo varnostni pomisleki pri uporabi CD133-CAR za bolnike z glioblastomom (51, 53).

Raziskujejo tudi učinek dodatnih modifikacij celic CAR-T s sistemom CRISPR/Cas9, kjer bi z delekcijo genov, kot je diacylglicerol-kinaza (DGK), dosegli manjšo občutljivost celic CAR-T na imunosupresivne učinke tumorskega mikrookolja (54). Pristopi za izboljšanje učinkovitosti celic CAR-T vklju-

čujejo tudi kombinirane terapije z zaviralci imunskih kontrolnih točk (55). Trenutno potekajo prve klinične raziskave, ki kombinirajo celice EGFRvIII-CAR-T s protitelesom pembrolizumab in IL-13R α 2-CAR-T celice s protitelesoma ipilimumab ter nivolumab.

5 ZAKLJUČEK

Pri bolnikih z glioblastomom je zaradi visoke stopnje umrljivosti kljub zdravljenju s standardno terapijo še vedno potreba po iznajdbi učinkovitejšega zdravila. Kljub imunosupresivnemu mikrookolju glioblastoma in prekomernemu izražanju nekaterih antigenov je imunoterapija veljala za obetaven način zdravljenja glioblastoma. Prvi imunoterapevtski pristop je temeljil na ciljanju specifičnih tumorskih antigenov (npr. peptidno cepivo, usmerjeno proti EGFRvIII). Slabost teh cepiv je predvsem, da tumorske celice pogosto nehajo izražati tarčni antigen. Poleg tega so se tudi personalizirana peptidna cepiva, usmerjena proti večjem številu antigenov, izkazala kot neuspešna.

Drugi pristop temelji na izboljšanju imunskega odziva na tumor, saj glioblastom deluje na svoje okolje imunosupresivno. Največji uspeh zaključenih kliničnih preskušanj v tretji fazi je izboljšanje preživetja bolnikov s primarnim glioblastomom brez napredovanja bolezni pri uporabi celične terapije s s citokini induciranimi citotoksičnimi limfociti T, vendar se celokupno preživetje glede na kontrolno skupino ni podaljšalo. Na odgovor, kako uspešna so cepiva iz dendritičnih celic, je potrebno počakati na zaključek tretje faze kliničnih preskušanj.

Pri pregledu imunoterapij, ki so v tretji klinični fazi, zaključujemo, da trenutno nobena ni uspešno prestala tretje klinične faze in imela dolgotrajnega učinka na preživetje. Zato je poleg izboljšave obstoječih imunoterapij nujno tudi iskanje novih pristopov, kot je npr. terapija z modificiranimi celicami T (CAR-T). Prvi rezultati kažejo, da je terapija uspešna predvsem pri rakah z visoko stopnjo klonalnosti, kot sta levkemija in B celični limfom. Pri glioblastomu, za katerega je značilna visoka stopnja heterogenosti, ciljanje samo enega antigena ni zadostno, zato je pomembno snovanje večvalentnih celic CAR-T, ki bi ciljale različne tumorske antigene hkrati. Raziskujejo tudi modifikacije celic CAR-T in kombinacije terapij, npr. zaviralci imunskih kontrolnih točk skupaj s celicami CAR-T. Poleg kombiniranja različnih terapij bo v prihodnje potrebno iskanje novih tumorsko spe-

cifičnih antigenov in napovednih bioloških označevalcev, kot so mutacijsko breme tumorja in neoantigenski odtis, ki bi lahko predstavljali učinkovite tarče za imunoterapijo.

6 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat sodelovanja Medicinskega centra za molekularno biologijo, MF UL, v programu Interreg Volunteer Youth v sklopu projekta Interreg EC 2014-2020, ref. št. 146, okrajšava: TRANS-GLIOMA, ter raziskovalnega projekta Z3-2649, programa P1-0390 in programa Mladih raziskovalcev, financiranih s strani ARRS.

7 LITERATURA

- Geraldo LHM, Garcia C, da Fonseca ACC, Dubois LGF, de Sampaio ESTCL, Matias D, et al. Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. *Trends Cancer*. 2019;5(1):46-65.
- Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2402-9.
- Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15017.
- Zanders ED, Svensson F, Bailey DS. Therapy for glioblastoma: is it working? *Drug Discov Today*. 2019;24(5):1193-201.
- Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhanel M, Spruss T, et al. Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 2002;110(9):1309-18.
- Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2015;5:159.
- Ampie L, Woolf EC, Dardis C. Immunotherapeutic advancements for glioblastoma. *Front Oncol*. 2015;5:12.
- Shahid K, Khalife M, Dabney R, Phan AT. Immunotherapy and targeted therapy-the new roadmap in cancer treatment. *Ann Transl Med*. 2019;7(20):595.
- Huang PW, Chang JW. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomed J*. 2019;42(5):299-306.
- Cesano A, Warren S. Bringing the next Generation of Immunology Biomarkers to the Clinic. *Biomedicine*. 2018;6(1).
- Wilcox JA, Ramakrishna R, Magge R. Immunotherapy in Glioblastoma. *World neurosurgery*. 2018;116:518-28.
- Kong Z, Wang Y, Ma W. Vaccination in the immunotherapy of glioblastoma. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(2):255-68.
- Candeias SM, Gaipl US. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2016;16(1):101-7.
- Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(7):422-42.
- Bloch O, Crane CA, Kaur R, Safaee M, Rutkowski MJ, Parsa AT. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res*. 2013;19(12):3165-75.
- De Felice F, Musio D, Cassese R, Gravina GL, Tombolini V. New Approaches in Glioblastoma Multiforme: The Potential Role of Immune-check Point Inhibitors. *Current cancer drug targets*. 2017;17(3):282-9.
- Kren L, Slaby O, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, et al. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance? *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2011;31(2):129-34.
- Lottaz C, Beier D, Meyer K, Kumar P, Hermann A, Schwarz J, et al. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer research*. 2010;70(5):2030-40.
- Wei J, Barr J, Kong LY, Wang Y, Wu A, Sharma AK, et al. Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(2):461-73.
- Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-oncology*. 2010;12(11):1113-25.
- Griffiths G. *Clinical trials in oncology. Medicine*. 2020;48(2):128-31.
- Portier WS. *Cancer Clinical Trials: Implications for Oncology Nurses. Semin Oncol Nurs*. 2020;36(2):150998.
- Verweij J, Hendriks HR, Zwierzina H, Cancer Drug Development F. *Innovation in oncology clinical trial design. Cancer Treat Rev*. 2019;74:15-20.
- Gan HK, Cvrjjevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *The FEBS journal*. 2013;280(21):5350-70.
- Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1373-85.
- van den Bent MJ, Gao Y, Kerkhof M, Kros JM, Gorlia T, van Zwieten K, et al. Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. *Neuro-oncology*. 2015;17(7):935-41.
- Terasaki M, Narita Y, Arakawa Y, Sugiyama K, Aoki T, Kanamori M, et al. Randomized, double-blind, phase III trial of a personalized peptide vaccination for human leukocyte antigen-A24-positive glioblastoma multiforme patients refractory to temozolomide-based therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):2000-.
- Chandramohan V, Bao X, Yu X, Parker S, McDowall C, Yu YR, et al. Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):142.
- Zebertavage L, Bambina S, Shugart J, Alice A, Zens KD, Lauer P, et al. A microbial-based cancer vaccine for induction of EGFRvIII-specific CD8+ T cells and anti-tumor immunity. *PLoS one*. 2019;14(1):e0209153.
- Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *NIH Public Access*; 2010. p. 464-78.
- Liau LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical



- trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):1-1.
32. Vik-Mo EO, Nyakas M, Mikkelsen BV, Moe MC, Due-Tønnesen P, Suso EMI, et al. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(9):1499-509.
 33. Chang CN, Huang YC, Yang DM, Kikuta K, Wei KJ, Kubota T, et al. A phase I/II clinical trial investigating the adverse and therapeutic effects of a postoperative autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with malignant glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2011;18(8):1048-54.
 34. Kong DS, Nam DH, Kang SH, Lee JW, Chang JH, Kim JH, et al. Phase III randomized trial of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy for newly diagnosed glioblastoma in Korea. *Oncotarget*. 2017;8(4):7003-13.
 35. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2015;17(8):1064-75.
 36. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2020.
 37. McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Current treatment options in oncology*. 2019;20(3):24.
 38. Chang ZL, Chen YY. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends in molecular medicine*. 2017;23(5):430-50.
 39. Thaci B, Brown CE, Binello E, Werbaneth K, Sampath P, Sengupta S. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma therapy. *Neuro-oncology*. 2014;16(10):1304-12.
 40. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *The New England journal of medicine*. 2016;375(26):2561-9.
 41. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(1):47-62.
 42. Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Ostberg JR, Chang WC, et al. Bioactivity and Safety of IL13Ralpha2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(18):4062-72.
 43. Rutkowska A, Stoczynska-Fidelus E, Janik K, Włodarczyk A, Rieske P. EGFR(vIII): An Oncogene with Ambiguous Role. *Journal of oncology*. 2019;2019:1092587.
 44. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrissette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2017;9(399).
 45. Ahmed N, Salsman VS, Kew Y, Shaffer D, Powell S, Zhang YJ, et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):474-85.
 46. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielskiowicz K, Kalra M, Landi D, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*. 2017;3(8):1094-101.
 47. Weenink B, French PJ, Sillevs Smitt PAE, Debets R, Geurts M. Immunotherapy in Glioblastoma: Current Shortcomings and Future Perspectives. *Cancers*. 2020;12(3).
 48. Donovan LK, Delaidelli A, Joseph SK, Bielskiowicz K, Fousek K, Holgado BL, et al. Locoregional delivery of CAR T cells to the cerebrospinal fluid for treatment of metastatic medulloblastoma and ependymoma. *Nature medicine*. 2020;26(5):720-31.
 49. Vora P, Venugopal C, Salim SK, Tatari N, Bakhshinyan D, Singh M, et al. The Rational Development of CD133-Targeting Immunotherapies for Glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2020;26(6):832-44 e6.
 50. Brown CE, Starr R, Aguilar B, Shami AF, Martinez C, D'Apuzzo M, et al. Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL13Ralpha2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13-zetakine-redirection T Cells. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2199-209.
 51. Akhavan D, Alizadeh D, Wang D, Weist MR, Shepphird JK, Brown CE. CAR T cells for brain tumors: Lessons learned and road ahead. *Immunol Rev*. 2019;290(1):60-84.
 52. Morgan RA, Johnson LA, Davis JL, Zheng Z, Woolard KD, Reap EA, et al. Recognition of glioma stem cells by genetically modified T cells targeting EGFRvIII and development of adoptive cell therapy for glioma. *Hum Gene Ther*. 2012;23(10):1043-53.
 53. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005;353(8):811-22.
 54. Jung IY, Kim YY, Yu HS, Lee M, Kim S, Lee J. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. *Cancer research*. 2018;78(16):4692-703.
 55. Morales-Kastresana A, Labiano S, Quejglas JI, Melero I. Better performance of CARs deprived of the PD-1 brake. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(20):5546-8.

REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL: METFORMIN IN VALPROJSKA KISLINA ZA ZDRAVLJENJE GLIOBLASTOMA

DRUG REPURPOSING: METFORMIN AND VALPROIC ACID FOR GLIOBLASTOMA TREATMENT

AVTORICE / AUTHORS:

Zala Žužek, mag. mikrobiol.^{1,2}

Lara Bolčina, mag. farm.^{1,3}

Ana Kump, mag. farm.^{1,4}

znanstv. sod. dr. Ivana Jovčevska, inž. kemije¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Medicinski center za molekularno biologijo,
Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

³ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

⁴ Inštitut Jožef Stefan,
Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ivana.jovcevska@mf.uni-lj.si

POVZETEK

Glioblastom je najpogostejša in najbolj agresivna oblika primarnega možganskega tumorja pri človeku. Zdravljenje, ki omogoča podaljšanje življenjske dobe pacientov do 15 mesecev, obsega operativni poseg, obsevanje in kemoterapijo. Zaradi specifične lokacije tumorja je odkrivanje novih zdravil zapleteno in drago, zato je repozicioniranje že znanih zdravil časovno in ekonomsko učinkovit pristop za odkrivanje alternativnih oblik zdravljenja. Številna že obstoječa zdravila, katerih prvotni namen ni zdravljenje raka, so že izkazala svoj potencial pri zdravljenju glioblastoma. Pri zdravljenju glioblastoma pozornost posvečamo učinkovinom, ki lahko prehajajo krvno-možgansko pregrado: antidiabetikom, antipsihotikom in antiepileptikom. Raziskave kažejo, da lahko kombinacije antidiabetika metformina oz. antiepileptika valprojske kisline s standardno terapijo za glioblastom podaljšajo preživetje bolnikov. Kljub vsem do sedaj znanim dejstvom, pa je potrebno natančneje opredeliti mehanizme delovanja in vloge repozicioniranih učinkovin pri razvoju in zdravljenju glioblastoma, da preprečimo nepotrebne zaplete in morebitne škodljive učinke.

KLJUČNE BESEDE:

glioblastom, metformin, repozicioniranje zdravil, valprojska kislina

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common and lethal brain malignancy. Standard treatment consists of surgery, radiotherapy and chemotherapy, and results in life expectancy of 15 months after diagnosis. Due to the specific location of the tumor, designing new drugs is complicated and expensive. Drug repurposing is an economic and time-saving way for identification of alternative treatment options. Numerous existing drugs whose initial purpose was not to treat cancer, have already proven successful against glioblastoma. For glioblastoma, attention is paid to antidiabetic drugs, antipsychotics and antiepileptics that can easily cross the blood-brain barrier. Studies show that adding the antidiabetic metformin or antiepileptic drug valproic acid to the standard glioblastoma therapy might prolong patient survival. However, the exact mechanisms of action



should further be studied and possible interactions should be examined in order to avoid unnecessary complications and adverse effects.

KEY WORDS:

drug repurposing, glioblastoma, metformin, valproic acid

1 UVOD

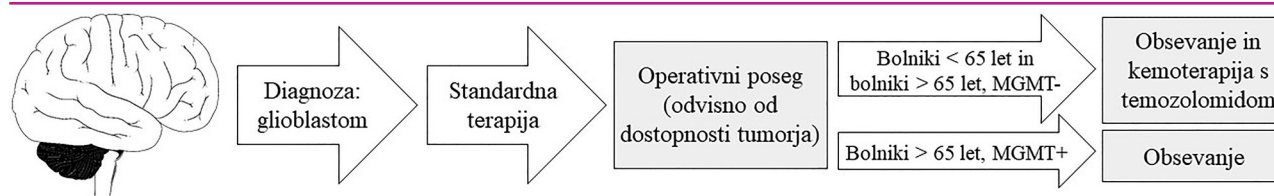
Glioblastom je vrsta možganskega tumorja, ki se razvije iz zvezdasto oblikovanih celic glia – astrocitov. Populacijo celic, v katerih se prične razvoj tumorja, imenujemo matične celice glioblastoma. Glede na klasifikacijo Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, *World Health Organization*) glioblastom uvrščamo med astrocitate razreda IV, najbolj agresivne maligne tumorje te vrste (1). V letih 2012–2016 so med možganskimi tumorji in tumorji centralnega živčnega sistema diagnosticirali kot glioblastom 14,6 % vseh tumorjev in 48,3 % malignih tumorjev (2). Potek bolezni je odvisen od lokacije in dinamike širjenja tumorja, povprečen čas preživetja zdravljenega pacienta je 15 mesecev (3). Diagnozo podamo na podlagi preiskave z magnetno resonanco (MRI, *magnetic resonance imaging*) ali z računalniško tomografijo (CT, *computed tomography*). Standardni postopki zdravljenja (slika 1) so namenjeni ohranjanju stabilnega stanja pacienta in začasnemu izboljšanju kakovosti življenja. Terapevtski pristopi vključujejo operativni poseg, obsevanje in kemoterapijo. Če lokacija tumorja omogoča kirurško odstranitev brez vpliva na funkcionalne sposobnosti bolnika, izvedemo operativni poseg. K daljši življenjski dobi pripomore zgolj popolna odstranitev tumorja skupaj z drugimi oblikami zdravljenja (4). Pri bolnikih, starejših od 65 let, določimo status metilacije promotora encima O^6 -metilgvanin DNK metiltransferaze (MGMT, *O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase*), ki ima pomembno vlogo pri

popravlilu poškodb DNK, do katerih prihaja med kemoterapijo. Bolnike, starejše od 65 let, ki imajo metilirano obliko MGMT, zdravimo samo z obsevanjem (4, 5). Bolniki z metiliranim MGMT in bolniki, mlajši od 65 let, pa zdravljenje nadaljujejo s kombinacijo obsevanja in kemoterapije s temozolomidom (TMZ) ter dodatno kemoterapijo s TMZ (4, 5) (slika 1). Poleg protitumorskega delovanja je pomembna lastnost zdravil za glioblastom tudi sposobnost prehajanja krvno-možganske pregrade. V okviru standardne terapije je na voljo le nekaj alternativ: protitelo bevacizumab proti vaskularnemu endotelijskemu rastnemu dejavniku (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) ter citostatične spojine nitrozosečnine (karmustin in lomustin) (5).

Nizka stopnja preživetja pacientov z glioblastomom je v veliki meri posledica pogoste ponovitve tumorja po zdravljenju. K ponovitvi pripomorejo genetska raznolikost, vraščanje v zdrava sosednja tkiva, hipoksično in imunosupresivno okolje tumorja ter razvoj odpornosti na zdravljenje, še posebej matičnih celic glioblastoma, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije (6, 7). Pojavlja se potreba po razvoju novih zdravil, ki zahteva veliko časa in denarja, boljša učinkovitost pa ni zagotovljena. Razvoj večine novih tarčnih terapij se ustavi pri kliničnem preskušanju zaradi neučinkovitega prehoda krvno-možganske pregrade (7).

2 REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL

V zadnjih letih se uveljavlja koncept repozicioniranja zdravil, ki temelji na iskanju nove terapevtske uporabnosti že obstoječih zdravil, prvotno namenjenih za zdravljenje drugih bolezni (6). Repozicioniranje izvedemo s farmakoepidemiološkimi raziskavami, na podlagi katerih povežemo uporabo zdravila z napredovanjem tumorja ali z metodami *in silico*, kjer z uporabo bioinformatičnih algoritmov analiziramo različne baze podatkov (NCBI TuPhenome-Genome Integrator, Human Protein Atlas, GeneCards, DrugBank



Slika 1: Standardni potek zdravljenja pacientov z glioblastomom.
Figure 1: Standard therapy for patients with glioblastoma.

itd.) in ugotavljamo nove povezave med zdravili, tarčami in boleznimi (8). Glavne prednosti repozicioniranja zdravil so nižji stroški raziskav, manj vloženega časa in manjša možnost neuspeha zaradi že opravljenih predkliničnih preiskovanj in s tem znanih farmakokinetičnih in toksikoloških lastnosti (6). Za odobritev novega namena obstoječega zdravila v Evropski uniji ni standardiziranih postopkov oziroma regulativnih smernic, potrebno pa je predložiti zadostne dokaze predkliničnih preiskovanj in podpreti z ustrežno strokovno literaturo (9, 10). Številna že obstoječa zdravila, katerih prvotni namen ni zdravljenje raka, so že izkazala svoj potencial pri zdravljenju glioblastoma (11). Mednje uvrščamo antimalarike, antidiabetike, protivnetna zdravila, zaviralce popravljanih mehanizmov DNK, zaviralce različnih signalnih poti in angiogeneze, zdravila za srčno-žilne, dermatološke in pljučne bolezni ter zdravila, ki ciljajo epigenetske modifikatorje (12, 13). V članku smo se osredotočili na antidiabetik metformin in antiepileptik valprojsko kislino, ki dokazano prehajata krvno-možgansko pregrado (7).

2.1 VLOGA ANTIDIABETIKOV

Povečana proliferativna aktivnost rakavih celic zahteva večjo potrebo po substratih, ki so potrebni za normalen potek glavnih biosinteznih poti celice, ter poveča in spremeni način porabe hranil. V zadnjih letih je proučevanje metaboloma rakavih celic omogočilo razumevanje, kako lahko presnovne spremembe, ki so povezane z rakom, povzročijo terapevtsko odpornost in kako jih lahko uporabimo kot tarče za zdravljenje. Posledično se je pozornost usmerila v iskanje zdravil, ki vplivajo na presnovne procese ogljikovih hidratov, beljakovin in lipidov (14).

Osnovno zdravljenje glioblastoma vključuje kombinacijo obsevanja in kemoterapije. Najbolj učinkovit citostatik je TMZ. Njegov mehanizem delovanja v osnovi temelji na metilaciji gvanidinske baze DNK v O⁶-metilgvanidin, kar povzroči motnje v podvojevanju DNK in tako vodi v apoptozo rakavih celic (15). Mehanizem delovanja TMZ na rakave celice vključuje številne signalne poti, med drugim aktivacijo adenozin monofosfat kinaze (AMPK, 5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (16). Eden izmed pristopov zdravljenja glioblastoma je zato dodatno povečanje aktivnosti AMPK, s čimer se lahko poveča učinkovitost TMZ. Pri tem ima pomembno vlogo metformin (14).

Metformin

Metformin ima številne fizikalno-kemijske lastnosti, ki bi lahko pozitivno doprinesle k njegovi uporabi v zdravljenju

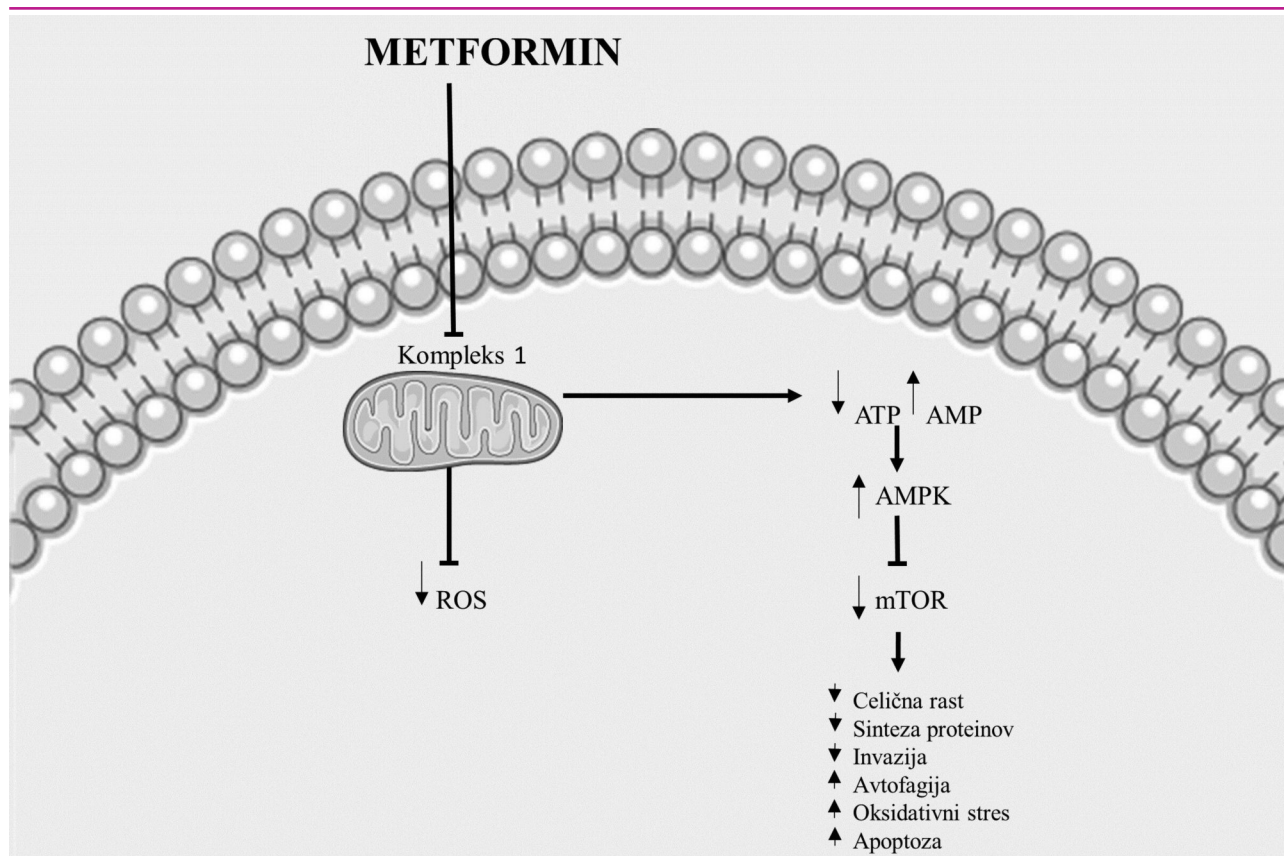
možganskih tumorjev, če bi bila njegova učinkovitost za to indikacijo odobrena. Metformin je majhna, amfoterna molekula, topna v vodi, hkrati pa ima zaradi nepolarne verige ogljikovodikov tudi lipofilne lastnosti, ki mu omogočajo vezavo na lipidne domene celične membrane (17). Dokazali so tudi njegovo sposobnost prehoda krvno-možganske pregrade (18).

Metformin je prva izbira pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2. Gre za bigvanidin, ki zmanjša nastajanje glukoze v jetrih, upočasni absorpcijo glukoze v črevesju ter poveča občutljivost celic na inzulin (19). Delovanje metformina je na molekularni ravni kompleksno in še vedno ni popolnoma raziskano, znano pa je, da deluje preko z AMP aktivirane protein kinazne poti in preko poti, ki ni odvisna od AMPK (20).

Metformin aktivira AMPK, ki preko različnih signalnih poti inhibira mehanistično tarčo za rapamicin (mTOR, *mammalian target of rapamycin*) (slika 2). Številne raziskave so potrdile povečano aktivnost mTOR v glioblastomu, zato je inhibicija tega eden izmed obetavnih terapevtskih pristopov zdravljenja (21). mTOR deluje kot serin/treonin protein kinaza, ki regulira celično rast in delitev, sintezo proteinov in lipidov, avtofagijo, celično gibljivost ter prepisovanje DNK, njegova inhibicija pa vodi v zaviranje rasti tumorja (22).

Drugi mehanizem protitumornega delovanja metformina temelji na oksidativnem stresu. Metformin inhibira kompleks 1 v dihalni verigi, ki je odgovoren za prenos elektronov z NADH na ubikinon. Inhibicija kompleksa 1 vodi v spremenjena mitohondrijski transmembranski potencial in raven kalcija, zaradi česar je motena sinteza ATP, kar povzroči povečan oksidativni stres, ki negativno vpliva na celice (23). V raziskavah so dokazali zmanjšano aktivnost kompleksa 1 v glioblastomskih celicah po vnosu metformina (23). Zaradi kompleksnosti signalnih poti, preko katerih deluje metformin, še ne poznamo natančnega mehanizma delovanja metformina na rakave celice (22).

Do sedaj so dokazali, da sočasen vnos metformina med terapijo s TMZ poveča citotoksičnost TMZ, kar ima za posledico večje uničenje rakavih celic v primerjavi z monoterapijo (23). Podoben učinek so opazili tudi pri sočasni terapiji z obsevanjem (24). Dokazali so tudi, da metformin s svojim delovanjem poveča občutljivost glioblastomskih celic na TMZ *in vitro* in *in vivo* (25). Pri sladkornih bolnikih, ki se zdravijo z metforminom, niso odkrili povezave z zmanjšanim tveganjem za razvoj glioblastoma, vendar pa se preživetje sladkornih bolnikov z glioblastomom podaljša za 10,13 mesecev (26). Ker je uporaba



Slika 2: Celične tarče metformina. Povzeto po (22).

Figure 2: Cellular targets of metformin. Adopted from (22).

metformina povezana z boljšim preživetjem pacientov z glioblastomom, na tem področju že izvajajo klinična preskušanja. Trenutno so registrirane štiri klinične raziskave, v katerih preskušajo uporabo metformina v terapiji glioblastoma, ena raziskava pa se je že zaključila, vendar njeni izsledki še niso znani (27).

Kljub vsem do sedaj znanim dejstvom pa bi bile potrebne dodatne raziskave, s katerimi bi natančneje opredelili mehanizem in vlogo metformina pri razvoju in zdravljenju glioblastoma.

2.2 UPORABA ANTIPSIHOTIKOV

Pogosto imajo bolniki z glioblastomom tudi pridružene duševne motnje, kot so depresija, tesnoba, psihoza in akutno stanje zmedenosti (28). Za izboljšanje kakovosti življenja teh bolnikov in lajšanje duševnih motenj jim pogosto predpisujemo antipsihotike (29). Prednosti uporabe znanih antipsihotikov so sposobnost prehoda krvno-možganske pregrade, kjer dosežejo enakomerno porazdelitev, in že

obstoječe klinične raziskave (28). Podatki iz epidemioloških raziskav kažejo, da uporaba antipsihotikov zmanjšuje pojavnost gliomov pri pacientih s shizofrenijo v primerjavi s splošno populacijo (30, 31). Povezavo med tipičnimi antipsihotiki in glioblastomom predstavljajo dopaminski receptorji D_2 , ki jih tipični antipsihotiki blokirajo in s tem onemogočijo proliferacijo, invazijo in rast glioblastomskih celic. Atipični antipsihotiki lahko delujejo preko zaviranja dopaminskih receptorjev D_1 , D_2 in D_4 (npr. klopazipin in olanzepin) in serotoninkega receptorja $5-HT_{2A}$ (npr. klopazipin in olanzepin), regulacije aktivnosti AMPK (npr. olanzepin in kvetiapin) ali kot epigenetski modifikatorji (npr. valprojska kislina).

Razdelitev antipsihotikov, ki jih uporabljamo v klinični praksi, je prikazana v preglednici 1. Poleg duševnih motenj pri 22 do 60 % obolelih z glioblastomom prihaja do epileptičnih napadov (7). V članku smo se osredotočili na valprojsko kislino, ki je ena izmed najbolj raziskanih in najpogosteje predpisanih zdravilnih učinkovin za preprečevanje in zdravljenje epileptičnih napadov.

Preglednica 1: Najpogostejša zdravila z vplivom na osrednji živčni sistem, ki jih raziskujejo kot potencialne zdravilne učinkovine za zdravljenje glioblastoma.

Table 1: Most common drugs affecting the central nervous system that are examined as potential drugs for glioblastoma treatment.

Zdravilna učinkovina	Način delovanja	Bolezen	Vloga pri zdravljenju glioblastoma	Vir
Tipični antipsihotiki (haloperidol, trifluoperazin, flufenazin, tioridazin, perfenazin, klorpromazin)	zaviralci receptorja D ₂	shizofrenija, akutna manija, bipolarna motnja, psihoza, Tourettov sindrom	↓ proliferacija, ↓ invazija in rast neodvisno od sidranja, ↓ receptor AMPA glutamat, ↓ mitohondrijska C-oksidadaza, ↑ avtofagija, ublažitev aktivacije signalne poti PI3K-Akt/mTOR	(7)
Atipični antipsihotiki (olanzapin, klozapin, asenapin, lurasidon, ziprazidon)	motilci in zaviralci receptorja 5-HT _{2A} , agonisti 5-HT _{1A} , M ₁ , D, H ₁ ter receptorjev α ₁ in α ₂	shizofrenija, bipolarna motnja, klinična depresija, anksioznost, Huntingtonova bolezen	↓ namnoževanje celic <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> , ↓ celična viabilnost, ↓ fosforilacija AKT (Ser473) in GSK-3β (Ser9), ustavitev celičnega cikla v G0/G1 fazi, vpliv na raven AMPK	(7, 29, 32, 33)
Antiepileptiki (valprojska kislina, karbamazepin, levetiracetam, topiramet)	podaljšajo inaktivacijo Na ⁺ napetostno odvisnega kanala, zaviralci GABA transaminaze	epilepsija, migrena, bipolarna motnja	↓ celična rast, ↓ angiogeneza, ↑ občutljivost na obsevanje, ↑ apoptoza, hiperacetilacija histonov in zastoj celičnega cikla	(7, 28, 34)
Pomirjevala in uspavala (benzodiazepini diazepam, lorazepam, triazolam, temazepam)	povečajo frekvenco odpiranja Cl ⁻ ionskega kanala	tesnoba, epileptični napadi, mesečnost, nočne more	↑ občutljivost na kemoterapijo, ustavitev celičnega cikla v fazi G0/G1	(7)
Triciklični antidepresivi (amitriptilin, imipramin, klopiramin, doksepin, amoksapin, klorpromazin)	antagonisti receptorja D ₂ , preprečujejo ponovni privzem noradrenalina in serotonina v presinaptični končič	anoreksija, tesnoba, duševne motnje	↑ avtofagija, ↑ fragmentacija jeder <i>in vitro</i> , ↓ signalna pot AKT/mTOR, utišanje lastnosti matičnih celic, citostatično delovanje	(7, 35, 36)

AMPA; α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kislina, PI3K-Akt/mTOR; PI3K, fosfatidilinozitol 3-kinaza/AKT, protein kinaza B/mTOR, sesalska (mehanična) tarča rapamicina, GSK-3β; glikogen sintaza kinaza 3 beta, GABA; gama-aminobutanojska kislina, 5-HT_{2A}; serotonin receptor, 5-HT_{1A}; serotonin receptor, M₁; muskarinski receptor, D; dopaminski receptor, D₂; dopaminski receptor, H₁; histaminski receptor, α₁ in α₂; adrenergična receptorja

Valprojska kislina

Valprojska kislina (VPA) je derivat valerične kisline, ki deluje nevrozaščitno, antimanično in protimigrensko (37). VPA je antiepileptik z dobro poznanim toksikološkim in farmakološkim profilom. Bolniki z glioblastomom prejemajo VPA za zdravljenje in preprečevanje epileptičnih napadov.

V gliomu VPA spodbuja izražanje od ciklina odvisne kinaze (CDK, *cyclin-dependent kinase*) inhibitorja p21, s čimer

povzroči zastoj celičnega cikla ter poveča izražanje α- in β-izoforn topoisomeraze II, ki je tesno povezana s sintezo DNK in popravljivimi mehanizmi (38). VPA ima različne vloge pri zdravljenju glioblastoma (slika 3): zavira celično proliferacijo, povzroča diferenciacijo in apoptozo ter poveča občutljivost glioblastomskih celic na obsevanje (39). Na glioblastomskih celičnih linijah so dokazali, da VPA znatno poveča učinek TMZ in obsevanja, neodvisno od statusa

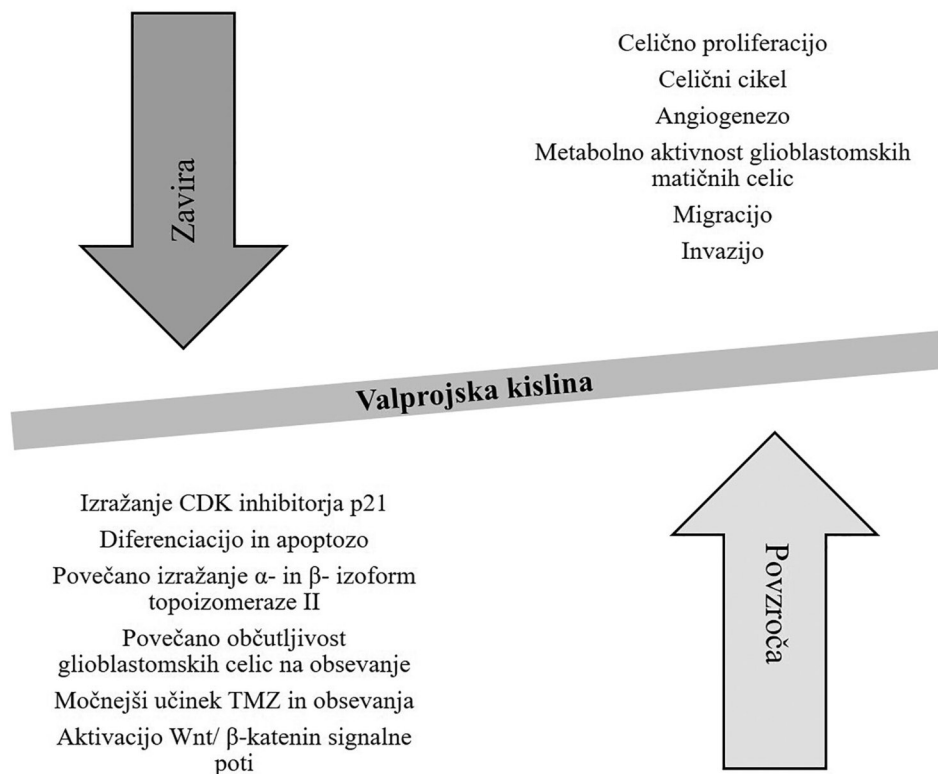


proteina MGMT. Učinek je verjetno posledica sposobnosti VPA, da sprosti kromatin, kar povzroči povečano stopnjo metilacije in s tem večje poškodbe v strukturi DNK.

Znanstvene raziskave kažejo, da imajo proteini, ki jih celice izločajo, pomembno vlogo pri različnih fizioloških in patoloških procesih. Z znižanjem ravni leptina v maščobnih celicah VPA vpliva na apetit, v rakavih celicah debelega črevesja pa zniža raven izločanja VEGF in vpliva na angiogenezo. V celicah glioblastoma lahko VPA, odvisno od odmerka, znatno zmanjša izločanje VEGF in posledično inhibira angiogenezo (40).

Izvedli so analizo sekretoma, zbirke izločenih proteinov, glioblastomskih celic po izpostavitvi VPA (41). Rezultati kažejo, da glioblastomske celice pospešujejo izločanje amferegulina (AR), ki spada med ligande epidermalnega rastnega dejavnika (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Druge raziskave *in vitro* in *in vivo* pa kažejo, da utišanje AR poveča občutljivost glioblastomskih celic na zdravljenje s TMZ. Izražanje AR je povezano tudi s povečano aktivacijo zunajcelične s signali regulirane kinaze (ERK, *extracellular-signal-regulated kinase*) preko EGFR, ki doprinese k napredovanju raka (41).

VPA lahko aktivira tudi signalno pot Wnt/ β -katenin (42). Wnt/ β -katenin je evlucijsko ohranjena signalna pot, ki ima ključno vlogo pri embriogenezi in samoobnavljanju matičnih celic, nepravilno delovanje te signalne poti pa je povezano z gliomagenezo in invazivnostjo. Po izpostavitvi glioblastomskih matičnih celic VPA se poveča izražanje tarčnih genov Wnt/ β -katenin *AXIN2*, *CD44* in *DKK1*. Dokazali so tudi, da VPA zmanjša metabolno aktivnost in proliferacijo glioblastomskih matičnih celic. Ker je signalna pot Wnt/ β -katenin vpletena v migracijo, je inkubacija glioblastomskih celičnih linij z VPA privedla do značilnega zmanjšanja migracije in invazije. Signalna pot Wnt/ β -katenin ima bivalentno vlogo, saj so si rezultati raziskav nasprotujoči. Taki rezultati kažejo na heterogenost glioblastoma oz. na prisotnost celic z različnimi molekulkimi lastnostmi in vpletenost različnih signalnih poti pri regulaciji celičnih procesov. Številne raziskave so pokazale, da VPA podaljša življenjsko dobo bolnikov z glioblastomom. VPA zavira histon deacetilazo (HDAC, *histone deacetylase*), zmanjša proliferacijo in povzroča apoptozo glioblastomskih celic (34). Trenutno je registriranih deset kliničnih raziskav, ki ocenjujejo uporabnost VPA pri zdravljenju glioblastoma (43). Avtorji klinične



Slika 3: Vloge valprojske kisline pri zdravljenju glioblastoma.

Figure 3: Roles of valproic acid in glioblastoma treatment.

raziskave (44) so pokazali, da je uporaba VPA v kombinaciji s TMZ in obsevanjem doprinesla k podaljšanju povprečne dobe preživetja bolnikov s 14,6 mesecev brez VPA na 29,6 mesecev z VPA. Pri kliničnem preskušanju uporabe VPA je potrebno opozoriti, da se koncentracija peroralno zaužite VPA razlikuje od tiste, ki doseže možgane. Pri uporabi dnevnega odmerka 15 do 20 mg/kg VPA za zdravljenje bolnikov z epilepsijo je koncentracija v plazmi med 0,3 in 0,7 mM (45). Zaradi vezave s serumskim albuminom je koncentracija VPA v možganih precej nižja, giblje se med 0,04 in 0,2 mM. V eksperimentalnih in kliničnih raziskavah uporaba višjih koncentracij VPA ni smiselna, saj bi preseгли največji dnevni odmerek učinkovine, ki je primerna za zdravljenje.

Pri načrtovanju terapij, ki vsebujejo VPA v kombinaciji s TMZ, se je potrebno zavedati, da VPA zavira histon deacetilaze, ki povzročijo demetilacijo genov, in posledično sprošča kromatinsko strukturo ter poveča dostopnost DNK. V primeru, da histon deacetilaze demetilirajo promotor gena MGMT, lahko na TMZ občutljive celice postanejo na TMZ odporne in s tem nevtralizirajo učinek TMZ v času zdravljenja (39). Zaradi možnosti, da VPA postane antagonist TMZ je nujno podrobneje raziskati možnosti njunih interakcij. Kljub številnim poskusom in raziskavam natančnega mehanizma protitumorskega delovanja VPA ne poznamo.

3 SKLEP

Glioblastom je trdovraten možganski tumor, ki se po standardnem zdravljenju z operativnim posegom, obsevanjem in kemoterapijo pogosto ponovi. Alternativnih zdravil v uporabi je malo, saj morajo poleg protitumorskega delovanja tudi učinkovito prehajati krvno-možgansko pregrado. Repozicioniranje zdravil je nov pristop k iskanju učinkovitejše terapije, ki poskuša najti še neodkrite lastnosti zdravil, primarno namenjenih zdravljenju drugih bolezni. Največji potencial imajo zdravila, ki dokazano prehajajo krvno-možgansko pregrado, med katere uvrščamo antipsihotike, nekaj dokazov za učinkovitejše zdravljenje pa obstaja tudi za antidiabetike. Najbolj obetavne repozicionirane zdravilne učinkovine te vrste so metformin, valprojska kislina in tipični antipsihotiki. Glede na to, da kljub dolgoletnim raziskavam ni zadostnega napredka pri zdravljenju glioblastoma, se zdi, da je repozicioniranje zdravil korak v pravo smer, saj

za razliko od tradicionalnega pristopa odkrivanja zdravil cilja več različnih tarč oz. poti v celicah, ki vodijo v začetek ali napredovanje raka. Antipsihotična in antidiabetična zdravila ponujajo novo upanje za bolnike z glioblastomom, vendar je najprej potrebno natančno proučiti in poglobliti razumevanje mehanizma protitumorskega delovanja in predvideti možne komplikacije.

4 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat sodelovanja avtoric Zale Žužek in Lare Bolčina, ki si delita prvo avtorstvo članka, kot prostovoljk na Medicinskem centru za molekularno biologijo, IBK, MF UL, preko programa *Interreg Volunteer Youth* (IVY) v sklopu projekta *Interreg EC 2014–2020*, ref. št. 146, okrajšava TRANS-GLIOMA, ter raziskovalnega projekta Z3-1869 in programa P1-0390, financiranih s strani ARRS.

5 LITERATURA

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
2. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016*. *Neuro-oncology*. 2019;21(Suppl 5):v1-v100.
3. Bi WL, Beroukhi R. *Beating the odds: extreme long-term survival with glioblastoma*. *Neuro-oncology*. 2014;16(9):1159-60.
4. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, et al. *EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma*. *The Lancet Oncology*. 2014;15(9):e395-403.
5. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. *Glioblastoma*. *Handbook of clinical neurology*. 2016;134:381-97.
6. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. *Drug repurposing: progress, challenges and recommendations*. *Nature reviews Drug discovery*. 2019;18(1):41-58.
7. Tan SK, Jermakowicz A, Mookhtiar AK, Nemeroff CB, Schurer SC, Ayad NG. *Drug Repositioning in Glioblastoma: A Pathway Perspective*. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:218.
8. Seliger C, Hau P. *Drug Repurposing of Metabolic Agents in Malignant Glioma*. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9).
9. Simsek M, Meijer B, van Bodegraven AA, de Boer NKH, Mulder CJJ. *Finding hidden treasures in old drugs: the challenges and importance of licensing generics*. *Drug Discov Today*. 2018;23(1):17-21.
10. Verbaanderd C, Rooman I, Meheus L, Huys I. *On-Label or Off-Label? Overcoming Regulatory and Financial Barriers to Bring Repurposed*



- Medicines to Cancer Patients. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:1664.
11. Yadavalli S, Yenugonda VM, Kesari S. Repurposed Drugs in Treating Glioblastoma Multiforme: *Clinical Trials Update*. *Cancer J*. 2019;25(2):139-46.
 12. Gupta SK, Kizilbash SH, Daniels DJ, Sarkaria JN. Editorial: Targeted Therapies for Glioblastoma: A Critical Appraisal. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1216.
 13. Basso J, Miranda A, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Repurposing drugs for glioblastoma: From bench to bedside. *Cancer letters*. 2018;428:173-83.
 14. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(9):671-84.
 15. Wick W, Platten M. Understanding and targeting alkylator resistance in glioblastoma. *Cancer discovery*. 2014;4(10):1120-2.
 16. Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(52):40461-71.
 17. Lutz TA, Estermann A, Haag S, Scharrer E. Depolarization of the liver cell membrane by metformin. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1513(2):176-84.
 18. Labuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopien B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacological reports : PR*. 2010;62(5):956-65.
 19. DrugBank. Metformin 2020 [Available from: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000114>].
 20. Janić M VŠ, Lunder M, Janež A. Metformin: Od mehanizmov delovanja do napredne klinične uporabe. *Zdravniški Vestnik*. 2017;86(3-4):138-57.
 21. Harder BG, Blomquist MR, Wang J, Kim AJ, Woodworth GF, Winkles JA, et al. Developments in Blood-Brain Barrier Penetration and Drug Repurposing for Improved Treatment of Glioblastoma. *Frontiers in oncology*. 2018;8:462.
 22. Mazurek M, Litak J, Kamieniak P, Kulesza B, Jonak K, Baj J, et al. Metformin as Targeted Therapy for High-Grade Glioma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
 23. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarie A, et al. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS one*. 2015;10(4):e0123721.
 24. Adeberg S, Bernhardt D, Harrabi SB, Nicolay NH, Horner-Rieber J, König L, et al. Metformin Enhanced in Vitro Radiosensitivity Associates with G2/M Cell Cycle Arrest and Elevated Adenosine-5'-monophosphate-activated Protein Kinase Levels in Glioblastoma. *Radiology and oncology*. 2017;51(4):431-7.
 25. Yu Z, Zhao G, Xie G, Zhao L, Chen Y, Yu H, et al. Metformin and temozolomide act synergistically to inhibit growth of glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015;6(32):32930-43.
 26. Adeberg S, Bernhardt D, Ben Harrabi S, Bostel T, Mohr A, Koelsche C, et al. Metformin influences progression in diabetic glioblastoma patients. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]*. 2015;191(12):928-35.
 27. ClinicalTrials.gov. Information on Clinical Trials and Human Research Studies: NIH U.S. National Library of Medicine; 2020 [Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Glioblastoma&term=metformin&cntry=&state=&city=&dist=>].
 28. Lee JK, Nam DH, Lee J. Repurposing antipsychotics as glioblastoma therapeutics: Potentials and challenges. *Oncology letters*. 2016;11(2):1281-6.
 29. Siegelin MD, Schneider E, Westhoff MA, Wirtz CR, Karpel-Massler G. Current state and future perspective of drug repurposing in malignant glioma. *Seminars in cancer biology*. 2019.
 30. Grinshpoon A, Barchana M, Ponizovsky A, Lipshitz I, Nahon D, Tal O, et al. Cancer in schizophrenia: is the risk higher or lower? *Schizophrenia Res*. 2005;73(2-3):333-41.
 31. Barak Y, Achiron A, Mandel M, Mirecki I, Aizenberg D. Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia. *Cancer*. 2005;104(12):2817-21.
 32. Karpel-Massler G, Kast RE, Westhoff MA, Dwucet A, Welscher N, Nonnenmacher L, et al. Olanzapine inhibits proliferation, migration and anchorage-independent growth in human glioblastoma cell lines and enhances temozolomide's antiproliferative effect. *Journal of neuro-oncology*. 2015;122(1):21-33.
 33. Shin SY, Choi BH, Ko J, Kim SH, Kim YS, Lee YH. Clozapine, a neuroleptic agent, inhibits Akt by counteracting Ca²⁺/calmodulin in PTEN-negative U-87MG human glioblastoma cells. *Cellular signalling*. 2006;18(11):1876-86.
 34. Ruda R, Pellerino A, Soffietti R. Does valproic acid affect tumor growth and improve survival in glioblastomas? *CNS oncology*. 2016;5(2):51-3.
 35. Abbruzzese C, Matteoni S, Persico M, Villani V, Paggi MG. Repurposing chlorpromazine in the treatment of glioblastoma multiforme: analysis of literature and forthcoming steps. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2020;39(1):26.
 36. Bielecka-Wajdman AM, Lesiak M, Ludyga T, Sieron A, Obuchowicz E. Reversing glioma malignancy: a new look at the role of antidepressant drugs as adjuvant therapy for glioblastoma multiforme. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2017;79(6):1249-56.
 37. DrugBank. Valproic Acid 2020 [Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00313>].
 38. Das CM, Aguilera D, Vasquez H, Prasad P, Zhang M, Wolff JE, et al. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *Journal of neuro-oncology*. 2007;85(2):159-70.
 39. Van Nifterik KA, Van den Berg J, Slotman BJ, Lafleur MV, Sminia P, Stalpers LJ. Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and gamma-radiation. *Journal of neuro-oncology*. 2012;107(1):61-7.
 40. Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurologia medico-chirurgica*. 2012;52(4):186-93.
 41. Chen JC, Lee IN, Huang C, Wu YP, Chung CY, Lee MH, et al. Valproic acid-induced amphiregulin secretion confers resistance to temozolomide treatment in human glioma cells. *BMC cancer*. 2019;19(1):756.
 42. Riva G, Cilibrasi C, Bazzoni R, Cadamuro M, Negroni C, Butta V, et al. Valproic Acid Inhibits Proliferation and Reduces Invasiveness in Glioma Stem Cells Through Wnt/beta Catenin Signalling Activation. *Genes (Basel)*. 2018;9(11).
 43. ClinicalTrials.gov. Information on Clinical Trials and Human Research Studies: NIH U.S. National Library of Medicine; 2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Glioblastoma&term=valproic+acid&cntry=&state=&city=&dist=>].
 44. Krauze AV, Myrehaug SD, Chang MG, Holdford DJ, Smith S, Shih J, et al. A Phase 2 Study of Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients With Glioblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;92(5):986-92.
 45. Eckert M, Klumpp L, Huber SM. Cellular Effects of the Antiepileptic Drug Valproic Acid in Glioblastoma. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(4):1591-605.

TARČNO ZDRAVLJENJE KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE Z ANTAGONISTI ANTIAPOPTOTIČNIH PROTEINOV

ANTAGONISTS OF ANTIAPOPTOTIC PROTEINS IN THE TARGETED THERAPY OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Damjan Avsec, mag. farm.¹

izr. prof. dr. Helena Podgornik, univ. dipl.
inž. kem. inž., spec. med. biok., spec. lab.
med. genetike^{1,2}

prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.¹

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

² Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinični oddelek za hematologijo,
Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: irena.mlinaric@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Kronična limfocitna levkemija je najpogostejša levkemija pri odraslih v Zahodnem svetu, za katero je značilno kopičenje monoklonskih limfocitov B v krvi, kostnem mozgu in limfatičnih organih. Desetletja je zdravljenje temeljilo na kemoterapiji in kemoimunoterapiji, ki so ju v zadnjem desetletju skoraj v celoti nadomestile majhne tarčne molekule. Te delujejo bodisi na receptorsko pot celic B bodisi na antiapoptotični protein Bcl-2. Apoptoza je ključen proces v homeostazi limfocitov B, pri čemer osrednjo vlogo igrajo antiapoptotični proteini iz družine Bcl-2. Ker je vzdrževanje malignih limfocitov B odvisno od antiapoptotičnih proteinov, predstavljajo njihovi antagonisti pomembne učinkovine v boju s kronično limfocitno levkemijo. V tem pregledu predstavljamo razvoj, pomen in prihodnost antagonistov antiapoptotičnih proteinov v tarčnem zdravljenju kronične limfocitne levkemije.

KLJUČNE BESEDE:

apoptoza, Bcl-2, kronična limfocitna levkemija, venetoklaks

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia is the most common leukemia among adults in the Western world, and is characterised by the progressive accumulation of monoclonal B lymphocytes in the blood, bone marrow and lymphatic organs. For decades, the treatment was based on chemotherapy and chemoimmunotherapy, which have been almost entirely replaced by the small targeted molecules over the past decade. These act on either the B cell receptor pathway or the antiapoptotic protein Bcl-2. Apoptosis is an important process for the homeostasis of B lymphocytes, with antiapoptotic proteins from the Bcl-2 family playing a central role. Because the maintenance of malignant B lymphocytes depends on antiapoptotic proteins, antagonists of these proteins represent important drugs in the fight against chronic lymphocytic leukemia. In this review, we present the development, significance and future of antagonists of antiapoptotic proteins in the targeted treatment of chronic lymphocytic leukemia.

KEY WORDS:

apoptosis, Bcl-2, chronic lymphocytic leukemia, venetoclax



1 UVOD

Kronična limfocitna levkemija (KLL) z več kot 100 na novo diagnosticiranih bolnikov letno predstavlja najpogostejšo levkemijo v Sloveniji (1). V Zahodnem svetu znaša incidenca bolezni 4–5 bolnikov na 100.000 prebivalcev letno in s starostjo močno narašča. Mediana starosti ob postavitvi diagnoze je 72 let. Ob predvidenih demografskih spremembah in staranju prebivalstva lahko pričakujemo porast števila bolnikov s KLL (2).

Za KLL je značilno kopičenje na videz zrelih, a funkcijsko nesposobnih CD5+/CD19+ monoklonskih limfocitov B v krvi, limfatičnih tkivih in kostnem mozgu. Bolezen večinoma odkrijemo naključno pri rutinskih pregledih krvi. Za postavitev diagnoze je potrebna prisotnost več kot $5 \times 10^9/L$ CD5+/CD19+ monoklonskih limfocitov B v venski krvi, ki vztraja najmanj tri zaporedne mesece (2, 3).

Zdravimo le bolnike z aktivno obliko bolezni (2). Na področju zdravljenja KLL je v zadnjem desetletju prišlo do korenitih sprememb. Dolga desetletja je zdravljenje temeljilo na kemoterapiji v obliki alkilirajočih sredstev (npr. ciklofosamid, bendamustin) in purinskih analogov (npr. fludarabin) ter kemoimunoterapiji, kjer so obstoječi kemoterapiji priključili monoklonsko protitelo proti CD20 rituksimab (2, 4, 5). Sheme zdravljenj so podrobneje predstavljene v članku Podgornik et al. (4). Žal so bile pri zdravljenju s kemoterapijo in kemoimunoterapijo določene omejitve, npr. potrebna je bila dobra fizična pripravljenost bolnika za začetek zdravljenja, bolniki pa so kljub temu imeli številne neželene učinke (5, 6). Poleg tega kemoterapija in kemoimunoterapija nista učinkoviti v primeru delecije oz. mutacije gena za tumorski zaviralec p53 (del/mut *TP53*) (2). Zaradi vsega naštetega ni presenetljivo, da so ju v zadnjem desetletju skoraj popolnoma nadomestile majhne tarčne molekule, ki ciljajo bodisi receptorsko pot celic B bodisi antiapoptotični protein Bcl-2 (B-celični limfom 2) (6). Tem učinkovinam je skupno to, da v celicah KLL delujejo citotoksično. Prvi v tej seriji so zaviralci Brutonove tirozin kinaze (ibrutinib, akalabrutinib) in fosfatidilinozitol 3-kinaze (idelalizib, duvelizib), ki preprečijo preživetvene signale preko B-celičnega receptorja (2, 6). Posledično sprožijo apoptozo celic KLL in njihovo odstranjevanje iz krvnega obtoka. Kljub izjemni klinični učinkovitosti zaviralci receptorske poti celic B pri nekaterih bolnikih niso učinkoviti ali pa jih le-ti ne prenašajo (7). V teh primerih lahko uporabimo antagonist antiapoptotičnega proteina Bcl-2 venetoklaks (7), ki neposredno proži apoptozo v celicah KLL. V tem pregledu predstavljamo

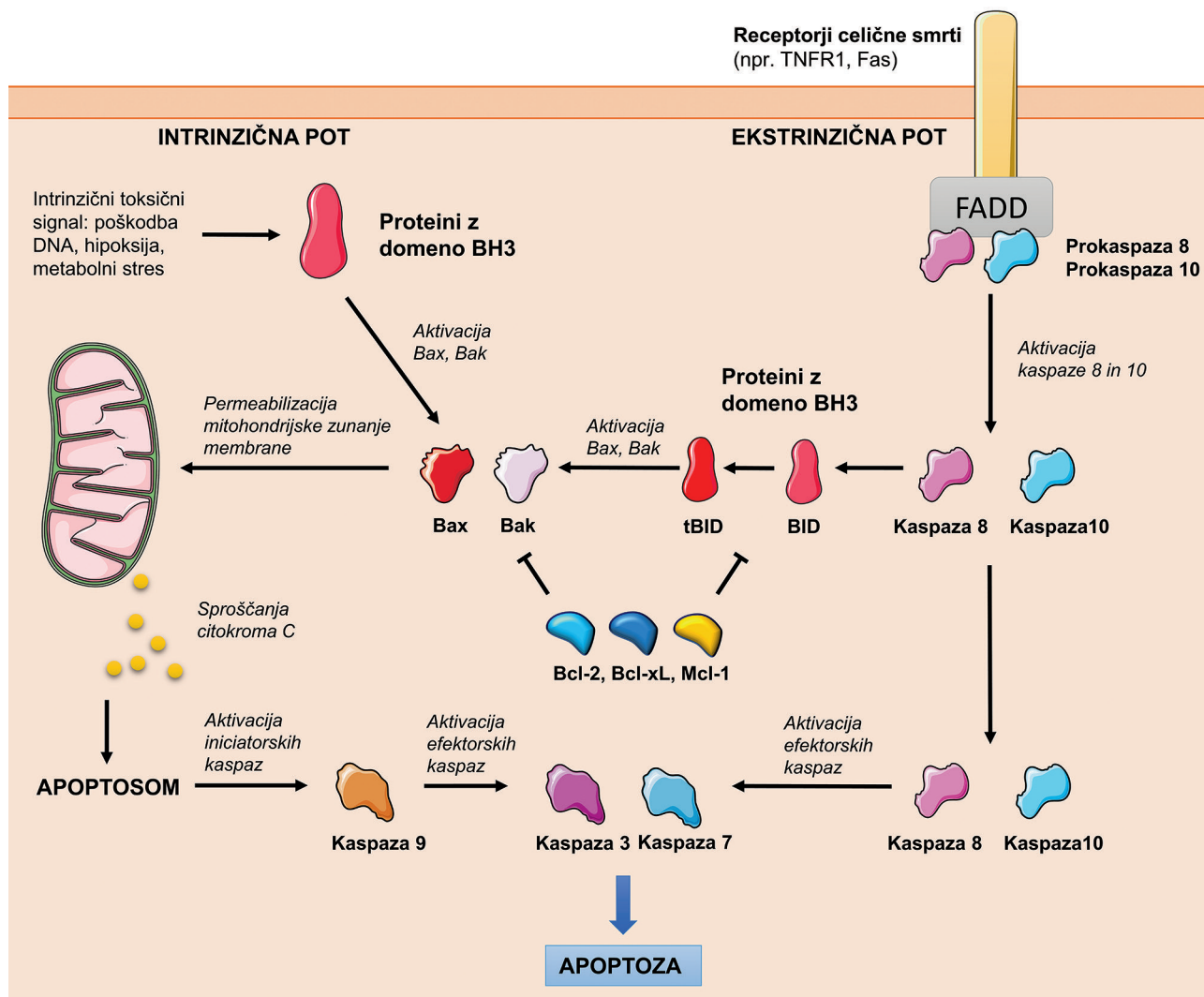
pomen apoptotične celične smrti v homeostazi limfocitov B ter trenutni klinični razvoj antagonistov antiapoptotičnih proteinov za zdravljenje KLL.

2 APOPTOTIČNA CELIČNA SMRT V LIMFOCITIH B

Apoptoza je vrsta programirane celične smrti, za katero so značilni krčenje citoplazme, kondenzacija kromatina, fragmentacija jedra in uvihanje plazmaleme, kar v končni fazi vodi do nastanka majhnih veziklov, znanih kot apoptotična telesca. Slednje preko fagocitne aktivnosti privzemajo okoliške celice, ki jih s pomočjo lizosomov dokončno razgradijo (8). Osrednjo vlogo v apoptozi imajo člani družine Bcl-2, ki jih na osnovi njihove funkcije delimo na antiapoptotične proteine (npr. Bcl-2, Bcl-xL in Mcl-1), proapoptotične proteine (npr. Bax, Bak) in aktivatorje (npr. BIM, BAD, BID, PUMA, NOXA) (9–11).

Apoptoza poteka po dveh poteh, **intrinzični** in **ekstrinzični** (slika 1). Intrinzična pot vključuje aktivnost BIM, ki sproži homooligomerizacijo proapoptotičnih članov družine Bcl-2, poimensko Bak in Bax, preko proteinske domene BH3. Vsidranje oligomerov v zunanjo membrano mitohondrijev povzroči permeabilizacijo in sproščanje citokroma c, kar vodi v sestavljanje in aktivacijo apoptosoma, končni rezultat tega je aktivacija efektorskih kaspaz (slika 1) (12). Po drugi strani pa ekstrinzična pot poteka mimo mitohondrijev in vključuje aktivacijo membranskih receptorjev celične smrti ter direktno aktivacijo efektorskih kaspaz (13). Obe poti imata ključno vlogo v homeostazi, kontroli protitelesnega odziva in toleranci limfocitov B. Tako je preko intrinzične poti uravnava preživetje limfocitov B s funkcionalnim B-celičnim receptorjem (BCR), ki so obenem nereaktivni proti lastnim antigenom, preko ekstrinzične poti, z membranskim receptorjem Fas, pa odstranjevanje avtoreaktivnih in nizkoafinitetnih klonov, ki nastanejo med somatsko hipermutacijo (14). Danes je dobro znano, da aktivacija BCR vodi v povečano aktivnost NFκB in s tem povečan prepis antiapoptotičnih članov družine Bcl-2, kot so Bcl-2, Bcl-xL in Mcl-1 (13). Po mehanizmu je antiapoptotična aktivnost slednjih posledica vezave in odstranjevanja proapoptotičnih članov družine Bcl-2 (Bax, Bak).

Natančno uravnavanje pro- in antiapoptotičnih signalov je ključno za homeostazo celic B-limfocitne vrste. Ker je signalna pot NFκB konstitutivno povečana, ni presenetljivo, da je porušenje ravnotežja v apoptotičnih poteh v prid preživetja



Slika 1: Intrinzična in ekstrinzična pot apoptoze.

Figure 1: Intrinsic and extrinsic pathway of apoptosis.

prisotno pri vrsti novotvorb limfocitov B, kot so folikularni limfom, difuzni velikocelični B-limfom, KLL in diseminirani plazmocitom (15). Ker imajo pri tem poglavitno vlogo člani družine Bcl-2, so posamezni predstavniki te družine osrednja tarča pri razvoju novih protilevkemičnih tarčnih zdravil.

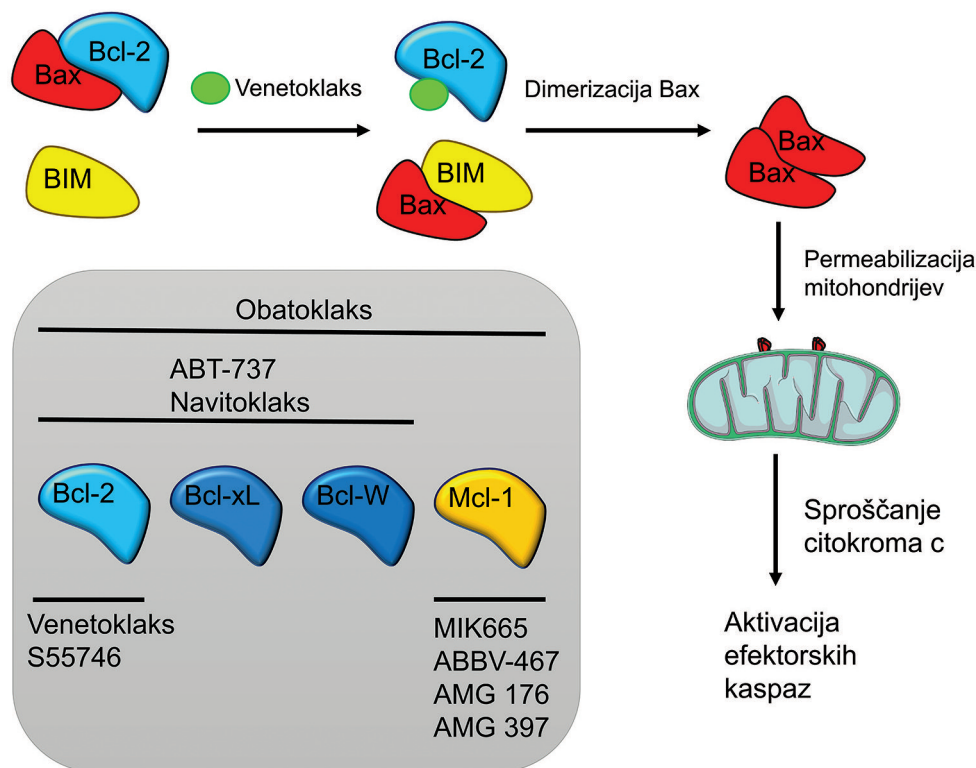
3 ANTAGONISTI ANTIAPOPTOTIČNIH PROTEINOV

Proteini družine Bcl-2 vsebujejo Bcl-2 homologne (BH) domene, med njimi antiapoptotični predstavniki vsebujejo

štiri domene BH (BH1 do BH4), proapoptotični predstavniki pa samo domeno BH3 (16). Proapoptotična domena BH3 se veže v hidrofobni žep antiapoptotičnih proteinov in neposrednih aktivatorjev z domeno BH3 (npr. BIM, BID, PUMA) (9, 16) ter tako sproži apoptozo. Antagonisti Bcl-2 torej posnemajo domeno BH3 (mimetiki BH3) (16), se vežejo na antiapoptotične proteine, preprečijo naravno interakcijo antiapoptotičnih in proapoptotičnih članov družine Bcl-2 in posledično sprožijo apoptozo (slika 2).

3.1 VENETOKLAKS

Venetoklaks (znan tudi kot ABT-199) so razvili iz mimetika BH3 prve generacije navitoklaksa (ABT-263) (17). Bil je prvi



Slika 2: Selektivnost antagonistov antiapoptotičnih proteinov pri KLL in mehanizem njihovega delovanja.

Figure 2: Selectivity of antagonists of antiapoptotic proteins in CLL and the mechanism of their action.

antagonist Bcl-2, ki sta ga Evropska agencija za zdravila (*European Medicines Agency*, EMA) in ameriška Agencija za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration*, FDA) odobrili za zdravljenje KLL (7, 18). V EU je v kombinaciji z obinutuzumabom odobren za zdravljenje predhodno nezdravljene KLL (prva linija) in v kombinaciji z rituksimabom za zdravljenje bolnikov s KLL, ki so prejeli vsaj eno predhodno zdravljenje (druga linija). Kot monoterapija je indiciran pri bolnikih, pri katerih kemoimunoterapija zaradi genetskih nepravilnosti (*del/mut TP53*) ni učinkovita, za zaviralce receptorske poti celic B pa niso primerni oz. jih ne prenašajo, ter za bolnike brez omenjenih genetskih nepravilnosti, ki se na kemoimunoterapijo in zaviralce receptorske poti celic B ne odzivajo (18).

Venetoklaks je bil odobren na podlagi rezultatov o učinkovitosti in varnosti iz randomizirane, multicentrične, odprte klinične raziskave III. faze (MURANO; NCT02005471), v kateri so primerjali kombinaciji venetoklaks+rituksimab (VR) in bendamustin+rituksimab (BR) na 389 bolnikih s predhodno zdravljeno KLL. O učinkovitosti pričajo podatki o preživetju brez napredovanja bolezni, saj je bilo 36-mesečno preživetje brez napredovanja pri VR (71,4 %)

značilno večje od skupine, ki je prejela BR (15,2 %). Bolniki, zdravljeni s kombinacijo VR, so imeli 81-odstotno zmanjšanje tveganja za napredovanje ali smrt v primerjavi z BR, prav tako je bil delež bolnikov z negativnim minimalnim preostankom bolezni (v periferni krvi) po končanem zdravljenju 72,5 % (121/167) pri VR, kar je značilno več v primerjavi z BR (20 % (26/128)) (7).

Varnostni profil venetoklaksa so dodatno ovrednotili v dveh raziskavah III. faze (CLL14 in MURANO), dveh raziskavah II. faze (M13-982 in M14-032) in ene raziskave I. faze (M12-175), celokupno na 758 bolnikih s KLL. Pri zdravljenju z venetoklaksom v kombinaciji z rituksimabom ali obinutuzumabom so najpogosteje poročali o nevtropeniji, driski in okužbah zgornjih dihal, pri zdravljenju v obliki monoterapije pa o nevtropeniji, driski, slabosti, anemiji, utrujenosti in okužbah zgornjih dihal (7).

Resen in življenje ogrožujoč učinek pri zdravljenju z venetoklaksom je sindrom tumorskega razpada (*tumor lysis syndrome*, TLS), ki se sicer lahko zgodi kadar koli tekom terapije, najpogosteje pa pri njenem uvajanju. Sindrom tumorskega razpada označuje hiter razpad tumorskih celic s sprostitvijo celične vsebine v krvni obtok in se

kaže laboratorijsko in klinično s povišanjem kreatinina in sečne kisline, pojavom aritmij ter akutno odpovedjo ledvic. Najhitreje ga opazimo po spremenjenih laboratorijskih parametrih (kalij, kalcij, sečna kislina, fosfat) (19). Njegovo resnost potrjuje podatek, da je zaradi krajšega obdobja titriranja (dva do tri tedne) in večjega začetnega odmerka v I. fazi klinične raziskave kar 13 % bolnikov doživelo sindrom tumorskega razpada, tri so doživeli akutno odpoved ledvic, dva pa sta umrla (7). Danes se sindrom tumorskega razpada pojavi pri 2 do 3 % bolnikov na venetoklaksu, pri čemer je za preprečevanje zapletov ključna pettedenska titracija odmerka (začetni odmerek 20 mg, nato tedensko 50/100/200 do 400 mg enkrat dnevno), pri bolnikih z visokim tveganjem pa uvedba zaščite z alopurinolom. Dodatno lahko pojav sindroma tumorskega razpada preprečimo z zadostno hidracijo bolnika. Svetuje se, da se 6–8 ur po prvem odmerku venetoklaksa pozorno spremlja laboratorijske označevalce sindroma tumorskega razpada, ob sumu nanj pa prilagodi odmerek oz. začasno prekine z zdravljenjem (12, 19).

3.2 NAVITOKLAKS

Navitoklaks (ABT-263) so razvili iz ABT-737, ki deluje antagonistično na Bcl-2, Bcl-xL in Bcl-W in s tem povezano deluje citotoksično in ojača delovanje zaviralcev proteasoma pri diseminiranem plazmocitomu. Zaradi potrebe po večji biološki uporabnosti zdravila so iz ABT-737 razvili strukturni analog navitoklaks (preglednica 1) (20). Iz strukturne podobnosti sledi podobno antagonistično delovanje na Bcl-2, Bcl-xL in Bcl-W. V I. fazi kliničnega preskušanja na bolnikih z neodzivno ali ponovljeno KLL se je izkazal za učinkovitega (NCT00481091) (21). Deloval je pri bolnikih, ki so bili neodzivni na fludarabin in pri nosilcih napovedno neugodne del/mut *TP53*. Mediana preživetja brez napredovanja je bila 25 mesecev, pri 35 % (9/26) bolnikov so zabeležili delni odziv. Zabeleženi odzivi so bili dolgotrajni. Kljub izkazani učinkovitosti so pri bolnikih na navitoklaksu zabeležili kar nekaj neželenih učinkov, kot so driska, slabost, bruhanje, utrujenost, trombocitopenija in nevtropenija. Medtem ko so bili z gastrointestinalnim traktom povezani neželeni učinki manj resni, sta bila od odmerka odvisna trombocitopenija in nevtropenija resnejša neželena učinka (stopnje 3 ali več); pojavila sta se pri 28 % bolnikov (21). V raziskavi so pokazali, da je nizko izražanje Mcl-1 in visoko razmerje BIM : Mcl-1 in BIM : Bcl-2 povezano z doseganjem odziva. Navitoklaks ne zavira Mcl-1, vendar pobija tudi celice, ki izražajo Mcl-1. Predpostavljajo, da vezava navi-

toklaksa na Bcl-2 sprostí BIM iz kompleksa z Bcl-2, tako da prostí BIM antagonizira delovanje Mcl-1 (21).

3.3 OBATOKLAKS

Obatoklaks (GX15-070) je antagonist pan-Bcl-2, kar pomeni, da deluje antagonistično na vse antiapoptotične pripadnike družine Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-W). Pan-Bcl-2 antagonistična aktivnost je najverjetneje posledica relativno enostavne strukture v primerjavi s selektivnejšimi antagonisti proteinov Bcl-2 (preglednica 1). V primerjavi z navitoklaksom obatoklaks antagonizira tudi Mcl-1. Mcl-1 je pogosto povečano izražen pri KLL, ki je odporna na fludarabin, in korelira z neugodnimi napovednimi dejavniki (22).

V I. fazi klinične raziskave, v kateri so ugotavljali največji odmerek, ki ga bolniki s ponovljeno KLL (N = 13) še prenašajo v kombinaciji s fludarabinom in rituksimabom (petdnevni cikel, šest ciklov), so ugotovili, da je obatoklaks v obliki triurne infuzije 1. in 3. dan cikla varno zdravilo, ki ga bolniki dobro prenašajo (NCT00612612). 85 % bolnikov se je na terapijo odzvalo, pri 54 % so zabeležili popoln odziv (23). Vendar pa obatoklaks v obliki monoterapije ni izkazal objektivnih odzivov pri folikularnem limfomu, Hodgkinovem limfomu in mielofibrozi. Dodatno so njegov klinični razvoj omejili nejasen mehanizem delovanja, saj deluje tudi v sistemih brez Bak in Bax, infuzijska nevrotoksičnost ter antagonizem pan-Bcl-2. Slednje bi lahko izkoriščali v premagovanju Mcl-1 in Bcl-xL posredovane odpornosti na selektivne antagoniste Bcl-2. Po drugi strani pa neselektivno delovanje botruje seriji neželenih učinkov, vključno s trombocitopenijo, saj je Bcl-xL ključen za homeostazo trombocitov (23).

3.4 S55746

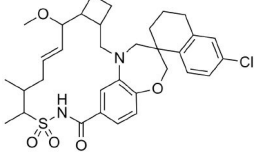
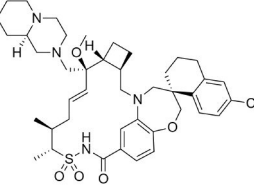
S55746 je najnovejši selektivni antagonist Bcl-2 (preglednica 1). V I. fazi kliničnega preskušanja se je v obliki monoterapije izkazal za varnega, bolniki s KLL (N = 12) so ga dobro prenašali (NCT02920697). Najpogostejša nehematološka neželena učinka sta bila glavobol in kašelj, najpogostejši neželeni učinki stopnje 3 ali več so bili hematološki, predvsem nevtropenija. Klinično ali laboratorijsko niso zaznali sindroma tumorskega razpada, so pa zabeležili šestkrat večjo biološko uporabnost (AUC) in maksimalno plazemsko koncentracijo v primeru jemanja s hrano (24). Na osnovi ustreznega varnostnega profila in potrjene učinkovitosti pri bolnikih s KLL bodo s testiranjem S55746 nadaljevali, najverjetneje v obliki kombinacijske sheme.



Preglednica 1: Pregled antagonistov antiapoptotičnih proteinov pri KLL.

Table 1: Overview of the antagonists of antiapoptotic proteins in CLL.

Tarča	Učinkovina	Struktura	Mehanizem delovanja	Faza preskušanja	Številka NCT
Bcl-2	venetoklaks (ABT-199)		antagonizem Bcl-2	III, odobren 2016	NCT02005471 NCT02242942
Bcl-2, Bcl-xL (in Bcl-W)	ABT-737		antagonizem Bcl-2, Bcl-xL in Bcl-W	/	/
Bcl-2, Bcl-xL (in Bcl-W)	navitoklaks (ABT-263)		antagonizem Bcl-2, Bcl-xL in Bcl-W	I	NCT00481091
Bcl-2, Bcl-xL, (Mcl-1, Bcl-W)	obatoklaks (GX15-070)		antagonizem Pan-Bcl-2	I	NCT00612612
Bcl-2	S55746		antagonizem Bcl-2	I (KLL, NHL, MM)	NCT02920697
Mcl-1	MIK665 (S64315)		antagonizem Mcl-1	I (DP, NHL, DVBL)	NCT02992483
Mcl-1	ABBV-467		antagonizem Mcl-1	I (DP)	NCT04178902

Mcl-1	AMG 176		antagonizem Mcl-1	I (DP, AML)	NCT02675452
Mcl-1	murizatoklaks(A MG 397)		antagonizem Mcl-1	I (DP, NHL, AML)	NCT03465540

AML – akutna mieloična levkemija, DP – diseminirani plazmocitom, DVCBL – difuzni velikocelični limfom B, KLL – kronična limfocitna levkemija, NHL – ne-Hodgkinov limfom.

3.5 SELEKTIVNI ANTAGONISTI MCL-1

Še neizkoriščen pristop za proženje apoptoze v KLL predstavljajo selektivni antagonisti Mcl-1 (preglednica 1). Slednje sicer že klinično preskušajo za zdravljenje različnih malignih obolenj limfocitov B. V I. fazi kliničnega preskušanja bodo za zdravljenje ponovljenega/neodzivnega diseminiranega plazmocitoma ovrednotili MIK665 (S64315) (NCT02992483), ABBV-467 (NCT04178902), AMG 176 (NCT02675452) in AMG 397 (NCT03465540). Rezultati kliničnega preskušanja na bolnikih z diseminiranim plazmocitomom bodo pokazali, ali je uporaba selektivnih antagonistov Mcl-1 smiselna za zdravljenje tudi drugih malignih obolenj limfocitov B.

4 ODPORNOST NA ANTAGONISTE ANTIAPOPTOTIČNIH PROTEINOV

Uporabo venetoklaks poleg neželenih učinkov omejuje pojav odpornosti. Ker je venetoklaks hkrati substrat in zaviralec p-glikoproteina in prenašalca ATP-vezavna kasetna poddružine G2 (ABCG2), klinično ta dva mehanizma najverjetneje nista pomembna za razvoj in ohranjanje odpornosti (25). Po mehanizmu delovanja se venetoklaks reverzibilno in visoko selektivno veže na BH3-vezavno mesto Bcl-2, s čimer izpodrine proapoptotične proteine z elementom BH3 (7). Med prvimi vzroki odpornosti na venetoklaks so zato proučevali Bcl-2 ter proteine okoli te tarče (Mcl-1, Bcl-xL). Pred kratkim so pri bolnikih, ki so postali neodzivni na venetoklaks, prepoznali dve genetski spremembi v *Bcl-2*. Različica c.302G>T povzroči zamenjavo

glicina z valinom na mestu 101 (p.G101V), kar ima za posledico 180-krat manjšo vezavno afiniteto venetoklaks do Bcl-2. Različica se je pojavila pri približno 50 % bolnikov z napredovano boleznijo, približno 2–3 leta po začetku terapije. Obenem je različica c.302G>T zadostna za odpornost na venetoklaks in za bolnike izredno neugodna (26). Kmalu za tem je Tausch s sodelavci odkril do tedaj neporočano različico c.307G>T, ki ima za posledico zamenjavo aspartata s tirozinom na mestu 103 (p.D103Y) v BH3-vezavnem žepu Bcl-2. Pojavila se je pri 25 % bolnikov, ki so postali odporni na venetoklaks. Aspartat na mestu 103 je odgovoren za visoko afiniteto venetoklaks do Bcl-2, in sicer preko tvorbe vodikovih vezi z indolnim obročem venetoklaks. Tako zamenjava s tirozinom vodi v izgubo afinitete, zaradi usmerjenosti stranske verige pa se obenem zmanjša še prostorska razpoložljivost vezavnega žepa (27). Pojav različic v genu *Bcl-2* pa ni edini mehanizem odpornosti KLL na venetoklaks. Do danes so poročali o povečani aktivnosti in izražanju Bcl-xL in Mcl-1, ki nadomestita funkcijo Bcl-2, in aktivaciji preživetvenih signalnih poti BCR in PI3K/Akt/mTOR (28, 29). Pereč problem odpornosti na venetoklaks bo potrebno reševati s kombinacijami zdravil, ki ciljajo različne tarče v KLL, razvojem antagonistov Bcl-2, ki bodo odporni na pojav različic, ter vpeljavo selektivnih antagonistov drugih antiapoptotičnih proteinov v klinično prakso.

5 PRIHODNOST ANTAGONISTOV ANTIAPOPTOTIČNIH PROTEINOV V KLINIKI

Danes venetoklaks posebej intenzivno raziskujejo kot dodatek zaviralcem receptorske poti celic B. Trenutno



potekajo klinične raziskave II. in III. faze, ki vrednotijo varnost in učinkovitost venetoklaks v kombinaciji z zaviralcema BTK ibrutinibom (NCT03943342, NCT03226301) in akalabrutinibom (NCT03868722) samostojno ali z dodanim anti-CD20 protitelesom obinutuzumabom (NCT02758665, NCT03701282, NCT03836261, NCT03580928). Poleg zaviralcev BTK venetoklaks kombinirajo tudi z zaviralcem PI3K idelalizibom in anti-CD20 protitelesom rituksimabom (NCT03639324). Sočasen razvoj zaviralcev receptorske poti celic B in anti-CD20 protiteles je vodil v preskušanje novih kombinacij. Tako venetoklaks vrednotijo v shemi z novim zaviralcem PI3K umbralizibom in novejšim anti-CD20 protitelesom ublituksimabom (NCT03801525) ter novim zaviralcem BTK zanubrutinibom samostojno (NCT03336333) ali v kombinaciji z obinutuzumabom (NCT03824483).

V prihodnosti lahko torej pričakujemo kombinacije antagonistov Bcl-2 s tarčnimi zdravili, ki ciljajo receptorsko pot celic B. Najverjetneje bodo svoje mesto v kliniki dobili tudi antagonisti Mcl-1, vsaj pri KLL, ki kaže odpornost na venetoklaks zaradi povečanega izražanja Mcl-1. Pričakujemo lahko pestro dogajanje okoli razvoja antagonistov antiapoptičnih proteinov tako pri KLL kot pri ostalih malignih obolenjih limfocitov B.

6 LITERATURA

- Rak v Sloveniji 2015. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2018.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(11):1266–87.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131(25):2745–60.
- Podgornik H, Gržinič N, Černelč P. Kronična limfatična levkemija. *Farm Vestn.* 2013;64(5):354–62.
- Jain N, O'Brien S. Initial treatment of CLL: Integrating biology and functional status. Vol. 126, *Blood.* 2015. p. 463–70.
- Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2018. p. 510–27.
- Venclyxto, INN-Venetoclax. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostopno na: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20161205136381/anx_136381_sl.pdf. Poskus dostopa: 23.3.2020.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Vol. 25, *Cell Death and Differentiation.* 2018. p. 486–541.
- Brouwer JM, Lan P, Cowan AD, Bernardini JP, Birkinshaw RW, van Delft MF, et al. Conversion of Bim-BH3 from Activator to Inhibitor of Bak through Structure-Based Design. *Mol Cell [Internet].* 2017;68(4):659–672.e9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276517308365>
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet].* 2013 Apr 1;5(4):a008714–a008714. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23545417>
- Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ [Internet].* 2018;25(1):65–80. Available from: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Ryan CE, Davids MS. BCL-2 Inhibitors, Present and Future. *Cancer J.* 2019;25(6):401–9.
- Sen R. Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 2006 Dec;25(6):871–83.
- Defrance T, Casamayor-Palleja M, Krammer PH. The life and death of a B cell. *Adv Cancer Res.* 2002;86:195–225.
- Adams CM, Clark-Garvey S, Porcu P, Eischen CM. Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. *Front Oncol [Internet].* 2019 Jan 8;8:636. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30671383>
- Nakajima W, Tanaka N. BH3 mimetics: Their action and efficacy in cancer chemotherapy. *Integr Cancer Sci Ther.* 2016 Jan 1;3:437–41.
- Cang S, Iragavarapu C, Savooji J, Song Y, Liu D. ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol [Internet].* 2015 Nov 20;8:129. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26589495>
- Venclexta, Full prescribing information, Dostopno na: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/208573s013lbl.pdf. Poskus dostopa: 23.3.2020.
- Gribben JG. Practical management of tumour lysis syndrome in venetoclax-treated patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2020 Mar;188(6):844–51.
- Chauhan D, Velankar M, Brahmandam M, Hideshima T, Podar K, Richardson P, et al. A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene.* 2007 Apr;26(16):2374–80.
- Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol [Internet].* 2011/12/19. 2012 Feb 10;30(5):488–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22184378>
- Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood.* 2008 Nov;112(9):3807–17.
- Brown JR, Tesar B, Yu L, Werner L, Takebe N, Mikler E, et al. Obatoclax in combination with fludarabine and rituximab is well-tolerated and shows promising clinical activity in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(12):3336–42.
- Preliminary results of s55746/BCL201 (a new BCL2 inhibitor) in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients and effect of calibrated moderate meal on the pharmacokinetics. Dostopno na: <https://library.ehaweb.org/eha/2017/22nd/180794/vincen>.
- Weiss J, Gajek T, Köhler BC, Haefeli WE. Venetoclax (ABT-199) Might Act as a Perpetrator in Pharmacokinetic Drug-Drug

- Interactions. Pharmaceuticals [Internet]. 2016 Feb 24;8(1):5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26927160>*
26. Blombery P, Anderson MA, Gong J, Thijsen R, Birkinshaw RW, Thompson ER, et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discov [Internet]. 2018 Dec 4; Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/early/2019/02/15/2159-8290.CD-18-1119.abstract>*
27. Tausch E, Close W, Dolnik A, Bloehdorn J, Chyla B, Bullinger L, et al. Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Vol. 104, Haematologica. 2019. p. E434–7.*
28. Zhu H, Almasan A. Development of venetoclax for therapy of lymphoid malignancies. *Drug Des Devel Ther. 2017 Mar 1;Volume11:685–94.*
29. Leveson JD, Cojocari D. Hematologic Tumor Cell Resistance to the BCL-2 Inhibitor Venetoclax: A Product of Its Microenvironment? *Front Oncol [Internet]. 2018;8:458. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00458>*



CELIČNA SENESCENCA: NOVA TERAPEVTSKA TARČA PRI ZDRAVLJENJU S STAROSTJO POVEZANIH BOLEZNI

CELL SENESCENCE: A NEW THERAPEUTIC TARGET FOR THE TREATMENT OF AGE- RELATED DISEASES

AVTORJI / AUTHORS:

Eva Prašnikar, mag. farm.

dr. Jure Borišek, mag. farm.

izr. prof. dr. Andrej Perdih, mag. farm.

Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andrej.perdih@ki.si

POVZETEK

Staranje predstavlja ključni dejavnik tveganja za razvoj večine kroničnih bolezni. Slednje pogosto zahtevajo neprekinjeno farmakološko zdravljenje, negativno vplivajo na kakovost življenja posameznika ter predstavljajo širši izziv sodobne družbe, še posebej kot znatno breme za zdravstveni sistem. Trenutno potekajo intenzivne raziskave na področju staranja, ki bi v prihodnosti lahko omogočile razvoj novih terapevtskih pristopov. Slednji ciljajo na biokemijske poti, udeležene v procesu staranja. Na ta način bi lahko bolj vzročno zdravili več s starostjo povezanih kroničnih bolezni. Eden izmed pomembnih pojavov v procesu staranja je celična senescenca, ki ima pomembno vlogo pri številnih s starostjo povezanih boleznih in posledično predstavlja perspektivno tarčo. Prve obetavne spojine, ki ciljajo na senescentne celice, so tudi že vstopile v klinična preskušanja. V prispevku predstavljamo različne poti nastanka senescence, obravnavamo nekaj ključnih lastnosti senescentnih celic ter opišemo trenutno poznane pristope njihove detekcije in modulacije v terapevtske namene.

KLJUČNE BESEDE:

označevalci, senescentne celice, senolitik, senomorfiki, staranje

ABSTRACT

Aging is a key risk factor for the development of most chronic diseases. The latter frequently require continuous pharmacological interventions, which affect the individual's quality of life and pose a major challenge for modern society, as a significant burden on its health system. Currently, intensive research is conducted in the field of aging, which could eventually enable the development of novel therapeutic approaches targeting the biochemical pathways involved in this process, resulting in a more causal treatment of the age-related chronic diseases. Among the hallmarks of aging, cellular senescence plays a significant role in the development of many age-related diseases, and it thus represents a promising target. The first promising compounds targeting these cells have already entered clinical trials. Here, we present the mechanisms leading to senescence, outline some of the key properties of senescent cells, and

describe current approaches of their detection and targeting for therapeutic purposes.

KEY WORDS:

aging, biomarkers, senolytics, senomorphics, senescent cells

1 STARANJE

Zaradi daljše življenjske dobe, kot posledice višje stopnje preživetja v zgodnjih letih, ter sočasnega upada rodnosti se delež ostarelega prebivalstva nenehno povečuje. Poleg tega demografski kohort prebivalstva, znan kot »baby boomerji«, ki zajema posameznike, rojene med letoma 1946 in 1964, počasi dosega obdobje starosti. Slednje napoveduje velik svetovni demografski premik, imenovan tudi »srebri cunami (silver tsunami)«, ki bo prinesel mnoge izzive na številnih socialnih in ekonomskih področjih, vključno z zdravstvom. S staranjem

se namreč veča dovzetnost za s starostjo povezane bolezni. Nekatere najpomembnejše so srčno-žilne bolezni, možganska kap, kronične pljučne bolezni, rak, diabetes, osteoartrza ter demenca. S starostjo se poveča tudi tveganje za multimorbidnost – tj. sočasno prisotnost več bolezenskih stanj (1). Staranje definiramo kot proces časovno odvisnega upadanja funkcionalnega delovanja organizma, ki vodi do večje ranljivosti in na koncu smrti. Odvija se hitro (npr. pri kvasovkah, ogorčici, sadni mušici), postopno (npr. pri miših in človeku), lahko pa poteka tudi zelo počasi (npr. pri kamniti ribi, želvi, bristlekonskem boru) (2). Tako je staranje kompleksen večdimenzionalen proces, katerega celoten potek še slabo razumemo in je zelo odvisen od posamezne vrste organizma. Vedno več raziskav se ukvarja z mehanističnim razumevanjem staranja in raziskovalci so definirali nekatere splošne značilnosti staranja, ki so med seboj povezane in značilne za večino organizmov, predvsem pa za sesalce, torej tudi človeka. Te so: genomska nestabilnost, krajšanje telomer, epigenetske spremembe, izguba proteostaze, izčrpanost matičnih celic, celična senescenca, mitohondrijska disfunkcija, deregulirano zaznavanje hranil, spremenjena medcelična komunikacija (slika 1) (3, 4).



Slika 1: Shematski prikaz splošnih značilnosti staranja (prirejeno po (3)).

Figure 1: Schematic representation of the hallmarks of aging (adapted from (3)).

S trenutno uveljavljenimi terapijami se prvenstveno osredotočamo na zdravljenje posamezne bolezni. Zdravilne učinkovine praviloma blažijo simptome ali pa se ukvarjajo z odpravljanjem posledic teh bolezni. V mnogih primerih žal to le malo prispeva k izboljšanju celotnega zdravstvenega stanja, saj so v poznejših letih življenja navadno prisotne še številne druge zdravstvene težave in komorbidnosti. Proces staranja tako predstavlja gonilo zdravstvenih težav v poznejšem življenjskem obdobju, zato predstavlja pomembno tarčo za zdravila prihodnosti. Poleg tega so raziskave pokazale, da je daljša življenjska doba povezana tudi z daljšim obdobjem odsotnosti s starostjo povezanih bolezni (5). To mlado področje raziskav se je začelo intenzivneje razvijati v novem tisočletju. Želja, da bi z mehanističnim poznavanjem procesov staranja omogočili tudi učinkovitejše zdravljenje, predstavlja eno izmed velikih raziskovalnih prioritet in izzivov 21. stoletja.

2 CELIČNA SENESCENCA

2.1 OPREDELITEV

Celična senescenca je eden splošnih znakov staranja. Gre za stanje trajne ustavitve celičnega cikla, ki sta ga Hayflick in Moorhead prvič opisala že leta 1961 na kulturi človeških fibroblastnih celic (6). Senescentne celice se ustavijo v fazi celičnega cikla G1 (ali tudi v fazi G2) kot odgovor na krajšanje telomer, genotoksični stres ter prekomerno izražanje ali inaktivacijo nekaterih genov, kot sta npr. gena *RAS* in *PTEN*. Senescenca je vključena tudi v fiziološke procese, kot so celjenje ran, fibroza, preoblikovanje tkiv in embrionalni razvoj, in ima tako pomembno vlogo za organizem. Senescentne celice so podvržene številnim spremembam, ki so odvisne od vrste celice in stresnega dejavnika. S pomočjo komponent imunskega sistema omogočajo tudi lastno odstranjevanje, vendar se s starostjo začnejo kopičiti (1, 7). Senescentne celice so opredelili kot vzročni dejavnik pri staranju sesalcev, saj njihova odstranitev upočasni staranje pri miših (8–10). Ena izmed njihovih ključnih lastnosti je s senescenco povezan sekretorni fenotip (*senescence-associated secretory phenotype*, SASP), ki ga sestavlja več dejavnikov, vključno s kemokini, citokini, rastnimi dejavniki in proteazami, in ga bomo natančneje opisali v nadaljevanju. Posledično so tesno povezane z vnetjem, ki prav tako predstavlja pomembno značilnost staranja (11).

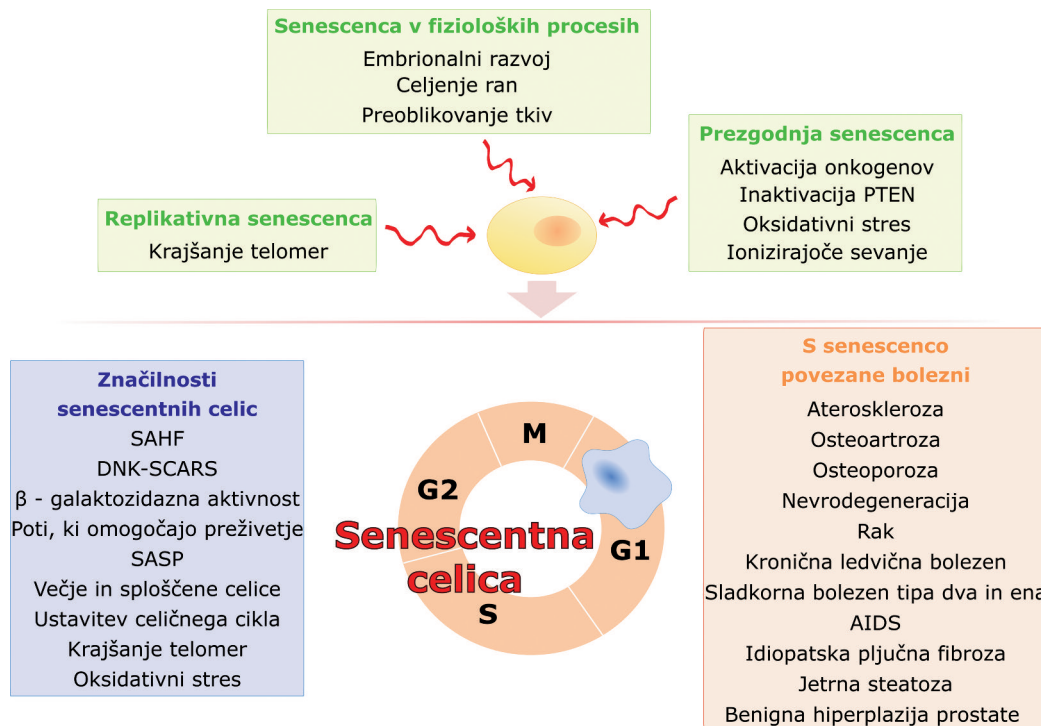
Kopičenje senescentnih celic je povezano tudi z razvojem s starostjo povezanih bolezni, predvsem z aterosklerozo, osteoartrazo, osteoporozo, nevrodegeneracijo, rakom, kronično ledvično boleznijo, sladkorno boleznijo tipa ena in tipa dva. Prav tako imajo te celice domnevno vlogo pri AIDS-u, idiopatski pljučni fibrozi, jetrni steatozi in benigni hiperplaziji prostate (1). Kot zanimivost omenimo še, da so med pandemijo covid-19 raziskave nakazale, da SARS-CoV-2 prednostno cilja senescentne celice v pljučih, ki prekomerno izražajo dve predlagani tarči – dipeptidil peptidazo 4 (DPP4, znana tudi kot CD26) in angiotenzin konvertazo 2 (ACE-2) (12).

2.2 MEHANIZMI NASTANKA SENESCENTNIH CELIC

V splošnem poznamo tri mehanizme, ki vodijo do senescentnih celic (slika 2). Senescenco, ki omogoča pravilen potek nekaterih fizioloških procesov, kot so celjenje ran (13), preoblikovanje tkiv in embrionalni razvoj (14), imenujemo senescenca v fizioloških procesih. Preostala mehanizma povzročajo različni stresorji. Replikativna senescenca se pojavlja zaradi progresivnega krajšanja telomer (15), prezgodnja senescenca (1) pa nastane kot celični odziv na dražljaje, ki povzročajo nepopravljive poškodbe (npr. oksidativni stres, ionizirajoče sevanje, nekatere terapije) ali prekomerno/pomanjkljivo izražanje/aktivnost nekaterih genov (16).

2.2.1 Replikativna in prezgodnja senescenca

Replikativna senescenca je povezana s podvajanjem molekule DNA. Telomere so ponovljive sekvence nukleotidov TTAGGG na koncih kromosomov, ki ščitijo genetsko informacijo. Ker po vsaki celični delitvi pride do skrajšanja nepodvojene DNA, so telomere krajše v hitro delečih se tkivih, kot so adipociti, levkociti in fibroblasti (17). Običajno po približno 50 celičnih delitvah (6) krajšanje telomer prepoznamo kot poškodbo DNA, ki izzove specifičen odziv, imenovan tudi DDR (*DNA damage response*) (18). Domnevamo, da poškodba DNA najprej aktivira kinazi ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) in ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein*), ki nato aktivirata širok spekter beljakovin, vključno s kinazo kontrolne točke 2 (Chk2). Slednja posreduje signalizacijo poškodbe DNA različnim dejavnikom, ki sodelujejo pri zaustavljanju celičnega cikla, apoptozi in popraviljanju DNA. Ti vključujejo fosforilacijo ter posledično stabilizacijo in aktivacijo proteina p53, kar vodi do transkripcije proteina p21. Slednji inhibira od ciklina odvisno kinazo 2 (CDK2) in tako prepreči fosforilacijo proteina retinoblastoma



Slika 2: Celično senescenco, udeleženo v mnogih bolezenskih stanjih, izzovejo različni dejavniki in jo razdelimo na replikativno in prezgodnjo senescenco ter senescenco, udeleženo v fizioloških procesih. Glede na tip celice in induktor imajo senescentne celice različne značilnosti.
Figure 2: Cellular senescence, involved in many disease states, is triggered by various factors, and is divided into replicative and premature senescence and senescence involved in physiological processes. Depending on the cell type and induktor, senescent cells possess different characteristics.

(Rb). Prepisovanje beljakovin, potrebnih za napredovanje celičnega cikla v naslednjo stopnjo (faza S), je zato ustavljeno, kar vodi v zaustavitev celičnega cikla v fazi G1 (1, 19, 20). Prezgodnja senescenca predstavlja široko in raznoliko skupino tvorbe senescentnih celic, katerih mehanizmi nastanka so še vedno slabo opredeljeni. Navadno je povezana z različnimi stresorji, ki senescenco sprožijo preko od DDR odvisnih ali neodvisnih poti. Dejavniki, ki so se v dosedanjih raziskavah izkazali za pomembne, vključujejo protein p19^{Arf} (protein iz lokusa CDKN2a, ARF) ali p16^{Ink4a}, prekomerno izražanje dejavnika transkripcije faze S E2F3 in prekomerno izražanje ali znižanje izražanja nekaterih genov (npr. RAS, BRAF, MYC, PTEN) (19).

2.3 URAVNAVANJE KOLIČINE SENESCENTNIH CELIC S POMOČJO IMUNSKEGA SISTEMA

V uravnavanje količine senescentnih celic je udeležen tudi imunski sistem. Le-ta jih odstrani s trenutno še slabo ra-

zumljenim procesom, ki vključuje prirojen in pridobljen imunski odziv. Pri odstranjevanju so vključene različne vrste imunskih celic, vključno z makrofagi, nevtrofilci, celicami naravnimi ubijalkami (NK) in T-limfociti CD4⁺. Prav tako naj bi bile vključene tudi komponente SASP (kemokini in citokini), ki služijo kot kemoatraktanti za NK in druge imunske celice, ter nekateri izraženi adhezijski (npr. ICAM-1, VCAM-1) in drugi proteini (npr. MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*), UL16 vezoči protein 2 (ULBP2) in malondialdehid (MDA)-vimentin) (1).

Prav tako še vedno ne razumemo popolnoma, zakaj se senescentne celice pričnejo kopičiti v poznejšem življenjskem obdobju. Nedavno so ugotovili, da senescentni dermalni fibroblasti izražajo molekulo glavnega histokompatibilnega kompleksa (MHC) razreda Ib, HLA-E. HLA-E je v večji meri izražen pri starejših posameznikih. Interagira z zaviralnim receptorjem NKG2A, ki je prisoten na celicah NK in visoko diferenciranih T-limfocitih CD8⁺ (21, 22). Interakcija med NKG2A in HLA-E zavira očistek senescentnih celic s celicami NK in CD8⁺, ki imajo izražen receptor NKG2A. *In vitro* zaviranje interakcije HLA-E/NKG2A krep

imunski odziv proti senescentnim celicam, kar kaže na vlogo HLA-E pri njihovem kopičenju (23)."

3 ZNAČILNOSTI SENESCENTNIH CELIC

Poleg trajne zaustavitve celičnega cikla imajo senescentne celice še nekaj značilnosti, ki jih ločijo od drugih celic. Najprej kažejo spremembe v morfologiji in delovanju, kar vodi v moteno celično komunikacijo z okoliškimi celicami (24). Senescentne celice lahko prostorsko prerazporedijo heterokromatin v t. i. s senescenco povezana heterokromatinska žarišča (*senescence-associated heterochromatin foci*, SAHF), kar lahko vodi v spremenjeno izražanje genov (25). Kot odgovor na poškodbo DNA se v senescentnih celicah lahko pojavijo tudi segmenti DNA s spremembami v kromatinu, ki ojačajo senescenco (*DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*, DNA-SCARS) (26). Te in še nekatere druge modifikacije, ki spremljajo celično senescenco, so izpostavljene na sliki 2.

Različne senescentne celice se v svojih značilnostih lahko tudi močno razlikujejo, zato je razvoj ustreznih označevalcev za njihovo prepoznavanje in nadaljnje načrtovanje učinkovitih terapevtikov precej otežen (27). Dosedanji pristopi detekcije in terapije v večini temeljijo na poznavanju ključnih značilnosti senescentnih celic, kot so: (i) s senescenco povezan sekretorni fenotip, (ii) specifične poti, ki omogočajo preživetje teh celic in preprečijo apoptozo, in (iii) s senescenco povezana β -galaktozidazna aktivnost.

3.1 S SENESCENCO POVEZAN SEKRETORNI FENOTIP – SASP

Kot smo omenili, senescentne celice razvijejo edinstven sekretorni fenotip, imenovan SASP (*senescence-associated secretory phenotype*), ki ga sestavljajo raznoliki citokini, kemokini, rastni dejavniki, proteaze, lipidi in nemakromolekularni elementi (npr. dušikov oksid, reaktivne kisikove zvrsti). Nekatere komponente SASP so pogostejše od drugih, vendar se razlikujejo med različnimi senescentnimi celicami, odvisno od induktorjev senescence in tipa celic (1). Pri nastanku SASP v posamezni senescentni celici sodelujejo različni dejavniki, med katerimi so najpomembnejšo vlogo izkazali jedrni faktor kB (NF- κ B), protein p53, CCAAT/ojačevalno-vezavni protein in protein GATA4. Nastanek SASP poteka v treh fazah: najprej se zgodi hitra z DDR povezana

faza, ki ji sledi zgodnja faza samoojačanja, kjer se pričnejo sproščati dejavniki SASP. V zadnji, zreli fazi pride do popolnega izražanja posameznega fenotipa SASP. Nekateri dejavniki, kot sta interleukina 1 α in β (IL-1 α , IL-1 β), se izrazijo prej kot drugi in vplivajo na nadaljnjo strukturo SASP (1). Senescentne celice lahko preko SASP delujejo na parakrini ali avtokrini način ter povzročajo provnetno mikrookolje ter tako spodbujajo lastno odstranjevanje z aktivacijo in rekrutiranjem imunskih celic. V nekaterih primerih povzročajo odpornost na zdravila (npr. protirakave učinkovine) in angiogenezo. Preko teh mehanizmov lahko SASP vzdržuje senescenco in jo povzroča v sosednjih celicah (28). Čeprav je senescenca v osnovi obrambni mehanizem pri raku, lahko senescentne celice prek SASP tudi spodbujajo kancerogenost. SASP ima torej preko spodbujanja vaskularizacije in celične proliferacije tako tumor promotorske kot tudi protitumorne lastnosti (spodbujanje senescence in imunskega očistka) (29). Prav zato je za stabilnost organizma ključno pravilno ravnotežje.

3.2 POTI, KI OMOGOČAJO PREŽIVETJE SENESCENTNIH CELIC

Podobno kot rakave tudi senescentne celice razvijejo mehanizme, ki jim omogočajo njihovo dolgoročno preživetje in izognitev programirani celični smrti – apoptozi. Senescentne celice se apoptozi lahko izognejo z aktivacijo proteinov iz družine Bcl (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, Mcl-1 in Bfl-1) ali preko vpliva na p53-p21-serpin in fosfoinozimid-3-kinazno (PI3K)/AKT pot. Pri odpornosti proti apoptozi sodelujejo tudi od efrina odvisna receptorska liganda, efrina B1 in B3, zaviralec aktivatorja plazminogena tipa 1 (PAI-1) (27), s hipoksijo inducirani dejavnik 1 α (HIF-1 α) ter proteini vročinskega šoka (HSP90) (30). Pri teh se izražanje pro- in antiapoptotičnih proteinov lahko razlikuje glede na vrsto celice (27). To pomeni, da se posamezna vrsta senescentnih celic lahko različno odzove na moduliranje izbrane »poti preživetja«, kar posledično omogoča tudi specifično ciljanje na posamezen tip senescentnih celic.

3.3 S SENESCENCO POVEZANA β -GALAKTOZIDAZNA AKTIVNOST

Encim β -D-galaktozidaza (β -Gal) je evkariontska hidrolaza, ki cepi končne β -galaktozne ostanke iz naravnih substratov, kot so gangliozidi, glikoproteini in glikozaminoglikani. Je lizosomalni encim, ki optimalno deluje pri pH, ki je blizu naravnemu okolju lizosoma (pH 4,0–4,5) (31).

Leta 1995 so Dimri in sod. v senescentnih človeških fibroblastnih celicah odkrili s senescenco povezano β -galaktozidazno aktivnost pri pH 6. Detekcija encimske aktivnosti pri pH 6 se je v primerjavi z drugimi celicami izkazala kot specifična za senescentne celice (32) in je posledica povečane koncentracije lizosomalnega encima in njegove rezidualne aktivnosti pri suboptimalnem pH, kar so potrdili tudi na nivoju izražanja genov (33).

4 OZNAČEVALCI ZA DETEKCIJO SENESCENTNIH CELIC

Za uspešen študij senescentnih celic je ključna njihova učinkovita identifikacija. Ravno ta korak predstavlja pomemben izziv pri proučevanju celične senescence, saj trenutno še ne poznamo dovolj občutljivega in specifičnega označevalca. Težavo predstavlja dejstvo, da prej opisane

značilnosti senescentnih celic niso prisotne v enakem obsegu v vseh vrstah senescentnih celic, medtem ko nekatere od njih sploh niso specifične za senescentne celice. Zato za detekcijo senescentnih celic večinoma uporabljamo kombinacije njihovih značilnosti (27). Najpogosteje po vizualni in rastni analizi celic celične kulture testiramo še na vsaj dva od naslednjih potencialnih označevalcev: s senescenco povezana β -galaktozidazna aktivnost, povečana prisotnost proteina p16, SAHF in DNA-SCARS (označevalci poškodb DNA) (34) (preglednica 1).

5 SENESCENTNE CELICE KOT TERAPEVTSKE TARČE

Senescentne celice so vzročno povezane s staranjem in imajo pomembno vlogo pri nastanku več s starostjo povezanih bolezni (29). Zato predstavljajo nove potencialne te-

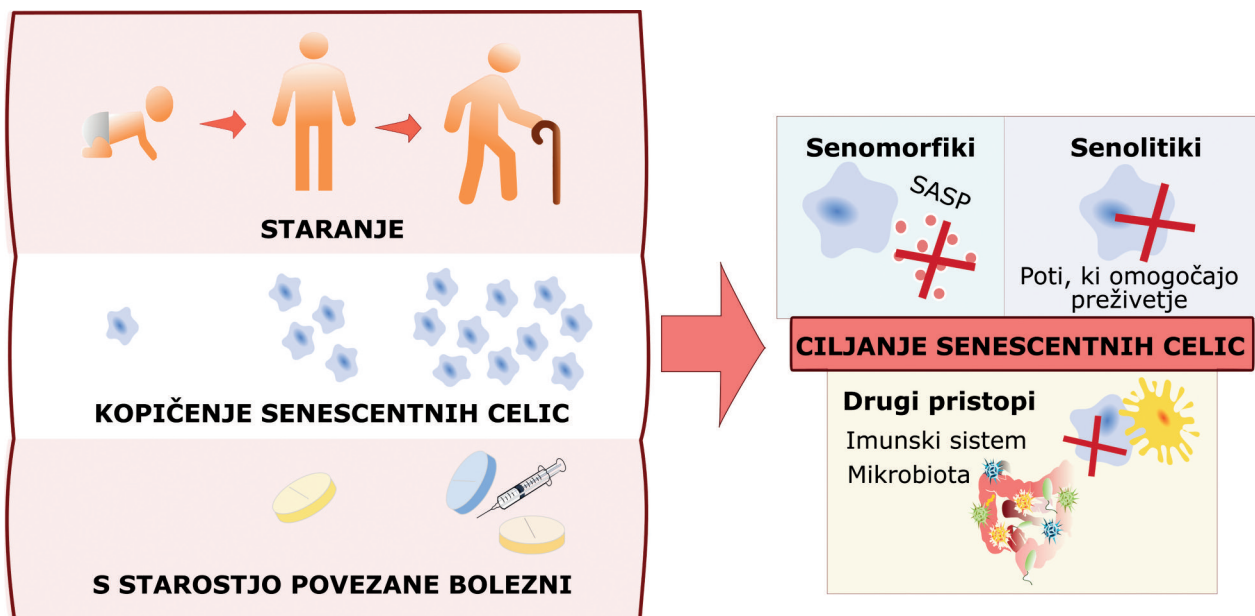
Preglednica 1: Pregled najpomembnejših označevalcev senescentnih celic (1, 35).

Table 1: Overview of most important biomarkers of senescent cells (1, 35).

OZNAČEVALEC	METODA ZA DOLOČANJE	REFERENCA
Morfološke spremembe (velikost jedra in oblika)	barvanje DNA s fluorescentnimi barvili vizualni pregled za velikost in obliko celice	34
Ustavljena replikacija	BrdU/EdU test štetje celic	34
Prisotnost proteinov, značilnih za ustavitev celičnega cikla	metoda, osnovana na imunskem odtisu	34
β -galaktozidazna aktivnost pri pH = 6,0	uporaba kromogenega (X-Gal), fluorescentnega (C ₁₂ FDG) ali kemiluminiscenčnega substrata (Galacton)	34, 36
Komponente SASP	sendvič ELISA kvantitativna proteomika na osnovi SILAC profiliranje mRNA	34
S senescenco povezana heterokromatinska gorišča (SAHF) in njihovi označevalci	barvanje DAPI-imunofluorescenca	34
DDR (žarišča poškodb DNA in teles PML)	označevanje žarišč poškodovane DNA/teles PML, pregled števila, velikosti žarišč in kolokalizacije teles PML	34

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, BrdU – bromodeoksiuridin, EdU – 5-etinil-2'-deoksiuridin, X-Gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid, C₁₂FDG – 5-dodekanoilamino fluorescein di- β -D-galaktopiranozid, SASP – s senescenco povezan sekretorni fenotip, ELISA – encimskoimunski test, SILAC – stabilno označevanje izotopa z aminokislino v celični kulturi, telesa PML – promielocitska levkemična telesa, DDR – odziv na poškodbe DNA.





Slika 3: Povezava staranja, kopičenja senescentnih celic in s starostjo povezanih bolezni ter strategije ciljanja senescentnih celic s potencialnimi zdravilnimi učinkovinami.

Figure 3: Relationship between aging, accumulation of senescent cells and age-related diseases along with existing strategies of targeting senescent cells with potential drugs.

rapevtske tarče za zdravljenje teh bolezni. Ločimo dve strategiji za regulacijo škodljivih učinkov senescentnih celic: (i) specifično odstranjevanje senescentnih celic ali (ii) modulacija njihove funkcije in morfologije oz. upočasnitev njihovega nastanka (slika 3) (1).

Senolitiki so spojine, ki povzročajo specifično odstranjevanje senescentnih celic. To dosežemo z delovanjem na v senescentnih celicah aktivirane poti, zlasti tiste, ki sodelujejo pri njihovi odpornosti proti apoptozi. Sem sodijo tarče, kot so proteini iz družine Bcl, p53, p21, PI3K, AKT in HSP90. Poznamo tudi nekatere druge tarče, kot so FOXO4 (*fork-head box protein O*) in histonske deacetilaze (1).

Senomorfiki, redkeje imenovani tudi senostatiki, so spojine, ki delujejo na fenotip senescentnih celic in tako zmanjšajo njihove škodljive učinke na okoliško tkivo ali zakasnjeno nastop senescence in pri tem ne povzročajo apoptoze senescentnih celic. Izraz je pomanjkljiv, saj se prekriva z drugimi izrazi v literaturi, kot sta inhibitorji SASP (37) in geroprotektorji (38). Ker obe omenjeni skupini delujeta na fenotip senescentnih celic, ju tu uvrščamo med senomorfike. Senomorfiki torej zavirajo tvorbo SASP. Kot terapevtske tarče so v uporabi sirtuin 1 (SIRT1), mehanistična tarča rapamicina (mTOR), NF- κ B, p38-mitogen aktivirana protein-

ska kinaza (P38MAPK), s kinazo aktivirana protein kinaza 2 (MK2), MDM2, glukokortikoidni receptorji in IL-1 α . Izraz senomorfiki lahko nadalje razširimo in vanj vključimo spojine, ki modulirajo delovanje in morfologijo senescentnih celic in zavirajo njihovo tvorbo. Te spojine lahko modulirajo telomerazno aktivnost, spreminjajo razmerja nekaterih oksidantov in antioksidantov, ki so pomembni za nastanek senescence, ali vplivajo na celične organele, kot so lizosomi in mitohondriji (1).

Poleg senolitikov in senomorfikov uporabljamo tudi druge pristope, s katerimi vplivamo na senescentne celice, npr. na njihovo odstranjevanje s komponentami imunskega sistema, ki temelji na specifičnih proteinih, izraženih na površini teh celic. Novejše raziskave so pokazale, da na količino senescentnih celic vpliva tudi mikrobiota (39). Nekateri senomorfiki so predstavljeni v preglednici 2, medtem ko so strukture izbranih predstavnikov obeh skupin podane na sliki 4.

Čeprav so raziskave vpliva na senescentne celice v terapevtske namene večinoma še v začetnih stopnjah, so nekatere spojine že vstopile v različne faze kliničnih raziskav; nekatere od njih so predstavljene v preglednici 3.

Razvoj optimalnega dostavnega sistema se običajno začne po identifikaciji potencialne učinkovine, ko že poznamo

Preglednica 2: Pregled identificiranih spojin z aktivnostjo na senescentnih celicah.

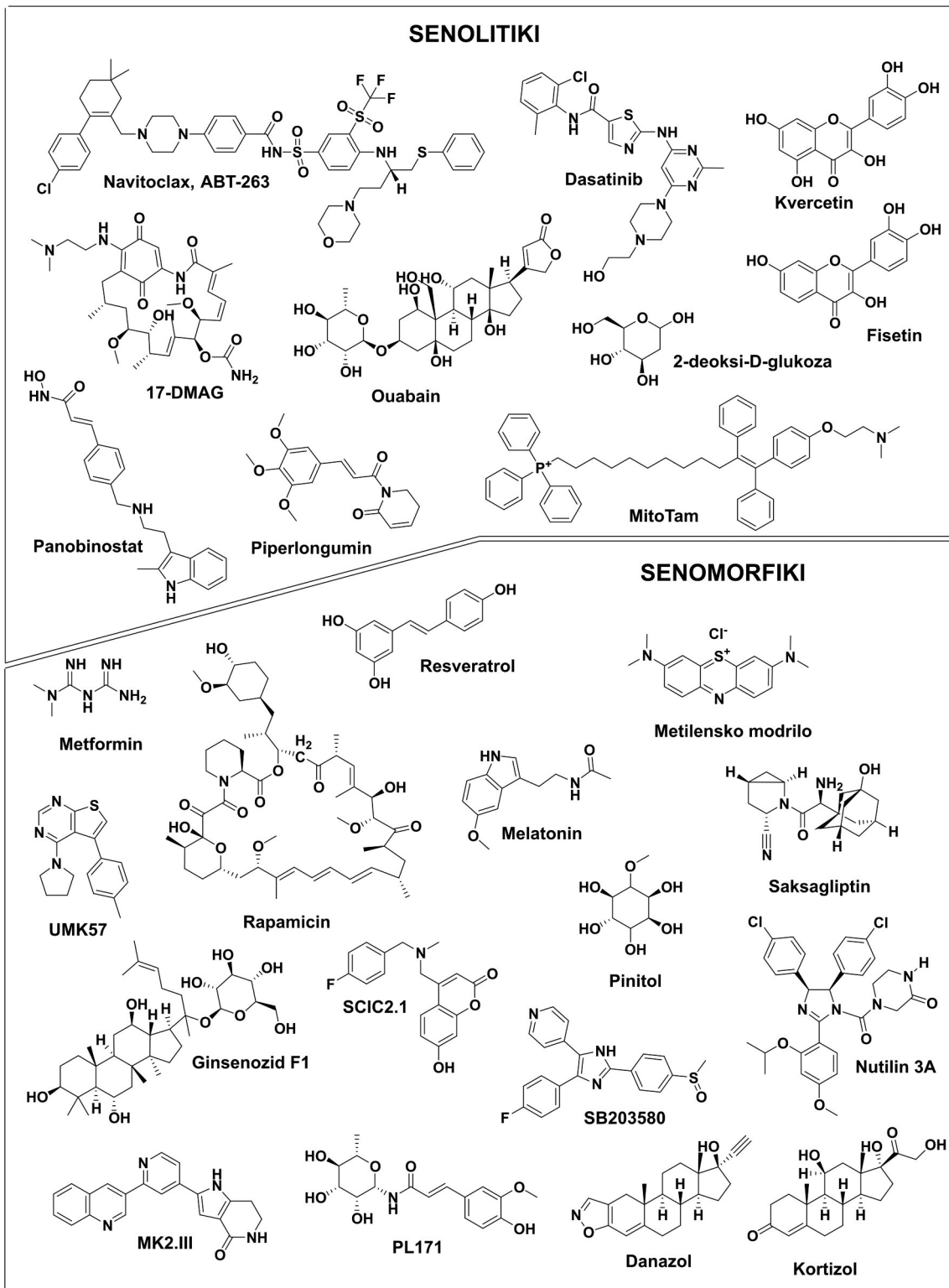
Table 2: Overview of identified compounds with activity on senescent cells.

SENOLITIKI	TARČA/TARČNE POTI	SENMORFIKI	TARČA/TARČNE POTI
Navitoclax (ABT-263) (40), ABT-737 (41)	Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w	metformin (42)	ni natančno znano
Venetoclax (ABT-199) (41)	Bcl-2	rapamicin (43)	mTOR
WEHI-539 (+ABT-199) (44), A1331852, A1155463 (45)	Bcl-xl	NEMO vezoča domena (NBD), vezana na domeno 8K (46)	IKK
		melatonin (47)	številne poti
TW-37 (40)	Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1	SCIC2, SCIC2.1 (48), omentin-1 (49)	SIRT1
Piperlongumin in analogi (50)	Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1	platikodin D (51), metilensko modrilo (52)	mitohondrij
		resveralogi (53)	ekspresija »splicing« faktorjev
Dasatinib (54)	tirozin kinaza	SB203580 (55), UR-13756 (56), BIRB-796 (23)	P38MAPK
Kvercetin (54), fisetin (45, 57)	serpini, PI3K in druge kinaze	PF-3644022, MK2.III (56)	MK2
Kardiotonični glikozidi (58)	Na ⁺ /K ⁺ transportna ATP-aza (podenota α), NOXA pot	nutilin 3A, MI-63 (59)	MDM2
		PL171 (60)	SIRT3
FOXO4-DRI (61)	FOXO4-p53 interakcija	ginsenzoid F1 (62)	P38MAPK
Geldanamicin, 17-DMAG (63)	HSP-90	resveratrol (64)	različne poti, vključno s SIRT1
Panobinostat (65)	histonska deacilaza	Kortizol, kortikosteron (66)	glukokortikoidni receptor
MitoTam (67)	dihalna veriga	17-β-estradiol (68), danazol (69)	telomeraza
2-deoksi-D-glukoza (70)	GLUTs	UMK57 (71)	kinezin-13
		nanodelci MoS ₂ (72)	avtofagični fluks lizosomov
		pinitol (73)	Nrf2 pot
		saksagliptin (74)	DPP4

GLUTs – glukozni transporterji, Nrf2 – jedrnemu dejavniku eritroid 2 soroden dejavnik 2, IKK – kinaza IκB

njene fizikalno-kemijske, farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti, tarčno mesto delovanja ter potencialna zunajtarčna mesta. Čeprav še nobene učinkovine s tem mehanizmom delovanja niso vpeljali v terapijo, najdemo v

literaturi že nekaj poskusov razvoja dostavnih sistemov, ki bi omogočili specifično ciljanje senescentnih celic in tako zmanjšali tveganje za neželene učinke. Tako npr. nanodelci iz poroznega ogrodka iz silicijevega dioksida, obdani z ga-



Slika 4: Izbrane spojine, ki delujejo kot senolitiki ali senomorfi (75).

Figure 4: Representative compounds that act as either senolytics or senomorphics (75).

Preglednica 3: Pregled izbranih kliničnih raziskav s senolitiki in senomorfi (1).

Table 3: Overview of selected clinical studies with senolytics and senomorphics (1).

NASLOV KLINIČNE RAZISKAVE	BOLEZEN	FAZA	UČINKOVINA	KODA RAZISKAVE
Senescenca, krhkost in delovanje mezenhimskih matičnih celic pri kronični bolezni ledvic: učinek senolitičnih učinkovin	kronična ledvična bolezen	faza 2	dasatinib + kvercetin	NCT02848131
Ciljanje senescentnih celic s senolitiki za izboljšanje zdravja okostja pri starejših ljudeh	/	faza 2	dasatinib + kvercetin fisetin	NCT04313634
Pilotna raziskava za proučevanje varnosti in izvedljivosti senolitične terapije za modulacijo napredovanja Alzheimerjeve bolezni (stomp-ad)	Alzheimerjeva bolezen	faza 1, faza 2	dasatinib + kvercetin	NCT04063124
Senolitična zdravila zmanjšujejo z osteoartritisom povezano degeneracijo artikularnega hrustanca: klinično preskušanje	osteoartroza, koleno	faza 1, faza 2	fisetin	NCT04210986
Dvojno slepo, s placebom kontrolirano preskušanje »anti-aging«, proavtofagijskih učinkov metformina pri odraslih s prediabetesom	prediabetes	faza 3	metformin	NCT03309007
Metformin v raziskavah dolgoživosti (MILES)	/	faza 4 (zaključena)	metformin	NCT02432287
Vpliv zaviralcev mTOR in druge intervencije metabolnih procesov pri ostarelih: imunske, kognitivne in funkcionalne posledice	/	faza 2 (zaključena)	rapamicin	NCT02874924

laktooligosaharidi, omogočajo specifično dostavo v senescentne celice, pri čemer izkoriščamo povišano aktivnost lizosomske β -galaktozidaze v senescentnih celicah (76, 77). Še en primer specifične dostave so nanodelci iz kalcijevega karbonata, obdani z laktozo (Lac-PEG-COOH), konjugirano z monoklonskimi protitelesi proti v senescentnih celicah prekomerno izraženem proteinu CD9 (78). Nedvomno bo imel primeren dostavni sistem za uspeh terapije, usmerjene na senescentne celice, ključno vlogo zaradi potrebe po zagotavljanju specifičnega delovanja.

6 IZZIVI IN NADALJNI RAZVOJ PODROČJA

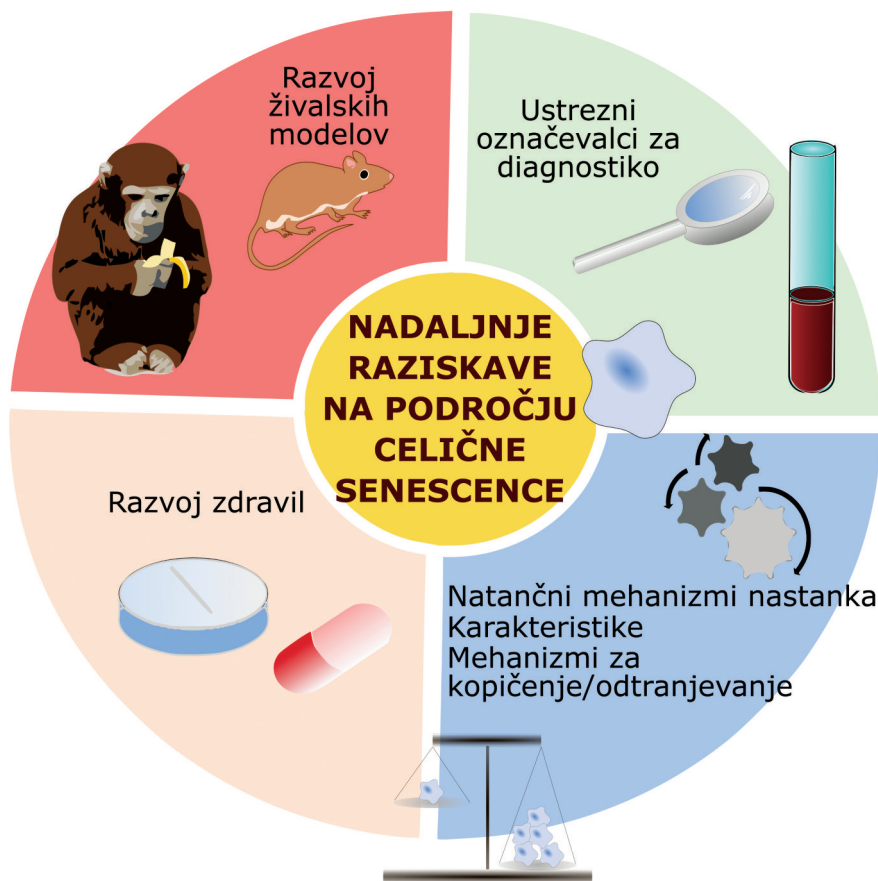
Senescenca je razmeroma mlado, hitro razvijajoče se raziskovalno področje. Še zlasti to velja za področje potencialnih terapevtikov. Še vedno je prisotnih mnogo neznank, na katere moramo z raziskavami poiskati ustrezne odgovore. Najprej omenimo potrebo po natančnejšem pozna-



vanju mehanizmov tvorbe senescentnih celic ter njihovih značilnosti. Prav tako moramo pojasniti razloge za njihovo kopičenje ter odkriti mehanizme, ki omogočajo njihovo učinkovito odstranjevanje pri mlajših posameznikih. Potreben bo tudi nadaljnji razvoj občutljivih označevalcev za njihovo detekcijo (slika 5).

Eden izmed ključnih izzivov pri raziskovanju celične senescence je odsotnost specifičnega označevalca za detekcijo senescentnih celic. Obstoječe strategije sicer omogočajo uspešno identifikacijo senescentnih celic, vendar zahtevajo uporabo kombinacije razmeroma nespecifičnih označevalcev, kar pomeni več časa in sredstev, potrebnih za raziskave. Pomemben korak je bil storjen z nedavno predstavljenim »Atlasom SASP« (79), obsežno proteomsko bazo topnih beljakovin in eksosomskih dejavnikov SASP, pridobljenih iz različnih tipov celic, ki so bile podvržene senescenci preko različnih induktorjev (79).

Ustrezni živalski modeli so naslednji raziskovalni izziv, saj rezultatov, pridobljenih iz teh modelov (identificirani potencialni terapevtiki, mehanizmi), ni vedno mogoče neposredno prenesti na človeka. Miši so najpogosteje uporabljeni testni živalski modeli, čeprav med njimi in človekom obstaja precej razlik med procesi staranja in izražanjem bolezni. S prilagoditvijo njihovega genskega zapisa je mogoče zagotoviti ustrežnejše in natančnejše mišje modele. Takšen primer so »humanizirane« miši, ki so imunsko oslabiljene in imajo prisotne funkcionalne človeške hematopetske in imunske celice ter tkiva (npr. ksenografti). Z vidika večje sorodnosti je v raziskavah staranja smiselna uporaba nečloveških primatov. Uporaba slednjih je zelo zahtevna, saj je povezana s številnimi etičnimi vprašanji, zahtevnim vzdrževanjem, dolgoživostjo ter majhnim številom potomcev. Podobno kot pri mišjih modelih pa bi v prihodnosti mogoče lahko razvili tudi modele nečloveških primatov s pospešenim staranjem (1).



Slika 5: Ponazoritev nekaterih bodočih izzivov raziskav na področju celične senescence.
 Figure 5: Illustration of future research challenges in the field of cellular senescence.

7 SKLEP

Senescentne celice so ena izmed ključnih značilnosti staranja, zato predstavljajo potencialno novo terapevtsko tarčo. Vse več raziskav potrjuje vzročno povezavo med kopičenjem senescentnih celic in večjo pojavnostjo različnih s starostjo-povezanih bolezni. V večini primerov njihovo vpletenost potrjuje tudi izboljšanje simptomov po njihovi odstranitvi ali utišanju dela SASP, ki je z njimi povezan. Ta opažanja nakazujejo, da bi morda že preprosto odstranjevanje senescentnih celic ali manipulacija z njihovim fenotipom s senolitiki ali senomorfiki lahko vodila k podaljšanju obdobja odsotnosti s starostjo povezanih bolezni in tako izboljšala potek nekaterih bolezni (npr. idiopatska pljučna fibroza, rak, genetske bolezni, povezane s kratkimi telomerami).

V nekaterih primerih (npr. celjenje ran, embrionalni razvoj) so senescentne celice tudi koristne za organizem, zato bo pravilna terapevtska uporaba nedvomno zelo zahtevna in povezana z mnogimi izzivi. Toda zaradi številnih mehanizmov njihovega nastanka in posledično raznolikih značilnosti senescentnih celic predvidevamo, da bo mogoče doseči tudi selektivno odstranitev oz. modulacijo zgolj posameznih tipov teh celic. To bo omogočilo, da se bomo izognili morebitnim negativnim posledicam in neželenim učinkom takšne terapije.

Na področju celične senescence se torej srečujemo z mnogimi izzivi, vključno z izostankom specifičnega označevalca za enostavno odkrivanje senescentnih celic, neustreznimi živalskimi modeli in nezadostnim razumevanjem temeljnih konceptov celične senescence. Rezultati intenzivnih raziskav trenutno nakazujejo, da jih lahko smatramo kot obetavne tarče za razvoj novih orodij in paradigem za bolj vzročno zdravljenje bolezni, povezanih s starostjo. Pomen in objektivni domet delovanja na senescentne celice bo seveda pokazala prihodnost. Že rezultati trenutno potekajočih kliničnih raziskav bodo kmalu postregli s prvimi podatki o potencialu tega pristopa za bodočo terapevtsko uporabo.

8 LITERATURA

1. Prašnikar E, Borišek J, Perdih A. Senescent cells as promising targets to tackle age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2021;66:101251.

2. Finch CE. Variations in senescence and longevity include the possibility of negligible senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1998;53(4):B235–B239.
3. López-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194–217.
4. Partridge L, Deelen J, Slagboom PE. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature.* 2018;561(7721):45–56.
5. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell.* 2014;159(4):709–13.
6. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585–621.
7. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, di Fagagna F d'Adda. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):75–95.
8. Karin O, Agrawal A, Porat Z, Krizhanovsky V, Alon U. Senescent cell turnover slows with age providing an explanation for the Gompertz law. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–9.
9. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016;530(7589):184–9.
10. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479(7372):232–6.
11. D' Alessio PA, Béné MC. AISA can control the inflammatory facet of SASP. *Mech Ageing Dev.* 2020;186:111206.
12. Lisanti MP, Sotgia F, Sargiacomo C. COVID-19 and chronological aging: senolytics and other anti-aging drugs for the treatment or prevention of corona virus infection? *Aging (Albany NY).* 2020;12(8):6511–7.
13. Jun J-I, Lau LF. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging (Albany NY).* 2010;2(9):627–31.
14. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell.* 2013;155(5):1104–18.
15. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):703–9.
16. Vizioli MG, Santos J, Pilotti S, Mazzoni M, Anania MC, Miranda C, et al. Oncogenic RAS-induced senescence in human primary thyrocytes: molecular effectors and inflammatory secretome involved. *Oncotarget.* 2014;5(18):8270–83.
17. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):3–11.
18. Di Fagagna F d'Adda, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194–8.
19. Childs BG, Durik M, Baker DJ, Van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424–35.
20. Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014;509(7501):439–46.
21. Prašnikar E, Perdih A, Borišek J. All-Atom Simulations Reveal a Key Interaction Network in the HLA-E/NKG2A/CD94 Immune Complex Fine-Tuned by the Nonameric Peptide. *J Chem Inf Model.* 2021;61(7):3593–603.
22. Prašnikar E, Perdih A, Borišek J. Nonameric Peptide Orchestrates Signal Transduction in the Activating HLA-E/NKG2C/CD94 Immune Complex as Revealed by All-Atom Simulations. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6670.



23. Pereira BI, Devine OP, Vukmanovic-Stejic M, Chambers ES, Subramanian P, Patel N, et al. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat Commun.* 2019;10:2387.
24. Kwon SM, Hong SM, Lee Y-K, Min S, Yoon G. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* 2019;52(1):5–12.
25. Sadaie M, Salama R, Carroll T, Tomimatsu K, Chandra T, Young AR, et al. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes Dev.* 2013;27(16):1800–8.
26. Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 1):68–81.
27. Knoppert SN, Valentijn FA, Nguyen TQ, Goldschmeding R, Falke LL. Cellular senescence and the kidney: potential therapeutic targets and tools. *Front Pharmacol.* 2019;10:770.
28. Hoare M, Narita M. Transmitting senescence to the cell neighbourhood. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):887–9.
29. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1047–78.
30. Wissler Gerdes EO, Zhu Y, Tchkonina T, Kirkland JL. Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions. *FEBS J.* 2020;287(12):2418–27.
31. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 20):3613–22.
32. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363–7.
33. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell.* 2006;5(2):187–95.
34. Galluzzi L, Vitale I, Kepp O, Kroemer G. Cell senescence: methods and protocols. Springer; 2013.
35. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J.* 2021;288(1):56–80.
36. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798–806.
37. Kirkland JL, Tchkonina T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21–8.
38. Moskalev A. Is anti-ageing drug discovery becoming a reality? *Expert Opin Drug Discov.* 2020;15(2):135–8.
39. Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, Yoshimoto S, Kanda H, Arai Y, et al. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through PGE2-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer discov.* 2017;7(5):522–38.
40. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging cell.* 2016;15(3):428–35.
41. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature communications.* 2016;7(1):1–11.
42. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappa B activation. *Aging cell.* 2013;12(3):489–98.
43. Wang R, Yu Z, Sunchu B, Shoaf J, Dang I, Zhao S, et al. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging cell.* 2017;16(3):564–74.
44. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge R-M, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2016;22(1):78.
45. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY).* 2017;9(3):955.
46. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF-kB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2601–12.
47. Lee JH, Yoon YM, Song K-H, Noh H, Lee SH. Melatonin suppresses senescence-derived mitochondrial dysfunction in mesenchymal stem cells via the HSPA1L-mitophagy pathway. *Aging Cell.* 2020;19(3):e13111.
48. Scisciola L, Sarno F, Carafa V, Cosconati S, Di Maro S, Ciuffreda L, et al. Two novel SIRT1 activators, SCIC2 and SCIC2.1, enhance SIRT1-mediated effects in stress response and senescence. *Epigenetics.* 2020;15(6-7):664–83.
49. Chai B, Zheng Z-H, Liao X, Li K-Y, Liang J-S, Huang Y-X, et al. The protective role of omentin-1 in IL-1beta-induced chondrocyte senescence. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2020;48(1):8–14.
50. Wang Y, Chang J, Liu X, Zhang X, Zhang S, Zhang X, et al. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY).* 2016;8(11):2915.
51. Shi C, Li Q, Zhang X. Platycodin D Protects Human Fibroblast Cells from Premature Senescence Induced by H2O2 through Improving Mitochondrial Biogenesis. *Pharmacology.* 2020;1–11.
52. Atamna H, Nguyen A, Schultz C, Boyle K, Newberry J, Kato H, et al. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J.* 2008;22(3):703–12.
53. Latorre E, Birar VC, Sheerin AN, Jeynes JCC, Hooper A, Dawe HR, et al. Small molecule modulation of splicing factor expression is associated with rescue from cellular senescence. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):31.
54. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower A, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' Heel of Senescent Cells: From Transcriptome to Senolytic Drugs. *Aging cell.* 2015;14(4):644–58.
55. Davis T, Kipling D. Assessing the role of stress signalling via p38 MAP kinase in the premature senescence of Ataxia Telangiectasia and Werner syndrome fibroblasts. *Biogerontology.* 2009;10(3):253–66.
56. Alimbetov D, Davis T, Brook AJ, Cox LS, Faragher RG, Nurgozhin T, et al. Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology.* 2016;17(2):305–15.
57. Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, Angelini L, Fuhrmann-Stroissnigg H, Xu M, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine.* 2018;36:18–28.
58. Guerrero A, Herranz N, Sun B, Wagner V, Gallage S, Guiho R, et al. Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics. *Nat Metab.* 2019;1(11):1074–88.

59. Wiley CD, Schaum N, Alimirah F, Lopez-Dominguez JA, Orjalo AV, Scott G, et al. Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–9.
60. Li Y, Lu J, Cao X, Zhao H, Gao L, Xia P, et al. A Newly Synthesized Rhamnoside Derivative Alleviates Alzheimer's Amyloid-beta-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Cell Senescence through Upregulating SIRT3. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
61. Baar MP, Brandt RM, Putavet DA, Klein JD, Derks KW, Bourgeois BR, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*. 2017;169(1):132–47.
62. Hou J, Cui C, Kim S, Sung C, Choi C. Ginsenoside F1 suppresses astrocytic senescence-associated secretory phenotype. *Chem-Biol Interact*. 2018;283:75–83.
63. Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, McGowan SJ, Zhu Y, Brooks RW, et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun*. 2017;8(1):1–14.
64. Ali D, Chen L, Kowal JM, Okla M, Manikandan M, AlShehri M, et al. Resveratrol inhibits adipocyte differentiation and cellular senescence of human bone marrow stromal stem cells. *Bone*. 2020;115252.
65. Samaraweera L, Adomako A, Rodriguez-Gabin A, McDaid HM. A novel indication for panobinostat as a senolytic drug in NSCLC and HNSCC. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–11.
66. Laberge R-M, Zhou L, Sarantos MR, Rodier F, Freund A, de Keizer PLJ, et al. Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell*. 2012;11(4):569–78.
67. Hubackova S, Davidova E, Rohlenova K, Stursa J, Werner L, Andera L, et al. Selective elimination of senescent cells by mitochondrial targeting is regulated by ANT2. *Cell Death Differ*. 2019;26(2):276–90.
68. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005;23(9):1699–706.
69. Townsley DM, Dumitriu B, Liu D, Biancotto A, Weinstein B, Chen C, et al. Danazol treatment for telomere diseases. *N Engl J Med*. 2016;374(20):1922–31.
70. Lane MA, Ingram DK, Roth GS. 2-Deoxy-D-glucose feeding in rats mimics physiologic effects of calorie restriction. *J anti-aging med*. 1998;1(4):327–37.
71. Barroso-Vilares M, Macedo JC, Reis M, Warren JD, Compton D, Logarinho E. Small-molecule inhibition of aging-associated chromosomal instability delays cellular senescence. *EMBO J*. 2020;21(5):e49248.
72. Ke S, Lai Y, Zhou T, Li L, Wang Y, Ren L, et al. Molybdenum disulfide nanoparticles resist oxidative stress-mediated impairment of autophagic flux and mitigate endothelial cell senescence and angiogenic dysfunctions. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(2):663–74.
73. Lou C, Deng A, Zheng H, Sun G, Zhao H, Li A, et al. Pinitol suppresses TNF-alpha-induced chondrocyte senescence. *Cytokine*. 2020;130:155047.
74. Chen Z, Yu J, Fu M, Dong R, Yang Y, Luo J, et al. Dipeptidyl peptidase-4 Inhibition Improves Endothelial Senescence by Activating AMPK/SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway. *Biochem Pharmacol*. 2020;113951.
75. PerkinElmer. ChemOffice+ Cloud Suite. Pridobljeno 1.10.2020 s strani: <https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw/>
76. Muñoz-Espín D, Rovira M, Galiana I, Giménez C, Lozano-Torres B, Paez-Ribes M, et al. A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Mol Med*. 2018;10(9):e9355.
77. Agostini A, Mondragón L, Bernardos A, Martínez-Mañez R, Marcos MD, Sancenón F, et al. Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51(42):10556–60.
78. Thapa RK, Nguyen HT, Jeong J-H, Kim JR, Choi H-G, Yong CS, et al. Progressive slowdown/prevention of cellular senescence by CD9-targeted delivery of rapamycin using lactose-wrapped calcium carbonate nanoparticles. *Sci Rep*. 2017;7:43299.
79. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol*. 2020;18(1):e3000599.



PRILAGAJANJE ODMERJANJA PROTIMIKROBNIH ZDRAVIL PRI KRITIČNO BOLNIH

DOSE ADJUSTMENTS OF ANTIMICROBIAL DRUGS IN CRITICALLY ILL PATIENTS

AVTORICA / AUTHOR:

Maja Cvikl Knehtl, mag. farm., spec. klin. farm.

*Univerzitetni klinični center Maribor –
Centralna lekarna, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: maja.cvikl@ukc-mb.si

1 UVOD

Odmerjanje protimikrobnih zdravil pri bolnikih v intenzivni enoti predstavlja velik izziv. Upoštevati moramo lastnosti protimikrobnega zdravila, posebnosti bolnika in občutljivost mikroorganizma (1, 2). Izbrati je treba protimikrobno zdravilo, ki bo učinkovito proti najverjetnejšemu povzročitelju, po-

POVZETEK

Odmerjanje protimikrobnih zdravil pri bolnikih v intenzivni enoti predstavlja velik izziv. Izbrati je treba protimikrobno zdravilo, ki bo učinkovito proti najverjetnejšemu povzročitelju, pomembna pa je tudi izbira ustreznega odmerjanja, ki bo zagotavljalo terapevtske koncentracije na mestu okužbe. Pri izbiri odmerka je treba upoštevati lastnosti protimikrobne učinkovine (hidrofilnost ali lipofilnost, farmakokinetično/farmakodinamični indeks učinkovitosti), posebnosti bolnika (telesna masa, vpliv kritične bolezni na farmakokinetiko, ledvično delovanje – akutna ledvična odpoved, pospešena ledvična funkcija, morebitna priključitev na dializno napravo in/ali zunajtelesni krvni obtok) ter občutljivost mikroorganizma. Pregledni članek podrobneje povzema dejavnike, ki jih je treba upoštevati pri prilagajanju odmerjanja protimikrobnih zdravil pri bolnikih na intenzivni enoti.

KLJUČNE BESEDE:

dializne metode, farmakokinetično/farmakodinamični indeks, kritično bolni, pospešena ledvična funkcija, protimikrobna zdravila

ABSTRACT

Dosing of antimicrobial drugs in critically ill patients remains challenging. Choosing an appropriate antimicrobial drug with effectiveness against the most likely pathogen, as well as the selection of an appropriate dosing regimen that will provide therapeutic concentration at the site of infection, is essential. When choosing a dosing regimen we should consider the pharmacokinetic properties of the selected antimicrobial agents (hydrophilicity and lipophilicity, pharmacokinetic/pharmacodynamic index), the patient's individual parameters (body weight, effect of critically illness on pharmacokinetics, kidney function – acute kidney failure, augmented renal clearance or possible application of different dialysis techniques, and extracorporeal membrane oxygenation) and susceptibility of the causative pathogen. This review article summarises factors to be considered in adjusting the dosing regimen of antimicrobial drugs in critically ill patients.

KEY WORDS:

augmented renal clearance, antimicrobial drugs, critically ill patients, dialysis techniques, pharmacokinetic/pharmacodynamic index

membna pa je tudi izbira ustreznega odmerjanja, ki bo zagotavljalo terapevtske koncentracije na mestu okužbe (3).

2 LASTNOSTI PROTIMIKROBNEGA ZDRAVILA

2.1 HIDROFILNOST IN LIPOFILNOST PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Na osnovi topnosti protimikrobne učinkovine razdelimo na lipofilne in hidrofilne. Vpliv lipofilnosti in hidrofilnosti na procese porazdelitve, metabolizma in izločanja prikazuje preglednica 1 (3).

2.2 FARMAKOKINETIČNO/FARMAKODINAMIČNI INDEKSI UČINKOVITOSTI

Ob prilagajanju odmerjanja protimikrobnih zdravil je treba upoštevati farmakokinetično/farmakodinamično (FK/FD) razmerje oz. t. i. FK/FD-indeks učinkovitosti. Protimikrobna

zdravila delujejo koncentracijsko ali časovno odvisno. Pri koncentracijsko odvisnih je učinek največji takrat, ko dosežemo čim večje razmerje med najvišjo koncentracijo protimikrobne učinkovine (C_{max}) in minimalno inhibitorno koncentracijo za mikroorganizem (MIK) (indeks učinkovitosti = C_{max}/MIK) (3). Te protimikrobne učinkovine imajo daljši poantibiotični učinek in delujejo baktericidno tudi nekaj časa po tem, ko koncentracija učinkovine pade pod MIK (4). Pri časovno odvisnih protimikrobnih zdravilih pa največji učinek dosežemo, ko je koncentracija proste (nevezane) protimikrobne učinkovine čim dlje nad MIK (indeks učinkovitosti = ft (free time) > MIK) (3). Poantibiotični učinek tovrstnih protimikrobnih zdravil je kratek ali ga ni, zato je baktericidni učinek hitro izničen, ko koncentracija pade pod MIK (4). Nekatera protimikrobna zdravila izkazujejo »mešano« delovanje. Pri teh je izid zdravljenja povezan z razmerjem med površino pod krivuljo v 24 urah (AUC_{24}) in MIK za bakterijo (indeks učinkovitosti = AUC_{24}/MIK) (3). Odmerjanje na podlagi FK/FD-indeksa izboljša učinkovitost zdravljenja, zmanjša tveganje za pojav neželenih učinkov in zmanjša pojavnost rezistence (5, 6). Primerjavo med časovno in koncentracijsko odvisnimi protimikrobnimi zdravili prikazuje slika 1.

Pri koncentracijsko odvisnih protimikrobnih zdravilih je zdravljenje najbolj uspešno, kadar apliciramo večje odmerke

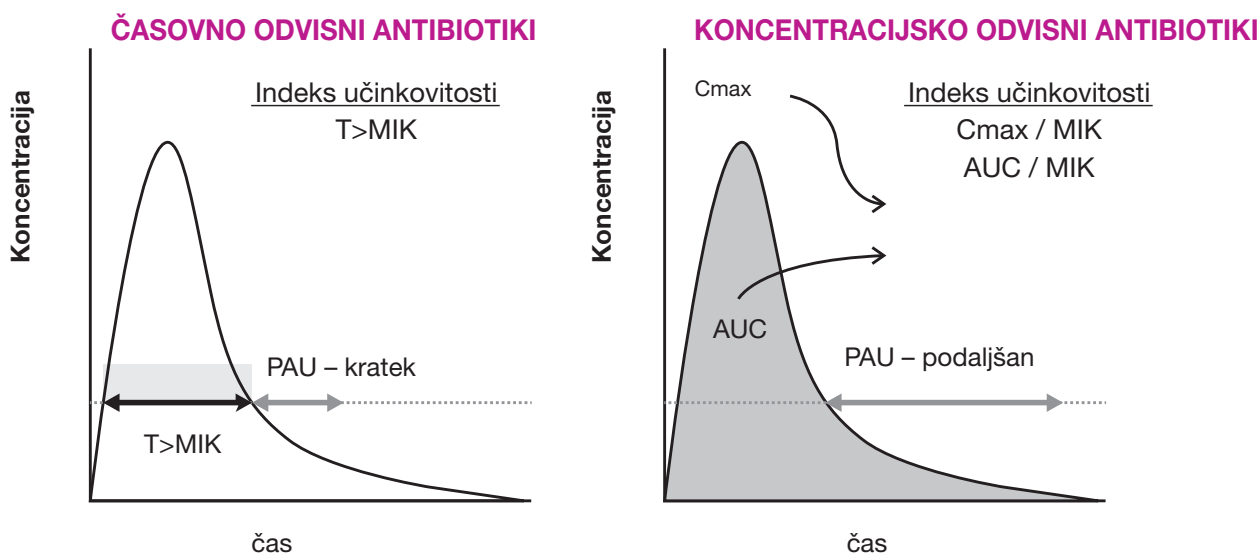
Preglednica 1: Vpliv lipofilnosti in hidrofilnosti na procese porazdelitve, metabolizma in izločanja protimikrobnih učinkovin (3).

Table 1: The effect of lipophilicity and hydrophilicity on the distribution, metabolism and elimination of antimicrobial agents (3).

OSNOVNE FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	HIDROFILNE UČINKOVINE	LIPOFILNE UČINKOVINE
Volumen porazdelitve	majhen, porazdelitev v telesno vodo	velik, porazdelitev v telesno maščobo
Prodiranje v tkivo	slabo	dobro
Metabolizem	običajno se ne metabolizirajo	da, v jetrih
Izločanje	nespremenjeni preko ledvic	metaboliti preko ledvic/žolča
Primeri protimikrobnih učinkovin	betalaktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami)	klindamicin
	aminoglikozidi	azoli
	vankomicin	tigeciklin
	kolistin	fluorokinoloni*
	fluorokinoloni*	
	linezolid	
daptomicin		

*fluorokinoloni imajo tako hidrofilne kot lipofilne lastnosti





Slika 1: Primerjava med časovno in koncentracijsko odvisnimi protimikrobnimi zdravili (PAU – poantibiotski učinek; C_{max} – najvišja koncentracija; AUC – površina pod krivuljo, MIK – minimalna inhibitorna koncentracija; $t > \text{MIK}$ = čas nad MIK) (povzeto po (33)).

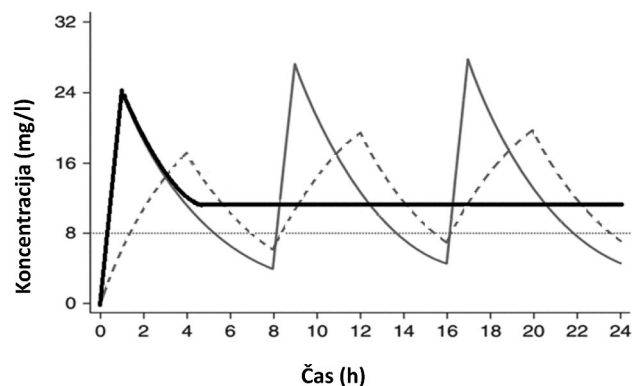
Figure 1: Comparison of time-dependent and concentration-dependent antimicrobial drugs (PAU – post-antibiotic effect; C_{max} – maximum concentration; AUC – area under the curve, MIK – minimum inhibitory concentration; $t > \text{MIK}$ – time above MIC) (adapted from (33)).

na daljši časovni interval. Primer je odmerjanje aminoglikozidov s podaljšanim odmernim intervalom, ko celokupni dnevni odmerek apliciramo enkrat dnevno (7).

Pri časovno odvisnih protimikrobnih zdravilih želimo doseči čim večji delež odmernega intervala s koncentracijo proste protimikrobne učinkovine nad MIK ($f_t > \text{MIK}$). Večji delež $f_t > \text{MIK}$ pri betalaktamskih antibiotikih in s tem večjo učinkovitost lahko dosežemo, če:

- povečamo dnevni odmerek (posledica: povečanje tveganja za neželene učinke in povečanje stroškov zdravljenja);
- apliciramo enak dnevni odmerek, razdeljen na več odmerkov (posledica: pogostejša aplikacija);
- ob nespremenjenem odmerjanju podaljšamo čas infundiranja – s tem znižamo najvišjo koncentracijo (C_{max}) in zato zmanjšamo tudi tveganje za neželene učinke protimikrobne učinkovine (npr. nevrotoksičnost cefepima), hkrati pa povišamo najnižjo koncentracijo (C_{min}). S povišanjem C_{min} podaljšamo čas, ko je koncentracija protimikrobne učinkovine nad MIK, bistveno pa ne spremenimo celokupne izpostavljenosti (AUC_{24} je primerljiva s tisto pri uporabi kratkotrajne infuzije);
- apliciramo protimikrobno zdravilo v kontinuirani infuziji – koncentracija proste protimikrobne učinkovine je v stacionarnem stanju ves čas konstantna in je teoretično lahko ves čas nad MIK (3).

Ker nastopi stacionarno stanje (in s tem ustrezna koncentracija protimikrobne učinkovine v krvi) šele po preteku petih razpolovnih dob, je pri uporabi kontinuiranih in podaljšanih infuzij treba aplicirati prvi odmerek kot polnilni odmerek, in sicer v obliki intermitentne (kratkotrajne) infuzije.



Slika 2: Primerjava odvisnosti koncentracije betalaktama v plazmi od časa pri uporabi kratkotrajne infuzije (tanka linija), podaljšane infuzije (črtkana linija) in kontinuirane infuzije s polnilnim odmerkom (poudarjena linija) (4).

Figure 2: Comparison of betalactam plasma concentrations versus time using intermittent infusions (thin line), prolonged infusions (dashed line) or continuous infusion with a loading dose (highlighted line) (4).

Tako dosežemo koncentracijo nad MIK prej (4). Slika 2 prikazuje odvisnost koncentracije betalaktamskega antibiotika v plazmi od časa pri kratkotrajni infuziji, podaljšani infuziji in kontinuirani infuziji s polnilnim odmerkom.

Preglednica 2 prikazuje razdelitev protimikrobnih zdravil glede na njihov FK/FD-indeks in povzema strategije za izboljšanje učinkovitosti.

3 POSEBNOSTI BOLNIKA

3.1 TELESNA MASA

Na farmakokinetiko protimikrobnih učinkovin vpliva tudi bolnikova telesna masa, zlasti na volumen porazdelitve (V_d). Pri debelosti je volumen porazdelitve povečan predvsem pri lipofilnih protimikrobnih učinkovinah (npr. fluorokinoloni), vsaj delno pa tudi pri hidrofilnih. Vse pogosteje se priporoča, da se odmerjanje protimikrobnih zdravil prilagaja telesni masi ali telesni površini, zlasti pri polnilnih odmerkih (7).

Za vankomicin in daptomicin je znano, da je najustrežnejše odmerjanje na podlagi dejanske telesne mase, pri aminoglikozidih pa odmerek pri bolnikih s preveliko telesno maso preračunamo na prilagojeno telesno maso. Za protimikrobna zdravila, ki nimajo priporočil o odmerjanju glede na

telesno maso, pri obilnejših bolnikih izberemo odmerjanje na zgornji meji priporočil (8).

3.2 SPREMENJENA FARMAKOKINETIKA PRI KRITIČNO BOLNIH

Kritično bolni imajo spremenjeno farmakokinetiko protimikrobnih učinkovin. Absorpcija peroralno, subkutano ali intramuskularno vnesenih učinkovin je običajno zmanjšana, v največji meri pa je spremenjen volumen porazdelitve. V začetni fazi sepse je volumen porazdelitve povečan zaradi povečane prepustnosti kapilar in večjega vnosa tekočin. Dodatno se poveča ob priklopu bolnika na dializni aparat ali na zunajtelesni krvni obtok (3). Pri vseh protimikrobnih zdravilih je nujno, da pri kritično bolnih uporabimo prvi odmerek kot polnilni odmerek, zlasti pri hidrofilnih protimikrobnih učinkovinah (7). Zaradi pogoste hipoalbuminemije je pri kritično bolnih spremenjena tudi vezava učinkovin na plazemske proteine. Pogosto se pri kritično bolnih razvije eno- ali večorganska odpoved, ki spremeni tako metabolizem kot izločanje protimikrobnih učinkovin (3). Očistek protimikrobnih učinkovin vpliva na prilagajanje vzdrževalnega odmerjanja (5).

3.2.1 Ustreznost standardnih odmernih režimov protimikrobnih zdravil

Odmerke protimikrobnih zdravil so sprva preskušali na zdravih prostovoljcih in šele nato na bolnikih. Registraijske raziskave običajno ne zajamejo kritično bolne po-

Preglednica 2: Strategije za izboljšanje učinkovitosti protimikrobnih zdravil glede na njihov FK/FD-indeks (3, 5, 6).

Table 2: Strategies to improve efficacy according to antimicrobial PK/PD index (3, 5, 6).

	ČASOVNO ODVISNI	»MEŠANI«	KONCENTRACIJSKO ODVISNI
FK/FD indeks	$ft > MIK$	AUC_{24}/MIK	C_{max}/MIK AUC_{24}/MIK
Primeri učinkovin	betalaktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami)	vankomicin linezolid kolistin tetraciklini tigeciklin	aminoglikozidi fluorokinoloni daptomicin metronidazol
Strategije za doseganje ustrezne FK/FD tarče	<ul style="list-style-type: none"> »večkrat po manj« podaljšane infuzije kontinuirane infuzije 		<ul style="list-style-type: none"> »manjkrat po več«



pulacije, zato ob prihodu novega protimikrobnega zdravila na trg pogosto ni dobrih podatkov za ustrezen odmerni režim pri kritično bolnih. Zaradi spremenjene farmakokinetike (zlasti povečanega volumna porazdelitve) je tveganje, da običajno odmerjanje ne doseže terapevtskih koncentracij, veliko, zlasti v zgodnjih fazah zdravljenja (5).

Za bolnike na intenzivni enoti je znana velika interindividualna raznolikost v doseganju terapevtskih koncentracij betalaktamov. Opazili so predvsem doseganje prenizkih koncentracij, te pa so povezane s slabšim kliničnim izidom in s povečano pojavnostjo odpornih mikroorganizmov. V raziskavi DALI Roberta s sod. (9) so v presečnem dnevu zajeli 361 kritično bolnih iz 68 bolnišnic, ki so se v tistem trenutku zdravili z enim izmed osmih proučevanih betalaktamov. Bolnikom so določili plazemsko koncentracijo proste učinkovine na polovici odmernega intervala in tik pred naslednjim odmerkom. Izračunali so vrednost $ft > \text{MIK}$. Ugotovili so, da izmed 248 bolnikov z okužbo, jih 16 % ni doseglo niti najbolj konzervativne tarče $50 \% ft > \text{MIK}$. 67 bolnikov je prejelo betalaktam v obliki podaljšane infuzije, bolniki v tej skupini so pogosteje dosegali ustrezno vrednost $ft > \text{MIK}$. Ugotovili so tudi, da obstaja pozitivna povezava med doseganjem FK/FD-tarče in pozitivnim kliničnim izidom zdravljenja; le-ta je bil ugodnejši pri doseganju $100 \% ft > \text{MIK}$ napram tistemu pri doseganju $50 \% ft > \text{MIK}$. Avtorji poudarjajo, naj se betalaktami odmerjajo individualno (9). Do podobnih zaključkov so prišli tudi Wrong in sod. (10), ki so pri 330 kritično bolnih določali koncentracijo prostega betalaktama v plazmi. Ugotovili so, da bi za doseganje $100 \% ft > \text{MIK}$ 33,1 % bolnikov potrebovalo višje odmerke od predpisanih, za doseganje tarče $100 \% > 4\text{-krat MIK}$ pa kar 63,4 % bolnikov (10).

Optimiziranje odmerjanja protimikrobnega zdravila na intenzivni enoti je nujno; idealno bi bilo prilagajanje odmerjanja individualnemu bolniku s pomočjo terapevtskega spremljanja koncentracij (TDM) pri vseh protimikrobnih zdravilih. V preteklosti se je TDM izvajal le pri prilagajanju odmerjanja protimikrobnih zdravil z ozkim terapevtskim območjem z namenom zmanjševanja toksičnosti (vankomicin, aminoglikozidi). Danes je priporočljivo odmerjanje prilagoditi na podlagi TDM tudi za protimikrobna zdravila s širokim terapevtskim oknom, predvsem z namenom doseganja učinkovitosti in zmanjšanja pojavnosti odpornih mikroorganizmov. Pri kritično bolnih se priporoča rutinsko izvajanje TDM za aminoglikozide, vankomicin, teikoplanin, linezolid, vorikonazol in betalaktame (11).

3.3 VPLIV LEDVIČNEGA DELOVANJA NA FARMAKOKINETIKO

3.3.1 Ocena ledvične funkcije na intenzivni enoti

Številna protimikrobna zdravila se iz organizma izločajo preko ledvic, zato je za izbiro ustreznega vzdrževalnega odmerjanja treba poznati ledvično delovanje. Najpogostejše enačbe za izračun očistka kreatinina so proučevali na stabilnih bolnikih in niso validirane za uporabo pri bolnikih na intenzivni enoti. Po nekaterih podatkih je za dokaj natančno in hitro oceno očistka kreatinina pri kritično bolnih najustreznejša uporaba cistatina C (kar je drago ter neustrezno ob disfunkciji ščitnice in pri bolnikih, ki prejema visoke odmerke kortikosteroidov ob ledvični disfunkciji), okvirno pa bi lahko uporabili tudi modificirano Jelliffejevo enačbo, Jelliffejevo enačbo in nazadnje enačbo MDRD (*modification of diet in renal disease*) z vključenimi šestimi spremenljivkami (*6-variable MDRD*). Za populacijo kritično bolnih naj ne bi uporabljali Cockcroft-Gault enačbe ali enačbe MDRD z vključenimi štirimi spremenljivkami (*4-variable MDRD*) (12).

3.3.2 Akutna ledvična odpoved na intenzivni enoti

Pri kritično bolnih se občasno pojavi akutna ledvična odpoved. Tudi pri akutni ledvični odpovedi se pojavlja vprašanje, kako najbolje oceniti delovanje ledvic. Smernice KDIGO (*kidney disease improving global outcome*) se ne opredelijo glede uporabe ustrezne enačbe za izračun očistka kreatinina pri akutni ledvični odpovedi, saj za to ni dovolj podatkov (13). Pri bolnikih, kjer akutna ledvična odpoved vztraja, priporočajo uporabo izmerjenega očistka kreatinina z zbiranjem urina v krajšem časovnem intervalu ali pa uporabo modificirane Jelliffejeve enačbe. Potrebni so dnevno spremljanje ledvične funkcije, redna ocena volumskega statusa bolnika in ukinitvev oz. prilagoditev odmerkov nefrotoksičnih zdravilnih učinkovin (14).

Pri kritično bolnih je prvih 48 ur protimikrobne terapije ključno obdobje za dober klinični izid zdravljenja okužbe (15). Bolniki, ki imajo akutno ledvično odpoved ob hudi okužbi, praviloma prejmejo prilagojene odmerke protimikrobnih zdravil. V raziskavi Crassa in sod. (16) so ugotovili, da je bila akutna ledvična odpoved pri 57,2 % bolnikov le prehodna in se je ledvično delovanje izboljšalo v roku 48 ur. Pri akutni ledvični odpovedi se spremembe v koncentraciji S-kreatinina z ozirom na ledvično funkcijo zgodijo z zamikom. Ker so bili standardno priporočeni odmerki protimikrobnih zdravil preizkušeni na stabilnih bolnikih s kronično ledvično boleznijo, je možno, da bolniki z akutno ledvično

odpovedjo s prilagojenim odmerjanjem protimikrobnih zdravil (predvsem tisti s prehodnim ledvičnim poslabšanjem) v prvih 48 urah prejmejo prenizke odmerke, kar se lahko odrazi v neučinkovitosti zdravljenja. Avtorji zato priporočajo, da bolniki z akutno ledvično odpovedjo v prvih 48 urah prejmejo polne odmerke, kar velja za protimikrobna zdravila s širokim terapevtskim oknom. V primeru, da akutna ledvična odpoved vztraja, naj se po 48 urah odmerjanje prilagodi (16).

3.3.3 Nadomestno ledvično zdravljenje

Kritično bolni občasno potrebujejo nadomestno ledvično zdravljenje. Obstaja več metod nadomestne ledvične terapije, in sicer intermitentne metode (IHD – intermitentna hemodializa, SLED – *sustained low-efficiency dialysis*) in kontinuirano nadomestno ledvično terapijo (CRRT, *continuous renal replacement therapy*). Na odstranjevanje protimikrobnega zdravila med procesom dializnega zdravljenja vplivajo lastnosti zdravila in lastnosti izbrane metode. Med procesom dialize se v večjem obsegu izločajo hidrofilne učinkovine, učinkovine z nizko molekularno maso, majhnim volumnom porazdelitve (< 1 l/kg) in nizko stopnjo vezave na plazemske proteine. Odstranjujemo lahko le prosto (nevezano) učinkovino v plazmi (3). Preglednica 3 prikazuje primerjavo različnih metod nadomestnega ledvičnega zdravljenja.

Večina protimikrobnih zdravil se iz organizma izloča preko ledvic. Pri bolnikih z akutno ledvično odpovedjo je očistek sorazmerno manjši in je povezan z bolnikovo rezidualno ledvično funkcijo in neledvičnim očistkom. Med dializo se protimikrobna učinkovina dodatno odstranjuje preko dializne metode, zato je celokupni očistek med dializo povečan. Očistek na uro je največji med intermitentno hemodializo in najmanjši pri kontinuirani nadomestni ledvični

terapiji. Ker pa dializne metode trajajo različno dolgo (intermitentna hemodializa običajno 3 do 4 ure, *sustained low-efficiency dialysis* 6 do 12 ur, kontinuirana nadomestna ledvična terapija 24 ur), je celokupni očistek učinkovine največji med kontinuirano nadomestno ledvično terapijo in najmanjši med intermitentno hemodializo (17).

Pri bolniku, ki ga priključimo na dializo, je treba prilagoditi odmerjanje protimikrobnih zdravil, ki se pretežno izločajo preko ledvic. Največ podatkov glede prilagajanja odmerjanja med dializo obstaja zlasti za intermitentno hemodializo in večina teh podatkov je pridobljena iz populacije stabilnih bolnikov s kronično ledvično boleznijo. Taki podatki niso neposredno prenosljivi na populacijo kritično bolnih (18). Splošne smernice za prilagoditev odmerjanja protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih, ki prejemajo dializno zdravljenje, povzemajo da:

- polnilnega odmerka običajno ni treba prilagajati;
- če se protimikrobna učinkovina izloča iz organizma preko ledvic, se odstranjuje tudi z dializno metodo;
- uporabimo priporočila o odmerjanju glede na vrsto dialize, če le-ta obstajajo;
- ko bolnika odklopimo od dialize, je znova potrebna prilagoditev odmerjanja (19).

Priporočila glede odmerjanja protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih na dializi sicer obstajajo, a se med seboj pogosto nekoliko razlikujejo (ena izmed novejših so objavili Hoff s sod. (20)).

3.3.4 Hiperfunkcija ledvic

Pri kritično bolnih se lahko pojavi tudi t. i. pospešena ledvična funkcija (*augmented renal clearance*, ARC). Vzrok za njen nastanek ni popolnoma pojasnjen, morda je povezan z nastankom sistemskega vnetnega odziva zaradi sepse, travme, opeklin ali velike operacije. Nekateri dom-

Preglednica 3: Primerjava različnih metod nadomestnega ledvičnega zdravljenja (3).

Table 3: Comparison of different renal replacement methods (3).

	PRETOK KRVİ	PRETOK DIALIZATA	PRETOK ULTRAFILTRATA	TRAJANJE	PROCES
Intermitentne metode					
IHD	300–500 ml/min	500–800 ml/min	/	3–4 h	difuzija
SLED	160–200 ml/min	100–300 ml/min	/	6–12 h	difuzija
Kontinuirane metode					
CVVH	50–300 ml/min	/	8–65 ml/min	24 h	konvekcija
CVVHD	50–300 ml/min	8–65 ml/min	0–6 ml/min	24 h	difuzija
CVVHDF	50–300 ml/min	8–65 ml/min	8–65 ml/min	24 h	difuzija in konvekcija

IHD – intermitentna hemodializa, SLED – *sustained low-efficiency dialysis*, CVVH – kontinuirana venovenska hemofiltracija, CVVHD – kontinuirana venovenska hemodializa, CVVHDF – kontinuirana venovenska hemodiafiltracija

nevajo, da je pospešena ledvična funkcija posledica izražanja delovanja t. i. ledvične rezerve (21).

Pospešena ledvična funkcija je definirana kot očistek kreatinina, ki presega vrednost 130 ml/min/1,73 m² (22), pojavila pa naj bi se pri 20 do 65 % bolnikih v intenzivni enoti, najpogosteje pri mladih (pod 50 let), bolnikih s politravmo, poškodbo glave, subarahnoidno krvavitvijo ali opekljami, povezana je tudi z nižjim rezultatom SOFA (točkovnik za oceno motenj v delovanju organov, *sequential organ failure assessment*). Pospešena ledvična funkcija se lahko pojavi le prehodno, lahko pa traja tudi nekaj tednov. Po nekaterih podatkih je najbolj izražena med četrtim in petim dnevom na intenzivni enoti, okoli sedmega dne pa se ledvična funkcija normalizira (23). Najbolje je, da ledvično delovanje rutinsko ocenjujemo čez celotno hospitalizacijo na intenzivni enoti (22).

Pri opredeljevanju očistka kreatinina pri pospešeni ledvični funkciji najpogostejše uporabljane enačbe podcenijo delovanje ledvic (MDRD, Cockcroft-Gault, CKD-EPI). Za odkrivanje bolnikov z večjim tveganjem so razvili nekaj točkovnikov (*ARC scoring system*, *ARTIC scoring system*). Trenutno je prednostno priporočena uporaba točkovnika ARC (22). Primerjavo obeh prikazuje preglednica 4.

Bolnikom, pri katerih s točkovnikom ocenimo večje tveganje za pospešeno ledvično funkcijo, izmerimo očistek kreatinina z metodo zbiranja urina v časovnem intervalu med 8 in 24 ur. Kadar izmerimo očistek kreatinina nad 130 ml/min, pospešeno ledvično funkcijo potrdimo, izmerjen očistek kreatinina pa nato uporabimo tudi za prilagoditev odmerjanja protimikrobnih zdravil z izločanjem preko ledvic (22). Izmerjeni očistek kreatinina je namreč bolje povezan z očistkom protimikrobne učinkovine v primerjavi z izračunanim očistkom kreatinina po drugih enačbah (23). Kadar

je izvedljivo, je priporočena uporaba TDM, sicer pa pri bolnikih s pospešeno ledvično funkcijo uporabimo največje možne odmerke ob skrbnem spremljanju bolnika. Zaradi nepredvidenega časa trajanja pospešene ledvične funkcije je treba pri teh bolnikih ledvično funkcijo spremljati dnevno (22), merjenje očistka kreatinina pa ponoviti vsaj sedmi dan po sprejemu na intenzivno enoto (23).

Odmerjanje protimikrobnih zdravil pri bolnikih s pospešeno ledvično funkcijo povzemajo pregledni članki Heffernana s sod. (5), Mahmouda s sod. (22) in Hobbsa s sod. (23).

3.4 VPLIV ZUNAJTELESNE MEMBRANSKE OKSIGENACIJE NA FARMAKOKINETIKO

Zunajtelesna membranska oksigenacija (*extracorporeal membrane oxygenation*, ECMO) je zunajtelesna naprava, ki jo uporabljamo kot začasno podporo dihalne in/ali srčne funkcije pri kritično bolnih. Sestavljena je iz kanalov, cevk, črpalke in membranskega oksigenatorja. Membranski oksigenator in cevke predstavljajo veliko površino, na katero se lahko adsorbirajo (oz. sekvestrirajo) predvsem lipofilne protimikrobne učinkovine, kar lahko vodi do njihovih nižjih koncentracij v plazmi. Na površino cevk in oksigenatorja se lahko vežejo tudi plazemski proteini, zato se lahko zniža tudi plazemska koncentracija učinkovin z visoko vezavo na plazemske proteine. ECMO torej vpliva na farmakokinetiko zlasti lipofilnih protimikrobnih učinkovin in tistih z visoko vezavo na plazemske proteine. Hkrati je povečan volumen porazdelitve tudi hidrofilih protimikrobnih učinkovin, kar je pomembno zlasti ob začetku zdravljenja in vpliva na izbiro polnilnega odmerka (24).

Preglednica 4: Primerjava dveh točkovnikov za opredeljevanje tveganja za pospešeno ledvično funkcijo (22).

Table 4: Comparison of two scoring systems for determining the risk for augmented renal clearance (22).

	TOČKOVNIK ARC	TOČKOVNIK ARCTIC (ARC »IN TRAUMA INTENSIVE CARE«)
Kriterij	starost ≤ 50 let = 6 točk travma = 3 točke SOFA ≤ 4 = 1 točka	S-kreatinin ≤ 62 μmol/l = 3 točke Moški spol = 2 točki Starost < 56 let = 4 točke Starost med 56–75 let = 3 točke
Interpretacija	0–6 točk = nizko tveganje za ARC 7–10 točk = visoko tveganje za ARC	< 6 točk = nizko tveganje za ARC > 6 točk = visoko tveganje za ARC
Občutljivost	100 %	84 %
Specifičnost	71 %	64 %

Večina podatkov glede odmerjanja protimikrobnih zdravil pri bolnikih na ECMO izhaja iz neonatalnih raziskav, v zadnjem času pa se zaradi njene pogostejše uporabe pri odraslih pojavlja vse več podatkov tudi za to populacijo. Veliko starejših farmakokinetičnih raziskav betalaktamov pri bolnikih na ECMO so opravili na modelih *ex vivo*, rezultati raziskav pa so bili pogosto nasprotujoči. Na primer, Shekar s sod. (25) so v raziskavi *ex vivo* ugotovili večjo sekvestracijo meropenema. Isti avtorji so dve leti kasneje opravili raziskavo *in vivo* vpliva ECMO na farmakokinetiko meropenema in ugotovili, da pomembnih razlik v farmakokinetičnih parametrih med bolniki na ECMO in brez ECMO ni bilo (26). Tudi raziskava Donadella s sod. (27) je pokazala, da je farmakokinetika meropenema in piperacilin/tazobaktama primerljiva z bolniki brez ECMO (27).

V zadnjih letih so objavili nekaj preglednih člankov, ki so povzeli odmerjanje protimikrobnih zdravil pri bolnikih na ECMO. Glede na trenutne podatke pri odmerjanju betalaktamov pri tovrstnih bolnikih upoštevamo enaka pripo-

ročila kot za kritično bolne brez ECMO. Kadar je mogoče, priporočajo uporabo TDM (28, 29, 30). Enako povzema tudi v letu 2020 objavljeni pregledni članek Abdul-Aziza s sod. (31). Povzetek odmerjanja protimikrobnih zdravil pri bolnikih na ECMO-u je predstavljen v preglednici 5.

Novembra 2020 so objavili raziskavo Kühna s sod. (32), ki so pri bolnikih na ECMO izmerili koncentracije štirih različnih protimikrobnih učinkovin – piperacilina, meropenema, ceftazidima in linezolida. Vse so aplicirali v obliki kontinuirane infuzije, preverjali so verjetnost za doseganje tarče $ft > 4$ -krat MIK. V raziskavo so prospektivno vključili 105 kritično bolnih, od tega jih je 30 potrebovalo ECMO. Ugotovili so, da je bila verjetnost za doseganje želene tarče precej manjša pri ECMO-bolnikih v primerjavi z bolniki brez ECMA za piperacilin in za linezolid. Pri piperacilinu v ECMO-skupini 48 % bolnikov ni doseglo zelene tarče, v skupini brez ECMO pa le 13 %. Pri linezolidu v ECMO-skupini 35 % bolnikov ni doseglo tarče, v skupini brez ECMO pa le 15 %. Pri meropenemu in ceftazidimu razlik med skupinama bolnikov ni bilo (32).

Preglednica 5: Povzetek odmerjanja protimikrobnih zdravil pri bolnikih na ECMO (povzeto iz virov (28, 29, 30)).

Table 5: Summary of antimicrobial dosing in ECMO patients (28, 29, 30).

UČINKOVINA	FARMAKOKINETIKA	ODMERJANJE
Betalaktami	nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • enako kot pri ostalih kritično bolnih • priporočljive podaljšane ali kontinuirane infuzije
Azitromicin	nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • enako kot pri ostalih kritično bolnih
Tigeciklin	nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • enako kot pri ostalih kritično bolnih
Ciprofloksacin Levofloksacin Moksifloksacin	nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • enako kot pri ostalih kritično bolnih
Vankomicin Amikacin Gentamicin	nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • odmerjanje na podlagi TDM
Oseltamivir	nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • enako kot pri ostalih kritično bolnih
Linezolid	ni dobro raziskano	<ul style="list-style-type: none"> • 600 mg/12 ur ustrezno le, če je MIK < 1
Flukonazol Vorikonazol Posakonazol	so lipofilni, različna farmakokinetika	<ul style="list-style-type: none"> • večji polnilni odmerki, nato standardno odmerjanje • različni rezultati raziskav
Kaspofungin Mikafungin Anidulafungin	načeloma nespremenjena	<ul style="list-style-type: none"> • enako kot pri ostalih kritično bolnih • različni podatki • ob neodzivu možno povežati odmerke

Glede na v zadnjih letih vse pogostejšo uporabo ECMO pri odraslih kritično bolnih je pričakovati, da bodo farmakokinetične raziskave protimikrobnih zdravil vključevale tudi bolnike, ki potrebujejo ECMO. Te raziskave bodo osnova za smernice predpisovanja protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih.

4 OBČUTLJIVOST MIKROORGANIZMA

Odmerjanje protimikrobnih zdravil na osnovi FK/FD-indeksov ni povezano samo z večjo učinkovitostjo zdravljenja, pač pa so ob doseganju ustreznih FK/FD-tarč dokazali tudi manjši pojav odpornih mikroorganizmov tudi pri kritično bolnih. Najbolje preiskovana je sicer povezava med FK/FD-indeksom in pojavom odpornosti pri kinolonskih protimikrobnih zdravilih. Pri betalaktamih je priporočeno, da $ft > MIK$ doseže vsaj okoli 50 % odmernega intervala, so pa dokazali, da je baktericidni učinek največji ob doseganju koncentracije v plazmi vsaj 4-krat MIK, ta vrednost pa je dobro povezana tudi z zaviranjem selekcije odpornih mikroorganizmov (6).

Ob začetni izbiri protimikrobnega zdravila pri kritično bolnih najpogosteje povzročitelja ne poznamo, zato tudi ne vemo, kakšen je MIK mikroorganizma za empirično uvedeno protimikrobno zdravilo. Ker imajo bolniki na intenzivni enoti večje tveganje za okužbo z mikroorganizmi z višjim MIK, je priporočljivo, da odmerjanje protimikrobnih zdravil prilagodi glede na FK/FD-tarčo s predvidevanjem najvišjega možnega MIK. Nekateri viri hkrati priporočajo, da ne zmanjšamo intenzivnosti odmerjanja niti ob potrditvi nižjega MIK. Izolirana bakterija namreč ni nujno reprezentativna za celotno populacijo, vzorčenje morda naključno ni zajelo odpornejše subpopulacije mikroorganizmov, hkrati pa prihaja tudi do variabilnosti pri samem določanju MIK (5).

Pojav odpornih sevov bakterij pri kritično bolnih lahko zmanjšamo s kombinacijsko terapijo protimikrobnih zdravil. Na tak način izboljšamo prodiranje v tkivo, sinergistično delujemo na biofilme in inhibiramo produkcijo toksinov, vendar le pri določenih bolnikih in določenih mikroorganizmih. Z manjšim tveganjem za razvoj odpornosti je povezano tudi trajanje zdravljenja. Za klinično učinkovitost naj bi zadostovalo štiri do pet dni zdravljenja. Po več kot desetih dneh zdravljenja se poveča verjetnost za pojavnost odpornih sevov, zato je za preprečevanje odpornosti najbolj učinkovit pristop: »Uporabi najvišje možne odmerke krajši čas!« (*Hit hard and stop early!*) (6).

5 SKLEP

Odmerjanje protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih je zahtevno. Za hitro doseganje učinkovitosti uporabimo polnilni odmerek. Odmerjanje naj sledi poznavanju FK/FD-indeksov za posamezno protimikrobno zdravilo (npr. uporaba podaljšanih ali kontinuiranih infuzij pri betalaktamih). Pri protimikrobnih zdravilih s širokim terapevtskim oknom lahko okvirno prvih 24 do 48 ur uporabimo polne odmerke protimikrobnega zdravila, tudi za bolnike s slabšim ledvičnim delovanjem, nato pa odmerjanje prilagodimo trenutni ledvični funkciji. Pri prilagajanju upoštevamo morebitno prisotno pospešeno ledvično funkcijo, uporabo dializnih metod (pazimo na prilagoditev odmerjanja pri vklopu oz. odklopu od dializne naprave) ter uporabo zunajtelesne membranske oksigenacije. Kadar je mogoče, prilagajamo odmerjanje s pomočjo TDM. Z dobrim poznavanjem principov farmakokinetike lahko optimiziramo odmerjanje protimikrobnih zdravil, s tem povečamo učinkovitost in varnost zdravljenja, hkrati pa zmanjšamo tveganje za razvoj odpornih mikroorganizmov.

6 LITERATURA

1. Chai MG, Cotta MO, Abdul-Aziz MH, Roberts JA. What are the current approaches to optimising antimicrobial dosing in the intensive care unit? *Pharmaceutics*. 2020;12(7):1–22.
2. Roberts JA, Roger C, De Waele JJ. Personalized antibiotic dosing for the critically ill. *Intensive Care Med* [Internet]. 2019;45(5):715–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05522-3>
3. Fish DN. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Antimicrobial Use in Critically Ill Patients. In: Erstad B. *Critical Care Pharmacotherapy*. ACCP; 2016: 252–282.
4. Bennet E. J, Dolin R, Blaser J. M. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles of Infectious Disease. In: Eight Edit. Elsevier Saunders; 2015. p. 252–262.
5. Heffernan AJ, Sime FB, Taccone FS, Roberts JA. How to optimize antibiotic pharmacokinetic/pharmacodynamics for Gram-negative infections in critically ill patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(6):555–65.
6. Abdul-Aziz MH, Lipman J, Mouton JW, Hope WW, Roberts JA. Applying pharmacokinetic/pharmacodynamic principles in critically ill patients: Optimizing efficacy and reducing resistance development. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36(1):136–53.
7. Lewis S, Mueller B. Antibiotic Dosing in Patients with Acute Kidney Injury. *J Intensive Care Med* [Internet]. 2016;31(3):164–

76. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=20160086595>
8. Eyler RF, Mueller BA, Eyler RF, Mueller BA. Antibiotic dosing in critically ill patients with acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2011;7(7):226–35. Available from: www.nature.com/nrneph
 9. Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, et al. DALI: Defining antibiotic levels in intensive care unit patients: Are current β -lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis*. 2014;58(8):1072–83.
 10. Wong G, Briscoe S, McWhinney B, Ally M, Ungerer J, Lipman J, et al. Therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics in the critically ill: Direct measurement of unbound drug concentrations to achieve appropriate drug exposures. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):3087–94.
 11. Abdul-Aziz MH, Alfenaar JWC, Bassetti M, Bracht H, Dimopoulos G, Marriott D, et al. Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a Position Paper#. *Intensive Care Med* [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06050-1>
 12. Sathi S, Ramanan V, Kanchi P, Ram P, Jayaraman R, Gupta A, et al. Estimation of renal function in the intensive care unit: the covert concepts brought to light. *J Intensive Care*. 2014;2(1):31.
 13. Awdishu L, Connor A, Bouchard J, Macedo E, Chertow G, Mehta R. Use of Estimating Equations for Dosing Antimicrobials in Patients with Acute Kidney Injury Not Receiving Renal Replacement Therapy. *J Clin Med*. 2018;7(8):211.
 14. Bihorac A, Ronco C, Fitzgerald RL, Ostermann M, Endre Z, Wald R, et al. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2017;13(4):241–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2017.2>
 15. Lee CC, Lee CH, Hong MY, Tang HJ, Ko WC. Timing of appropriate empirical antimicrobial administration and outcome of adults with community-onset bacteremia. *Crit Care*. 2017;21(1):1–9.
 16. Crass RL, Rodvold KA, Mueller BA, Pai MP. Renal Dosing of Antibiotics: Are We Jumping the Gun? *Clin Infect Dis* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy790>
 17. Nangethu N, Raina R, Krishnappa V, Sethi SK, Frazee LA, Nemer P. Antibiotic Dosing in Sustained Low-Efficiency Dialysis in Critically Ill Patients. *Can J Kidney Heal Dis*. 2018;5:205435811879222.
 18. Sime FB, Roberts JA. Antibiotic Dosing In Critically Ill Patients Receiving Renal Replacement Therapy. *Expert Rev Clin Pharmacol* [Internet]. 2015;9(4):497–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1586/17512433.2016.1133290>
 19. Bentley ML. Principles of Estimating Renal Clearance, Acute Kidney Injury, and Renal Replacement in the Critically Ill Patient. *ACCP Updates in Therapeutics 2015: Critical Care Pharmacy Preparatory Review Course*.
 20. Hoff BM, Maker JH, Dager WE, Heintz BH. Antibiotic Dosing for Critically Ill Adult Patients Receiving Intermittent Hemodialysis, Prolonged Intermittent Renal Replacement Therapy, and Continuous Renal Replacement Therapy: An Update. *Ann Pharmacother*. 2020;54(1):43–55.
 21. Bilbao-Meseguer I, Rodríguez-Gascón A, Barrasa H, Isla A, Solinís MÁ. Augmented Renal Clearance in Critically Ill Patients: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(9):1107–21.
 22. Mahmoud SH, Shen C. Augmented renal clearance in critical illness: An important consideration in drug dosing. *Pharmaceutics*. 2017;9(3).
 23. Hobbs ALV, Shea KM, Roberts KM, Daley MJ. Implications of augmented renal clearance on drug dosing in critically ill patients: A focus on antibiotics. *Pharmacotherapy*. 2015;35(11):1063–75.
 24. Dzierba AL, Abrams D, Brodie D. Medicating patients during extracorporeal membrane oxygenation: The evidence is building. *Crit Care*. 2017;21(1).
 25. Shekar K, McDonald, Charles IFisquet S, Wallis SC, Fung YL, Mullany D V, Fraser JF, et al. Sequestration of drugs in the circuit may lead to therapeutic failure during extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care* [Internet]. 2012;16(5):R194. Available from: <http://ccforum.com/content/16/5/R194>
 26. Welch S, Shekar K, Mullany D V, Wallis SC, Fraser JF, Taccone FS, et al. The combined effects of extracorporeal membrane oxygenation and renal replacement therapy on meropenem pharmacokinetics: a matched cohort study. *Crit Care*. 2014;18(6):1–9.
 27. Donadello K, Antonucci E, Jacobs F, Taccone FS, Rondelet B, Vincent J-L, et al. β -Lactam pharmacokinetics during extracorporeal membrane oxygenation therapy: A case-control study. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2014;45(3):278–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.11.005>
 28. Cheng V, Abdul-Aziz MH, Roberts JA, Shekar K. Optimising drug dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J Thorac Dis*. 2018;10(Suppl 5):S629–41.
 29. Ha M, Sieg A. Evaluation of Altered Drug Pharmacokinetics in Critically Ill Adults Receiving Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Pharmacotherapy*. 2017;37(2):221–35.
 30. Sherwin J. Pharmacokinetics and Dosing of Anti-Infective Drugs in Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Review of the Current Literature. *Clin Ther*. 2016;38(9):1976–94.
 31. Abdul-Aziz MH, Roberts JA. Antibiotic dosing during extracorporeal membrane oxygenation: does the system matter? *Curr Opin Anaesthesiol* [Internet]. 2020 Feb;33(1):71–82. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/ACO.0000000000000810>
 32. Kühn D, Metz C, Seiler F, Wehrfritz H, Roth S, Alqudrah M, et al. Antibiotic therapeutic drug monitoring in intensive care patients treated with different modalities of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and renal replacement therapy: a prospective, observational single-center study. *Crit Care* [Internet]. 2020;24(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03397-1>
 33. Sako K-I, Haniu H, Hasegawa M. The Application of Proteomics to PK-PD Modeling and Simulation. *J Bioequiv Availab*. 2011;01(02).



KIMI

Dezikim Derm S1
Sinonim varnosti v
zdravstvu in zanesljiv
partner tudi v času
krize COVID-19.

www.kimi.si | 386(0)1 5300 561



VPLIV ČREVESNE MIKROBIOTE NA METABOLNI SINDROM PRI MOŠKIH

IMPACT OF GUT MICROBIOTA ON METABOLIC SYNDROME IN MEN

AVTORICA / AUTHOR:

asist. dr. Kristina Groti Antić, dr. med.^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra
za interno medicino, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: kristina.groti@kclj.si

1 UVOD

Metabolni sindrom je skupek povezanih kliničnih, biokemijskih in presnovnih dejavnikov tveganja, ki napovedujejo tveganje za sladkorno bolezen tipa 2 in umrljivost zaradi

POVZETEK

Metabolni sindrom je skupek povezanih kliničnih in presnovnih dejavnikov tveganja, ki napovedujejo tveganje za sladkorno bolezen tipa 2 in srčno-žilne bolezni. Vključuje centralno debelost, moteno presnovo glukoze, aterogeno dislipidemijo in arterijsko hipertenzijo. Nizek prosti ali biorazpoložljivi testosteron pri moških je neodvisni dejavnik tveganja za nastanek metabolnega sindroma in obratno, metabolni sindrom lahko vodi do nastanka hipogonadizma preko neposrednega zaviranja testikularne osi. Črevesna mikrobiota je sestavljena iz mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavila, vključno z bakterijami, glivami, enoceličnimi evkarionti in virusi. Črevesna mikrobiota je dejavnik, ki lahko močno vpliva na zdravje ljudi in lahko prispeva k nastanku sladkorne bolezni tipa 2, kronične vnetne bolezni črevesja ter drugih stanj. Rezultati predkliničnih in kliničnih raziskav kažejo na povezavo med pomanjkanjem testosterona in spremenjeno mikrobioto, ki lahko vpliva na razvoj debelosti. Raziskave v povezavi s črevesno mikrobioto so odprle povsem nove možnosti za razumevanje patogeneze različnih bolezni in možnih načinov zdravljenja.

KLJUČNE BESEDE:

debelost, hipogonadizem, metabolni sindrom, mikrobiota, sladkorna bolezen tipa 2, testosteron

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a cluster of clinical and metabolic risk factors that predict the risk for type 2 diabetes and cardiovascular diseases. It includes central obesity, impaired glucose metabolism, atherogenic dyslipidemia and arterial hypertension. Low free or bioavailable testosterone in males is an independent risk factor for metabolic syndrome, and conversely, metabolic syndrome can lead to hypogonadism through a direct inhibition of testicular axis. Intestinal microbiota consists of microorganisms inhabiting gastrointestinal tract, including bacteria, fungi, unicellular eukaryotes and viruses. The intestinal microbiota is a factor that can have a major impact on human health and can contribute to the development of type 2 diabetes, chronic inflammatory bowel disease and other conditions. Pre-clinical and clinical trial results suggest a link



between testosterone deficiency and altered microbiota, which may affect the development of obesity. Research related to intestinal microbiota has opened up entirely new possibilities for understanding the pathogenesis of various diseases and potential treatments.

KEY WORDS:

hypogonadism, microbiota, metabolic syndrome, obesity, testosterone, type 2 diabetes

srčno-žilnih bolezni (miokardni infarkt, možganska kap in drugi zapleti). Metabolni sindrom vključuje centralno debelost, moteno presnovo glukoze, aterogeno dislipidemijo in arterijsko hipertenzijo (1). Njegova patogeneza je kompleksna in vključuje različne dejavnike, kot so avtonomna disfunkcija, oksidativni stres, kronično vnetje nizke stopnje ter odpornost na inzulin (2).

V zadnjih letih so ugotovili, da je tudi neravnovesje črevesne mikrobiote dejavnik tveganja za razvoj metabolnega sindroma. Bakterije ali njihove sestavine, kot so endotoksini, vstopijo v krvni obtok in povzročijo nizko stopnjo vnetja, kar povzroči neravnovesje v črevesni mikrobioti in zmanjšanje tesnosti črevesnega epitelijskega (3). Sprememba črevesne mikrobiote je dejavnik, ki lahko močno vpliva na nastanek različnih bolezni.

Črevesna mikrobiota je sestavljena iz mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavila, vključno z bakterijami, glivami, enoceličnimi evkarionti in virusi. Sestavlja jo približno 10^{14} mikroorganizmov, kar je desetkrat več kot celokupno število celic pri odraslih (4). Njihovo število, vrsta in funkcija se razlikujejo po celotnem prebavnem traktu, največ pa jih najdemo v debelem črevesu.

V debelem črevesu prevladujejo naslednja debela koristnih bakterij: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* in *Verrucomicrobia*, pri čemer *Firmicutes* in *Bacteroidetes* predstavljata 90 % črevesne mikrobiote. *Firmicutes* sestavlja več kot 200 različnih rodov, kot so *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* in *Ruminococcus*. *Bacteroidetes* sestavljajo rodovi, kot sta *Bacteroides* in *Prevotella*. Deblo *Actinobacteria* v glavnem predstavlja rod *Bifidobacterium* (5).

Pri odraslih ljudeh so najpogostejše bakterije iz družin *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Prevotellaceae*, *Eubacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* in *Enterobacteriaceae*. Sestava črevesne mikrobiote se razlikuje med posamezniki in je – med dru-

gim – odvisna od indeksa telesne mase, življenjskega sloga, prehranjevalnih navad in stopnje telesne dejavnosti (5).

Črevesna mikrobiota ima pomembno vlogo pri presnovi ogljikovih hidratov, lipidov in aminokislin ter prispeva k ohranjanju črevesne prepustnosti. Mikrobiota tudi zagotavlja encime, ki jih človeški genom ne kodira, med drugimi encime za razgradnjo določenih polisaharidov in polifenolov ter za sintezo vitaminov (6).

Raziskave v povezavi s črevesno mikrobioto so odprle povsem nove možnosti za razumevanje patogeneze različnih bolezni in možnih načinov zdravljenja. Porušeno ravnovesje v sestavi črevesne mikrobiote (disbioza), posledica katerega so spremembe v metabolnih produktih mikrobiote, vpliva na zdravje ljudi in lahko prispeva k nastanku sladkorne bolezni tipa 2, kronične vnetne bolezni črevesja, celiakije, karcinoma debelega črevesa, alergij, Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni, jetrne encefalopatije ter drugih bolezenskih stanj (4, 7, 8).

2 ČREVESNA MIKROBIOTA IN METABOLNI SINDROM

Črevesna mikrobiota sodeluje z različnimi signalnimi potmi gostitelja. Disbioza tako lahko vodi do sprememb imunskih odzivov, aktivnosti živčnega sistema in delovanja hormonov in s tem do nagnjenosti k presnovnim boleznim (5). Črevesna mikrobiota lahko vpliva na raven peptidov, kot so leptin, grelin, glukagonu podoben peptid-1 (GLP-1), holecistokinin (CCK), YY (PYY) ter serotonin (5-HT), ki se izločajo iz enteroendokrinih celic. Grelin je hormon, ki ima vlogo spodbujevalca apetita, medtem ko večina črevesnih hormonov, vključno s CCK, PYY in GLP-1, zavira apetit.

Črevesna mikrobiota uravnava črevesni metabolizem preko osi mikrobiota-črevesje-možgani. Rezultati raziskav so pokazali, da je raven grelina v serumu v negativni povezavi s številom bakterij *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* in *Eubacterium* ter v pozitivni povezavi s številom bakterij *Bacteroides* in *Prevotella*. Raven leptina je v negativni povezavi s številom bakterij *Clostridium*, *Bacteroides* in *Prevotella* ter pozitivni povezavi s številom bakterij *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*. Preko regulacije izločanja peptidov lahko črevesna mikrobiota vpliva na vagusno aferentno pot in nato preko osi mikrobiota-črevesje-možgani uravnava presnovo v črevesju (7).

Posebne spremembe v črevesni mikrobioti so povezane s sladkorno boleznijo tipa 2, pogosti spremljevalec katere je pri moških bolnikih funkcionalni hipogonadizem. V raziskavi, v kateri so primerjali sestavo mikrobiote črevesja pri 16 bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 in 12 zdravih preiskovancih, so opazili, da so bakterije iz rodu *Bacteroides*, ki razgrajujejo večinoma ogljikove hidrate, bolj razširjene pri teh bolnikih, obenem pa so pri njih opazili upad števila bakterij iz rodu *Bifidobacterium*, ki razgrajujejo ogljikove hidrate z nizko molekulsko maso (9). V drugi raziskavi so ugotovili pozitivno korelacijo med ravno glukoze v plazmi in razmerjem med številom bakterij iz debel *Bacteroides* in *Firmicutes*. V isti raziskavi so tudi pokazali, da imajo osebe s sladkorno boleznijo tipa 2 povečano količino po Gramu negativnih bakterij (*Bacteroides*, *Prevotella* in *Beta*-*proteobacteria*) v črevesju (8).

Zdravljenje z antibiotiki je povezano z nenadnimi in korenitimi spremembami črevesne mikrobiote. Opravili so epidemiološke raziskave, ki so poskušale ugotoviti, kakšna je povezava med vplivom antibiotičnega zdravljenja pri dojenčkih in tveganjem za nastanek debelosti. Rezultati so pokazali povezavo med zdravljenjem z antibiotiki v zgodnjem življenjskem obdobju in povečanim indeksom telesne mase kasneje (10). Raziskava iz leta 2014 je poročala o znatno večji pojavnosti prekomerne telesne mase pri otrocih med 9. in 12. letom starosti, ki so bili v prvem letu življenja izpostavljeni antibiotikom, ne glede na odmerek zdravila in dolžino trajanja zdravljenja (11). Nato so izvedli dve kohortni raziskavi z velikim vzorcem otrok, ki so bili antibiotikom izpostavljeni prenatalno. V prvi raziskavi so otroci, izpostavljeni antibiotikom v drugem ali tretjem trimesečju, imeli za 84 % večje tveganje za nastanek debelosti, pri čemer je bila pozitivna in statistično značilna povezava z indeksom telesne mase, obsegom pasu in deležem telesne maščobe (12). Podobno so pokazali v drugi raziskavi šolskih otrok s prekomerno telesno maso, ki so bili že intrauterino izpostavljeni antibiotikom, zlasti tisti z nižjo telesno maso ob rojstvu (13). Omenjene raziskave nakazujejo možne dolgoročne posledice zgodnje izpostavljenosti antibiotikom in poudarjajo potrebo po ustreznem predpisovanju antibiotikov v otroštvu. Za ugotavljanje dolgoročnih posledic za presnovo in zdravje srca in ožilja ter za razvoj strategij za ublažitev teh učinkov, kadar je uporaba antibiotikov nujna, bi bile potrebne dodatne raziskave, s katerimi bi ugotovili, ali je uporaba antibiotikov v prenatalnem obdobju povezana z debelostjo otrok in ali so spremembe v črevesni mikrobioti novorojenčkov v ozadju omenjenih rezultatov, ter določili mehanizme, na katerih ta povezava temelji.

3 VPLIV DEBELOSTI NA REPRODUKTIVNO ZDRAVJE MOŠKIH

Debelost je najpogostejši etiološki dejavnik, ki je povezan z razvojem funkcionalnega hipogonadizma (14). Funkcionalni hipogonadizem je biokemijski in klinični sindrom, za katerega so značilni znižana raven testosterona v serumu (celokupnega testosterona pod 11 nmol/l in/ali prostega testosterona pod 220 pmol/l) in simptomi motene spolne funkcije (zmanjšan libido, erektilna disfunkcija, odsotnost ali zmanjšana pogostost jutranjih erekcij), ki se pojavijo v odsotnosti strukturne patologije hipotalamo-hipofizno-testikularne osi in posebnih patoloških stanj, ki zavirajo hipotalamo-hipofizno-testikularno os pri moških (15). Gre torej za funkcionalno motnjo hipotalamo-hipofizno-testikularne osi, ki je potencialno reverzibilna.

Patofiziološki mehanizmi, odgovorni za nastanek funkcionalnega hipogonadizma zaradi debelosti, so kompleksni. Med hipogonadizmom in debelostjo obstaja dvosmerna povezava: nizek prosti ali biorazpoložljivi testosteron pri moških je neodvisni dejavnik tveganja za nastanek metaboličnega sindroma in sladkorne bolezni tipa 2 (16). In obratno, metabolični sindrom lahko vodi do nastanka hipogonadizma preko neposrednega zaviranja tvorbe testosterona, znižanja serumske koncentracije vezalne beljakovine za spolne hormone (*sex hormone-binding globulin*, SHBG) in povečane aktivnosti encima aromataze v adipocitih, kar ima za posledico povečano pretvorbo testosterona v estradiol (17). Debelost močno zavira delovanje hipotalamo-hipofizno-testikularne osi. Normalen homeostazni odgovor hipotalamo-hipofizno-testikularne osi na znižan testosteron je povečano izločanje gonadotropinov in stimulacija testisov (18). Pri moških z debelostjo je ta odgovor zavrt zaradi neposrednega zaviranja izločanja luteinizirajočega hormona preko zapletenega ciklusa hipogonadizem-debelost-adipocitokini, delovanja aromataze ter vpliva leptinske rezistence v hipotalamusu (19). Maščobno tkivo je metabolno zelo aktivno in izloča več kot 30 biološko aktivnih peptidov, npr. leptin, ter imunomodulatorne adipocitokine, kot sta TNF- α in IL-6 (20). Normalno leptin povečuje sproščanje luteinizirajočega hormona in folikle stimulirajočega hormona (FSH) z neposrednim stimulativnim učinkom na hipofizo (preko vezave na leptinske receptorje) in hipotalamus (reko vpliva na gonadotropin sproščajoči hormon (GnRH)). Pri debelosti se znatno poveča raven leptina, kar povzroči funkcionalno stanje odpornosti na leptin, z oslabljenim delovanjem leptina in posledičnim upadom funkcije



hipotalamo-hipofizno-testikularne osi (21). Vnetni adipocitokini TNF- α , IL-6 in IL-1 β poslabšajo funkcijo hipotalamo-hipofizno-testikularne osi in posledično povzročijo zmanjšano proizvodnjo testosterona (slika 1) (22).

Črevesni hormoni GLP-1, gastrični inhibitorni polipeptid (GIP), peptid YY, polipeptid slinavke (PP), grelin in amilin, prav tako vplivajo na delovanje hipotalamo-hipofizno-testikularne osi (23).

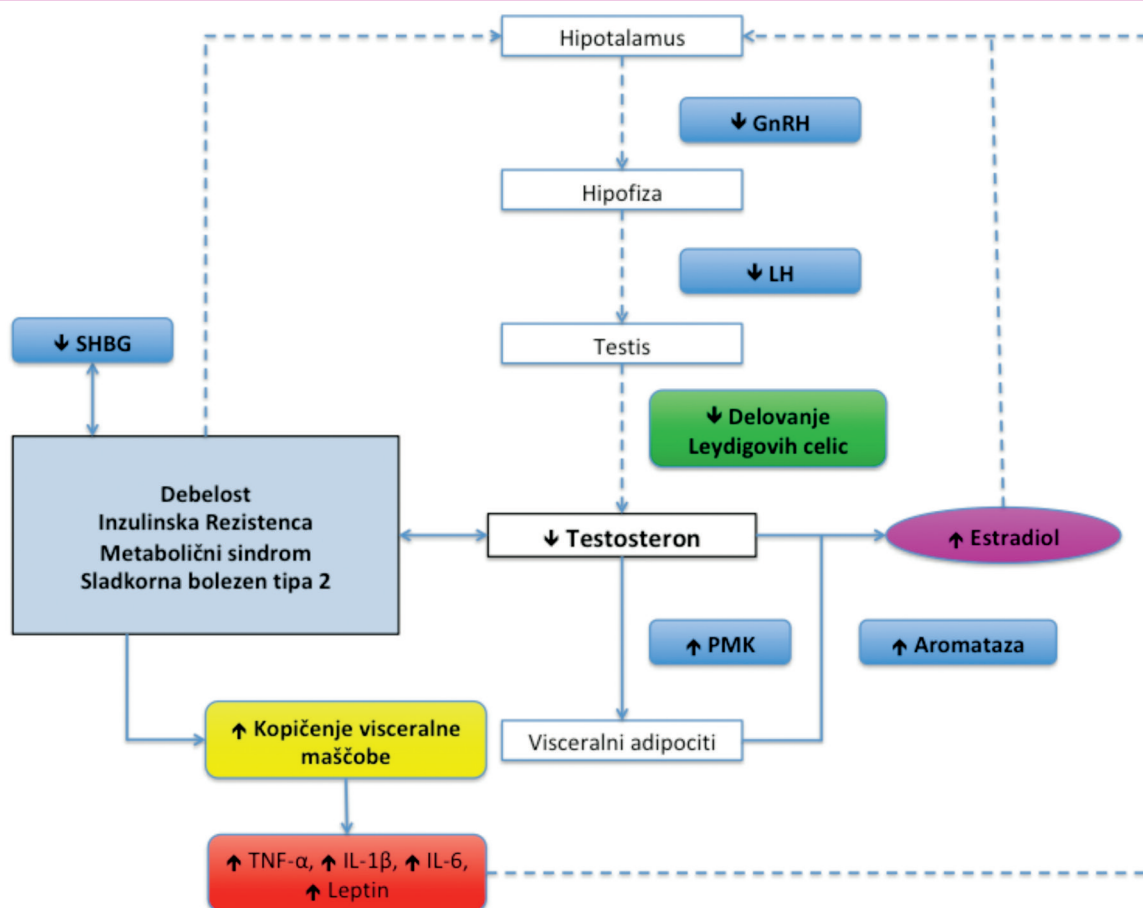
Obstajajo številni dokazi, da debelost povzroči neposredno okvaro mod in spermatogenezo. Ugotovili so, da je raven inzulina podobnega peptida 3 (INSL3), ki je označevalec diferenciacije in funkcije Leydigovih celic, znižana pri debelih moških, kar je verjetno posledica primarne disfunkcije Leydigovih celic (24). Podobno velja tudi za koncentraciji inhibina B in anti-Müllerjevega hormona (AMH), produktov Sertolijevih celic

mod, ki sta pomembna za regulacijo spermatogeneze; tudi ti upadeta z naraščanjem indeksa telesne mase (25, 26).

Metaanalize so povezale debelost s pomembno povečanim tveganjem za znižanje števila in gibljivosti semenčic ter s povečanjem fragmentacije DNK znotraj semenčic, kar povzroča zmanjšanje plodnosti (27).

4 ČREVESNA MIKROBIOTA IN HIPOGONADIZEM

Raziskave kažejo na povezavo med pomanjkanjem testosterona pri moških in spremenjeno mikrobioto, te spre-



Slika 1: Shematski prikaz patofiziologije povezave hipogonadizma in metaboličnega sindroma; SHBG – vezalna beljakovina za spolne hormone (sex hormone binding globulin), GnRH – gonadotropin-sproščajoči hormon (gonadotropin-releasing hormone), LH – luteinizirajoči hormon, PMK – proste maščobne kisline, TNF- α – faktor tumorske nekroze α (tumor necrosis factor α), IL – interleukin.

Figure 1: Schematic representation of hypogonadism-metabolic syndrome connection; SHBG – sex hormone binding globulin, GnRH – gonadotropin-releasing hormone, LH – luteinising hormone, PMK – free fatty acids, TNF- α – tumor necrosis factor α , IL – interleukin.

membe pa lahko prispevajo k nastanku debelosti. Razi-skave na miših so pokazale, da je hipogonadizem, ki je nastal po kastraciji, povzročil trebušno debelost pri tistih miših, ki so se prehranjevale s hrano z visoko vsebnostjo maščob, ne pa tudi pri miših, ki so se hranile z zanje običajno prehrano. Prehrana z visoko vsebnostjo maščob spremeni presnovo lipidov in vpliva na črevesno mikrobioto, ki sodeluje pri razvoju trebušne debelosti (28). Rezultati raziskave, v kateri so raziskovali interakcijo med hrano z visoko vsebnostjo maščob in znižanim testosteronom na modelu kastriranih miši, so pokazali, da je hipogonadizem povzročil debelost, povečanje trebušne maščobe, zvišanje ravni trigliceridov, zvišanje ravni glukoze v krvi na tešče ter spremembo črevesne mikrobiote (29).

Sestava črevesne mikrobiote pri zdravih posameznikih se bistveno razlikuje od sestave pri debelih posameznikih, kar kaže na to, da ima lahko črevesna mikrobiota pomembno vlogo pri debelosti. Pri debelih ljudeh je povišano razmerje bakterij debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes* v primerjavi z vitkimi ljudmi (30).

Rezultati več raziskav kažejo, da je upadanje funkcije gonad pri moških s prekomerno telesno maso oz. pri diabetikih posledica kronično povišanih ravni endotoksina. Po teoriji GELDING (*Gut Endotoxin Leading to a Decline In Gonadal function*) o z debelostjo povzročenem hipogonadizmu namreč debelost in z njo povezana slaba prehrana (z visoko vsebnostjo maščob ali kalorij) povzroča razgradnjo črevesne sluznice, kar olajša prehod črevesnih bakterij iz lumna črevesja v sistemski obtok. Močni imunski stimulant, prisotni v bakterijah, kot je npr. bakterijski lipopolisaharid (endotoksin), povzročajo kronično vnetje nizke stopnje v telesu (presnovna endotoksemija), citokini IL-1 β , TNF- α in IL-6 pa poslabšajo steroidogenezo testisov v intervencijskih študijah na živalih in na ljudeh (31).

Vpliv endotoksina na testosteron pri zdravih vitkih moških so raziskovali v raziskavi, v kateri so dajali endotoksin vitkim moškim, starim 18 do 40 let. Endotoksin je povzročil vnetje pri teh moških v približno šestih urah, ravni celokupnega testosterona in luteinizirajočega hormona sta se znižali, kar nakazuje, da lahko povečana prepustnost črevesja spodbuja znižanje ravni testosterona celo pri zdravih moških, ki so v reproduktivni dobi (32).

Trenutno prevladujoča teorija z debelostjo povezanega hipogonadizma je, da je znižanje ravni testosterona posledica kombinacije zmanjšane izločanja luteinizirajočega hormona iz hipofize in neposredne okvare funkcije gonad (14). Maščobno tkivo namreč vsebuje aromatazo, ki je odgovorna za pretvorbo testosterona v estrogen, kar zniža raven testosterona. Poleg tega estrogen vpliva na hipotalamo-

hipofizno-testikularno os, kar ima za posledico zmanjšanje frekvence in amplitude izločanja luteinizirajočega hormona. Ker je ta glavni dražljaj za povečanje proizvodnje testosterona iz Leydigovih celic v modih, njegovo zmanjšano izločanje povzroči dodatno zmanjšanje izločanja testosterona (33).

5 PROBIOTIKI IN PREBIOTIKI

Z uporabo probiotičnih ali prebiotičnih pripravkov lahko spreminjamo črevesno mikrobioto, kar lahko izboljša zdravje ljudi (34). Glavna rodova po Gramu pozitivnih bakterij, *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, sta v najširši uporabi kot probiotiki. Tudi druge vrste bakterij, kot so *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* Nissle, *Streptococcus thermophilus* in *Saccharomyces boulardii*, uporabljamo kot probiotike. Probiotične bakterije lahko pomagajo preprečiti presnovno endotoksemijo z zaviranjem rasti potencialno škodljivih po Gramu negativnih bakterij preko znižanja pH debelega črevesa in povečanja izločanja antibakterijskih imunoglobulinov in baktericidnih spojin v črevesni sluznici (35). Probiotične bakterije so sposobne proizvajati kratkoverižne maščobne kisline, ki povečujejo proizvodnjo sluznice v celicah znotraj stene debelega črevesa, s čimer zagotavljajo fizično pregrado, ki zmanjšuje neposredni stik stene debelega črevesa z bakterijami v črevesnem lumnu, kar zmanjšuje možnost za prehod teh bakterij v krvni obtok. Iz koristnih bakterij pridobljene kratkoverižne maščobne kisline krepijo proizvodnjo epitelijskih beljakovin, ki preprečujejo prehod makromolekul, kakršna je endotoksin, med črevesne epitelijske celice (36). Delujejo tudi kot signali, ki vplivajo na presnovo ogljikovih hidratov in črevesno fiziologijo s spodbujanjem izločanja hormonov, kot je grelin, in sproščanja črevesnih peptidov PYY in GLP-1, ki regulirajo sitost (37).

Prebiotiki so prehranski substrati, ki selektivno spodbujajo razmnoževanje in aktivnost koristnih bakterij v črevesju. Prebiotiki so najpogosteje kompleksni oligosaharidi, ki jih encimi gostitelja ne prebavijo, in zato končajo v debelem črevesu, kjer spodbujajo rast in razmnoževanje črevesne mikrobiote. Prebiotiki so inulin, galaktooligosaharidi, fruktooligosaharidi, ksilooligosaharidi, pektin, beta glukani in škrob (38). Pogosto je najučinkovitejši način za izboljšanje črevesnega mikrobioma kombinirana uporaba probiotikov s prebiotiki – t. i. simbiotska terapija (34).



Raziskave na živalih potrjujejo tezo o potencialni učinkovitosti probiotikov za povečanje funkcije mod pri debelih moških. Uživanje probiotične zmesi, ki je vsebovala *Lactobacillus* in druge probiotične bakterije pri podganah, ki so jih hranili s hrano z visoko vsebnostjo maščob, je preprečilo oksidativni stres v modih in s tem povezano zmanjšano spermatogenezo (39).

V drugi raziskavi so imele miši, ki so se prehranjevale s hrano, ki je vsebovala probiotične bakterije *Lactobacillus reuteri*, v primerjavi s kontrolno skupino večjo gostoto Leydigovih celic, višji serumski testosteron ter povečano spermatogenezo (40). Ta blagodejni učinek probiotikov na reprodukativno funkcijo moških osebkov najverjetneje posreduje imunski sistem, saj je zaviranje vnetja povzročilo tudi izboljšanje proizvodnje testosterona in spermatogeneze.

6 ZDRAVLJENJE METABOLNEGA SINDROMA IN FUNKCIONALNEGA HIPOGONADIZMA

Pri zdravljenju metabolnega sindroma se poslužujemo nefarmakoloških in farmakoloških ukrepov ter v indiciranih primerih tudi bariatrične kirurgije. Nefarmakološki ukrepi zajemajo spremembo življenjskega sloga, dieto (15- do 30-odstotno zmanjšanje vnosa kalorij) ter zmerno intenzivno vadbo 120 do 150 minut na teden (41).

Farmakoterapija lahko pomaga bolnikom pri preprečevanju razvoja sočasnih bolezni zaradi debelosti. Zdravljenje z zdravili je priporočljivo za bolnike z indeksom telesne mase $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ali $ITM \geq 27 \text{ kg/m}^2$ in z boleznimi, povezanimi z debelostjo (hipertenzija, sladkorna bolezen tipa 2, sindrom apneje v spanju). Zdravila je potrebno predpisovati v skladu z njihovimi indikacijami in omejitvami. Zdravilne učinkovine za zdravljenje debelosti, ki so trenutno registrirane pri nas, so:

- orlistat (zaviralec absorpcije maščob iz prebavil, ki je reverzibilni zaviralec гастриčne in pankreatične lipaze),
- kombinacija bupropiona in naltreksona (bupropion je analog amfetamina – antidepressiv ter selektivni zaviralec ponovnega privzema noradrenalina in dopamina; naltrekson je opiatni antagonist, zaviralec apetita s centralnim delovanjem na proopiomelanokortinske nevrone) in
- liraglutid (agonist GLP-1, ki se izloča postprandialno, stimulira izločanje inzulina, deluje centralno in zavira apetit; v Sloveniji je odobren le za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2) (42).

Učinkovitost farmakoterapije je treba oceniti po prvih treh mesecih zdravljenja. Če je dosežena izguba telesne mase zadovoljiva ($> 5 \%$ izgube mase pri bolnikih brez sladkorne bolezni tipa 2 in $> 3 \%$ pri bolnikih s to boleznijo), z zdravljenjem nadaljujemo. Pri bolnikih, ki se niso odzvali na zdravljenje, pa zdravljenje prekinemo.

Bariatrični kirurški posegi so najučinkovitejša metoda za zdravljenje debelosti. Indikacije za poseg so $ITM > 40 \text{ kg/m}^2$ brez sladkorne bolezni tipa 2 in $ITM > 35 \text{ kg/m}^2$ za bolnike s sladkorno boleznijo tipa 2. Po opravljenem kirurškem posegu se spremeni anatomska struktura prebavil, s čimer se spremeni vnos hranil, praznjenje želodca in izločanje želodčne kisline, vpliva pa tudi na črevesno mikrobioto in zgradbo žolčne kisline. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 se po posegu znižata telesna masa in raven glikilirane hemoglobina (HbA_{1c}). Vloga črevesne mikrobiote pri prognozi po opravljeni bariatrični operaciji je še vedno predmet raziskav (3).

V skladu s teorijo GELDING je ključ do učinkovitega zdravljenja z debelostjo povzročene hipogonadizma izboljšanje pregradne funkcije črevesja, s čimer preprečimo prehod endotoksina iz črevesnega lumna v krvni obtok in zmanjšamo vnetje, ki slabša delovanje mod. Potencialno zdravljenje, ki je usmerjeno v ta proces, je zaužitje probiotičnih bakterij, ki izboljšujejo celovitost črevesne stene s sproščanjem kratkoverižnih maščobnih kislin, ki hranijo sluznico črevesja in izboljšajo njeno celovitost (31). Zmanjša se tudi presnovna endotoksemija, kar lahko posledično privede do izboljšane delovanja mod (43).

Presaditev fekalne mikrobiote (*fecal microbiota transplant*, FMT) je široko raziskovana metoda zdravljenja ponavljajočih se okužb z bakterijo *Clostridium difficile*, ki ima za cilj obnove črevesne mikrobiote. Na podlagi ugotovitev o potencialni vzročni povezavi med črevesno mikrobioto in debelostjo v raziskavah na živalih so v raziskavah na ljudeh poskušali presaditi črevesno mikrobioto iz zdravih in vitkih darovalcev v debele prejemnike z metabolnim sindromom. V raziskavi, ki je ocenjevala presnovne parametre pri bolnikih z debelostjo in metabolnim sindromom, je presaditev fekalne mikrobiote po 18 tednih privedla do prehodno izboljšane občutljivosti na inzulin, vendar ni prinesla koristi glede na druge klinične parametre (HbA_{1c} , glukoza na tešče, lipidogram, indeks telesne mase) (45). Dejavniki, ki omejujejo širšo uporabo presaditve fekalne mikrobiote, med drugim vključujejo težave z izbiro darovalcev, stroške presejanja darovalcev, pomanjkanje optimiziranih metod za pripravo in aplikacijo fekalne mikrobiote. Dejavniki okolja in genetika prejemnikov lahko preprečijo uspešnost, ključno pa je tudi upoštevanje prehranskih dejavnikov za doseganje

optimalnih učinkov te terapije. Poleg tega je potrebno podrobneje raziskati varnost in neželene učinke presaditve fekalne mikrobiote, predvsem dolgoročne. Zaključujemo, da se presaditev fekalne mikrobiote zaenkrat kaže kot obetavna, a zahteva nadaljnje vrednotenje, saj so bile obstoječe raziskave pri bolnikih z debelostjo in metabolnim sindromom opravljene na majhnem številu in predvsem pri bolnikih z debelostjo nižje stopnje (44).

Po veljavnih smernicah Evropskega endokrinološkega združenja sta uspešna izguba telesne mase in zdrav življenjski slog prvi izbor zdravljenja in uspešen ukrep za zdravljenje bolnikov s funkcionalnim hipogonadizmom. Posledično se zaradi teh sprememb lahko zviša raven celokupnega testosterona. Pri bolnikih, ki imajo znižano raven testosterona in klinične znake hipogonadizma, lahko po izključitvi kontraindikacij predpišemo nadomestno zdravljenje s testosteronom, ki lahko učinkovito odpravi psihološke in fizične simptome pomanjkanja testosterona (15, 46). Nadomestno zdravljenje s testosteronom zavira spermatogenezo in pogosto povzroča azoospermijo (47), zato ga je potrebno v času načrtovanja družine in zdravljenja neplodnosti ukiniti. Sprememba prehrane, ki privede tudi do izboljšanja črevesne mikrobiote, je torej priporočljiva v sklopu ukrepov za zdravljenje funkcionalnega hipogonadizma. Pri bolnikih, kjer zaradi kontraindikacij (karcinom dojke, karcinom prostate, neopredeljen tumor prostate, srčno popuščanje hude stopnje, večžilna koronarna bolezen, zdravljenje z glukokortikoidi, spalna apneja hude stopnje, primarna eritrocitoza) nadomestno zdravljenje s testosteronom ni možno, pa je njena vloga še toliko pomembnejša.

7 SKLEP

Izguba telesne mase in povišanje deleža mišične mase v primerjavi z maščobo vodi v zmanjšanje pojavnosti boleznih srca in ožilja in drugih zdravstvenih stanj, povezanih z debelostjo, kot je funkcionalni hipogonadizem. Sprememba življenjskega sloga (sprememba prehrane in povečanje telesne dejavnosti) vodi k zmanjšanju telesne mase, vendar je zelo malo bolnikov sposobnih dolgoročno upoštevati spremembe v načinu življenja. Dejavniki, ki prispevajo k metabolnemu sindromu, so posledica zapletenih notranjih dejavnikov gostitelja, kot sta genetika in črevesna mikrobiota, ter zunanjih dejavnikov, kot sta prehrana in življenjski slog. Medtem ko je genetika določena, lahko s spremembo

črevesne mikrobiote potencialno ublažimo tveganje za nastanek metabolnega sindroma. Terapevtski pristopi, ki neposredno spreminjajo črevesno mikrobioto (probiotiki, prebiotiki, antibiotiki in drugi terapevtski posegi) in vplivajo na os mikrobiota-črevesje-možgani, so lahko koristni pri zdravljenju metabolnega sindroma in z njim povezanih stanj, zato je v prihodnosti na to področje smiselno usmeriti še več raziskav.

8 LITERATURA

1. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640–5.
2. Devaraj S, Rosenson RS, Jialal I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004 Jun;33(2):431–53.
3. Wang P-X, Deng X-R, Zhang C-H, Yuan H-J. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Apr 5;133(7):808–16.
4. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Oct;2(10):747–56.
5. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiaro GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14.
6. Delzenne NM, Cani PD. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2011 Jul 14;31(1):15–31.
7. Wang S-Z, Yu Y-J, Adeli K. Role of Gut Microbiota in Neuroendocrine Regulation of Carbohydrate and Lipid Metabolism via the Microbiota-Gut-Brain-Liver Axis. *Microorganisms*. 2020 Apr 7;8(4):527.
8. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. 2010 Feb 5;5(2):e9085.
9. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol*. 2010 Jul;61(1):69–78.
10. Block JP, Bailey LC, Gillman MW, Lunsford D, Daley MF, Eneli I, et al. Early Antibiotic Exposure and Weight Outcomes in Young Children. *Pediatrics*. 2018 Dec;142(6).
11. Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozyrskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int J Obes*. 2014 Oct;38(10):1290–8.
12. Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, Oberfield S, Dominguez-Bello MG, Widen EM, et al. Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *Int J Obes*. 2015 Apr;39(4):665–70.



13. Mor A, Antonsen S, Kahlert J, Holsteen V, Jørgensen S, Holm-Pedersen J, et al. Prenatal exposure to systemic antibacterials and overweight and obesity in Danish schoolchildren: a prevalence study. *Int J Obes* 2005. 2015 Oct;39(10):1450–5.
14. Corona G, Vignozzi L, Sforza A, Mannucci E, Maggi M. Obesity and late-onset hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Dec 15;418 Pt 2:120–33.
15. Corona G, Goulis DG, Huhtaniemi I, Zitzmann M, Toppari J, Forti G, et al. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males. *Andrology*. 2020 Feb 5;00:1–18.
16. Corona G, Rastrelli G, Vignozzi L, Mannucci E, Maggi M. Testosterone, cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Apr;25(2):337–53.
17. Gautier A, Bonnet F, Dubois S, Massart C, Grosheny C, Bachelot A, et al. Associations between visceral adipose tissue, inflammation and sex steroid concentrations in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Mar 1;78(3):373–8.
18. Jones TH. Testosterone associations with erectile dysfunction, diabetes, and the metabolic syndrome. *Eur Urol Suppl*. 2007;6(16)(16):847–57.
19. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 20;130(8)(8):671–80.
20. Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Møller K, Mittendorfer B, Pedersen BK. Influence of TNF- α and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2006 Jul 1;291(1):108–14.
21. Osuna C, JA, Gómez-Pérez R, Arata-Bellabarba G, Villaroel V. Relationship between BMI, total testosterone, sex hormone-binding-globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch Androl*. 2006 Jan 1;52(5):355–61.
22. Carrageta DF, Oliveira PF, Alves MG, Monteiro MP. Obesity and male hypogonadism: Tales of a vicious cycle. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2019 Aug;20(8):1148–58.
23. Ng Tang Fui M, Hoermann R, Grossmann M. Effect of Testosterone Treatment on Adipokines and Gut Hormones in Obese Men on a Hypocaloric Diet. *J Endocr Soc*. 2017 Apr 1;1(4):302–12.
24. Foresta C, Di Mambro A, Pagano C, Garolla A, Vettor R, Ferlin A. Insulin-like factor 3 as a marker of testicular function in obese men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Nov;71(5):722–6.
25. Winters SJ, Wang C, Abdelrahman E, Hadeed V, Dyky MA, Brufsky A. Inhibin-B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fewer Sertoli cells? *J Androl*. 2006 Aug;27(4):560–4.
26. Andersen JM, Herning H, Aschim EL, Hjelmæsæth J, Mala T, Hanevik HI, et al. Body Mass Index Is Associated with Impaired Semen Characteristics and Reduced Levels of Anti-Müllerian Hormone across a Wide Weight Range. *PloS One*. 2015;10(6):e0130210.
27. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013 Jun;19(3):221–31.
28. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004 Dec;53 Suppl 3:S215–219.
29. Harada N, Hanaoka R, Horiuchi H, Kitakaze T, Mitani T, Inui H, et al. Castration influences intestinal microflora and induces abdominal obesity in high-fat diet-fed mice. *Sci Rep*. 2016 Mar 10;6(1):23001.
30. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 1;444(7122):1022–3.
31. Tremellen K, McPhee N, Pearce K. Metabolic endotoxaemia related inflammation is associated with hypogonadism in overweight men. *Basic Clin Androl*. 2017 Mar 8;27(1):5.
32. Tremellen K, McPhee N, Pearce K, Benson S, Schedlowski M, Engler H. Endotoxin-initiated inflammation reduces testosterone production in men of reproductive age. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018 Mar 1;314(3):E206–13.
33. Sartorius G, Spasevska S, Idan A, Turner L, Forbes E, Zamojska A, et al. Serum testosterone, dihydrotestosterone and estradiol concentrations in older men self-reporting very good health: the healthy man study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Nov 1;77(5):755–63.
34. Kolida S, Gibson GR. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011;2:373–93.
35. Marchiando AM, Graham WW, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:119–44.
36. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*. 2009 May 13;420(2):211–9.
37. Rivera-Piza A, Lee S-J. Effects of dietary fibers and prebiotics in adiposity regulation via modulation of gut microbiota. *Appl Biol Chem*. 2020 Jan 7;63(1):2.
38. Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Jan;61(1).
39. Chen XL, Gong LZ, Xu JX. Antioxidative activity and protective effect of probiotics against high-fat diet-induced sperm damage in rats. *Anim Int J Anim Biosci*. 2013 Feb;7(2):287–92.
40. Poutahidis T, Springer A, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, et al. Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *PloS One*. 2014;9(1):e84877.
41. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts*. 2015;8(6):402–24.
42. Narayanaswami V, Dvoskin LP. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol Ther*. 2017 Feb;170:116–47.
43. Tremellen K. Gut Endotoxin Leading to a Decline IN Gonadal function (GELDING) - a novel theory for the development of late onset hypogonadism in obese men. *Basic Clin Androl*. 2016;26:7.
44. Zhang Z, Mocanu V, Cai C, Dang J, Slater L, Deehan EC, et al. Impact of Fecal Microbiota Transplantation on Obesity and Metabolic Syndrome-A Systematic Review. *Nutrients*. 2019 Sep 25;11(10):2291.
45. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, et al. Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab*. 2017 Oct 3;26(4):611–619.e6.
46. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, et al. Testosterone therapy in men with hypogonadism: an Endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 May 1;103(5):1715–44.
47. Grimes DA, Lopez LM, Gallo MF, Halpern V, Nanda K, Schulz KF. Steroid hormones for contraception in men. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Mar 14;(3):CD004316.

NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

FAKULTETA ZA FARMACIJO UNIVERZE V LJUBLJANI NA SLAVNOSTNI PODELITVI POČASTILA SVOJE ZOISOVE NAGRAJENCE

**izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm., Sara Lucu
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani**

Na slavnostnem delu Raziskovalnega dneva Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, 15. decembra 2021,



Zoisova nagrajenka za življenjsko delo prof. dr. Julijana Kristl in prejemnik Zoisove nagrade prof. dr. Stanislav Gobec (avtor fotografije: Boris Gumilar).

so posebno pozornost namenili počastitvi treh profesorjev s fakultete, ki so prejemniki Zoisovih nagrad in priznanj za leto 2021. V okviru dogodka so pripravili tudi krajši pogovor, v katerem so nagrajenci delili nekaj svojih misli o vlogi in pomenu Fakultete za farmacijo in farmacije nasploh.

Kot je dejal prof. dr. Stanislav Gobec, *»ima Slovenija vsekakor kritično maso zelo dobro usposobljenih ljudi, ki so sposobni prebojev na področju biomedicinskih raziskav na splošno in seveda tudi na področju razvoja novih zdravil. Te ljudi bi bilo treba kvalitetno med seboj povezati in jim omogočiti dostop do sredstev, delno pa njihovo raziskovalno delo tudi usmeriti. Načeloma je to možno enostavno doseči s pravimi razpisi in namenskimi sredstvi.«*

Sogovorniki so se dotaknili tudi prostorske stiske na fakulteti, saj so pogoji za delo bistven dejavnik pri doseganju vrhunskih znanstvenih dosežkov. Prof. dr. Marko Anderluh je prepričan, da so v zadnjih dvajsetih letih delavci Fakultete za farmacijo pokazali, da so bile investicije v infrastrukturo zelo upravičene, saj dokazujejo konstantno kvantitativno in kvalitativno rast dosežkov na malodane vseh področjih delovanja. Obenem pa je opozoril, da so na fakulteti *»prišli do omejitvenega dejavnika in nepremostljive ovire – to je prostor za delo. To se je morda še najbolj pokazalo med epidemijo covid-19, saj je primanjkljaj prostorov vplival na pedagoški in raziskovalni izplen. Zato so investicije v novo stavbo Fakultete za farmacijo ne samo potrebne, temveč nujne za ohranjanje slovenske odličnosti na področju vseh vej farmacije.«*

Prof. dr. Julijana Kristl je dodala, da bo Fakulteta za farmacijo *»kos prihajajočim trendom le, če bo močna, povezana in solidarna že na primarni ravni, saj bo potem tudi v hibridni in nadnacionalni. Obvladati pa bo morala tudi aktualne znanstvene in strokovne vsebine, ki bodo svetovno konkurenčne. Strinjam se, da Fakulteta za farmacijo potrebuje več prostorov za raziskovanje, enako potrebni pa so doktorski študentje, ki bodo razvijali ideje in ustrezne veščine za soočanje z izzivi prihodnosti.«* Zato je apelirala na Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport in Javno agencijo za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, da zagotovita več sredstev za skrben razvoj znanstvenih kadrov v Sloveniji.

Kljub omenjenim izzivom pa so ravno Zoisovi nagrajenci neposreden dokaz, da je Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani nedvomno izjemno uspešna, inovativna in vodilna izobraževalna in raziskovalna ustanova v slovenskem prostoru.



ROCHE – 125 LET PRAZNOVANJA ŽIVLJENJA, 25 LET V SLOVENIJI

**mag. Petra Rupar, mag. farm. Mateja Malnar Štembal
Roche farmacevtska družba, d. o. o.**

Fritz Hoffmann je bil med prvimi, ki so spoznali, da je industrijska proizvodnja zdravil ključna za napredek v boju proti boleznim. Verjel je, da je treba povezati znanost z gospodarstvom in znanstveno raziskane farmacevtske spojine spremeniti v standardizirana zdravila, jih distribuirati po svetu in tako rešiti na milijone življenj. Njegova vizija je postala resničnost, ko je 1. oktobra 1896, kot 28-letnik, ustanovil podjetje F. Hoffmann-La Roche & Co v Baslu v Švici. Od takrat je Roche prerasel v eno vodilnih svetovnih zdravstvenih podjetij, ki še vedno ostaja v družinski lasti. V svojih 125 letih je prehodil pot od industrijskega izdelovalca vitaminov in zdravil do mednarodnega zdravstvenega podjetja, ki v več kot 100 državah zaposluje prek 100.000 strokovnjakov.

V Rochu prinašamo celovite zdravstvene rešitve, saj pod eno streho združujemo diagnostiko, farmacevtsko in podatkovno analitiko. Tako lahko na bolezni gledamo bolj holistično in si prizadevamo za posamezniku prilagojeno zdravljenje, kjer bi vsak bolnik dobil pravo zdravljenje ob pravem času. Glede na edinstvene značilnosti posameznika želimo kar najbolj prilagoditi vsak korak na njegovi poti zdravljenja. Povzročitelje bolezni odkrivamo že na molekularni ravni, upoštevamo genetsko sliko in življenjski slog, ob uporabi baz podatkov in algoritmov pa lahko predvidimo, kako se bo posameznik odzval na določeno zdravilo oziroma zdravljenje.

Naši prioriteti zagotovo ostajata razvoj inovativnih zdravil in diagnostičnih rešitev ter vlaganje v znanost. Roche je med največjimi vlagatelji v raziskave in razvoj v industriji, lani smo za to namenili več kot 13 milijard švicarskih frankov. Iščemo nove terapevtske rešitve za bolezni, kjer je še vedno zelo velika in neizpolnjena potreba po zdravljenju. To so redki raki ali pa bolezni tako velikih razsežnosti, kot je Alzheimerjeva bolezen, ki ne prizadene le bolnika, ampak tudi njegovo družino.

Naše temeljno terapevtsko področje ostaja onkologija s tarčnim zdravljenjem in imunoterapijo ter dolgoročno novimi tehnologijami, kot so cepiva proti raku. Intenzivno raziskujemo in prinašamo inovacije tudi na področju nevroznosti in redkih bolezni, oftalmologije in nalezljivih boleznih, vklju-

čno s covidom-19. V zadnjih letih smo registrirali prebojni terapiji za multiplo sklerozo in hemofilijo ter prvo peroralno zdravilo za spinalno mišično atrofijo. V tretjem četrtletju leta 2022 pričakujemo podatke iz enega naših največjih programov, ki je usmerjen v Alzheimerjevo bolezen.

Roche je s svojim portfeljem tudi eden ključnih ponudnikov diagnostičnih rešitev predvsem na področju kardiologije, zdravljenja ženskih bolezni, diabetesa in virologije.

V Sloveniji smo prisotni že 25 let in danes zaposlujemo več kot 80 strokovnjakov. Ponosno sledimo svojemu poslanstvu »*Doing now what patients need next*« ter si prizadevamo, da so naše prebojne inovativne zdravstvene rešitve čim hitreje na voljo slovenskim bolnikom. Slovenija je pogosto med državami v Evropi, kjer so naši produkti najprej dostopni. Od leta 2010 smo slovenskim bolnikom zagotovili kar 24 novih zdravil za 64 indikacij.

Ključ našega uspeha je, da v ospredje vedno postavljamo dobrobit za bolnike, svoje zaposlene ter partnerstvo z drugimi deležniki.

ROCHE v Sloveniji

Po osamosvojitvi Slovenije leta 1991 in razpadu enotnega jugoslovanskega trga so se v Sloveniji organizirala zastopstva in konsignacijska skladišča tujih farmacevtskih družb. Tako so zagotovili njihovo boljšo preglednost in delovanje v razmerju do zdravstvenih delavcev in organizacij. V marcu leta 1996 so ustanovili Podružnico družbe Roche v Ljubljani, ki se je kasneje v skladu z zakonodajo preoblikovala v Roche farmacevtsko družbo, d. o. o.

Irena Debeljak, mag. farm., je sodelovala pri ustanovitvi podružnice, pred tem pa je zastopanje Rocha od leta 1982 vodila preko zastopstva Jugomontane v Beogradu in nato v Sloveniji preko veleprodajne Salus. Nato je kot prokuristka vodila Roche v Ljubljani do svoje upokojitve leta 1999.

Izjava Irene Debeljak, mag. farm., ob 125-letnici Rocha: »*Zelo ponosna sem, da sem bila skupaj s svojimi sodelavci del zgodbe o uspehu farmacevtske družbe Roche. O tem smo se lahko prepričali tudi člani Sekcije za zgodovino farmacije pri SFD, ko smo leta 2019 med strokovno ekskurzijo obiskali družbo Roche v Baslu v Švici.*«



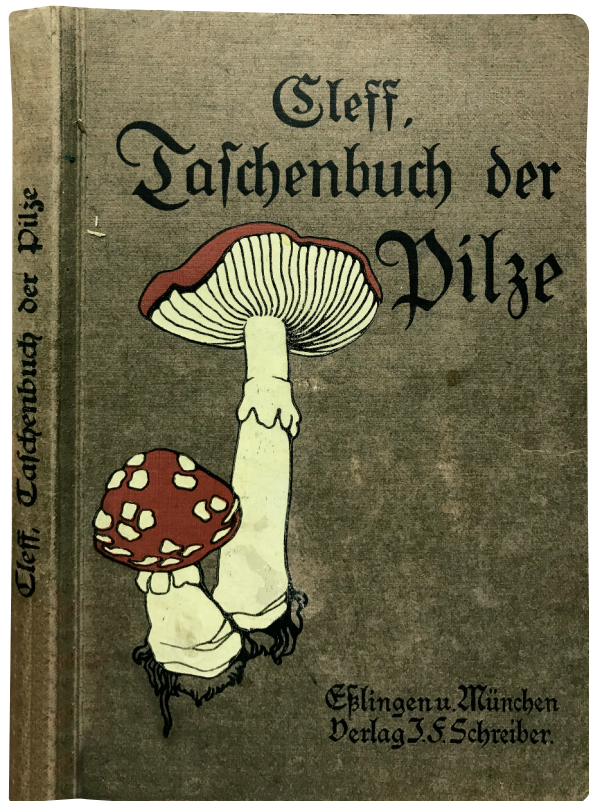
ZMAGO JELINČIČ DONIRAL IZJEMNO ZBIRKO ZGODOVINSKIH PUBLIKACIJ

**prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani**

Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani je bogatejša za izjemno zbirko strokovnih in znanstvenih revij, publikacij in časopisov, ki jih je nesebično doniral g. Zmago Jelinčič Plemeniti, mag. farm. V zbirki je 165 strokovnih in znanstvenih knjig ter časopisov s področja farmakognozije in galenske farmacije, predvsem iz 19. in 20. stoletja.

S svojo donacijo nas je g. Zmago Jelinčič Plemeniti spomnil na globok pomen stavka, ki bi se ga morali zavedati vsi rodovi slovenske farmacije, še prav posebej pa tisti, ki so šele zakorakali v to čudovito področje zdravja in znanja: »Kdor ne spoštuje svoje zgodovine, ni vreden, da živi za prihodnost.«

Iskrena zahvala g. Zmagu Jelinčiču Plemenitemu, mag. farm.



POMANJKANJE ZDRAVIL V EVROPSKI UNIJI

**dr. Marjetka Korpar, mag. farm., spec.
Javni zavod Lekarne Ptuj**

Pomanjkanje zdravil je vztrajajoč problem v Sloveniji in v drugih evropskih državah. Po podatkih raziskave Evropskega združenja lekarniških farmacevtov (PGEU, *Pharmaceutical Group of European Union*) iz leta 2021 je bilo pomanjkanje zdravil prisotno v vseh 27 članicah PGEU, ki so sodelovale v anketi. Največkrat je šlo za pomanjkanje zdravil za srčno-žilni sistem (85 % sodelujočih držav), zdravil za živčni sistem (78 %) ter zdravil za dihalni sistem (74 %). V času anketiranja je 52 % sodelujočih držav navedlo pomanjkanje več kot 200 zdravil, dve državi celo več kot 400 zdravil. 41 % sodelujočih držav je navedlo, da nimajo opredeljene definicije pomanjkanja zdravil na nacionalni ravni, in 37 %, da nimajo vzpostavljenega sistema za poročanje o pomanjkanju zdravil. V povprečju je lekarniško osebje porabilo 5,1 uro na teden za reševanje težav zaradi pomanjkanja zdravil.

Vir:

1. PGEU Medicine Shortages, Survey 2021 Results.
<https://www.pgeu.eu/publications/pgeu-medicine-shortages-survey/>, dostop: februar 2022

LETO 2021: EVROPSKA AGENCIJA ZA ZDRAVILA IZDALA KAR 92 POZITIVNIH MNENJ ZA NOVA ZDRAVILA

**prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani**

V letu 2021 je Evropska agencija za zdravila (EMA) obravnavala 104 vloge za izdajo pozitivnega mnenja za dovoljenje za promet v EU. Sedem vlog so umaknili vlagatelji sami, pet vlog so na EMI zavrnili, kar 92 pa so jih ocenili pozitivno. Od teh so dobila pozitivno mnenje zdravila, v katerih je 53 novih zdravilnih učinkovin. Podelili so 19 statusov zdravil sirot in podobnih bioloških zdravil. Po področjih zdravljenja so pozitivno ocenili 20 zdravil za zdravljenje rakavih bolezni,



13 zdravil za zdravljenje nevroloških bolezni, osem zdravil je dobilo pozitivno mnenje s področja imunologije in revmatologije, sedem cepiv in zdravil s področja covid 19, osem zdravil s področja endokrinologije, štiri zdravila v okviru dermatologije in osem zdravil s področja hematologije, štiri zdravila s področja metabolizma, tri zdravila za oftalmološke bolezni, tri zdravila v alergologiji, prav tako tri

zdravila za zdravljenje reproduktivnih motenj, dve zdravili za ostale infekcije, dve cepivi (izven področja covid-19) ter po eno zdravilo za področja gastroenterologije, diagnostičnih preparatov ter psihiatrije.

Vir:

1. EMA Press Release, News 15. 02. 2022



DOGODKI SFD

Simpozij ob 47. skupščini SFD

Portorož, Kongresni center Bernardin

12.–14. maj 2022

OSREDNJE TEME:

Izbrane novosti na področju zdravljenja z zdravili

Ali lahko sladkorno bolezen zdravimo še bolje

Oskrba ran

Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnikov

Rogla, Hotel Planja

27. in 28. maj 2022

TEMA: *Samozdravljenje med in po virusi*

9. mednarodna BBBB konferenca

V organizaciji SFD in FFA bo od 15. do 17. septembra 2022 v Ljubljani potekala mednarodna konferenca z naslovom: *Pharma sciences of tomorrow.*



SPET NA VOLJO:

e-izobraževanje: **S KOMUNIKACIJO NIMAM TEŽAV**

3 licenčne točke, proti plačilu kotizacije, prijave zbiramo preko spletne strani www.sfd.si.

NOVO:

POSODOBLJENE INFORMACIJE O COVID-19, o virusu, cepivih in zdravilih

Na zaprtih straneh spletne strani SFD med strokovnimi predavanji brez licenčnih točk najdete kratek video prof. dr. Boruta Štruklja o novostih v zvezi z epidemijo covid-19, do katerega lahko dostopajo člani SFD brezplačno.

ČETRTEKI ZA HOMEOPATIJO

Izobraževanje obsega 3-urna predavanja na dveh nivoji (vsak nivo 24 predavanj).
Brez licenčnih točk, proti plačilu kotizacije.

Napovedujemo družabni dogodek: **ŠPORTNE IGRE**

Preddvor, 11. junij 2022

VABLJENI!

Več informacij na www.sfd.si



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

