

# FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 5





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.

Tokratna številka Farmacevtskega vestnika je, kar zadeva člankov, bogata in raznolika. Ponuja osem prispevkov, med njimi pa kar dva izvirna znanstvena članka. Prvi je povezan s stroškovno učinkovitostjo uporabe 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva pri odraslih, kar je z vidika večje dostopnosti in zaščite starejše populacije izjemno pomembna tema. Drugi izvirni znanstveni članek je tudi zelo aktualen: kako s poznavanjem prehranskih vrednosti živil uravnovežiti našo prehrano? Še posebej smo veseli, da je prva avtorica članka dolgoletna sekretarka SFD, ki svoje veliko znanje tudi sedaj dobrohotno deli med člane društva. Magistra Dolinar tako dokazuje, da smo lahko vsi člani društva, ne glede na to, kateri sekciji pripadamo, zelo aktivni in predstavljammo močno podporo farmacevtski znanosti in stroki v Sloveniji. Drage kolegice in kolegi, naj bo to spodbuda za vse, ki imate ideje, znanje in izkušnje, da jih boste delili s širšo strokovno javnostjo. Z veseljem namreč sporočam, da dobivamo pohvale glede vsebine Farmacevtskega vestnika tudi s strani zdravnikov in drugega medicinskega osebja, biologov, biokemikov, biotehnologov in širše javnosti.

V preglednih člankih so nato najprej opisani kemijski motilci endokrinega sistema, ki nakazujejo na negativen vpliv na naš genski zapis. Kolega Klinc in prof. Sollner Dolenc opisujeta neklinično preverjanje varnosti pediatričnih zdravil, kolegici Rede in prof. Bogataj pomen prebavnih lipaz za aplikacijo zdravil, skupina prof. Kosa pa pomen cisteinskih peptidaz pri nevrodegenerativnih boleznih. Novosti na področju zdravljenja kronične limfocitne levkemije predstavljajo tarčni zaviralci Brutonove tirozin kinaze, v zadnjem članku pa kolegica Groti Antonić opisuje vpliv okužbe s SARS-CoV-2 na reproduktivno zdravje moških.

Šele ob prebiranju novosti na področju sodobnih terapevtskih pristopov začnemo spoznavati širino enormnega razvoja farmacije, medicine in zdravstva. S področja relativno nespecifičnih učinkovin prehajamo v tarčne sintezne, biološke in genske učinkovine. Počasi prihajamo do tega, da bomo za večino bolezenskih stanj našli primerno zdravilo ali nefarmakološki način zdravljenja. Bistveno vprašanje pa ostaja: kateri sistem bo omogočil plačilo zdravljenja, ne da bi bistveno posegel po osnovni pravici bolnikov, ki se glasi: vsi moramo imeti enak dostop do zdravil in zdravljenja! Ali nam bo to uspelo, je v veliki meri odvisno od uspešne racionalizacije in prestrukturiranja zdravstva. Vlade se menjajo, sistem ureditve zdravstva v Sloveniji pa ostaja nedodelan.

V imenu uredniškega odbora Farmacevtskega vestnika vam vsem želim obilo zdravja, z branjem Farmacevtskega vestnika pa boste svoje znanje o zdravilih še bolj izpopolnili. Zakorakajmo v leto 2023 vedro in optimistično!

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



## VSEBINA / CONTENT

### IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 351 Rok Hren, Danica Rotar Pavlič, Tina Aiken Vinkovič  
Stroškovna učinkovitost uporabe 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva pri odraslih v Sloveniji  
*Cost-effectiveness of vaccinating adults with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Slovenia*
- 364 Jelka Dolinar, Andrijana Tivadar, Ana Marija Gerbič  
S poznavanjem prehranskih vrednosti živil do uravnoveženega prehranjevanja  
*With knowledge about food nutrition values to a balanced diet*

### PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 375 Andrej Grobin, Jurij Trontelj, Borut Štrukelj  
Estrogeni hormoni in estrogeno delujoči kemijski motilci endokrinega sistema: Ali vplivajo na izražanje DNA?  
*Estrogen hormones and estrogenically active endocrine disruptors: Do they influence DNA expression?*
- 384 Igor Klinc, Marija Sollner Dolenc  
Neklinično preverjanje varnosti zdravil, namenjenih pediatrični populaciji  
*Non-clinical safety testing of medicines intended for the paediatric population*
- 395 Katarina Rede, Marija Bogataj  
Prebavne lipaze in njihov pomen pri aplikaciji zdravil  
*Digestive lipases and their significance in drug delivery*
- 403 Lara Bolčina, Janko Kos, Anja Pišlar  
Pomen cisteinskih peptidaz pri nevrodegenerativnih boleznih  
*Importance of cysteine peptidases in neurodegenerative disorders*
- 410 Damjan Avsec, Helena Podgornik, Matevž Škerget, Irena Mlinarič-Raščan  
Tarčno zdravljenje kronične limfocitne levkemije z zaviralci Brutonove tirozin kinaze  
*Targeting Bruton's tyrosine kinase in chronic lymphocytic leukemia*
- 418 Kristina Groti Antonić  
Vpliv SARS-CoV-2 na reproduktivno zdravje pri moških  
*Effects of SARS-CoV-2 on male reproductive health*

- 426 DRUŠTVENE VESTI

# STROŠKOVNA UČINKOVITOST UPORABE 23-VALENTNEGA POLISAHARIDNEGA PNEVMOKOKNEGA CEPIVA PRI ODRASLIH V SLOVENIJI

## COST-EFFECTIVENESS OF VACCINATING ADULTS WITH THE 23-VALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE VACCINE IN SLOVENIA

AVTORJI / AUTHORS:

zn. sod. dr. Rok Hren<sup>1,2</sup>  
prof. dr. Danica Rotar Pavlič, dr. med.<sup>3</sup>  
Tina Aiken Vinkovič, mag. farm.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Inštitut za matematiko, fiziko in mehaniko,  
Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana*

<sup>2</sup> *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko  
in fiziko, Oddelek za fiziko,  
Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana*

<sup>3</sup> *Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra  
za družinsko medicino, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana*

<sup>4</sup> *MSD Inovativna zdravila,  
Ameriška ulica 2, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: rok.hren@fmf.uni-lj.si

### POVZETEK

Ovrednotili smo stroškovno učinkovitost cepljenja odraslih s 23-valentnim polisaharidnim pnevmokoknim cepivom (PPV23) v Sloveniji. Na podlagi kliničnih izsledkov smo uporabili Markovski model, v katerem smo upoštevali lokalne epidemiološke podatke, stroške cepiva ter stroške zdravljenja invazivnih in neinvazivnih pnevmokoknih bolezni. Oceno stroškovne učinkovitosti smo napravili za strategijo cepljenja s PPV23 v primerjavi s strategijo brez cepljenja. Upoštevali smo scenarija cepljenja kroničnih bolnikov, starejših od 26 let, ter cepljenja vseh odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni. Spremljali smo kohorto 646.070 posameznikov skozi celo življenjsko obdobje in upoštevali, da se bo cepilo 10 % kohorte. Raziskava je pokazala, da je razmerje prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti (ICER) PPV23 v primerjavi s strategijo brez cepljenja znašalo 8751 € na leto zdravstveno kakovostnega življenja (QALY), kar je pod pragom mejnega ICER v Republiki Sloveniji (25.000 €/QALY). V podskupini kroničnih bolnikov, starejših od 26 let, je ICER znašal 12.946 €/QALY, v podskupini odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni, pa 1632 €/QALY. Občutljivostna analiza je potrdila izsledke raziskave. Rezultati naše raziskave kažejo, da cepljenje odraslih s PPV23 v Sloveniji predstavlja stroškovno učinkovito strategijo preprečevanja invazivnih in neinvazivnih pnevmokoknih bolezni.

### KLJUČNE BESEDE:

farmakoeconomika, pnevmokokne bolezni, pnevmokokno cepivo, stroškovna učinkovitost

### ABSTRACT

We evaluated the cost-effectiveness of vaccinating adults with a 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) in Slovenia. Based on clinical findings, we used the Markov model in which we considered local epidemiological data, costs of the vaccine and costs of treating invasive and non-invasive pneumococcal diseases. The cost-effectiveness assessment was made for the PPV23 vaccination strategy compared to the no-vaccination strategy. We considered the vaccination scenarios of chronic patients over 26 years of age and the



vaccination of all adults over 65 years of age without chronic diseases. We followed a cohort of 646,070 individuals throughout their lives and considered 10% vaccination coverage within the cohort. The research showed that when comparing PPV23 to the no-vaccination strategy, the incremental cost-effectiveness ratio (ICER) was €8,751 per quality-adjusted life year (QALY), which is below the willingness-to-pay threshold in Slovenia (€25,000/QALY). In the subgroup of chronic patients older than 26 years, ICER was €12,946/QALY, and in the group of adults older than 65 years, it was €1,632/QALY. Sensitivity analysis confirmed the results of the study. The results of our research show that vaccination of adults with PPV23 in Slovenia represents a cost-effective strategy for the prevention of invasive and non-invasive pneumococcal diseases.

#### KEY WORDS:

cost-effectiveness, pharmacoconomics, pneumococcal diseases, pneumococcal vaccine

## 1 UVOD

Okužba s pnevmokokom *Streptococcus pneumoniae* lahko povzroči resne bolezni, vključno s sepsom, meningitisom in pljučnico z bakteriemijo (invazivno) ali brez bakteriemije (neinvazivno) (1). V zadnjih petih letih je v Sloveniji letna incidenca invazivnih pnevmokoknih okužb znašala med 13,3 do 16,1 na 100.000 prebivalcev (2). V letu 2018 je bila obolevnost največja pri mlajših od 5 let (prijavna letna incidenčna stopnja invazivnih pnevmokoknih okužb: 38,8/100.000) in starejših od 65 let (prijavna letna incidenčna stopnja invazivnih pnevmokoknih okužb: 34,4/100.000) (2), medtem ko je pljučnica še vedno pomemben vzrok smrti (3). Dobro je znano, da pnevmokokna cepiva učinkovito preprečujejo invazivne in neinvazivne pnevmokokne bolezni in z njimi povezano smrtnost in obolevnost (4).

V Sloveniji izvajamo cepljenje proti pnevmokoknim okužbam v primeru zdravstvenih indikacij od leta 1995. Sprva je bilo na voljo le polisaharidno cepivo, kasneje pa tudi konjugirana cepiva (7-valentno, 10-valentno in 13-valentno). Z letom 2015 se je začelo redno cepljenje proti pnevmokoknim okužbam s konjugiranim 10-valentnim

cepivom pri otrocih, ki so dopolnili tri mesece starosti (rojeni od oktobra 2014 dalje). Od leta 2019 je za izvajanje rednega cepljenja otrok proti pnevmokoknim okužbam na voljo 13-valentno cepivo (5).

Pomen 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) je v tem, da pokrije večji nabor potencialnih pnevmokoknih patogenov. Na podlagi zadnjih dostopnih podatkov iz leta 2018 za območje Evropske unije oz. Evropskega gospodarskega prostora je bil pri osebah, starih 65 let in starejših, v 73 % primerov povzročitelj invazivne bolezni serotip, vključen v 23-valentno polisaharidno cepivo, 29 % primerov pa je bilo posledica serotipov, vključenih v 13-valentnem konjugiranem cepivu (6).

Obe cepivi sta se izkazali kot učinkoviti pri preprečevanju invazivne pljučnice z bakteriemijo in neinvazivne pljučnice brez bakteriemije (7). V raziskavi CAPITA (*Community-Acquired Pneumonia immunization Trial in Adults*) so primerjali PCV13 s placebom pri odraslih, starih 65 let in starejših. Raziskava je pokazala statistično značilno učinkovitost cepiva v primerjavi s placebom za preprečevanje pljučnice, povzročene s cepilnimi sevi, nebakteriemične neinvazivne bronhopneumonije, povzročene s cepilnimi sevi, in bakteriemične invazivne pnevmokokne bolezni (8).

Prospektivne in retrospektivne raziskave so pokazale, da cepivo PPV23 zmanjša tveganje za invazivno pnevmokokno bolezen (IPB) in nebakteriemično pnevmokokno pljučnico (NBPP) ter je učinkovito proti izvenbolnišnično pridobljeni pljučnici iz vseh vzrokov. V metaanalizi, objavljeni leta 2016, ki je vključevala 24 randomiziranih kontroliranih raziskav in opazovalnih raziskav, ki so ocenjevale učinkovitost cepiva PPV23 proti invazivni pnevmokokni bolezni in izvenbolnišnično pridobljeni pljučnici iz vseh vzrokov pri odraslih, starih 50 let in starejših, so pokazali, da je cepljenje s PPV23 povezano s 50-odstotnim zmanjšanjem pojavnosti invazivne pnevmokokne bolezni (95-% IZ; 21 % do 69 %) pri kohortnih raziskavah in 54-odstotnim zmanjšanjem pojavnosti te bolezni pri kontroliranih raziskavah primerov (95-% IZ; 32 % do 69 %) (9).

Prospektivna raziskava, ki jo je izvedel Kawakami s sod. (2018), je pokazala, da je bil drugi odmerek cepiva PPV23 vsaj pet let po prvem cepljenju odraslih proti pnevmokokni bolezni imunogen in so ga starostniki na Japonskem, stari 70 let ali starejši, dobro prenašali ne glede na časovni interval po prvem cepljenju (10).

Multicentrična prospektivna raziskava, izvedena na Japonskem med odraslimi, starimi 65 let in starejšimi (2017), je pokazala 27,4-odstotno učinkovitost cepiva PPV23 (95-% IZ; 3,2 % do 45,6 %) pri vseh pnevmokoknih pljučnicah, 33,5-odstotno učinkovitost (95-% IZ; 5,6 % do

53,1 %) pri vseh serotipih PPV23 in 2,0-odstotno učinkovitost (95-% IZ; od -78,9 % do 46,3 %) pri serotipih, ki niso zastopani v cepivu PPV23 (11).

Leventer-Roberts in sod. (2015) so pokazali, da cepljenje s cepivom PPV23 zmanjša tveganje za invazivno pnevmokokno bolezen za 42 % (95-% IZ; od 19 % do 59 %;  $P < 0,01$ ) v kohorti odraslih v Izraelu, starih 65 let in starejših (12).

Raziskava, ki jo je izvedel Tsai s sod. (2015), je pokazala, da je bilo cepljenje s cepivom PPV23 v prejšnjem letu povezano s 60-odstotnim zmanjšanjem hospitalizacij zaradi pljučnice (95-% IZ; od 58 % do 61 %;  $P < 0,001$ ), 76-odstotnim zmanjšanjem pojavnosti invazivne pnevmokokne bolezni (95-% IZ; 54 % do 88 %;  $P < 0,001$ ) in več kot 90-odstotnim zmanjšanjem števila smrti zaradi pljučnice, invazivne pnevmokokne bolezni in vseh razlogov med osebami na Tajvanu, starejšimi od 75 let (13).

V prospektivni raziskavi, objavljeni leta 2014, je Ochar-Gondar s sod. ocenjeval učinkovitost cepiva PPV23 pri odraslih, starih 60 let in starejših, ki so bili cepljeni nedavno (manj kot pet let pred začetkom raziskave). Cepivo je bilo v 48 % primerov učinkovito proti nebakteriemični pnevmokokni, izvenbolnišnično pridobljeni pljučnici (razmerje ogroženosti (HR) 0,52; 95-% IZ; 0,29 do 0,92), 51-odstotno učinkovito proti vsem primerom pnevmokokne, izvenbolnišnično pridobljene pljučnice (vključno z bakteriemičnimi primeri) (HR 0,49; 95-% IZ; od 0,29 do 0,84), in 25-odstotno učinkovito proti izvenbolnišnično pridobljeni pljučnici iz vseh vzrokov (HR 0,75; 95-% IZ; od 0,58 do 0,98) (14).

Hechter in sod. (2012) so izvedli prospektivno raziskavo pri moških, cepljenih pri starosti 65 let ali več, in pokazali, da cepljenje s cepivom PPV zmanjša pojavnost pnevmokokne bakteriemije za 65 %, vendar pa učinek ni bil statistično pomemben ( $P = 0,22$ ) (15).

V Sloveniji izvajamo cepljenje proti pnevmokoknim okužbam v skladu s programom cepljenja in zaščite z zdravili za tekoče leto. Nacionalni inštitut za javno zdravje je leta 2019 objavil osvežena Priporočila za cepljenje odraslih in otrok, starih pet let in starejših, proti pnevmokoknim okužbam (16). Cepljenje s konjugiranim in polisaharidnim pnevmokoknim cepivom pri osebah z visokim tveganjem financira Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS), in sicer pri osebah z anatomsko ali funkcionalno asplenijo, osebah z okrnjeno imunostjo (na primer bolniki po presaditvi kostnega mozga, bolniki brez vranice, bolniki, okuženi z virusom HIV, bolniki s kronično ledvično odpovedjo, bolniki z nefrotskim sindromom, bolniki na imunosupresivnem zdravljenju, bolniki, ki se

zdravijo z obsevanjem, bolniki s hudo imunsko pomanjkljivostjo ter nekateri onkološki ali hematološki bolniki), osebah s polževim vsadkom ali z likvorfistulo ter osebah po presaditvi krvotvornih matičnih celic. Pobudo za cepljenje zaradi zdravstvenih indikacij mora podati zdravnik ustrezne specialnosti (17).

V skladu s priporočili cepljenje s PCV13 ali PPV23 proti pnevmokoknim okužbam priporočamo osebam, ki imajo kronične bolezni obtočil, dihal, jeter in sladkorno bolezen ter vsem osebam, starih 65 let ali starejšim. Cepljenje s polisaharidnim cepivom PPV23 proti pnevmokoknim okužbam se za kronične bolnike financira iz obveznega zdravstvenega zavarovanja do vključno 25. leta starosti, nad 26. letom pa so kronični bolniki samoplačniki. Prav tako so samoplačniki tudi zdrave osebe, stare 65 let ali več, pri katerih v primeru cepljenja z obema cepivoma najprej cepimo s PCV13. V primeru, da je oseba predhodno dobila enega ali več odmerkov PPV23, cepimo s PCV13 najmanj eno leto po zadnjem odmerku PPV23 (16).

Nacionalni inštitut za javno zdravje je decembra 2021 objavil posodobljena Priporočila za cepljenje in revakvacijo s pnevmokoknim polisaharidnim cepivom (18). Namen cepljenja proti pnevmokoknim okužbam je zaščititi osebe s kroničnimi boleznimi in stanji, ki povečujejo tveganje za invazivni potek pnevmokokne okužbe. Cepljenje proti pnevmokoknim okužbam s pnevmokoknim polisaharidnim cepivom je priporočljivo za vse osebe, stare 65 let ali več, in za osebe, stare 2 leti ali več, ki imajo kronične bolezni obtočil, dihal, jeter, ledvic, anatomsko ali funkcionalno asplenijo, sladkorno bolezen, polžev vsadek, nevromišično bolezen, ki povečuje tveganje za aspiracijo, sum na likvorfistulo in boleznimi ali stanji, ki slabijo imunski sistem. Osnovno cepljenje opravimo z enim odmerkom cepiva (18). V Sloveniji so kronični bolniki, stari 26 let in več, ter osebe, stare 65 let in več (izjema so osebe z visokim tveganjem), samoplačniki. Ameriška svetovalna komisija za cepljenja (*US Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP*) je 13. avgusta 2014 priporočila sekvenčno cepljenje s PCV13 in PPV23 za odrasle, stare 65 let in več. Vsi odrasli, stari  $\geq 65$  let, prejmejo en odmerek PPV23. Če se zdravstveno osebje odloči za PCV13, ga mora dati vsaj eno leto pred PPV23. ACIP še naprej priporoča PCV13 v seriji s PPV23 za odrasle, stare  $\geq 19$  let, z imunsko oslabiljenim stanjem, uhajanjem cerebrospinalne tekočine ali kohlearnim vsadkom (19).

Tudi Center za nadzor bolezni in njihovo preprečevanje v ZDA (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) je novembra 2019 objavil priporočilo o uporabi pnevmokoknega cepiva pri odraslih, starejših od 65 let (20), pri katerih je pljučnica pomemben vzrok obolevnosti in umrljivosti (20).



Tudi pri tej skupini ZZZS ne krije stroškov cepljenja in posledično se jih velika večina ne odloči za cepljenje (21). Osnovni pomen farmakoekonomskih analiz je v določanju stroškovne učinkovitosti, to je razmerja med učinkovitostjo nove tehnologije in stroški, ki jih le-ta prinaša. Takšna analiza praviloma predstavlja plačniku osnovo za odločanje o vpeljavi nove zdravstvene tehnologije. S farmakoekonomsko analizo smo v tej raziskavi ovrednotili, ali je cepljenje odraslih s 23-valentnim polisaharidnim pnevmokoknim cepivom (PPV23) v Sloveniji stroškovno učinkovito.

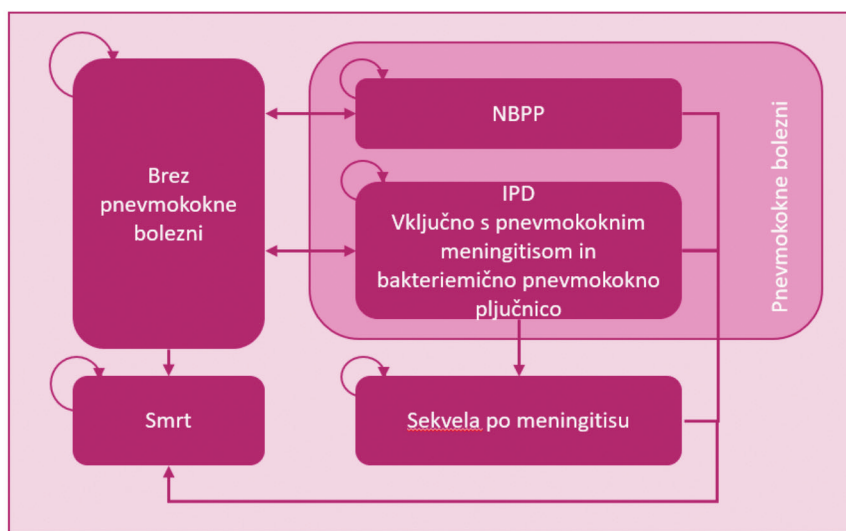
## 2 METODE

Analizo stroškovne učinkovitosti smo izvedli z vidika plačnika, tj. ZZZS. V analizo smo tako vključili stroške cepiva in cepljenja kot tudi stroške zdravljenja bolezenskih stanj, nismo pa upoštevali posrednih stroškov, npr. stroškov odsotnosti z dela. Stroškovno učinkovitost PPV23 smo ocenili v kohorti kroničnih bolnikov, starejših od 26 let (502.758), ter kohorti odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni (143.312), kar je skupaj 646.070 posameznikov (podatek za leto 2017) (22). Obdobje analize smo v vsaki izmed starostnih kohort postavili na doživljenjsko obdobje oz. do starosti 100 let, letno diskontno stopnjo pa na 3,5 % za stroške in učinkovitost.

### Model

Model je zasnovan kot Markovski kohortni model, ki s celostno obravnavo stroškov in učinkovitosti zaščite upošteva epidemiološko kompleksnost bremena pnevmokoknih bolezni. V raziskavi smo uporabili izboljšano verzijo modela, ki je bil v preteklosti natančno validiran in predstavljen v znanstvenih publikacijah (23–25). V modelu s ciklom enega leta posamezniki v kohorti prehajajo skozi zdravstvena stanja, kot je prikazano na sliki 1. Model privzame, da pri bolnikih v zdravstvenem stanju kasnejših posledic po meningitisu (izguba sluha, epileptični napadi, hidrocefalus, spastičnost/pareza, paraliza lobanjskih živcev in okvara vida), imenovanem sekvela po meningitisu, ne more priti do nove epizode invazivnih pnevmokoknih bolezni ali nebakteriemične pnevmokokne pljučnice, saj so takšni primeri redki. Vsako izmed zdravstvenih stanj v modelu je povezano z osnovno utežjo uporabnosti, ki se s starostjo spreminja (26), bolezenska stanja pa osnovno utež uporabnosti še dodatno zmanjšajo (27). Ker bolniki v zdravstvenem stanju sekvela po meningitisu ne morejo okrevati, smo uporabili enako utež uporabnosti za vse starostne skupine na podlagi des Portesove raziskave (28).

Prehajanja med posameznimi zdravstvenimi stanji v vsakem izmed ciklov so določena s starostno specifično pojavnostjo dane bolezni (preglednica 1) (29–35). Model upošteva tudi specifično porazdelitev serotipov (29) in tako omogoča oceno zaščite za vsak posamezni serotip v cepivu (preglednica 2).



Slika 1: Struktura Markovskega modela; NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica, IPD – invazivne pnevmokokne bolezni.  
Figure 1: Markov model structure; NBPP – non-bacteremic pneumococcal pneumonia, IPD – invasive pneumococcal diseases.

Preglednica 1: Klinični parametri, uporabljeni pri izdelavi modela.

Table 1: Used clinical input parameters.

Starostna skupina	Incidenca IPD na osebo	Incidenca NBPP na osebo	Stopnja smrtnosti zaradi IPD	Stopnja smrtnosti zaradi NBPP		Delež meningitisa v primerih IPD	Delež PMS v primerih IPD meningitisa	Delež hospitaliziranih primerov NBPP
				Ambulantna	Bolnišnična			
18–24	0,000020	0,00226	18,2 %	0,0 %	1,7 %	3,00 %	31,70 %	8,5 %
25–29	0,000050	0,00220	18,2 %	0,0 %	2,4 %	3,00 %	31,70 %	8,5 %
30–34	0,000040	0,00271	18,2 %	0,0 %	2,4 %	3,00 %	31,70 %	8,5 %
35–39	0,000060	0,00409	18,2 %	0,0 %	3,5 %	3,00 %	31,70 %	8,5 %
40–44	0,000070	0,00532	18,2 %	0,0 %	3,5 %	3,00 %	31,70 %	8,5 %
45–49	0,000030	0,00507	18,2 %	0,0 %	4,9 %	3,00 %	31,70 %	8,5 %
50–54	0,000120	0,00399	18,2 %	0,0 %	4,9 %	3,00 %	31,70 %	15,6 %
55–59	0,000150	0,00716	18,2 %	0,0 %	5,5 %	3,00 %	31,70 %	15,6 %
60–64	0,000190	0,01058	18,2 %	0,0 %	5,5 %	3,00 %	31,70 %	15,6 %
65–69	0,000340	0,00807	33,0 %	0,0 %	6,7 %	3,00 %	31,70 %	27,4 %
70–74	0,000230	0,00886	33,0 %	0,0 %	6,7 %	3,00 %	31,70 %	27,4 %
75–79	0,000360	0,01240	33,0 %	0,0 %	8,2 %	3,00 %	31,70 %	35,2 %
80–84	0,000520	0,01801	33,0 %	0,0 %	8,2 %	3,00 %	31,70 %	35,2 %
85–89	0,000790	0,02918	33,0 %	0,0 %	11,6 %	3,00 %	31,70 %	38,6 %
90–94	0,000870	0,04314	33,0 %	0,0 %	11,6 %	3,00 %	31,70 %	38,6 %
95–100	0,001940	0,06900	33,0 %	0,0 %	15,4 %	3,00 %	31,70 %	38,6 %

IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica, PMS – sekvela po meningitisu

Preglednica 2: Učinkovitost 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) proti posameznim serotipom, ki povzročajo invazivne pnevmokokne bolezni ter nebakteriemično pnevmokokno pljučnico. Prikazana je tudi serotipska razširjenost.

Table 2: Serotype-specific 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) effectiveness for invasive pneumococcal disease and non-bacteremic pneumococcal pneumonia with serotype distribution.

Serotip	Serotipsko specifična zaščita pred IPD	Serotipska razširjenost za IPD	Serotipsko specifična zaščita pred NBPP	Serotipska razširjenost za NBPP
ST 1	73,0 %	7,8 %	33,5 %	7,8 %
ST 2	73,0 %	0,0 %	33,5 %	0,0 %
ST 3	22,0 %	10,5 %	10,0 %	10,5 %
ST 4	73,0 %	2,3 %	33,5 %	2,3 %
ST 5	73,0 %	0,6 %	33,5 %	0,6 %
ST 6B	73,0 %	1,4 %	33,5 %	1,4 %
ST 7F	73,0 %	9,1 %	33,5 %	9,1 %
ST 8	73,0 %	6,8 %	33,5 %	6,8 %
ST 9N	73,0 %	2,6 %	33,5 %	2,6 %
ST 9V	73,0 %	1,4 %	33,5 %	1,4 %
ST 10A	73,0 %	1,7 %	33,5 %	1,7 %
ST 11A	73,0 %	2,3 %	33,5 %	2,3 %
ST 12F	73,0 %	3,4 %	33,5 %	3,4 %
ST 14	73,0 %	3,7 %	33,5 %	3,7 %



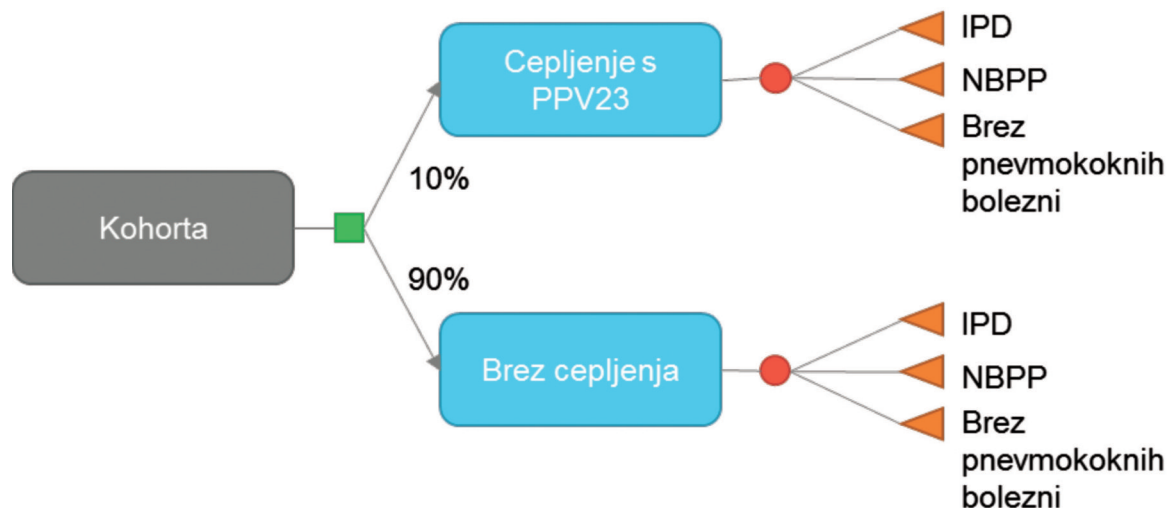


Serotip	Serotipsko specifična zaščita pred IPD	Serotipska razširjenost za IPD	Serotipsko specifična zaščita pred NBPP	Serotipska razširjenost za NBPP
ST 15BC	73,0 %	1,2 %	33,5 %	1,2 %
ST 17F	73,0 %	0,6 %	33,5 %	0,6 %
ST 18C	73,0 %	1,0 %	33,5 %	1,0 %
ST 19A	73,0 %	8,6 %	33,5 %	8,6 %
ST 19F	73,0 %	1,6 %	33,5 %	1,6 %
ST 20	73,0 %	0,8 %	33,5 %	0,8 %
ST 22F	73,0 %	7,4 %	33,5 %	7,4 %
ST 23F	73,0 %	1,5 %	33,5 %	1,5 %
ST 33F	73,0 %	2,5 %	33,5 %	2,5 %
NVT košarica	0,0 %	21,2 %	0,0 %	21,2 %

IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteremična pnevmokokna pljučnica, NVT – serotipi, proti katerim PPV23 ne omogoča zaščite

Učinkovitost PPV23 proti posameznim serotipom (preglednica 2), ki povzročajo invazivne pnevmokokne bolezni, temelji na raziskavi Falkenhorsta in sod. (36), proti serotipom, ki povzročajo pljučnico brez bakterijske etiologije, pa na raziskavi Suzukija in sod. (37). Izjema je serotip ST3, kjer učinkovitost PPV23 proti invazivnim pnevmokoknim boleznim izhaja iz raziskave Andrewsa in sodelavcev (38), medtem ko smo za pljučnico brez bakterijske etiologije privzeli enako razmerje učinkovitosti kot pri ostalih serotipih

in jo postavili na 10 %. V modelu smo spreminjali zaščito PPV23, ki je bila v prvih dveh letih po cepljenju najvišja in se je potem linearno zmanjševala do 0 % v obdobju 13 let. V modelu smo primerjali učinkovitost PPV23 s strategijo brez cepljenja, kot prikazuje slika 2, in s tem poskrbeli, da ocenimo stroškovno učinkovitost PPV23 kar se da konzerватivno. Privzeli smo 10-odstotno precepljenost, kar pomeni, da je bilo v modelu cepljenih 10 % oseb v vsaki starostni skupini.



Slika 2: Odločitveno drevo farmakoekonomskega modela primerjave 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) s strategijo brez cepljenja; IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteremična pnevmokokna pljučnica. V modelu je bilo cepljenih 10 % oseb v vsaki starostni skupini.

Figure 2: Schematic overview of vaccination patient flow, with vaccination with 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) and coverage rate (10%) in each patient group; IPD – invasive pneumococcal diseases, NBPP – non-bacteremic pneumococcal pneumonia.

## Stroški

Vhodne podatke o neposrednih stroških zdravljenja smo povzeli po ZZS (39) in so predstavljeni v preglednici 3. Stroški zdravljenja invazivne pnevmokokne bolezni znašajo 3791,58 €, nebakteriemične pnevmokokne pljučnice 3791,58 €, če je potrebna bolnišnična obravnava, ter 89,10 €, če zadostuje ambulantna obravnava. Večina (okoli 75 %) primerov pnevmokokne pljučnice je neinvazivnih ali nebakteriemičnih pnevmokoknih pljučnic, približno četrtina vseh primerov pnevmokokne pljučnice pa je invazivnih ali bakteriemičnih (tj. vdor bakterij v krvni obtok) (preglednica 3) (40). Izračun stroška zdravljenja (v obeh primerih 3791,58 €) je upošteval vrednost uteži v višini 2,78 za enako diagnozo, J13 Pljučnica, ki jo povzroča *S. pneumoniae*, in ceno uteži v višini 1361,52 €. Stroški zdravljenja pnevmokoknega meningitisa so 3571,72 €, prav tako

sekvele po meningitisu. Vhodne podatke za najvišjo dovoljeno ceno PPV23, ki je enaka 16,12 €, smo pridobili v Centralni bazi zdravil (41), upoštevali pa smo tudi stroške aplikacije cepiva in pregleda v višini 22,84 € (42).

## Uteži uporabnosti

V modelu smo uporabili različne izhodiščne vrednosti uteži uporabnosti glede na kohorto oseb in njihovo starost (preglednica 4). S prisotnostjo bolezni so se v modelu izhodiščne vrednosti zmanjšale za 0,071 na dan za skupaj 21 dni ob prisotnosti invazivne pnevmokokne bolezni, za 0,071 na dan ob prisotnosti bolnišnične nebakteriemične pnevmokokne pljučnice ter 0,005 na dan ob prisotnosti ambulantne nebakteriemične pnevmokokne pljučnice (v obeh primerih za skupaj 15 dni) (27). Za zdravstveno stanje sekvele po meningitisu smo privzeli utež uporabnosti 0,69 po des Portesu (28).

Preglednica 3: Neposredni stroški zdravljenja.

Table 3: Direct treatment costs.

Starostna skupina	Strošek primera IPD (€)	Strošek primera NBPP (€)		Strošek primera meningitisa (€)	Strošek primera PMS (€)
		Ambulantno	Bolnišnično		
18–100	3791,58	3791,58	89,10	3571,72	3571,72

IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica, PMS – sekvela po meningitisu

Preglednica 4: Izhodiščne vrednosti uteži uporabnosti, ki smo jih uporabili v modelu.

Table 4: Baseline utility values per risk category used in the model.

Starostna skupina	Izhodiščne vrednosti uteži uporabnosti	
	Odrasli, starejši od 65 let, brez kroničnih bolezni	Odrasli, starejši od 26 let, s kroničnimi boleznimi
18–24	0,830	0,720
25–29	0,830	0,720
30–34	0,830	0,720
35–39	0,830	0,720
40–44	0,830	0,720
45–49	0,830	0,720
50–54	0,830	0,720
55–59	0,810	0,690
60–64	0,770	0,630
65–69	0,760	0,570
70–74	0,740	0,540
75–79	0,700	0,520
80–84	0,630	0,510
85–89	0,510	0,510
90–94	0,510	0,510
95–100	0,510	0,510

## Analiza občutljivosti

Izsledke raziskave smo preskusili z analizo občutljivosti, z verjetnostno občutljivostno analizo pa smo še celostno ocenili robustnost rezultatov.

# 3 REZULTATI

Preglednica 5 povzema klinične izide cepljenja s PPV23 ter strategije brez cepljenja za kohorto kroničnih bolnikov,

starejših od 26 let, ter odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni.

Preglednica 6 povzema izsledke analize stroškovne učinkovitosti, ki kažejo, da je v osnovnem primeru razmerje prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti ICER za PPV23 v primerjavi s strategijo brez cepljenja enako 8751 € na leto zdravstveno kakovostnega življenja (QALY), kar je pod mejnim ICER v Republiki Sloveniji, ki znaša 25.000 €/QALY (43). Po pričakovanju PPV23 zniža neposredne stroške zdravljenja invazivnih in neinvazivnih pnevmokoknih bolezni. Najvišji so stroški bolnišnične obravnave nebakteriemične pnevmokokne pljučnice. Stroški cepiva predstavljajo manj kot 1 % vseh ocenjenih neposrednih stroškov.

*Preglednica 5: Klinični izidi (število primerov) cepljenja s 23-valentnim polisaharidnim pnevmokoknim cepivom (PPV23) ter strategije brez cepljenja.*

*Table 5: Clinical outcomes (number of cases) for vaccination with 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) and for the no-vaccination strategy.*

Klinični izidi	PPV23	Brez cepljenja
Primeri IPD (meningitis + bakteriemija)	4969	5025
Meningitis	149	151
Primeri NBPP – ambulantni	136.066	136.823
Primeri NBPP – bolnišnični	57.906	58.182
Primeri PMS	47	48
Smrti zaradi IPD	1519	1535
Smrti zaradi NBPP – ambulantni	0	0
Smrti zaradi NBPP – bolnišnični	5365	5389

*IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica, PMS – sekvela po meningitisu*

*Preglednica 6: Neposredni stroški in učinkovitost 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) in strategije brez cepljenja za kohorto kroničnih bolnikov, starejših od 26 let, ter odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni (N = 646.070).*

*Table 6: Direct costs and effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) and the no-vaccination strategy for a defined cohort of chronic patients over 26 years of age and the vaccination of all adults over 65 years of age without chronic diseases (N=646.070).*

Neposredni stroški	PPV23 (€)	Brez cepljenja (€)
Stroški cepiva	1.041.465	0
Stroški aplikacije	1.475.624	0
Stroški zdravljenja IPD	9.759.854	9.941.689
Meningitis	275.817	280.956
NBPP, bolnišnična obravnava	6.535.643	6.593.420
NBPP, ambulantna obravnava	110.424.539	111.317.699
Zdravljenje sekvele po meningitisu	87.434	89.063
Celokupni stroški	129.324.559	127.941.871
Učinkovitost		
<b>QALY</b>	<b>6.036.656</b>	<b>6.036.498</b>
<b>ICER</b>		<b>8751 €/QALY</b>

*IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica,*

*ICER – razmerje prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti, QALY – leto zdravstveno kakovostnega življenja*

Preglednici 7 in 8 prikazujeta rezultate analize stroškovne učinkovitosti posebej za kohorto kroničnih bolnikov, starejših od 26 let, in odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni. Tudi v teh primerih sta razmerji prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti ICER (12.946 €/QALY ter 1632 €/QALY) pod mejnim ICER v Republiki Sloveniji 25.000 €/QALY.

V občutljivostni analizi smo preverili vpliv širokega nabora parametrov na izide farmakoekonomske raziskave. Pri stopnji diskontiranja 0 % je ICER znašal 5072 €/QALY, pri

8 % pa 14.704 €/QALY. Vpliv ostalih parametrov na izide je bil zanemarljiv. Na sliki 3 je prikazan primer za kohorto kroničnih bolnikov, starejših od 26 let. Enake rezultate smo opazili pri kohorti odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni, verjetnostna občutljivostna analiza pa je v obeh kohortah pokazala robustnost rezultatov.

Slika 4 prikazuje rezultate za kohorto kroničnih bolnikov, starejših od 26 let. Tudi spreminjanje ostalih parametrov (npr. umrljivosti zaradi invazivnih pnevmokoknih bolezni ali pojavnosti pnevmokoknih bolezni) je imelo majhen vpliv na rezultate.

**Preglednica 7:** Neposredni stroški in učinkovitost 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) in strategije brez cepljenja samo za kohorto kroničnih bolnikov, starejših od 26 let (N = 502.758).

**Table 7:** Direct costs and effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) and the no-vaccination strategy only for the cohort of chronic patients over 26 years of age (N=502.758).

Neposredni stroški	PPV23 (€)	Brez cepljenja (€)
Stroški cepiva	810.446	0
Stroški aplikacije	1.148.300	0
Stroški zdravljenja IPD	7.393.072	7.507.964
Meningitis	208.931	212.178
NBPP, bolnišnična obravnava	5.201.897	5.242.944
NBPP, ambulantna obravnava	78.739.825	79.254.515
Zdravljenje sekvele po meningitisu	66.231	67.260
Celokupni stroški	93.359.771	92.072.683
<b>Učinkovitost</b>		
<b>QALY</b>	<b>5.250.212</b>	<b>5.250.112</b>
<b>ICER</b>		<b>12.946 €/QALY</b>

IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica, ICER – razmerje prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti, QALY – leto zdravstveno kakovostnega življenja

**Preglednica 8:** Neposredni stroški in učinkovitost 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) in strategije brez cepljenja samo za kohorto odraslih, starejših od 65 let, brez kroničnih bolezni (N = 143.312)

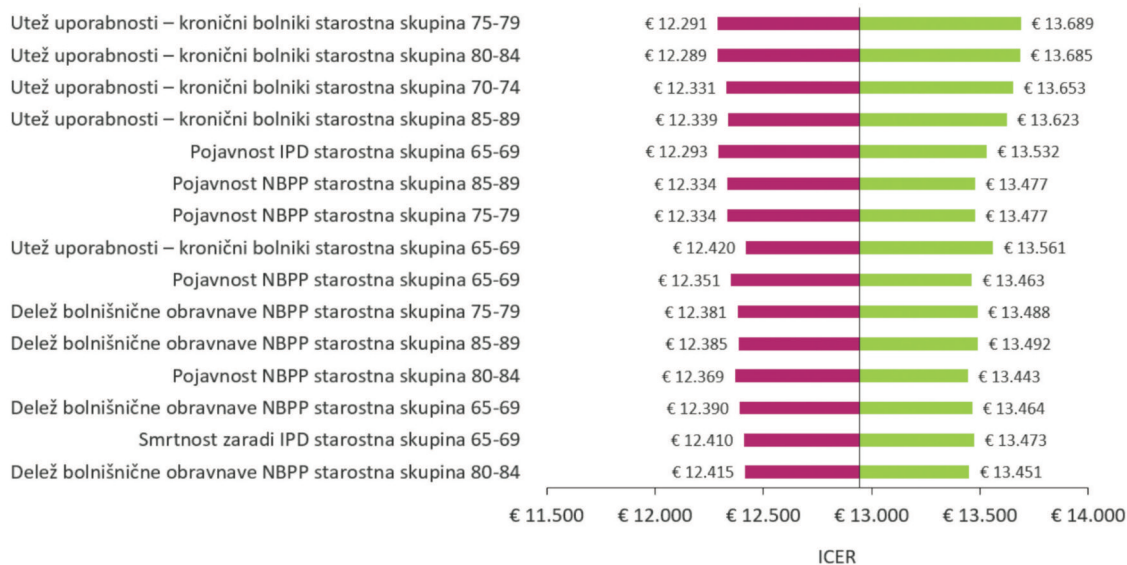
**Table 8:** Direct costs and effectiveness of the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPV23) and the no-vaccination strategy only for the cohort of all adults over 65 years of age without chronic diseases (N=143.312)

Neposredni stroški	PPV23 (€)	Brez cepljenja (€)
Stroški cepiva	231.018	0
Stroški aplikacije	327.324	0
Stroški zdravljenja IPD	2.366.782	2.433.725
Meningitis	66.886	68.778
NBPP, bolnišnična obravnava	1.333.745	1.350.477
NBPP, ambulantna obravnava	31.684.715	32.063.184
Zdravljenje sekvele po meningitisu	21.203	21.803
Celokupni stroški	35.964.788	35.869.188
<b>Učinkovitost</b>		
<b>QALY</b>	<b>786.444</b>	<b>786.385</b>
<b>ICER</b>		<b>1632 €/QALY</b>

IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteriemična pnevmokokna pljučnica, ICER – razmerje prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti, QALY – leto zdravstveno kakovostnega življenja



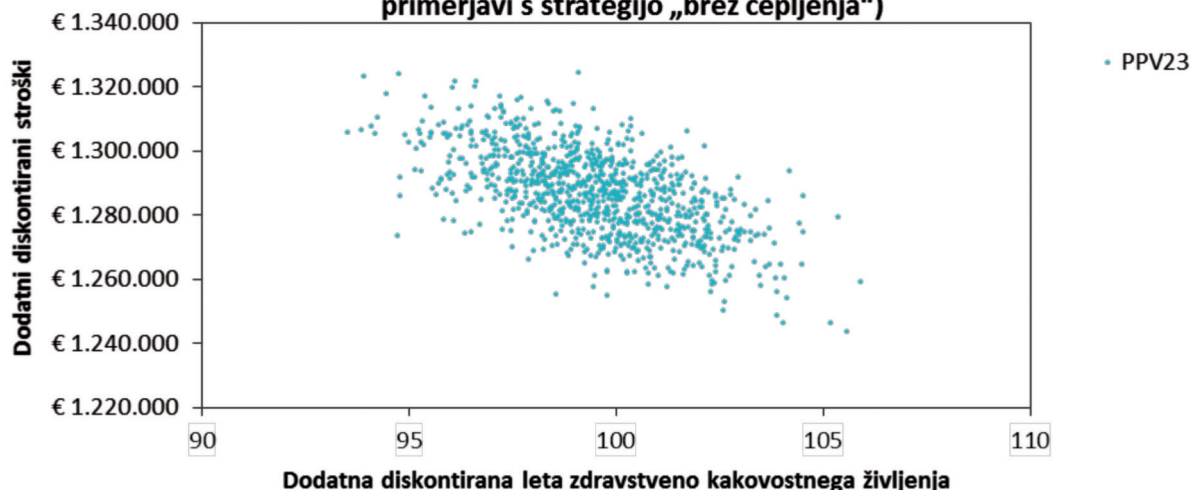
## ICER (PPV23 v primerjavi s strategijo »brez cepljenja«)



Slika 3: Povzetek občutljivostne analize vpliva širokega nabora parametrov na izide (t. i. Tornado diagram) primerjave 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) s strategijo brez cepljenja za primer kohorte kroničnih bolnikov, starejših od 26 let; IPD – invazivne pnevmokokne bolezni, NBPP – nebakteremična pnevmokokna pljučnica, ICER – razmerje prirastka stroškov glede na prirastek učinkovitosti.

Figure 3: ICER tornado diagram of the deterministic sensitivity analysis of 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPSV23) versus no vaccination in chronic patients over 26 years of age; IPD – invasive pneumococcal diseases, NBPP – non-bacteremic pneumococcal pneumonia, ICER – incremental cost-effectiveness ratio.

## Dodatni stroški in leta zdravstveno kakovostnega življenja (PPV23 v primerjavi s strategijo „brez cepljenja“)



Slika 4: Rezultati verjetnostne občutljivostne analize primerjave stroškovne učinkovitosti 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva (PPV23) s strategijo brez cepljenja za kohorto kroničnih bolnikov, starejših od 26 let. Rezultati so predstavljeni v ravnini stroškovne učinkovitosti, kjer se strategija brez cepljenja nahaja v izhodišču koordinatnega sistema, PPV23 pa v zgornjem desnem kvadrantu.

Figure 4: Results of probabilistic sensitivity analysis comparing 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine (PPSV23) with the no-vaccination strategy for chronic patients over 26 years of age population. The results are presented in the cost-effectiveness plane, where the no-vaccination strategy is located at the origin of the coordinate system and PPV23 is located in the upper right quadrant.

## 4 RAZPRAVA

V raziskavi smo ovrednotili stroškovno učinkovitost PPV23 v primerjavi s strategijo brez cepljenja in pokazali, da cepljenje odraslih s PPV23 v Sloveniji predstavlja stroškovno učinkovito strategijo preprečevanja invazivnih in neinvazivnih pnevmokoknih bolezni. Izsledke raziskave smo potrdili z občutljivostno analizo.

V raziskavi smo se odločili za primerjalno strategijo brez cepljenja. Možna bi bila tudi primerjava s 13-valentnim konjugiranim cepivom (44, 45), ki pa bi, glede na višji strošek konjugiranih cepiv in njihovo manjše pokritje potencialnih pnevmokoknih patogenov, bila manj konservativna od naše raziskave. Poleg tega smo pri odločitvi glede modeliranja upoštevali tudi dejstva glede umeščanja cepiva v sistem financiranja v drugih evropskih državah.

Na podlagi pojavnosti serotipov (6) se države namreč pri odrasli populaciji odločajo za cepljenje z enim odmerkom PPV23 in ne za PCV13. Tako npr. v Nemčiji priporočajo in financirajo cepljenje z enim odmerkom PPV23 za kronične bolnike, starejše od 16 let (kot so npr. bolniki z astmo, kronično obstruktivno pljučno boleznijo, sladkorno boleznijo ali nevrološkimi boleznimi). Poleg omenjene skupine cepljenje z enim odmerkom PPV23 priporočajo in financirajo tudi za vse odrasle, starejših od 60 let. Sekvenčno cepljenje v Nemčiji priporočajo in financirajo podobno kot pri nas, torej za najbolj ogrožene osebe (46).

PPV23 uporabljamo že desetletja, v Nemčiji pa so ga prvič priporočili leta 1998 za odrasle, stare 60 let in več. Priporočilo periodično ponovno ocenjujejo in priporočajo cepljenje s PPV23 za vse odrasle, stare 60 let in več, z možnimi ponovnimi odmerki v intervalih  $\geq 6$  let glede na ugotovljeno potrebo (47).

Dansko ministrstvo za zdravje je objavilo, da danski parlament in vlada uvajata nov sveženj cepljenj, ki med drugim vsebuje cepljenje proti pnevmokokom za osebe, stare 65 let ali več, in za rizične skupine. Prva faza je začela veljati 22. aprila 2020 in je zajela prebivalce domov za ostarele, bolnike s kronično boleznijo, stare 65 let ali več, in osebe s posebno velikim tveganjem za hudo pnevmokokno bolezen, mlajše od 65 let. Več drugih držav, vključno z Anglijo in Walesom, ima podobne programe za starejše. Jeseni 2020 so začeli podoben program izvajati tudi na Nizozemskem (48, 49).

Izsledki naše raziskave so pomembni pri odločanju, to je kritju stroškov cepljenja s PPV23 pri kroničnih bolnikih, stare-

jših od 26 let, in osebah, starih 65 let in več, ki ga v nekaterih evropskih državah (Nemčija, Danska, Hrvaška, Slovaška, Združeno Kraljestvo) že izvajajo. Zdravstveni svet Ministrstva za zdravje je na svoji seji v torek, 19. aprila 2022 sprejel sklep, da vlogo Nacionalnega inštituta za javno zdravje in Združenja zdravnikov družinske medicine Slovenije (*»Predlog širitve obstoječega nacionalnega Programa cepljenja in zaščite z zdravili s programom cepljenja proti pnevmokoknim okužbam s polisaharidnim cepivom (PPV23) pri odraslih kroničnih bolnikih, starih od 26 do 64 let, ter osebah, starih 65 let in več«*) odobri in predlaga uvrstitev v financiranje (50). Menimo, da bi ukrep pomembno zmanjšal breme bolezni ter stopnjo smrtnosti, ki je pri starejših osebah zaradi pnevmokokne bakteriemije lahko celo 60-odstotna.

## 5 SKLEP

Rezultati naše farmakoeekonomske raziskave kažejo, da cepljenje odraslih s PPV23 v Sloveniji predstavlja stroškovno učinkovito strategijo preprečevanja invazivnih in neinvazivnih pnevmokoknih bolezni.

## 6 FINANCIRANJE

Raziskavo je financiral MSD.

## 7 IZJAVA O RAZKRITJU INTERESOV

Tina Aiken Vinkovič je zaposlena v MSD Inovativna zdravila in je lahko lastnik delnic in/ali delniških opcij v podjetju Merck & Co, Inc, Rahway, New Jersey.

## 8 LITERATURA

1. Matanock A, Lee G, Gierke R, Kobayashi M, Leidner A, Pilishvili T. Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-



- Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Among Adults Aged  $\geq 65$  Years: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019;68:1069-75.
2. Sočan M, Kraigher A, Klavs I, Frelih T, Grlic E, Grgič Vitek M, Učakar V. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2018. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2018.
  3. Lejko Zupanc T. Kaj več lahko ponudimo kroničnim bolnikom. In: Rotar-Pavlic D. Kakovostna obravnava bolnika v družinski medicini: novosti v zdravljenju sladkorne bolezni, kakovostno vodenje bolnikov z astmo in KOPB, obravnava atopijskega dermatitisa, aken, keratoz, življenje s smrtonosno redko boleznijo, kronične bolezni, zdravstvena nega in delo diplomiranih medicinskih sester v ADM. 46. srečanje timov v osnovnem zdravstvu, 21. in 22. maja 2021. Ljubljana: Združenje zdravnikov družinske medicine; 2021. 129 p.
  4. Fisman DN, Abrutyn A, Spaude KA, Kim A, Kirchner A, Daley J. Prior pneumococcal vaccination is associated with reduced death, complications, and length of stay among hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(8):1093-101.
  5. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020.
  6. NIJZ. Priporočila za cepljenje otrok do 5. leta starosti s konjugiranimi pnevmokoknimi cepivi [Internet]. [updated 2015 March 25; cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje\\_s\\_konj\\_pnevmo\\_za\\_otroke\\_-\\_marec\\_2015.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje_s_konj_pnevmo_za_otroke_-_marec_2015.pdf).
  7. Cañero-Fonseca ET, Stawasz A, Johnson ST, Sato R, Bloom DE. The full benefits of adult pneumococcal vaccination: A systematic review. *PLoS one*. 2017;12(10):e0186903.
  8. Isturiz R1, Webber C. Prevention of adult pneumococcal pneumonia with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: CAPITA, the community-acquired pneumonia immunization trial in adults. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11: 1825-7.
  9. Kraicer-Melamed H, O'Donnell S, Quach C. The effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine 23 (PPV23) in the general population of 50 years of age and older: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2016;34(13):1540-50.
  10. Kawakami K, Kishino H, Kanazu S, Takahashi K, Iino T, Sawata M, et al. Time interval of revaccination with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine more than 5 years does not affect the immunogenicity and safety in the Japanese elderly. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(8):1931-8.
  11. Suzuki M, Gopal Dhoubhadal B, Ishifuji T, Yasunami M, Yaegashi M, Asoh N, et al. Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, test-negative design study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(3):313-21.
  12. Leventer-Roberts M, Feldman BS, Brufman I, Cohen-Stavi CJ, Hoshen M, Balicer RD. Effectiveness of 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Against Invasive Disease and Hospital-Treated Pneumonia Among People Aged  $\geq 65$  Years: A Retrospective Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2015 May; 60(10):1472-80.
  13. Tsai YH, Hsieh MJ, Chang CJ, Wen YW, Hu HC, Chao YN, et al. The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine is effective in elderly adults over 75 years old—Taiwan's PPV vaccination program. *Vaccine*. 2015;33(25):2897-902.
  14. Ochoa-Gondar O, Vila-Corcoles A, Rodriguez-Blanco T, Gomez-Bertomeu F. Effectiveness of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against community-acquired pneumonia in the general population aged  $\geq 60$  years: 3 years of follow-up in the CAPAMIS study. *Clin Infect Dis*. 2014;58(7):909-17.
  15. Hechter RC, Chao C, Jacobsen SJ, Slezak JM, Quinn VP, Van Den Eeden SK, et al. Clinical effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in men: California Men's Health Study. *Vaccine*. 2012;30(38):5625-30.
  16. NIJZ. Priporočila za cepljenje odraslih in otrok, starih 5 let in več, proti pnevmokoknim okužbam. [Internet]. [updated 2019 August 28; cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje\\_pnevmo\\_za\\_odrasle\\_in\\_otroke\\_nad\\_5\\_let\\_posodobljen\\_2019.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje_pnevmo_za_odrasle_in_otroke_nad_5_let_posodobljen_2019.pdf)
  17. NIJZ. Navodila za izvajanje Programa cepljenja in zaščite z zdravili za leto 2021. [Internet]. [cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/navodila\\_za\\_izvajanje\\_ip\\_2021.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/navodila_za_izvajanje_ip_2021.pdf)
  18. NIJZ. Priporočila za cepljenje in revakcinacijo s pnevmokoknim polisaharidnim cepivom. [Internet]. [updated 2021 December 16; cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje\\_in\\_revakcinacija\\_s\\_ppv\\_update\\_2021\\_cistopis.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/cepljenje_in_revakcinacija_s_ppv_update_2021_cistopis.pdf)
  19. Tomczyk S, Bennett NM, Stoecker C, Gierke R, Moore MR, Whitney CG, et al. Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged  $\geq 65$  years: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63:822-5.
  20. Matanock A, Lee G, Gierke R, Kobayashi M, Leidner A, Pilishvili T. Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Among Adults Aged  $\geq 65$  Years: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019;68:1069-75.
  21. Pečavar B, Lejko Zupanc T, Vodopivec Jamšek V, Osolnik K, Seme K. Izkustveno antibiotično zdravljenje doma pridobljene pljučnice pri odraslih v Sloveniji. In: Beović B, Lejko Zupanc T. Zbornik prispevkov: Infektološki simpozij 2017; Ljubljana, Slovenija. Ljubljana: Slovensko zdravniško društvo; 2017. 62 p.
  22. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017). *World Population Prospects: The 2017 Revision, Volume I: Comprehensive Tables (ST/ESA/SER.A/399)* [Internet]. New York: 2017 [cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un\\_2017\\_world\\_population\\_prospects-2017\\_revision\\_volume-i\\_comprehensive-tables.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un_2017_world_population_prospects-2017_revision_volume-i_comprehensive-tables.pdf)
  23. Jiang Y, Gauthier A, Annemans L, Van Der Linden M, Nicolas-Spony L, Bresse X. Cost-effectiveness of vaccinating adults with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) in Germany. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research. 2012;12(5):645-60.
  24. Jiang Y, Gauthier A, Keeping S, Carroll S. Cost-effectiveness of vaccinating the elderly and at-risk adults with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine or 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the UK. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. Dec 2014;14(6):913-27.
  25. Jiang Y, Gervais F, Gauthier A, Baptiste C, Martinon P, Bresse X. A comparative public health and budget impact analysis of

- pneumococcal vaccines: The French case. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(9):2188-97.
26. Sisk JE, Whang W, Butler JC, Sneller V-P, Whitney CG. Cost-effectiveness of vaccination against invasive pneumococcal disease among people 50 through 64 years of age: role of comorbid conditions and race. *Annals of internal medicine.* 2003;138(12):960-8.
  27. Mangen M-JJ, Rozenbaum MH, Huijts SM, van Werkhoven CH, Postma DF, Atwood M, et al. Cost-effectiveness of adult pneumococcal conjugate vaccination in the Netherlands. *European Respiratory Journal.* 2015;46(5):1407-16.
  28. des Portes V. Long-term follow-up of bacterial meningitis - sequels in children and adults: incidence, type, and assessment issues. *Med Mal Infect.* 2009 Jul-Aug;39(7-8):572-80.
  29. Distribution of reported IPD cases by clinical presentation and age group, EU/EEA countries, 2012. Cases per 100.000 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2015 [cited 2022 Aug 26]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-invasive-bacterial-diseases-europe-2012>
  30. National Institute of Public Health. Data on monitoring hospitalizations for 2019. (Data on 28 diagnosis). Ljubljana; 2021.
  31. Tong S, Amand C, Kieffer A, Kyaw MH. Trends in healthcare utilization and costs associated with pneumonia in the United States during 2008-2014. *BMC health services research.* Sep 14 2018;18(1):715.
  32. van Hoek AJ, Andrews N, Waight PA, Stowe J, Gates P, George R, et al. The effect of underlying clinical conditions on the risk of developing invasive pneumococcal disease in England. *Journal of Infection.* 2012;65(1):17-24.
  33. Wuerth BA, Bonnewell JP, Wiemken TL, Arnold FW. Trends in Pneumonia Mortality Rates and Hospitalizations by Organism, United States, 2002-2011(1). *Emerging infectious diseases.* Sep 2016;22(9):1624-7.
  34. Health and Helath Care. Data for 2019 [Internet]. Republic of Slovenia Statistical office [cited 2022 Aug 26]. Available from: <https://www.stat.si/StatWeb/en/Field/Index/10/117>
  35. Jit M. The risk of sequelae due to pneumococcal meningitis in high-income countries: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of infection.* Jul 2010;61(2):114-24.
  36. Falkenhorst G, Remschmidt C, Harder T, Hummers-Pradier E, Wichmann O, Bogdan C. Effectiveness of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) against pneumococcal disease in the elderly: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(1).
  37. Suzuki M, Dhoubhadel BG, Ishifuji T, Yasunami M, Yaegashi M, Asoh N, et al. Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, test-negative design study. *The Lancet infectious diseases.* 2017;17(3):313-21.
  38. Andrews NJ, Waight PA, George RC, Slack MP, Miller E. Impact and effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in the elderly in England and Wales. *Vaccine.* Nov 6 2012;30(48):6802-8.
  39. ZZZS. Akontativne cene. Priloga 1 k Splošnemu dogovoru [Internet]. [cited 2021 May]. Available from: [https://partner.zzzs.si/wps/portal/portali/aizv/zdravstvene\\_storitve/cene\\_%20za\\_izvajalce\\_zdr\\_storitve/cene\\_in\\_izhodisca\\_za\\_cene](https://partner.zzzs.si/wps/portal/portali/aizv/zdravstvene_storitve/cene_%20za_izvajalce_zdr_storitve/cene_in_izhodisca_za_cene).
  40. Ludwig E, Bonanni P, Rohde G, Saviner A, Torres A. The remaining challenges of pneumococcal disease in adults. *Eur Respir Rev.* 2012;21(123):57-65.
  41. Centralna baza zdravil. PNEUMOVAX 23 razt.za inj. brizga 0,5 ml 1x [Internet]. [cited 2022 Aug 26]. Available from: <http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/018382DF9ABAD194C12584380083B668?>
  42. ZZZS. Navodilo o beleženju in obračunavanju zdravstvenih storitev in izdanih materialov, Priloga 1,a: Šifranti za obračun Zavodu, Verzija 2020-9; Ljubljana, 2020 July 1.
  43. ZZZS. Sklep o določitvi mejnega razmerja stroškovne učinkovitosti [Internet]. [cited 2022 Aug 26]. Available from: [http://api.zzzs.si/ZZZS/info/egradiva.nsf/0/de161d25a238859cc1257c1d0026d7f9/\\$FILE/Podpisan%20sklep%20ICER.pdf](http://api.zzzs.si/ZZZS/info/egradiva.nsf/0/de161d25a238859cc1257c1d0026d7f9/$FILE/Podpisan%20sklep%20ICER.pdf).
  44. Hren R, Delgleize E. The importance of sensitivity analysis in assessing clinical and economic impact of national immunization programs: An example of Slovenia. Poster at the ISPOR 17th Annual European Congress, November 8-12, 2014, Amsterdam. *Value in Health* vol 17: A676, 2014.
  45. Hren R, Olbrecht J, Vidmar A, Plevnik Kapun A. Pharmacoeconomic evaluation of public procurement criteria in the national pneumococcal vaccine immunization program: Slovenia as a case study. Poster presentation at the ISPOR 21st Annual European Congress, Barcelona, November 10-14, 2018.
  46. Robert Koch-Institute. *Epidemiological Bulletin* [Internet]. Berlin: 2019 Aug 22 [cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/34\\_19.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/34_19.pdf?__blob=publicationFile).
  47. Perniciaro S, van der Linden M. Pneumococcal vaccine uptake and vaccine effectiveness in older adults with invasive pneumococcal disease in Germany: A retrospective cohort study. *The Lancet Regional Health Europe,* 2021;7
  48. Statens Serum Institute News. Pneumococcal vaccination programme for persons aged 65 years or more and for risk groups, 2020 No 14/16 – 2020. Available from: <https://en.ssi.dk/news/epi-news/2020/no-14---2020>. [Internet].
  49. Zeevat F, van der Schans J, Boersma WG, Boersma C, Postma MJ. Cost-effectiveness analysis on elderly pneumococcal vaccination in the Netherlands: Challenging the Dutch Health Council's advice. *Vaccine,* 2019;37(43).
  50. Zdravstveni svet. Zapisnik 11.seje Zdravstvenega sveta, 19.4.2022 [Internet]. [cited 2022 Aug 26]. Available from: [https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/ZBIRK/E/Zdravstveni-svet/zapisnik-11\\_2022-ZS.pdf](https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/ZBIRK/E/Zdravstveni-svet/zapisnik-11_2022-ZS.pdf).





# S POZNAVANJEM PREHRANSKIH VREDNOSTI ŽIVIL DO URAVNOTEŽENEGA PREHRANJEVANJA

## WITH KNOWLEDGE ABOUT FOOD NUTRITION VALUES TO A BALANCED DIET

AVTORICE / AUTHORS:

Jelka Dolinar, mag. farm.<sup>1</sup>

dr. Andrijana Tivadar, mag. farm.<sup>2</sup>

Ana Marija Gerbič, dipl. inž. živilstva in prehrane<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Strniševa cesta 45, 1231 Ljubljana

<sup>2</sup> Slovensko farmacevtsko društvo,  
Dunajska 184 A, Ljubljana

<sup>3</sup> Lamutova ulica 37, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: [jelkadolinar@cibus.si](mailto:jelkadolinar@cibus.si)

## 1 UVOD

Ozaveščenost ljudi o pomenu zdrave prehrane narašča in spodbujajo jo javne zdravstvene ustanove.

## POVZETEK

Izbira in priprava hrane je vsakodnevno opravilo slehernega gospodinjstva. Farmacevti kot interdisciplinarno usposobljeni zdravstveni delavci lahko ob poznavanju prehranskih vrednosti živil, prehranskih navad, zdravstvenega stanja in načina življenja posameznika ocenijo, ali je njegova prehrana uravnotežena ali pa je potreben dodaten vnos esencialnih hranil s prehranskimi dopolnili. V članku smo predstavili nekaj glavnih vzrokov za izgube hranil med pripravo živil za lastne potrebe in dejavnikov, ki vplivajo na biološko uporabnost hranil iz živil. Sestavili smo jedilnik z energijsko vrednostjo okoli 2000 kcal (kar ustreza 8368 kJ) in podatke o sestavi živil primerjali v petih različnih prehranskih podatkovnih zbirkah. Ugotavljali smo energijsko vrednost hrane, celokupno vsebnost makrohranil ter nekaterih mikrohranil glede na priporočene dnevne vnose, med katerimi smo izbrali šest mineralov in deset vitaminov. Rezultati se med podatkovnimi zbirkami razlikujejo, vseh pet zbirk pa kljub temu omogoča uporabno oceno prehranske vrednosti živil, ki je osnova za prehranska priporočila.

## KLJUČNE BESEDE:

makrohranila, mikrohranila, prehranska vrednost živil, prehranske podatkovne zbirke

## ABSTRACT

The selection and preparation of food is a daily task for every household. Pharmacists, interdisciplinary trained health professionals, can, based on food composition values, individual eating habits, health status, and lifestyle, assess whether an individual's diet is balanced or whether an additional food supplement intake is required. We present some of the main causes of potential nutrient losses in food during the preparation of food for its own use and the impact on the bioavailability of nutrients from food. We compiled a menu with an energy value of about 2000 kcal (i.e. 8368 kJ) and compared food composition values in five different national food databases. We determined the energy value of food, the total content of macronutrients, and some micronutrients, according to the recommended daily intake, from which we selected six minerals and ten vitamins. The results differ between databases,

but all five databases allow quite an usefull assessment of food nutrition values, which is the basis for dietary recommendations.

**KEY WORDS:**

food databases, food nutrition values, macronutrients, micronutrients

Na voljo je vedno več spletnih orodij, ki usmerjajo potrošnike, zelo velik pa je tudi vpliv oglaševanja. Ob vseh novih spoznanjih o vplivu hrane na zdravje narašča ponudba prehranskih dopolnil, ki večinoma vsebujejo enake sestavine, kot jih lahko dobimo tudi s hrano. Vzrokov za pomanjkanje hranil je veliko, eden od njih je tudi neustrezna prehrana.

Lekarniški farmacevt sodi med najbolj dostopne zdravstvene strokovnjake, ki je interdisciplinarno usposobljen, pozna vpliv učinkovin na zdravje človeka in lahko na podlagi prehranskih navad posameznika, njegovega zdravstvenega stanja in načina življenja oceni, ali je potreben dodaten vnos esencialnih hranil s prehranskimi dopolnili. Obiskovalci lekarn mu pri izbiri prehranskih dopolnil zaupajo, kar dokazuje raziskava Sekcije farmacevtov javnih lekarn pri SFD iz leta 2011 (1). Spletne oblike komunikacije z javnostjo lahko to zaupanje v prihodnje še okrepijo.

Evropska agencija za varnost hrane (EFSA, *European Food Safety Authority*) je na podlagi znanstvenih mnenj določila referenčne prehranske vrednosti za različne populacijske skupine, ki predstavljajo osnovo za prehranska priporočila (2). Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) je leta 2020 objavil posodobljena priporočila referenčnih vrednosti za energijski vnos in vnos hranil (3), ki so povzete po referenčnih vrednostih za vnos hranil D-A-CH. V evropskem prostoru je D-A-CH (D za *Deutschland*, A za *Austria* in CH za Švico, tj. *Confederatio Helvetica*) namreč referenčna institucija za določanje populacijskih priporočenih vrednosti za vnose hranil. Metode in orodja za oceno prehranskega vnosa ter prehranske referenčne vrednosti so podrobno predstavljene v knjigi *Minerali, vitamini in druge izbrane snovi*, prav tako tudi splošni podatki o zgradbi in pomenu nacionalnih podatkovnih zbirk o sestavi živil (4).

S člankom smo želeli opozoriti na nekatere dejavnike, na katere lahko vplivamo sami in tako poskrbimo za ustrezno preskrbljenost organizma z makro- in nekaterimi mikrohranili: izbira živil in ocena njihove prehranske vrednosti, priprava hrane za lastne potrebe in način prehranjevanja.

## 2 PODATKOVNE ZBIRKE O HRANILNI SESTAVI ŽIVIL

Seznam nacionalnih podatkovnih zbirk o hranilni sestavi živil iz držav EU in nekaterih drugih držav je objavljen na spletni strani Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO, *Food and Agriculture Organization*) (5).

Prehransko vrednost izbranih živil smo ocenili s pomočjo podatkov iz petih zbirk:

- danske zbirke FRIDA – *National Food Institute, Technical University of Denmark* (DTU) (6),
- ameriške USDA – *FoodData Central, U.S. Department of Agriculture* (7),
- francoske CIQUAL – *Observatory of Food, unit of ANSES, The French agency for food, environmental and occupational health safety* (8),
- nemške BLS – *Max Rubner Institut, Federal Research Centre for Nutrition and Food (BfEL), Federal Ministry of Food and Agriculture* (9), in
- slovenske OPKP – odprta platforma za klinično prehrano, Odsek za računalniške sisteme, Institut Jožef Stefan (10).

Zbirke imajo nekaj pomanjkljivosti, tudi očitnih napak pri navajanju vsebnosti mikrohranil, zato je smiselno podatke o istih živilih primerjati po različnih zbirkah. Odstopanja vsebnosti posameznih hranil v istih živilih smo ugotavljali celo v istih zbirkah. Med zbirkami so tudi razlike v terminologiji in v navajanju merskih enot, kar lahko nepazljivo uporabnike zavede in je razlog za večje napake pri izračunih energijske vrednosti in količine hranil v živilih. Nekatere podatke je bilo za namen primerjave potrebno preračunati. Francoska zbirka CIQUAL navaja podatke o vsebnostih retinola in beta-karotena ločeno, ne pa tudi celokupne vrednosti vitamina A v retinolnem ekvivalentu (RE), ki je osnovna enota za priporočene odmerke. Za vsebnost mikrohranil uporabljajo različne enote (ng, µg, mg). Nekatere zbirke navajajo razpoložljive (prebavljive) ogljikove hidrate, ki ne vključujejo vlaknin, druge skupaj z vlakninami. Podatek je pomemben pri preračunavanju deleža energijske vrednosti, ki jo prispevajo ogljikovi hidrati. V primerih, ko v zbirki ni podatka o določenem hranilu, to še ne pomeni nujno, da živilo hranila ne vsebuje. Npr. v zbirki CIQUAL smo našli nekaj živil (čebula, kis, mandlji), pri katerih ni navedene energijske vrednosti. Upravljalci zbirke podatkov o energiji ne preračunavajo, ko predvidevajo, da so v živilih prisotni poliol in/ali organske kisline, ki pa jih niso dokazali s kvantitativno analizo. V takih primerih smo vnesli pov-



prečno vrednost podatkov iz ostalih zbirk, sicer bi rezultati preveč odstopali.

V zbirkah smo iskali enaka ali vsaj čim bolj primerljiva živila, kar ni bilo vedno mogoče. Tako npr. CIQUAL ne vsebuje podatkov o kruhu iz 100-odstotne ržene moke, zato smo pri izračunu upoštevali ržen kruh z dodano pšenično moko. V ameriški zbirki smo izbirali živila (kruh, ovseni kosmiči, jabolčni sok), ki so posebej označena, da niso obogatena z minerali in vitamini in ne vsebujejo dodanih sladkorjev.

### ALI STE VEDELI?

- Energijo živil preračunavajo glede na vsebnosti maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov, vlaknin, poliolov, organskih kislin in alkohola po dogovorjenih faktorjih:
  - 37 kJ/g (9 kcal/g) maščobe
  - 17 kJ/g (4 kcal/g) beljakovine
  - 17 kJ/g (4 kcal/g) ogljikovi hidrati
  - 8 kJ/g (2 kcal/g) vlaknine
  - 10 kJ/g (2,4 kcal/g) poliolov
  - 13 kJ/g (3 kcal/g) organske kisline
  - 29 kJ/g (7 kcal/g) alkohol

## 3 IZGUBE MIKROHRANIL PRI PRIPRAVI HRANE ZA LASTNE POTREBE

Vsebnost makro- in mikrohranil je osnova za prehransko vrednost živil, ki je odvisna od številnih dejavnikov, na katere, razen pri pripravi živil za posamezne obroke, potrošniki nimamo vpliva. Količina mikrohranil, predvsem vitaminov, ki jih živilo ohrani oz. se iz živila izgublja, je odvisna od načina predelave, transporta in skladiščenja. Zmanjšanje vsebnosti pospeši segrevanje, prisotnost zraka, svetlobe, mikrobov in nekaterih mineralov, zlasti železa in bakra, na zmanjšanje vsebnosti pa vpliva tudi medsebojno delovanje s snovmi, ki so naravno prisotne v živilih (encimi, sulfiti, nitriti). Med predelavo živil oz. pripravo hrane se ohrani več mineralov (okoli 90 %) kot vitaminov. Pri kuhanju in dušenju ostanejo minerali v mediju, v katerem smo živilo pripravljali. Izgube vitaminov, zlasti vodotopnih, so večje in so odvisne od načina priprave hrane. Navajamo nekaj primerov: Z zamrzovanjem sadje izgubi okoli 30 % vitamina C, s sušenjem 80 %. Veliko je podatkov o krompirju. Za 20 % se zniža vsebnost vitamina C, če mlad krompir pečemo v olupku, za 25 %, če ga skuhamo v olupku, kuhan star krompir pa

vsebuje najmanj, le 25 % prvotne količine vitamina C. Vsebnost nekaterih vitaminov skupine B se zmanjša za polovico pri toplotni obdelavi mesa, rib in stročnic (med 30 in 60 %). Padeč je sorazmeren s trajanjem toplotne obdelave. Bolj stabilen je npr. vitamin B<sub>12</sub> (kobalamin). Pri kratkotrajni toplotni obdelavi mesa se vsebnost vitamina B<sub>12</sub> zniža od 10 do največ 40 % (11, 12). Stabilnost vitamina B<sub>3</sub> (niacin), vitamina B<sub>6</sub> (piridoksin), pantotenske kisline (vitamin B<sub>5</sub>), folatov (vitamin B<sub>9</sub>) in vitamina B<sub>12</sub> (kobalamin) v živilih je večja kot vitaminov, ki so občutljivi na oksidacijo (maščobotopni vitamini A, D in E ter vodotopni vitamin C, vitamin B<sub>1</sub> (tiamin), vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin) in vitamin B<sub>7</sub> (biotin)) (14, 15).

V novejši raziskavi iz leta 2017 so analizirali vsebnost vitaminov C, E, A in K v termično obdelani zelenjavi v vodi in ugotovili, da so izgube vitaminov zelo odvisne od vrste zelenjave in termičnega postopka. V večini primerov se je pri kuhanju izgubilo manj maščobotopnih vitaminov kot vodotopnega vitamina C. Njegova vsebnost se je zmanjšala za od 8,9 % do 100 %. Izgube vitamina C so bile najmanjše pri brokoliju. Na splošno se pri kuhanju brokolija in druge zelenjave v vodi izgubi več vitamina C kot pri kuhanju v sopari. Največ vitamina C, celo več kot 90 %, se je ohranilo v špinači, korenju, sladkem krompirju in brokoliju pri kuhanju v majhni količini vode v mikrovalovni pečici (13).

Kljub temu, da velja ocvrta hrana za manj priporočeno (velika energijska gostota, vsebuje več trans-maščobnih kislin), ima cvrtje tudi določene prednosti pred drugimi termičnimi postopki. Pri cvrtju v olju s temperaturo 180 °C se namreč temperatura v notranjosti živila ni dvignila nad 100 °C, zato se vsebnost termolabilnih snovi ni bistveno zmanjšala, vodotopna mikrohranila se niso izločila v olje, izgube mineralov so bile manjše od 10 %, manjše so bile tudi izgube tiamina (vitamin B<sub>1</sub>) in vitamina C (16).

## 4 ABSORPCIJA MAKRO- IN MIKROHRANIL IZ HRANE

Biološko uporabnost mikrohranil pogosto definiramo kot delež zaužitega mikrohranila, ki je v organizmu na razpolago za fiziološke procese (4). Biološka uporabnost mikrohranil iz živil je med drugim odvisna od vrste živila, načina priprave, prebavljivosti in interakcij med hranili. Pri tem imajo zelo pomembno vlogo snovi v živilih, ki spodbujajo ali zavirajo prebavo in absorpcijo hranil. Pri biološki uporabnosti mineralov navajajo, da je pogosto fiziološki status posameznika (starost, fiziološko stanje prebavil, nosečnost, gi-

bljivost prebavil, prirojene okvare ...) pomembnejši kot živilski vir (17). V tem prispevku smo izpostavili le absorpcijo nekaterih hranil iz živil, na katero lahko tudi sami vplivamo z ustrezno pripravo hrane ali kombinacijo živil.

Med makrohranili imajo beljakovine posebno mesto glede na fiziološki pomen za človeka, saj omogočajo tvorbo lastnih beljakovin. Pri tem ni pomemben le zadosten vnos beljakovin, pač pa tudi kakovost. Prebava beljakovin se začne že v ustih s solubilizacijo, nadaljuje s proteolizo v želodcu, kjer klorovodikova kislina in encimi razgradijo velike molekule beljakovin na manjše peptide, in zaključi v tankem črevesju s sproščanjem aminokislin, di- in tripeptidov. Prebavljivost beljakovin v živilih živalskega izvora izboljša toplotna obdelava, ker visoka temperatura uniči inhibitorje proteaz, poleg tega denaturirane beljakovine lažje hidrolizirajo v gastrointestinalnem traktu. Eden izmed parametrov, s katerimi lahko primerjamo kakovost beljakovin, je PD-CAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*), indikator kakovosti beljakovin, ki ga uporabljamo pri oceni sposobnosti beljakovine, da doseže telesne potrebe po aminokislinah (18). Beljakovine živalskega izvora (mleko, jajca, meso) imajo najvišji PD-CAAS, ocenjen je na najmanj 1, z njimi so med beljakovinami rastlinskega izvora primerljive le sojine. PD-CAAS za fižol je ocenjen na 0,7–0,75, za žita 0,5–0,65. Problematične so tri aminokislina – stročnice vsebujejo malo metionina in cisteina, žita malo lizina. PD-CAAS < 1 pomeni, da je v živilu omejena količina najmanj ene aminokislina (19, 20).

Absorpcija aminokislin iz gastrointestinalnega trakta je odvisna od fizioloških lastnosti posameznika, kemijske oblike razgrajenih aminokislin v tankem črevesju ter prisotnosti snovi, ki jih zaužijemo s hrano in lahko ovirajo tako razgradnjo beljakovin kot tudi absorpcijo aminokislin. To so antinutritivni dejavniki, med katere uvrščamo fitate, fenole, saponine, polifenole, npr. tanine, glukozinolate ter encimske zaviralce, in jih vsebujejo ovojnice semen žit, stročnic in oreščkov, nekaj pa tudi zeleni deli rastlin in sadje. V prebavnem traktu tvorijo neaktivne komplekse z beljakovinami in minerali, s proteazami in amilazami ter tako zmanjšajo absorpcijo (18, 21).

Učinek antinutritivnih dejavnikov izničimo oz. zmanjšamo npr. s kuhanjem, namakanjem, fermentacijo in nakaljevanjem živil. S tem izboljšamo tako absorpcijo mineralov kot prebavljivost beljakovin in absorpcijo aminokislin (21).

Primer slabe prakse je vsakodnevno uživanje jogurta z ovsenimi kosmiči, ki jih prej nismo namakali, kar so dokazali v poljski študiji. Potem ko so v jogurt ali mleko dodajali ovsene kosmiče, se je bistveno zmanjšala količina prostega kalcija med prebavo *in vitro* (22). Drug primer slabe prakse je sočasno uživanje mesa in pravega čaja, vina ali kave, ki

vsebujejo polifenole, ti pa zmanjšajo absorpcijo železa in drugih mineralov (23).

Vpliv interakcij med makro- in mikrohranili ni zanemarljiv. Beljakovine iz mleka, jajčnega beljaka in soje zmanjšajo absorpcijo železa, medtem ko jo beljakovine iz mesa, perutnine in rib izboljšajo. 30 g mišičnega tkiva je enako povečalo absorpcijo železa kot 25 mg askorbinske kisline (23). Živalske beljakovine izboljšajo tudi absorpcijo cinka (17).

Vitaminski in mineralni so v živilskem matriksu vezani v različnih kemijskih oblikah, kar vpliva na njihovo biološko uporabnost. Absorpcija železa se giblje med 14–18 % iz živil rastlinskega in živalskega izvora in 5–12 % iz živil izključno rastlinskega izvora (23). Železo vsebuje skoraj vsako živilo, organizem ga lažje izkoristi iz živil živalskega izvora, v našem primeru iz jajca in piščančjega mesa, kjer je vezano v hemski obliki. Absorpcija niacina znaša med 23 in 70 %, manjša je iz žit in večja iz živil živalskega izvora (24). Absorpcija retinola iz živalske hrane je zelo visoka, med 70 in 90 %, medtem ko je absorpcija beta-karotenov iz rastlinske hrane med 5 in 65 %, večja je iz kuhanih živil in v kombinaciji z mastno hrano (25). Absorpcija vitamina E variira od 10 do 79 %. Nanjo vplivajo številni dejavniki, ki še niso v celoti raziskani: genetika, prisotnost maščob in drugih maščobotopnih vitaminov ter nekaterih proteinov (26, 27). Absorpcija vitamina B<sub>12</sub> je večja od 50 %, celo do 89 % iz ovčetine in piščančjega mesa (28, 29), iz jajc 13,2 do 57,7 % (30). Absorpcija vitamina B<sub>12</sub> je manjša iz živil, ki vsebujejo velike količine tega vitamina (npr. iz jeter) (28, 29). Podobno velja tudi za nekatere druge vitamine. Čeprav se zelo dobro absorbirajo (tiamin v 95 %, vitamin C v 80–90 %), pa jih organizem lahko izkoristi le v omejenem obsegu.

## 5 ANALIZA JEDILNIKA

Sestavili in analizirali smo jedilnik, ki vsebuje dostopna, pogosto uporabljena živila v slovenski kuhinji, s katerimi zagotovimo okoli 2000 kcal (8368 kJ) energije, nismo pa sledili kuharskim receptom. Odločili smo se za omejen izbor živil in ocenjevali njihovo prehransko vrednost s ciljem, da se čim bolj približamo priporočenim dnevnim vnosom makro- in mikrohranil. Doseganje referenčnih vrednosti za posamezno hranilo glede na populacijsko skupino v krajšem časovnem obdobju (1–2 tedna, ne pa vsak dan posebej) je osnova za uravnoteženo prehranjevanje. Zaradi boljše absorpcije hranil pa je priporočljivo, da je vnos ča-



sovno čim bolj enakomerno porazdeljen. V preglednici 1 navajamo seznam in količine živil, ki smo jih vključili v jedilnik, v preglednici 2 pa celokupno hranilno vrednost, ki smo jo izračunali na podlagi podatkov iz posameznih zbirk.

Primer dnevnega jedilnika, ki ga lahko pripravimo z živili iz preglednice 1:

ZAJTRK:

- Navaden jogurt z ovsenimi kosmiči, žlica mandljev
- Palačinka z marmelado
- Jabolko

KOSILO:

- Piščančji file na žaru
- Kuhana ječmenova kaša s cvetačo in korenjem
- Paradižnikova solata s čebulo, olivnim oljem in kisom
- Kos rženega kruha
- Grozdje
- Jabolčni sok

VEČERJA:

- Kos belega kruha s sirom
- Solata endivija s krompirjem, sončničnim oljem in kisom

Razvoj programske opreme omogoča številne rešitve za ugotavljanje prehranskega vnosa z živili. Mnoge med njimi so prosto dostopne v obliki spletnih aplikacij, vendar se niso izkazale kot optimalne za vrednotenje prehranskega vnosa (31). Ključnega pomena za ustrezno vrednotenje prehranskega vnosa so podatki o hranilni sestavi živil, ki jih uporabljajo programska orodja.

## 5.1 OCENA VSEBNOSTI MAKROHRANIL

Slovenske nacionalne smernice *Referenčne vrednosti za energijski vnos ter vnosa hranil* (3) priporočajo dnevne vnose beljakovin v g/kg telesne mase, za odrasle 0,8 g/kg/dan. Enako vrednost predlaga EFSA. Slovenske smernice priporočajo orientacijske dnevne vrednosti za maščobe in ogljikove hidrate. Z maščobami naj bi odrasli pokrili 30 % energije, z ogljikovimi hidrati pa več kot 50 %; EFSA predlaga 45–60 %. Ta razmerja se med populacijskimi skupinami razlikujejo, na potrebe po hranilih pa vpliva tudi raven telesne dejavnosti.

Slovenci v različnih starostnih skupinah (od 1 do 74 let) pokrijejo 15–19 % energije z beljakovinami, 29–34 % energije z maščobami in 45–55 % z ogljikovimi hidrati (32). Podobna je tudi struktura energijskega vnosa po našem jedilniku (slika 1).

EFSA določa potrebe po beljakovinah na osnovi dušikovega ravnovesja, ki je doseženo, ko sta vnos dušika z beljakovi-

*Preglednica 1: Seznam živil, izbranih za analizo hranilne vrednosti, in količina živila za celodnevni jedilnik z energijsko vrednostjo okoli 2000 kcal (8368 kJ).*

*Table 1: List of foods selected for nutritional analysis and the amount of food for a daily menu with an energy value of about 2000 kcal (8368 kJ).*

Živilo	Masa [g]
Cvetača	50
Čebula	20
Grozdje	50
Jabolka	150
Jajce (kokošje, celo)	50
Ječmen	50
Jogurt (1,5 % maščobe)	150
Kis	20
Korenje	50
Krompir (kuhan v olupku)	150
Kruh (bel, iz pšenične moke)	100
Kruh (ržen)	50
Mandlji	10
Marmelada (50 % sladkorja)	15
Mleko (3,5 % maščobe)	30
Moka (pšenična bela, tip 550)	20
Olje (olivno, deviško)	15
Olje (sončnično)	15
Ovseni kosmiči	20
Paradižnik (rdeč )	100
Piščančja prsa (brez kosti in kože)	120
Sir (poltrdi, 45 % maščobe)	50
Sok (jabolčni, 100 %)	300
Solata endivija	200

nami iz hrane in eliminacija dušika izenačena. Povprečne dnevne potrebe odraslega zdravega človeka znašajo 105 mg dušika/kg telesne mase (0,66 g beljakovin/kg/dan). Na tej osnovi je EFSA določila populacijski referenčni vnos 0,83 g beljakovin/kg telesne mase/dan, kar zadošča za okoli 10 % energije. EFSA ob tem izpostavlja polnovredne beljakovine s PDCAAS = 1 oz. 100 %. Beljakovine v živilih z našega seznama prispevajo med 16 in 17 % energije (od tega je delež beljakovin živalskega izvora 60 %, beljakovin rastlinskega izvora pa 40 %). Pri vnosih beljakovin, ki pokrijejo do 35 % energije, ni podatkov o škodljivih stranskih učinkih. Kljub temu EFSA predlaga, da zgornja meja vnosa beljakovin ne presega dvakratnika priporočenega populacijskega referenčnega vnosa beljakovin (19).

Preglednica 2: Celokupna hranilna vrednost živil iz preglednice 1, ki smo jo izračunali na podlagi podatkov iz petih različnih zbirk o hranilni sestavi živil.  
Table 2: Total nutritional value of foods listed in Table 1, calculated based on data from five different food databases.

Energijska in hranilna sestava živil	Merske enote	Cijani vnos energije	USDA	FRIDA	CIQUAL	BLS	OPKP
Energija	kJ (kcal)	8368 (2000)	9100 (2175)	8477 (2026)	8531 (2039)	8309 (1986)	8498 (2031)
Makrohranila	Merske enote	Priporočeni orientacijski dnevni vnos makrohranil	USDA	FRIDA	CIQUAL	BLS	OPKP
Beljakovine	g (% E)	0,8 g/kg/dan	92,86	81,62	86,72	84,84	84,08
Maščobe	g (% E)	30 % E	67,21	73,12	68,18	65,43	67,12
Ogljikovi hidrati	g (% E)	>50 % E	300	244,2	248,91	241,1	269,06
Vlaknine	g (% E)	najmanj 30 g	34,37	33,97	36,43	29,71	26,75
Sladkorji	g (% E)	/	84,71	80,44	83,52	93,82	82,30
Mikrohranila	Merske enote	PDV mikrohranil	% PDV	% PDV	% PDV	% PDV	% PDV
Kalij	mg	2000	3840	3536,85	3859	3647,4	3928,87
Kalcij	mg	800	1001,79	1076,93	924,35	1028,95	1096,66
Magnezij	mg	375	369,2	321	86	345,05	369,83
Fosfor	mg	700	1558,1	1462,53	209	1499,7	1519,63
Železo	mg	14	11,4	10,29	74	13,18	19,24
Cink	mg	10	11,57	9,86	99	10,71	10,10
Vitamin A	µg	800	884	926	116	1872	1643,47
Vitamin D	µg	5	1,76	2,04	41	2,19	1,39
Vitamin E	mg	12	15,3	128	135	22,26	20,50
Vitamin C	mg	80	86,75	107,83	135	121,38	88,24
Vitamin B <sub>1</sub> (tiamin)	mg	1,1	1,53	1,23	112	1,27	1,63
Vitamin B <sub>2</sub> (riboflavin)	mg	1,4	1,89	1,52	108	1,21	1,87
Vitamin B <sub>3</sub> (niacin)	mg	16	22,57	19,75	123	22,54	31,77
Vitamin B <sub>6</sub> (piridoksin)	mg	1,4	2,38	1,89	135	1,97	2,68
Vitamin B <sub>9</sub> (folna kislina)*	µg	200	303,45	384,90	192	311,85	345,28
Vitamin B <sub>12</sub> (kobalamin)	µg	2,5	2,49	2,26	90	3,13	2,30

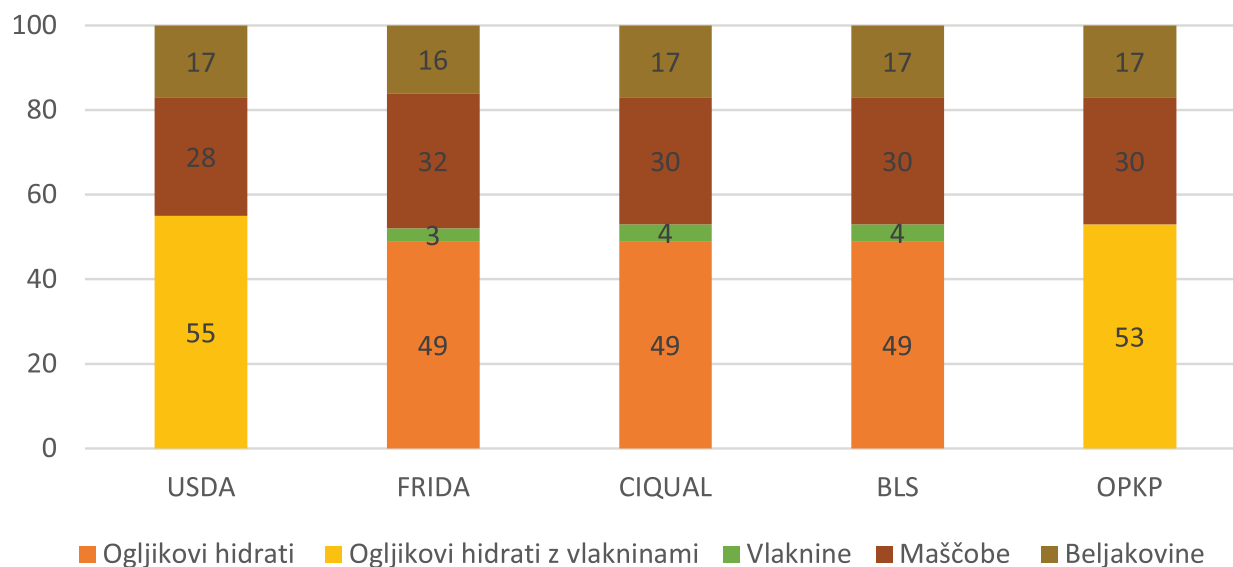
Priporočeni orientacijski dnevni vnos: za beljakovine v g/kg/dan, za maščobe, ogljikove hidrate in vlaknine so podane orientacijske vrednosti (3)

PDV – priporočeni dnevni vnos: vitaminov in mineralov, ki se lahko navajajo (40)

Podatki, označeni z rdečo, prikazujejo rezultate, ki so manjši od 100 % PDV.

\*Vrednost folne kisline je preračunana iz folatov, ki jih vsebujejo živila z jedilnika (1 µg folata iz hrane = 0,6 µg folne kisline)





**Slika 1:** Delež energijskega vnosa (% energije), ki ga prispevajo posamezna makrohranila, glede na rezultate analize jedilnika po petih zbirkah.  
**Figure 1:** Percentage of energy intake (% energy) from individual macronutrients according to the results of the analysis of the menu by five databases.

Ustrezen vnos beljakovin vse pogosteje določajo glede na telesno maso posameznikov in starost. Raziskava PRO-AGE iz leta 2013 priporoča za starostnike nad 65 let višje vnose beljakovin, in sicer 1,2 g/kg oz. celo do 1,5 g/kg, če imajo starostniki resnejše bolezni, izjema so le bolniki s hujšo ledvično okvaro (33).

V našem jedilniku je energijski delež maščob med 28 % energije po USDA in 32 % po FRIDA, kar lahko ocenimo kot primerno. Če je delež maščob nižji od 20 % energije, se že pojavi nevarnost nezadostnega vnosa maščobotopnih vitaminov (34).

Energijski delež ogljikovih hidratov skupaj z vlakninami znaša od 52 % (49 % prebavljivi ogljikovi hidrati in 3 % vlaknine) po FRIDA do 55 % po USDA. Zaradi pomanjkanja dokazov EFSA ne predlaga zgornje meje vnosa celokupnih sladkorjev, izpostavlja pa, da vnos sladkorjev, večji od 20 % energije, povečuje možnost razvoja hiperlipidemije, vnos več kot 25 % energije pa vodi v sladkorno bolezen tipa 2 (35). Največji delež sladkorjev z našega seznama vsebujejo živila po podatkih iz zbirke BLS, in sicer 19 % energije, po vseh ostalih zbirkah je vsebnosti sladkorjev okoli 16 % energije. Odrasla slovenska populacija s sladkorji pokrije med 14–17 % energije (32).

Vse večji pomen za ohranjanje zdravja pripisujemo vlakninam. Vlaknine v prebavnem traktu ne hidrolizirajo, se

ne absorbirajo in vstopijo v debelo črevo nespremenjene. Tam pod vplivom mikrobiote steče proces anaerobnega vrenja, pri katerem se sproščajo propionati in acetati, ki se absorbirajo in prispevajo nekaj energije, zato vlakninam pripisujejo 8 kJ (2 kcal)/g. Pomembnejša kot sama energijska vrednost pa je vloga vlaknin pri regulaciji prebave, vplivajo na presnovo holesterola in sladkorjev, varovale naj bi pred razvojem raka debelega črevesa in danke (35).

Pri večini prebivalcev EU in Slovenije je povprečen dnevni vnos vlaknin manjši od priporočenega, v odrasli populaciji med 19,5 in 22,4 g (36). Živila s seznama vsebujejo več vlaknin, med 26,75 g vlaknin po OPKP, do največ 36,43 g po CIQUAL, ki jih prispevajo štiri različna žita (pšenica, oves, rž, ječmen), mandlji, sadje in zelenjava. Smernice NIJZ *Referenčne vrednosti za energijski vnos in vnos hranil* priporočajo vsaj 30 g vlaknin/dan. EFSA navaja, da vnosi vlaknin, ki so večji od 25 g/dan, zmanjšujejo tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni, sladkorne bolezni tipa 2 in olajšajo vzdrževanje telesne mase (35).

## 5.2 OCENA VSEBNOSTI MIKROHRANIL

Med mikrohranili najbolj odstopata glede na PDV vitamin D in železo. V vseh petih zbirkah so vrednosti vitamina D

izrazito nižje od PDV (med 28 % PDV po OPKP in 62 % PDV po CIQUAL).

Študije pri nas in v svetu kažejo, da je preskrbljenost organizma z vitaminom D nezadostna. Pomanjkanje vitamina D je največje v zimskih mesecih, ko ni endogene sinteze vitamina D, in pri ljudeh, ki niso dovolj časa izpostavljeni sončnim žarkom, predvsem starostnikov (37). Vnos vitamina D s hrano pri prebivalcih Slovenije se giblje med 2,5–3,2 µg na dan v vseh starostnih skupinah (38); naš jedilnik je vseboval med 1,39 in 3,09 µg vitamina D. Da bi dosegli priporočeno serumsko koncentracijo vitamina D v odsotnosti endogene sinteze, bi potrebovali 20 µg vitamina D na dan (3). Zdrav način življenja (gibanje v naravi, zmerno izpostavljanje sončnim žarkom, ustrezna telesna masa) bistveno vplivajo na preskrbljenost organizma z vitaminom D, pomembna pa je tudi hrana. Tako npr. pri Inuitih iz ZDA opažajo manjšo preskrbljenost z vitaminom D, odkar so spremenili način prehranjevanja, ki je tradicionalno vsebovalo veliko rib. Po drugi strani se je stanje preskrbljenosti z vitaminom D na Finskem izboljšalo, odkar mlečne izdelke bogatijo z vitaminom D (39). 30 µg vitamina D vsebuje 100 g surovega divjega lososa, 100 g jegulje, 18,7 µg vitamina D pa vsebuje 100 g gojene postrvi (7). Poleg tega z ribami zelo povečamo vnos nenasičenih maščobnih kislin omega-3.

Vsebnost vitamina B<sub>12</sub> je nekoliko nižja od PDV po podatkih treh zbirk, vsebnost B<sub>2</sub> je prenizka samo po podatkih BLS. Najnižja je vsebnost vitamina B<sub>12</sub> po podatkih FRIDA (90 % PDV), najvišja po BLS (125 % PDV). Kljub nižjemu % PDV lahko vsebnost vitamina B<sub>12</sub> ocenimo kot primerno. Absorpcija vitamina B<sub>12</sub> iz piščančjega mesa je namreč zelo dobra in dosega 89 % (28, 29).

Po podatkih OPKP je vnos železa bistveno višji od priporočenega, 137 % PDV, medtem ko je po FRIDA le 74 % PDV. Na našem seznamu vsebujejo največ železa ječmen, ovseni kosmiči in mandlji. Nekoliko nižja od priporočenih vrednosti je po vseh zbirkah vsebnost magnezija, med 86 in 99 % PDV.

### 5.3 PRIMERLJIVOSTI PODATKOV IZ IZBRANIH PODATKOVNIH ZBIK O HRANILNI SESTAVI ŽIVIL

Vsebnost hranil v posameznih živilih se razlikuje predvsem pri mikrohranilih, manj pri makrohranilih. Na našem seznamu živil je največja razlika v vsebnosti niacina (vitamin B<sub>3</sub>) v jogurtu. Po OPKP je vsebnost med 20- in 30-krat večja kot v ostalih zbirkah. Po CIQUAL je vsebnost vitamina C v cvetači med 10- do 20-krat nižja, kot v ostalih zbirkah. Večina pa so te razlike manjše, za faktor 1,3 do 3.

Primerljivost podatkov po zbirkah smo ugotavljali z odstopanji od srednje vrednosti (preglednica 3). Odstopanje ni v nobenem primeru preseglo 50 % in le v šestih primerih, ki so v tabeli označeni z rdečo, je preseglo 30 %.

Izračunana energijska vrednost živil je po vseh petih zbirkah zelo primerljiva, odstopanje od srednje vrednosti znaša med +6 % in -3 %.

Med makrohranili od srednje vrednosti najbolj odstopajo ogljikovi hidrati, med +15 % po USDA in -8 % po BLS. Odstopanje bi bilo manjše, če bi vse zbirke enako navajale celokupno količino ogljikovih hidratov, z oz. brez vlaknin. Vrednosti za same vlaknine odstopajo med +13 % in -17 %. Odstopanja od srednjih vrednosti beljakovin in maščob so manjša, od +8 % do -5 %.

Podatki o vsebnosti mikrohranil se veliko bolj razlikujejo kot pri makrohranilih. Od srednje vrednosti najbolj odstopajo vrednosti za vitamin D, vitamin A, niacin in železo. Odstopanje vsebnosti vitamina D od srednje vrednosti se giblje med -34 % po OPKP do +48 % po CIQUAL. Ugotovili smo veliko razliko v vrednosti retinolnega ekvivalenta (interval odstopanja med +46 % po BLS in -31 % po USDA). Domnevamo, da upravljavci zbirk uporabljajo različne faktorje preračunavanja aktivnosti beta-karotenov in drugih karotenoidov v retinolne ekvivalente, čeprav te faktorje določajo EFSA in drugi viri (1 RE = 1 µg retinola = 6 µg beta-karotena = 12 µg drugih karotenoidov). Dejstvo je, da so vsebnosti karotena in karotenoidov v istem živilu lahko zelo podobne, navedene vrednosti RE v zbirkah pa se razlikujejo za faktor 2.

Podatki o vsebnosti niacina odstopajo za 35 % od srednje vrednosti po OPKP. Predvidevamo, da zbirka OPKP navaja vsebnost niacina kot ekvivalent.

Odstopanje vsebnosti mineralov od srednje vrednosti je enako oz. manjše od 10 %, razen pri železu, interval odstopanja od srednje vrednosti se giblje med +49 % po OPKP in -21 % po FRIDA. Po podatkih OKPK vsebujejo nekatera živila z našega seznama (kruh, kuhan krompir, piščančja prsa, solata ...) do 3,5-krat več železa v primerjavi s podatki v preostalih štirih zbirkah.

## 6 SKLEP

Analiza našega jedilnika s pomočjo podatkov v petih zbirkah je pokazala majhna odstopanja od srednje vrednosti energije in količine makrohranil, večje je bilo odstopanje





Preglednica 3: Odstotek (%) odstopanja od srednje vrednosti po petih zbirkah o hranilni sestavi živil.

Table 3: Percentage (%) of deviation from the average value according to five food databases.

Energija in makro- ter mikrohranila	Srednja vrednost	% odstopanja USDA	% odstopanja FRIDA	% odstopanja CIQUAL	% odstopanja BLS	% odstopanja OPKP
Energija	2052 Kcal	6	-1	-1	-3	-1
Beljakovine	86 g	8	-5	1	-1	-2
Maščobe	68 g	-1	7	0	-4	-2
Ogljikovi hidrati	261 g	15	-6	-5	-8	3
Sladkorji	85 g	0	-5	-2	10	-3
Vlaknine	32 g	7	5	13	-8	-17
Kalij	3762 mg	2	-6	3	-3	4
Kalcij	1026 mg	-2	5	-10	0	7
Magnezij	351 mg	5	-9	0	-2	5
Fosfor	1527 mg	2	-4	-2	4	0
Železo	13 mg	-12	-21	-18	2	49
Cink	10 mg	11	-6	-4	2	-3
Vitamin A	1279 µg	-31	-28	-16	46	28
Vitamin D	2,1 µg	-16	-3	48	5	-34
Vitamin E	19 mg	-17	-12	-1	20	11
Vitamin C	100 mg	-13	8	-4	21	-12
Vitamin B <sub>1</sub> (tiamin)	1,4 mg	11	-11	-9	-8	18
Vitamin B <sub>2</sub> (riboflavin)	1,6 mg	19	-4	-10	-24	18
Vitamin B <sub>3</sub> (niacin)	24 mg	-4	-16	-10	-4	35
Vitamin B <sub>6</sub> (pridoksin)	2,2 mg	10	-13	-11	-9	24
Vitamin B <sub>9</sub> (folna kislina)	341 µg	-11	13	6	-9	1
Vitamin B <sub>12</sub> (kobalamin)	2,5 µg	0	-9	-8	25	-8

Podatki, označeni z rdečo, prikazujejo rezultate, kjer je bilo odstopanje večje kot (±) 30 %.

vrednosti za mikrohranila. Najbolj so odstopale vrednosti po OPKP, vendar je bil vzorec živil premajhen, da bi na podlagi teh rezultatov lahko ocenili posamezno zbirko. Za oceno posamezne zbirke bi bilo potrebno analizirati večji vzorec živil.

Kljub veliki variabilnosti podatkov o prehranski vrednosti živil in težko merljivi biološki uporabnosti hranil pa izračunan % PDV po vseh petih zbirkah daje dobro podlago za oceno prehranskega vnosa, kar lahko uporabimo za izboljšanje prehranskih navad, optimizacijo vnosa hranil skladno s priporočili NIJZ ter ocenimo, kdaj in za koga bi bilo uživanje prehranskih dopolnil smiselno.

## 7 LITERATURA

1. Pisk N, Pal M, Pavšar H. Raziskava javnega mnenja prebivalcev Slovenije o izdelkih za samozdravljenje ter načinu informiranja glede njihove uporabe. *Farm Vestn* 2011;62:184-190.
2. European Food Safety Authority (EFSA). *Dietary Reference Values for nutrients Summary report EFSA Supporting publication. December 2017, e15121*. [Internet] EFSA [updated 2019 Sept 23] [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/dietary-reference-values>

3. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Referenčne vrednosti za energijski vnos ter vnos hranil [Internet]. Dopolnjena izdaja NIJZ 2020. [cited 2022 Feb 1]. Available from: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/referencne\\_vrednosti\\_2020\\_3\\_2.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/referencne_vrednosti_2020_3_2.pdf)
4. Peterlin Mašič L, Obreza A, Vovk T (uredniki). Minerali, vitamini in druge izbrane snovi. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2020.
5. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet] International Network of Food Data Systems (INFOODS) [cited 2022 Feb 1]. Available from: (<https://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/europe/en/>).
6. Zbirka podatkov FRIDA [Internet] National Food Institute, Technical University of Denmark (DTU) [updated 2022 June 15] [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://frida.fooddata.dk/>
7. Zbirka podatkov USDA [Internet]. FoodData Central, U.S. Department of Agriculture [updated 2022 April 28] [cited 2022 June 20]. Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/>.
8. Zbirka podatkov CIQUAL [Internet]. Observatory of Food, unit of ANSES, The French agency for food, environmental and occupational health safety. Version 2020. [cited 2022 Jun 1]. Available from: <https://ciqual.anses.fr/>.
9. Zbirka podatkov BLS [Internet]. Max Rubner Institut, Federal Research Centre for Nutrition and Food (BfEL), Federal Ministry of Food and Agriculture. Version 2021 Jun 8. [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://blsdb.de/>.
10. OPKP (odprta platforma za klinično prehrano) [Internet]. Odsek za računalniške sisteme, Institut Jožef Stefan. [cited 2022 Jun 20] Available from: [http://www.opkp.si/sl\\_SI/cms/vstopna-stran](http://www.opkp.si/sl_SI/cms/vstopna-stran).
11. USDA Table of Nutrient Retention Factors, Release 6. Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture; 2007.
12. Bell S, Becker W, Vásquez-Caicedo AL, Hartmann BM, Møller A, Buttriss J. Report on Nutrient Losses and Gains Factors used in European Food Composition Databases. European Food Information Resource Network (EuroFIR). Workpackage 1.5 Standards Development. Federal Research Centre for Nutrition and Food (BfEL); 2006.
13. Seongeung L, Youngmin C, Heon SJ, Junsoo L, Jeehye S. Effect of different cooking methods on the content of vitamins and true retention in selected vegetables. *Food Sci Biotechnol.* 2018 Apr;27(2):333-342.
14. Bernhardt S, Schlich E. Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering* 2006;77(2):327-333.
15. Combs GF, McClung JP. The vitamins. *Fundamental Aspects in Nutrition and Health.* 6th Ed. Elsevier 2018:43.
16. Fillion L, Henry CJK. Nutrient losses and gains during frying: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 1998;49(2):157-168.
17. Alegria-Torán A, Barberá-Sáez R et al. Bioavailability of minerals in foods. In: *Handbook of Mineral Elements in Food*, 1st Ed. De la Guardia M, Garrigues S, editors. *Handbook of Mineral Elements in Food.* Valencia: Department of Analytical Chemistry, University of Valencia; 2015:41-67.
18. Boye J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition.* 2012 Aug(108):183-211.
19. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein [Internet]. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal.* 2012;10(2):2557. Internet: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2557>.
20. Protein and amino acid requirements in human nutrition [Internet]. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (WHO Technical Report Series 935). 2007 [cited 2022 Feb 1]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43411/WHO\\_TRS\\_935\\_eng.pdf?ua=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43411/WHO_TRS_935_eng.pdf?ua=1).
21. Samtiya M, Aluko RE, Dhewa T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Prod Process and Nutr* 2020;2(6):2-14.
22. Klobukowski AJ, Skibniewska KA, Kowalski IM. Calcium bioavailability from dairy products and its release from food by in vitro digestion. *J Elem* 2014;19/1:277-288.
23. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(suppl):1461S-7S.
24. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for niacin. *EFSA Journal* 2014; 12(7): 3759. [Internet]. EFSA [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3759>.
25. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin A. *EFSA Journal* 2015;13(3):4028. [Internet]. EFSA. [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4028>.
26. Borel P, Preveraud D, Desmarchelier C. Bioavailability of vitamin E in humans: an update. *Nutrition Reviews.* 2013;71(6):319-331.
27. Reboul E. Vitamin E. Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants.* 2017;6(95).
28. Watanabe F. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007 232: 1266. Allen LH. Bioavailability of Vitamin B12. *Int J Vitam Nutr Res (Special Issue)* 2010;80(4-5):330-335.
29. Gille D, Schmid A. Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutrition Reviews.* 2015;73(2):106-115.
30. Garrod MG, Rossow HA, Calvert CC, Miller JW et al. 14 C-Cobalamin Absorption from Endogenously Labeled Chicken Eggs Assessed in Humans Using Accelerator Mass Spectrometry. *Nutrients.* 2019 Sep 8;11(9):2148.
31. Šajin A. Vrednotenje uporabnosti mobilnih aplikacij za beleženje prehranskega vnosa pri svetovanju o prehranskih dopolnilih. Magistrska naloga. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, UL 2021.
32. Gregorič M, Blaznik U, Fajdiga Turk V et al. Različni vidiki prehranjevanja prebivalcev Slovenije v starosti od 3 mesecev do 74 let. [Internet]. Nacionalni inštitut za javno zdravje Ljubljana 2019:63. [cited 2022 Apr 5] Available from: [https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/razlicni\\_vidiki\\_prehranjevanja\\_prebivalcev\\_slovenije.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/razlicni_vidiki_prehranjevanja_prebivalcev_slovenije.pdf).
33. Bauer J, Biolo G, Cederholm T et al. Evidence-Based Recommendations for Optimal Dietary Protein Intake in Older People: A Position Paper From the PROT-AGE Study Group. *Journal of the American Medical Directors Association.* 2013;14(8):542-559.
34. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010;8(3):1461. [Internet]. EFSA. [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1461>.



35. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010;8(3):1462. [Internet]. EFSA. [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1462>.
36. Seljak BK, Valenčič E, Hristov H, Hribar M, Lavriša Ž, Kušar A et al. Inadequate Intake of Dietary Fibre in Adolescents, Adults, and Elderlies: Results of Slovenian Representative Sl. Menu Study. *Nutrients*. 2021 Oct 27;13(11):3826.
37. Hribar M, Hristov H, Gregorič M et al. Nutrihealth Study: Seasonal Variation in Vitamin D Status Among Slovenian Adult and Elderly Population. *Nutrients*. 2020;12(6):1838.
38. Hribar M, Hristov H, Lavriša Ž, Koroušič Seljak B, Gregorič M, Blaznik U et al. Vitamin D intake in Slovenian adolescents, adults, and the elderly population. *Nutrients*. 2021;13(3528):1-19.
39. Lips P, de Jongh TR, van Schoor NM. Trends in Vitamin D Status Around the World. *JBMR Plus (Special Issue)*. 2021:1-6.
40. UREDBA (EU) št. 1169/2011 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 25. oktobra 2011 [Internet]. PRILOGA XIII. Vitamini in minerali, ki se lahko navedejo, ter njihovi priporočeni dnevni vnosi (PDV) [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:SL:PDF>.

# ESTROGENI HORMONI IN ESTROGENSKO DELUJOČI KEMIJSKI MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA: ALI VPLIVAJO NA IZRAŽANJE DNA?

## ESTROGEN HORMONES AND ESTROGENICALLY ACTIVE ENDOCRINE DISRUPTORS: DO THEY INFLUENCE DNA EXPRESSION?

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Andrej Grobin, mag. farm.<sup>1</sup>

doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.<sup>2</sup>

prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko biologijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andrej.grobin@ffa.uni-lj.si

### POVZETEK

Estrogeni hormoni in estrogeno delujoči kemijski motilci endokrinega sistema so v okolju prisotne spojine, s katerimi vsakodnevno prihajamo v stik preko vode in hrane. Poleg klasičnih mehanizmov delovanja na receptorje vplivajo tudi na izražanje genov v človeškem telesu. Do sedaj najbolj raziskani vplivi na njihovo izražanje so preko metiliranja DNA, histonskih modifikacij, dolgih nekodirajočih RNA ter mikro RNA. Nekateri od teh vplivov so potrjeni tako *in vitro* kot *in vivo*, na primeru bisfenola A že pri okoljsko relevantnih koncentracijah. Vsakodnevno pa smo izpostavljeni vedno novim vrstam še neznanih kemijskih motilcev endokrinega sistema. Problemi, povezani s tem, pa so trenutno pomanjkljiva analitika zaznavanja teh spojin v okolju in človeškem organizmu ter slaba sistematičnost določanja njihove toksičnosti preko različnih dejavnikov, ki sinergistično vplivajo na izražanje DNA.

### KLJUČNE BESEDE:

bisfenol A (BPA), epigenetika, estrogeni hormoni, izražanje DNA, kemijski motilci endokrinega sistema

### ABSTRACT

Estrogen hormones and estrogenically active endocrine disruptors are substances, which we come into daily contact with in the environment through food and water. Apart from their classic mechanisms of action which are receptor mediated, they also elicit effects on the expression of genes in the human body. Currently, the most researched mechanisms affecting gene expression are DNA methylation, histone modification and effects via long non-coding RNA and microRNA. Some of these effects have already been determined in *in vitro*, as well as in *in vivo* tests, in the case of BPA even in environmentally relevant concentrations. Lately, we are being subjected to new types of previously unknown endocrine disruptors. The issues stem from the fact that we currently have limited analytics available for detecting all these substances in the environment and humans with tests, which are not systematic enough in determining the toxicity of the aforementioned substances caused by synergistic effects they have on DNA expression.

### KEY WORDS:

bisphenol A (BPA), DNA expression, endocrine disruptors, epigenetics, estrogen hormones



# 1 UVOD

Endokrini sistem je nadzorni sistem žlez z notranjim izločanjem, ki tvorijo kemijske prenašalce hormone. Ti s pomočjo transporta po krvniškem sistemu prehajajo na mesta delovanja v tkiva in organe. Ker v telesu delujejo že v zelo nizkih koncentracijah, prav tako pa je njihova biološka aktivnost od koncentracije močno odvisna, telo preko zapletenih povratnih zank regulira njihovo delovanje.

Eden glavnih hormonskih sistemov pri človeku je sistem spolnih hormonov, ki jih po kemizmu uvrščamo med steroidne hormone. Njihova osnovna funkcija je sodelovanje v sistemu, v katerem sta udeležena še hipotalamus in nadledvična žleza. Skrbijo za razvoj spolovil in posledično spolni dimorfizem, omogočajo razmnoževanje, delujejo pa tudi na druge telesne funkcije, kot je npr. termoregulacija. V nadaljevanju se bomo posvetili estrogenskim spolnim hormonom. Ljudje smo v vsakodnevnem življenju izpostavljeni še spojinam, ki niso telesu lastne in prav tako delujejo na hormonski sistem. V okoljskih vzorcih, kot so npr. površinske vode, v merljivih koncentracijah najdemo različne spojine (1). Poleg ostankov sintezno pridobljenih hormonskih učinkovin, endogenih hormonov in fitosterolov, je med njimi vedno več novoodkritih onesnažil, za katere so že dokazali delovanje na hormonski sistem in jih posledično uvrščamo med kemijske motilce endokrinega sistema. Med te spadajo (2–7):

- bisfenoli (plastifikatorji, ki jih najdemo v večini plastičnih izdelkov),
- poliklorirani bifenili (PCB; spojine v industrijskih hladilih in mazivih),

- polibromirani difenil etri (zaviralci gorenja in penilci),
- pesticidi (večinoma zelo polarne spojine, ki jih najdemo v vodah),
- ftalati (plastifikatorji, sestavina gastrorezistentnih oblog v tabletah ipd.) in
- perfluorirane alkilirane spojine (PFAS; na vodo in maščobo odporne prevleke za papir in karton).

Zaradi njihove sposobnosti učinkovanja že v okoljsko relevantnih koncentracijah in njihove dokazane prisotnosti v človeku so v zadnjih desetletjih deležni večje pozornosti znanstvene stroke (8).

## 2 KLASIČNI IN ALTERNATIVNI MEHANIZMI DELOVANJA STEROIDNIH HORMONOV

Obstajata dve vrsti estrogenskih receptorjev, in sicer jedrni (ER $\alpha$  in ER $\beta$ ) in membranski (GPR30, ER-X in G $_q$ -mER) estrogenski receptorji. V odsotnosti estrogena se jedrni receptor nahaja v citoplazmi, vezan s šaperoni. Po vezavi estrogena receptor dimerizira, se translocira v jedro in nato veže na hormonsko odvisne elemente, ki se nahajajo na promotorjih tarčnih genov za jedrni receptor. Nato koregulatorji jedrnega receptorja delujejo na promotor in inducirajo transkripcijo tarčnih genov (9). Med temi koregulatorji so mnogi encimi, kot so npr. histonske acetiltransferaze, histonske deacetilaze, histonske metilaze in demetilaze ter DNA metilaze in demetilaze. Estrogenski membranski receptorji pa so večinoma z G-proteinom sklopljeni receptorji. Ti po vezavi agonista na receptor preko celične mobilizacije kalcija povzročijo sproščanje fosfatidilinozitol trifosfata v jedru celice, kar sproži signalno verigo za sproščanje hormonov.



*Slika 1: Shema mehanizmov delovanja hormonov in kemijskih motilcev endokrinega sistema na DNA, ki niso povezani s spremembami v zapisu DNA.*

*Figure 1: Scheme of the mechanisms of action for hormones and endocrine disruptors on DNA not related to changes in DNA sequence.*

Mehanizem delovanja različnih skupin kemijskih motilcev endokrinega sistema na jedrne receptorje so natančno raziskali in opisali (10). Poleg prekomerno ali premalo izraženih fizioloških učinkov, ki bi bili posledica vezave na te receptorje, pride pri vezavi prej omenjenih ligandov tudi do aktivacije negenomskih reakcij, kot so kinazne kaskade PI3K/AKT in MAPK. To posledično vodi do modulacije različnih encimov v celicah, kot so kinaze in fosfataze, na katere steroidni jedrni receptorji v fizioloških pogojih ne bi imeli neposrednega vpliva (11).

Poleg neposrednega vpliva na jedrne receptorje izkazujejo tudi vpliv na genomsko pot delovanja preko prej omenjenih koregulatorjev in tako posledično spreminjajo izražanje DNA. Zelo pomembni so tudi mehanizmi, ki niso povezani s spremembami v zapisu DNA (slika 1). Najbolj raziskani med njimi so spremembe v metiliranju DNA, histonske modifikacije, vpliv na mikro RNA ter dolge nekodirajoče RNA (12–16).

## 3 METILIRANJE DNA

Metiliranje DNA je bil prvi odkrit epigenetski označevalec. DNA se večinoma metilira na petem ogljikovem atomu citozina, tako dobimo 5-metilcitozin. Reakcijo katalizirajo encimi DNA metiltransferaze (DNMT). Citozin se v baznem paru veže z gvaninom. Regije, ki so bogate s citozin-gvanin dinukleotidom (CpG), imenujemo CpG-otočki in jih pogosto najdemo v regulatornih delih genoma.

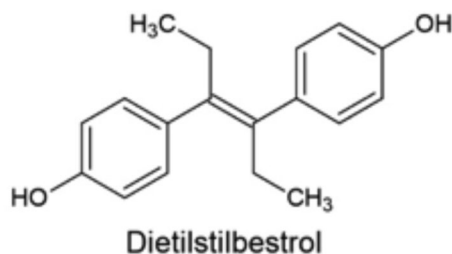
V splošnem velja, da metiliranje CpG, še posebej če gre za CpG-otoček, korelira z zaprto konformacijo kromatina, kar pomeni, da je DNA nedosegljiva za transkripcijske dejavnike. Nasprotno pa nemetilirane CpG najdemo v genih, ki se aktivno prepisujejo.

Obstajajo tudi izjeme, kjer lahko metiliranje DNA privede do povečane transkripcije. To vidimo na primeru zaviralca transkripcije CCCTC-vezavnega faktorja (CTCF), ki se veže na regije med promotorjem in ojačevalcem in s tem zavre prepisovanje genov. Metiliranje DNA na vezavnih mestih za CTCF tako onemogoči vezavo CTCF-proteina in s tem poveča izražanje genov. Estradiol z vezavo na estrogensko odzivne elemente v jedru neposredno pospešuje metiliranje DNA na CpG-otočkih, prav tako pa pospešuje izražanje DNMT (15). Njegova regulacija lahko pomembno vpliva na potek raka dojke (17).

Pomembnost vpliva kemijskih motilcev endokrinega sistema na metiliranje DNA so najprej odkrili pri terapiji z

dietilstilbestrolom. Dietilstilbestrol je sintezni nesteroidni estrogenski agonist, ki so ga do sedemdesetih let prejšnjega stoletja uporabljali za vzdrževanje normalnih serumskih koncentracij steroidnih hormonov pri nosečnicah, kar preprečuje zaplete v nosečnosti (slika 2).

Kasneje se je izkazalo, da dietilstilbestrol ni bil učinkovit pri zmanjševanju števila spontanih splavov in prezgodnjih porodov. Prišlo je celo do povečanja vaginalnega adenokarcinoma pri kar 0,1 % ženskih potomk pacientk, ki so uporabljale dietilstilbestrol, poleg tega pa še do abnormalnosti v razvoju spolovil in zmanjšani plodnosti njihovih potomk ter potomcev (5, 6). Raziskave so pokazale, da so ti učinki najverjetneje posledica sprememb v metiliranju DNA na laktoferinskem promotorju (dietilstilbestrol je povzročil demetiliranje), kar je posledično vodilo do motenj v razvoju organov (20).



Slika 2: Kemijska struktura dietilstilbestrola.

Figure 2: Chemical structure of diethylstilbestrol.

V zadnjih letih metiliranje DNA povezujejo še z več hormonsko odvisnimi boleznimi. Endometrijoza je bolezen, pri kateri najdemo endometrijo podobno tkivo izven maternične votline. Endometrijoza je najverjetneje epigenetska in od estrogenov odvisna bolezen (7, 8). Raziskave so pri intestinalni globoki endometrijozi (ena izmed najbolj agresivnih oblik) pokazale metiliranje DNA v promotorskih regijah za progesteronski receptorja A (PR-A) in B (PR-B). Metilirane alele promotorja PR-A so v večjem deležu odkrili v endometrioznem tkivu v primerjavi z zdravim, metilirane alele promotorja PR-B pa so zaznali samo v endometrioznem tkivu, ne pa tudi v zdravem (23).

Kontaminacija okolja in posledična izpostavitve človeka kemijskim motilcem endokrinega sistema lahko tudi vpliva na metiliranje DNA. Znanе so že spremembe v profilu metiliranja CpG-otočkov kot posledica uživanja hrane, kontaminirane z npr. PCB in PFAS (24). Slednji najverjetneje vplivajo na metiliranje v več delih DNA. Za perfluorooktil sulfonat, ki je predstavnik te skupine spojin, je znano, da



povzročajo zmanjšano metiliranje DNA, natančneje njenih elementov Alu, ki so najpogostejši gen v človeškem genomu (25). Prav tako so zaznali korelacijo med koncentracijo perfluorooktanojske kisline v krvi nosečnic, ki je tudi značilen predstavnik te skupine spojin, in zmanjšano porodno maso njihovih otrok (26).

Še ena izmed bolezni, za katero točni razlogi niso poznani, je sindrom policističnih jajčnikov. Poleg povezave z boleznimi metabolnega sindroma, kot sta sladkorna bolezen tipa 2 in debelost, odkrivajo tudi povezave bolezni z epigenetskimi modifikacijami, še posebej z metiliranjem DNA. Spremembe v metiliranju DNA, povezane s to boleznijo, so zaznali na več deset genih. Izražene so tako v periferni krvi in tisti v popkovnici kot tudi v tkivih, ki so zaradi bolezni spremenjena, npr. v jajčnikih, podkožnih maščobnih tkivih in skeletnih mišicah (27). Metiliranje DNA pri pacientkah z izraženo boleznijo je značilno višje kot pri zdravih (28).

Posledic metiliranja posameznih genov še ne poznamo v celoti, saj je raziskava odkrila mnogo večje število genov, pri katerih je bil profil metiliranja spremenjen, kot pa je bilo potem dejansko izraženih sprememb. Iz tega lahko sklepamo, da večina sprememb v metiliranju očitno ne vpliva na izražanje posameznih genov, zato so potrebne nadaljnje raziskave, da identificiramo posamezne gene, katerih metiliranje je pomembno za potek bolezni, in v kolikšni meri kemijski motilci endokrinega sistema vplivajo nanjo.

## 4 HISTONSKE MODIFIKACIJE

Histoni so proteini, odgovorni za urejenost DNA. 146 baznih parov DNA, navite okoli osmih histonskih molekul, tvorijo t. i. nukleosome. Vsak nukleosom je sestavljen iz dveh podenot (obe sta sestavljeni iz histonov H2A, H2B, H3 in H4)

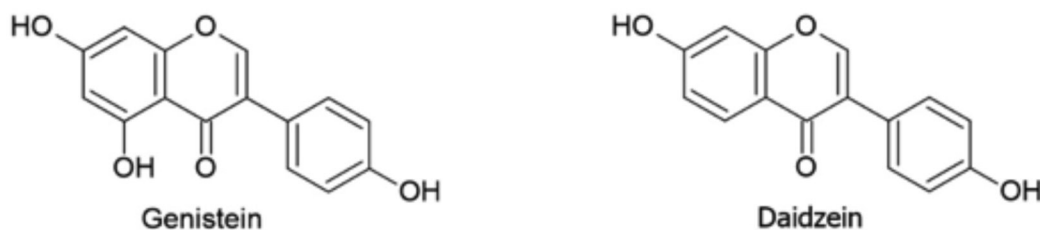
in povezovalnega histona H1, ki deluje kot stabilizator, ki poveže podenoti med seboj.

Vezavna afiniteta med DNA in histonom definira kromatinsko stanje, ki je lahko sproščeno (nizka vezavna afiniteta med DNA in histonom) ali kondenzirano (visoka vezavna afiniteta med DNA in histonom). Kromatinsko stanje je pomembno za regulacijo izražanja genov in je modulirano s posttranslacijskimi modifikacijami iztegnjenih repov histonov. Primera posttranslacijskih modifikacij sta npr. acetiliranje in metiliranje lizina. Estradiol pospešuje tako acetiliranje (z acetilazo p300, kar vodi v aktivacijo transkripcije) kot metiliranje histonov. Slednje lahko vodi v aktivacijo (metiliranje na histonu 3, lizin 4) ali inhibicijo transkripcije (metiliranje na histonu 3, lizin 27) (15).

Izoflavoni so skupina rastlinskih estrogenov. Največ jih najdemo v rastlinah iz družine metuljnic (Fabaceae), med katere spadajo arašidi, grah, čičerika in soja. Slednja je verjetno najpomembnejša predstavnica družine iz vidika nadomestne hormonske terapije, saj se uporablja v mnogih prehranskih dopolnilih, ki so prvenstveno namenjena blaženju simptomov klimakterija in ostalih postmenopavzalnih težav.

Glavni učinkovini v družini izoflavonov sta genistein in daidzein (slika 3). Po strukturi sta podobna estrogenom in delujeta na jedrne estrogenske receptorje. Učinkujeta tudi na encim histonsko acetiltransferazo in s tem povzročata povečano acetilacijo histonov (29). Učinek izoflavonov na encim je sicer manjši kot učinek estrogenov (za približno 250-krat), a je že viden tudi v serumskih koncentracijah izoflavonov, ki so značilne za populacijo s fitoestrogensko terapijo. Serumsko koncentracija pri terapiji pa je za več kot 250-krat višja od povprečne koncentracije estrogenov pri ženskah, iz česar bi lahko sklepali, da je učinek izražen tudi pri takšni terapiji (15, 16).

Verjetno najbolj raziskan kemijski motilec endokrinega sistema sodobnega časa je bisfenol A (BPA; slika 4). Uporabljamo ga v proizvodnji plastike že od šestdesetih let



Slika 3: Kemijski strukturi genisteina in daidzeina.

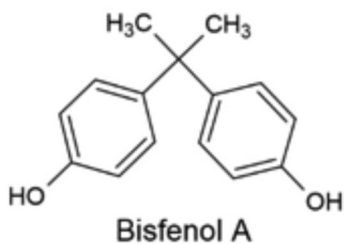
Figure 3: Chemical structures of genistein and daidzein.

prejšnjega stoletja, največ v proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smol. Le-te so pogosto uporabljane v vsebnikih za shranjevanje hrane in pijače.

BPA najdemo skoraj povsod v okolju, v vodah, zemlji in celo zraku, različne so zgolj koncentracije (31). V Evropi je uporaba BPA od leta 2011 prepovedana v plastiki, ki je namenjena za izdelavo otroških steklenič in steklenic za infuzijske raztopine. Od leta 2020 je prepovedan tudi za uporabo v termo papirju. Leta 2017 so ga dodali na evropski seznam spojin zelo velikega tveganja, ki je prvi korak omejitve uvoza in uporabe spojin v EU (32).

BPA med drugim deluje tudi na nivo metiliranja in acetiliranja promotorjev na več estrogensko reguliranih genih. Primer tega sta *HOXB9* in *HOXC6*. Udeležena sta v kodiranju proteinov, ki so kot transkripcijski faktorji udeleženi v proliferaciji in diferenciaciji celic. Le-ti imajo pomembno vlogo pri razvoju mlečnih žlez pri sesalcih (33). V primeru raka dojke je *HOXC6* značilno bolj izražen v rakavih tkivih. Podatki iz testiranj *in vitro* ter *in vivo* kažejo, da BPA inducira izražanje *HOXC6*. Enak učinek ima tudi estradiol. Povišano izražanje inducira izražanje tumorskih rastnih dejavnikov in tako pospešuje rast tumorja, čeprav je treba upoštevati, da so v raziskavi uporabili velik odmerek (25 µg/kg telesne mase) po principu odmerka z akutno toksičnostjo (34). Ocenjen vnos BPA v Sloveniji je približno 25 ng/kg telesne mase/dan (35).

BPA je vpleten tudi v indukcijo pospeševalca zeste homologa 2 (EZH2), ki je metiltransferaza, specifična za histon 3 na lizinu 27. Metilacijska aktivnost EZH2 olajša nastanek heterokromatinov in s tem utiša delovanje genov, prav tako pa je EZH2 udeležen v celični mitozii (36). EZH2 je povišano izražen pri raku dojke. Njegovo transkripcijo v telesu inducira prisotnost estradiola *in vitro* ter *in vivo*. BPA prav tako povečuje izražanje EZH2 (koncentracija, uporabljena v poskusu je bila 100 nM za BPA v primerjavi z 0,1 nM za estradiol), kar najverjetneje vodi v povečano izražanje tumorja (37).



Slika 4: Kemijska struktura bisfenola A.  
Figure 4: Chemical structure of Bisphenol A.

## 5 MIKRO RNA

Mikro RNA (miRNA) so kratke nekodirajoče molekule RNA, velikosti 21 do 26 nukleotidov. Delujejo tako, da posttranslacijsko zavirajo izražanje genov preko vezave na 3'-neprevedene regije (3'-UTR) tarčnih informacijskih RNA (mRNA). Udeležene so v mnogih bioloških procesih, kot so razvoj celic, njihova rast in apoptoza (38). miRNA naj bi modulirale izražanje približno 30 % vseh genov, ki kodirajo proteine (39). Delovanje miRNA je odvisno od njene specifične interakcije s tarčo. Večina molekul miRNA se delno veže na svoje tarče na pozicijah 2–7 z njenega 5' konca. Ta regija se potem popolnoma veže na 3'-UTR preko interakcij baznih parov. Te interakcije posledično zavirajo izražanje tarčne mRNA, ker blokirajo njeno prepisovanje ali razpad (40). Raziskave kažejo, da različni hormoni modulirajo izražanje miRNA v različnih organih (41). Estradiol aktivno vpliva na nastanek miRNA v tkivih dojke in jajčnikov. To modulacijo estrogeni vršijo z inaktivacijo RNA polimeraze II in zaviranjem nastanka prekurzorjev za miRNA z zaviranjem delovanja ribonukleaze III. S tem se zmanjša prepisovanje miRNA (42). Poleg vpliva na njeno prepisovanje lahko estrogen vpliva tudi na izražanje miRNA. Skladno s tem so v raziskavah pokazali značilno razliko v profilih izražanja miRNA v estrogensko odvisnih in drugih vrstah raka dojke (43). Dokazali so tudi, da lahko estrogen neposredno modulira profile izražanja miRNA na modelu rib cebic in v celicah človeškega raka dojke MCF-7 in ZR-75 (44).

Tudi v primeru miRNA so že poznani vplivi nekaterih kemijskih motilcev endokrinega sistema na njeno izražanje (npr. pri perfluorooktanojski kislini in BPA). Motnje v profilu izražanja miRNA, ki jih ti povzročajo, se kažejo v obliki bolezni centralnega živčnega sistema, metabolnih motenj in seveda tudi motenj v reprodukciji (45). Za BPA je npr. znano, da povzroča zmanjšano izražanje miR-21 in nekaterih drugih molekul miRNA, kar je povezano z nastankom raka dojke (46).

## 6 DOLGE NEKODIRAJOČE RNA

Dolge nekodirajoče RNA (lncRNA) so skupina regulatornih molekul RNA, ki se ne prevedejo v protein in so daljše od 200 nukleotidov. lncRNA imajo več kot polovični delež





med molekulami, ki se prepisujejo v človeških celicah (47). Udeležene so v mnogih bioloških procesih, kot so pakiranje genoma, organizacija kromatina in regulacija genov. Podobno kot mRNA, se mnogo molekul lncRNA prepisuje z RNA polimerazo II ter se posttranslacijsko modificira.

Značilen predstavnik lncRNA je HOX transkripcijska protismislena RNA (HOTAIR). Gen, ki kodira zanj, najdemo na kromosomu 12. Mehanizem delovanja HOTAIR je preko utišanja nekaterih genov na kromosomu 2 (48). Znano je, da je HOTAIR povečano izražen v mnogih vrstah tumorjev, kot so npr. hepatocelični karcinom, rak trebušne slinavke, rak pljuč, kolorektalni rak in rak dojke (49).

Prepisovanje HOTAIR v telesu v primeru raka dojke regulira estradiol in je pomemben dejavnik vzdrževanja in preživetja rakavih celic. Zmanjšanje izražanja HOTAIR posledično povzroča zmanjšanje metastaz tumorja in njihovo invazivnost (50).

Eksperimenti so pokazali, da oba, BPA in dietilstilbestrol povečujeta izražanje HOTAIR v kulturi celic raka dojke ter tudi *in vivo* v mlečnih žlezah podgan. Posledično povečujeta možnost nastanka rakavih celic in vzdržujeta njegovo rast in metastaziranje (49).

## 7 RAZISKOVALNI IZZIVI PRI DOLOČEVANJU VPLIVOV KEMIJSKIH MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA

Raziskovalci učinkov kemijskih motilcev endokrinega sistema se spopadajo s številnimi izzivi (51). Eden večjih je poleg vedno naraščajočega števila spojin z endokrinim delovanjem tudi njihova koncentracijska odvisnost. Za večino kemijskih motilcev endokrinega sistema v okolju so predvidene koncentracije v velikostnem razredu nekaj ng/L (npr. za BPA v površinskih vodah) (31). Točni podatki za vse skupine teh spojin še niso na voljo, saj se analitika, ki omogoča meritve tako nizkih koncentracij, kot jih najdemo v okolju (in tudi nizkih koncentracij v kompleksnih bioloških materialih), v zadnjih letih šele razvija (52).

Mnogi učinki kemijskih motilcev endokrinega sistema, še posebej vplivi na izražanje DNA, se v tako nizkih koncentracijah, ki so značilne za okolje, ne pokažejo hitro (53). Posledično testiranja izvajamo po smernicah, ki predvidevajo kratkotrajnejša testiranja z višjimi odmerki, kar je zlati standard pri testiranju toksičnosti kemikalij (54).

Problem pri delovanju kemijskih motilcev endokrinega sistema se pokaže v dejstvu, da je lahko delovanje neke

spojine različno pri različnih koncentracijah. Če neka spojina pri višjih koncentracijah pospešuje nastanek raka, ni vedno nujno, da bo njeno delovanje enako, a zgolj počasnejše, tudi pri nižji koncentraciji. Primer tega je že prej omenjeni izoflavon genistein. Obstajajo raziskave, ki so pokazale, da v nekaterih primerih raka genistein v višjih koncentracijah (za faktor sto do nekaj tisoč višje, kot bi jih našli pri terapiji, in jih uporabljajo v kratkotrajnejših testih toksičnosti) pospešuje nastanek rakavih celic, v nižjih koncentracijah (primerljive s tistimi, ki jih pričakujemo ob terapiji) pa deluje protitumorčno (41, 42).

## 8 VPLIV NA IZRAŽANJE DNA

Iz napisanega sledi, da lahko hormoni in kemijski motilci endokrinega sistema na mnogo različnih načinov, ki niso nujno vezani na delovanje preko receptorjev, delujejo na izražanje DNA. Vprašanje, ki se pri tem poraja, je, ali je ta izpostavitve relevantna s stališča toksičnosti za človeka ali pa so učinki vidni samo na testnih modelih.

Na več omenjenih primerih smo videli, da se učinek spojin lahko izrazi že v serumskih koncentracijah, ki so v območju pričakovanih oz. najdenih v človeškem organizmu, oz. v primeru BPA tudi tolikšnih, ki jih po obstoječih smernicah obravnavamo kot varne (16, 20, 43). To nam daje slutiti, da je pomen vpliva kemijskih motilcev endokrinega sistema (in analogno tudi hormonov) na izražanje DNA pri določevanju varnih dnevni odmerkov trenutno premalo upoštevan.

V klasičnih poskusih določevanja toksičnosti *in vitro* ter *in vivo*, ki so osnova za določitev varnih dnevni izpostavljenosti neki spojini, niso upoštevani vsi vidiki učinkovanja spojin, kot so kemijski motilci endokrinega sistema, saj leti še niso dobro poznani (58). Ker lahko sklepamo, da tovrstne spojine na izražanje DNA ne delujejo zgolj preko enega mehanizma (nenazadnje, BPA deluje na različne procese, povezane z izražanjem DNA), je zelo verjetno, da so ti mehanizmi med seboj sinergistični, kar še dodatno povišuje njihovo toksičnost (59). Zelo verjetno je tudi, da še mnoge druge spojine delujejo na več različnih procesov hkrati, a še niso tako dobro raziskane kot BPA.

Pomemben dejavnik sprememb izražanja DNA, ki ni povezan s spremembo genskega zapisa, je dejstvo, da se te spremembe lahko dedujejo. Raziskave potrjujejo dedovanje takšnih sprememb, ki jih povzroči BPA, na naslednje ge-

neracije, ki mu niso bile izpostavljene (60). V enem poskusu so bile vidne spremembe v izražanju genov (v serumskih koncentracijah, ki jih najdemo v splošni populaciji), potomci pa so imeli vedenjske motnje (61). Z izpostavitvijo staršev okoljsko relevantnim koncentracijam BPA so v drugem poskusu zaznali značilen upad rodnosti in sposobnosti razmnoževanja v prvi generaciji potomcev, ki se je nadaljevala še v drugo in tretjo generacijo potomcev; to so potrdili zgolj preko določanja plodnosti in histoloških preiskav (62). Iz napisanega sledi, da je naše vedenje o točnih učinkih posameznih kemijskih motilcev endokrinega sistema v okoljsko relevantnih koncentracijah trenutno pomanjkljivo. Še naprej je pomembno razvijati nove analize metode, ki nam omogočajo določitev velikostnega razreda izpostavljenosti vsem že znanim in vedno novim spojinam v okolju, še posebej v pitni vodi in hrani ter ostalih pijačah in posledično zaradi tega tudi v telesu.

Nadalje je zelo pomemben strukturiran pristop k razvoju eksperimentov, s katerimi bi v relevantnih koncentracijah ugotavljali dolgoročne učinke na žive organizme. Manjkajo predvsem večgeneracijski testi, pri katerih bi uporabljali odmerke spojin, ki so bližje izpostavljenosti v realnem svetu, torej nizke odmerke, ki so jim testni organizmi izpostavljeni vsakodnevno dlje časa, kar predstavlja realen scenarij stalnega vstopa spojin v organizme v naravi. Le tako lahko ustrezno opredelimo toksični potencial spojin, ob upoštevanju fizioloških sposobnosti popravljanja genskega zapisa po eni strani in sposobnosti akumulacije kemijskih motilcev endokrinega sistema v telesu po drugi. Za slednje velja, da kljub zmožnosti glukuronidacije in njihovem relativno hitrem izločanju iz telesa, le-te v telesu ostajajo dlje časa (31). To je lahko posledica možnosti deglukuronidacije in ponovne absorpcije v telesu in že omenjene kronične izpostavljenosti spojinam. Zavedati se moramo, da so takšni testi dolgotrajni in iz vidika potencialno negativnih rezultatov zaradi uporabe nižjih koncentracij za raziskovalce manj privlačni, a za napredek našega znanja na področju toksikologije toliko bolj pomembni.

## 9 SKLEP

Hormoni in kemijski motilci endokrinega sistema so spojine, ki jih najdemo v hrani, vodi in drugje v našem okolju. Ker so mnogi izmed njih lipofilne spojine, imajo potencial, da se nalagajo v telesu. Tako lahko kljub izpostavljenosti majh-

nim dnevnim vnosom, le-ti sčasoma postanejo veliko breme. Uporaba večine znanih kemijskih motilcev endokrinega sistema je omejena, a na trg in posledično v okolje prihajajo vedno nove spojine, velikokrat z neznanimi mehanizmi delovanja in toksičnostjo. Ker lahko poleg klasičnega načina delovanja svoje učinke izražajo tudi preko vpliva na izražanje DNA, so lahko posledično priporočene količine maksimalne dnevne izpostavljenosti postavljene previsoko, njihovi učinki pa se lahko celo izrazijo ne samo v osebnih, ki so bili neki spojinam izpostavljeni, ampak tudi v njihovih potomcih.

Odprtih ostaja veliko vprašanj, saj ne vemo, katere spojine se bodo izkazale kot kemijski motilci endokrinega sistema, kakšne so posledice sinergije učinkov različnih načinov vpliva na izražanje DNA zgolj ene spojine, kakšni so sinergistični učinki vplivov kombinacij tovrstnih spojin, katerim njihovim kombinacijam smo v vsakodnevnem življenju izpostavljeni in seveda, kakšne bodo dolgoročne posledice izpostavitve tem spojinam za nas in naše potomce. Zato so zelo pomembne skrbno načrtovane nadaljnje raziskave, ki obravnavajo to problematiko čim bolj celostno in v relevantnih časovnih ter koncentracijskih okvirjih.

## 10 LITERATURA

1. Kolodziej EP, Harter T, Sedlak DL. Dairy Wastewater, Aquaculture, and Spawning Fish as Sources of Steroid Hormones in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol*. 2004 Dec 1;38(23):6377–84.
2. Ohore OE, Zhang S. Endocrine disrupting effects of bisphenol A exposure and recent advances on its removal by water treatment systems. A review. *Scientific African*. 2019 Sep 1;5:e00135.
3. Buha Djordjevic A, Antonijevic E, Curcic M, Milovanovic V, Antonijevic B. Endocrine-disrupting mechanisms of polychlorinated biphenyls. *Curr Opin Toxicol*. 2020 Feb 1;19:42–9.
4. Cao LY, Ren XM, Yang Y, Wan B, Guo LH, Chen D, et al. Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers Exert Estrogenic Effects via Non-Genomic G Protein-Coupled Estrogen Receptor Mediated Pathways. *Environ Health Perspect*. 2018 May;126(5):057005.
5. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jun;8(6):2265–303.
6. Hlilsníková H, Petrovičová I, Kolena B, Šidlovská M, Sirotkin A. Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Sep;17(18):6811.
7. Li J, Cao H, Feng H, Xue Q, Zhang A, Fu J. Evaluation of the Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Perfluoroalkyl Substances and Their Interactions with the Human Estrogen Receptor by

- Combining *In Vitro* Assays and *In Silico* Modeling. *Environ Sci Technol.* 2020 Nov 17;54(22):14514–24.
8. Karzi V, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Alegakis T, Katsikantami I, Sifakis S, et al. Biomonitoring of bisphenol A, triclosan and perfluorooctanoic acid in hair samples of children and adults. *J Appl Toxicol.* 2018 Aug;38(8):1144–52.
  9. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016 Dec 5;16(1):4–20.
  10. Deb P, Mandal SS. Endocrine Disruptors. In: *Gene Regulation, Epigenetics and Hormone Signaling* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cited 2019 Nov 21]. p. 607–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527697274.ch20>
  11. Ordóñez-Morán P, Muñoz A. Nuclear receptors: Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle.* 2009 Jun 1;8(11):1675–80.
  12. Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018;122(1):38–45.
  13. Nettore IC, Franchini F, Palatucci G, Macchia PE, Ungaro P. Epigenetic Mechanisms of Endocrine-Disrupting Chemicals in Obesity. *Biomedicines.* 2021 Nov;9(11):1716.
  14. Martini M, Corces VG, Rissman EF. Mini-review: Epigenetic mechanisms that promote transgenerational actions of endocrine disrupting chemicals: Applications to behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav.* 2020 Mar 1;119:104677.
  15. Kovács T, Szabó-Meleg E, Ábrahám IM. Estradiol-Induced Epigenetically Mediated Mechanisms and Regulation of Gene Expression. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(9):3177.
  16. Salinas I, Sinha N, Sen A. Androgen-induced epigenetic modulations in the ovary. *J Endocrinol.* 2021 Jun 1;249(3):R53–64.
  17. Ung M, Ma X, Johnson KC, Christensen BC, Cheng C. Effect of estrogen receptor  $\alpha$  binding on functional DNA methylation in breast cancer. *Epigenetics.* 2014 Apr 17;9(4):523–32.
  18. Dieckmann WJ, Davis ME, Rynkiewicz LM, Pottinger RE. Does the Administration of Diethylstilbestrol during Pregnancy have Therapeutic Value? *Am J Obst Gynecol.* 1953 Nov 1;66(5):1062–81.
  19. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR, Hornsby PP, Herbst AL. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med.* 1995 May 25;332(21):1411–6.
  20. Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, et al. Developmental Exposure to Diethylstilbestrol Elicits Demethylation of Estrogen-responsive Lactoferrin Gene in Mouse Uterus. *Cancer Res.* 1997 Oct 1;57(19):4356–9.
  21. Nasu K, Kawano Y, Tsukamoto Y, Takano M, Takai N, Li H, et al. Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *J Obstet Gynaecol Re.* 2011;37(7):683–95.
  22. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter Hypermethylation of Progesterone Receptor Isoform B (PR-B) in Endometriosis. *Epigenetics.* 2006 Apr 1;1(2):106–11.
  23. Meyer JL, Zimbardi D, Podgaec S, Amorim RL, Abrão MS, Rainho CA. DNA methylation patterns of steroid receptor genes *ESR1*, *ESR2* and *PGR* in deep endometriosis compromising the rectum. *Int J Mol Med.* 2014 Apr 1;33(4):897–904.
  24. Leung YK, Ouyang B, Niu L, Xie C, Ying C, Medvedovic M, et al. Identification of sex-specific DNA methylation changes driven by specific chemicals in cord blood in a Faroese birth cohort. *Epigenetics.* 2018;13(3):290–300.
  25. Liu CY, Chen PC, Lien PC, Liao YP. Prenatal Perfluorooctyl Sulfonate Exposure and Alu DNA Hypomethylation in Cord Blood. *Int J Environ Res Public Health.* 2018 24;15(6).
  26. Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The Hokkaido Study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2017;27(3):251–9.
  27. Vázquez-Martínez ER, Gómez-Viais YI, García-Gómez E, Reyes-Mayoral C, Reyes-Muñoz E, Camacho-Arroyo I, et al. DNA Methylation in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reproduction.* 2019 Apr 1;158(1):R27–40.
  28. Yu YY, Sun CX, Liu YK, Li Y, Wang L, Zhang W. Genome-wide screen of ovary-specific DNA methylation in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2015 Jul 1;104(1):145–153.e6.
  29. Hong T, Nakagawa T, Pan W, Kim MY, Lee Kraus W, Ikehara T, et al. Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004 Apr 23;317(1):259–64.
  30. Nikander E, Kilkinen A, Metsä-Heikkilä M, Adlercreutz H, Pietinen P, Tiitinen A, et al. A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients. *Obstet Gynecol.* 2003 Jun 1;101(6):1213–20.
  31. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-Response.* 2015 Jul 1;13(3):1559325815598308.
  32. ECHA. Four new substances of very high concern added to the Candidate List - All news - ECHA [Internet]. [cited 2020 Sep 8]. Available from: <https://echa.europa.eu/-/four-new-substances-of-very-high-concern-added-to-the-candidate-list>
  33. Castronovo V, Kusaka M, Chariot A, Gielen J, Sobel M. Homeobox genes: potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype. *Biochem Pharmacol.* 1994 Jan 13;47(1):137–43.
  34. Hussain I, Bhan A, Ansari KI, Deb P, Bobzean SAM, Perrotti LI, et al. Bisphenol-A induces expression of *HOXC6*, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jun;1849(6):697–708.
  35. Huang RP, Liu ZH, Yuan SF, Yin H, Dang Z, Wu PX. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. *Environ Pollut.* 2017 Nov;230:143–52.
  36. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006 Feb;439(7078):871–4.
  37. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SAM, Perrotti LI, Mandal SS. Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *J Mol Biol.* 2014 Oct 9;426(20):3426–41.
  38. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281–97.
  39. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15–20.
  40. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLOS Biol.* 2005 Feb 15;3(3):e85.
  41. Cameron BE, Craig PM, Trudeau VL. Implication of microRNA deregulation in the response of vertebrates to endocrine

- disrupting chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 2016 Apr;35(4):788–93.
42. Gupta A, Caffrey E, Callagy G, Gupta S. Oestrogen-dependent regulation of miRNA biogenesis: many ways to skin the cat. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug;40(4):752–8.
  43. Cohen A, Burgos-Aceves MA, Smith Y. Estrogen repression of microRNA as a potential cause of cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016 Mar;78:234–8.
  44. Ferraro L, Ravo M, Nassa G, Tarallo R, De Filippo MR, Giurato G, et al. Effects of Oestrogen on MicroRNA Expression in Hormone-Responsive Breast Cancer Cells. *Horm Canc.* 2012 Jun 1;3(3):65–78.
  45. Vrijens Karen, Bollati Valentina, Nawrot Tim S. MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environ Health Persp.* 2015 May 1;123(5):399–411.
  46. Tilghman SL, Bratton MR, Segar HC, Martin EC, Rhodes LV, Li M, et al. Endocrine Disruptor Regulation of MicroRNA Expression in Breast Carcinoma Cells. *PLoS One.* 2012 Mar 5;7(3):e32754.
  47. Niland CN, Merry CR, Khalil AM. Emerging Roles for Long Non-Coding RNAs in Cancer and Neurological Disorders. *Front Genet.* 2012;3:25.
  48. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1311–23.
  49. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SAM, Perrotti LI, Mandal SS. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR *in vitro* and *in vivo*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 May;141:160–70.
  50. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Kasiri S, Bashyal A, Mandal SS. Antisense transcript long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR is transcriptionally induced by estradiol. *J Mol Biol.* 2013 Oct 9;425(19):3707–22.
  51. Schug TT, Johnson AF, Birnbaum LS, Colborn T, Guillette LJ, Crews DP, et al. Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Mol Endocrinol.* 2016 Aug;30(8):833–47.
  52. Kudlak B, Szczepańska N, Owczarek K, Mazerska Z, Namieśnik J. Endocrine Disrupting Compounds – Problems and Challenges. In: *Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications* [Internet]. 2015 [cited 2019 Dec 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/emerging-pollutants-in-the-environment-current-and-further-implications/endocrine-disrupting-compounds-problems-and-challenges>
  53. Coady KK, Biever RC, Denslow ND, Gross M, Guiney PD, Holbech H, et al. Current Limitations and Recommendations to Improve Testing for the Environmental Assessment of Endocrine Active Substances. *Integr Environ Assess Manag.* 2017 Mar;13(2):302–16.
  54. OECD Work Related to Endocrine Disrupters - OECD [Internet]. [cited 2019 Dec 17]. Available from: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>
  55. Moiseeva EP, Manson MM. Dietary Chemopreventive Phytochemicals: Too Little or Too Much? *Cancer Prev Res.* 2009 Jul 1;2(7):611–6.
  56. Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;83(1–5):113–8.
  57. Chen Z, Zuo X, He D, Ding S, Xu F, Yang H, et al. Long-term exposure to a 'safe' dose of bisphenol A reduced protein acetylation in adult rat testes. *Sci Rep.* 2017 Jan 9;7(1):1–9.
  58. Lee HR, Jeung EB, Cho MH, Kim TH, Leung PCK, Choi KC. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. *J Cell Mol Med.* 2013 Jan;17(1):1–11.
  59. Barouki R. Endocrine disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology. *C R Biol.* 2017 Sep 1;340(9):410–3.
  60. Rissman EF, Adli M. Minireview: Transgenerational Epigenetic Inheritance: Focus on Endocrine Disrupting Compounds. *Endocrinology.* 2014 Aug;155(8):2770–80.
  61. Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SRJ, Gatewood JD, Taylor JA, Rissman EF, et al. Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology.* 2012 Aug;153(8):3828–38.
  62. Salián S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 2009 Nov 18;85(21–22):742–52.



# NEKLINIČNO PREVERJANJE VARNOSTI ZDRAVIL, NAMENJENIH PEDIATRIČNI POPULACIJI

## NON-CLINICAL SAFETY TESTING OF MEDICINES INTENDED FOR THE PAEDIATRIC POPULATION

AVTORJA / AUTHORS:

Igor Klinc, mag. farm.<sup>1</sup>

prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Javni lekarniški zavod Mariborske lekarnice Maribor,  
OE Galenski laboratorij,  
Minaškova ulica 6, 2000 Maribor

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko kemijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: marija.sollner@ffa.uni-lj.si

### POVZETEK

V pediatriji zdravniki pogosto uporabljajo zdravila, ki prvotno niso imela dovoljenja za uporabo pri pediatrični populaciji. Pri tem seveda upoštevajo pomembne razlike med lastnostmi otrok v primerjavi z odraslimi. Tovrstno eksperimentiranje je imelo v preteklosti tudi nekaj tragičnih dogodkov. S spremembo zakonodaje v Evropski uniji se je leta 2007 uveljavila zahteva pri registraciji zdravil, da je treba med razvojem za zdravila pripraviti načrt pediatričnih preiskav. Zaradi tega je najprej nastala smernica Evropske agencije za zdravila, ki obravnava izvajanje nekliničnih raziskav z uporabo juvenilnih živali za zdravila, namenjena pediatrični populaciji. Pred kratkim je stopila v veljavo nova harmonizirana smernica S11, ki jo je pripravil Mednarodni svet za harmonizacijo (ICH). V tem prispevku povzemamo vsebino smernic S11 in pomen preskušanja zdravil za pediatrično populacijo.

### KLJUČNE BESEDE:

neklinično preskušanje na juvenilnih živalih, registracija zdravil za pediatrično populacijo, smernica ICH S11

### ABSTRACT

In the treatment of paediatric population, doctors are often prescribing medicines which were not registered for children. With such prescribing they take into account the differences in characteristics between adults and children. Such experimenting had some tragic consequences in history. With the change of the regulation within the European Union in the field of a new medicine registration procedure, it's since the year 2007 mandatory to prepare a paediatric investigation plan during the medicine development. Based on that the European medicines agency prepared Guidelines on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. Just recently a new harmonized guideline S11 was adopted, which was prepared by The International Council for Harmonisation. This paper summarizes the content of the S11 guidelines and the importance of drug testing for the paediatric population.

### KEY WORDS:

guideline ICH S11, nonclinical juvenile animal testing, paediatric medicines registration

# 1 UVOD

V farmaciji že dolgo poznamo dejstvo, da otroci niso pomanjšani odrasli, zato je v luči tega zelo pomemben pristop k preverjanju varnosti zdravil, namenjenih pediatrični populaciji. Že pred več kot 100 leti je dr. Abraham Jacobi, znan tudi kot oče ameriške pediatrije, prepoznal pomembnost in nujnost prilagajanja farmakoterapije starosti. Zapisal je tudi, da pediatrija ni obravnava pomanjšanih moških in žensk in uporaba manjših odmerkov pri enaki bolezni v manjših telesih, ampak ima svoje neodvisne razsežnosti in obzorja (1).

Z razvojem zdravil za vedno nova in nova indikacijska področja imajo zdravniki vedno več možnosti zdravljenja bolezni. Kljub temu so tisti, ki zdravijo pediatrično populacijo, dandanes v težkem položaju. Ne le, da imajo na voljo več zdravil za zdravljenje večjega števila bolezni kot kadar koli prej, zdravila postajajo vse kompleksnejša. Pomembna posledica tega je tudi večji potencial pojavljanja neželenih učinkov (2).

Pojavljane neželenih učinkov je težavno že pri odraslih, v pediatriji – še posebej pri nedonošenčkih – pa je ta težava veliko večja zaradi številnih dejavnikov. Veliko zdravil ima popolnoma drugačne farmakokinetične značilnosti pri otrocih v primerjavi z odraslimi na vseh ravneh farmakokinetike (absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija) (2), kar je posledica anatomskih, fizioloških in razvojnih razlik med otroki in odraslimi (3). Adherenca pri otrocih je močno odvisna od formulacije zdravila, njegovega okusa, videza in načina uporabe, prav tako pa tudi od dejavnikov s strani staršev ali skrbnikov (njihovo lastno prepričanje glede zdravil in dojemanje razmerja med tveganjem in koristjo). Pomembno je tudi dejstvo, da številna zdravila, ki jih uporabljamo v pediatrični populaciji, za tovrstno zdravljenje niso pridobila dovoljenja za promet. Prav tako je za večino zdravil na trgu opravljeno formalno preskušanje glede varnosti pri odraslih. Le malo zdravil na trgu pa je takšnih, ki so posebej registrirana za uporabo pri otrocih (2).

Še pred nekaj desetletji so za več kot 70 % zdravil, ki so jih uporabljali v pediatriji in ki so bila na voljo globalno, manjkali podatki o uporabi v pediatriji v navodilih za uporabo teh zdravil (3). V norveški raziskavi uporabe neregistriranih zdravil za uporabo pri otrocih oz. uporabe zdravil izven registriranih indikacij (*off-label*) je več kot 90 % zdravljenih otrok prejelo tovrstna zdravila (4). Tudi ameriška Agencija za hrano in zdravila (*Food and Drug Administra-*

*tion*, FDA) navaja podobno, da je bilo v preteklosti le približno 20 % zdravil registriranih za uporabo pri otrocih. Razloge za to pripisujejo različnim dejavnikom, kot so:

- ekonomski, pri čemer so farmacevtska podjetja v otroški populaciji videla le manjše finančne koristi, kar kaže vrsta zdravil, ki so bila v večji meri registrirana tudi za uporabo pri otrocih, predvsem nekateri antibiotiki in zdravila za lajšanje težav s kašljem in prehladom;
- potreba po zagotovitvi pogojev, ki so prijazni otrokom v širšem pomenu besede, kar zajema vse, od ustrezne opreme in postopkov, prilagojenih otrokom, do ustreznih strokovnjakov s področja pediatrije, ki znajo postopati tudi ob otrokovem občutku strahu;
- postopki odvzemanja bioloških vzorcev, kot sta kri in urin, so zelo preprosti pri odrasli populaciji, vendar lahko predstavljajo težavo pri otrocih;
- etične ovire, ki jih pri odraslih premostimo s preprostimi izjavami, pri otrocih pa je to zapleteno, saj na primer otroci, starejši od sedem let, v nekaterih državah lahko kljub predhodnemu soglasju staršev sami odločajo o svojem sodelovanju, tako da to sprejmejo ali zavrnejo (5).

## 2 POTREBA PO RAZVOJU VARNIH ZDRAVIL ZA OTROKE

Pogost pristop pri uporabi zdravil pri otrocih, ki niso registrirana za to populacijsko skupino, je uporaba podatkov, pridobljenih na odrasli populaciji, in prilagoditev odmerka glede na telesno maso otroka. Z večletnim eksperimentiranjem so zdravniki pridobili znanje, kako uporabljati številna zdravila, registrirana za uporabo pri odraslih, varno in učinkovito tudi pri otrocih. Vendar je takšen pristop z metodo poskusov in napak privedel do tragedije, ki je opozorila, da izkušnje z varnostjo zdravila pri odraslih niso nujno zanesljiv kazalnik, kako se bodo na zdravilo odzvali otroci. Takšen primer je bil v petdesetih letih prejšnjega stoletja z uporabo protimikrobne učinkovine kloramfenikol, ki so jo široko uporabljali pri odraslih za zdravljenje okužb, rezistentnih na penicilin. Veliko novorojenčkov je umrlo zaradi uporabe kloramfenikola, ker njihova jetra niso bila dovolj razvita, da bi presnovila to zdravilno učinkovino (5). Primer tragedije uporabe zdravila pri otrocih brez predhodnega preverjanja varnosti je tudi uporaba eliksirja s sulfanilamidom, ki je kot topilo vseboval etilen glikol. Posledica je bila smrt kar 107 otrok (6). K sreči se je zlasti zadnji dve de-



setletji okrepi razvoj zdravil za uporabo v pediatriji kot posledica spremembe v zakonodaji v Združenih državah Amerike (ZDA) in Evropski uniji (EU) (3). Sprejem evropske Uredbe št. 1901/2006 o zdravilih za pediatrično uporabo, ki je stopila v veljavo januarja 2007, je sprožil masovni premik v razvoju zdravil znotraj EU. Ta uredba določa, da morajo farmacevtska podjetja Pediatričnemu odboru (*Paediatric Committee*, PDCO) pri Evropski agenciji za zdravila (EMA) obvezno posredovati načrt pediatričnih preiskav (*Pediatric investigational plan*, PIP) ob koncu prve stopnje preskušanja novega zdravila pri odraslih (7). Tako trenutno potekajo preiskave vseh pogojno odobrenih cepiv proti koronavirusu, ki se bodo predvideno zaključile sredi leta 2024 (8). Zahteve po preskušanju zdravil na pediatrični populaciji pa ni uvedla le EU, ampak velja podobno tudi na primer v ZDA, kjer je na stopnji razvoja zdravila treba pripraviti pediatrični varnostni načrt (*Pediatric safety plan*, PSP) (9).

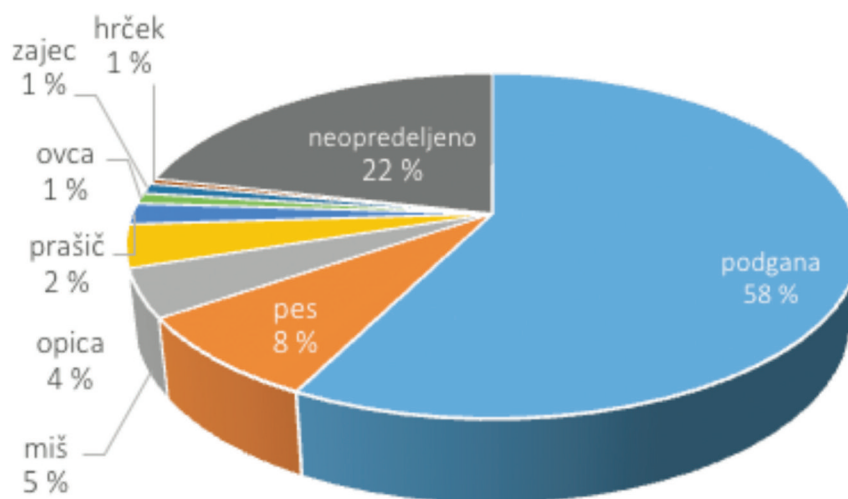
Načrt pediatričnih preiskav vsebuje oris razvoja zdravila in opredeljuje načrtovanje in terminsko izvedbo nekliničnih in kliničnih raziskav, ki so nujni za predložitev k vlogi za pridobitev dovoljenja za promet za pediatrično uporabo. Načrt pregleda Pediatrični odbor, ki ga lahko odobri ali zavrne (10). Pediatrični odbor sestavljajo strokovnjaki s kompetencami v razvoju in ocenjevanju vseh vidikov zdravil za uporabo v pediatrični populaciji (11).

PIP ni treba vložiti v vseh primerih in je pri določenih zdravilih možna opustitev. To velja za zdravila, pri katerih ni znanih indikacij pri otrocih oz. ko se predvidena uporaba zdravila ne nanaša na otroško populacijo (na primer Parkinsonova

bolezen). Opustitev mora biti odobrena pred oddajo vloge za dovoljenje za promet z zdravilom. V nekaterih drugih primerih pa obstaja preveliko varnostno tveganje za preskušanje zdravila pri otrocih (ali podskupini otrok) do zaključka predkliničnih raziskav ali raziskav pri odraslih ali specifični podskupini otrok. V teh primerih se lahko raziskave na pediatrični populaciji odložijo do potrditve, da je izvajanje raziskav varno in etično tudi pri otrocih ali specifični starostni podskupini (3).

PDCO je v letu 2008 objavil seznam opustitev, ki so ga nato revidirali v letih 2009 in 2010, na katerem so zdravila, ki so oproščena obveznega posredovanja PIP. Seznam je vseboval 42 zdravil za zdravljenje bolezni (25 od teh je bilo namenjenih zdravljenju rakavih bolezni), ki se ne pojavljajo pri otrocih. Vendar so pediatri, onkologi in starši poudarili, da so nekatera zdravila neupravičeno na tem seznamu. Kot enega od primerov na seznamu opustitev so navedli zdravilno učinkovino krizotinib, ki je registrirana za zdravljenje na ALK (anaplastična limfomska kinaza) pozitivnega raka na pljučih, ki se ne pojavlja pri otrocih (12). Za to učinkovino je PDCO najprej podelil oprostitev za vse starostne skupine, nato pa je EMA leta 2019 objavila novo odločitev, da se podeli oprostitev izvedbe PIP le za starostno skupino do 12 mesecev (zdravljenje anaplastičnega velikoceličnega limfoma in vnetnega miofibroblastnega tumorja), za starostno skupino od 12 mesecev do 18 let pa ne (13).

Dokazovanje varnosti uporabe zdravila oziroma zdravilne učinkovine v pediatrični populaciji vključuje tudi preskušanje na juvenilnih živalih (*juvenile animals*). V letih 2007 do 2017



Slika 1: Grafična predstavitev deležev vrst živali, ki jih uporabljajo za preskušanje na juvenilnih živalih (14).

Figure 1: Graphic representation of the proportions of animal species used for testing on juvenile animals (14).

je bilo na podlagi podatkov o odločitvah evropskih PIP kar 227 zdravil z opravljenim preskušanjem na juvenilnih živalih različnih živalskih vrst, in sicer na podganah (57,5 %), psih (8 %), miših (4,5 %), opicah (4 %), prašičih (2 %), ovcah (1 %), zajcih (1 %), hrčkah (0,5 %) in vrstah, ki niso bile posebej opredeljene (21,5 %) (slika 1). Prav tako so bile te raziskave izvedene za zdravila, namenjena zelo različnim terapevtskim skupinam. Najpogosteje so bile učinkovine s področij zdravljenja infekcijskih bolezni (15 %), endokrinologije (13,5 %), onkologije (13 %), nevrologije (11 %) in srčno-žilnih bolezni (10 %) (14).

Navedeni podatki kažejo stanje nekliničnega preverjanja varnosti zdravil v pediatrični populaciji v času nastajanja težko pričakovane harmonizirane smernice ICH 11 o nekliničnem preskušanju varnosti kot podpori razvoju zdravil, namenjenih pediatrični populaciji (*Guideline S11 on non-clinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals*).

Smernico S11 so prvič objavili na spletni strani EMA 1. 4. 2020, v veljavo pa je stopila 26. 9. 2020. V splošnem velja, da so v tej smernici predlagani standardi za pogoje, pod katerimi je preskušanje na juvenilnih živalih koristno in nujno za podporo izvedbe kliničnih raziskav na pediatrični populaciji. Prav tako so v smernici navedene usmeritve glede načrtovanja raziskav. Implementacija te smernice prinaša lažji razvoj zdravil in večjo zanesljivost znanstvenih podatkov ob hkratnem zmanjšanju odvečne uporabe živali (15).

ICH (*The International Council for Harmonisation*) ne samo v tej smernici, ampak v vseh objavljenih smernicah nekliničnega preskušanja varnosti poudarja princip 3R. Ta princip se nanaša na živali, ki se uporabljajo v nekliničnih preskušanjih varnosti zdravil, in pomeni zmanjšati število testnih živali (**R**educe), izboljšati metode, da povzročajo manj bolečin (**R**efine), in zamenjati preskušanja na živalih z drugimi metodami, kot so metode *in silico* in metode *in vitro* na celičnih kulturah (**R**eplace) (15).

Preskušanje varnosti zdravila vključuje veliko število živali za izvedbo vseh raziskav. Samo v Veliki Britaniji so v letu 2020 za namene preskušanja varnosti zdravil za uporabo v humani medicini potrebovali 193.000 živali. Kar 67 % preskušanj na psih in 76 % na primatih so opravili z namenom zadostiti regulatornim zahtevam, od katerih največji delež predstavlja preverjanje varnosti zdravil (16).

Podatki kažejo, da 90 % zdravil, ki so uspešno prestala preskušanja na živalih, ne prestane kliničnih preskušanj zaradi varnostnih tveganj in ker v kliničnih raziskav ne potrdijo učinkovitosti (17).

Smernica S11 pa ne prinaša popolne novosti na področju preskušanj zdravil na juvenilnih živalih, ampak je to področje

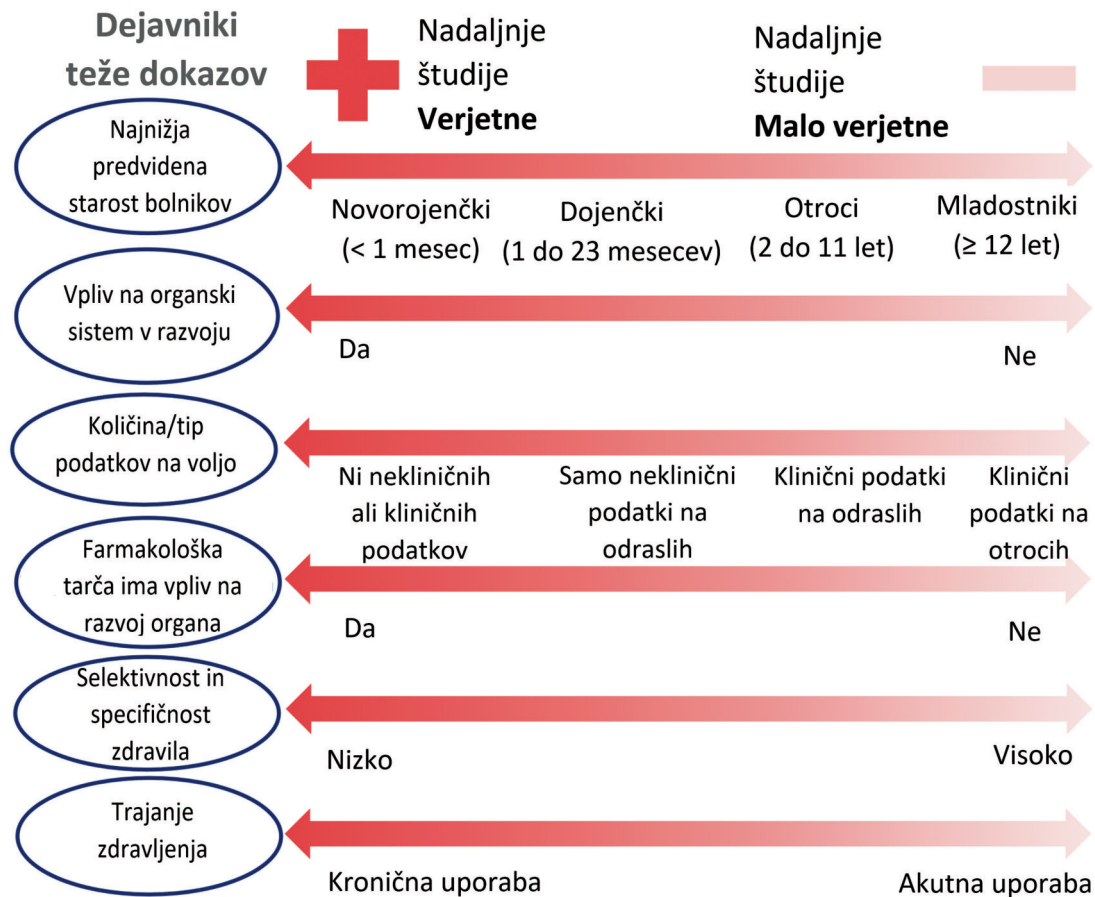
v EU do neke mere urejala že smernica Odbora za zdravila v humani medicini (*Comitee for Human Medicinal products*, CHMP) pri EMA z naslovom *Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications* (smernica glede potrebe za neklinična preskušanja zdravil na juvenilnih živalih za indikacije pri pediatrični populaciji), ki je stopila v veljavo 1. 8. 2008 (18). EU pri tem ni bila nobena posebnost, saj so tudi nekatere druge države sprejele nacionalne smernice glede preskušanja zdravil na juvenilnih živalih. V ZDA so takšne smernice sprejeli že pred EU – v letu 2006, na Japonskem pa pozneje – v letu 2012 (9).

Kot navaja smernica S11, lahko nezrelost organskih sistemov in zorenje teh sistemov vpliva na farmakokinetiko, farmakodinamiko in/ali ima netarčne učinke pri uporabi zdravil, kar potencialno vodi v razlike v profilu varnosti in/ali učinkovitosti med pediatrično populacijo in odraslimi. Glede odločanja o tem, ali je potrebno dodatno neklinično preskušanje za uporabo zdravila v pediatrični populaciji, je treba upoštevati pristop teže dokazov (*weight of evidence*, WoE). V luči tega pristopa ima največji vpliv na odločitve o tem, ali so dodatne neklinične raziskave nujne, najnižja predvidena starost bolnikov in učinek zdravila na organske sisteme v razvoju, medtem ko za druge dejavnike velja enaka stopnja pomembnosti (slika 2). S kliničnim razvojem zdravila se lahko na podlagi vseh razpoložljivih podatkov v določenem trenutku naredijo prilagoditve WoE. Rezultat ovrednotenja teže dokazov pa je lahko različen za različne aplikacije enakega zdravila, odvisno od najnižje starosti ciljne pediatrične populacije, terapevtske indikacije in trajanja zdravljenja (15).

### 3 KLINIČNE INFORMACIJE IN NJIHOV POMEN PRI ODLOČANJU O IZVAJANJU DODATNIH NEKLINIČNIH RAZISKAV NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Ko se odloča o tem, ali so dodatne neklinične raziskave nujne, je najprej treba razmisliti o že obstoječih kliničnih podatkih, ki se nanašajo na predvideno ciljno populacijo, iz drugih pediatričnih subpopulacij, če so na voljo, in podatkih o izpostavljenosti odraslih. Tudi trajanje zdravljenja je pomemben dejavnik odločanja, ali so nujna dodatna neklinična preskušanja. Daljše trajanje zdravljenja (na pri-





Slika 2: Ključni dejavniki teže dokazov, ki jih je treba upoštevati pri odločanju, ali so neklinične raziskave nujne (15).

Figure 2: Key data weighting factors to consider when deciding whether non-clinical studies are necessary (15).

mer tri mesece, šest mesecev, kronično intermitentno zdravljenje) poveča izpostavljenost otroka med razvojno občutljivim časovnim oknom, kar poveča verjetnost izvajanja dodatnih nekliničnih raziskav v primerjavi s krajšim trajanjem zdravljenja, ki manj verjetno vpliva na vidike razvoja, kot je rast. Če je na voljo dovolj podatkov o klinični varnosti zdravila in je strategija zmanjšanja tveganja v pediatrični populaciji ustrezna, ni treba izvajati dodatnih nekliničnih raziskav. Prav tako z izvajanjem nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih (NŠJŽ) ne potrjujemo toksičnosti na določene tarčne organe, za katere se ne pričakujejo razlike v občutljivosti glede toksičnosti v primerjavi z odraslo populacijo (15).

Če so na voljo podatki o klinični uporabi zdravila pri odraslih in se le-to ne uporablja v času otrokovega občutljivega razvoja organov, neklinične raziskave na juvenilnih živalih niso pomembne za začetek kratkotrajnih (1–3 dni) farmakokinetičnih raziskav v pediatrični populaciji (15, 19).

### 3.1 FARMAKOLOŠKE LASTNOSTI IN NJIHOV POMEN PRI ODLOČANJU O IZVAJANJU DODATNIH NEKLINIČNIH RAZISKAV NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Za pojav neželenih učinkov so odgovorne primarne ali sekundarne farmakološke lastnosti, kar je lahko zadržek glede uporabe v pediatrični populaciji, če se ti neželeni učinki kažejo na sistemih/organih v razvoju ali so organi v razvoju občutljivejši v primerjavi z dozorelimi organi. Če imajo znani farmakološki učinki zdravila potencial za vpliv na razvoj pri predvideni ciljni populaciji ali pa vpliv farmakološkega delovanja na razvoj ni znan oz. ga ni mogoče predvideti v razumnem obsegu, so nujne dodatne neklinične raziskave na juvenilnih živalih. Izvajanje le-teh ne prinaša koristi, ko na podlagi obstoječih farmakoloških podatkov identifi-

ramo določeno nevarnost, razen v primeru podrobnejšega razumevanja povezave odmerk-odziv ali razlike v občutljivosti med odraslimi in juvenilnimi živalmi (15).

## 4 NEKLINIČNI PODATKI O VARNOSTI

### 3.2 FARMAKOKINETIČNI PODATKI IN NJIHOV POMEN PRI ODLOČANJU O IZVAJANJU DODATNIH NEKLINIČNIH RAZISKAV NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Novorojenčki in dojenčki imajo lahko bistveno drugačne lastnosti absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije (ADME) učinkovine v primerjavi z odraslimi. Avtorja Hannah Katharine Batchelor in John Francis Marriott sta te razlike nazorno povzela in jih predstavljamo v preglednici 1 (20). Kljub razlikam neklinične raziskave na juvenilnih živalih niso informativne za predvidevanje starostno pogojenih razlik v ADME. Za te primere so uporabna tudi modelirna in simulacijska orodja ter klinična farmakologija (15).

Velik razlog za skrb predstavljajo morebitni podatki o toksičnosti, ugotovljeni pri raziskavah na odraslih živalih, za organe, ki so pri ciljni populaciji še v razvoju, zlasti če se neželeni učinki pojavljajo v primerljivi izpostavljenosti, kot je predvidena izpostavljenost v klinični uporabi. Zelo pomemben vir podatkov predstavljajo raziskave reproduktivne toksičnosti, predvsem pre- in postnatalne raziskave razvojne toksičnosti (*enhanced pre- and postnatal development toxicity study*, [e]PPND), če je bil potomec izpostavljen učinkovini. Ti podatki se vrednotijo s podatki splošne toksičnosti pri odločanju o izvedbi morebitnih dodatnih nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih. Informacija o tem, da je nastal neželeni učinek pri potomcu samice, izpostavljene zdravilni učinkovini, še ni razlog za izvedbo tovrstne raziskave (15).

*Preglednica 1: Povzetek razlik v lastnostih ADME med pediatrično in odraslo populacijo (20).*

*Table 1: Summary of differences in ADME characteristics between paediatric and adult population (20).*

	Razvojna sprememba	Posledica v farmakokinetiki
<b>Absorpcija</b>	↓ prehod črevesja	↓ $C_{max}$ in ↓AUC
	↓ želodčni pH	↑ $C_{max}$ za šibke kisline
		↓ $C_{max}$ za šibke baze
	↓ koncentracija žolča v črevesju	↓ $C_{max}$ in ↓AUC
<b>Distribucija</b>	sestava telesa	↔ $V_d$ (novorojenčki imajo relativno zmanjšano količino maščobe, medtem ko imajo dojenčki relativno večjo količino maščobe v primerjavi z odraslimi; novorojenčki imajo relativno več vode v zunajceličnem prostoru v primerjavi s predšolskimi otroki)
	↓ plazemski proteini	↑ proste frakcije učinkovine v plazmi, ↑ $V_d$
<b>Metabolizem</b>	večja relativna velikost jeter	↑ jetrni očistek učinkovine
	razvoj jetrnih encimov	↔ metabolizem učinkovine v jetrih
	bakterijska kolonizacija črevesja	↑ $C_{max}$ in ↑AUC
<b>Eliminacija</b>	večja relativna velikost ledvic	↑ ledvični očistek pri dojenčkih in predšolskih otrocih
	razvoj tubulnih transporterjev	↔ ledvični očistek učinkovine

$C_{max}$  – največja koncentracija učinkovine v plazmi, AUC – površina pod krivuljo,  $V_d$  – volumen porazdelitve



## 4.1 UPORABA IN REZULTAT VREDNOTENJA TEŽE DOKAZOV

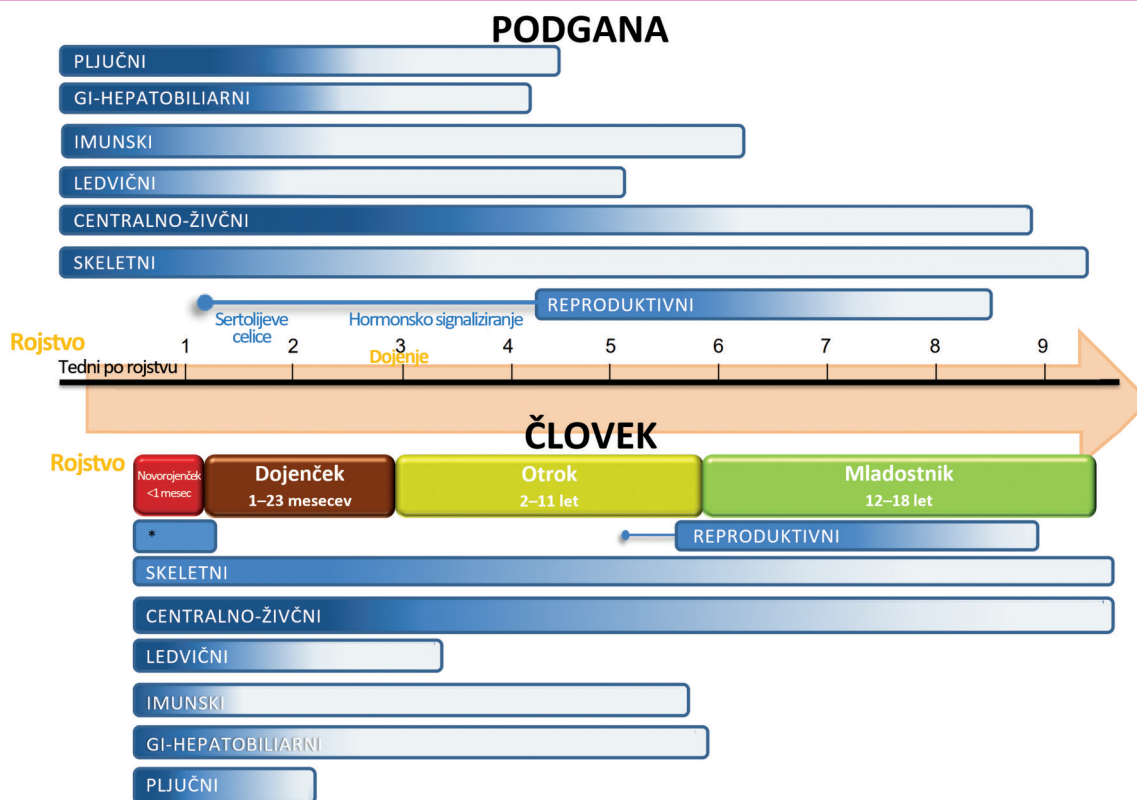
S pristopom teže dokazov ugotavljamo, ali so nujna dodatna neklinična preskušanja, s poudarkom na dejavnikih, ki so najpomembnejši za dopolnitev klinične ocene tveganja. Če ugotovimo potrebo po dodatnem preskušanju, ni nujno, da to pomeni izvedbo neklinične raziskave na juvenilnih živalih, ampak je lahko tudi raziskava *in vitro*, *ex vivo* ipd. V primeru neklinične raziskave na juvenilnih živalih cilje te raziskave uskladimo z rezultati vrednotenja teže dokazov, upoštevaje ciljno populacijsko skupino (15).

## 4.2 ZASNOVA NEKLINIČNE RAZISKAVE NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Pri načrtovanju neklinične raziskave na juvenilnih živalih je med drugim zelo pomembno poznavanje relativne ravnosti zrelosti in delovanja na stopnji razvoja med vrstami živali,

kar je ključno tudi pri translaciji ugotovitev nekliničnega preskušanja na starostne kategorije pri človeku. Primerjava razvoja med vrstami je lahko zelo zahtevna in ni enaka za vse organske sisteme. Slika 3 prikazuje razvojne razlike posameznih organskih sistemov med podgano in človekom v odvisnosti od starosti (15).

Pred začetkom izvajanja neklinične raziskave na juvenilnih živalih je priporočeno izvesti raziskavo ugotavljanja odmerka (*dose range finding study*, DRF) na manjši skupini juvenilnih živali za ugotavljanje tolerance v odvisnosti od izpostavljenosti in starosti. To je še posebej priporočljivo v primeru načrtovanja glavne raziskave, če se bo raziskava izvajala v času dojenja, in sicer v izogib nepričakovani smrtnosti ali pretirani toksičnosti. Z raziskavo ugotavljanja odmerka lahko ugotovimo tudi razlike v izpostavljenosti med starostnimi obdobji, na podlagi česar nato prilagodimo režim odmerjanja. Poleg tega se lahko pokaže tudi netoleranca na odmere, prilagojen na pričakovano izpostavljenost v predvideni ciljni populaciji. To lahko povzroči izvedbo dodatne prilagojene preiskovalne neklinične raziskave na ju-



Slika 3: Prikaz razvojnih razlik posameznih organskih sistemov med podgano in človekom v odvisnosti od starosti (prirejeno po (15)).

Figure 3: Demonstration of developmental differences of individual organ systems between rat and human depending on age (adapted from (15)).

venilnih živalih za nadaljnje opredeljevanje občutljivega starostnega okna in/ali razumevanje morebitnega mehanizma toksičnosti (15).

### 4.3 IZBIRA ŽIVALI ZA IZVEDBO NEKLINIČNE RAZISKAVE NA JUVENILNIH ŽIVALIH

Če rezultat vrednotenja teže dokazov pomeni izvedbo neklinične raziskave na juvenilnih živalih, je običajno zadostna izvedba na eni vrsti živali, ki naj bi bila enaka uporabljeni v raziskavi s ponovitvami odmerkov, prednostno pa naj bi to bil glodavec. Izvedba na dveh vrstah je v primeru prve uporabe zdravila v pediatrični populaciji ali če obstaja več specifičnih razlogov za vpliv na postnatalni razvoj. Pri izbiri ustrezne vrste živali je treba upoštevati več dejavnikov (15):

- razumevanje razvoja farmakološke ali toksikološke tarče (npr. receptor) pri živali v primerjavi s ciljno pediatrično populacijo;
- prednostno izbrati vrsto živali, na kateri so bile izvedene raziskave s ponovljenimi odmerki, kar omogoča primerjavo med toksičnostjo in izpostavljenostjo med juvenilno in odraslo živaljo;
- toksikološke tarčne organe;
- podobnost s človeškimi lastnostmi ADME;
- tehnično in praktično izvedljivost.

Za biološka zdravila pogosto velja, da so nečloveški primati največkrat edina ustrežna vrsta za izvajanje toksikoloških raziskav. Te vrste pa so z vidika znanstvenih in praktičnih razlogov zelo zahtevne za izvedbo nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih, zlasti v času dojenja (npr. hranjenje, transport in bivanje matere z mladičkom) (15).

Starost živali, ki jih vključujemo v neklinične raziskave na juvenilnih živalih, mora ustrezati razvojni stopnji najmlajše predvidene ciljne pediatrične populacije in je odvisna od primerjave razvojnega obdobja organa oz. organskega sistema, na katerem se kažejo toksikološki učinki. Vsi organi med živalskimi vrstami se ne razvijajo sorazmerno enako hitro v primerjavi s človekom, zato starost živali določimo glede na razvojno stopnjo kritičnega organa ali posebej ranljiv sistem v razvoju najmlajše ciljne pediatrične populacije (15).

Pomembna razlika med izvedbo neklinične raziskave na juvenilnih živalih in raziskave na odraslih živalih je tudi v trajanju, saj se zaradi razlike med juvenilnimi živalmi in človekom v trajanju razvoja posameznega organa v vseh primerih ne upošteva priporočilo smernice M3. Če je zdravilo namenjeno uporabi v času adolescence, običajno uporabijo

glodavce kot primeren živalski model za dajanje zdravila do odraslosti. Nečloveški primati za te namene niso primerni, saj traja od rojstva do odraslosti več let, poleg tega pa je med njimi velika interindividualna razlika med začetkom pubertete in razvoja do odraslosti (15).

Izbrani režim odmerjanja mora biti takšen, da z njim dosežemo in ohranjamo ustrezno izpostavljenost med kritičnimi razvojnimi obdobji. To pomeni, da režim odmerjanja pri juvenilnih živalih običajno ni enak režimu v klinični uporabi. Če se zdravilo v klinični uporabi odmerja enkrat tedensko, je lahko primernejše pogostejše odmerjanje v neklinični raziskavi na juvenilnih živalih. Ravno obratno pa velja v primerih morebitne akumulacije učinkovine v juvenilni živali, ko je treba interval odmerjanja povečati (15).

## 5 VREDNOTENJE UČINKOV PO PRENEHANJU DAJANJA ZDRAVILNE UČINKOVINE

Vključitev obdobja vrednotenja po prenehanju dajanja zdravilne učinkovine juvenilnim živalim se v splošnem priporoča iz dveh razlogov, ker s tem ugotovimo, ali (15):

- so opaženi učinki reverzibilni, persistentni ali progresivni, in ali
  - se kateri učinki pojavijo pozneje v razvojni dobi kot posledica izpostavljenosti v zgodnji dobi življenja.
- Pri tem je pomembno, da je obdobje opazovanja po prenehanju dajanja zdravila zadostno, da omogoča izzvenenje učinka, pri čemer je treba upoštevati eliminacijo učinkovine. Ni pa treba čakati na popolno izzvenenje; dovolj je, da dokažemo trend k izboljšanju ob hkratni znanstveni oceni, da se bo trend nadaljeval k popolnemu prenehanju toksičnega učinka. Podobno velja za nereverzibilni učinek, ki ga ni treba dokazovati z neklinično raziskavo na juvenilnih živalih, če je učinek dobro opisan in dokazan v raziskavah na odraslih živalih (15).

Nekateri toksični učinki so takšne narave, da jih lahko znanimo le po določeni stopnji zrelosti opazovane živali. Sem sodijo npr. učinki na učenje in spomin, ki jih lahko vrednotimo le pri živalih ustrezne zrelosti, ko so bile v vseh kritičnih časovnih oknih razvoja obremenjene z zdravilom, ki ga do obdobja ustrezne zrelosti niso prejemale. Tovrsten pristop je primeren za glodavce, medtem ko je za neglodavce manj primeren zaradi daljšega razvojnega obdobja, velike variabilnosti med osebki ter manjše količine in ne tako dobro uveljavljenih ocenjevalnih metod za prepoznavanje zapoznelega ali spremenjenega razvoja (15).



## 6 NAČIN APLIKACIJE IN FORMULACIJA

Tako kot pri drugih toksikoloških raziskavah je tudi pri nekliničnih raziskavah na juvenilnih živalih priporočljivo, da uporabimo enak način aplikacije zdravila, kot bo v klinični praksi (če je izvedljivo), pri čemer je ključnega pomena doseganje zadostne systemske izpostavljenosti. V primeru težav pri praktični izvedbi takšnega načina aplikacije je seveda treba razmisliti o drugih načinih aplikacije (peroralni način aplikacije pri podgani za dermalni pripravek). Z odraščanjem živali lahko med izvedbo raziskave tudi spremenimo način aplikacije (ko je izvedljivo, iz subkutane aplikacije preidemo na intravensko) (15).

Optimalna izvedba toksikoloških raziskav je s končno formulacijo zdravila, kar še posebej velja za zdravila za peroralno aplikacijo, saj je pri teh zdravilih običajno velika razlika v sestavi v primerjavi z zdravilom za odraslo populacijo (npr. sirup v primerjavi s kapsulo), hkrati je treba preveriti varnost zdravila z vsemi pomožnimi snovmi. Pomembna razlika med zdravili za pediatrično populacijo in odrasle je običajno pri tekočih pripravkih, saj je za prvo navedena pogosto nižja koncentracija zdravilne učinkovine, kar pomeni večji volumen, ki ga je treba aplicirati preizkusnim živalim. To lahko povzroči napolnitev želodca z zdravilom, kar lahko vodi v zmanjšan vnos hrane in posledično do pomanjkanja določenih hranil oz. prehranjenosti, kar lahko zamaskira toksični učinek zdravila ali pa daje lažno pozitiven rezultat (21).

### 6.1 IZBIRA ODMERKA

Pri izbiri odmerka je pomembno, da za neželene učinke dosežemo razmerje odmerka-učinek ter določimo odmerk, pri katerem ni opaziti neželenih učinkov (*no observed adverse effect level*, NOAEL) pri juvenilnih živalih. Raziskavo izvajamo z več odmerki, od katerih najvišji odmerk ne sme biti tako visok, da povzroča znake izrazite toksičnosti (npr. motnje v razvoju in rasti, kar oteži vrednotenje). Eden od odmerkov mora biti primerljiv z odmerkom v klinični uporabi (če je izvedljivo). Določitev odmerkov mora do določene mere sovpadati tudi z odmerki, uporabljenimi pri odraslih živalih, zaradi možnosti primerjave učinkov med juvenilnimi in odraslimi živalmi (15).

Z rastjo in razvojem živali se lahko pomembno spremenijo lastnosti ADME, kar posledično vpliva na izpostavljenost živali zdravilu, zato je treba odmerk prilagoditi, da se ohranja

razmeroma konsistentna izpostavljenost in klinična ustreznost. Običajno se odmerk ne spremeni več kot enkrat (15).

## 7 KONČNE TOČKE

V splošnem mora vsaka neklinična raziskava na juvenilnih živalih vsebovati osnovne končne točke (*core endpoints*), navedene v smernici S11, ki so: smrtnost in klinična opazanja, rast, uživanje/vnos hrane, spolni razvoj, klinična patologija, anatomsko patologija in toksikokinetika. Poleg teh lahko vključimo tudi dodatne končne točke, zlasti v primerih nadaljnjih raziskav, ko ugotovimo toksične učinke pri izvedbi raziskave z osnovnimi končnimi točkami, vendar praviloma nikoli ne vključimo vseh navedenih dodatnih končnih točk (15).

Dodatne končne točke, ki jih raziskava lahko vključuje, so druge končne točke rasti, ki niso bile spremljane med osnovnimi končnimi točkami, ocena kosti, klinična patologija dodatnih parametrov, ki niso vključeni pod osnovno končno točko, anatomsko patologija dodatnih parametrov, ki niso vključeni pod osnovno končno točko, preiskave oči, ocena osrednjega živčnega sistema, ocena reproduktivne funkcije, ocena funkcije imunskega sistema (15).

## 8 ZDRAVILA, NAMENJENA IZKLJUČNO PEDIATRIČNI POPULACIJI ALI UPORABLJENA NAJPREJ V PEDIATRIJI

Pred izvedbo kakršne koli klinične raziskave na pediatrični populaciji je treba zdravilo preizkusiti na zdravih odraslih prostovoljcih. To najprej vključuje raziskavo toksičnosti pri ponovljenih odmerkih na glodavcih in neglodavcih, kot tudi raziskave varnostne farmakologije in genetske toksičnosti. Raziskave, ki jih izvedemo pred prvo uporabo pri človeku, so lahko standardne toksikološke raziskave s ponovljenimi odmerki na dveh vrstah živali, lahko pa izvedemo eno od teh ali obe na juvenilnih živalih, ki pa naj bi vključevali dodatne končne točke. Ta pristop lahko skrajša čas do uporabe zdravila v pediatrični populaciji, saj lahko zdravilo uvedemo že po prvem dajanju zdravila odraslim (15).

V določenih primerih lahko poteka razvoj zdravila za pediatrično populacijo tudi brez predhodnega preskušanja na odraslih prostovoljcih. To velja npr. v primeru varnostnega tveganja, če bi izpostavljenost takšnemu zdravilu predstavljala tveganje za te prostovoljce, ali v primerih, ko gre za zdravljenje življenje ogrožajočih stanj (15).

## 9 VREDNOTENJE PODATKOV

Vse pridobljene podatke, tako podatke preverjanja toksičnosti na odraslih kot tudi juvenilnih živalih, je treba gledati kot celoto in jih med seboj primerjati. Posebej je treba ovrednotiti relevantne spremembe med ugotovitvami na odraslih in juvenilnih živalih, prav tako pa tudi izrazite razlike v občutljivosti med njimi. Celotna interpretacija ugotovitev obsega tip, resnost in reverzibilnost učinkov, starost živali in izpostavljenost/odmerke, pri katerih so se pojavili učinki, vse to pa je treba interpretirati v luči uporabe pri pediatrični populaciji (15). Takšen pristop bi lahko opisali tudi kot holističen pristop obravnave podatkov.

Kar nekaj dejavnikov pa otežuje vrednotenje podatkov na tak način. Tako se lahko, odvisno od končnih točk in vrednotenih parametrov, razlikuje moč posamezne raziskave. Prav tako v vsaki raziskavi ni mogoče določiti krivulje odmerka-odziv. Če se pojavi neželeni učinek, se ta ne pojavi pri vseh živalih, prav tako pa vedno ni mogoče določiti subpopulacije glede na raven občutljivosti (21).

## 10 SKLEP

Razvoj zdravila in preverjanje toksičnih vplivov na pediatrično populacijo pred dajanjem zdravila na trg je zelo pomemben preskok in napredek k varni uporabi zdravil, ki sicer prvotno niso namenjena pediatrični populaciji, a iz historičnih izkušenj zdravljenja otrok hitro ugotovimo, da se takšna zdravila pogosto uporabljajo tudi v pediatriji. V preteklosti so imeli zdravniki bistveno manj podatkov o varnosti uporabe nekaterih zdravil pri otrocih in so bili odvisni od podatkov v literaturi, izkušenj drugih kolegov, metodologije pretvorb odmerkov za odrasle na pediatrično populacijo in lastnega znanja ter izkušenj. Tovrstno ekspe-

rimentiranje je v nekaterih primerih privedlo celo do najhujših možnih izidov zdravljenja. S sprejetjem zakonodajne obveze v EU, da je treba za vsa zdravila, razen opravičenih izjem, izdelati in poslati v pregled načrt pediatričnih preiskav, so za zdravila, registrirana po datumu začetka izvajanja Uredbe 1901/2006, na voljo tudi podatki o varnosti oz. toksičnih učinkih pri otrocih. Tovrstno preverjanje zahteva posebne vrste preiskav, ki pogosto zaradi primerljivosti vpliva na obdobje razvoja in odraščanja vključujejo tudi juvenilne živali. Da bi te živali uporabljali le takrat, ko je to treba in ko to pripomore k razrešitvi vprašanj oz. pomislekov glede varnosti, je Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini pri EMA tudi na podlagi Uredbe 1901/2006 sprejel smernice glede potreb za neklinična preskušanja zdravil za indikacije pri pediatrični populaciji na juvenilnih živalih. V bolj razširjeni in nadgrajeni obliki pa je ICH ob koncu leta 2020 sprejel novo smernico S11, ki podrobneje opisuje izvajanje nekliničnih raziskav na juvenilnih živalih, poudarja celovit pristop vrednotenja podatkov, pri katerem je teža dokazov poglobitnega pomena, ter poudarja pomen 3R. Zagotovo je bil to zelo težko pričakovan dokument, ki harmonizira izvajanje tovrstnih preskušanj, odgovarja na številna prej neodgovorjena vprašanja, predvsem pa zagotavlja varno uporabo zdravil za pediatrično populacijo.

## 11 LITERATURA

1. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Development pharmacology-drug disposition, action and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003; 349: 1157–62. doi: 10.1056/NEJMra035092.
2. Albert Ferro. Paediatric prescribing: why children are not small adults. *British Journal of Clinical Pharmacology* 351–353. 2014. DOI: 10.1111/bcp.12540.
3. Faqi A. S. *Juvenile Testing to Support Clinical Trials in Pediatric Population. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development, Second Edition*. 2017. Elsevier Inc.
4. Teigen A, Wang S., Thuy Truong B. et al. Off-label and unlicensed medicines to hospitalised children in Norway. *J Pharm Pharmacol*. 2017; 69(4): 432–438. doi: 10.1111/jphp.12581.
5. U. S. FOOD & DRUG Administration. *Drug Research and Children [INTERNET]*. 2016 Apr 05 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-information-consumers/drug-research-and-children>.
6. Jong GW. *Unlicensed and off-label drug use in children. Thesis, Erasmus University Rotterdam*. 2002.
7. European Union. *Regulation (EC) no. 1902/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 amending Regulation 1901/2006 on medicinal products for pediatric use. Official J Eur Union L378/20 2006a, 1–2.*

8. European medicines agency. COVID-19 vaccines: authorised [INTERNET]. [cited 2021 Oct 4]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorized>.
9. Baldrick P. The evolution of juvenile animal testing for small and large molecules. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 67(2): 125–35. doi: 10.1016/j.yrtph.2013.07.009.
10. Carleer J, Karres J. Juvenile animal studies and pediatric drug development: a European regulatory perspective. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2011; 92: 254–60. doi: 10.1002/bdrb.20310.
11. Zisowsky J, Krause A, Dingemans J. Drug development for pediatric populations: regulatory aspects. *Pharmaceutics* 2010; 2(4): 364–88. doi: 10.3390/pharmaceutics2040364.
12. Gilles V, Patricia B, Chris C., Andrew P Will the revised class waiver list make it [INTERNET]? *The Lancet Oncology*. Volume 16, ISSUE 9, e425–e426, 2015 Sep 1 [cited 2020 Oct 4]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(15\)00233-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(15)00233-8/fulltext).
13. European medicines agency. European Medicines Agency decision (P/0399/2019) [INTERNET]. 2019 Dec 4 [cited: 2020 Oct 10]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p/0399/2019-ema-decision-4-december-2019-agreement-paediatric-investigation-plan-granting-deferral-granting\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p/0399/2019-ema-decision-4-december-2019-agreement-paediatric-investigation-plan-granting-deferral-granting_en.pdf).
14. Baldrick P. Juvenile Animal Testing: Assessing Need and Use in the Drug Product Label. *Ther Innov Regul Sci* 2018; 52(5): 641–648. doi: 10.1177/2168479017750129.
15. European medicines agency. ICH guideline S11 on nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals – Step 5 [INTERNET]. 2020 Sep 26 [cited 2020 Oct 5]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-guideline-s11-nonclinical-safety-testing-support-development-paediatric-pharmaceuticals-step-5>.
16. GOV.UK. Annual Statistics of Scientific Procedures on Living [INTERNET]. 2021 Jul 15 [cited 2022 Jun 05]. Available from: <https://www.gov.uk/government/statistics/statistics-of-scientific-procedures-on-living-animals-great-britain-2020/annual-statistics-of-scientific-procedures-on-living-animals-great-britain-2020>.
17. Humane society international. UK animal experiment statistics indicate reluctance to embrace modern tools to advance British labs into the 21st century [INTERNET]. 2019 Jul 18 [cited: 2020 Oct 15]. Available from: <https://www.hsi.org/news-media/uk-animal-experiment-statistics-2018/>.
18. Comitee for human medicinal products. Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. Ref. EMEA/CHMP/SWP/169215/2005 [INTERNET]. 2008 Aug 01 [cited 2020 Oct 20]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-need-non-clinical-testing-juvenile-animals-pharmaceuticals-paediatric-indications\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-need-non-clinical-testing-juvenile-animals-pharmaceuticals-paediatric-indications_en.pdf).
19. European medicines agency. ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals – Step 5 (EMA/CPMP/ICH/286/1995) [INTERNET]. EMA; 2009 Dec [cited 2020 Oct 20]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation_en.pdf).
20. Batchelor HK, Marriott JF. Paediatric pharmacokinetics: key considerations. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 79(3): 395–404. doi: 10.1111/bcp.12267.
21. Lodola A., Stadler J. *Pharmaceutical toxicology in practice: a guide for non-clinical development*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2011.

# PREBAVNE LIPAZE IN NJIHOV POMEN PRI APLIKACIJI ZDRAVIL

## DIGESTIVE LIPASES AND THEIR SIGNIFICANCE IN DRUG DELIVERY

AVTORICI / AUTHORS:

asist. dr. Katarina Rede, mag. farm.  
prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: marija.bogataj@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Prebavni encimi imajo pomembno vlogo pri razgradnji hrane, saj katalizirajo kemijske reakcije razgradnje večjih molekul hranil v manjše enote, ki se lahko absorbirajo v prebavnem traktu. Ključni so pri razgradnji vseh treh skupin

### POVZETEK

Prebavni encimi imajo pomembno vlogo pri razgradnji hrane in marsikdaj tudi pri peroralni dostavi zdravilnih učinkovin. Ena izmed skupin prebavnih encimov so lipaze, katerih naloga je kataliza hidrolize lipidov, pri čemer nastanejo razgradni produkti, ki se lahko absorbirajo. Najpomembnejši prebavni lipazi pri človeku sta želodčna in pankreasna lipaza. Želodčna lipaza je acidostabilen encim, ki se izloča iz želodčne sluznice in začne z razgradnjo lipidov. Pankreasna lipaza, ki k lipolizi prispeva v največjem obsegu, se izloča iz trebušne slinavke v dvanajstnik in nadaljuje z razgradnjo lipidov. Proces razgradnje lipidov lahko vpliva na biološko uporabnost zdravilnih učinkovin, ki so vgrajene v lipidne dostavne sisteme, saj se lahko s pomočjo lipaz razgradijo komponente teh sistemov, in tudi na peroralna lipidna predzdravila. Poznavanje delovanja lipaz je zato pomemben dejavnik pri razvoju tovrstnih dostavnih sistemov in njihovem biofarmacevtskem vrednotenju.

### KLJUČNE BESEDE:

encim, lipidni dostavni sistemi, pankreasna lipaza, prebava, želodčna lipaza

### ABSTRACT

Digestive enzymes play an important role in food breakdown and they are also frequently involved in oral drug delivery. One of digestive enzyme groups is lipases, which catalyze the hydrolysis of lipids, resulting in the formation of digestion products that can be absorbed. The most important digestive lipases in humans are gastric and pancreatic lipases. Gastric lipase is an acid-stable enzyme, which is secreted from gastric mucosa. It initiates lipid digestion. Pancreatic lipase, which contributes to lipolysis to the greatest extent, is secreted from the pancreas into the duodenum and continues lipid digestion. The process of lipid digestion can also influence the bioavailability of a drug incorporated into lipid-based drug delivery systems, as components of these systems can be digested by lipases, and it can also affect oral lipid prodrugs. Therefore, knowledge about lipase activity is an important factor in the development





of these drug delivery systems and their biopharmaceutical evaluation.

#### KEY WORDS:

enzyme, digestion, gastric lipase, lipid-based drug delivery systems, pancreatic lipase

#### ALI STE VEDELI?

- Tetrahidrolipstatin, bolj znan pod imenom orlistat, zavira delovanje želodčne in pankreasne lipaze (25).
- Pankreasna lipaza pri zdravih osebah ni prisotna v želodcu (6, 28).
- Pri novorojenčkih, še zlasti pri nedonošenčkih, lahko želodčna lipaza delno kompenzira nizko aktivnost pankreasne lipaze (32).
- Aktivnost želodčne lipaze se s starostjo zmanjšuje. Velik preskok je viden po 50. letu starosti, saj se specifična aktivnost encima z 4700 U/g mukoze pred 50. letom zmanjša na 700 U/g mukoze po 60. letu (11).

makrohranil – ogljikovih hidratov, proteinov in maščob. Vendar prebavni encimi niso pomembni le pri prebavi hrane, temveč marsikdaj tudi pri aplikaciji zdravil.

Peroralni dostavni sistemi so po zaužitju izpostavljeni tem encimom, ki lahko vplivajo tako na zdravilno učinkovino kot na pomožne snovi. Dobro poznan primer je razgradnja peptidnih in proteinskih zdravilnih učinkovin s proteolitičnimi encimi v prebavilih, kar otežuje razvoj dostavnih sistemov za peroralno aplikacijo tovrstnih učinkovin. Manj pa je poznano, da so lahko tudi lipaze v prebavnem traktu pomembne za obnašanje nekaterih zdravil. Vplivajo lahko na lipidne dostavne sisteme, ki so eden izmed inovativnih pristopov za izboljšanje biološke uporabnosti težko topnih zdravilnih učinkovin. Namen članka je prikazati fiziološke lastnosti lipaz in predstaviti njihov pomen pri aplikaciji zdravil.

## 2 FUNKCIJA IN VRSTE PREBAVNIH LIPAZ

Lipaze so encimi, ki razgrajujejo trigliceride do digliceridov, monogliceridov, prostih maščobnih kislin in glicerola. Odgovorne so za prebavo prehranskih lipidov in tako ključne za absorpcijo lipidnih molekul v tankem črevesu (1, 2). Li-

pidi, ki jih uporabljamo v prehrani, so večinoma mešanice različnih trigliceridov, v manjšem deležu so prisotni še fosfolipidi, holesterol in vitamini, topni v maščobah (3, 4). Priporočen dnevni vnos maščob za odrasle je okoli 80 g na dan oz. približno 30 % energije naj bi pridobili z uživanjem maščob (5). V industrializiranih državah je dnevni vnos maščob pogosto večji – v povprečju med 100 in 150 g maščob dnevno (4, 6, 7). Navadno se absorbira več kot 95 % prehranskih lipidov, ki jih zaužijemo (4, 7). Ob odsotnosti oz. zmanjšani aktivnosti lipaz se trigliceridi ne razgradijo in zato ne absorbirajo, ampak se izločijo z blatom, kar ima lahko za posledico npr. izgubo tekočine, zmanjšanje telesne mase in pomanjkanje lipidotopnih vitaminov (2). Najpomembnejša dela prebavnega trakta, kjer poteka razgradnja lipidov, sta želodec in tanko črevo. Lipolitična aktivnost v prebavilih je rezultat delovanja večjega števila lipaz, ki so humana želodčna lipaza (HGL), humana pankreasna lipaza (HPL), kolipaza, karboksil ester hidrolaza, pankreasna fosfolipaza A2 in pankreasni lipazi podoben protein 2. Med njimi sta najpomembnejši HGL in HPL (8, 9). Lipolitično delovanje so zaznali tudi v ustni votlini, vendar je bilo to v primerjavi z aktivnostjo HGL zanemarljivo majhno (10, 11). Prav tako ni potrjeno, ali gre za lipazo, ki se izloča v ustno votlino (jezična lipaza), ali za encim mikrobnege izvora, ki je produkt ustne mikroflore, ali za posledico refluksa želodčne vsebine (12).

## 3 DELOVANJE PREBAVNIH LIPAZ

Lipaze sodijo v skupino esteraz, vendar so njihovi substrati molekule, ki so v vodi težko topne, za razliko od klasičnih esteraz, ki delujejo na vodotopne substrate. Lipaze so vodotopni encimi, toda njihova značilnost je delovanje na medfazni površini med vodo in oljem, tj. na površini maščobnih kapljic. Pomembno je, da se tudi njihovi substrati nahajajo na medfazi olje-voda, in posledično je aktivnost lipaz odvisna od koncentracije substrata na medfazni površini in od velikosti medfazne površine (8, 9, 13, 14). Prebava lipidov je kompleksen proces, ki poteka v več stopnjah: emulgiranje, hidroliza, micelizacija in na koncu absorpcija lipidnih razgradnih produktov v enterocite (15). Pri tem HGL in HPL ter drugi lipolitični encimi delujejo komplementarno in sinergistično (9, 16). Prebava lipidov se začne v želodcu z delovanjem HGL. K procesu še dodatno prispevajo kontrakcije želodčne mu-

skulature, ki želodčno vsebino dobro premešajo, da nastane emulzija. Prebava se nato nadaljuje v dvanajstniku z delovanjem HPL (slika 1) (15), ki se izloča iz trebušne slinavke skupaj z drugimi prebavnimi encimi in alkalno tekočino, ki nevtralizira kislo želodčno vsebino in regulira pH v lumnu tankega črevesa (9). V dvanajstnik se izloča tudi žolč, ki ima pomembno vlogo pri emulgiranju lipidov in lipidnih prebavnih produktov ter obenem prispeva k regulaciji pH. Soli žolčnih kislin in druge površinsko aktivne komponente žolča vključujejo lipidne molekule v različne koloidne strukture, kot so vezikli, mešani miceli in miceli, kar poveča solubilizacijsko kapaciteto tankega črevesa za lipidne razgradne produkte in tudi za zdravilne učinkovine. Solubilizacija lipidnih razgradnih produktov le-te odstrani z medfazne površine, kar olajša nadaljnjo razgradnjo lipidov in tako izboljša njihovo absorpcijo. Razgradni produkti, ki nastanejo pri lipolizi, se nato absorbirajo v enterocite (15, 17).

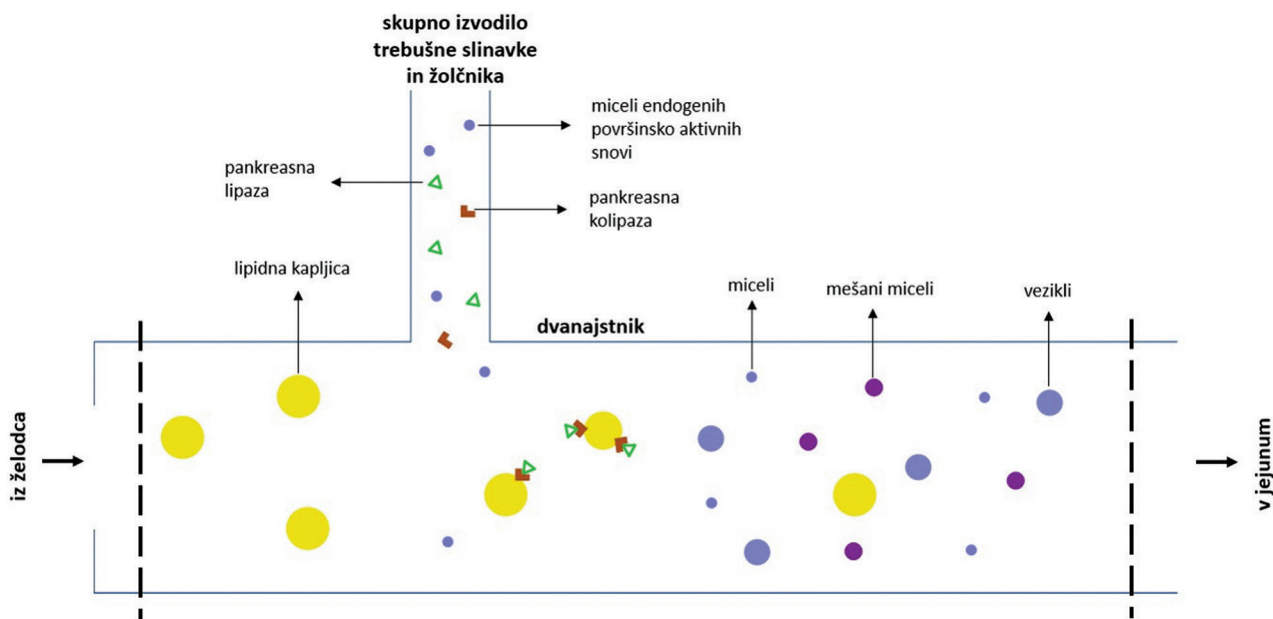
Lipaze cepijo estrsko vez med maščobno kislino in glicerolom (slika 2). V prvi stopnji razgradnje triglicerida nastane diglicerid in prosta maščobna kislina. Digliceridi so težko vodotopni in se preferenčno nahajajo na medfazi olje-voda. V drugi stopnji razgradnje se od diglicerida odcepi še ena prosta maščobna kislina in nastane monogli-

cerid. Monogliceridi so bolj polarni in lahko v vodnem okolju tvorijo in se vključujejo v različne koloidne strukture. V zadnji stopnji razgradnje iz monoglicerida nastane prosta maščobna kislina in glicerol (8). Za popolno absorpcijo lipidov je dovolj že razgradnja do monoglicerida in dveh prostih maščobnih kislin, saj se lahko v enterocite absorbirajo monogliceridi in proste maščobne kisline (15, 16). Vloga najpomembnejših encimov pri razgradnji trigliceridov, HGL in HPL, je podrobneje opisana v nadaljevanju.

## 4 ŽELODČNA LIPAZA

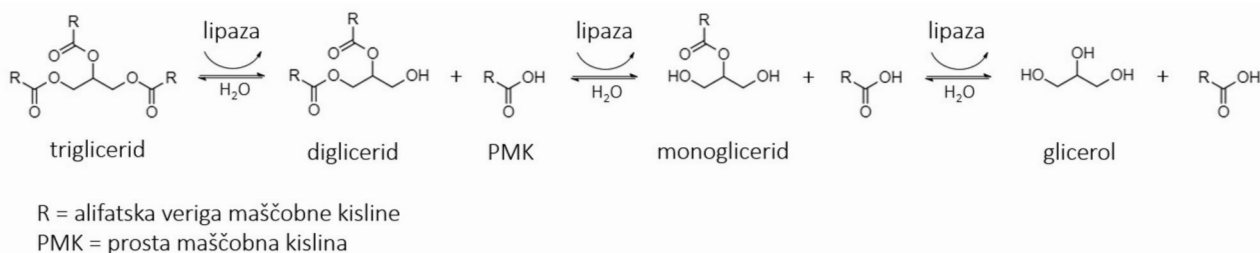
Hidroliza trigliceridov iz hrane se pri ljudeh začne v želodcu z delovanjem HGL, ki nastaja v glavnih celicah proksimalnega dela želodca (fundusa) (11) in se v lumen želodca izloča skupaj s pepsinogenom. Izločanje stimulira zaužitje obroka preko delovanja holinergičnega sistema (18). Za delovanje ne potrebuje koencima (19, 20).

Prisotnost encima navadno vrednotimo preko določanja njegove aktivnosti in ne le preko podajanja koncentracije,



Slika 1: Shema prebave lipidov v dvanajstniku. Težko vodotopna zdravilna učinkovina se med prebavo lahko nahaja v lipidni kapljici in v različnih koloidnih strukturah, kot so vezikli, mešani miceli in miceli (prirejeno po (15)).

Figure 1: Scheme of lipid digestion in duodenum. During digestion, a poorly water-soluble drug may be present in a lipid droplet and in different colloid structures such as vesicles, mixed micelles and micelles (adapted from (15)).



Slika 2: Kemijska reakcija razgradnje trigliceridov, ki jo katalizirajo lipaze.

Figure 2: Lipase-catalyzed chemical reaction of triglyceride degradation.

saj je delovanje encima odvisno od pogojev, ki jim je izpostavljen. Posledično se podatki o specifični aktivnosti HGL med seboj zelo razlikujejo, saj so odvisni od pogojev, pri katerih so izmerjeni, ali so določeni v celotni želodčni tekočini ali le za izoliran encim, od metode *in vitro*, uporabljene za vrednotenje aktivnosti, izbranega substrata, pH medija in sestave medija (16, 21–23). Za primerjavo – specifične aktivnosti encima, določene pri optimiziranih pogojih pri uporabi tributirina kot substrata, so bile bistveno višje (1300 U/mg) kot pri uporabi trdnega ali tekočega obroka za substrat (okoli 30 U/mg), torej kot pri pogojih, ki jih navadno najdemo v prebavnem traktu (21). Tudi *in vivo* je aktivnost HGL odvisna od številnih dejavnikov, kot so pH vrednost želodčne vsebine, motiliteta želodčne muskulature, koncentracija površinsko aktivnih snovi in od tega odvisno emulgiranje lipidov in velikost kapljic emulzije (24). HGL je acidostabilna in je aktivna pri pH med 2 in 7; izven tega območja pH se njena aktivnost naglo zmanjšuje. Največjo aktivnost izkazuje pri pH med 3 in 5 (23). Koncentracija HGL v želodčni tekočini na tešče (bazalni želodčni tekočini) znaša 100 µg/mL (16), vendar je možno tudi, da v stanju na tešče zaradi nizkega pH želodčne vsebine sploh ni aktivna (23, 25). Prisotnost HGL v bazalni želodčni tekočini so namreč dokazali preko vrednotenja aktivnosti pri višjih pH in/ali z optimalnimi substrati (22, 23, 26), kar pa ne odraža pogojev na tešče.

Po zaužitju obroka se pH v lumnu želodca dvigne z zelo nizkih vrednosti v stanju na tešče (1,0–1,5 po viru (27)) na vrednosti med 5 in 7. Dvig pH je odvisen od vrste obroka in njegove pufrne kapacitete (27). Aktivnost HGL se z dvigom pH poveča (22, 23, 25). Bazalna želodčna tekočina se z zaužitjem hrane razredči, kar sicer vpliva v smeri zmanjšanja koncentracije encima, vendar pride hkrati do povečanega izločanja HGL iz želodčne sluznice. Aktivnost encima v želodcu je tako močno odvisna od časa po obroku in od hitrosti praznjenja želodca, kljub temu da je izločanje HGL med prebavo obroka ves čas konstantno.

Bazalna koncentracija encima in pH sta bila v opisanih raziskavah dosežena po približno štirih urah od zaužitja obroka oz. ko je vsa hrana zapustila želodec (6, 16, 27, 28). HGL ostaja aktivna tudi pri pH dvanajstnika in naj bi bila pri zdravih posameznikih odgovorna za 7 oz. 7,5 % lipolize s hrano vnesenih maščob v tankem črevesu (16, 29). Celokupno, v želodcu in tankem črevesu, je pri zdravih osebah prispevek HGL k razgradnji trigliceridov 10–30 %; deleži se med raziskavami nekoliko razlikujejo (6, 16, 28, 30).

HGL je sposobna katalizirati razgradnjo dolgo- in kratkoverižnih trigliceridov s primerljivo hitrostjo (22), vendar pri dolgoverižnih trigliceridih nastanejo dolgoverižne proste maščobne kisline, ki so v vodi težko topne. Slednje nato zasedejo površino maščobnih kapljic in zavirajo delovanje HGL (22, 30, 31). Mehanizem tega procesa še ni povsem pojasnjen. Inhibicija naj bi se zgodila približno eno uro od začetka razgradnje lipidov, vendar je pri emulzijah z drobnimi kapljicami proces lahko zakasnen (31). Po prehodu želodčne vsebine v dvanajstnik endogene površinsko aktivne snovi solubilizirajo dolgoverižne proste maščobne kisline, kar naj bi omogočilo ponovno delovanje HGL v lumnu zgornjega tankega črevesa (30). V pogojih *in vitro* bi lahko HGL sama, brez prisotnosti HPL, v celoti razgradila lipide iz obroka, vendar bi za to potrebovala več časa kot HPL, ker je prisotna v nižjih koncentracijah in ne zaradi manjše specifične aktivnosti v primerjavi s HPL. Da bi bila HGL enako učinkovita kot HPL pri razgradnji lipidov iz hrane, bi morala biti njena koncentracija v prebavnem traktu šestkrat večja (21). Novorojenčki, predvsem nedonošenčki, imajo fiziološko znižano koncentracijo HPL, ki se kompenzira preko delovanja HGL (32).

Pri osebah z zmanjšanim eksokrinim delovanjem trebušne slinavke (posledica kroničnega pankreatitisa, alkoholizma, cistične fibroze ipd.) je celokupna lipolitična aktivnost v prebavnem traktu manjša kot pri zdravih osebah, saj se HPL v manjši meri izloča iz trebušne slinavke. Delež pri-

spevka HGL k lipolitični aktivnosti je lahko tako bistveno večji kot pri zdravih posameznikih, vendar je kljub temu celokupna lipolitična aktivnost zmanjšana (29, 30, 33). Večji prispevek HGL k razgradnji lipidov pri teh posameznikih predvidoma ni posledica povečanega izločanja HGL v želodcu, ampak večje aktivnosti HGL v dvanajstniku v primerjavi z zdravimi osebami. To se verjetno zgodi zaradi nižjega pH v tankem črevesu, ki ga imajo ti bolniki v primerjavi z zdravimi (29, 33). Klinične raziskave so pokazale, da v primerih hude oblike insuficience eksokrine funkcije trebušne slinavke HGL lahko le delno kompenzira pomanjkanje HPL, ne more pa celokupno normalizirati lipolitične aktivnosti v prebavnem traktu (30).

## 5 PANKREASNA LIPAZA

Najpomembnejši lipolitični encim pri človeku je HPL, saj ga je količinsko daleč največ izmed prebavnih lipaz (8, 16, 21). HPL nastaja v acinarnih celicah trebušne slinavke in se izloča skozi njeno izvodilo ter nato preko skupnega izvodila trebušne slinavke in žolčnika v lumen dvanajstnika (1, 8, 9). Izločanje je stimulirano z delovanjem holinergičnega živčevja in hormonskega sistema (holecistokinin), ki se aktivirata po zaužitju obroka (18). Več kot je maščob v hrani, večje je izločanje HPL (30). Izločanje HPL je uravnano tudi s praznjenjem želodca (16).

Molekula HPL je glikoprotein s polipeptidno verigo, ki tvori dve ločeni domeni – ena je pomembna za vezavo na medfazno površino in vsebuje aktivno mesto, druga vsebuje vezavno mesto za kolipazo (34–36). Ko se HPL izloči iz trebušne slinavke, mora najprej priti do obsežnih konformacijskih sprememb, da se substrat lahko veže v aktivno mesto (9, 36). V zaprti konformaciji je namreč aktivno mesto pokrito z zanko, kar onemogoča dostop substrata. Za odprtje zanke oz. za pretvorbo v odprto konformacijo je potrebna vezava HPL na medfazno površino. V tankem črevesu so medfazne površine večinoma zasedene zaradi prisotnosti površinsko aktivnih snovi (soli žolčnih kislin, fosfolipidi) in proteinov, zato je za vezavo HPL na medfazno površino potrebna prisotnost kolipaze (37).

Kolipaza je polipeptidni kofaktor, ki se v dvanajstniku izloča iz trebušne slinavke v neaktivni obliki (prokolipaza) in se aktivira šele pod vplivom delovanja tripsina. Kolipaza sama nima lipolitične aktivnosti, ampak se veže na HPL v razmerju 1 : 1 in s tem omogoči vezavo HPL na površino li-

pidne kapljice (38). Do nastanka kompleksa med HPL in kolipazo lahko pride v raztopini, afiniteta vezave pa je povečana ob prisotnosti lipidov (39).

V želodčni vsebini, ki zapusti želodec in preide v dvanajstnik, so lipidi večinoma prisotni v obliki lipidnih kapljic (tj. emulgirani). K temu prispeva mehanska obremenitev vsebine želodca in delna razgradnja trigliceridov, ki jo katalizira delovanje HGL. Produkti lipolize namreč sodelujejo pri emulgiranju in prispevajo k povečanju medfazne površine, ki je nato na voljo za delovanje HGL (6, 28). Prebavljajoča se hrana ob vstopu v dvanajstnik tako vsebuje okoli 10–20 % prostih maščobnih kislin, ki so pri pH dvanajstnika delno ionizirane in prispevajo k tvorbi emulzije (9). Delovanje HGL uravnava emulgiranje lipidov, hkrati pa obseg emulgiranja lipidov uravnava hitrost lipolize, saj preko spremembe medfazne površine in drugih mehanizmov vpliva na delovanje HGL in HPL (6, 21, 22, 40). V dvanajstniku so prisotni tudi drugi lipolitični encimi, ki se prav tako izločajo iz trebušne slinavke (karboksil ester hidrolaza, pankreasna fosfolipaza A2 in pankreasni lipazi podoben protein 2). To se odraža v še nekoliko večji lipolitični aktivnosti, kar so pokazali z *in vitro* primerjavo lipolitične aktivnosti črevesne tekočine in izolirane HPL (21).

Višji pH v dvanajstniku glede na kisel pH v želodcu je ključen za delovanje HPL (1), saj pride pri pH pod 3 do ireverzibilnih strukturnih sprememb in encim agregira. HPL je stabilna v območju pH med 3 in 6,5, čeprav lahko že pri pH, manjšem od 5, vidimo strukturno destabilizacijo, ki je reverzibilna (41). Podatki o območju pH, v katerem je HPL aktivna, se med viri precej razlikujejo; omenjene vrednosti so znotraj intervala pH 4,5 in 9,5 (1, 8, 9). Navedeno območje pH so določili *in vitro*, pri aplikaciji *in vivo* pa tako visoke vrednosti pH niso dosežene.

Po zaužitju obroka se koncentracija HPL poveča pet- do desetkrat v primerjavi s stanjem na tešče (42). Koncentracija HPL po obroku je odvisna od količine lipidov v obroku in časa, ki je minil od zaužitja obroka (30). Aktivnost HPL je povezana s koncentracijo encima in pogoji, v katerih se encim nahaja, odvisna je od metode *in vitro*, ki jo uporabimo za vrednotenje aktivnosti, od substrata in od tega, ali je aktivnost določena v celotni črevesni tekočini ali le za izoliran encim (16, 21, 43). Tako je bila specifična aktivnost HPL, določena pri optimiziranih pogojih s tributirinom, 8000 U/mg, pri uporabi tekočega ali trdnega obroka, tj. pogojih, ki jih navadno najdemo v prebavnem traktu, pa 12 oz. 47 U/mg (21).

Med posamezniki so velika nihanja v aktivnosti HPL, ki jih lahko pojasnimo z razlikami v izločanju HPL, praznjenju želodca in redčitvijo črevesne tekočine z obrokom (43).



Pomembne so prehranjevalne navade posameznika (30), aktivnost HPL pa se zmanjšuje tudi s staranjem (11). Prav tako je pri določenih bolezenskih stanjih, kot je npr. kronični pankreatitis, aktivnost HPL lahko zmanjšana. Pri bolnikih s hudo obliko te bolezni so izmerili okoli 10–40-krat manjšo aktivnost kot pri zdravih posameznikih (30).

## 6 POMEN LIPAZ ZA ZDRAVILA

Vpliv delovanja prebavnih lipaz na zdravila so najpogosteje proučevali pri lipidnih dostavnih sistemih, med katere uvrščamo lipidne raztopine, emulzije, liposome, trdne lipidne nanodelce, nanostrukturirane lipidne nosilce in samoemulgirajoče dostavne sisteme. Najpogosteje vsebujejo olja, površinsko aktivne snovi in/ali sotpila (1). Lahko gre za relativno enostavne formulacije z eno lipidno pomožno snovjo (npr. oleinska kislina, koruzno olje itd.) ali zapletene dostavne sisteme z več kot štirimi komponentami, ki jih združimo v ustreznem razmerju. V zadnjem obdobju so zelo aktualni samoemulgirajoči sistemi. Gre za brezvodne predkoncentrate, ki se v prebavnem traktu dispergirajo in tvorijo emulzijo, ki nato predstavlja rezervoar za prenos zdravilne učinkovine v raztopljenem stanju do mesta absorpcije. Zlasti velik potencial za peroralno dostavo zdravilnih učinkovin so pokazali predkoncentrati, ki po dispergiranju tvorijo mikroemulzijo, saj imajo obsežno zmožnost solubilizacije težko topnih učinkovin (3).

V lipidne dostavne sisteme navadno vgrajujemo težko topne zdravilne učinkovine, saj lipidne pomožne snovi pripomorejo k njihovi solubilizaciji in posledično boljši biološki uporabnosti teh zdravilnih učinkovin. Vendar pa so lahko lipidne pomožne snovi po aplikaciji podvržene delovanju lipaz v prebavnem traktu, kar pogosto vpliva na sproščanje zdravilne učinkovine in na njeno absorpcijo. Posledica delovanja lipaz je lahko obarjanje zdravilne učinkovine, kar je možno do neke mere ponazoriti s poskusi sproščanja *in vitro*, kjer je upoštevana razgradnja lipidnih komponent (1, 44). Na primeru lipidnih formulacij z danazolom so pokazali, da je do obarjanja zdravilne učinkovine, opaženega *in vitro*, verjetno prišlo tudi *in vivo* in se odražalo v nižjih plazemskih koncentracijah (45). Poznavanje vplivov prebavnih lipaz na posamezne lipidne pomožne snovi in na lipidne dostavne sisteme kot celoto je torej relevantno za uspešno pripravo in biofarmacevtsko vrednotenje takšnih zdravil (1, 44). Primeri zdravilnih učinkovin, ki so na trgu v obliki peroralnih li-

pidnih dostavnih sistemov so ciklosporin A, ritonavir, sakvinavir, tretinoin, kalcitriol in dutasterid (3).

Lipaze imajo ključno vlogo tudi pri lipidnih predzdravilih. V lipidnih predzdravilih imajo zdravilne učinkovine kovalentno vezano lipidno molekulo, kot so maščobne kisline, digliceridi ali fosfogliceridi. Lipaze v prebavilih cepijo vez med zdravilno učinkovino in lipidnim delom molekule ter tako omogočijo sprostitve aktivne oblike učinkovine. Namen oblikovanja lipidnih predzdravil je lahko zmanjšanje neželenih učinkov, npr. zaščita želodčne sluznice, in načrtovanje absorpcije preko limfatičnega sistema (46). Raziskava na podganah je tako pokazala, da lipidno predzdravilo acetylsalicilne kisline ne draži želodčne sluznice, medtem ko so neželeni učinki same acetylsalicilne kisline na sluznico prebavnega trakta pogosti (47). Za peptidno učinkovino v obliki lipidnega predzdravila so v raziskavi *in vitro* pokazali večjo stabilnost ob izpostavljenosti  $\alpha$ -kimotripsinu, v primerjavi s samo učinkovino. Test *in vitro* je tudi pokazal, da je peptidna učinkovina po razgradnji predzdravila s pankreasno lipazo izkazovala ustrezno aktivnost (48).

## 7 SKLEP

Poznavanje delovanja lipaz in procesa hidrolize lipidov iz hrane je pomemben del razumevanja fizioloških dogajanj v prebavnem traktu. Dodatno imajo prebavne lipaze ključno vlogo pri dogajanju po peroralni aplikaciji nekaterih zdravil, saj lahko vplivajo na sproščanje in s tem tudi na absorpcijo zdravilnih učinkovin preko delovanja na pomožne snovi v formulaciji pri lipidnih dostavnih sistemih ali preko neposrednega delovanja na lipidna predzdravila. Dobro poznavanje vpliva encimov na dostavne sisteme je tako pomembno pri razvoju novih lipidnih dostavnih sistemov in modelov *in vitro* za njihovo vrednotenje, saj encimska razgradnja lahko močno vpliva na obnašanje teh sistemov.

## 8 LITERATURA

1. Joyce P, Whitby CP, Prestidge CA. Nanostructuring biomaterials with specific activities towards digestive enzymes for controlled gastrointestinal absorption of lipophilic bioactive molecules. *Adv Colloid Interface Sci.* 2016;237:52-75.

2. Lowe ME. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:141-58.
3. Gibson L. Lipid-based excipients for oral drug delivery. In: Hauss DJ, editor. *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs.* New York: Informa Healthcare; 2007. p. 33-61.
4. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci.* 2007;52(1):1-17.
5. NIJZ. Referenčne vrednosti za energijski vnos ter vnos hranil [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 17]. Available from: [https://www.dobertekslovenija.si/wp-content/uploads/2017/10/2016\\_referencne\\_vrednosti\\_za\\_energijski\\_vnos\\_ter\\_vnos\\_hranil\\_17022016.pdf](https://www.dobertekslovenija.si/wp-content/uploads/2017/10/2016_referencne_vrednosti_za_energijski_vnos_ter_vnos_hranil_17022016.pdf)
6. Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, et al. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):G372-81.
7. Mu H, Hoy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res.* 2004;43(2):105-33.
8. Bakala N'Goma JC, Amara S, Dridi K, Jannin V, Carriere F. Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Ther Deliv.* 2012;3(1):105-24.
9. Scharpé S, Uyttenbroeck W, Samyn N. Pancreatic enzyme replacement. In: Albert L, Simon S, editors. *Pharmaceutical enzymes.* New York: Taylor & Francis; 1997. p. 187-221.
10. DeNigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC, Hamosh P. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1988;959(1):38-45.
11. Moreau H, Laugier R, Gargouri Y, Ferrato F, Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology.* 1988;95(5):1221-6.
12. Lai WYW, Chua JWM, Gill S, Brownlee IA. Analysis of the lipolytic activity of whole-saliva and site-specific secretions from the oral cavity of healthy adults. *Nutrients.* 2019;11(1):191.
13. Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME, Miller R. Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009;147-148:237-50.
14. Saktaweewong S, Phinyocheep P, Ulmer C, Marie E, Durand A, Inprakhon P. Lipase activity in biphasic media: Why interfacial area is a significant parameter? *J Mol Catal B Enzym.* 2011;70(1):8-16.
15. Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(3):231-48.
16. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology.* 1993;105(3):876-88.
17. Holm R, Mullertz A, Mu H. Bile salts and their importance for drug absorption. *Int J Pharm.* 2013;453(1):44-55.
18. Borovicka J, Schwizer W, Mettraux C, Kreiss C, Remy B, Asal K, et al. Regulation of gastric and pancreatic lipase secretion by CCK and cholinergic mechanisms in humans. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 1):G374-80.
19. Bodmer MW, Angal S, Yarranton GT, Harris TJ, Lyons A, King DJ, et al. Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1987;909(3):237-44.
20. Roussel A, Canaan S, Egloff MP, Riviere M, Dupuis L, Verger R, et al. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J Biol Chem.* 1999;274(24):16995-7002.
21. Carriere F, Renou C, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, et al. The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. *Gastroenterology.* 2000;119(4):949-60.
22. Gargouri Y, Pieroni G, Riviere C, Sauniere JF, Lowe PA, Sarda L, et al. Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology.* 1986;91(4):919-25.
23. Ville E, Carriere F, Renou C, Laugier R. Physiological study of pH stability and sensitivity to pepsin of human gastric lipase. *Digestion.* 2002;65(2):73-81.
24. Koziolk M, Carriere F, Porter CJH. Lipids in the stomach - implications for the evaluation of food effects on oral drug absorption. *Pharm Res.* 2018;35(3):55.
25. Carriere F, Renou C, Ransac S, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, et al. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):G16-28.
26. Pedersen PB, Vilmann P, Bar-Shalom D, Mullertz A, Baldursdottir S. Characterization of fasted human gastric fluid for relevant rheological parameters and gastric lipase activities. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3 Pt B):958-65.
27. Sams L, Paume J, Giallo J, Carriere F. Relevant pH and lipase for *in vitro* models of gastric digestion. *Food Funct.* 2016;7(1):30-45.
28. Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, et al. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol.* 1996;271(1 Pt 1):G172-83.
29. Abrams CK, Hamosh M, Dutta SK, Hubbard VS, Hamosh P. Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology.* 1987;92(1):125-9.
30. Carriere F, Grandval P, Renou C, Palomba A, Prieri F, Giallo J, et al. Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(1):28-38.
31. Pafumi Y, Lairon D, de la Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, et al. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *J Biol Chem.* 2002;277(31):28070-9.
32. Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB, Hamosh P. Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants. *J Clin Invest.* 1981;67(3):838-46.
33. Abrams CK, Hamosh M, Hubbard VS, Dutta SK, Hamosh P. Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J Clin Invest.* 1984;73(2):374-82.
34. De Caro A, Figarella C, Amic J, Michel R, Guy O. Human pancreatic lipase: a glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1977;490(2):411-9.
35. Lowe ME, Rosenblum JL, Strauss AW. Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA. *J Biol Chem.* 1989;264(33):20042-8.
36. Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature.* 1990;343(6260):771-4.
37. van Tilbeurgh H, Egloff MP, Martinez C, Rugani N, Verger R, Cambillau C. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* 1993;362(6423):814-20.
38. Erlanson-Albertsson C. Pancreatic colipase. Structural and physiological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1125(1):1-7.
39. Patton JS, Albertsson PA, Erlanson C, Borgstrom B. Binding of porcine pancreatic lipase and colipase in the absence of substrate studies by two-phase partition and affinity chromatography. *J Biol Chem.* 1978;253(12):4195-202.



40. Bernback S, Blackberg L, Hernell O. Fatty acids generated by gastric lipase promote human milk triacylglycerol digestion by pancreatic colipase-dependent lipase. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1001(3):286-93.
41. Ranaldi S, Belle V, Woudstra M, Rodriguez J, Guigliarelli B, Sturgis J, et al. Lid opening and unfolding in human pancreatic lipase at low pH revealed by site-directed spin labeling EPR and FTIR spectroscopy. *Biochemistry*. 2009;48(3):630-8.
42. Riethorst D, Mols R, Duchateau G, Tack J, Brouwers J, Augustijns P. Characterization of human duodenal fluids in fasted and fed state conditions. *J Pharm Sci*. 2016;105(2):673-81.
43. Sternby B, Nilsson A, Melin T, Borgstrom B. Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents. Radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand J Gastroenterol*. 1991;26(8):859-66.
44. Fatouros DG, Müllertz A. Using *in vitro* dynamic lipolysis modeling as a tool for exploring IVIVC relationships for oral lipid-based formulations. In: Hauss DJ, editor. *Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs*. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 257-71.
45. Cuine JF, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Porter CJ. Increasing the proportional content of surfactant (Cremophor EL) relative to lipid in self-emulsifying lipid-based formulations of danazol reduces oral bioavailability in beagle dogs. *Pharm Res*. 2007;24(4):748-57.
46. Zaro JL. Lipid-based drug carriers for prodrugs to enhance drug delivery. *AAPS J*. 2015;17(1):83-92.
47. Carter GW, Young PR, Swett LR, Paris GY. Pharmacological studies in the rat with [2-(1,3-didecanoyloxy)-propyl]2-acetyloxybenzoate (A-45474): an aspirin pro-drug with negligible gastric irritation. *Agents Actions*. 1980;10(3):240-5.
48. Delie F, Couvreur P, Nisato D, Michel JB, Puisieux F, Letourneux Y. Synthesis and *in vitro* study of a diglyceride prodrug of a peptide. *Pharm Res*. 1994;11(8):1082-7.

# POMEN CISTEINSKIH PEPTIDAZ PRI NEURODEGENERATIVNIH BOLEZNIH

## IMPORTANCE OF CYSTEINE PEPTIDASES IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Lara Bolčina, mag.farm.<sup>1</sup>  
prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.<sup>1, 2</sup>  
izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Inštitut Jožef Stefan,  
Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: bolcina.lara@gmail.com

## 1 UVOD

Peptidaze so proteolitični encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi (1). Sprva je bila vloga peptidaz poznana le pri razgradnji proteinov v prebavni verigi, kasneje pa se je izkazalo, da je njihova vloga v človeškem organizmu bistveno kompleksnejša (1). Peptidaze s svojim delovanjem uravnavajo številne biološke procese v organizmu, kot so

## POVZETEK

Živčni sistem predstavlja široko raziskovalno področje za razvoj novih učinkovin, primernih za zdravljenje nevroloških in neurodegenerativnih bolezni. Pri tem imajo pomembno vlogo cisteinske peptidaze in drugi lizosomski proteini, ki s svojim delovanjem vplivajo na sintezo in razgradnjo možganskih peptidov ter tako regulirajo številne fiziološke in patološke procese v organizmu. Ključni pomen pri z vnetjem povezani neurodegeneraciji ima aktivirana mikroglia, ki s sproščanjem cisteinskih peptidaz vpliva na razvoj Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni. Proteolitično aktivnost cisteinskih peptidaz lahko regulirajo endogeni ali eksogeni zaviralci; slednji odpirajo možnosti za razvoj novih terapevtskih pristopov za zdravljenje neurodegenerativnih bolezni.

## KLJUČNE BESEDE:

Alzheimerjeva bolezen, cisteinski katepsini, neurodegeneracija, Parkinsonova bolezen, vnetni odziv

## ABSTRACT

The nervous system represents a broad field of potential pharmacological targets suitable for the development of new compounds for the treatment of neurological and neurodegenerative diseases. To date, a lot of research has focused on the role of cysteine peptidases, which play an important role in degradation of brain peptides playing either a neuroprotective or neurodegenerative role. Activated microglia has a significant role in inflammation-related neurodegeneration. By releasing cysteine cathepsins it promotes the development of Alzheimer's and Parkinson's disease. The proteolytic activity of cysteine cathepsins can be regulated by endogenous or exogenous inhibitors. Exogenous inhibitors open up possibilities for the development of new therapeutic approaches for the treatment of neurodegenerative diseases.

## KEY WORDS:

Alzheimer's disease, cysteine cathepsins, inflammation, neurodegeneration, Parkinson's disease

imunski odziv, celična delitev in celična smrt, podvojevanje DNA, sodelujejo pri preoblikovanju in razgradnji zunajceličnega matriksa, pri vzdrževanju hemostaze ter pri celjenju ran (1).





Poznavanje njihove fiziološke vloge je pomembno za razumevanje njihove vpletenosti v patološke procese (1). Peptidaze se pretežno nahajajo v vezikularnem sistemu endosomov/lizosomov, najdemo pa jih tudi v jedru, citosolu, na celični membrani ali v zunajceličnem prostoru (2). Glede na mesto hidrolize peptidne vezi peptidaze razdelimo na endopeptidaze in eksopeptidaze. Prve cepijo peptidno vez znotraj polipeptidne verige proteinov, druge pa na N-koncu (aminopeptidaze) oziroma C-koncu (karboksipeptidaze) polipeptidne verige (3). Glede na katalitsko skupino v aktivnem mestu jih razdelimo na serinske, cisteinske, aspartatne, glutamatne, asparaginske, treoninske, metalopeptidaze in peptidaze mešanega tipa (4).

## 2 CISTEINSKE PEPTIDAZE

Najobsežnejšo skupino peptidaz predstavljajo cisteinske peptidaze, del teh pa so lizosomske cisteinske peptidaze, ki jih krajše imenujemo kar katepsini. Mednje uvrščamo 11 človeških cisteinskih katepsinov (katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W) (4). Večina izmed njih je endopeptidaz (katepsini F, K, L, O, S, V), medtem ko eksopeptidazno aktivnost izkazujeta katepsina C (aminopeptidaza) in X (karboksimonopeptidaza). Katepsina B in H izkazujeta tako endopeptidazno kot tudi eksopeptidazno aktivnost. Ustrezno delovanje in aktivnost katepsinov zagotavlja rahlo kislo okolje znotraj lizosomov, njihova inaktivacija, z izjemo katepsina S, pa poteče pri nevtralnem pH v citosolu in zunajceličnem okolju (5).

Večina cisteinskih peptidaz je prisotnih v vseh tkivih, medtem ko je izražanje drugih značilno za določena tkiva, kjer imajo specifično vlogo pri različnih procesih v organizmu (6). Zaradi slednjega mora biti za normalno fiziološko delovanje katepsinov njihova aktivnost skrbno uravnavana na več ravneh, saj lahko povečana proteolitična aktivnost privede do patoloških stanj, kot so razvoj in napredovanje raka, srčno-žilne, vnetne in nevrodegenerativne bolezni (1). V zadnjem desetletju so cisteinskim peptidazam pripisali pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju nevrodegenerativnih bolezni, med katerimi sta najpogostejši Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen. Patološke spremembe v možganih so povezane s pospešenim upadanjem kognitivnih in spominskih funkcij, ki jih spremljata spremenjeno izražanje in aktivnost cisteinskih peptidaz. V normalnih fizioloških pogojih se katepsini B, F, H in L nahajajo po celotnem centralnem živčnem sistemu (CŽS), preostale katepsine pa najdemo le v določenih možganskih celicah (7, 8). Katepsina C in S najdemo pretežno v celicah mikroglije, katepsin V pa v možganski skorji in hipokampusu (7). Mesta izražanja in delovanje posameznih cisteinskih peptidaz, značilnih za centralni živčni sistem, so povzeti v preglednici 1.

## 3 CISTEINSKE PEPTIDAZE V NEVRODEGENERATIVNIH PROCESIH

Motnje v povečanem izražanju katepsinov in njihovo sproščanje iz lizosomov lahko vodijo v razvoj nevrodegenerativnih procesov, ki lahko povzročijo nastanek in razvoj Alzhei-

*Preglednica 1: Mesta izražanja in biološka vloga posameznih cisteinskih peptidaz v centralnem živčnem sistemu (6, 7, 9, 10).*

*Table 1: Locations and biological roles of cysteine peptidases in the central nervous system (6, 7, 9, 10).*

Cisteinska peptidaza	Mesto izražanja	Biološka vloga
Katepsin B	nevroni, mikroglija	razgradnja proteinov zunajceličnega matriksa (kolagen tipa IV, laminin, fibronektin), delitev celic, razvoj nevronov
Katepsin C	nevroni	regulacija delovanja nevronov
Katepsin F	nevroni	razgradnja celičnih proteinov, lipidov
Katepsin H	astrociti	sintheza, metabolizem in inaktivacija neuropeptidov
Katepsin L	nevroni, astrociti, mikroglija	biosinteza peptidnih nevrotransmitorjev (neuropeptid Y, dinorfin, holecitokinin)
Katepsin S	mikroglija	predstavitev antigenov, komunikacija mikroglija-nevroni
Katepsin V	nevroni	biosinteza peptidnih nevrotransmitorjev (neuropeptid Y, enekfalin)
Katepsin X	nevroni, astrociti, mikroglija, oligodendrociti	razgradnja celičnih proteinov, biosinteza bradikinina, regulacija apoptoze

merjeve in Parkinsonove bolezni, tauopatije in Huntingove bolezni. Okvara vezikularnega lizosomske/endosomskega sistema v možganskih celicah je povezana z aktivacijo mikroglije, ki največkrat vodi v propad nevronov (7, 11, 12). Pro-vnetni mediatorji, ki jih sprošča aktivirana mikroglija, hitro sprožijo nadaljnjo aktivacijo okoliških celic mikroglije in astrocitov, kar vodi do vnetja v centralnem živčnem sistemu. Po drugi strani pa propadajoči nevroni v svojo okolico sproščajo številne dejavnike, ki vzdržujejo nadaljnjo aktivacijo mikroglije. To ustvarja vzajemno razmerje med aktivacijo mikroglije in smrtjo nevronov, ki skupno prispevata k napredovanju nevrodegenerativnih procesov (6).

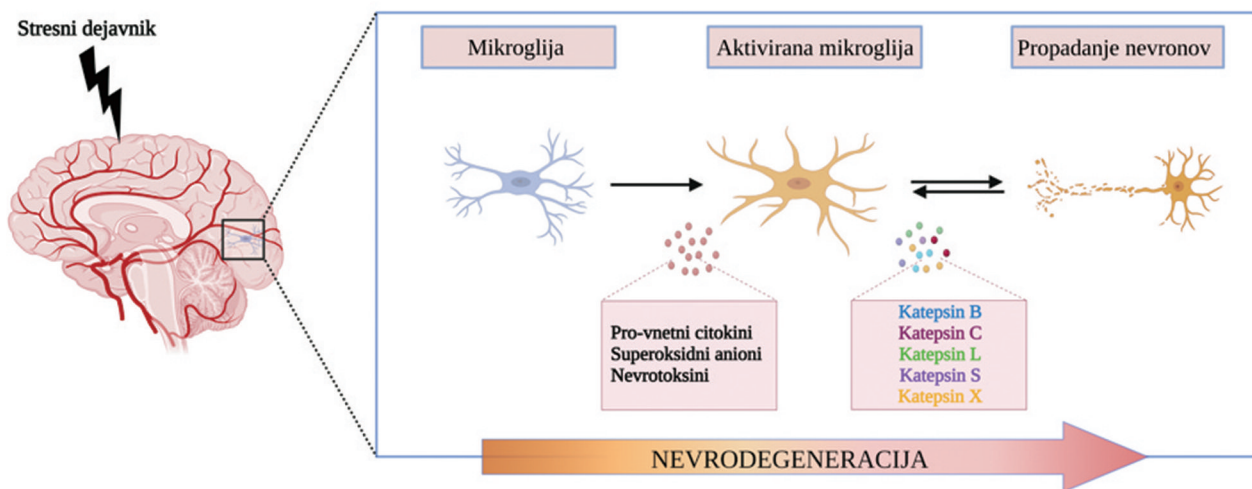
### 3.1 AKTIVACIJA MIKROGLIJE

Vzrok za propadanje nevronov in posledično za razvoj nevrodegenerativnih boleznih je povezan z vnetnimi procesi, ki se dogajajo v centralnem živčnem sistemu. Pri tem imajo pomembno vlogo celice mikroglije, prirojene imunske celice možganov, ki jim pravimo tudi imunski sistem možganov. Pri aktivaciji mikroglije so udeležene številne molekule, kot so endogeni vnetni mediatorji, nevrotoksini ter eksogene patogene bakterije in virusi (6, 7, 13). Aktivirana mikroglija se odzove na možgansko poškodbo s sproščanjem vnetnih citokinov, ki s fagocitozo odstranjujejo poškodovane celice (7, 14). Poleg vnetnih citokinov aktivirana mikroglija v svojo okolico izloča tudi superoksidne anione in nevrotoksine kot tudi katepsine B, C, L, S in X. Ti se sproščajo iz aktivi-

rane mikroglije in so odgovorni za propad aksonskih in mielinskih proteinov, za pretvorbo proteinskih prekursorjev v aktivne peptidne neurotransmitorje, za razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa ter za ojačenje apoptoznih signalnih poti, s čimer sprožijo smrt nevronov (7, 12, 15) (slika 1).

### 3.2 PROPAD NEVRONOV

Katepsini, ki se sprostijo iz aktivirane mikroglije, s svojo aktivnostjo preko različnih signalnih poti vplivajo na možgansko vnetje, ki povzroči smrt nevronov. Udeleženi so pri procesih avtolize, celični nekrozi, pri razgradnji celičnega matriksa ter so mediatorji programirane celične smrti (16). Zunajcelični katepsini B, L in X spodbujajo možgansko vnetje preko aktivacije jedrnega dejavnika kapa B (NF- $\kappa$ B), katepsin B lahko dodatno povzroči smrt nevronov preko spodbujenega izražanja in izločanja intelektina 1 $\beta$  ter preko cepitve proapoptotičnega proteina Bid. Katepsin C spodbuja nastajanje kemokinov, medtem ko katepsin S z razgradnjo komponent zunajceličnega matriksa povzroči migracijo mikroglije (6). Pomembno vlogo v nevrodegenerativnih boleznih ima tudi katepsin X. V fizioloških pogojih je njegovo izražanje omejeno na celice imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi in dendritične celice (17, 18). Izražanje katepsina X in njegova proteolitična aktivnost pa se močno poveča pri nevrodegenerativnih procesih, zlasti v glija celicah in staranih nevronih (19–21).



**Slika 1:** Aktivacija celic mikroglije in z njo povezana nevrodegeneracija. Sprožilci vnetja izzovejo aktivacijo celic mikroglije, ki s sproščanjem toksičnih molekul in katepsinov povzročijo poškodbo in propad nevronov, kar vodi v razvoj nevrodegenerativnih boleznih (7, 14).

**Figure 1:** Microglial cell activation and neurodegeneration. Inflammatory triggers provoke the activation of microglial cells, which are responsible for the release of toxic molecules and cathepsins that cause neuronal damage leading to neurodegenerative diseases (7, 14).

Na mišjem modelu Alzheimerjeve bolezni so dokazali povišano izražanje katepsina X v celicah mikroglije, ki obdajajo amiloidne plake (19–21), kjer med drugim sodeluje pri cepitvi C-končnega dela  $\gamma$ -enolaze. S cepitvijo zadnjih dveh aminokislin  $\gamma$ -enolaze katepsin X zavre njeno nevrotrofično in neuroprotektivno aktivnost (8, 20, 21). Poleg tega so na celičnem modelu Parkinsonove bolezni nakazali njegovo vlogo pri apoptozi nevronov, povzročeni z nevrotoksinom 6-hidroksidopaminom, kjer naj bi sodeloval pri aktivaciji signalne poti NF- $\kappa$ B (7).

## 4 CISTEINSKE PEPTIDAZE V NEURODEGENERATIVNIH BOLEZNIH

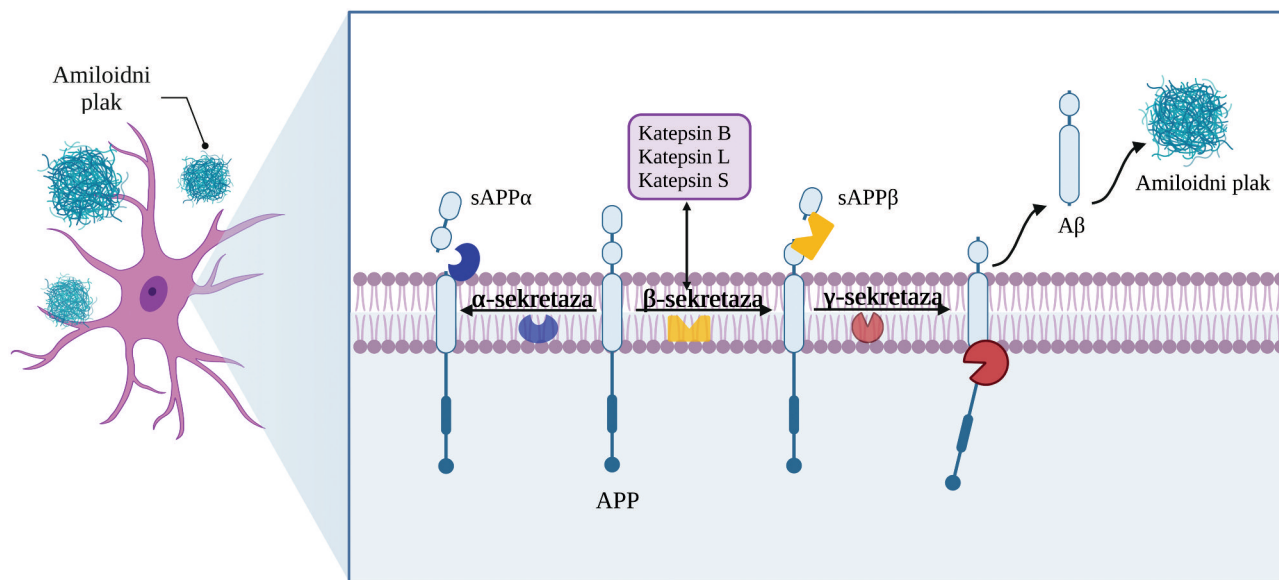
Neurodegenerativne bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, prizadenejo desetine milijonov ljudi po vsem svetu. S staranjem svetovnega prebivalstva se bo število bolnikov s temi boleznimi še povečevalo. Zaradi naraščajočega števila bolnikov predstavljajo neurodegenerativne motnje velik zdravstveni in ekonomski zalogaj, večja pa se tudi povpraševanje po novih terapijah za njihovo

preprečevanje in zdravljenje. Zaradi slednjega je izrednega pomena poznavanje patogenih dejavnikov, ki prispevajo k razvoju teh bolezni, med katere spadajo tudi cisteinski katepsini (1, 6, 12).

### 4.1 VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI ALZHEIMERJEVI BOLEZNI

Alzheimerjeva bolezen je najpogostejša neurodegenerativna bolezen in je glavni vzrok za razvoj demence pri starostnikih. Bolezen povzroči kognitivne napake, ki v prvi vrsti vplivajo na spomin, funkcijo presoje, izražanja in predstave. Zaradi njene čedalje večje pojavnosti je v središču številnih raziskav. Bolezen so prvič opisali leta 1906, ko je nemški zdravnik Alois Alzheimer pri obdukciji možganov bolnice z znaki demence opazil nenavadne usedline okrog in znotraj živčnih celic, ki jih danes imenujemo senilni oz. amiloidni plaki. V stoletju od takrat so znanstveniki naredili velik napredek pri razumevanju, kako Alzheimerjeva bolezen vpliva na možgane, in se naučili, kako izboljšati življenje prizadetim posameznikom in družinam (22).

Na molekulskem nivoju so za patogenezo Alzheimerjeve bolezni značilne vnetne in oksidativne spremembe neuro-



**Slika 2:** Vloga katepsinov pri procesiranju amiloida  $\beta$  (A $\beta$ ). Cepitev amiloidnega prekursorskega proteina (APP) z  $\beta$ -sekretazo in nato z  $\gamma$ -sekretazo povzroči nastanek amiloida  $\beta$ , pri čemer katepsini B, L in S izkazujejo  $\beta$ -sekretazno aktivnost. Nastali fragmenti amiloida  $\beta$  tvorijo škodljive oligomere, ki se združujejo v amiloidne plake (12, 23).

**Figure 2:** The role of cathepsins in the amyloid beta processing (A $\beta$ ). The cleavage of amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ -secretase and subsequently by  $\gamma$ -secretase results in the production of an amyloid beta. Cathepsins B, L and S display  $\beta$ -secretase activity. The externally released amyloid beta fragments form toxic oligomers that are eventually packaged in amyloid plaques (12, 23).

nov ter nepravilna zvitja proteinov. Spremembe vodijo v propad sinaptičnih stikov in smrt neuronov, ki se kopičijo v amiloidnih plakih. Eden izmed glavnih proteinov, odgovornih za nastanek amiloidnih plakov, je amiloid  $\beta$ , polipeptid, ki nastane s proteolitično cepitvijo amiloidnega prekursor-skega proteina (11, 12). Za proteolitično cepitev slednjega v toksični fragment amiloida  $\beta$  so v večji meri odgovorne  $\alpha$ -,  $\beta$ - in  $\gamma$ -sekretaze, pri čemer katepsini B, L in S izkazujejo proteolitično aktivnost  $\beta$ -sekretaz (12, 23) (slika 2).

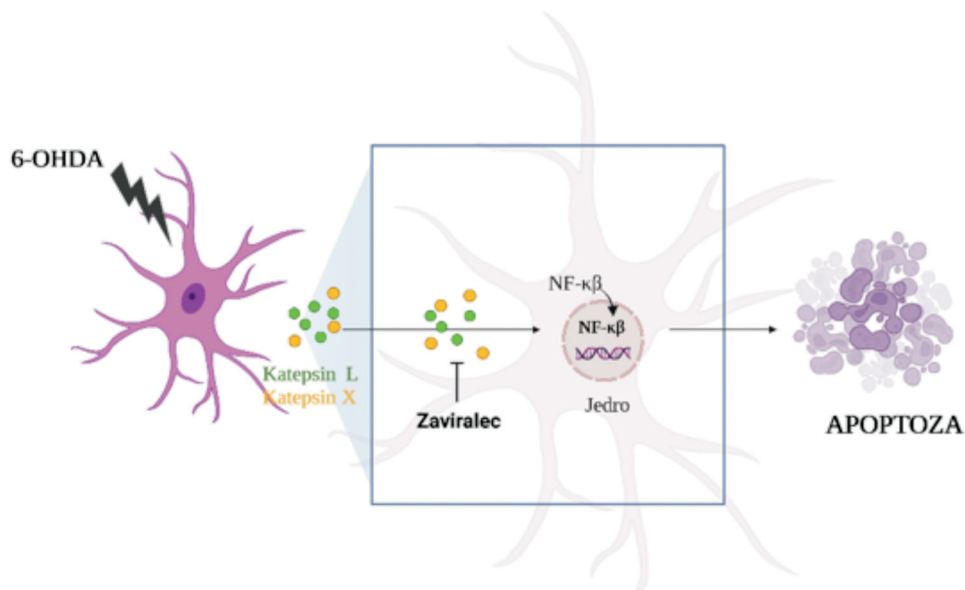
V patologiji Alzheimerjeve bolezni je udeležen tudi katepsin X. Nastajanje amiloidnih plakov izzove aktivacijo mikroglije, pri čemer pride do sproščanja vnetnih citokinov, toksinov in katepsinov, med drugimi tudi katepsina X, ki izniči nevroprotektivno delovanje  $\gamma$ -enolaze, ki sicer s svojim delovanjem v veliki meri zmanjša toksično delovanje amiloida  $\beta$  (21, 24). Na živalskih modelih z Alzheimerjevo boleznijo so zaviralci cisteinskih peptidaz izkazali terapevtski potencial, saj so zmanjšali nastajanje amiloida  $\beta$  v celicah in izboljšali pomanjkanje spomina (23). V raziskavi na mišjem modelu z Alzheimerjevo boleznijo je zaviranje katepsina B z ireverzibilnim zaviralcem cisteinskih peptidaz E-64d in sorodnim zaviralcem katepsina B, CA074Me, pokazalo zmanjšano nastajanje amiloida  $\beta$  in znatno izboljšanje zna-

kov izgube spomina (25, 26), prav tako je tudi izbitje gena za katepsin B pri miših zmanjšalo nastajanje amiloidnih plakov (27). Zaradi teh ugotovitev in poznavanja delovanja cisteinskih katepsinov pri amiloidogenih neurodegenerativnih procesih predstavljajo katepsini obetavne terapevtske tarče za razvoj zaviralcev, s katerimi bi lahko preprečili ali upočasnili napredek Alzheimerjeve bolezni (23).

## 4.2 VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI PARKINSONOVI BOLEZNI

Parkinsonova bolezen, druga najpogostejša neurodegenerativna bolezen, ki prizadene predvsem telesno gibanje bolnika, se odraža s tremorjem v mirovanju, mišični rigidnosti in upočasnjeni gibljivosti (28). Zanj je značilno propadanje dopaminergičnih neuronov v črnem jedru (*substantia nigra*) in posledično pomanjkanje dopamina (15, 28). Natančni mehanizmi, ki vodijo v propad možganskih celic pri PB še niso znani, eden izmed možnih vzrokov za njihov propad pa je povezan z aktivacijo mikroglije, kot odziv na vnetne procese, ki spremljajo neurodegeneracijo (7).

Na celičnem modelu *in vitro*, ki z uporabo 6-hidroksidopamina posnema nevropatološka in biokemijska stanja, zna-



**Slika 3:** Molekularni mehanizem preprečevanja apoptoze s specifičnimi zaviralci cisteinskih peptidaz. Izpostavljenost 6-hidroksidopaminu (6-OHDA) poveča izražanje in aktivnost katepsinov L in X, njuna inhibicija s specifičnimi zaviralci pa zmanjša aktivacijo NF- $\kappa$ B in njegov prehod v jedro celice ter posledično apoptozo celic (15, 29).

**Figure 3:** Molecular mechanism of the suppression of apoptosis by specific inhibitors of cysteine peptidases. Exposure to 6-hydroxydopamine (6-OHDA) increase the protein levels and activity of cathepsins L and X. Their inhibition suppresses the NF- $\kappa$ B activation, its translocation to the nucleus and consequently cell apoptosis (15).

čilna za Parkinsonovo bolezen, so pokazali pomembno vlogo nekaterih cisteinskih peptidaz pri s 6-hidroksidopaminom spodbujeni apoptozi dopaminergičnih nevronov. 6-hidroksidopamin poveča izražanje in aktivnost katepsina L, ki je s sodelovanjem v signalni poti NF- $\kappa$ B udeležen pri apoptozi dopaminergičnih nevrnskih celic. Zaviranje katepsina L v humanih nevroblastomskih celicah z ireverzibilnim zaviralcem Z-FY(t-Bu)-DMK je zmanjšalo spodbujeno apoptozo in s tem propad nevrnskih celic (29).

Prav tako so pokazali povečano izražanje katepsina X v poškodovanih dopaminergičnih nevronih na celičnem modelu *in vitro* kot tudi hemiparkinsonskem modelu Parkinsonove bolezni *in vivo* (15, 30, 31). Zaviranje aktivnosti katepsina X tako *in vitro* kot *in vivo* z ireverzibilnim epoksisukcinilnim zaviralcem AMS36 je izkazalo zaščitno delovanje preko zmanjšane apoptoze dopaminergičnih celic (7, 31, 32), hkrati pa se je zaviralec katepsina X izkazal za učinkovitega pri zaviranju vnetnega odziva aktivirane mikroglije, ki posredno vodi v apoptozo in propad nevronov (slika 3) (15). Slednje nakazuje pomembno vlogo cisteinskih katepsinov, predvsem katepsinov L in X, pri degeneraciji in propadu dopaminergičnih nevronov v črnem jedru, kar je značilno za potek Parkinsonove bolezni (15).

Med eksogenimi zaviralci sta se kot učinkovita sintezna ireverzibilna zaviralca izkazali spojini E-64d in CA074, ki preko zaviranja katepsina B zmanjšujeta ravni toksičnega fragmenta amiloida  $\beta$  v možganih. Zaviralec katepsina L, Z-FY(t-Bu)-DMK, značilno zmanjša apoptozo, sproženo s 6-hidroksidopaminom. Podobno tudi ireverzibilni epoksinilni zaviralec katepsina X, AMS36, izkazuje zaščito zoper s 6-hidroksidopaminom inducirano nevrodegeneracijo (7). V fazi raziskovanja so trenutno tudi nekateri triazolni derivati, ki so se v raziskavah *in vitro* izkazali kot selektivni in reverzibilni zaviralci katepsina X (35).

Trenutno so v predkliničnih in kliničnih raziskavah zaviralci z nitrilnimi skupinami (11). Zaviralci katepsina K so se v tretji fazi kliničnega razvoja izkazali za učinkovite pri zdravljenju osteoporoze, zaviralce katepsina S v kliničnih raziskavah vrednotijo za zdravljenje luskavice, nevropatične bolečine in Chronove bolezni, zaviralci katepsinov B, L in S pa so v predkliničnih raziskavah za zdravljenje rakavih bolezni in ateroskleroze (11, 36).

Razvoj zaviralcev cisteinskih peptidaz se povečuje, saj narašča razumevanje biološke vloge katepsinov in mehanizmov delovanja pri posameznih patoloških procesih, iskanje zaviralcev pa je čedalje bolj usmerjeno v iskanje selektivnejših, nekovalentnih in reverzibilnih zaviralcev.

## 5 ZAVIRALCI CISTEINSKIH PEPTIDAZ IN NJIHOVA TERAPEVTSKA UPORABA

Nekontrolirano izražanje in aktivnost cisteinskih peptidaz lahko povzroči motnje v celični homeostazi, zato je potrebno natančno uravnavanje njihovega delovanja (11). Glavni regulatorji aktivnosti cisteinskih peptidaz v telesu so endogeni zaviralci, njihovo povečano aktivnost pri patoloških procesih pa lahko dodatno uravnavamo z uporabo eksogenih zaviralcev (11). Med endogene zaviralce uvrščamo cistatine, tiropine, propeptidne zaviralce in  $\alpha$ 2-makroglobulin (1, 33). Najpomembnejši med njimi so cistatini (34). Endogeni zaviralci katepsinov so splošni zaviralci in niso selektivni za posamezen katepsin, zato niso tako primerni za terapevtske namene. Za ta namen preiskujejo nove eksogene, sintezne zaviralce.

Razvoj sinteznih zaviralcev cisteinskih peptidaz je napredoval z razumevanjem njihove biološke vloge. Eksogeni zaviralci so lahko proteinske in neproteinske molekule, izolirane iz živali, mikroorganizmov, rastlin in gliv, nevtralizirajoča monoklonska protitelesa ter nizkomolekularne sintezne spojine (3).

## 6 SKLEP

Cisteinske peptidaze s svojim delovanjem uravnavajo fiziološke procese v organizmu, hkrati pa pomembno prispevajo k nekaterim patološkim stanjem. Številne patološke nepravilnosti povzročijo motnje v proteolitični aktivnosti katepsinov in njihovo sproščanje iz lizosomov, kar ima za posledico razvoj nevrodegenerativnih procesov, ki vodijo do Alzheimerjeve, Parkinsonove, Huntingove bolezni in tauopatije. Nevrodegeneracija in z njo povezana aktivacija mikroglije sta glavna dejavnika v patogenezi nevrodegenerativnih bolezni. Katepsini, ki se sproščajo iz mikroglije, so pomembni pro-vnetni mediatorji, ki s svojim delovanjem povzročijo propad nevronov. Zaradi njihove udeležnosti v številnih patoloških procesih natančno poznavanje njihove biološke vloge predstavlja izhodišče za razvoj novih molekularnih orodij, s katerimi bi lahko uravnavali njihovo aktivnost. Pričakujemo, da bo zasnova selektivnih in reverzibilnih zaviralcev cisteinskih katepsinov izboljšala na peptidaze usmerjeno terapijo in izboljšala zdravljenje bolnikov z nevrodegenerativnimi motnjami.

# 7 LITERATURA

1. Turk B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):785–99.
2. Obermajer N, Doljak B, Kos J. Cysteine cathepsins: Regulators of antitumour immune response. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(12):1295–309.
3. Kos J, Mitrović A, Mirković B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. Vol. 6, *Future Medicinal Chemistry, Future Science*; 2014. p. 1355–71.
4. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D624–32.
5. Turk B, Dolenc I, Turk D, Kos J, Čolič A, Stoka V, et al. Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1995;376(4):225–30.
6. Pišlar A, Bolčina L, Kos J. New insights into the role of cysteine cathepsins in neuroinflammation. Vol. 11, *Biomolecules.* 2021.
7. Pišlar A, Kos J. Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol.* 2014;49(2):1017–30.
8. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J. Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(8–9):1685–96.
9. Tran A, Silver J. Cathepsins in neuronal plasticity. *Neural Regen Res.* 2021 Jan 1;16(1):26.
10. Ni J, Lan F, Xu Y, Nakanishi H, Li X. Extralysosomal cathepsin B in central nervous system: Mechanisms and therapeutic implications. *Brain Pathol.* 2022;e13071.
11. Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2016;32:22–37.
12. Haque A, Banik N, Ray S. New Insights into the Roles of Endolysosomal Cathepsins in the Pathogenesis of Alzheimers Disease: Cathepsin Inhibitors as Potential Therapeutics. *CNS Neurol Disord - Drug Targets.* 2008;7(3):270–7.
13. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Jan;8(1):57–69.
14. Lull ME, Block ML. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):354–65.
15. Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, Kos J. Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology.* 2014;82:121–31.
16. Leist M, Ja M, Lundbeck HAS, Valby D-. Triggering of apoptosis by cathepsins. 2001;324–6.
17. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Bergant VZ, Langerholc T, Turk B, et al. Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res.* 2005 May 15;306(1):103–13.
18. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N. The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adhes Migr.* 2009;3(2):164–6.
19. Wendt W, Zhu XR, Lübbert H, Stichel CC. Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp Neurol.* 2007;204(2):525–40.
20. Pišlar AH, Kos J. C-terminal peptide of  $\gamma$ -enolase impairs amyloid- $\beta$ -induced apoptosis through p75NTR signaling. *NeuroMolecular Med.* 2013;15(3):623–35.
21. Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Živin M, Schliebs R, Kos J. Neuroprotective role of  $\gamma$ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell.* 2013;12(4):604–14.
22. Hasanbasic S, Jahic A, Karahmet E, Sejranic A, Prnjavorac B. THE ROLE OF CYSTEINE PROTEASE IN ALZHEIMER DISEASE. *Mater Sociomed.* 2016;28(3):235.
23. Schechter I, Ziv E. Cathepsins S, B and L with aminopeptidases display  $\beta$ -secretase activity associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol Chem.* 2011;392(6):555–69.
24. Hafner A, Obermajer N, Kos J.  $\gamma$ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochem J.* 2012;443(2):439–50.
25. Hook VYH, Kindy M, Hook G. Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce  $\beta$ -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant,  $\beta$ -secretase site of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 2008;283(12):7745–53.
26. Hook G, Hook V, Kindy M. The cysteine protease inhibitor, E64d, reduces brain amyloid- $\beta$  and improves memory deficits in alzheimer's disease animal models by inhibiting cathepsin B, but not BACE1,  $\beta$ -secretase activity. *J Alzheimer's Dis.* 2011;26(2):387–408.
27. Hook VYH, Kindy M, Reinheckel T, Peters C, Hook G. Genetic cathepsin B deficiency reduces  $\beta$ -amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(2):284–8.
28. Hook VYH. Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4–6):449–69.
29. Xiang B, Fei X, Zhuang W, Fang Y, Qin Z, Liang Z. Cathepsin L is involved in 6-hydroxydopamine induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2011;1387:29–38.
30. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Živin M, Kos J. Upregulation of cysteine protease cathepsin X in the 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Front Mol Neurosci.* 2018;11(November):1–12.
31. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Zidar N, Živin M, Kos J. Neuroinflammation-Induced Upregulation of Glial Cathepsin X Expression and Activity in vivo. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:0–2.
32. Pišlar A, Božić B, Zidar N, Kos J. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. *Neuropharmacology.* 2017;114:88–100.
33. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(8):2560–70.
34. Breznik B, Mitrović A, T. Lah T, Kos J. Cystatins in cancer progression: More than just cathepsin inhibitors. *Biochimie.* 2019;166:233–50.
35. Fonović UP, Mitrović A, Knez D, Jakoš T, Pišlar A, Brus B, et al. Identification and characterization of the novel reversible and selective cathepsin X inhibitors. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
36. Kramer L, Turk D, Turk B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(10):873–98.

# TARČNO ZDRAVLJENJE KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE Z ZAVIRALCI BRUTONOVE TIROZIN KINAZE

## TARGETING BRUTON'S TYROSINE KINASE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

AVTORJI / AUTHORS:

Damjan Avsec, mag. farm.<sup>1</sup>

izr. prof. dr. Helena Podgornik, univ. dipl.  
inž. kem. inž., spec. med. biok., spec. lab.  
med. genetike<sup>1,2</sup>

doc. dr. Matevž Škerget, dr. med., spec.  
internist in hematolog<sup>2,3</sup>

prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični  
oddelek za hematologijo, Zaloška cesta 7, 1000  
Ljubljana

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

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

### POVZETEK

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je bolezen kopičenja monoklonskih limfocitov B v krvi in limfatičnih organih in predstavlja najpogostejšo levkemijo pri odraslih v Sloveniji. V zadnjem desetletju je zdravljenje KLL doživelo korenito prenovu, saj so zlati standard kemoimunoterapijo nadomestile majhne tarčne molekule. Prvi v tej vrsti so zaviralci Brutonove tirozin kinaze (ibrutinib, akalabrutinib) in fosfatidilinozitol 3-kinaze (idelalizib, duvelizib), ki delujejo na receptorsko pot limfocitov B. V tem članku predstavljamo razvoj, pomen in prihodnost zaviralcev Brutonove tirozin kinaze pri tarčnem zdravljenju KLL.

### KLJUČNE BESEDE:

akalabrutinib, BTK, ibrutinib, kronična limfocitna levkemija

### ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterised by the progressive accumulation of monoclonal B lymphocytes in the blood and lymphoid organs, and represents the most prevalent leukemia among adults in Slovenia. In the last decade, CLL treatment has undergone a radical change, as the standard of care chemoimmunotherapy has been replaced by small targeted molecules. The first among them are selective inhibitors of Bruton's tyrosine kinase (ibrutinib, acalabrutinib) and phosphatidylinositol 3-kinase (idelalisib, duvelisib), which target B-cell receptor signalling pathway of lymphocytes B. In this review, we present the development, significance and future of Bruton's tyrosine kinase inhibitors in the targeted therapy of CLL.

### KEY WORDS:

acalabrutinib, BTK, chronic lymphocytic leukemia, ibrutinib

## 1 UVOD

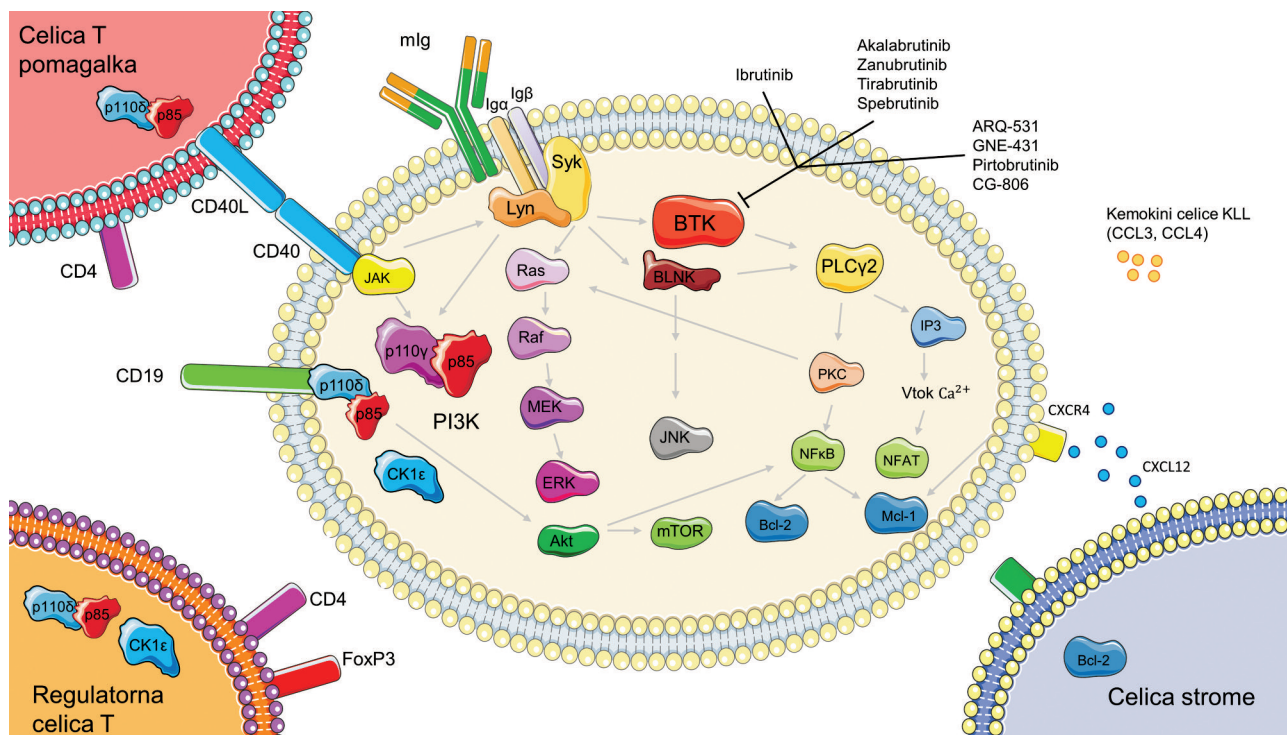
Kronična limfocitna levkemija (KLL) je s pojavnostjo 4–5 obolelih na 100.000 prebivalcev letno najpogostejša levkemija pri odraslih v Sloveniji kot tudi sicer v Zahodnem svetu (1, 2). Za KLL je značilna klonska ekspanzija in kopi-

čenje na videz zrelih, vendar funkcijsko nesposobnih CD5+, CD19+, CD23+ monoklonskih limfocitov B v krvi, kostnem mozgu in limfatičnem tkivu (2). Bolezen prizadene predvsem starejše. Mediana starosti ob diagnozi je 72 let in zgolj 10 % bolnikov je mlajših od 55 let (3,4). Klinični potek bolezni in zdravljenje sta odvisna od genetskih označevalcev, pri čemer sta napovedno neugodnega pomena delecija ali mutacija gena za tumorski zaviralec p53 (del/mut TP53) in del(11q), ki vodi v izgubo gena ATM. Kot pomembni napovedni pokazatelj se je uveljavil mutacijski status gena za variabilno regijo težke verige imunoglobulina (IgHV). Nemutiran status IgHV, ki je opredeljen z več kot 98-odstotno skladnostjo z zarodno linijo, je v številnih raziskavah pokazal krajši čas do napredovanja bolezni in slabši odgovor na zdravljenje s kemoimunoterapijo (2, 3, 5). Podrobneje so diagnostični in napovedni označevalci pregledani v članku Podgornik in sod. (6). Dolga leta je zdravljenje temeljilo na uporabi kemoterapije, vključujoč alkilirajoča sredstva (ciklofosamid, bendamustin) in nukleozidne analoge (fludarabin, citarabin) (7). Kasneje so kemoterapiji priključili monoklonski protiteleski proti CD20 rituksimab in obinituzumab, s čimer se je pričelo obdobje kemoimunoterapije. Čeprav je to zdravljenje pomembno

izboljšalo klinični izid bolnikov, pa je neuspešno pri bolnikih z del/mut TP53 (6,8). Za te bolnike do 2014, ko sta bila odobrena prva zaviralca receptorske poti celic B, ibrutinib in idelalizib, ustrezne alternative prazvprav ni bilo (8). Od 2016 je za zdravljenje KLL na voljo tudi venetoklaks, prvi predstavnik antagonistov Bcl-2 (9).

## 2 RECEPTORSKA POT CELIC B

Ker je receptorska pot celic B ključna za preživetje, proliferacijo in normalni razvoj limfocitov B, predstavljajo posamezne kinaze v tej poti pomembne tarče v terapiji KLL (slika 1). Poglavitni element receptorske poti celic B je B-celični receptor (BCR), ki sestoji iz membransko vezanega imunoglobulina (mIg) in heterodimera Iga/Igβ v razmerju 1 : 1. Po aktivaciji BCR transdukcija signala poteče preko Iga/Igβ, ki imata v citoplazemskem delu imunoreceptorske aktivacijske motive na osnovi tirozina (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM), ki so ključni za aktivacijo



Slika 1: Signalne poti in tarče v celicah KLL in njihovem mikrookolju.  
Figure 1: Signaling pathways and targets in CLL cells and their microenvironment.





nereceptorskih tirozin kinaz. Mednje sodijo tirozin kinaze iz družine Src (Fyn, Lyn, Blk), vranična tirozin kinaza (Syk) in Brutonova tirozin kinaza (BTK). Kinaze iz družine Src fosforilirajo ITAM, čemur sledita privabljanje in aktivacija Syk (10–12). Pod vplivom aktivne Syk, ki jo uravnava BLNK (*B-cell linker protein*) (13, 14), se aktivirajo številne signalne poti (slika 1). Najpomembnejša med njimi je BTK, ki aktivira fosfolipazo C (PLC)  $\gamma 2$  in protein kinazo C (PKC) (10, 11, 13). PKC sproži translokacijo NF $\kappa$ B v jedro in prepis antipoptotičnih proteinov Bcl-2 in Mcl-1. Dodatno Syk aktivira signalno pot Ras/Raf/mitogen aktivirana protein kinaza (MEK)/z zunajceličnim signalom regulirana kinaza (ERK) in c-Jun N-terminalno protein kinazo (JNK) (slika 1). Tirozin kinaze iz družine Src obenem aktivirajo tudi signalno pot NF- $\kappa$ B (11). Drugo pomembno tarčo v receptorski poti celic B predstavlja fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K). Aktivirajo jo vezava liganda CD40 na CD40/JAK, Lyn in CD19, kar vodi v aktivacijo preživetvenih poti Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) in NF $\kappa$ B (15, 16).

## 3 ZAVIRALCI BRUTONOVE TIROZIN KINAZE

BTK je osrednja komponenta receptorske poti celic B in pomemben regulator proliferacije in preživetja limfocitov B. Pomen BTK v razvoju limfocitov B je razviden iz raziskav s kromosomom X povezane agamaglobulinemije, kjer sta zaradi različic v BTK zavrti dozorevanje in končna diferenciacija limfocitov B v plazmatke (12, 17). Ker je BTK v primerjavi z normalnimi limfociti B povišano izražena v malignih limfocitih B, je ciljanje BTK v KLL smiselno (18). Zaviralci BTK po strukturi posnemajo ATP in z njim tekmujejo za vezavo v ATP-vezavni žep (17). Trenutno poznamo tri generacije zaviralcev BTK, pri čemer se razvoj premika od kovalentnih ireverzibilnih k nekovalentnim reverzibilnim zaviralcem.

### 3.1 IBRUTINIB

Ibrutinib (PCI-32765) je bil prvi predstavnik zaviralcev BTK, ki sta ga FDA in EMA v letu 2014 odobrili za zdravljenje hematoloških malignih bolezni (19, 20). Varnost in klinično učinkovitost ibrutiniba so potrdili v številnih kliničnih raziskavah III. faze pri bolnikih s predhodno nezdravljeno KLL in pri bolnikih s ponovljeno ali na zdravljenje neodzivno boleznijo (19). V raziskavah je ibrutinib v primerjavi s kontrolnim

zdravljenjem zmanjšal tveganje za napredovanje ali smrt in tudi pokazal izboljšanje v celokupnem preživetju. V EU je ibrutinib v obliki monoterapije ali v kombinaciji z obinutuzumabom odobren za zdravljenje odraslih bolnikov s predhodno nezdravljeno KLL (prva linija), lahko pa se ga uporablja tudi v drugi liniji (19).

Po mehanizmu delovanja spada ibrutinib med kovalentne zaviralce BTK. Za delovanje je ključen akrilamidni fragment v strukturi (preglednica 1), s katerim se ireverzibilno veže na cisteinski ostanek (Cys-481) v kinazni domeni BTK (21). Ibrutinib ima ugodne farmakodinamične lastnosti; zavira BTK v nizkem nanomolarnem območju, zasedenost BTK 24 ur po zaužitju je več kot 95-odstotna (18, 22).

Ibrutinib zavira tudi kinaze iz družine Tec (npr. TEC) in družine EGFR (npr. EGFR, ErbB2/HER2), ki v aktivnem mestu vsebujejo cisteinu 481 homologni cisteinski ostanek (22–24). To se odraža v neželenih učinkih, ki predstavljajo vzrok za 50–60 % vseh prekinitiv zdravljenja (25). Najpogostejši neželeni učinki stopnje 3 ali več pri zdravljenju z ibrutinibom so nevtropenija (26 %), trombocitopenija (10 %) in pljučnica (10 %) (19). Krvavitve vseh stopenj pri bolnikih na ibrutinibu (31 %) (19) so posledica zaviranja signalnih poti BTK in TEC v trombocitih, kar zavira adhezijo in agregacijo (26). Neželeni učinki ibrutiniba na srčno-žilni sistem (atrijska fibrilacija, hipertenzija) so posledica neposrednega zaviranja zgoraj omenjenih kinaz iz družine EGFR in posrednega zaviranja nižje ležečih signalnih poti (npr. PI3K/Akt) (18, 22, 23, 27).

Okoli 25 % bolnikov preneha zdravljenje z ibrutinibom zaradi napredovanja KLL ali Richterjeve transformacije (25, 28). Pojavnost različic na ravni BTK in nižje ležeče PLC $\gamma 2$ , ki botrujejo odpovedi ibrutiniba, je 80-odstotna (29). Izguba aktivnosti kovalentnih zaviralcev BTK je pogosto posledica zamenjave cisteina na mestu 481 v kinazni domeni BTK z drugo aminokislino, med njimi je najpogostejša različica p.C481S, ki vodi v zamenjavo cisteina s serinom. Poleg p.C481S v odpornost KLL na zaviralce BTK vodijo p.C481R, p.C481F, p.C481Y in p.C481T (12, 17). Dodatno so za odpornost odgovorne p.L528W, p.T474I in p.T474S (17). Dodaten mehanizem odpornosti predstavljajo različice s pridobitvijo funkcije PLC $\gamma 2$ , kot so p.R665W, p.L845F in p.S707Y (17). Konstitutivno aktivna PLC $\gamma 2$  namreč aktivira preostale signalne poti v receptorski poti celic B neodvisno od BTK (12). Tako farmakološko zaviranje BTK nima več pomena in so za zdravljenje KLL potrebni drugi pristopi. Poleg genetskih poznamo tudi negenetske mehanizme odpornosti na zaviralce BTK. Ti so v glavnem posledica povečanega izražanja CD79B (Ig $\beta$ ), onkogene MYC, spremenjenih signalnih poti Akt/MAPK in NF- $\kappa$ B (27). Napori

raziskovalcev so usmerjeni v razvoj novih selektivnejših in na različice odpornih zaviralcev BTK (21).

## 3.2 DRUGA GENERACIJA ZAVIRALCEV BTK

### Akalabrutinib

Akalabrutinib (ACP-196) je tako kot ibrutinib ireverzibilni zaviralec BTK, pri čemer je za njegovo učinkovitost ključna reaktivna butinamidna skupina, ki v aktivnem mestu BTK tvori kovalentno vez s Cys-481 (preglednica 1) (18). Akalabrutinib doseže 95-odstotno zasedenost BTK, ob tem je aktiven tudi njegov glavni metabolit ACP-5862 (30). Akalabrutinib je od 2019 na voljo za zdravljenje v ZDA (30), od novembra 2020 pa tudi v EU (31). Indiciran je kot monoterapija ali v kombinaciji z obinutuzumabom za zdravljenje odraslih bolnikov s predhodno nezdravljeno KLL (prva linija) ali kot monoterapija pri odraslih bolnikih s KLL po vsaj enem predhodnem zdravljenju (druga linija) (31).

Regulatorno odobritev FDA je akalabrutinib pridobil na osnovi dveh kliničnih raziskav III. faze, ELEVATE-TN (NCT02475681) in ASCEND (NCT02970318). V obeh raziskavah so ugotovili, da so imeli bolniki, ki so prejeli akalabrutinib boljše odzive in večje preživetje brez napredovanja bolezni v primerjavi s kontrolnim zdravljenjem (30). Jakost zaviranja BTK s strani akalabrutiniba je manjša v primerjavi z ibrutinibom. Polovična maksimalna inhibitorna koncentracija ( $IC_{50}$ ) akalabrutiniba na BTK je 5,1 nM, medtem ko je za ibrutinib 0,5–1,5 nM (18, 22). Na račun večje selektivnosti pri zdravljenju z akalabrutinibom so opazili manj neželenih učinkov, ki se sicer pogosto pojavljajo pri zdravljenju z ibrutinibom (18, 30). Najpogostejši neželeni učinki stopnje 3 ali več pri bolnikih na akalabrutinibu (raziskava ASCEND) so bili nevtropenija (23 %), anemija (15 %) in okužbe (15 %). Zdravljenje z akalabrutinibom je zaradi neželenih učinkov prenehalo 10 % bolnikov s ponovljeno/neodzivno KLL (30), kar je v primerjavi s 15–20 % vseh prekinitev zdravljenja z ibrutinibom (25) precej manj.

Različice v aktivnem mestu BTK in PLC $\gamma$ 2 vodijo v odpornost na akalabrutinib (32). Pojav C481S se kaže v 14-krat manjši sposobnosti akalabrutiniba za zaviranje BTK (33). Pogosto pojav različic več mesecev vnaprej predvidi odpoved zaviralca BTK, zato bi jih bilo smiselno spremljati med zdravljenjem (29).

Za preprečevanje odpornosti na tarčna zdravila pri KLL lahko kombiniramo zdravila z delovanjem na različne tarče. Ker brutinib in akalabrutinib na raven Bcl-2 v celicah KLL nimata vpliva (18), je smiselno hkratno zaviranje BTK z

akalabrutinibom in antagonizem Bcl-2 z venetoklaxsom (NCT03836261). Tak pristop poleg sinergističnega delovanja lahko prepreči pojav odpornosti na zaviralec BTK ali jo celo premosti (NCT03513562).

### Zanubrutinib

Zanubrutinib (BGB-3111) je ireverzibilen zaviralec BTK, za njegovo aktivnost je ključna akrilamidna skupina, ki s cisteinom 481 tvori kovalentno vez (preglednica 1). V klinični raziskavi III. faze ALPINE bodo vrednotili njegovo učinkovitost v primerjavi z ibrutinibom na 600 bolnikih s ponovljeno/neodzivno KLL (NCT03734016). Bolniki bodo prejeli po 160 mg zanubrutiniba dvakrat dnevno.

### Tirabrutinib

Tirabrutinib (ONO/GS-4059) je ireverzibilni kovalentni zaviralec BTK, pri čemer je za njegovo delovanje ključna butinamidna skupina (preglednica 1). V primeru p.C481S ima petkrat manjšo sposobnost zaviranja BTK, v primeru p.T474I in p.T474M pa se v BTK ni sposoben vezati (33). Za zdravljenje neodzivne/ponovljene KLL ga preskušajo v dveh kliničnih raziskavah II. faze (NCT02968563, NCT02983617). V obeh raziskavah bolniki prejema 80 mg enkrat dnevno. Odzivi bolnikov na tirabrutinib so podobni odzivom bolnikov na ibrutinib, a zaradi večje selektivnosti do BTK tirabrutinib izkazuje ugodnejši varnostni profil (34).

### Spebrutinib

Spebrutinib (CC-292) spada med ireverzibilne kovalentne zaviralce BTK (preglednica 1) (27). Njegovi varnost in učinkovitost za zdravljenje ponovljene/neodzivne KLL so ovrednotili v klinični raziskavi I. faze (NCT01351935). Bolniki so spebrutinib (1000 mg enkrat dnevno ali 500 mg dvakrat dnevno) dobro prenašali. Spebrutinib je dosegel krajše odzive v primerjavi z ibrutinibom in akalabrutinibom (35) in odpovedal v primeru pojava različic v BTK, zato je njegov nadaljnji klinični razvoj vprašljiv (33).

## 3.3 TRETJA GENERACIJA ZAVIRALCEV BTK

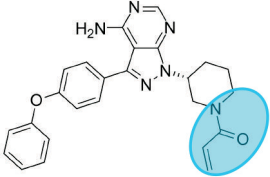
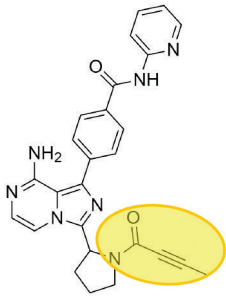
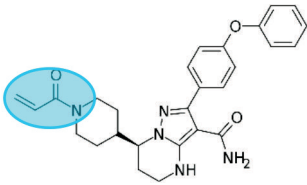
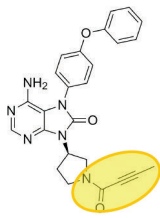
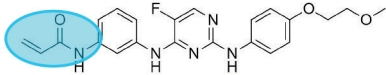
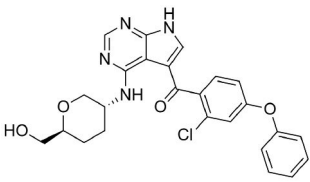
Zaviralci 3. generacije so nekovalentni, s tem pa tudi reverzibilni zaviralci, kar ima za posledico aktivnost tudi v primeru pojava različic C481 v BTK (27).

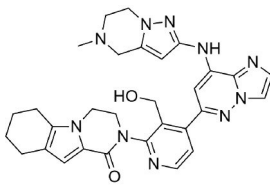
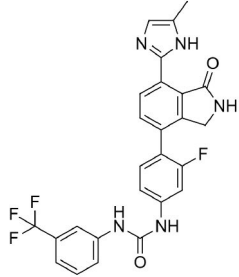
**ARQ-531** je visoko selektiven, reverzibilen, nekovalenten zaviralec BTK. V predkliničnih raziskavah se je izkazal za učinkovitega pri KLL z različicama BTK in PLC $\gamma$ 2 (27). V I/II. fazi kliničnega preskušanja ga bodo ovrednotili pri 146



Preglednica 1: Pregled zaviralcev Brutonove tirozin kinaze pri KLL.

Table 1: Overview of Bruton's tyrosine kinase inhibitors in CLL.

Tarča	Učinkovina	Struktura	Mehanizem delovanja	Faza preskušanja	Številka NCT
BTK	Ibrutinib (PCI-32765)		Kovalenten zaviralec	III, odobren 2014	NCT01722487 NCT02264574 NCT01578707 NCT01611090
BTK	Akalabrutinib (ACP-196)		Kovalenten zaviralec	III, odobren 2019	NCT02475681 NCT02970318 NCT03836261
BTK	Zanubrutinib (BGB-3111)		Kovalenten zaviralec	II	NCT03336333 NCT03734016
BTK	Tirabrutinib (ONO/GS-4059)		Kovalenten zaviralec	II	NCT02983617 NCT02968563
BTK	Spebrutinib (CC-292, AVL-292)		Kovalenten zaviralec	I	NCT01351935
BTK	ARQ-531		Nekovalenten zaviralec	I/II	NCT03162536

<b>BTK</b>	GNE-431		Nekovalenten zaviralec	/	/
<b>BTK</b>	Pirtobrutinib	/	Nekovalenten zaviralec	I/II	NCT03740529
<b>BTK/ FLT3</b>	CG-806		Nekovalenten zaviralec	I	NCT03893682

Kovalentni zaviralci Brutonove tirozin kinaze (BTK) vsebujejo akrilamidni (modro) ali butinamidni strukturni fragment (rumeno), s katerim tvorijo kovalentno vez s tiolno skupino C481 v aktivnem mestu BTK. Zaviralec CG-806 poleg BTK zavira receptorsko tirozin kinazo FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*).

bolnikih s ponovljenimi/neodzivnimi hematološkimi novotvorbami, vključno s KLL z različico BTK na mestu C481 (NCT03162536).

**GNE-431** je nekovalenten zaviralec BTK in izkazuje izvrstno aktivnost v primeru pojava različic v BTK (33). Vrednosti  $IC_{50}$  za zaviranje nemutirane BTK (3.2 nM) in različic p.C481S (2,5 nM), p.C481R (8.4 nM), p.T474I (11 nM) in p.T474M (8,8 nM) so med seboj primerljive. Klinično GNE-431 še niso ovrednotili pri zdravljenju KLL, predstavlja pa spojine, ki zavirajo BTK neodvisno od statusa različic, zato ima velik potencial za zdravljenje odporne KLL.

**Pirtobrutinib** (LOXO-305) je po delovanju podoben GNE-431, vendar deluje bolje na nemutirani in C481S-mutirani BTK ( $IC_{50} \square 1$  nM). Zaviranje BTK v primerjavi z več kot 98 % od 350 testiranih kinaz je 100-krat večje, kar predpostavlja minimalne učinke mimo tarče *in vivo* (21). V klinični raziskavi I/II faze je pirtobrutinib pokazal dobro učinkovitost tudi pri bolnikih z boleznijo, neodzivno na ibrutinib in prisotno različico C481 (36). To zdravilo predstavlja pomembno možnost zdravljenja po odpovedi trenutno odobrenih zaviralcev BTK.

**CG-806** je dvojni nekovalentni zaviralec, zavira BTK (neodvisno od statusa različic) in receptorsko tirozin kinazo FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*). V poskusih *in vitro* na primarnih celicah bolnikov s KLL so pokazali, da deluje podobno ci-

totoksično kot ibrutinib (37). Varnost, toleranco in učinkovitost CG-806 v ponovljeni/neodzivni KLL bodo ovrednotili v klinični raziskavi I. faze (NCT03893682). Začetni odmerek bo 150 mg dvakrat dnevno.

## 4 ZAKLJUČEK

Vpeljava zaviralcev BTK v terapijo KLL je korenito spremenila klinične izide bolnikov z napovedno neugodno KLL. Kljub izjemni klinični učinkovitosti omejitev uporabe zaviralcev BTK predstavljajo številni neželeni učinki in pojav odpornosti. Prihodnost zaviralcev BTK v terapiji KLL je kljub temu svetla, saj so v razvoju tudi visoko selektivni in na različice odporni zaviralci naslednjih generacij. Do tedaj za zdravljenje bolnikov s KLL, ki se na zaviralce BTK ne odzivajo, ostajata na voljo dva razreda tarčnih zdravil. To so zaviralci PI3K in antagonisti Bcl-2, ki uspešno izpodrivajo kemoimunoterapijo iz prve linije zdravljenja. S tem v mislih lahko zaključimo, da je zdravljenje KLL iz obdobja kemoimunoterapije in kemoimunoterapije dokončno prestopilo v dobo tarčnih zdravil.

## 5 IZJAVA O RAZKRITJU INTERESOV

Prvi in vodilni avtor nimata navzkrižja interesov. Eden izmed avtorjev je v zadnjih dveh letih prejel honorarje za opravljena izobraževanja in sodelovanje v posvetovalnih telesih s strani podjetij AbbVie, Janssen, Roche in AstraZeneca. Eden izmed avtorjev je prejel honorar za predavanja in svetovanje s strani podjetij AbbVie in Janssen.

## 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. *American Journal of Hematology*. 2019;94(11):1266–87.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Vol. 111, *Blood*. 2008. p. 5446–56.
- Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015;26:vi50–4.
- Lin KI, Tam CS, Keating MJ, et al. Relevance of the immunoglobulin VH somatic mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) or related chemoimmunotherapy regimens. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3168–71.
- Podgornik H, Gržinič N, Čermelč P. Kronična limfatična levkemija. *Farmacevtski Vestnik*. 2013;64(5):354–62.
- Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American Journal of Hematology*. 2016;91(3):330–40.
- Avsec D, Mlinarič-Raščan I. Zdravljenje kronične limfocitne levkemije. *Spatula*. 2020;81:4–8.
- Avsec D, Podgornik H, Mlinarič-Raščan I. Tarčno zdravljenje kronične limfocitne levkemije z antagonisti antiapoptotičnih proteinov. *Farmacevtski vestnik*. 2022;73(1):31–9.
- Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, et al. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science (New York, NY)*. 1996 Feb;271(5250):822–5.
- Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology*. 2003 Dec;110(4):411–20.
- Smith CIE. From identification of the BTK kinase to effective management of leukemia. *Oncogene*. 2016/09/26 ed. 2017 Apr;36(15):2045–53.
- Fu C, Turck CW, Kurosaki T, et al. BLNK: a Central Linker Protein in B Cell Activation. *Immunity*. 1998;9(1):93–103.
- Baba Y, Hashimoto S, Matsushita M, et al. BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001/02/13 ed. 2001 Feb 27;98(5):2582–6.
- Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):573–86.
- Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. Vol. 3, *Nature Reviews Immunology*. 2003. p. 317–30.
- Roskoski RJ. Ibrutinib inhibition of Bruton protein-tyrosine kinase (BTK) in the treatment of B cell neoplasms. *Pharmacological research*. 2016 Nov;113(Pt A):395–408.
- Patel V, Balakrishnan K, Bibikova E, et al. Comparison of acalabrutinib, a selective Bruton tyrosine kinase inhibitor, with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(14):3734–43.
- Imbruvica, INN-ibrutinib. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostopno na: [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/imbruvica-epar-product-information\\_sl.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/imbruvica-epar-product-information_sl.pdf). Poskus dostopa: 13.1.2021.
- IMBRUVICA® (ibrutinib) - FDA. Dostopno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/210563s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210563s000lbl.pdf). Poskus dostopa: 7.9.2020.
- Kim HO. Development of BTK inhibitors for the treatment of B-cell malignancies. *Archives of pharmacol research*. 2019 Feb;42(2):171–81.
- Berglöf A, Hamasy A, Meinke S, et al. Targets for Ibrutinib Beyond B Cell Malignancies. *Scandinavian journal of immunology*. 2015 Sep;82(3):208–17.
- Ahn IE. Cardiovascular adverse events of ibrutinib. *Blood*. 2019 Nov 28;134(22):1881–2.
- Vitale C, Burger JA. Chronic lymphocytic leukemia therapy: new targeted therapies on the way. Vol. 17, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016. p. 1077–89.
- Mato AR, Nabhan C, Thompson MC, et al. Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis. *Haematologica*. 2018 May;103(5):874–9.
- Levade M, David E, Garcia C, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014 Dec;124(26):3991–5.
- George B, Chowdhury SM, Hart A, et al. Ibrutinib Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for B-Cell lymphomas. *Cancers*. 2020 May 22;12(5):1328.
- Sharma S, Galanina N, Guo A, et al. Identification of a structurally novel BTK mutation that drives ibrutinib resistance in CLL. *Oncotarget*. 2016;7(42):68833–41.
- Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017;129(11):1469–79.
- Calquence. Full prescribing information. Dostopno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/210259s006s007lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/210259s006s007lbl.pdf). Poskus dostopa: 13.6.2022.
- EMA. Calquence. Dostopno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/calquence>. Poskus dostopa: 28.11.2020.
- Woyach J, Huang Y, Rogers K, et al. Resistance to Acalabrutinib in CLL Is Mediated Primarily By BTK Mutations. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement\_1):504.
- Johnson AR, Kohli PB, Katewa A, et al. Battling Btk Mutants With Noncovalent Inhibitors That Overcome Cys481 and Thr474 Mutations. *ACS Chemical Biology*. 2016 Oct 21;11(10):2897–907.
- Walter HS, Rule SA, Dyer MJS, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and

- refractory mature B-cell malignancies. Blood. 2015/11/05 ed. 2016 Jan 28;127(4):411–9.*
35. Brown JR, Harb WA, Hill BT, et al. Phase I study of single-agent CC-292, a highly selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor, in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica. 2016/05/05 ed. 2016 Jul;101(7):e295–8.*
36. Mato AR, Shah NN, Jurczak W, et al. Pirtobrutinib in relapsed or refractory B-cell malignancies (BRUIN): a phase 1/2 study. *The Lancet. 2021 Mar 6;397(10277):892–901.*
37. Kim E, Zhang H, Sivina M, et al. CG-806, a First-in-Class Pan-FLT3/Pan-BTK Inhibitor, Exhibits Broad Signaling Inhibition in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Blood. 2019 Nov 13;134(Supplement\_1):3051.*



# VPLIV SARS-COV-2 NA REPRODUKTIVNO ZDRAVJE PRI MOŠKIH

## EFFECTS OF SARS-COV-2 ON MALE REPRODUCTIVE HEALTH

AVTORICA / AUTHOR:

asist. dr. Kristina Groti Antonić, dr. med.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana,  
Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in  
presnovne bolezni,

Zaloška cesta 7, 1252 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,

Katedra za interno medicino,

Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: kristina.groti@kclj.si

## 1 UVOD

Koronavirusna bolezen 2019 (*coronavirus disease 2019*, covid-19) je virusna bolezen dihal, ki jo povzroča virus sin-

### POVZETEK

Covid-19 je pandemična bolezen, ki jo povzroča virus sindroma akutnega oteženega dihanja 2 (SARS-CoV-2). Moški imajo hujši potek bolezni z višjo stopnjo umrljivosti kot ženske. Raven testosterona lahko vpliva na okužbo s SARS-CoV-2 in potek covid-19. Testosteron modulira imunski odziv, zmanjšuje oksidativni stres in endotelijsko disfunkcijo, a tudi poveča izražanje transmembranske serinske proteaze tipa 2, ki je ključna za cepitev in aktiviranje koničastega proteina SARS-CoV-2. Rezultati raziskav kažejo, da so nizke ravni testosterona povezane s hujšim potekom covid-19. Nizka raven testosterona pri moških s covid-19 je predvsem posledica poškodbe mod. Delce SARS-CoV-2 so po covid-19 našli v tkivu penisa in testisov pri moških, ki so covid-19 preboleli, in tistih, ki so bolezni podlegli; kljub temu je spolni prenos SARS-CoV-2 malo verjeten. Hujši potek covid-19 lahko povzroči izčrpanost Leydigovih in zarodnih celic, kar povzroča funkcionalni hipogonadizem, zmanjšano spermatogenezo in neplodnost. Ostajajo dileme o specifičnih mehanizmih vpliva covid-19 na moške reproduktivne organe in dolgoročnih posledicah na reproduktivno zdravje moških.

### KLJUČNE BESEDE:

covid-19, hipogonadizem, SARS-CoV-2, testisi, testosteron

### ABSTRACT

Covid-19 is a pandemic disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Men have a more severe outcome and higher mortality rate than women. Testosterone levels affect SARS-CoV-2 infection and covid-19 severity. Testosterone modulates the immune response, reduces oxidative stress and endothelial dysfunction; however, it also increases expression of transmembrane serine protease 2, required for cleavage and activation of SARS-CoV-2 spike protein. Studies show that low testosterone levels are associated with high covid-19 severity. Low testosterone in men with covid-19 is primarily due to damage to the testicles. SARS-CoV-2 particles have been identified in penile and testicular tissue of convalescents and those succumbing to co-

vid-19; however, it is unlikely that SARS-CoV-2 is sexually transmitted. More severe covid-19 outcomes can cause germline depletion in Leydig cells, resulting in functional hypogonadism, reduced spermatogenesis and infertility. Dilemmas about specific underlying mechanisms of covid-19 affecting male reproductive organs and the long-term consequences on male reproductive health remain.

#### KEY WORDS:

covid-19, hypogonadism, SARS-CoV-2, testes, testosterone

droma akutnega oteženega dihanja 2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2. Gre za zelo nalezljivo bolezen, ki se primarno prenaša preko dihalnih izločkov, čeprav drugih poti okužbe ni mogoče izključiti. Okužba večinoma poteka kot blaga okužba zgornjih dihal, pri nekaterih bolnikih pa se razvije zmerna ali huda oblika s prizadetostjo spodnjih dihal – pljučnica, sindrom akutne dihalne stiske (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS). Možen je tudi nastanek sistemskih zunajpljučnih manifestacij kot kritična oblika bolezni s šokom in večorgansko odpovedjo, poškodbo trebušne slinavke ali poškodbo testisov (1).

Moški imajo hujši potek covid-19 in višjo stopnjo smrtnosti pri covid-19 kot ženske (1). Testosteron ima pomembne učinke na imunski sistem in znižan testosteron v serumu je kazalec splošno slabega zdravja pri moških, nizka raven testosterona v serumu pri moških pa je tudi povezana z resnostjo covid-19 pri kritično bolnih bolnikih zaradi zmanjšanih imunomodulacijskih protivirusnih učinkov (2). Androgeni regulirajo izražanje genov za angiotenzinske konvertaze 2 (*angiotensin converting enzyme 2*, ACE2) in transmembranske serinske proteaze tipa 2 (*transmembrane protease serine 2*, TMPRSS2) (3), zato se je pojavila hipoteza, da lahko višje koncentracije testosterona povzročajo težji potek covid-19 in hitrejše napredovanje te bolezni pri moških preko povečanega izražanja TMPRSS2, ki je ključnega pomena za cepitev in aktivacijo koničastega proteina SARS-CoV-2 (4).

To odpira vprašanje, kako različne koncentracije testosterona vplivajo na potek covid-19 pri moških. Ta pregledni članek predstavlja dognanja o vplivu SARS-CoV-2 na reproduktivno zdravje moških in potencialno vlogo testosterona pri nastanku razlik med spoloma pri dovzetnosti na okužbo s SARS-CoV-2 in prebolevanju covid-19.

## 2 PATOGENEZA OKUŽBE S SARS-COV-2

SARS-CoV-2 vstopi v celice preko vezave na funkcionalni receptor ACE2, ki je prisoten na površini membrane gostiteljske celice. ACE2 je ključni regulator sistema renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS). SARS-CoV-2 povzroča motnje v ravnovesju angiotenzinske konvertaze 1 in 2 (ACE1/ACE2) ter aktivacijo RAAS, kar na koncu privede do hitrejšega napredovanja covid-19, zlasti pri bolnikih s spremljajočimi boleznimi, kot so hipertenzija, sladkorna bolezen in srčno-žilne bolezni (5). Sistemski učinek covid-19 je posledica visoke stopnje razširjenosti ACE2, funkcionalnega receptorja in vstopne točke za SARS-CoV-2. ACE2 se močno izraža v različnih človeških celicah, in sicer v zgornjih dihalnih poteh, v alveolarnih epitelnih celicah tipa 2, epitelnih celicah požiralnika, celicah proksimalnih tubulov ledvic, enterocitih ileuma in debelega črevesa, miokardnih celicah in celicah mehurja, prav tako tudi v Leydigovih in Sertolijevih celicah (6). Za vstop v celico je potrebno delovanje TMPRSS2 na isti celici kot ACE2.

ACE2 omogoča pretvorbo angiotenzina (ANG) I in II v ANG-(1–7) in ANG-(1–9); slednja sta vazodilatatorja in imata vlogo pri imunskem odzivu. Pri okužbi z virusom SARS-CoV-2 igra pomembno vlogo v pljučih, kjer deluje protivnetno in antioksidativno ter varuje pljuča pred razvojem sindroma akutne dihalne stiske ARDS. ACE1 je encim, ki omogoča pretvorbo ANG I v ANG II, ki povzroča vazokonstrikcijo in vnetje. Virus SARS-CoV-2 z vezavo na ACE2 zmanjša delež ACE2 na celicah, zviša raven vazokonstriktorja ANG II in zmanjša ravni ANG-(1–7) in ANG-(1–9) ter spodbuja sproščanje vnetnih citokinov. Z vstopom v celice izzove njihovo okvaro in pospeši vnetni odgovor. Vstop SARS-CoV-2 v pnevmocite preko ACE2 povzroči znižanje ravni ACE2. Posledično nižje ravni ACE2 in višje ravni imunološko bolj aktivnega ANG II povzročijo okrepljeno vnetno stanje v pljučih. Pri bolnikih z dihalno odpovedjo so opazili povečano razmerje ACE1/ACE2 v pljučih. Spremenjeno razmerje ANG II in ANG-(1–7) vodi v poškodbo pljuč (7).

## 3 RAZLIKE MED SPOLOMA PRI IZIDU COVID-19

Metaanaliza podatkov več kot 3 milijonov primerov okužb (zbranih iz 92 raziskav), ki so vsebovale informacije o skup-





nem številu okužb po spolu, številu sprejemov v enoto intenzivne terapije in številu smrti, je pokazala, da imajo moški večjo verjetnost za potrebo po intenzivnem zdravljenju in za smrtni izid v primerjavi z ženskami, medtem ko v deležu primerov covid-19 ni razlik med spoloma (8). Testosteron in estrogen, ki sta ključna za nastanek fizioloških razlik med moškimi in ženskami, vplivata na patogenezo in imunski odziv na SARS-CoV-2. Pri ženskah estrogen uravnava izražanje ACE2 v diferenciranih epitelijskih celicah dihalnih poti, prav tako tudi poveča imunski odziv, kar lahko delno pojasni, zakaj imajo ženske nižjo stopnjo smrtnosti zaradi covid-19 ne glede na starost (9).

## 4 PATOFIZIOLOŠKA POVEZAVA MED TESTOSTERONOM IN OKUŽBO S SARS-COV-2

Patofiziološka povezava med testosteronom in potekom covid-19 je večstranska. Testosteron lahko neposredno vpliva na vstop SARS-CoV-2 v človeške celice, po drugi strani ima pomemben vpliv tudi pri aktivaciji imunskega sistema gostitelja. Izražanje in aktivnost TMPRSS2 v alveolnih epitelnih celicah tipov 1 in 2 sta večja pri moških kot pri ženskah. TMPRSS2 se izraža tudi v številnih celicah različnih organov, vključno s pljuči, črevesjem, želodcem in prostato, ter v celičnih skupkih v testisih, kot so spermatogoniji in spermatide (10).

Virus SARS-CoV-2 se na receptor ACE2 na ciljnih celicah veže preko koničastega proteina, vstop virusa pa olajša proteazna aktivnost TMPRSS2, ki omogoča fuzijo virusne in celične membrane. Raziskava, v kateri so za identifikacijo molekul, ki znižujejo ravni ACE2 v človeških celicah, opravili pregled skoraj 1500 učinkovin, je pokazala, da je androgena signalizacija ključni modulator izražanja ACE2 in da antiandrogene učinkovine lahko zmanjšajo izražanje ACE2 v človeških embrionalnih matičnih celicah in ščitijo pred okužbo s SARS-CoV-2 (11).

Ker je za vstop SARS-CoV-2 v celico pomembno izražanje ACE2 in TMPRSS2 in ker celice hormonsko odvisnega raka prostate kažejo visoko izražanje TMPRSS2 kot odziv na androgene, so domnevali, da terapija z odtegnitvijo androgenov (*androgen deprivation therapy*, ADT) pri teh bolnikih deluje zaščitno pri covid-19. Raziskava, v katero so vključili 4532 bolnikov z rakom prostate, je pokazala, da so imeli bolniki, ki so prejeli odtegnitvijo androgenov, manjše tveganje za okužbo s SARS-CoV-2 (12). Več raziskav je identificiralo to terapijo in antiandrogene kot po-

tencialne terapevtske možnosti za zaščito pred okužbo s SARS-CoV-2 ali zmanjšanje razmnoževanja virusa (12). Rezultati švedske epidemiološke raziskave, v katero so vključili 7894 bolnikov z rakom prostate na dolgotrajni terapiji z odtegnitvijo androgenov, ni pokazala nobenih koristnih ali škodljivih učinkov te terapije na stopnjo ali resnost okužbe s SARS-CoV-2 (13).

## 5 VPLIV TESTOSTERONA NA RESNOST POTEKA COVID-19

Kljub temu, da je več raziskav (14, 15) opisalo povezavo znižane ravni testosterona s slabšimi kliničnimi izidi, še vedno ostaja nejasno, ali je znižan testosteron posledica ali vzrok hujšega poteka covid-19. Kritična bolezen lahko povzroči supresijo hipotalamo-hipofizno-testikularne (HHT) osi, kar povzroči znižanje LH, FSH in serumskega testosterona in posledično privede do funkcionalnega hipogonadizma. Medtem ko je pomanjkanje testosterona povezano s povečanim sproščanjem provnetnih citokinov, se je pokazalo tudi to, da vnetni mediatorji znižujejo raven testosterona med akutno fazo bolezni. Posmrtni proteomske analize organov bolnikov s covid-19 so pokazale znake poškodb testisov, posebej Leydigovih celic, ki proizvajajo testosteron (16). Koničasti protein SARS-CoV-2 so *post mortem* našli v jedrih in citoplazmi Leydigovih celic skupaj z infiltracijo limfocitov in makrofagov v modih po sepsi, povzročeni s SARS-CoV-2 (17). Rezultati raziskave pri 81 moških s covid-19 in znižanim testosteronom so pokazali visok LH in znižano razmerje testosteron/LH, kar prej kaže na neposredni učinek SARS-CoV-2 na celice testisov kot na učinek preko osi HHT (18).

## 6 IMUNOLOŠKI UČINKI TESTOSTERONA PRI COVID-19

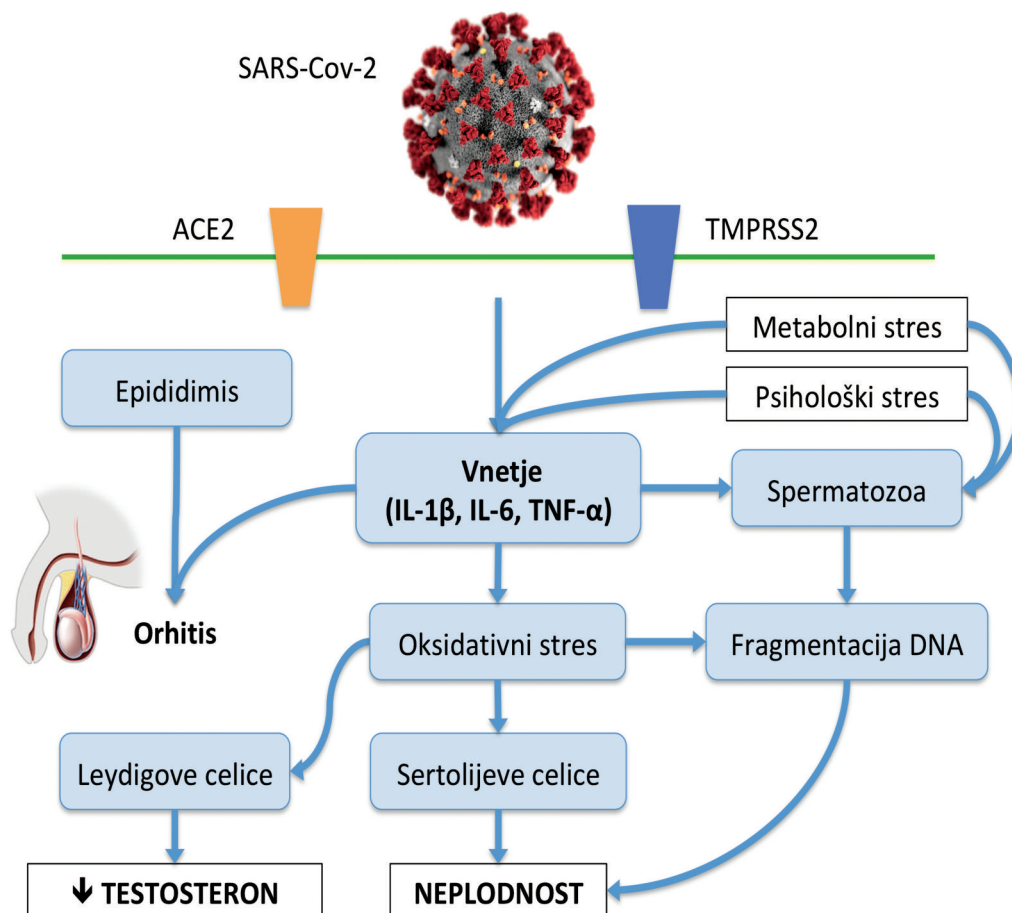
Okužba z virusom SARS-CoV-2 lahko sproži čezmerni imunski odziv oz. citokinsko nevihto, ki je pogost vzrok smrti in je povezana s povišanim sproščanjem vnetnih citokinov, zlasti interleukinov (IL) 1 $\beta$  in IL-6 in dejavnika tumorske nekroze  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ). Isti vnetni citokini so povezani z napredovanjem erektilne dis-

funkcije. Vnetni citokini so tudi tesno povezani z ravnmi testosterona: hipogonadni bolniki imajo višje koncentracije IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$ , kar poslabša endotelijsko disfunkcijo in še dodatno poslabša erektilno funkcijo (19).

Testosteron deluje kot modulator endotelijske funkcije. Raziskave so pokazale, da zavira signalizacijo IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$  z zaviranjem proteinskega kompleksa NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), ki je bistvenega pomena za proizvodnjo citokinov (20). Testosteron prav tako poveča protivnetni odziv prek signalizacije androgenih receptorjev s povečanjem izražanja IL-10 in transformirajočega rastnega dejavnika  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) (21). Glede na vlogo testosterona pri imunski regulaciji lahko sklepamo, da hipogonadizem prispeva k nagnjenosti k prekomernemu imunskemu odzivu.

## 7 VPLIV SARS-CoV-2 NA REPRODUKTIVNO ZDRAVJE PRI MOŠKIH

Neplodnost in funkcionalni hipogonadizem pri moških sta povezana z oksidativnim in psihološkim stresom ter presnovnimi motnjami (presnovni stres; slika 1). Kakovost semena se takoj po okužbi s SARS-CoV-2 poslabša, bodisi zaradi neposrednega učinka virusa ali posredno preko citokinske nevihte, ki jo povzročita okužba in povečan oksidativni stres. Tako lahko sklepamo, da okužba s SARS-CoV-2 poslabša plodnost pri moških s povečanjem oksidativnega, presnovnega in psihološkega stresa (22).



Slika 1: Možni mehanizmi okvare reproduktivnih funkcij moških zaradi okužbe s SARS-CoV-2. Povzeto po (22).

Figure 1: Possible mechanisms of SARS-CoV-2 infection induced impairment in male reproductive functions. Adapted from (22).



Patofiziologija okužb z respiratornimi virusi (vključno s SARS-CoV-2) vključuje vnetje, proizvodnjo citokinov in celično smrt, ki je povezana s prekomerno proizvodnjo reaktivnih kisikovih vrst (*reactive oxygen species*, ROS) in povečanim oksidativnim stresom. Obstajajo tudi dokazi, da ANG II povečuje proizvodnjo ROS, kar vodi do nastanka vnetnega fenotipa v endotelijskih in vaskularnih gladkih mišičnih celicah s povečano regulacijo adhezijskih molekul, kemokinov in citokinov. Prekomerna proizvodnja ROS pri okužbi s SARS-CoV-2 sproži signalno pot NF- $\kappa$ B, ki dodatno poveča sproščanje citokinov, kar povzroči pretiran vnetni odziv, ki lahko negativno vpliva na moško plodnost (22). Poleg tega sta citokina IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  povezana z zmanjšano kakovostjo semena in nastankom neplodnosti (23).

Pri hudi obliki covid-19 do hipogonadizma pride zaradi okvare testisov. SARS-CoV-2 preko neposredne vezave na ACE2 v Sertolijevih in Leydigovih celicah zavira proizvodnjo testosterona in lahko povzroča neplodnost pri moških (slika 1) (24).

Zmanjšanje števila Leydigovih celic so opisali pri posmrtni patološki oceni testisov pri moških, ki so umrli zaradi covid-19 (5). Obdukcijski rezultati druge raziskave so pokazali, da je okužba s SARS-CoV-2 povezana s povečanim oksidativnim stresom, ki vodi v apoptozo celic testisov; huda oblika covid-19 je bila povezana z zmanjšanim volumnom intersticijskega tkiva in dolžino seminiferih tubulov (25).

Okužba s SARS-CoV-2 lahko privede do povečanega presnovnega stresa in obratno, presnovni stres je povezan s povečano dovzetnostjo za okužbo s SARS-CoV-2. Okužba s SARS-CoV-2 povzroči zgodnejši nastanek ali poslabšanje sladkorne bolezni tipa 2 (26). Citokinska nevihta lahko povzroči okvaro in apoptozo celic  $\beta$ , hipoksijo in nenormalno preoblikovanje celic trebušne slinavke (27). Po drugi strani pa lahko sladkorna bolezen tipa 2 pri moških povzroči neplodnost in funkcionalni hipogonadizem skupaj s spolno disfunkcijo, kot sta erektilna in ejakulacijska disfunkcija. Tudi debelost poveča tveganje za različne motnje in bolezni, vključno s sladkorno boleznijo tipa 2, apnejo v spanju, tveganje za srčno-žilne bolezni in trombozo, kar prispeva k povečanemu presnovnemu stresu (28).

Okužbo s SARS-CoV-2 spremlja tudi hud psihološki stres, ki lahko povzroči citokinsko nevihto in oksidativni stres. Pri mišjih modelih kronični stres povzroči motnje krvno-testisne pregrade, kar lahko povzroči reproduktivne motnje, kot sta slaba kakovost semena in neplodnost (29).

Zaradi prisotnosti ACE2 in TMPRSS2 v urogenitalnih organih so moški bolj dovzetni za okvare zaradi okužbe s SARS-CoV-2. Vpliv testosterona in prisotnost androgenih receptorjev v teh organih lahko preko spodbujanja TMPRSS2 dodatno

pojasnijo privzem virusa (10), hematogeno širjenje virusa pri moških s hujšim potekom covid-19 pa je odgovorno za neposredne učinke virusa na moške reproduktivne organe. Izražanje ACE2 v celicah testisov je povezano s starostjo, in sicer je največje pri moških v starosti 30 let, najmanjše pa pri starosti 60 let (30), kar lahko nakazuje, da pri mlajših moških SARS-CoV-2 lažje povzroči poškodbo testisov.

Endotelijska disfunkcija je podlaga za hud potek covid-19 in predstavlja patofiziološko osnovo za nastanek erektilne disfunkcije po preboleli bolezni. ACE2 in TMPRSS2, tarči za privzem SARS-CoV-2, se nahajata v endotelijskih celicah. SARS-CoV-2 neposredno poškoduje celice – povzroči vaskulopatijo, ki privede do mikrovaskularne poškodbe. Poleg endotelijske disfunkcije lahko na erektilno disfunkcijo vplivajo tudi drugi z okrevanjem po covid-19 povezani vzroki, vključno s subkliničnim hipogonadizmom, psihološko stisko in oslabljeno pljučno hemodinamiko. Patofiziologija erektilne disfunkcije je sicer večfaktorska, vendar so prisotnost SARS-CoV-2 dokazali v tkivu penisa sedem mesecev po okužbi, kar pomeni da SARS-CoV-2 lahko neposredno poškoduje kavernozi endotelij, kar povzroči endotelijsko disfunkcijo in erektilno disfunkcijo po hudi obliki covid-19 (31).

Kljub temu, da se v njih izražata tako ACE2 kot TMPRSS2, so prostata in semenski mešički moški reproduktivni organi, za katere niso ugotovili, da bi jih SARS-CoV-2 prizadel. To je mogoče pripisati zelo nizkemu izražanju ACE2, nasprotno pa je izražanje TMPRSS2 v prostati nekoliko večje. V Leydigovih in Sertolijevih celicah se izraža ACE2, medtem ko je TMPRSS2 bolj izražen v spermatogonijih in spermatidih (10). Ker trenutni modeli kažejo, da sta za vstop SARS-CoV-2 potrebna oba receptorja, morda obstaja drug mehanizem, s katerim virus okuži tkivo testisov. V dveh raziskavah, ki sta proučevali prisotnost SARS-CoV-2 v semenski tekočini, je 18 % moških poročalo o neugodju v skrotumu (32). Podobno je bilo pri ocenjevanju vnetja z ultrazvokom skrotuma – pri 22 % moških z akutnim covid-19 so potrdili akutni orhitis z ali brez epididimitisa (33).

Po ocenah 10–22 % moških z akutno okužbo s SARS-CoV-2 razvije orhitis ali epididimo-orhitis, verjetno zaradi neposredne okužbe testisov (33). Vnetje testisov ob covid-19 je možno pripisati neposredni virusni invaziji. V posmrtnih biopsijah testisov so različne raziskave odkrile virus v 17 % vzorcev (5). Tudi spremembe transkriptoma v testisih s SARS-CoV-2 kažejo na disfunkcijo genov, ki uravnavajo spermatogenezo, in spremembe, povezane z vnetjem (34). Prisotnost SARS-CoV-2 v testisih, poškodba krvno-testisne pregrade in izčrpanje zarodnih celic privedejo do vprašanja, kakšni so vplivi SARS-CoV-2 na moško reprodukcijo. Na začetku pandemije so identificirali virusne delce SARS-

CoV-2 pri šestih od 38 moških, ki so oddali vzorec semena. Ta ugotovitev je sprožila vprašanje, ali je virus prisoten v dovolj visokih koncentracijah, da bi se lahko prenašal s spolnim kontaktom (35). V nedavni metaanalizi 19 raziskav so ocenjevali razpoložljive podatke o prisotnosti SARS-CoV-2 v semenski tekočini. Glede na nizke stopnje SARS-CoV-2 v semenski tekočini androloški tehniki med izvajanjem analize semena ob upoštevanju splošnih previdnostnih ukrepov najverjetneje niso izpostavljeni tveganju okužbe s SARS-CoV-2. Trenutni podatki kažejo, da je tveganje za možnost spolnega prenosa od moških, ki so preboleli okužbo, zanemarljivo (36).

Moški z zmerno obliko covid-19 so imeli statistično značilno poslabšanje spermograma v primerjavi s tistimi z blago okužbo ali s tistimi iz kontrolne skupine. Čeprav dolgoročni učinki okužbe s SARS-CoV-2 na kakovost semena še niso znani, je po okužbi in normalizaciji parametrov semena, kar lahko traja do dva do tri mesece za obnovitev spermatogeneze, sperma verjetno dovolj varna za kriokonzervacijo in/ali uporabo za tehniko asistirane reprodukcije, kot je oploditev *in vitro* (36–38).

## 8 VLOGA ZDRAVLJENJA S TESTOSTERONOM PRI COVID-19

Vloga testosterona pri zmanjšanju vnetnega odziva je spodbudila zanimanje za zdravljenje s testosteronom pri okužbah s SARS-CoV-2. Rezultati raziskav kažejo, da je vnetno stanje, ki nastane zaradi znižanega testosterona, mogoče ustaviti z nadomestnim zdravljenjem s testosteronom. Nadomestno zdravljenje s testosteronom zavira vnetne dejavnike, kot so IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$  (39). V primerjavi s kortikosteroidnim zdravljenjem ima določene prednosti, saj ublaži vnetni odziv na SARS-CoV-2 brez zavore celičnega imunskega odziva na virus (40). Nizke ravni testosterona zmanjšajo aktivnost dihalnih mišic in vadbeno zmogljivost, medtem ko imajo normalne ravni testosterona zaščitni učinek na različne dihalne parametre, kot sta ekspiracijski volumen in vitalna kapaciteta (41). Glede na te ugotovitve so izvedli randomizirano kontrolirano raziskavo in ugotovili, da nadomestno zdravljenje s testosteronom izboljša največjo porabo kisika in dihalno funkcijo, kar kaže na potencialno vlogo pri zaščiti pljučne funkcije pri moških s SARS-CoV-2 (42). Potrebne so nadaljnje raziskave o specifični uporabi tega zdravljenja pri bolnikih z okužbo z virusom SARS-CoV-2, da bi lahko natančno ocenili njegovo učinkovitost v tem kontekstu.

Obsežna raziskava, v kateri so proučevali, ali je nadomestno zdravljenje s testosteronom povezano z zmanjšanim napredovanjem bolezni, je pokazala, da pri tistih, ki so prejeli testosteron 120 dni ali manj, ni bilo zmanjšane tveganja za hujši potek covid-19. V raziskavo je bilo vključenih 33.380 moških, ki so bili starejši od 50 let in so bili hospitalizirani 30 dni po potrjeni diagnozi covid-19, ter 10.273 moških s hujšim potekom covid-19, ki so potrebovali sprejem v enoto intenzivne terapije ali mehansko ventilacijo po hospitalizaciji (43).

## 9 ZAKLJUČEK

Na videz nasprotujoče si vloge testosterona v patogenezi covid-19 zahtevajo nadaljnje preiskave. Testosteron lahko olajša okužbo celic s SARS-CoV-2, a hkrati tudi ščiti pred slabšimi kliničnimi izidi med aktivnimi okužbami in zmanjša verjetnost za pojav komorbinih stanj pred okužbo.

Višje ravni androgenov pri moških so potencialni mehanizem za vstop virusa v celice. Sposobnost androgenih receptorjev, da uravnavajo gena ACE2 in TMPRSS2, je lahko osnovni razlog za hujši potek bolezni. Poleg tega so kljub izredno nizkim ravnum tako ACE2 kot TMPRSS2 v reproduktivnih organih, kot so testisi, med moškimi z zmerno do hudo boleznijo covid-19 opazili višje stopnje orhitisa in motenj spermatogeneze od pričakovanih, kar kaže, da morda obstaja še drug mehanizem, po katerem SARS-CoV-2 vpliva na reproduktivno zdravje pri moških. Prospektivne raziskave, ki vključujejo longitudinalne hormonske meritve in oceno hormonskega statusa pred okužbo, bi omogočile globlji vpogled v vlogo testosterona pri okužbi s SARS-CoV-2. Prihodnje raziskave so potrebne tudi za pojasnitev posledic okužbe, razvoj metod za zmanjšanje vpliva SARS-CoV-2 na reproduktivno zdravje pri moških in obravnavanje dolgoročnih posledic hude bolezni. Ker dolgoročni učinki okužbe pri moških še niso na voljo, je pomembno, da moški, ki so preboleli covid-19 in jih skrbiti morebitne posledice bolezni, poiščejo zdravniško pomoč.

## 10 LITERATURA

1. Chavez S, Long B, Koyfman A, Liang SY. Coronavirus Disease (COVID-19): A primer for emergency physicians. *Am J Emerg Med.* 2021 Jun;44:220–9.



2. Liva SM, Voskuhl RR. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):2060–7.
3. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):271–280.e8.
4. Wambier CG, Goren A, Vaño-Galván S, Ramos PM, Ossimetha A, Nau G, et al. Androgen sensitivity gateway to COVID-19 disease severity. *Drug Dev Res.* 2020 Nov;81(7):771–6.
5. Yang M, Chen S, Huang B, Zhong JM, Su H, Chen YJ, et al. Pathological Findings in the Testes of COVID-19 Patients: Clinical Implications. *Eur Urol Focus.* 2020 Sep 15;6(5):1124–9.
6. Navarra A, Albani E, Castellano S, Arruzzolo L, Levi-Setti PE. Coronavirus Disease-19 Infection: Implications on Male Fertility and Reproduction. *Front Physiol.* 2020;11:574761.
7. Pal R, Bhansali A. COVID-19, diabetes mellitus and ACE2: The conundrum. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Apr;162:108132.
8. Peckham H, de Grijter NM, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn LR, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. *Nat Commun.* 2020 Dec 9;11(1):6317.
9. Fernández-Atucha A, Izagirre A, Fraile-Bermúdez AB, Kortajarena M, Larrinaga G, Martínez-Lage P, et al. Sex differences in the aging pattern of renin-angiotensin system serum peptidases. *Biol Sex Differ.* 2017;8:5.
10. Wang Z, Xu X. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. *Cells.* 2020 Apr 9;9(4).
11. Samuel RM, Majd H, Richter MN, Ghazizadeh Z, Zekavat SM, Navickas A, et al. Androgen Signaling Regulates SARS-CoV-2 Receptor Levels and Is Associated with Severe COVID-19 Symptoms in Men. *Cell Stem Cell.* 2020 Dec 3;27(6):876–889.e12.
12. Montopoli M, Zumerle S, Vettor R, Rugge M, Zorzi M, Catapano CV, et al. Androgen-deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study (N = 4532). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2020 Aug;31(8):1040–5.
13. Welén K, Rosendal E, Gisslén M, Lenman A, Freyhult E, Fonseca-Rodríguez O, et al. A Phase 2 Trial of the Effect of Antiandrogen Therapy on COVID-19 Outcome: No Evidence of Benefit, Supported by Epidemiology and In Vitro Data. *Eur Urol.* 2022 Mar;81(3):285–93.
14. Rastrelli G, Di Stasi V, Inglese F, Beccaria M, Garuti M, Di Costanzo D, et al. Low testosterone levels predict clinical adverse outcomes in SARS-CoV-2 pneumonia patients. *Andrology.* 2020/06/03 ed. 2021 Jan;9(1):88–98.
15. Dhindsa S, Zhang N, McPhaul MJ, Wu Z, Ghoshal AK, Erlich EC, et al. Association of Circulating Sex Hormones With Inflammation and Disease Severity in Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open.* 2021 May 3;4(5):e2111398.
16. Nie X, Qian L, Sun R, Huang B, Dong X, Xiao Q, et al. Multi-organ proteomic landscape of COVID-19 autopsies. *Cell.* 2021 Feb 4;184(3):775–791.e14.
17. Enikeev D, Taratkin M, Morozov A, Petov V, Korolev D, Shpikina A, et al. Prospective two-arm study of the testicular function in patients with COVID-19. *Andrology.* 2022 Sep;10(6):1047–56.
18. Ma L, Xie W, Li D, Shi L, Mao Y, Xiong Y, et al. Effect of SARS-CoV-2 infection upon male gonadal function: A single center-based study. *medRxiv.* 2020 Jan 1;2020.03.21.20037267.
19. Sansone A, Mollaoli D, Ciocca G, Colonnello E, Limoncin E, Balercia G, et al. “Mask up to keep it up”: Preliminary evidence of the association between erectile dysfunction and COVID-19. *Andrology.* 2021 Jul;9(4):1053–9.
20. Traish A, Bolanos J, Nair S, Saad F, Morgentaler A. Do Androgens Modulate the Pathophysiological Pathways of Inflammation? Appraising the Contemporary Evidence. *J Clin Med.* 2018 Dec 14;7(12):549.
21. D’Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, et al. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 22;876:426–9.
22. Dutta S, Sengupta P. SARS-CoV-2 and Male Infertility: Possible Multifaceted Pathology. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* 2021 Jan;28(1):23–6.
23. Morselli S, Sebastianelli A, Liaci A, Zaccaro C, Pecoraro A, Nicoletti R, et al. Male reproductive system inflammation after healing from coronavirus disease 2019. *Andrology.* 2022 Sep;10(6):1030–7.
24. Abobaker A, Raba AA. Does COVID-19 affect male fertility? *World J Urol.* 2021 Mar;39(3):975–6.
25. Moghimi N, Eslami Farsani B, Ghadipasha M, Mahmoudiasl GR, Piryaei A, Aliaghaei A, et al. COVID-19 disrupts spermatogenesis through the oxidative stress pathway following induction of apoptosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2021 Aug;26(7–8):415–30.
26. Silva N de J, Ribeiro-Silva R de C, Ferreira AJF, Teixeira CSS, Rocha AS, Alves FJO, et al. Combined association of obesity and other cardiometabolic diseases with severe COVID-19 outcomes: a nationwide cross-sectional study of 21 773 Brazilian adult and elderly inpatients. *BMJ Open.* 2021 Aug 9;11(8):e050739.
27. Hayden MR. An Immediate and Long-Term Complication of COVID-19 May Be Type 2 Diabetes Mellitus: The Central Role of  $\beta$ -Cell Dysfunction, Apoptosis and Exploration of Possible Mechanisms. *Cells.* 2020 Nov 13;9(11).
28. Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. *Curr Opin Urol.* 2017 Sep;27(5):441–5.
29. Kolbasi B, Bulbul MV, Karabulut S, Altun CE, Cakici C, Ulfer G, et al. Chronic unpredictable stress disturbs the blood-testis barrier affecting sperm parameters in mice. *Reprod Biomed Online.* 2021 May;42(5):983–95.
30. Shen Q, Xiao X, Aierken A, Yue W, Wu X, Liao M, et al. The ACE2 expression in Sertoli cells and germ cells may cause male reproductive disorder after SARS-CoV-2 infection. *J Cell Mol Med.* 2020 Aug;24(16):9472–7.
31. Kresch E, Achua J, Saltzman R, Khodamoradi K, Arora H, Ibrahim E, et al. COVID-19 Endothelial Dysfunction Can Cause Erectile Dysfunction: Histopathological, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study of the Human Penis. *World J Mens Health.* 2021 Jul;39(3):466–9.
32. Pan F, Xiao X, Guo J, Song Y, Li H, Patel DP, et al. No evidence of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019. *Fertil Steril.* 2020 Jun;113(6):1135–9.
33. Chen L, Huang X, Yi Z, Deng Q, Jiang N, Feng C, et al. Ultrasound Imaging Findings of Acute Testicular Infection in Patients With Coronavirus Disease 2019: A Single-Center-Based Study in Wuhan, China. *J Ultrasound Med Off J Am Inst Ultrasound Med.* 2021 Sep;40(9):1787–94.
34. Ma X, Guan C, Chen R, Wang Y, Feng S, Wang R, et al. Pathological and molecular examinations of postmortem testis biopsies reveal SARS-CoV-2 infection in the testis and spermatogenesis damage in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2021 Feb;18(2):487–9.

35. Li D, Jin M, Bao P, Zhao W, Zhang S. *Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019*. *JAMA Netw Open*. 2020 May 1;3(5):e208292.
36. Yassin A, Sabsigh R, Al-Zoubi RM, Aboumarzouk OM, Alwani M, Nettleship J, et al. *Testosterone and Covid-19: An update*. *Rev Med Virol*. 2022 Sep 3;e2395.
37. Wesselink AK, Hatch EE, Rothman KJ, Wang TR, Willis MD, Yand J, et al. *A Prospective Cohort Study of COVID-19 Vaccination, SARS-CoV-2 Infection, and Fertility*. *Am J Epidemiol*. 2022 Jul 23;191(8):1383–95.
38. Holtmann N, Edimiris P, Andree M, Doehmen C, Baston-Buest D, Adams O, et al. *Assessment of SARS-CoV-2 in human semen-a cohort study*. *Fertil Steril*. 2020 Aug;114(2):233–8.
39. Mohamad NV, Wong SK, Wan Hasan WN, Jolly JJ, Nur-Farhana MF, Ima-Nirwana S, et al. *The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men*. *Aging Male*. 2019 Jun;22(2):129–40.
40. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. *Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review*. *JAMA*. 2020 May 12;323(18):1824–36.
41. Mohan SS, Knuiman MW, Divitini ML, James AL, Musk AW, Handelsman DJ, et al. *Higher serum testosterone and dihydrotestosterone, but not oestradiol, are independently associated with favourable indices of lung function in community-dwelling men*. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015 Aug;83(2):268–76.
42. Caminiti G, Volterrani M, Iellamo F, Marazzi G, Massaro R, Miceli M, et al. *Effect of long-acting testosterone treatment on functional exercise capacity, skeletal muscle performance, insulin resistance, and baroreflex sensitivity in elderly patients with chronic heart failure a double-blind, placebo-controlled, randomized study*. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Sep 1;54(10):919–27.
43. Baillargeon J, Kuo YF, Westra J, Lopez DS, Urban RJ, Williams SB, et al. *Association of testosterone therapy with disease progression in older males with COVID-19*. *Andrology*. 2022 Sep;10(6):1057–66.



## 9. MEDNARODNA BBBB KONFERENCA

### 9<sup>TH</sup> BBBB INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHARMACEUTICAL SCIENCES PHARMA SCIENCES OF TOMORROW

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



Otvoritveni nagovor predsednika konference prof. dr. Aleša Obreze.

Od 15. do 17. septembra 2022 je v Ljubljani potekala 9. mednarodna konferenca farmacevtskih znanosti, ki združuje predvsem znanstvenike s področij **B**ospor, **B**altik, **B**alaton, **B**led (od tod kratica BBBB).

Prvo tovrstno srečanje je potekalo leta 2005 na Madžarskem (Siófok), nato 2007 v Estoniji (Talinn-Tartu), 2009 v Turčiji (Antalya), 2011 v Sloveniji (Bled), 2013 v Grčiji (Atene) in 2015 na Finskem (Helsinki). Leta 2017 se je s konferenco na Madžarskem (Balatonfüred) začel novi cikel konferenc BBBB, v letu 2019 je sledila Turčija (Izmir), letos pa je bila po triletnem premoru zaradi epidemije SARS-CoV-2 ponovno organizator Slovenija.

Konferenco v Ljubljani sta organizirala Fakulteta za farmacija Univerze v Ljubljani in Slovensko farmacevtsko društvo. Potekala je pod pokroviteljstvom dveh mednarodnih združenj: Evropske federacije farmacevtskih znanosti (*European Federation of Pharmaceutical Sciences*, EUFEPS) in Evropske federacije za medicinsko kemijo (*European Federation for Medicinal Chemistry*, EFMC), kar je pripomoglo k odmevnosti konference v mednarodnih strokovnih in znanstvenih krogih. V skladu z duhom konference BBBB so se k organizaciji in promociji dogodka pridružila tudi farmacevtska društva držav ustanoviteljic, to je Madžarske (*Hungarian Society for Pharmaceutical Sciences*), Estonije

in Finske (*Estonian Academical Society of Pharmacy, Finnish Pharmaceutical Society*) ter Turčije (*Turkish Pharmaceutical Technology Scientists Association*).

V letošnji konferenci smo združili različne farmacevtske znanstvene discipline, kar se je odražalo v raznolikosti vsebin konference. V obliki dveh vzporednih sekcij so potekala predavanja s področja **farmacevtske tehnologije in nanotehnologije** (pet sekcij: *Novi trendi na področju industrijske farmacije; Izzivi na področju formuliranja in dostave malih molekul in bioloških učinkovin; Iztiskanje vroče taline in tehnologija 2D/3D tiskanja v farmacevtski proizvodnji; Oblikovanje pacientom prijaznih farmacevtskih oblik; Izzivi sodobne farmacije*), **farmacevtske kemije** (dve sekciji: *Nove molekule za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni ter bakterijskih in virusnih okužb*), **farmacevtske analitike** (sekcija *Novodobna onesnaževala v okoljskih vzorcih in farmacevtskih izdelkih*), **klinične farmacije in laboratorijske biomedicine** (sekcija *Terapevtsko spremljanje zdravil in farmakogenomika kot orodji personalizirane medicine za izboljšanje učinkovitosti in varnosti zdravil*) in **biotehnologije** (sekcija *Peptidi kot učinkovine in selektivni vezalci bioloških makromolekul; m-RNA cepiva*). Mladi raziskovalci so se lahko udeležili tudi praktičnih delavnic na Fakulteti

za farmacijo, na katerih so spoznali osnove elektrostatskega sukanja in pretočne citometrije.

Sočasno s konferenco pa je potekala tudi razstava sodobne tehnološke in analizne opreme, tehnologij in izdelkov ter novih materialov različnih proizvajalcev na širšem področju farmacije. Poleg osnovne konference smo organizirali še predkonferenčni simpozij v čast profesorjema prof. dr. Julijani Kristl in prof. dr. Stanetu Srčiču ob upokojitvi, ki je predstavljen v ločenem prispevku.

Konferenca je kljub globalno zahtevnim zdravstvenim in političnim razmeram v marsičem preseгла naša pričakovanja. Tridnevnemu dogodku je tako prisostvovalo skoraj 250 udeležencev iz 19 različnih evropskih držav in ZDA. Na otvoritvi konference so udeležence pozdravili predsednik konference prof. dr. Aleš Obreza, prorektor Univerze v Ljubljani za raziskovanje in razvoj prof. dr. Anton Ramšak, dekanja Fakultete za farmacijo prof. dr. Irena Mlinarič Raščan in prof. dr. Aleš Mrhar kot član ustanovnega odbora konferenc BBBB.

Svoj pogled na vprašanja in izzive s področja farmacevtskih znanosti, ki bodo nedvomno aktualni tudi v prihodnosti, je v okviru plenarnih predavanj predstavilo šest mednarodno priznanih znanstvenikov iz širšega Evropskega prostora:



Člani organizacijskega odbora konference.







Utrinek z otvoritve konference.

**prof. dr. Stanislav Gobec** (Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani), **prof. dr. Daniel Markl** (University of Strathclyde, Združeno kraljestvo), **dr. Sulev Reisberg** (University of Tartu, Estonija), **prof. dr. Niklas Sandler** (Nanoform, Finska), **prof. dr. Helder Santos** (University of Groningen, Nizozemska) in **prof. dr. Gerhard Winter** (Ludwig Maximilian University of Munich, Nemčija). V okviru 26 sekcijskih predavanj (15 tujih in 11 domačih), 40 kratkih predstavitev (21 tujih in 18 domačih) in 76 posterjev (47 tujih in 29 domačih) pa so rezultate svojega dela predstavili tako že uveljavljeni raziskovalci kot tudi doktorski študenti, ki so še na začetku svoje raziskovalne poti. Slednje je v skladu z osnovnim namenom konferenc BBBB, ki je tudi spodbujanje medgeneracijskega sodelovanja med znanstveniki in raziskovalci na različnih stopnjah kariere.

Eden od pomembnih rezultatov tega srečanja bo tudi izid posebne številke farmacevtske znanstvene revije z dejavnikom vpliva *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, kjer bodo objavljeni izbrani znanstveni prispevki s konfe-



Udeleženci konference s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

rence. Kot gostujoči uredniki so povabljeni predsednik konference prof. dr. Aleš Obreza, predsednik znanstvenega odbora prof. dr. Rok Dreu, generalna sekretarka konference izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk in članica organizacijskega odbora izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički.

K izpolnitvi glavnega namena konference, to je omogočiti in učvrstiti sodelovanje med domačimi in tujimi raziskovalci in strokovnjaki, tako iz akademske sfere kot industrije, pa je zagotovo pripomogel tudi sproščen družabni program in nenazadnje tudi deževno vreme, ki je še dodatno spodbujalo druženje pod streho konferenčnega prostora in navezovanje novih stikov. Podrobnejše informacije o konferenci so dostopne na spletni strani: <https://bbbb2022.sfd.si/>.

Velik uspeh in odmevnost konference potrjuje zadovoljstvo, izraženo s strani številnih udeležencev simpozija, tako z znanstvenim programom kot organizacijo dogodka. Na konferenci predstavljene vsebine so ponudile oz. nakazale odgovore na obstoječe in prihajajoče izzive sodobnega farmacevtskega razvoja. Slednjih je mnogo, pot



Delegacija iz Estonije, ki bo gostila naslednjo konferenco BBBB.



Predavatelji in ostali udeleženci z Madžarske.

do uspeha pa vodi skozi interdisciplinarni pristop, kar je dodatna vzpodbuda za še intenzivnejše raziskovalno povezovanje, tudi v obliki mednarodnih aktivnosti v skupini BBBB.

K uspešnosti konference je seveda prispevala tudi finančna podpora platinastih sponzorjev Krke d. d. Novo mesto in Leka, d. d., člana skupine Sandoz, zlatega sponzorja Brinox, srebrnega sponzorja Asahi KASEI, bronastih sponzorjev Merck, MletPrep, Munit, ABL&E-JASCO, Labtim, Harke, Chemass, Fluidnatek, Mettler Toledo in Simplivia ter ostalih sponzorjev, za kar smo vsem zelo hvaležni. Upamo, da smo s konferenco in vsemi spremljajočimi dogodki upravičili tudi njihova pričakovanja.



*Predavateljci in ostali udeleženci iz Turčije.*



*Omizja konferenčne večerje v Veliki dvorani Grand hotela Union.*



## SPONSORS

### PLATINUM SPONSORS



#### KRKA

At Krka, our dedication lies in producing high quality products, and keeping people healthy is what motivates us. From start to finish, everything we do revolves around our patients and our attempts to help them preserve and improve their health. Each day, more than 50 million patients in 70 markets are treated with our medicines, which are marketed under our own brand names. This is possible because of our innovative products, investments, and market expansion. Stable sales growth, multiple research projects, and sound business performance have seen us grow into a multinational pharmaceutical business group with almost 13,000 employees.



član skupine Sandoz  
a Sandoz company

#### LEK

Novartis is the leading provider of medicines in Slovenia operating through Lek, Novartis Pharma Services and Sandoz. We are delivering the Novartis strategy: to become focused medicines company powered by technology leadership in R&D, world-class commercialization, global access and data science. Together we build and maintain our reputation as a dynamic, ethical and trusted pharmaceutical company.

### GOLD SPONSOR



#### BRINOX

Brinox is a company with almost forty years of experience offering complete turnkey process solutions and equipment for the biopharmaceutical, pharmaceutical, and food industries.

Brinox guides the customer along the entire path from a complex process challenge to an optimal solution, tailor-made to meet the customer's needs. With the aim of producing first-rate products and systems, we carry out all the steps necessary for success, from research and development, process engineering, design, manufacturing, automation, testing and qualification, installation and all after-sales services.

### SILVER SPONSOR



#### ASAHI KASEI

We, the Asahi Kasei Group, contribute to life and living for people around the world.

Asahi Kasei is the leading manufacturer and supplier of microcrystalline cellulose. We leveraged five decades of experience and our proprietary morphology design technology to create high-performance MCC products with unique properties. With their superior flowability and compactibility, our materials bring formulation design and tableting efficiency to a new level, particularly for high dose, small tablet, and low-compactibility drug formulations.

## BRONZE SPONSORS

**MERCK**

**MeltPrep**

**HARKE**  
Pharma

**CHEMASS**  
MERILNI SISTEMI

**TELEDYNE**  
HANSON RESEARCH  
Everywhereyoulook™



**ABL&E Group**  
Laboratory Equipment

**Fluidnatek**®  
One Step Ahead  
by Bioinicia

**MUNIT**  
JETPHARMA • MICROCHEM  
WE ARE MICRONIZATION

**Labtim**

**SIMPLIVIA**

**METTLER TOLEDO**

---

## OTHER SPONSORS

**SARTORIUS**



**Pfizer**

**MEDIS**

**avantor**™  
delivered by **VWR**™

**Ljubljana**  
Ljubljana Tourism

**mikrospolo**  
VAŠ PARTNER ZA LABORATORIJ



## SIMPOZIJ V ČAST PROFESORJEMA JULIJANI KRISTL IN STANKU SRČIČU OB NJUNI UPOKOJITVI

prof. dr. Mirjana Gašperlin



*Ljubljanski farmacevtski tehnologi: prof. Kristl, prof. Korbar, prof. Srčič in prof. Gašperlin.*

V sredo, 14. septembra 2022, je na Fakulteti za farmacijo (UL FFA) potekal simpozij v čast profesorjema Julijani Kristl in Stanku Srčiču ob njuni upokojitvi. Mednarodno uveljavljenima profesorjema farmacevtske tehnologije in nanotehnologije so se s predavanji poklonili njuni doktorandi, dogodka pa so se udeležili številni sodelavci s fakultete ter kolegi iz Slovenije in tujine. Simpozij je bil uvod v deveto konferenco BBBB, ki je potekala v Ljubljani.

Uvodni pozdrav je slavljenecema in gostom namenila dekanja UL FFA prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, nato pa je pogled na ljubljansko šolo farmacevtske tehnologije, ki sta jo bistveno zaznamovala omenjena profesorja, podal direktor razvoja in proizvodnje zdravil v Krki dr. Aleš Rotar. Sledila sta dva dela, ki sta bila posvečena vsakemu profesorju, uvodoma pa je njuno poklicno pot in pečat, ki

ga puščata v stroki in znanosti, orisala prof. dr. Mirjana Gašperlin, predstojnica Katedre za farmacevtsko tehnologijo.

Prvi del simpozija je bil namenjen profesorici Kristl, mednarodno priznani znanstvenici na področju farmacevtske (nano)tehnologije, ki je uvedla to perspektivno vejo znanosti v stroko pri nas, univerzitetni učiteljici, ki je raziskovalne dosežke vseskozi vključevala v pedagoško delo, in predani mentorici, katere študenti in študentke so prejeli vrsto nagrad, med drugim štiri prestižne nagrade L'Oreal-Unesco za ženske v znanosti. Profesorica Kristl je v svoji karieri uspešno opravljala pomembne vodstvene funkcije na FFA (dekanja fakultete, predstojnica katedre) in UL (prorektorica za izobraževanje). Kot strokovnjakinja je s svojim znanjem in strateškim razmišljanjem sooblikovala razvoj stroke v



Slavljenca ob uvodnem nagovoru dekanje

Sloveniji z vodilnimi pozicijami v različnih strokovnih združenjih in komisijah. Z močno vpetostjo v mednarodni prostor je širila ugled UL FFA tudi izven domačih meja. Izbrana raziskovalna področja in svoj pogled na prof. Kristl kot mentorico so z nami delile njene doktorandke, danes uveljavljene znanstvenice, in sicer:

- dr. Zrinka Abramović, Lek, d. d., **Liposomi in transferosomi: preboj v dermalni in transdermalni dostavi učinkovin**,
- dr. Karmen Teskač Plajnšek, Marifarm, d. o. o., **Razvoj nanodelcev in njihovo vstopanje v celice**, in
- doc. dr. Špela Zupančič, UL FFA, **Nanovlakna: obetavni dostavni sistem in material za regeneracijo tkiv**.

Drugi del simpozija je bil posvečen prof. dr. Stanku Srčiču, prav tako mednarodno prepoznanemu strokovnjaku, ki je s svojim raziskovalnim delom odpiral in širil



Čestitke prof. Srčiču.

znanstvena področja naše fakultete. V svoji bogati karieri je bil predstojnik katedre in prodekan za študijske zadeve, med študenti je veljal za izjemnega predavatelja, ki zna navduševati, zato je bil zelo priljubljen tudi kot mentor pri diplomskih, magistrskih in doktorskih nalogah. S svojim strokovnim delom, članstvom v uredniških odborih mednarodnih revij, strokovnih združenjih in mrežah je pomembno prispeval k povezovanju fakultete z gospodarstvom in širšim mednarodnim okoljem. Vrsto let je deloval kot ekspert za veterinarska zdravila pri Evropski agenciji za zdravila. Tudi prof. Srčiča so v raziskovalni luči s pogledom, zazrtim v preteklost in sedanost ter uprtim v prihodnost, predstavili njegovi doktorandi, in sicer:

- prof. dr. Rok Dreu, UL FFA, **Raziskave na področju tehnologij izdelave pelet: od peletnih jeder do večletnih tablet**,
- doc. dr. Biljana Janković, Lek, d. d., in UL FFA, **Mehanske lastnosti farmacevtskih učinkovin: izzivi v teoriji in praksi**, in
- asist. dr. Zoran Lavrič, UL FFA, **NQR karakterizacija trdne snovi na področju farmacije**.

Simpozij sta s svojimi občutki in spomini na prehojeno pot ter z nasveti za prihodnost nam, ki smo od njiju prevzeli štafetno palico in s tem odgovornost za nadaljnji razvoj in prepoznavnost slovenske farmacevtske tehnologije, zaključila slavljenca. Kljub temu, da smo se s simpozijem poklonili plodnima karierama dveh eminentnih farmacevtskih tehnologov, smo prepričani, da njuno delo in poslanstvo še zdaleč ni končano, le oblike sodelovanj bodo odslej nekoliko drugačne.



Čestitke prof. Kristlovi.



## FIP 2022 – POROČILO

Saša Zaviršek Mikolič, mag. farm., podpredsednica SFD



Letošnji jubilejni 80. Svetovni kongres farmacije in farmacevtskih znanosti (*FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*) je potekal od 18. do 22. 9. 2022 v Seville. Po dveh letih premora zaradi epidemije covid-19 so bili vsi, tako organizatorji kot tudi udeleženci, zelo veseli ponovnega snidenja v živo. Bilo je skoraj 5000 udeležencev iz 104 držav, kar je zagotovo največja udeležba do sedaj. Sočasno je potekal tudi 22. Nacionalni farmacevtski kongres Španije.

Sevilla je glavno mesto pokrajine Andaluzija in predstavlja kulturno in finančno središče južne Španije. Prireditveni center (*Palacio de Exposiciones y Congresos*), v katerem je potekal kongres, je nekoliko izven središča mesta. Omogoča veliko prostora za razstavljalce in veliko število dvoran za predavanja.

Dan pred otvoritvijo kongresa je potekala skupščina FIP-a (*FIP Council Meeting*). Na skupščini lahko sodelujejo pred-

stavniki 144 članskih organizacij. Skupščina je bila organizirana v hibridni obliki in je med drugim obravnavala finančno poročilo 2022 in predlog finančnega poročila za 2023, ki ga je tudi potrdila. FIP v prihodnje (post-covidna faza) načrtuje organizacijo vseh kongresov in srečanj v živo. Naslednji, 81. kongres FIP bo v Brisbanu, v Avstraliji.

Skupščina je med ostalim potrdila tri dokumente: *FIP global competency framework for educators and trainers in pharmacy*, *The role of pharmacy professionals in point-of-care testing in Statement of Policy on continuing professional development*. Priročniki, ki jih je izdal FIP: *Chronic respiratory diseases — A handbook for pharmacists*, *Knowledge and skills reference guide for professional development in chronic respiratory diseases*, *Knowledge and skills reference guide for professional development in cancer care*. Povezave do dokumentov najdete na spletni strani SFD in na straneh FIP.

Letošnja skupščina je bila volilna. Novi predsednik FIP-a je postal Paul Sinclair, farmacevt iz Avstralije. Dosedanji predsednik Dominique Jordan se poslavlja s funkcije. G. Sinclair je farmacevt koncesionar na primarnem nivoju. S FIP-om sodeluje že vrsto let, in sicer kot predsednik Sekcije lekarn na primarnem nivoju (*Community Pharmacy Section*, 2014–18) in predsednik Odbora za lekarniško prakso (*FIP's Board of Pharmaceutical Practice*) od leta 2018.

V nagovoru je poudaril ključne izzive med pandemijo covid-19, kjer je prevzel aktivno vodilno in povezovalno vlogo organizacije FIP, ki je nudila številna izobraževanja v pomoč članskim organizacijam med pandemijo.

Otvoritvena slovesnost je potekala v avditoriju kongresnega centra, kjer so imeli nagovore g. Dominique Jordan, predsednik FIP, g. Jesus Aguilar Consejo, predsednik Sveta Farmacevtov Španije (*General de Colegios Farmacéuticos*), g. Antonio Muñoz, župan Seville, ga. Carolina Darias San Sebastián, ministrica za zdravje Španije, in g. Juan Manuel Moreno, predsednik Odbora za zdravje Andaluzije.

Nagrade in priznanja FIP so bili podeljeni za leta 2020, 2021 in 2022.

Osrednja tema kongresa je bila Združena farmacija in okrevanje zdravstvenega sistema po pandemiji (*Pharmacy united in the recovery of health care*).

Kongres je bil predvsem usmerjen v predstavitev dobrih praks ter izkušenj in okrevanje po epidemiji covid-19. Predstavili so izzive, s katerimi so se soočali v Španiji v času epidemije in kako so uspeli ohraniti lekarnne odprte in dostopne pacientom. Uspešno se je razvila telefarmacija in tudi različni načini digitalizacije storitev za paciente. FIP je bil usmerjen v visoke etične standarde in odgovornost do storitev tudi za ranljivejše skupine ljudi, ki so bili med epidemijo prikrajšani. Pomembno je povezovanje zdravnikov in farmacevtov na področju cepljenja ter vloga farmacevtov



pri zagotavljanju farmacevtskih storitev v dobi digitalizacije.

Naša zavzetost je ključna, da ustvarjamo bolj kakovosten in uspešnejši zdravstveni sistem v državi, kjer živimo. Farmacevti na primarnem, sekundarnem in terciarnem nivoju v vsaki državi, tudi Sloveniji, smo odgovorni, da izpolnjujemo poslanstvo našega poklica in izboljšujemo ugled poklica v javnosti.





## 18. DAN SLOVENSКИH LEKARN – ZDRAVILA IN OTROCI

Maša Koritnik Zadavec, mag. farm., spec.

Z letošnjim dnevom slovenskih lekarn smo se odločili pozornost nameniti našim najmlajšim pacientom. Z izbrano temo in aktivnostmi v lekarnah želimo prispevati k povečanju prepoznavnosti lekarniške dejavnosti in poklica farmacevta v zdravstvu, predvsem pa k varnejši in pravilnejši uporabi zdravil in drugih izdelkov, dosegljivih v lekarni.

Tako smo se v letošnji knjižici poleg osnovnih fizioloških značilnosti in posebnosti otrok dotaknili tudi najpogostejših zdravstvenih težav pri otrocih, cepljenja in nalezljivih bolezni pri otrocih ter farmacevtskih oblik za otroke in njihove pravilne uporabe. V posebnem poglavju smo se osredotočili tudi na to, kaj naj o skrbi za otrokovo zdravje vedo starši in kaj otroci.

V okviru letošnjega dneva slovenskih lekarn smo izvedli tudi **nagradni natečaj z naslovom »Skrbim za svoje zdravje«**. Natečaj je bil namenjen ozaveščanju najmlajših članov družbe o tem, kako zelo je pomembno skrbeti za svoje zdravje in dobro počutje. S tem smo želeli vsem vrtčevskim otrokom in otrokom prve triade osnovne šole približati zdrav način življenja. Otroci ali njihovi starši so imeli možnost oddati risbe osebno v lekarnah ali jih poslati po pošti na sedež Slovenskega farmacevtskega društva. Med vsemi prejetimi izdelki je komisija izbrala šest najbolj izvirnih risb, ki bodo soustvarjale tudi novoletno voščilnico Slovenskega farmacevtskega društva.

18.

dan slovenskih lekarn  
26. september 2022

O PRAVILNI IN VARNI UPORABI ZDRAVIL

## ZDRAVILA IN OTROCI



SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO  
SLOVENIAN PHARMACEUTICAL SOCIETY



## 20. SIMPOZIJ SEKCIJE FARMACEVTOV JAVNIH LEKARN – NOVOSTI NA PODROČJU MAGISTRALNIH ZDRAVIL

Maša Koritnik Zadavec, mag. farm., spec.



Simpozij je po dveh letih potekal v živo v Domus Medica. Vsekakor je bilo po dolgem času lepo spremljati medsebojna srečanja kolegic in kolegov z različnih koncev države. Nekaj nevšečnosti je udeležencem simpozija povzročilo deževno vreme in z njim povezani cestni zastoji, a je bila dvorana v uvodnem delu simpozija že lepo zapolnjena.

Na simpoziju smo se seznanili z novostmi na področju magistralnih zdravil. Poleg magistrov farmacije iz zunanjih in bolnišničnih lekarn smo med predavatelje povabili tudi strokovne kolege z Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS) in Javne agencije RS za medicinske pripomočke (JAZMP). V prvem sklopu predavanj je bil predstavljen pomen Kodeksa magistralnih zdravil, svoj pogled na področje magistralnih zdravil sta predstavila ZZZS in JAZMP, kar je odprlo vprašanja na temo magistralnih zdravil, od samega prevzema substanc, obdelave receptov magistralnih zdravil in aktualnih omejitev izdelave magistralnih zdravil z določenimi učinkovinami.

Temu primerna je bila tudi sklepna diskusija, v kateri je poleg predavateljev sodeloval tudi vodja oddelka za zdravila pri Zavodu za zdravstveno zavarovanje Slovenije prim. mag. Jurij Fürst. Vprašanja in dileme udeležencev so malce premaknili časovnico simpozija, vsi udeleženci so tudi dobili

možnost poslati vprašanja na pisarno Slovenskega farmacevtskega društva (pisarna@sfd.si), ki bo poskrbelo, da bodo strokovnjaki ZZZS, JAZMP in Lekarniške zbornice Slovenije pripravili odgovore in bo dokument z vprašanji in odgovori nanje posredovan v vse lekarnе.

Letošnji simpozij je bil jubilejni, zato smo v počastitev okrogle obletnice v program vključili tudi slavnostni del, in sicer je udeležence nagovoril predsednik Slovenskega farmacevtskega društva prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm., dogajanje pa je s svojimi glasbenimi uspešnicami popestrila tudi slovenska pevka Ditka.

V naslednjih dveh sklopih predavanj je bilo predstavljeno obvladovanje kakovosti in vodenje dokumentacije o pripravi magistralnega zdravila ter njegova ocena tveganja, prav tako tudi kakovost vhodnih farmacevtskih substanc in ovojnine ter ustrezna zaščitna oprema. Seznanili smo se s pripravo sterilnih magistralnih zdravil ter novostmi in izzivi na področju magistralnih zdravil v zunanji in bolnišnični lekarni.

Simpozij so udeleženci dobro sprejeli, tematiko so ocenili kot zelo aktualno ter potrebno širše predstavitve in obdelave, saj se je v preteklih letih na področju magistralnih zdravil izoblikovalo kar nekaj novosti, s katerimi se farmacevti dnevno srečujemo.



## 11. SIMPOZIJ SEKCIJE KLINIČNIH FARMACEVTOV – HEMATOLOŠKI BOLNIK IN ZDRAVILA

Sara Kenda, mag. farm., spec.

3. in 4. junija 2022 je v hotelu Radin v Radencih potekal 11. simpozij Sekcije kliničnih farmacevtov na temo Hematološki bolnik in zdravila. Kot običajno so se simpozija udeležili večinoma specialisti klinične farmacije in specializanti ter drugi magistri farmacije, ki jih področje klinične farmacije zanima. Petkov del simpozija se je začel s častnim predavanjem predsednika ESCP z naslovom »*Future opportunities in clinical pharmacy*«. Sledili so trije sklopi predavanj: hemostaza/tromboza, anemija in izbrana poglavja iz hematologije ter hemato-onkologija. Predavanja in diskusije so bili izčrpani, ne glede na to pa so poslušalci med odmori z veseljem pregledovali posterje ter razstavne prostore številnih razstavjalcev.

Kljub zelo napornemu programu so imeli udeleženci še dovolj energije, da so se udeležili odlične degustacije vin, po kateri je sledila večerja. Večer se je zaključil z zabavo z DJ-em v klubu Swing.

Sobotni program se je začel s postrsko sekcijo. Čeprav so poslušalci zjutraj izgledali nekoliko utrujeni od prejšnjega dne, je bila diskusija na postrski sekciji dokaz, da so imeli še dovolj energije ter da gre raziskovanje na področju klinične farmacije v pravo smer. Sledile so tri delavnice, na katerih so poslušalci krožili razdeljeni v tri skupine. Po končanih delavnicah je sledilo satelitsko predavanje na temo novega zdravila za zdravljenje covid-19, nato pa razglasitev najboljšega posterja. Zaradi izenačenega rezultata iz jutranjega glasovanja je bilo potrebno ponovno glasovanje, pri čemer se je odvila prava drama, saj je bil na koncu odločilen en sam glas.

Letni simpozij Sekcije kliničnih farmacevtov je dobro obiskan simpozij, na katerem se izmenja veliko znanja in izkušenj ter spleta prijateljske vezi. Verjamem, da so udeleženci simpozij zapustili s pozitivnimi občutki in motivacijo za dobro delo tudi v prihodnje.

## EVROPSKA NOČ RAZISKOVALCEV NA FAKULTETI ZA FARMACIJO

izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, izr. prof. dr. Janez Mravljak

V skladu z vizijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani o delovanju v dobrobit slovenskih državljanov z ustvarjanjem in širjenjem znanstvenih spoznanj in s tem sooblikovanjem naše skupne prihodnosti, smo tudi letos na zadnji petek v mesecu septembru organizirali Noč raziskovalcev 2022. Gre za vseevropski projekt »Evropska noč raziskovalcev«, sofinanciran s strani Evropske komisije, pri katerem različne članice Univerze v Ljubljani sodelujemo s projektom »Humanistika, to si ti!«. Slednji se izvaja že od leta 2017, letos pa je bila Noč raziskovalcev prav posebna, saj smo jo po dveh letih epidemije ponovno izvedli tako, kot je najlepša – v živo!

Aktualni projekt v letih 2022 in 2023 nosi naslov »Človek živali in žival človeku«. Letos je na deževni septembrski petek za okoli 150 vedoželjnih obiskovalcev, od tega približno 90 otrok, odlično poskrbela 25-članska ekipa zaposlenih in študentov. Udeleženci so na Fakulteti za farmacijo spoznali znanstveno delo raziskovalk in raziskovalcev s

strokovnih področij farmacije, kozmetologije in laboratorijske biomedicine. Izbirali so lahko med 12 aktivnostmi, devet od teh je potekalo v laboratorijih in/ali predavalnicah. Skozi slednje so obiskovalci dobili odgovore na vprašanja, kot so: kako svetijo kresničke, kako lahko izoliramo DNA – molekulo življenja iz različnih bioloških materialov, kako se izdelata šampon za hišnega ljubljence in kako leščilo za ustnice iz čebeljega voska, kaj se skriva za izrazi slončkova zobna pasta in magične gliste, katera zdravila so živalim prijazna, so računalniške metode alternativa testiranju na živalih in kako zdravimo simptome pasje demence?

Številne kemijske eksperimente smo podkrepili tudi z znanstveno razlago odvijajočih se kemijskih reakcij, obiskovalcem pa prikazali tudi aparaturu za elektrostatsko sukanje, ki smo jo za to noč preimenovali v »nanopajka«, ter sodoben postopek 3D tiskanja in s tem pogled v prihodnost farmacije. Na ogledu v lekarni Mirje so obiskovalci podrobneje spoznali delo lekarniškega farmacevta in njegovo vlogo



pri varni in učinkoviti uporabi (veterinarskih) zdravil, prostore lekarne in njihovo namembnost, naši raziskovalci pa so z izvedbo okrogle mize, naslovljene »Etika uporabe živalskih modelov v raziskavah v farmaciji in medicini« letos sodelovali tudi na glavnem odru prireditve v Ljubljani. Na Noč raziskovalcev smo premierno predvajali tudi videoposnetek s prikazom laboratorijskega dela z živalskimi celičnimi linijami, ki je na kanalu YouTube na voljo vsem zainteresiranim. Vse delavnice, ki jih v okviru tega projekta izvajamo na Fakulteti za farmacijo, so prilagojene različnim skupinam obiskovalcev, še zlasti pa želimo skozi njih približati raziskovalno delo najmlajšim, ki se šele spoznavajo s celotnim spektrom poklicev, ter vzbuditi zanimanje za znanost in poklic raziskovalca. V okviru projekta smo tako že v poletnih mesecih obiskali tudi štiri skupine vrtčevskih otrok in približno 60 šolarjev, ki smo jim predstavili poklic farmacevta, otroci pa

so se kot »farmaceuti-pomočniki« preskusili v izdelavi kreme.

Preko vseh delavnic se je ponovno potrdila velika interdisciplinarnost znanj, ki jih pokriva Fakulteta za farmacijo. Vsi sodelujoči ocenjujemo, da so tovrstni dogodki izjemnega pomena tudi za farmacevtsko stroko in predstavljajo dragoceno priložnost seznanitve širše javnosti z našim raziskovalnim in pedagoškim delom.

Znan je tudi že datum prihodnje Evropske noči raziskovalcev, ki bo potekala 29. 9. 2023 in bo v duhu projekta ponovno razširjala naša obzorja in naše obete delala prijaznejše. Podrobnejši opis aktivnosti je dostopen na spletni strani: <https://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/dogodki/2022/evropska-no%C4%8D-raziskovalcev-2022.pdf?sfvrsn=2>. Lepo vabljeni, da se nam pridružite v čim večjem številu!



## FARMAHRIBI 2022

Patricija Dolinar, mag. farm.

V soboto, 10. septembra 2022, smo v Gorenjski podružnici Slovenskega farmacevtskega društva uspešno izpeljali projekt »Farmahribi 2022«. S 43 udeleženci smo se v družbi vodnikov Franca Golmajerja iz PD Radovljica in Matjeja Trobca, našega stanovskega kolega in člana PD Sežana, tokrat podali po netradicionalni turi. Pohod smo začeli pri slapu Savica. Po slabih dveh urah klepetave hoje

smo prišli do Doma na Komni, kjer smo ob pogledu na Bohinjsko jezero in okoliške gore nazdravili z Gorenjsko grenčico in pojedli obilno kosilo, ki nam ga je omogočilo podjetje Krka, d. d. V dolino smo odnesli sonce in skupno obljubo, ki pravi, da se v vsaj tako pestri zasedbi ponovno srečamo naslednje leto.



# Zahvala

V uredništvu smo ponosni in hvaležni, da smo s kakovostnim delom tako avtorjev kot recenzentov tudi v letu 2022 oblikovali pester letnik vsebin Farmaceutskega vestnika. Utrjevanje in nadgrajevanje starih ter pridobivanje novih znanj sta temelja, na katerih si želimo graditi našo stroko tudi v prihodnje. V tej luči bi želeli vse bodoče avtorje spodbuditi zlasti k pisanju originalnih znanstvenih člankov, ki nam predstavljajo veliko dodano vrednost.

Naj na koncu vsem vam in tudi cenjenim bralcem zaželim vse najlepše v letu, ki prihaja.  
Srečno!

izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač, glavna urednica Farmaceutskega vestnika

Članke, objavljene v letu 2022, so recenzirali:

Alenka Kovačič • Ana Mitrovič • Andrej Perdih • Barbara Breznik  
Boštjan Martinc • Darja Gramec Skledar • Helena Pavšar • Igor Locatelli • Igor Pravst  
Janja Zupan • Janko Kos • Jerneja Ambrožič Avguštin • Joško Osredkar  
Karmen Bončina • Katarina Bolko Seljak • Lea Knez  
Lidija Vrbovšek • Lucija Peterlin Mašič • Maja Rupnik • Marija Petek Šter  
Marija Sollner Dolenc • Marjetka Korpar • Martina Gobec • Maša Bošnjak  
Maša Kenda • Matevž Škerget • Matjaž Jeras • Metka Novak  
Mirjana Gašperlin • Mojca Jensterle Sever • Mojca Kerec Kos • Nace Zidar  
Nataša Karas Kuželički • Nejc Horvat • Nejc Horvat • Nika Marija Lovšin  
Nina Kočever Glavač • Nina Pisk • Polona Gričnik Vozelj • Polonca Drofenic  
Ante Škrobonja • Rok Frlan • Rok Herman • Samo Kreft  
Samo Rožman • Samo Zver • Sara Kenda • Špela Perčič  
Špela Zupančič • Špela Žerovnik • Tanja Tomšič • Teja Glavnik  
Tihomir Tomašič • Tijana Markovič • Tomaž Bratkovič  
Tomaž Vovk • Urša Pečar Fonovič • Urška Blaznik • Urška Nabergoj Makovec  
Venceslava Bavčar • Zvezdana Cvišič • Žane Temova Rakuša • Žiga Jakopin



# RAZPIS ZA PODELITEV PRIZNANJ SLOVENSKEGA FARMACEVTSKEGA DRUŠTVA V LETU 2023

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj objavlja

## RAZPIS ZA PODELITEV PRIZNANJ SFD V LETU 2023.

Predloge za podelitev Minařikovega odličja, Minařikovega priznanja ali priznanja častnega člana Društva lahko podajo podružnice in sekcije, potem ko jih potrdi občni zbor podružnice oz. sekcije.

Rok za prijavo kandidatov teče od objave razpisa v Farmaceutskem vestniku do vključno

**31. januarja 2023.**

Predlagatelji morajo najkasneje do vključno 31. januarja 2023 na naslov **Slovensko farmacevtsko društvo, Dunajska cesta 184A, 1000 Ljubljana (za OPDP)** predložiti **ustrezno datirano, podpisano in žigosano dokumentacijo**,

ki jo zahteva 7. člen Pravilnika o podeljevanju priznanj Slovenskega farmacevtskega društva:

- izpolnjen obrazec za podelitev odličja/priznanja/priznanja častnega člana (dostopen na povezavi: <https://www.sfd.si/o-drustvu/drustvena-priznanja/obrazci/>),
  - utemeljitev,
  - pri predlogu za Minařikovo odličje tudi bibliografijo,
    - sklep organa, ki je predlog potrdil,
- izjavo predlagatelja, da jamči za verodostojnost podatkov, vključenih v predlog za podelitev odličja in priznanj, ter da zagotavlja, da je pri izboru upošteval Kodeks farmacevtske etike članov SFD,
  - soglasje kandidata (pridobi predlagatelj).

Dodatno se pošlje elektronski izvod vloge, ki naj vsebuje zgoraj zahtevano dokumentacijo, pri čemer naj bo besedilo utemeljitve v wordu, in sicer na naslov **pisarna@sfd.si**.

## IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

Učinki slovenske termalne vode na kožne celice, gojene <i>in vitro</i> / <i>The influence of thermal water from Slovenia on in vitro cultured skin cells</i> (Gradišnik L, Železnik D, Krajnc B, Maver U, Eržen A, Milojević M, Velnar T)	3
O lekarnarju Petru Eugenu Sušnju in njegovem izvodu knjige Friedricha Wöhlerja/ <i>About the pharmacist Petar Eugen Sušanj and his book copy written by Friedrich Wöhler</i> (Fabjančič I, Obreza A)	191
Ozaveščenost pacientk, farmacevtov in predpisovalcev o farmakovigilančnih ukrepih za varno uporabo retinoidov/ <i>Awareness of pharmacovigilance measures for safe use of retinoids among female patients, pharmacists and prescribers</i> (Prelesnik S, Čebren Lipovec N, Kos M)	199
Poznavanje demence in podpore osebam z demenco med obiskovalci zdravstvenih domov v Savinjski regiji/ <i>Knowledge of dementia and support for people with dementia among visitors of health care services in the Savinjska region</i> (Glavnik T, Felc B, Jazbar J, Felc Z)	210
Stroškovna učinkovitost uporabe 23-valentnega polisaharidnega pnevmokoknega cepiva pri odraslih v Sloveniji/ <i>Cost-effectiveness of vaccinating adults with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Slovenia</i> (Hren R, Rotar Pavlič D, Vinkovič AT)	351
S poznavanjem prehranskih vrednosti živil do uravnoteženega prehranjevanja/ <i>With knowledge about food nutrition values to a balanced diet</i> (Dolinar J, Tivadar A, Gerbič AM)	364

## PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

Imunoterapija pri zdravljenju glioblastoma: kako daleč (še) do klinične uporabe?/ <i>Immunotherapy in the treatment of glioblastoma: How far (yet) to clinical use?</i> (Knez L, Krivec E, Zottel A, Šamec N)	13
Repozicioniranje zdravil: metformin in valprojska kislina za zdravljenje glioblastoma/ <i>Drug repurposing: metformin and valproic acid for glioblastoma treatment</i> (Žužek Z, Bolčina L, Kump A, Jovčevska I)	23
Tarčno zdravljenje kronične limfocitne levkemije z antagonisti antiapoptotičnih proteinov/ <i>Antagonists of antiapoptotic proteins in the targeted therapy of chronic lymphocytic leukemia</i> (Avsec D, Podgornik H, Mlinarič-Raščan I)	31
Celična senescenca: nova terapevtska tarča pri zdravljenju s starostjo povezanih bolezni/ <i>Cell senescence: a new therapeutic target for the treatment of age-related diseases</i> (Prašnikar E, Borišek J, Perdih A)	40
Prilagajanje odmerjanja protimikrobnih zdravil pri kritično bolnih/ <i>Dose adjustments of antimicrobial drugs in critically ill patients</i> (Cvikl Knehtl M)	54
Vpliv črevesne mikrobiote na metabolični sindrom pri moških/ <i>Impact of gut microbiota on metabolic syndrome in men</i> (Groti Antonić K)	65
Zdravila za napredno zdravljenje: naslednja generacija zdravil <i>Advanced therapy medicinal products: next generation of medicines</i> (Švajger U, Cukjati M)	79
Nove možnosti zdravljenja spinalne mišične atrofije/ <i>New options for the treatment of spinal muscular atrophy</i> (Berlec A)	89
Zdravljenje koronavirusne bolezni 19 z zdravili/ <i>Overview of COVID-19 therapeutics</i> (Morgan T)	95





Monoklonska protitelesa za preprečevanje migrene/ <i>Monoclonal antibodies for the prevention of migraine</i> (Bratkovič T)	107
Novosti pri zdravljenju z zaviralci SGLT2 in agonisti receptorjev GLP-1/ <i>Novelties in the treatment of SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists</i> (Martinc B)	115
Sladkorna bolezen in covid-19: sindemija ali le medsebojna opazovalca/ <i>Diabetes and covid-19: syndemic or just casual bystanders</i> (Volčanšek Š, Janič M)	129
Polimerna nanovlakna za dostavo učinkovin in regeneracijo tkiv pri zdravljenju raka/ <i>Polymer nanofibers for drug delivery and tissue regeneration in cancer treatment</i> (Potrč T, Erdani Kreft M, Kocbek P)	222
Semaglutid – prvi peroralni agonist receptorjev GLP-1 za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2/ Semaglutide – The first oral GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes (Jovanović M, Jančič E, Janič M, Janež A, Lunder M)	231
Protibakterijske spojine z multiplim delovanjem/ <i>Antibacterial compounds with multiple mode of action</i> (Durcik M, Ilaš J)	241
Analizne tehnike za vrednotenje (ne)stabilnosti proteinov/ <i>Analytical techniques for evaluation of protein (in)stability</i> (Osel N, Roškar R)	252
Pregled razvoja metod za določanje vitamina D v krvi/ <i>Development of methods for the measurement of vitamin D in blood – Review</i> (Mlekuš Kozamernik K, Kocjan T, Lanišnik Rižner T)	261
Estrogeni hormoni in estrogeno delujoči kemijski motilci endokrinega sistema: Ali vplivajo na izražanje DNA?/ <i>Estrogen hormones and estrogenically active endocrine disruptors: Do they influence DNA expression?</i> (Grobin A, Trontelj J, Štrukelj B)	375
Neklinično preverjanje varnosti zdravil, namenjenih pediatrični populaciji/ <i>Non-clinical safety testing of medicines intended for the paediatric population</i> (Klinc I, Sollner Dolenc M)	384
Prebavne lipaze in njihov pomen pri aplikaciji zdravil/ <i>Digestive lipases and their significance in drug delivery</i> (Rede K, Bogataj M)	395
Pomen cisteinskih peptidaz pri neurodegenerativnih boleznih/ <i>Importance of cysteine peptidases in neurodegenerative disorders</i> (Bolčina L, Kos J, Pišlar A)	403
Tarčno zdravljenje kronične limfocitne levkemije z zaviralci Brutonove tirozin kinaze/ <i>Targeting Bruton's tyrosine kinase in chronic lymphocytic leukemia</i> (Avsec D, Podgornik H, Škerget M, Mlinarič-Raščan I)	410
Vpliv SARS-CoV-2 na reproduktivno zdravje pri moških/ <i>Effects of SARS-CoV-2 on male reproductive health</i> (Groti Antonić K)	418

## STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

Novosti pri zdravljenju povišanega holesterola/ <i>Novel treatment approaches against elevated levels of cholesterol</i> (Štrukelj B)	137
Inzulini za zdravljenje sladkorne bolezni – novosti in posebnosti/ <i>Insulins for the treatment of diabetes – novelties and special features</i> (Kovačič A)	141
Merjenje glukoze v krvi, izziv za lekarniškega strokovnega delavca/ <i>Measuring blood glucose levels – a pharmacist's challenge</i> (Novak F)	147
Medicinski pripomočki za oskrbo rane/ <i>Medical devices for wound care</i> (Faganelli N)	152
Cepljenje v lekarnah/ <i>Vaccination in Community Pharmacy</i> (Potočnik Benčič D)	158
Predstavitev in pomen Kodeksa magistralnih zdravil/ <i>Codex of extemporaneously prepared medicines and its relevance</i> (Kumperščak Duh M) 87	

Pogled Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije na področje magistralnih zdravil/ <i>View of the Health Insurance Institute of Slovenia on the field of extemporaneously prepared medicines</i> (Strmljan A, Samaluk V, Povše M, Fürst J)	293
Pogled Javne agencije RS za zdravila in medicinske pripomočke na področje magistralnih zdravil: izkušnje iz nadzorov v lekarnah/ <i>View of the Agency for Medicinal Products and Medical Devices of the Republic of Slovenia on the field of extemporaneously prepared medicines: findings from pharmacy inspections</i> (Zupančič T)	301
Obvladovanje kakovosti in vodenje dokumentacije o pripravi magistralnega zdravila v Lekarnah Maribor/ <i>Quality control and documentation management on the preparation of the extemporaneously prepared medicines in Lekarne Maribor</i> (Farič Tuš V, Gričnik Vozelj P)	307
Ocena tveganja za magistralna zdravila/ <i>Risk assessment for extemporaneously prepared medicines</i> (Vrbovšek L)	313
Kakovost vhodnih substanc za farmacevtsko uporabo in ovojnine pri izdelavi magistralnih zdravil ter ustrezna zaščitna oprema/ <i>The quality of incoming substances for pharmaceutical use and packaging in the production of pharmacy preparations and appropriate protective equipment</i> (Alidžanović G, Martinčič E, Perčič Š)	321
Priprava sterilnih magistralnih zdravil v lekarni/ <i>Compounding sterile extemporaneous preparations in pharmacy</i> (Bavčar V, Mitrović S, Tršan M)	327
Novosti in izzivi na področju magistralnih zdravil v zunanji lekarni – primeri iz prakse/ <i>Novelties and challenges in the field of extemporaneous preparations in community pharmacy – examples from practice</i> (Vatovec Rojc B)	336
Izzivi in novosti pri pripravi magistralnih zdravil v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana/ <i>Challenges and novelties in preparation of extemporaneously prepared medicines in University medical centre Ljubljana</i> (Laptoš T, Mitrović S)	343

## KRATKI STROKOVNI ČLANKI – SHORT PROFESSIONAL ARTICLES

Zdravila za subkutano aplikacijo za zdravljenje sladkorne bolezni – klinični primeri farmacevta/ <i>Subcutaneous drugs for the treatment of diabetes – clinical cases of a pharmacist</i> (Korpar M)	164
Bolnik s sladkorno boleznijo v ambulanti farmacevta svetovalca/ <i>Patient with diabetes and drug therapy optimization by consultant pharmacist</i> (Banović Koščak A)	172
Farmakoterapijski pregled pri bolniku s kronično rano/ <i>Pharmacotherapy review in a patient with a chronic wound</i> (Korošec S)	177

## DRUŠTVENE VESTI

Simpozij ob 47. skupščini SFD (Tivadar A)	268
47. skupščina SFD (Tivadar A)	269
Podelitev društvenih priznanj 2022 (Tivadar A)	270
Kratke utemeljitve Minařikovih priznanj (prebrane na slavnostni podelitvi)	272
Prejemnica Minařikovega odličja 2022 Tajda Miharija Gala, magistra farmacije, specialistka iz oblikovanja zdravil – utemeljitev	274
Zahvala prejemnice odličja v imenu vseh nagrajencev (Miharija Gala T)	275
Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnikov na Rogli (Ozmec S)	276
Ob 50-letnici smrti magistra Franca Minařika (Dermota L)	277

Športne igre SFD (Demšar P)	278
9. mednarodna BBBB konferenca (Zvonar Pobirk A, Obreza A)	426
Simpozij v čast profesorjema Julijani Kristl in Stanku Srčiču ob njuni upokojitvi (Gašperlin M)	432
FIP 2022 – poročilo (Zaviršek Mikolič S)	434
18. dan slovenskih lekarn – Zdravila in otroci (Koritnik Zadavec M)	436
20. simpozij Sekcije farmacevtov javnih lekarn – Novosti na področju magistralnih zdravil (Koritnik Zadavec M)	437
11. simpozij sekcije kliničnih farmacevtov – Hematološki bolnik in zdravila (Kenda S)	438
Evropska Noč raziskovalcev na Fakulteti za farmacijo (Zvonar Pobirk A, Mravljak J)	438
Farmahribi 2022 (Dolinar P)	440
Zahvala avtorjem in recenzentom	441
Razpis za podelitev priznanj 2023	442
Letno kazalo	443
Indeks avtorjev	447

## INDEKS AVTORJEV / INDEX OF AUTHORS

Aiken Vinkovič T	351	Klinc I	384
Alidžanović G	321	Kocbek P	222
Avsec D	31, 410	Kocjan T	261
Banović Koščak A	172	Koritnik Zadavec M	436, 437
Bavčar V	327	Korošec S	177
Berlec A	89	Korpar M	164
Bogataj M	395	Kos J	403
Bolčina L	23, 403	Kos M	199
Borišek J	40	Kovačič A	141
Bratkovič T	107	Krajnc B	3
Cukjati M	79	Krivec E	13
Cvikl Knehtl M	54	Kump A	23
Čebtron Lipovec N	199	Kumperščak Duh M	287
Demšar P	278	Lanišnik Rižner T	261
Dermota L	277	Laptoš T	343
Dolinar J	364	Lunder M	231
Dolinar P	440	Martinc B	115
Durcik M	241	Martinčič E	321
Erdani Kreft M	222	Maver U	3
Eržen A	3	Miharija Gala T	275
Fabjančič I	191	Milojevič M	3
Faganeli N	152	Mitrovič S	327, 343
Farič Tuš V	307	Mlekuš Kozamernik	K 261
Felc B	210	Mlinarič-Raščan I	31, 410
Felc Z	210	Morgan T	95
Knez L	13	Mravljak J	438
Fürst J	293	Novak F	147
Gašperlin M	432	Obreza A	191
Gerbič AM	364	Obreza A	426
Glavnik T	210	Osel N	252
Gradišnik	L 3	Ozmeč S	276
Gričnik Vozelj P	307	Perčič Š	321
Grobin A	375	Perdih A	40
Groti Antonić K	65, 418	Pišlar A	403
Hren R	351	Podgornik H	31
Ilaš J	241	Podgornik H	410
Jančič E	231	Potočnik Benčič D	158
Janež A	231	Potrč T	222
Janič M	129	Povše M	293
Janič M	231	Prašnikar E	40
Jazbar J	210	Prelesnik S	199
Jovanović M	231	Rede K	395
Jovčevska I	23	Roškar R	252
Kenda S	438	Rotar Pavlič D	351



Samaluk V	293	Vatovec Rojc B	336
Sollner Dolenc M	384	Velnar T	3
Strmljan A	293	Volčanšek Š	129
Šamec N	13	Vrbovšek L	313
Škerget M	410	Zaviršek Mikolič S	434
Štrukelj B	137, 375	Zottel A	13
Švajger U	79	Zupančič T	301
Tivadar A	268, 269, 270, 364	Zvonar Pobirk A	426, 438
Trontelj J	375	Železnik D	3
Tršan M	327	Žužek Z	23

*24 javnih lekarniških zavodov, ki opravljajo  
lekarniško dejavnost na primarni ravni  
zdravstvene dejavnosti v 196 lekarnah in 50  
lekarniških podružnicah*

*Vam v letu 2023 želi  
veliko zdravja, strokovnosti, sodelovanja,  
povezanosti, novih znanj  
ter prijetnih srečevanj na strokovnih  
in družabnih dogodkih*

Celjske lekarne, Dolenjske lekarne Novo mesto, Gorenjske lekarne,  
Goriška lekarna Nova Gorica, Koroška lekarna, Kraške lekarne Ilirska Bistrica,  
Lekarna Ajdovščina, Lekarna Brežice, Lekarna Kočevje, Lekarna Krško, Lekarna Ljubljana,  
Lekarna Mozirje, Lekarna Ormož, Lekarna Ribnica, Lekarna Sevnica,  
Lekarna Slovenska Bistrica, Lekarna Velenje, Lekarne Ptuj, Lekarne Maribor,  
Mestne lekarne, Obalne lekarne Koper, Pomurske lekarne,  
Zasavske lekarne Trbovlje, Žalske lekarne Žalec





SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO  
SLOVENIAN PHARMACEUTICAL SOCIETY

*Vam želi srečno 2023*

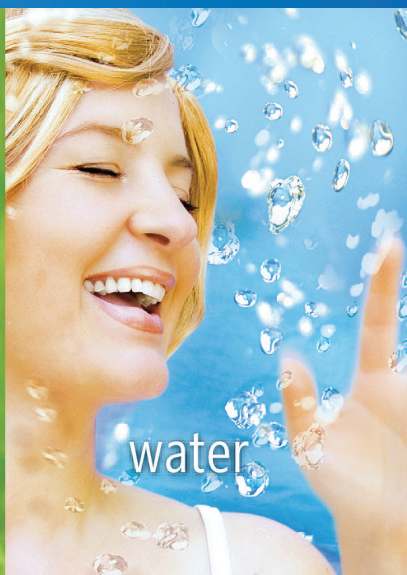


*na vseh poteh!*

\*Risbica je nastala v okviru otroškega likovnega natečaja na temo Skrbim za svoje zdravje.

Zaupajte svojim idejam in počutili se boste svobodne.  
Ustvarjajte in bodite ponosni na svoja dejanja.  
Cenite svojo ljubezen in ljubljeni boste.  
Negujte duha in bodite močni.

V podjetju Alkaloid verjamemo v lastne stvaritve.  
Cenimo in negujemo silo, ki poganja  
življenje in gradi popolno harmonijo,  
ki ji rečemo ZDRAVJE.



*Health above all*



**ALKALOID**







# MINERALI, VITAMINI in druge izbrane snovi

$K^+$

$Zn^{2+}$

$Fe^{2+}$

$Mg^{2+}$

$Ca^{2+}$

Uredniki  
Lucija Peterlin Mašič,  
Aleš Obreza,  
Tomaž Vovk



# 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](http://www.kemofarmacija.si)

