



# farmaceutski vestnik 5-6



Š T 5 - 6 . D E C E M B E R 2 0 1 0 . L E T N I K 6 1

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE · PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA



## 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 lekarnice in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

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

01 470 98 00 | [www.kemofarmacija.si](http://www.kemofarmacija.si)



# Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 5 – 6 • D E C E M B E R 2 0 1 0 • L E T N I K 6 1

## Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

## Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

## Glavna urednica

Petra Slanc Može

## Uredniški odbor

Janja Marc

Lucija Peterlin Mašič

Alenka Rutar Pariš

Andrijana Tivadar

Jurij Trontelj

Matjaž Tuš

## Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mirjana Gašperlin

Mojca Prah Klemenčič

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

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

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

Farmaceutski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 6 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in: BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

Letnik 2010 sofinancira Javna agencija za knjigo Republike Slovenije.

## UVODNIK

V začetku decembra 2010 je Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani organizirala slavnostno srečanje, saj je naša Alma mater praznovala okrogel jubilej: 50. letnico celovitega študija farmacije na Slovenskem. Ob tej priložnosti je dekan Fakultete za farmacijo podelil Slovenskemu farmacevtskemu društvu priznanje za intenzivno sodelovanje na področju promoviranja in razvoja farmacevtske stroke. Prav pri promociji in prenosu farmacevtskih znanj in Farmaceutski vestnik eno od osrednjih nalog, ki sledijo eni od specifik farmacije kot vede in znanosti: to je večdisciplinarnosti, ki je za farmacijo še posebej izrazita. In prav s tem izzivom se sooča Farmaceutski vestnik že vrsto let, saj poskušamo slediti novostim na širokem strokovnem polju, ki zaobjema farmacevtsko industrijo, regulativo, farmacevtsko biokemijo, medicino, tehnologijo, analizo zdravil, interakcije in metabolizem zdravil, klinično in laboratorijsko biomedicino, lekarništvo s socialno farmacijo, distribucijo zdravil in medicinskih pripomočkov, itd. Prav zaradi te strokovne raznolikosti je težko s prispevki ustreči vsem in vsakomur. Zato smo si za prihajajoče leto zadali vsebinsko nekoliko prenoviti Farmaceutski vestnik, za kar pa potrebujemo aktivno udeležbo vseh, ki bi želeli v Farmaceutskem vestniku sodelovati. Uredništvo FV tako odpira novo rubriko s pomenljivim naslovom: »**Aktualno iz stroke**«. Od Vas, spoštovanih bralcev Farmaceutskega vestnika pričakujemo, da boste aktivno sodelovali s krajšimi prispevki o novostih in sodobnih perečih temah, ki zadevajo farmacijo. Posebej bomo veseli prispevkov s kritičnimi, a korektnimi polemikami, ki naj bi še intenzivneje razvijale in tudi povezovala (ne razdvajale) farmacevtsko okolje. V rubriki »**Novice iz sveta farmacije**« si preberite, kako povezovalno za svoje okolje poskrbijo najenostavnejši enocelični organizmi-bakterije. Verjamem, da bomo to zmogli tudi mi, ki se samouvrščamo med najrazvitejša bitja tega planeta.

Ob koncu leta, ko pogledamo za nazaj in načrtujemo delo vnaprej, se vsem kolegicam in kolegom v imenu uredništva FV zahvaljujem za soustvarjanje Farmaceutskega vestnika in vsem bralcem zaželim dobro in čimbolj stabilno, uspehov polno leto 2011.

*Prof.dr. Borut Štrukelj*

# Vsebina

## *Izvirni znanstveni članki – Original scientific articles*

---

**Bojana Bogovič Matijašič, Metoda Zorič Peternel, Irena Rogelj**

Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu  
*Determination of labeled bacteria in probiotic food supplements and medicinal products (OTC) on Slovenian market*

**263**

**Barbara Kozamernik**

Spontano poročanje neželenih učinkov: odnos in praksa zdravstvenih delavcev in distributerjev v Jugovzhodni Evropi  
*Spontaneous adverse drug reaction reporting: attitudes and practice of health care professionals and distributors in South East European region*

**271**

**Maja Florjanič, Julijana Kristl**

Proučevanje razkužilnega učinka ozona na planktonske in biofilmske mikroorganizme v prečiščeni vodi v dinamičnem laboratorijskem in industrijskem okolju  
*Investigation of ozon disinfection effect on planctonic and biofilm microorganisms in purified water in dynamic laboratory and industrial environment*

**282**

## *Pregledni znanstveni članek – Review scientific articles*

---

**Polonca Ferk**

Farmakogenomika selektivnih zaviralcev privzema serotonina  
*Pharmacogenomics of selective serotonin reuptake inhibitors*

**289**

## *Zanimivosti iz stroke*

---

**295**

Evropski komite za homeopatijo in smernice za prihodnost

**295**

7<sup>th</sup> EPSA Autumn Assembly

**296**

50-letnica celovitega študija farmacije v Sloveniji

**298**

## *Novice iz sveta farmacije*

---

**299**

## *Osebne vesti*

---

**302**

## *Letno kazalo*

---

**303**

## *Navodila avtorjem*

---

**308**

# Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu

## Determination of labeled bacteria in probiotic food supplements and medicinal products (OTC) on Slovenian market

Bojana Bogovič Matijašič, Metoda Zorič Peternel, Irena Rogelj

**Povzetek:** Na slovenskem trgu se število probiotičnih prehranskih dopolnil oziroma zdravil hitro povečuje. Pomemben kriterij kakovosti teh izdelkov je število živih probiotičnih mikroorganizmov, ki zagotavljajo njihovo učinkovitost. Proizvajalci, distributerji ali prodajalci se redko odločajo za preiskave probiotičnih izdelkov v neodvisnih laboratorijih, saj slovenska zakonodaja ne predpisuje preverjanja njihove sestave pred prodajo. Namen raziskave je bil zato pregledati ustreznost probiotičnih prehranskih dopolnil ter probiotičnih zdravil (OTC), naprodaj v slovenskih lekarnah. Od 20 probiotičnih prehranskih dopolnil je le pet izdelkov vsebovalo dovolj živih mikroorganizmov glede na deklaracijo, pri dveh izdelkih pa število ni bilo deklarirano. V šestih izdelkih z metodo PCR nismo našli živih predstavnikov vseh navedenih vrst. Obe probiotični zdravili sta ustrezali tako po vrstni sestavi kot po številu probiotičnih bakterij. Rezultati kažejo na potrebo po boljši kontroli kakovosti tovrstnih izdelkov.

**Ključne besede:** probiotična prehranska dopolnila, probiotična zdravila, kakovost probiotičnih izdelkov, PCR

**Abstract:** There are an increasing number of probiotic food supplements or medicinal products on the Slovenian market. Probiotic microorganisms in these products have to be viable otherwise the effects may not be expected. Producers, distributors or sellers do not decide often for the analysis of probiotic products in independent laboratories since Slovenian legislation does not require control of their content before being sold. The aim of this study was to survey the suitability of probiotic food supplements and medicinal products (OTC) available in Slovenian pharmacies. Five food supplements out of 20 tested contained enough viable microorganisms while the number was not declared in two products. In six products the viable representatives of all declared species were not found by PCR method. Both probiotic medicinal products were suitable regarding the species composition and number of probiotic bacteria. Results indicate the need for better quality control of such products.

**Key words:** probiotic food supplements, probiotic medicinal products, quality of probiotic products, PCR

## 1 Uvod

Na trgu so probiotiki na voljo v obliki funkcionalnih živil, prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta. Med funkcionalnimi živili s probiotiki prevladujejo probiotični jogurti in mlečni napitki, sledijo jim siri in mlečni namazi s probiotiki, vse več pa je tudi živil rastlinskega izvora, namenjenih predvsem vegetarijancem. Prehranska dopolnila in zdravila pa vsebujejo liofilizirane probiotične mikroorganizme v obliki kapsul, tablet, pastil, peroralnih praškov in peroralnih kapljic. Prehranska dopolnila daleč prednjačijo pred zdravili, saj so regulatorne zahteve za prehranska dopolnila bistveno blažje od tistih za zdravila (1). Posebnost zdravil s probiotiki je, da lahko navajajo neposredne

učinke na bolezenska stanja, ki so dokazani, medtem ko pri hrani oz. prehranskih dopolnilih to ni dovoljeno, oziroma so trditve in navedbe lahko samo splošne (2, 3). Podobno velja tudi za oglaševanje.

Kljub temu da proizvajalci, dobavitelji ali uvozniki prehranskih dopolnil niso dolžni preverjati sestave izdelkov pred prodajo, pa se v zadnjem času vse pogosteje odločajo za preiskave v neodvisnih laboratorijih, saj se zavedajo, da s tem pridobijo večje zaupanje kupcev. Ker je zanesljivo potrjevanje probiotičnih mikroorganizmov mogoče samo s kombinacijo klasičnih in sodobnih, nekoliko zahtevnejših mikrobioloških metod, ki se še razvijajo, v EU zaenkrat še ne obstajajo standardne

metode za preiskave probiotičnih izdelkov, prvi laboratoriji za tovrstne analize pa so šele v postopkih akreditacije.

Leta 2006 so bili prvič objavljeni podatki o ustreznosti probiotičnih izdelkov, naprodaj v Sloveniji (4). Avtorici sta v raziskavo zajeli 6 prehranskih dopolnil v obliki kapsul, tablet ali praška, enega probiotičnega zdravila brez recepta (OTC) ter 11 probiotičnih mlečnih izdelkov. Pokazalo se je, da je označevanje teh izdelkov pogosto pomanjkljivo ali neustrezno glede števila živih probiotičnih bakterij in navedenih vrst.

V raziskavi, katere rezultati so predstavljeni v tem delu, pa smo pregledali 20 probiotičnih prehranskih dopolnil ter dve probiotični

zdravili (OTC) s polic slovenskih lekarn, kupljenih v letu 2009. Ker s konvencionalnimi gojitvenimi metodami lahko ugotovljamo le določene skupine oziroma rodove probiotičnih bakterij v izdelku, ne moremo pa potrditi prisotnosti posameznih navedenih vrst, smo uporabili tudi molekularno biološke metode.

## 2 Materiali in metode

### 2.1 Probiotični izdelki

Probiotične izdelke smo kupili v lekarnah v Sloveniji. Hranili smo jih pri sobni temperaturi do analize, izvedene pred iztekom roka uporabnosti.

### 2.2 Bakterijski sevi in pogoji kultivacije

Imena in izvor bakterijskih sevov, ki smo jih uporabili kot referenčne seve v reakcijah PCR, so navedeni v Preglednici 1. Omenjene seve smo oživili iz zamrznjenih kultur, ki jih hranimo v mikrobnih zbirki na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, z dvakratnim precepljanjem v gojišče MRS (Merck). *Str. thermophilus* smo inkubirali pri 42 °C v aerobnih razmerah, vse ostale pa pri 37 °C. Bifidobakterije smo tako v tekočem kot v trdnem gojišču inkubirali v anaerobnih razmerah, ki smo jih zagotovili z uporabo sistema Genbox (Bio-Merieux). Laktobacile v trdnem gojišču smo inkubirali v anaerobnih razmerah, v tekočem gojišču pa v aerobnih. Bifidobakterije smo gojili v tekočem gojišču MRS (Merck) z dodanim cistein hidrokloridom (Merck) v koncentraciji 0,05 % (w/v), laktobacile pa v običajnem gojišču MRS.

### 2.3 Ugotavljanje števila mikroorganizmov z metodo štetja na ploščah

Število mikroorganizmov posameznih skupin, rodov oziroma vrst smo ugotavljali z nacepljanjem vzorcev na standardna selektivna gojišča (Preglednica 2). Uporabili smo hranljive podloge proizvajalca Merck. Anaerobne pogoje inkubacije smo zagotovili s sistemom GenBox (Bio-Mérieux). Analizirali smo po 1 g vzorca oziroma 1 ml izdelka v obliki suspenzije ali 5 kapljic izdelka v kapalni steklenički. Za razredčevanje smo uporabljali ¼ Ringerjevo raztopino, ki smo ji dodali 0,05 % L-cistein hidroklorida. Po končani inkubaciji smo prešteli izrasle kolonije

**Preglednica 1:** Vrste in izvor referenčnih bakterijskih sevov.

**Table 1:** Species and source of reference bacterial strains.

Bakterija	Izvor
<i>Bif. animalis ssp. lactis</i>	LMG 8314
<i>Bif. bifidum</i>	ATCC 29521
<i>Bif. infantis</i>	FAM 14390
<i>Bif. longum</i>	ATCC 15708
<i>Ec. faecium</i>	ATCC 6057
<i>Lb. acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Lb. bulgaricus</i>	ATCC 11842
<i>Lb. casei</i>	ATCC 393
<i>Lb. paracasei</i>	DSM 5622
<i>Lb. gasseri</i>	ATCC 20243
<i>Lb. plantarum</i>	ATCC 8014
<i>Lb. reuteri</i>	ATCC 55730
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 53103
<i>Lb. salivarius</i>	LMG 9477
<i>Lc. lactis</i>	LMG 7930
<i>Str. thermophilus</i>	CCM 7711

ATCC, American Type Culture Collection

FAM, Swiss Federal Research Station for Animal Production and Dairy Products, Bern, Švica

LMG, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Gent, Belgija

DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Nemčija

CCM, Czech Collection of Microorganisms, Brno, Češka Republika

**Preglednica 2:** Gojišča in pogoji gojenja mikroorganizmov.

**Table 2:** Media and cultivation conditions for microorganisms.

Vrsta mikroorganizma	Gojišče	Pogoji gojenja
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS+cli <sup>a</sup> +ciproflo <sup>b</sup> , pH=6,8	37 °C, anaer., 3 dni
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
Skupni laktobacili	Rogosa	37 °C, anaer., 3 dni
Mezofilni laktobacili	Rogosa	30 °C, anaer., 3 dni
<i>Bifidobacterium</i>	MRS+0,05% cistein+mup <sup>c</sup> , pH=6,8	37 °C, anaer., 3 dni
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17	42 °C, aer., 3 dni
<i>Lactococcus</i>	M17	30 °C, aer., 3 dni
Plesni in kvasovke	YGC	24 °C, aer., 3-5 dni
<i>Enterococcus</i>	CATC	37 °C, aer., 3 dni
<i>Bacillus</i>	BHI	37 °C, aer., 2 dni

cli<sup>a</sup> – clindamycin (Sigma), koncentracija v gojišču 0,1 µg/ml

ciproflo<sup>b</sup> – ciprofloxacilin (Fluka), koncentracija v gojišču 10 µg/ml

mup<sup>c</sup> – mupirocin (AppliChem), koncentracija v gojišču 50 µg/ml

s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (KE) mikroorganizmov v enoti probiotičnega izdelka smo izračunali po naslednji formuli (5):

$$KE = n / ((f_a^{-1} + f_b^{-1}) \cdot d)$$

Legenda:

n ... vsota kolonij izraslih na ploščah

$f_a$  ... število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi

$f_b$  ... število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi

d ... recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

## 2.4 Ugotavljanje prisotnosti deklariranih vrst iz rodov *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* in *Bifidobacterium* v izdelkih

DNA smo iz referenčnih sevov (Preglednica 1) osamili s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca. Modificirali smo le liziranje bakterijskih celic na začetku protokola, ki je potekalo 45 minut pri 37 °C, s pomočjo lizocima (Sigma, 10 mg/ml) in mutanolizina (Sigma, 25 U/ml). Na podoben način smo izolirali tudi skupno DNA iz mešanice kolonij, zraslih po nacepljanju izdelkov na posamezna gojišča (Preglednica 2): M17 za laktokoke, Rogosa za laktobacile, gojišče z mupirocinom za bifidobakterije ter CATC za enterokoke. Prisotnost posameznih vrst probiotičnih bakterij smo ugotavljali s pomočjo metode PCR (eng. polymerase chain reaction - verižna reakcija s polimerazo), pri čemer smo uporabili v literaturi opisane vrstno specifične začetne oligonukleotide in reakcijske pogoje: *Bifidobacterium* (*Bif.*) *bifidum*, *Bif. lactis*, *Bif. infantis* in *Bif. longum* (6); *Lactobacillus* (*Lb.*) *acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* in *Lb. rhamnosus* (7); *Lb. paracasei* (8); *Lb. salivarius* (9); *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (10); *Lactococcus lactis* (11); *Enterococcus faecium* (12) in *Streptococcus thermophilus* (13).

Velikost pomnožkov PCR smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo (2 % agaroz), pri čemer smo gele obarvali z barvilom SybrGreen I.

## 2.5 Identifikacija izolatov *Bacillus*

Za vrsto *Bacillus coagulans*, ki smo jo ugotovili v 4 izdelkih, ni na voljo dovolj specifičnih začetnih oligonukleotidov za PCR, zato smo to vrsto potrjevali na podlagi ugotavljanja nukleotidnega zaporedja dela gena za bakterijsko 16S rRNA. Genomsko DNA smo iz kulture izolatov *Bacillus*, zraslih na gojišču BHI, osamili s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca. 660 bp dolgi odsek variabilne regije V1/V3 gena za 16S rDNA (685-705 pri *E. coli*) smo pomnožili s PCR z začetnimi oligonukleotidi P1 in P4, kakor so opisali Kljiv in sod. (14). Nukleotidno zaporedje pomnožkov PCR, očiščenih s pomočjo komercialnega kompleta Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), so ugotavljali v laboratoriju Microsynth (Balgach, Švica). Nukleotidna zaporedja smo primerjali s tistimi, ki so shranjena v genski banki NCBI (National Center for Biotechnology Information, Rockville, Bethesda, ZDA), s pomočjo

programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ki je dostopen na medmrežju (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 3 Rezultati in razprava

Rezultati pregleda prehranskih dopolnil s polic slovenskih lekarn, kupljenih v letu 2009, so strnjeni v priloženi preglednici (Preglednica 3). Od skupaj 20 pregledanih, je pet izdelkov (25 %) vsebovalo število probiotičnih mikroorganizmov, skladno z deklaracijo, pri 12 izdelkih je bilo ugotovljeno število nižje od navedenega, pri dveh izdelkih pa število ni bilo navedeno. V enem izdelku nismo uspeli potrditi živih bakterij. Navajanje vrst je bilo z izjemo enega izdelka zadovoljivo, oznake sevov pa so prej izjema kot pravilo. Navedene vrste smo večinoma tudi potrdili, z izjemo izdelkov z velikim številom različnih bakterij (6-8), pri katerih v nobenem primeru med živimi bakterijami nismo našli prav vseh navedenih vrst. Pregledali smo tudi dve probiotični OTC zdravili, ki pa sta bili ustrezni tako po vrsti kot po številu probiotičnih bakterij.

Pri navajanju pričakovanih učinkov probiotikov sicer nismo naleteli na deklarativne nepravilnosti, saj je le pri obeh probiotičnih OTC zdravilih zapisano, da je izdelek namenjen zdravljenju, in sicer »preventivo in podporno zdravljenje pri driskah« medtem, ko na prehranskih dopolnilih ni direktnih »zdravstvenih trditev«. Navedbe na prehranskih dopolnilih namreč omenjajo **pomoč** pri vzpostavitvi porušene črevesne mikroflore, **blagodejno delovanje** na imunski sistem, **preventivno delovanje** pri dietah in nekaterih bolezenskih stanjih (driska odraslih in otrok, driska ob antibiotični terapiji, kronične vnetne bolezni črevesja, atopijski dermatitis, različne alergije in kronična zaprtja), **prispevek** k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi ali **boljše počutje** oseb v zrelih letih. Opozoriti pa je potrebno, da takšne navedbe potrošnika zlahka zavedejo, saj hitro spregleda malenkostne dodatke, kot so »pomoč, blagodejno, preventivno, prispevek ali boljše počutje« in ga pritegne bolj atraktivna paleta bolezenskih stanj, običajno navedena v oklepajih.

Na pomanjkljivosti probiotičnih izdelkov, predvsem prehranskih dopolnil s probiotiki, raziskovalci opozarjajo že vrsto let (15, 16, 17, 18, 19). Tudi raziskava izpred petih let o probiotičnih izdelkih na slovenskem trgu je potrdila neprimernost nekaterih izdelkov. Najpogostejše pomanjkljivosti so bile odsotnost živih predstavnikov deklariranih vrst, premajhno število živih bakterij in nepravilno poimenovanje probiotičnih bakterij (4). Od šestih prehranskih dopolnil je samo eno (~ 16,7 %) popolnoma odgovarjalo navedbam o sestavi in številu mikroorganizmov, kar je še nekoliko manj, kot v predstavljeni raziskavi. Žive bifidobakterije smo na primer dokazali le v dveh izdelkih, čeprav so bile deklarirane kar v petih, vrste *Lb. acidophilus* pa celo v nobenem od štirih, ki bi jo morale vsebovati. Pri treh izdelkih števila mikroorganizmov sploh ni bilo navedenega, dva izdelka pa sta jih vsebovala premalo. Probiotični jogurti in mlečni napitki so se takrat odrezali veliko bolje kot prehranska dopolnila. Po sestavi so večinoma ustrezali, le pri bifidobakterijah je bilo nekaj pomanjkljivosti pri navedbi vrst. Od 11 omenjenih izdelkov jih je pet vsebovalo več kot 10<sup>7</sup> KE/ml vse do konca uporabnosti, ostali pa vsaj 10<sup>6</sup> KE/ml (4). S 100 g izdelka z 10<sup>7</sup> KE/ml zaužijemo 10<sup>9</sup> živih probiotičnih bakterij – kar je povprečno število probiotikov v odmerku prehranskega dopolnila.

**Preglednica 3:** Ustreznost 20 probiotičnih prehranskih dopolnil in 2 probiotičnih zdravil, kupljenih v slovenskih lekarnah v letu 2009, glede prisotnosti deklariranih vrst mikroorganizmov in njihovega števila.

**Table 3:** Suitability of 20 probiotic food supplements and 2 probiotic medicinal products (OTC) obtained in Slovenian pharmacies in 2009 regarding the presence of labeled species of microorganisms and their number.

DEKLARIRANI PROBIOTIKI	DEKLARIRANO ŠTEVILO	UGOTOVLJENO ŠTEVILO	USTREZNOST
<b>PROBIOTIČNA PREHRANSKA DOPOLNILA</b>			
<i>Lb. acidophilus</i>	✓ Skupno: 10 <sup>11</sup> KE /stekleničko	Skupno: 1,8×10 <sup>9</sup> KE/stekleničko-	<b>ne ustreza</b> prenizko število
<i>Lb. paracasei</i>	✓ <i>Bif. lactis</i> : 24×10 <sup>9</sup> KE/stekleničko	<i>Bif. lactis</i> : 1,8×10 <sup>9</sup> KE/stekleničko	
<i>Lb. plantarum</i>	✓ <i>Lb. acidophilus</i> : 6,4×10 <sup>9</sup> KE/stekleničko	<i>Lb. acidophilus</i> : 1,2×10 <sup>7</sup> KE/stekleničko	
<i>Bif. lactis</i>	✓ <i>Lb. plantarum</i> : 28 × 10 <sup>9</sup> KE/stekleničko <i>Lb. paracasei</i> : 0,32×10 <sup>9</sup> KE/stekleničko	<i>Lb. plantarum</i> + <i>Lb. paracasei</i> : 2,2×10 <sup>7</sup> KE/stekleničko	
<i>Lb. gasseri</i>	✓ 10 <sup>7</sup> KE/tableto	1,5×10 <sup>7</sup> KE/tableto	<b>ustreza</b>
<i>Bif. bifidum</i>	✓		
<i>Bif. longum</i>	✓		
<i>Lb. reuteri</i>	✓ 10 <sup>8</sup> KE/tableto	1,4×10 <sup>7</sup> KE/tableto	<b>ne ustreza</b> prenizko število
Protectis			
<i>Lb. acidophilus</i>	7,5×10 <sup>8</sup> KE/kapsulo	1,2×10 <sup>7</sup> KE/kapsulo	<b>ne ustreza</b> prenizko število nepravilno ime v deklaraciji ( <i>Lb. sporogenes</i> ) odsotnost KE treh vrst
<i>Lb. bulgaricus</i>			
<i>Lb. sporogenes</i> (neobstoječa vrsta)			
= <i>Bacillus coagulans</i>	✓		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	✓		
<i>Bif. bifidum</i>			
<i>Lb. acidophilus</i>	✓ 1,5×10 <sup>9</sup> KE/vrečko	4,8×10 <sup>8</sup> KE/vrečko	
<i>Lb. bulgaricus</i>			<b>ne ustreza</b> prenizko število odsotnost KE dveh vrst
<i>Lb. sporogenes</i> (neobstoječa vrsta)=			
<i>Bacillus coagulans</i>	✓		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	✓		
<i>Bif. bifidum</i>			
<i>Lb. plantarum</i>	✓ 10 <sup>10</sup> KE/kapsulo	3,8×10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	
<i>Lb. gasseri</i>	✓ 10 <sup>7</sup> KE/tableto	4,3×10 <sup>6</sup> KE/tableto	
<i>Bif. bifidum</i>	✓		
<i>Bif. longum</i>	✓		
<i>Lb. reuteri</i>	10 <sup>8</sup> KE/5 kapljic	2,4×10 <sup>7</sup> KE/5 kapljic	<b>ne ustreza</b> prenizko število
Protectis			
<i>Bif. bifidum</i>	✓ 5×10 <sup>9</sup> KE/vrečko	1,1×10 <sup>10</sup> KE/vrečko	<b>delno ustreza</b> skupno število je ustrezno odsotnost KE dveh vrst
<i>Lb. acidophilus</i>	✓		
<i>Lb. casei</i>			
<i>Lb. plantarum</i>	✓		
<i>Lb. rhamnosus</i>			
<i>Lb. salivarius</i>	✓		
<i>Lactococcus lactis</i>	✓		
<i>Bif. bifidum</i>	5×10 <sup>9</sup> KE/vrečko	1,4×10 <sup>10</sup> KE/vrečko	
<i>Bif. lactis</i>	✓		
<i>Lb. acidophilus</i> (2×)	✓		
<i>Lb. paracasei</i>	✓		
<i>Lb. plantarum</i>	✓		
<i>Lb. rhamnosus</i>			
<i>Lb. salivarius</i>	✓		
<i>Enterococcus faecium</i>	✓		



Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu

DEKLARIRANI PROBIOTIKI	DEKLARIRANO ŠTEVILO	UGOTOVLJENO ŠTEVILO	USTREZNOST
<b>PROBIOTIČNA PREHRANSKA DOPOLNILA</b>			
<i>Lb. casei</i>	4×10 <sup>9</sup> KE/vrečko	1,3×10 <sup>10</sup> KE/vrečko	<b>delno ustreza</b>
<i>Lb. rhamnosus</i>			skupno število
<i>Lb. plantarum</i>	✓		je ustrezno
<i>Bif. bifidum</i>	✓		odsotnost KE
<i>Bif. lactis</i>	✓		dveh vrst
<i>Bif. longum</i>	✓		
<i>Lb. bulgaricus</i> (2 seva)	1×10 <sup>10</sup> KE/ kapsulo	2×10 <sup>8</sup> KE/ kapsulo	<b>ne ustreza</b>
<i>Lb. gasseri</i>			pre nizko število
<i>Streptococcus thermophilus</i>			
<i>Bacillus coagulans</i>	✓ 2×10 <sup>9</sup> spor <i>B. coagulans</i> /stekleničko	2,9×10 <sup>6</sup> spor <i>B. coagulans</i> /stekleničko	<b>ne ustreza</b>
			pre nizko število
<i>Bacillus coagulans</i>	✓ 2×10 <sup>9</sup> spor <i>B. coagulans</i> /kapsulo	1,2×10 <sup>7</sup> spor <i>B. coagulans</i> /kapsulo	<b>ne ustreza</b>
			pre nizko število
<i>Lb. acidophilus</i> La-14	✓ 2,6×10 <sup>10</sup> KE/kapsulo	6,2×10 <sup>10</sup> KE/kapsulo	<b>ustreza</b>
<i>Lb. paracasei</i> Lpc-37	✓		
<i>Lb. plantarum</i> Lp-115	✓		
<i>Bif. lactis</i> BI-14	✓		
<i>Lb. acidophilus</i> DDS-1	✓ 7,2×10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	1,0×10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	<b>ne ustreza</b>
<i>Lb. bulgaricus</i> DDS-14	✓		pre nizko število
<i>Bif. bifidum</i>			
<i>Lb. acidophilus</i>	✓ 4×10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	3,5×10 <sup>8</sup> KE/kapsulo	<b>ne ustreza</b>
<i>Lb. bulgaricus</i>	✓		pre nizko število
<i>Lb. paracasei</i>	✓		odsotnost KE
<i>Bif. bifidum</i>			dveh vrst
<i>Bif. longum</i>			
<i>Str. thermophilus</i>	✓		
»acidophilus«	Ni navedeno	1,0×10 <sup>3</sup> KE kvasovk/ml suspenzije	<b>ne ustreza</b>
»bifidus«		1,1×10 <sup>7</sup> KE bakterij/ ml suspenzije	deklaracija ne
»saccharomyces«			navaja števila
			imena so
			nepopolna
<i>Lb. gasseri</i> PA 16/8	✓ Ni navedeno	7,1×10 <sup>6</sup> KE/tableto	<b>ne ustreza</b>
<i>Bif. bifidum</i> MF 20/5	✓		deklaracija ne
<i>Bif. longum</i> SP 07/3	✓		navaja števila
<i>Lb. rhamnosus</i>	2×10 <sup>10</sup> KE laktobacilov/stekleničko	Nismo ugotovili živih bakterij	<b>ne ustreza</b>
<i>Lb. acidophilus</i>			število živih
<i>Lb. bulgaricus</i>			bakterij pod
<i>Bif. bifidum</i>			mejo detekcije
<i>Str. thermophilus</i>			
<b>PROBIOTIČNI ZDRAVILI</b>			
<i>Lb. gasseri</i>	✓ 1,2×10 <sup>7</sup> KE/kapsulo	5,8×10 <sup>7</sup> KE/kapsulo	<b>ustreza</b>
<i>Bif. infantis</i>	✓		
<i>Enterococcus faecium</i>	✓		
<i>Lb. acidophilus</i>	✓ 10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	3,5×10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	<b>ustreza</b>
<i>Bif. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	✓ 10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	3,7×10 <sup>9</sup> KE/kapsulo	



**Slika 1:** Reprezentativna slika agarosenega gela (2 % w/vol agaroze) po elektroforezi vzorcev DNA, osamljene iz kultivabilne populacije probiotikov iz različnih probiotičnih izdelkov, ter pomnožene v reakciji verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR), specifični za posamezne bakterijske vrste: *Bif. lactis* (proge 2-4, 680 bp), *Bif. bifidum* (proge 6-8, 278 bp), *Bif. longum* (proge 12-14, 831 bp) in *Bif. infantis* (proge 15-18, 828 bp).

Proge 1, 11 in 19, DNA velikostni standard 100 bp (Fermentas); Progi 10 in 20, DNA velikostni standard Ultra low range (Fermentas); proga 2, referenčni vzorec DNA za *Bif. lactis*; progi 3 in 4, DNA iz dveh izdelkov; proga 5, negativna kontrola; proge 6-8, DNA iz treh izdelkov; proga 9, negativna kontrola; progi 12 in 13, DNA iz dveh izdelkov; proga 14, negativna kontrola; proga 15, referenčni vzorec za *Bif. infantis*; proga 16, DNA iz izdelka; proga 17, DNA iz izdelka; proga 18, negativna kontrola.

**Figure 1:** Representative picture of agarose gel (2 % w/vol agarose) after electrophoresis of DNA samples isolated from the cultivable population of probiotics from different probiotic products and amplified in PCR specific for different bacterial species: *Bif. lactis* (lanes 2-4, 680 bp), *Bif. bifidum* (lanes 6-8, 278 bp), *Bif. longum* (lanes 12-14, 831 bp) and *Bif. infantis* (lanes 15-18, 828 bp). Lanes 1, 11 and 19, DNA ladder 100 bp (Fermentas); Lanes 10 and 20, DNA ladder Ultra low range (Fermentas); lane 2, reference DNA of *Bif. lactis*; lanes 3 and 4, DNA from two products; lane 5, negative control; lanes 6-8, DNA from three products; lane 9, negative control; lanes 12 and 13, DNA from two products; lane 14, negative control; lane 15, reference DNA of *Bif. infantis*; lane 16, DNA from a product; lane 17, DNA from a product; lane 18, negative control.

Velja pa omeniti, da mnogi menijo, da metoda štetja na ploščah, ki se tradicionalno uporablja za ugotavljanje kakovosti probiotičnih izdelkov, ni najprimernejša. Razen tega, da je selektivnost razpoložljivih gojišč nezadostna, kar lahko vodi v precenjeno število posameznih probiotičnih bakterij, je znano tudi, da sposobnosti razmnoževanja oz. kultivabilnosti probiotičnih bakterij v laboratorijskih pogojih ne moremo enačiti z živostjo in aktivnostjo. Lahtinen in sod. so na primer pokazali, da imajo tudi probiotične bakterije, ki niso sposobne zrasti na gojišču, nekatere lastnosti živih celic, kot so esterazna aktivnost, nepoškodovana citoplazmna membrana in ohranjen pH gradient (20).

V zadnjem času se uveljavljajo tudi alternativne metode za ugotavljanje živosti, med katerimi je poleg tekočinske citometrije zelo obetavna tudi metoda PCR v realnem času, ki v kombinaciji s tretiranjem vzorcev s propidijevim monoazidom omogoča razlikovanje nepoškodovanih bakterij od mrtvih (21). V bližnji prihodnosti lahko zato pričakujemo nove in/ali izpopolnjene metode ter standarde, ki bodo omogočili zanesljivejšo in bolj striktno kontrolo probiotičnih izdelkov, kar bo v korist in zaščito tako potrošnika kot kakovostnih proizvajalcev.

## 4 Sklep

Na slovenskem trgu je trenutno naprodaj več probiotičnih prehranskih dopolnil, ki ne ustrezajo deklaracijam. Odstopanja so največja pri številu živih probiotičnih bakterij, v nekaterih izdelkih pa ni prisotnih živih predstavnikov vseh deklariranih vrst. Ugotovljeno stanje kaže na potrebo po boljši kontroli kakovosti tovrstnih izdelkov. Zagotavljanje

kakovosti otežuje tudi pomanjkanje ustreznih, standardiziranih metod za ugotavljanje števila živih probiotikov, ter akreditiranih laboratorijev. Kljub številnim pomanjkljivostim so zaenkrat še vedno najbolj razširjene kultivacijske metode. Kombinacija slednjih z molekularno biološkimi metodami omogoča preverjanje selektivnosti metode štetja na ploščah ter potrjevanje prisotnosti posameznih vrst v izdelkih.

## 5 Literatura

1. Tuš M, Mlinarič A. Prehranska dopolnila – zakonodaja, problematika, primeri. *Farm Vest*, 2007; 58:72-73.
2. Pravilnik o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 82/03, 44/04, 72/05 in 22/07).
3. Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega Parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih.
4. Matijašič BB, Rogelj I. Demonstration of suitability of probiotic products. An emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. *Agro Food Ind Hi Tech*, 2006; 17(3): 38-40.
5. ISO 4833: Microbiology – General Guidance for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C, 1991: 5.
6. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-target species-specific primers. *Appl Environ Microbiol*, 1999; 65: 4506–4512.
7. Walter J, Tannock GW, Tilsala - Timisjärvi A, Rødtong S, Loach DM, Munro K, Alatosava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66: 297-303.

8. Ward LJH, Timmins MJ. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, 1999; 29: 90-92.
9. Chagnaud P, Machinis K, Coutte LA, Marecat A, Mercenier A. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J Microbiol Meth*, 2001; 44: 139-148.
10. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1999; 65(10): 4351-4356.
11. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP. Rapid PCR Based Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst Appl Microbiol*, 2000; 23: 510-522.
12. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant *Enterococci* by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 24-27.
13. Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol*, 1997; 35: 49-56.
14. Klijn N, Weerkamp AH, De Vos WM. Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction-Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes. *Appl Environ Microbiol*, 1991; 57(11): 3390-3393.
15. Hamilton-Miller JM, Shah TS, Winkler JT. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Pub Health Nutr*, 1999; 2: 223-229.
16. Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol*, 2003; 81(1): 1-10.
17. Elliot E, Teversham K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. *S Afr Med J*, 2004; 94(2): 121-4.
18. Huff BA. Caveat emptor. "Probiotics" might not be what they seem. *Can Fam Physician*, 2004; 50: 583-7.
19. Aureli P, Fiore A, Scalfaro C, Casale M, Franciosa G. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *Int J Food Microbiol*, 2010; 137(2-3): 265-273.
20. Lahtinen SJ, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Korpela JM, Sandholm J, Salminen SJ. Intrinsic Properties of So-Called Dormant Probiotic Bacteria, Determined by Flow Cytometric Viability Assays. *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72(7): 5132-5134.
21. Kramer M, Obermajer N, Bogovič Matijašič B, Rogelj I., Kmetec V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009; 84(6): 1137-1147.

## **Razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2011**

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj objavlja razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2011.

Podružnice in sekcije prijavijo kandidate skladno z določili  
Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj najkasneje do 31. januarja 2011.



**Za utemeljitev uspešnosti kandidata mora predlagatelj navesti pozitivne spremembe v delovnem okolju, ki so posledica kandidatovih aktivnosti. Iz predloga mora biti razvidno, kako je kandidat v smislu kvalitete in kvantitete presegel svoje obveznosti, ki izhajajo iz opisa del in nalog delovnega mesta, ki ga zaseda.**

**Predlogi morajo biti pripravljene na obrazcih, ki so sestavni del Pravilnika.**



Predlog za podelitev društvenih priznanj mora predlagatelj poslati skupaj s prilogami v enem izvodu v elektronski obliki na naslov [info@sfd.si](mailto:info@sfd.si) in v enem izvodu v tiskani obliki tajništvu Slovenskega farmacevtskega društva najkasneje do 31. januarja 2011. Elektronsko oddane prijave, posredovane po elektronski pošti, morajo biti popolnoma enake kot pisne, poslane z navadno pošto.

# Spontaneous adverse drug reaction reporting: attitudes and practice of health care professionals and distributors in South East European region

## Spontano poročanje neželenih učinkov: odnos in praksa zdravstvenih delavcev in distributerjev v Jugovzhodni Evropi

Barbara Kozamernik

**Abstract:** *Study objectives:* The study was conducted to determine current pharmacovigilance practice, knowledge and attitude of health care professionals and employees working for Baxter distributors in selected countries (Croatia, Serbia, Macedonia, Bosnia and Herzegovina, Romania) of South East European (SEE) region and to determine what further steps might be effective to increase the reporting culture from the company perspective. *Method:* Pre-notification letters and 115 questionnaires were prepared and distributed via e-mail to the distributors in the selected countries of SEE region. Distributors then submitted the questionnaires to health care professionals. Completed questionnaires were analysed in a descriptive way. *Results:* 44% (24) of distributors and 33% (20) of health care professionals returned the questionnaires. Responders were in majority sales representatives and medical specialists from hospitals. Results showed low ADR reporting rate for both responder types. Major obstacles and important factors to motivate reporting were identified. *Conclusion:* Reporting form availability, intensive education about ADR reporting importance and providing a feedback about ADRs to reporter should be an important focus of the company in order to improve reporting rate in the SEE region. Further steps included implementation of the tools found in our study and additional study with nurses as a target sample, were recommended.

**Key words:** *pharmacovigilance, adverse drug reaction, health care professional, distributor*

**Povzetek:** *Cilj študije:* Cilj študije je bilo določiti farmakovigilančno prakso, znanje in odnos do farmakovigilance pri zdravstvenih delavcih in zaposlenih, ki delajo za distributerje podjetja Baxter v izbranih državah (Hrvaška, Srbija, Makedonija, Bosna in Hercegovina, Romunija) Jugovzhodne Evrope in ugotoviti nadaljne ukrepe, ki bi povečali kulturo poročanja z vidika podjetja. *Metode:* Pismo namere in 115 vprašalnikov je bilo preko elektronske pošte poslanih distributerjem v izbranih državah Jugovzhodne Evrope, ti pa so nato razdelili določeno število vprašalnikov še zdravstvenim delavcem. Izpolnjeni vprašalniki so bili analizirani na opisni način. *Rezultati:* 44% (24) distributerjev in 33% (20) zdravstvenih delavcev je vrnilo vprašalnike. Največ vrnjenih vprašalnikov je bilo s strani prodajnih zastopnikov in zdravnikov specialistov iz bolnišnic. Rezultati so pokazali nizko stopnjo poročanja ADR za obe vrsti anketirancev. Ugotovljene so bile glavne ovire pri poročanju in pomembni motivacijski dejavniki. *Zaključek:* Podjetje bi moralo dati večji poudarek na dostopnost formularjev za poročanje, intenzivno izobraževanje o pomenu ADR poročanja in zagotavljanje povratnih informacij o neželenih učinkih, da bi se izboljšala stopnja poročanja v JVE regiji. Priporočeni so nadaljnji koraki, ki bi vključevali implementacijo teh orodij v prakso in izdelava dodatne študije, ki bi vključevala medicinske sestre kot ciljni vzorec.

**Ključne besede:** *farmakovigilanca, neželeni učinki zdravil, zdravstveni delavci, distributerji*

## 1 Introduction

In the past decade the safety of medicinal products has become increasingly important to the manufacturers of pharmaceutical products and regulatory agencies. Since the early 1960s, after the Thalidomide tragedy, many voluntary schemes for reporting adverse

drug reactions (ADR) have been introduced in different countries and reporting systems have been developed to enable health care professionals to report ADRs (1, 2). It was recognized that ADRs are one of the major cause of hospitalization and have therefore high impact on the healthcare system from economic point of view (3, 4).

Some of the multinational pharmaceutical companies were faced with high profile safety concerns resulted in withdrawals of their major drug products or even lawsuits that cost them millions of dollars and their good reputation. The history of catastrophic consequences of some ADRs for public health and therefore for manufacturers, has been driven the regulatory agencies to set up more stringent regulatory requirements and manufacturers to use proactive approaches to monitor drug safety (5, 6, 7).

The importance of pharmacovigilance (PhV) today is not only to follow the regulations; it is also to have influence on improving the awareness of importance of drug safety and to reduce the problem of under-

reporting as much as possible. The focus in PhV should be to improve and sustain a good relationship between all partners involved in the PhV arena and to establish effective and qualitative communication between them (2, 8).

## 1.1 Under-reporting of adverse drug reactions

Underreporting related to spontaneous ADR reporting is a common practice and a big challenge for PhV experts all over the world. Even if the PhV system is precisely described in the legislation, this does not mean that it is also accurately and fully performed. The PhV system

**Table 1:** Reasons of underreporting confirmed in published studies.

**Preglednica 1:** Razlogi za neporočanje v objavljenih študijah.

Publication	Reasons for underreporting
Hasford, J., et al. (2002). Pharmacoepidemiology report. Physician's knowledge and attitudes regarding the spontaneous reporting system for adverse drug reactions. <i>Journal of Clinical Epidemiology</i> , 55, 945-950.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADR well known</li> <li>- Doubt of causality</li> <li>- Not know the spontaneous reporting system</li> <li>- Not know how to report</li> </ul>
Vallano, A., et al.(2005). Obstacles and solutions for spontaneous reporting of adverse drug reactions in the hospital. <i>British journal of Clinical Pharmacology</i> , 60(6), 653-658.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lack of time, forgetfulness to report, clinical workload</li> <li>- Not know the spontaneous reporting system</li> <li>- Uncertainty of the ADR diagnosis</li> <li>- Potential conflicts derived from reporting ADRs</li> </ul>
Herderio, M.T., et al. (2005). Physicians' attitudes and adverse drug reaction reporting. A case-control study in Portugal. <i>Drug Safety</i> , 28(9), 825-833.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Belief serious ADRs are well documented by the time a drug is marketed</li> <li>- Belief it is impossible to determine the causality</li> <li>- One case could not contribute to the safety</li> <li>- It is only necessary to report serious or unexpected ADRs</li> </ul>
Figueras, A., et al. (1999). Influence of Physician' attitudes on reporting adverse drug events. A case-control study. <i>Medical Care</i> , 37 (8), 809-814.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Belief serious ADRs are well documented by the time a drug is marketed</li> <li>- Belief it is impossible to determine the causality</li> <li>- ADR is reported only if one is sure that it is related to the use of a particular drug</li> <li>- One case could not contribute to the safety</li> </ul>
Belton, K. J. and the EU Pharmacovigilance research group. (1997). Attitude survey of adverse drug-reaction reporting by health professionals across the European Union. <i>Eur J Clin Pharmacol</i> ,52, 423-427.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uncertainty of the ADR diagnosis</li> <li>- Not know how to report</li> <li>- Lack of time</li> <li>- Types of ADR to be reported are misconcepted</li> </ul>
Aziz, Z., et al. (2007). Reporting of adverse drug reactions: predictors of under-reporting in Malaysia. <i>Pharmacoepidemiology and Drug safety</i> , 16, 223-228.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADR too trivial and well known</li> <li>- Doubt that reaction is being certainly caused by a drug</li> <li>- Not knowing the PhV system</li> <li>- ADR not diagnosed</li> <li>- Lack of time</li> </ul>
Toklu, H.Z., Uysal, M.K. (2008). The knowledge and attitude of the Turkish community pharmacists toward pharmacovigilance in the Kadikoy district of Istanbul. <i>Pharm world sci</i> , 30, 556-562	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Do not know how / where to report</li> <li>- Not essential</li> <li>- Not enough knowledge</li> <li>- Not enough time</li> <li>- Not mandatory</li> <li>- Doctors responsibility</li> </ul>
Eland, I.A., et al. (1999). Attitudinal survey of voluntary reporting of adverse drug reactions. <i>Journal of Clinical Pharmacology</i> . 48, 623 – 627.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uncertain association</li> <li>- Too well known ADR</li> <li>- ADR too trivial</li> <li>- Lack of time</li> <li>- Not know how to report</li> </ul>
McGettigan, P., et al. (1997). Reporting of adverse drug reactions by hospital doctors and the response to intervention. <i>British Journal of Clinical Pharmacology</i> , 44, 98 – 100.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unavailability of reporting form</li> <li>- Lack of time</li> <li>- Unsure how to report</li> </ul>

involves different partners: health care professionals, marketing authorization holders and regulatory agencies, patients, lawyers and media. All parties should be closely involved in the system if they would like to benefit from it (7, 8).

It is expected that PhV stakeholders will do their best to follow the product once launched on the market and to share information about its safety with each other. But, regardless the mandatory legal requirements and efforts of the pharmaceutical companies to collect spontaneous ADRs of their products from the market, the under-reporting rate is still very high (3,7, 9).

In non-EU countries, the underreporting issue is the same as in United Kingdom, France, Germany or even United States where underreporting rate is around 90% (3,10,11,12,13, 14,15,16). In the literature, the most recent published articles related to the improving of ADRs reporting describe Nepal, Malaysia and Turkey knowledge and attitude of the health care professionals regarding the post-marketing PhV and improvement of the reporting rate. (17,18,19). No studies conducted in former Republics of Yugoslavia or in Romania were found in published literature but it could be stated that the common major problem in PhV, regardless the region or country, is underreporting.

In his commentary Lexchin (2006) described some pluses and minuses of the current spontaneous reporting system and he emphasised the responsibility of the health care professionals, especially doctors, in the underreporting issue (20). The role of health care professionals in spontaneous reporting system is much bigger than one could expect.

In the mid 1970s Dr. Bill Inman conducted a study through which he identified the attitudes, so called "seven deadly sins", responsible that ADRs are not reported (10, 21, 22). After 30 years the reasons for not reporting ADR are slightly modified to those in 1970s and insecurity was added as an additional sin (22, 23). Inman's sins related to the attitude and knowledge were studied in studies presented in table 1 and showed high association with underreporting of ADRs regardless the geographical location of the country. Lack of time appears to be one of the leading reasons for underreporting in six of nine studies presented in table 1. This is a difficult obstacle to overcome and it is important to bear in mind when educating health care professionals and other partners in PhV arena. Another very important obstacle shown in these published studies is uncertainty about ADR diagnosing and causality. This could be overcome much easier than lack of time, by proper education and communication. Studies in table 1 show also that well known ADRs even if they are serious are not reported due to believe of reporters that only unexpected and serious reactions should be reported. Again, education could be an important tool to overcome these common believes.

Although the most important reasons for underreporting (table 1) are known from the mid 1970s, they are still causing this high degree of underreporting.

## **1.2 Development of pharmacovigilance system in South East European (SEE) countries**

Baxter is as a multinational company and covers with its portfolio also all former Republics of Yugoslavia (SFRJ) (Slovenia, Croatia, Serbia,

Macedonia, Bosnia and Herzegovina, Kosovo and Montenegro), Albania, Bulgaria and Romania. These countries form so called SEE region. Slovenia, Bulgaria and Romania among these SEE countries are a part of EU community and therefore their PhV regulation is completely harmonised with EU regulation (24). Other SEE countries have their own national regulation. Our study included only Romania, Croatia, Serbia, Macedonia, and Bosnia and Herzegovina.

Baxter local affiliate situated in Slovenia is responsible for marketing, regulatory activities and PhV activities in a cluster of countries that include Croatia, Serbia, Macedonia, BiH and Romania.

The specific of some SEE countries is also the fact that the marketing authorisation holder (MAH) should originate from the country and because Baxter is not legally present there it works through the distributors in the respective region. In Serbia, Croatia, Macedonia and Bosnia and Herzegovina, all Baxter products are authorized and sold by different distributors who act as a MAH for Baxter products in the region. In Romania distributors are not MAH and therefore Baxter itself is responsible for all PhV activities in Romania with the help of distributors due to a language barrier and allocation of the country.

SEE countries differ from the western EU countries or USA due to the fact that each country had started new era and independence from 1989. Each country had to face with the newly developed health care system, reforms and very hard political situation (25, 26, 27, 28).

After the collapse of Socialistic Federative Republic of Yugoslavia (SFRY), all newly organized republics were forced to establish among others also new drug agencies, new regulation on medicinal products and new regulation on PhV. This has started after 1995, when the political situation in these countries has stabilized (5, 29, 30, 31, 32, 33).

The structure of PhV system among SEE countries slightly differs. This is due to the fact that some countries are already in EU (as Romania), some are harmonizing their national legislation with EU legislation since they are accession countries and some has their own national legislation originated from EU regulation with some slight modifications (5, 24, 29, 30, 31, 32, 33).

## **2 The scope of the study: opportunities to improve pharmacovigilance activities in see countries**

Although there is a local regulation, distribution agreement or other legal tool describing how to report ADRs, the underreporting of ADRs in SEE countries is still very high.

The study was conducted to evaluate the knowledge, practice and attitude of all parties involved in PhV arena regarding ADR reporting and PhV activities, and to find improvements to the reporting between health care professionals, distributors and Baxter.

Baxter distributors and their customers (mainly specialists from the hospitals where Baxter products are available) from Croatia, Serbia, Bosnia and Herzegovina, Macedonia and Romania were included in the study.

The scope of the study was to determine the awareness of PhV importance, the actual knowledge and implementation of PhV in the daily practice at the subjects who are responsible for reporting ADRs in the SEE region. The tools found through the results of the study will assist in the development of PhV in terms of reporting especially between employees at the distributor site and health care professionals, and thus contribute to increase reporting of ADRs.

### 3 Methodology

In this study the knowledge, attitude and practice (KAP) of PhV were studied using self-administered questionnaires (KAP questionnaires) in English language.

Due to the fact that the target population for the study comes from a wide geographic area, the mail survey was used to get the information. This option supposed to be cost effective, since e-mail was used to transfer the questionnaires, the cost was negligible, but greater probability of non-responders existed (34).

The pilot test was performed to examine the questionnaires in linguistic and interpretive way (35). Each of these two types of questionnaires was piloted between the Baxter employees from two different countries where English language is not a native language: Belgium and Slovenia. Time spent to complete the questionnaire and the understanding of the questions was also evaluated.

Two types of the KAP questionnaires were used: one for the distributors and the other for health care professionals. Minor differences existed between these two types, related to the questions referring to either only health care professionals or only to the employees working at the distributor. Each questionnaire contained a cover letter describing the purpose of the study briefly and concisely, including the time required to complete the questionnaire.

The questionnaires were mailed to the distributors in Croatia, Serbia, Bosnia and Herzegovina, Macedonia and Romania. Contact persons at the distributor site were asked to distribute the predefined number of the questionnaires to the employees at the distributor site and to the health care professionals at the hospitals, pharmacy, etc., and also to collect the questionnaires after completion and return them back in the defined timeframe by fax, post or mail in a scanned version.

The number of questionnaires differed from county to country. The number was determined taking in account the portfolio of the products in each country, number of employees at the distributor site and the number of distributor companies in the country.

Number of questionnaires sent was limited due to the limited number of the employees at the distributor site and the number of final customers of Baxter products, who mainly are specialists at the hospitals. To achieve the appropriate statistical power higher number of questionnaires should be used and completed (34).

Therefore, the simple descriptive data analyse was used to evaluate the data according different parameters such as country, job position, type of respondent, etc.

## 4 Results

### 4.1 Response Rate

#### 4.1.1 Total response rate

In total 44 (38 %) questionnaires of 115 distributed were returned by fax or as a scanned document via e-mail in pre-defined time frame. The number of returned questionnaires varied according to the country, type of respondent and their job position. The response rate was higher among distributors (44 %) than at the health care professional site (33 %).

#### 4.1.2 Response rate by a country

Among the respondent countries, Romania had the highest respondent rate among distributors (60 %) and health care professionals (87 %), followed by Serbia and Croatia. The minimum response rate was achieved by Bosnia and Herzegovina what could be attributable to a lower number of employees and end customers of Baxter products. Macedonia did not respond.

#### 4.1.3 Response rate by a job position

In countries where Baxter works with one or more major distributors, the highest response rate was reached at the sales representatives. This was expected due to the fact that sales representatives communicate with health care professionals as the final Baxter customers on a daily basis and they are very important in obtaining the information about ADR from the market. At the health care professional level, the highest response rate was achieved among specialist. This result was expected due to the nature of Baxter products.

Graphically the response rate by the job position, country and responder type is presented in the Figure 1.

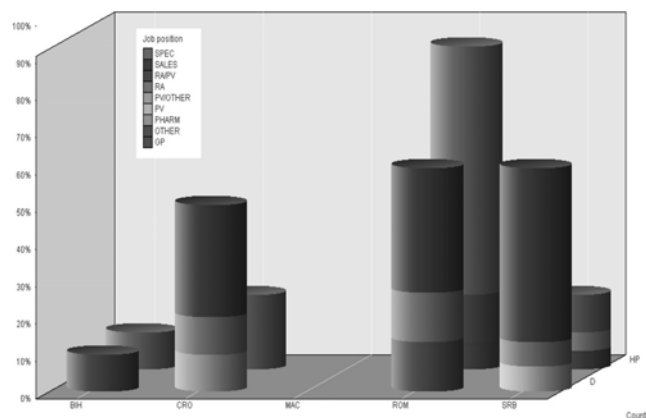


Figure 1: Response rate by a job position, country and responder type.

Graf 1: Prikaz deleža odgovorov glede na delovno mesto, državo in tip anketirancev.

Legend: BIH = Bosnia and Herzegovina, CRO= Croatia, MAC = Macedonia, ROM = Romania, SRB = Serbia, D = distributors, HP = Health professionals, SPEC = specialists, SALES = sales representatives, RA = regulatory affairs, PhV = pharmacovigilance, PHARM = pharmacists, GP = general practitioners



## 4.2 Pharmacovigilance practice of responders

Among all 44 responders 24 (55 %) were aware of at least one patient experiencing an ADR. The results of reporting history in relation to the type of respondent are presented in a Figure 2.

Seventy five percent of the health care professionals who responded had been aware of at least one patient experiencing an ADR. But only 25 to 30% of them reported an ADR to the national drug agency or the manufacturer or licence holder of the product. The situation was reverse with respect to the distributor responders, where only 38% of them had been aware of a patient experiencing an ADR, but the reporting practice was between 20 and 30 %. Distributors usually do

not have daily contact with patients, therefore the awareness of a patient experiencing ADR was lower than for health care professionals. Comparing the reporting practice between distributors and health care professionals it is clear that the underreporting practice of health care professionals is higher.

The most preferable method for reporting ADRs was to send the reporting form by fax, e-mail or post to the corresponding person or institution. The answers were similar for both types of responders.

Question related to the communication about ADRs between distributors and health care professionals showed that health care professionals who responded (mostly specialists) were not prone to communicate ADRs with MAH representatives (Figure 3).

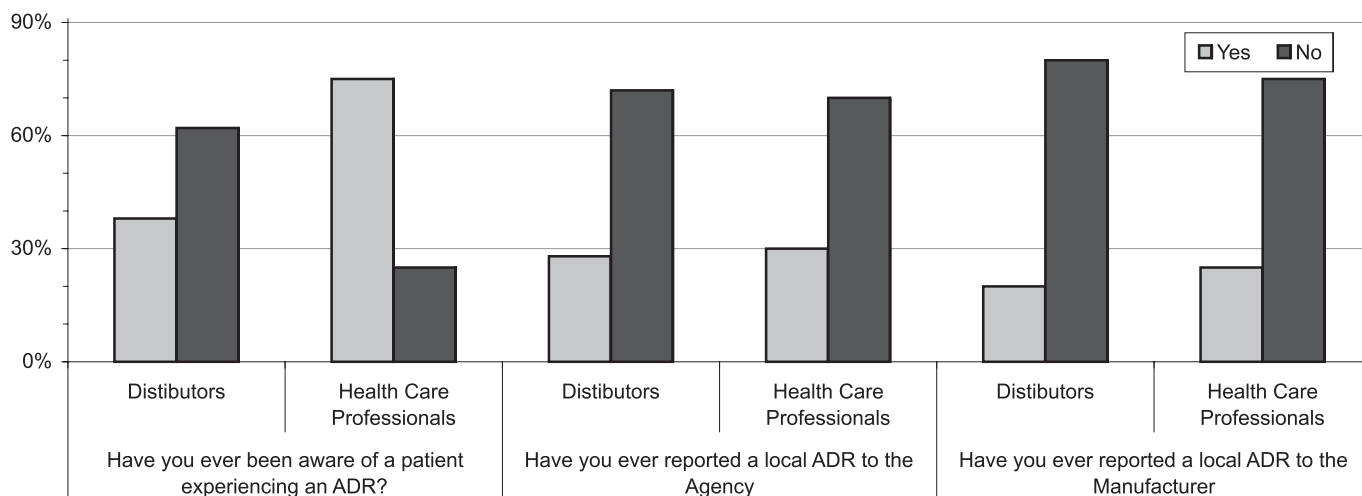


Figure 2: Comparison of reporting practice between distributors and health care professionals.

Graf 2: Primerjava prakse poročanja med distributerji in zdravstvenimi delavci.

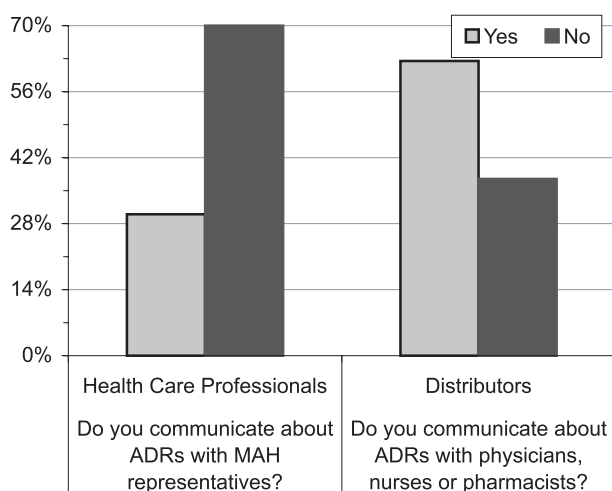


Figure 3: Communication of ADRs.

Graf 3: Medsebojna komunikacija o neželenih učinkih.

## 4.3 Pharmacovigilance knowledge of responders

Knowledge about PhV of health care professionals and distributors was evaluated with different questions referred to the PhV literature they received, their awareness of the local PhV system and their personal opinions regarding the importance of reporting ADR information.

The results showed that very high percentage of both type of respondents was not receiving pharmacovigilance literature. About 40% of responders received national PhV literature, mostly on yearly basis and this percent is almost equal for both types of responders.

Almost 100% of the responders regardless the type believed that the reporting of ADRs is important to improve drug safety and 95% of them agreed it is good for the company to report ADRs to the authorities. An additional question was added for distributors asking if it is sufficient if they receive ADRs only from the manufacturer of the product. Seventy five percent did not agree.

The results of the final two questions determined the PhV knowledge of both type of responders showed very good knowledge especially

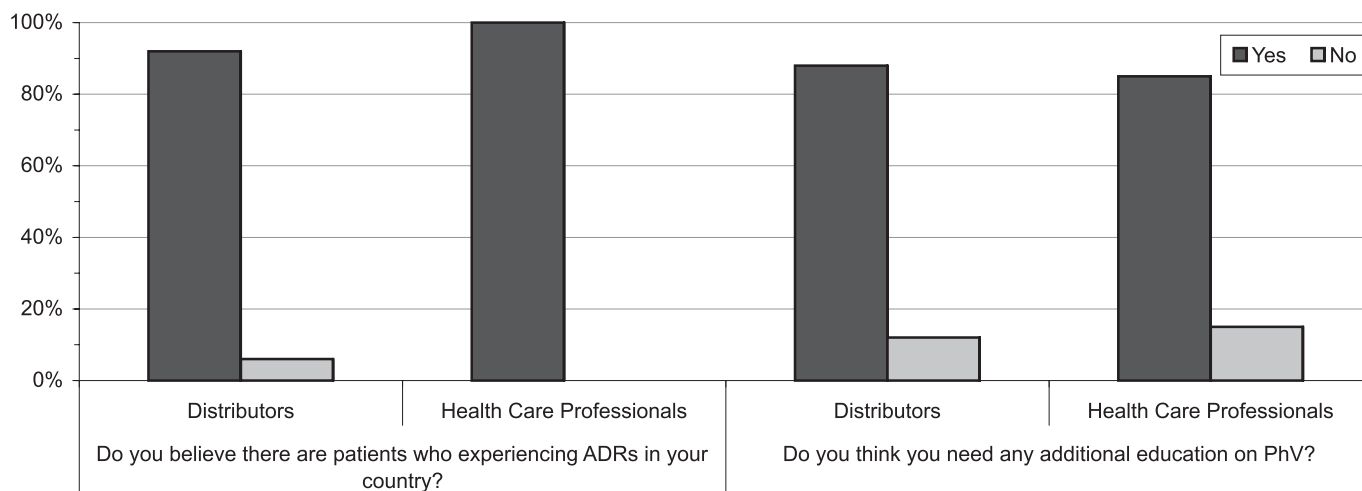


Figure 4: PhV knowledge of responders.

Graf 4: Znanje o PhV glede na tip anketirancev.

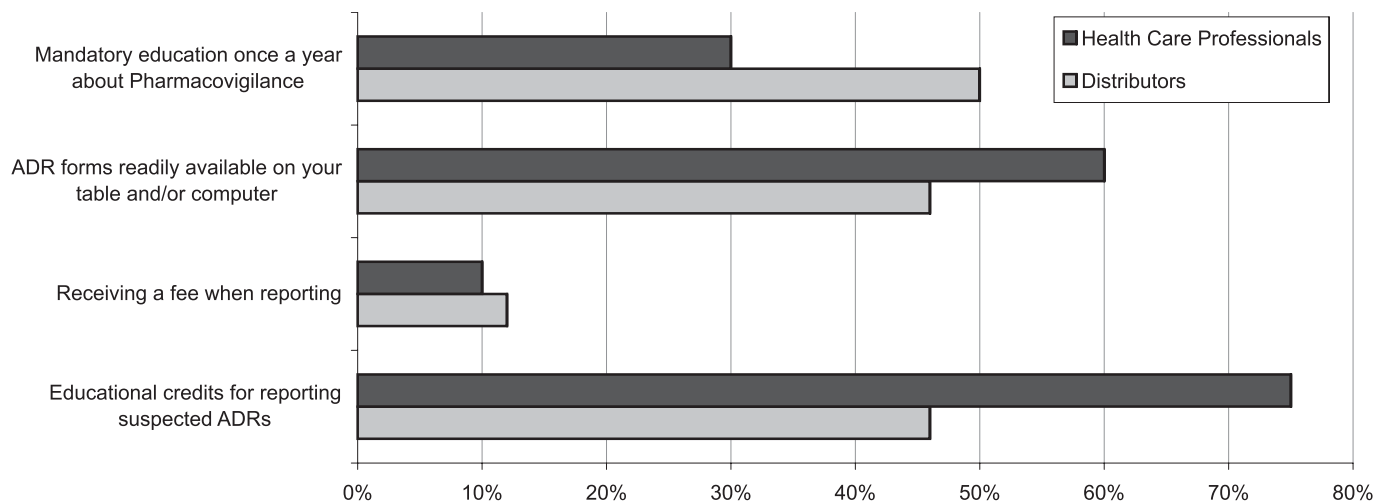


Figure 5: Motivation for reporting ADRs.

Graf 5: Motivacija za poročanje neželenih učinkov.

about the patients experiencing ADRs and about the PhV education. All health care professionals participated in the study and 92% of distributors believed there are patients experiencing ADRs in the country. The majority of distributors (88%) and health care professionals (85%) also thought they need additional education regarding Pharmacovigilance (Figure 4).

#### 4.4 Attitude of responders towards adverse drug reactions reporting

Factors that would motivate the responders to report ADR are presented in Figure 5. The maximum deviation between both types of

responders was obtained for educational credits what was expected since health care professionals are obliged to collect these credits in order to maintain the medical licence.

Regardless the type of responders the most important factors that would prompt the reporting of ADR was serious and not-expected ADR, unusual ADR and serious expected ADR. For more than 58% of distributors new drug on the market and increased frequency of non-serious ADR were the reasons that would prompt them to report ADR, while only 30 - 35% of health care professionals selected these options. Minority of responders would report an ADR if ADR was a drug interaction or ADR was 100% related to the drug. The distribution of

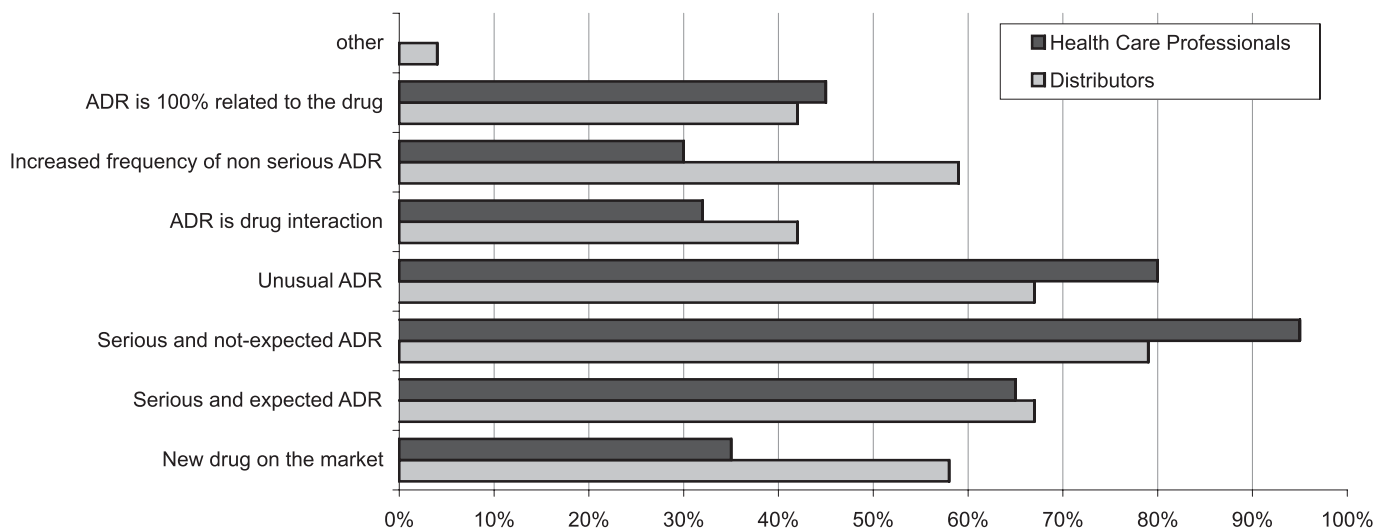


Figure 6: Factors affecting the reporting of ADRs - comparison between D and HP.

Graf 6: Faktorji, ki vplivajo na poročanje o neželenih učinkih – primerjava med distributerji in zdravstvenimi delavci.

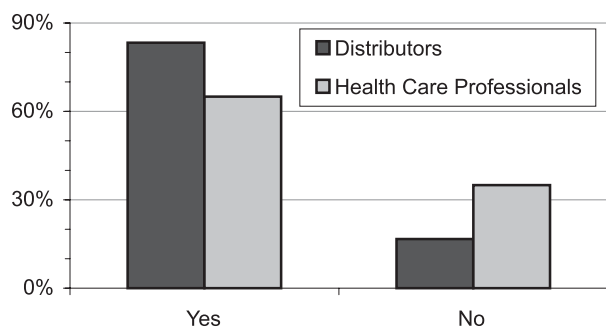


Figure 7: The importance of information feedback.

Graf 7: Pomembnost povratnih informacij.

results for distributors and health care professionals (Figure 6) showed the importance of factors affecting ADR reporting was similar for both types of responders although two factors are far more important for distributors (new drug on the market, increased frequency of non serious ADR).

Interestingly the distribution of the importance of factors that would adversely affect the reporting was very different for distributors and health care professionals.

The majority of distributors would not report an ADR because of the believe just one report would not make any difference if it is not reported (58%), because they did not have enough time due to other responsibilities (54%) and because they believed it is bad for the company if reporting ADR for their products (50).

On the other hand, the reporting addresses and not knowing how to report were the most important factors for health care professionals (60%, 65%) to deter reporting of ADRs.

The Figure 7 clearly presents the importance of information feedback for both types of responders. It is slightly more important for distributors where more than 80% responded with »yes«. Due to statistically not representative samples in terms of number of respondents, larger samples would probably show less difference between the types of responders and higher difference between the »yes« and »no« answers within the type of responders.

## 5 Discussion

According to our knowledge and reviewed published literature, this is the first study which evaluates and compares the knowledge, attitude and practice of health care professionals and personnel at the distributors in SEE countries, in order to facilitate the reporting of ADRs between the pharmaceutical company, its distributors and health care professionals as final customers.

The intention of the study was exploratory rather to provide precise estimates that would be applicable to whole population of distributors and health care professionals in SEE region. The major limitation of the study was low number of study population and low response rate. This was due to the fact that the study was conducted with Baxter distributors in the region and the fact that one person from each participating distributor's office was responsible to distribute the questionnaires to the health care professionals. It was not possible to compare the pharmacovigilance practice, knowledge and attitude between SEE countries and to evaluate the influence of job position, gender or age to the reporting rate and to get some statistically significant results, because of small number of participants. Nevertheless, the study reflects the way the Baxter distributors in the selected SEE countries and their final customers (as health care professionals) cope with ADRs and also showed comparable results with other published studies.

## **5.1 Current pharmacovigilance practice and knowledge of responders**

The response rate among the participating SEE countries varied widely. The highest response rate (87%) for health care professionals was achieved in Romania. This could be attributable to the higher involvement of employees at the distributor site since they were responsible to deliver and collect the questionnaires to the health care professionals and the fact that Romania is already a member of European Union. Interestingly, response rate of health care professionals from other countries had not exceeded 20%. One speculated explanation for this observation could be that non-EU countries are less aware of the importance of PhV and without a proper knowledge they fear to involve with PhV. Macedonia did not respond what could be contributable to the fact that they still have no national legislation concerning PhV activities and their health care system is still in its early stage. This was also the reason why Albania, Kosovo and Montenegro were not included in our study.

The majority of health care professionals were medical specialists, working in hospitals. This is related to the fact that the questionnaires for health care professionals were distributed mainly to the hospitals. Response rate for distributors showed high involvement of sales representatives in our study. Sales representatives are very important from the company point of view since they are the primary contact with the health care professionals and are usually the first who receive information about ADR.

The percentage of responders who stated they had observed a patient with ADR before was the highest among health care professionals. This result was expected since the medical doctors, who generally completed our questionnaires work with patients on a daily basis and the result indicates that medical doctors have no problems diagnosing an ADR. But despite the awareness of ADRs among health care professionals, the reporting rate of ADRs to the national agencies or product manufacturers was very low for both types of responders. There are several published reports that commonly describe the problem of underreporting (23, 36, 37, 38, 39), therefore it could be concluded that the reporting culture is virtually the same regardless the geographical location of the country or its PhV historical background. This awareness of ADRs and reporting ADRs to the agencies or the company was also described in Belton study (1997). The study was multinational and the discrepancy between observing and reporting ADR was seen for most of the participated countries (40).

MAH representatives in the region are Baxter distributors and as such they are fully involved in PhV trainings conducted by Baxter and PhV trainings mostly conducted by their national agencies. It is interesting that the results showed distributors communicated with health care professionals regarding ADRs in much higher percent than opposite. From our experiences in Baxter we have received only one or two ADRs directly from the distributor in SEE region in the past two years. Although it is in the distribution agreement that distributor should report ADRs to Baxter and more than 60% of distributors communicate about ADRs with health care professionals, the underreporting to the company is still a big issue. Baxter experiences of very low reporting rate of ADRs are compatible with the results about PhV reporting practice in SEE region. Obviously there is a gap in communication between the company and distributor, not so much between the

distributor as MAH representative in the region and health care professionals as final customers. There are no published studies where the communication between company representatives and health care professionals was studied which could confirm our results.

Our study showed that a large percent of both types of responders usually not receive international literature about PhV but mostly national literature mainly on a yearly basis. This situation is of concern given that these journals usually contribute to greater knowledge in the PhV field. Distribution of ADR bulletins is stimulation in terms of reporting rate of ADRs, but it is mostly an instrument to improve the knowledge about PhV.

Regardless the availability of PhV literature, our study showed very good knowledge about the importance of ADR reporting and national PhV system in SEE region. National agencies from non-EU countries perform seminars in order to improve PhV knowledge of any personnel participating in PhV system (33, 41).

By interpreting the results from our study, it could be concluded that the low reporting rate of ADRs to the company or to the national agencies may be secondary to the communication gap especially between MAH representative in the SEE region and the company. The PhV knowledge is not on a very low level, due to the education input of the national agencies but it still indicates the possibility of improvement.

## **5.2 Attitude of responders towards pharmacovigilance**

Health care professionals believed that not know how to report an ADR would be the most important reason for not reporting it, followed by unavailability of reporting form and reporting address. These results were similar to other published studies. Lopez-Gonzales et al. (2009) systematically reviewed published literature on determinants of underreporting ADRs and confirmed that lack of knowledge and unavailability of reporting forms were the major excuses for not reporting (22). Belton (1997) study suggested that unavailability of reporting forms and addresses deterred reporting especially in countries where the form was a stand-alone document, not a part of prescription pads (40). This could be extrapolated to SEE countries where forms are mostly available as independent documents.

Interestingly, lack of time was only a minor obstacle in reporting ADRs according to health care professional's type of respondents. This is not in line with most of the published studies where the majority of responders agreed the lack of time was the major determinant for reporting (23, 40, 42) but Aziz et al. (2007) study had confirmed that lack of time was not a significant obstacle in reporting (32). Therefore it might be also speculated that the pressure on health care professionals to evaluate more patients per day and thus having less time for other so called "paper work" is not yet expressed in SEE region as it might be in more developed countries.

Distributors showed different results about the factors that deter reporting of ADRs. It is the fact that distributors has no direct daily communication with patients and therefore their view on these factors is different than of health care professionals. Since these responders are working as a MAH representative and their primary responsibility is not collecting ADRs, it is obvious why lack of time is important deterioration factor. Other two factors (one case would not make any

difference if it is not reported and it is bad for the company if ADR is reported) clearly showed lack of basic PhV knowledge and national regulatory requirements of distributors.

The most important reasons that would prompt health care professionals and distributors to report an ADR were serious not-expected ADRs, serious expected ADRs and unusual ADRs. Most of serious ADRs are seen in hospitals or patients are admitted to the hospital due to the serious ADRs (23, 40) and majority of health care professionals participated in our study work in hospitals. The study suggested the same attitude of health care professionals toward PhV as in other published studies (40), although new drug on the market was not among important reasons for reporting. Distributors also believed if a new drug is on the market and if there is an increase in frequency of non serious ADR, this would prompt them to report. This could be attributed to distributor's better knowledge in regulation compared to health care professionals, because regulation knowledge is important in their daily work.

Our experiences in Baxter showed great underreporting of serious ADRs from health care professionals in SEE region if comparing the reporting rate for the same products in other EU countries or US. One explanation for such discrepancy could be the number of patients treated in SEE countries. Statistics showed if we would like to detect one rare ADR with the incidence 1/10 000, 30 000 patients should be treated (35). Considering the above statistics and the health care professional's perception that serious ADRs prompt the reporting it is obvious why the reporting rate in SEE countries is so low.

The most motivating for health care professionals would be however to receive educational credits for reporting suspected ADR. Educational credits were not important for majority of distributors that is due to the fact that these credits are related only to physicians who need to update their medical licence. Regardless the low number of responders, our study also indicated that receiving a fee when reporting an ADR is not an important motivating factor for reporting.

Results about the importance of information feedback showed that responders would like to actively participate in PhV, to gain knowledge about the cases they had reported. It also showed that the communication within PhV arena is not ideal and should be improved.

### **5.3 Opportunities for improvement**

Results from the study, showed the current practice, attitude and knowledge of MAH representatives (distributors) and health care professionals from SEE countries. These parameters are not corresponding to the current national legislation in terms of reporting ADRs. All three parameters showed some differences between both types of responders. Following results from the study the following opportunities reflect the improvements that could be implemented by the company:

#### **Opportunities for improvements for health care professionals**

This type of responders included in our study was mostly specialist from the hospitals. The results lead us to the following possible options for improvement the reporting of health care professionals working in hospitals :

#### Availability of reporting forms and reporting address

Looking from our company perspective, to improve the reporting rate of ADRs concerning our products, reporting forms could be distributed to the final customers via distributors in a paper version together with a computer version on a CD. This could be done as a part of a regular visit of a distributor representative or at a conference meeting. As another factor to deter reporting is unavailability of reporting address, this could be incorporated on the form. Considering that health care professionals has a preference to submit the report via e-mail, post or fax, the reporting form should also include address and fax number where to submit the reports. This kind of action would probably improve the reporting rate directly to the company not so much to the national agency, however this study aim was mostly to find some tools to improve reporting rate to the company not so much to the agencies.

#### Education about PhV reporting

Not knowing how to report was the major obstacle for health care professionals. Education is a key goal also for the national agencies in SEE countries, but what a company could do is to incorporate PhV training of health care professionals into different conferences or health care professional training's agendas.

#### Improve feedback about ADRs

Medical investigators and their teams should cooperate more in providing feedbacks about ADRs for the products in the way it would be appropriate for the company. When ADR is reported from the country, this should not be treated as a one-way street. The company should provide some transparent information about the cases and not keep it as a secret. It is a regulatory obligation for the company to report ADRs to the agencies but it should be also taken into account that reporters are usually excluded from the circle.

Educational credits for reporting ADRs are the domain of national institutions and Baxter has no influence or power to motivate the reporting of health care professionals in such way.

#### **Opportunities for improvements for distributors**

The key points for improvements the reporting rate of distributors result from the fact that the majority of responders in our study were sales representatives. The possible options for improvements are:

#### Education of consumer facing employees

Following the results from the study, education is also an important motivation for distributors to report ADR. But from other results concerning attitude and knowledge of responders towards reporting, some lack of basic PhV knowledge and some misconceptions regarding the spontaneous reporting of ADRs can be seen. Educational intervention is important especially for sales representatives who usually disagree with PhV specialists about the importance of the reporting ADRs. Since effects of intervention might diminish over time, some appropriate educational interval should be implemented. As only majority of responders receive some national PhV bulletins on a yearly basis, this is a good indicator that lack of PhV knowledge is a major problem in SEE region.

#### Improve feedback about ADRs

This is an important gap in current PhV system for distributors. Again as for health care professionals, the company should consider how to

provide appropriate feedback information for distributors. With regard that sales representatives are in contact with health care professionals, the company might consider to prepare information on reported ADRs in such way, it would benefit both types of responders at the same time.

## 6 Conclusion

The underreporting issue exists also in SEE countries. Only a good will of reporters, who are mostly health care professionals and their good knowledge about PhV, could run the system in a proper way. Pharmaceutical companies usually expect that reporting ADRs from local markets is an automated process. The companies should invest more in communication with local markets and local reporters especially in countries with a short history of PhV. If companies would really like to benefit from spontaneous reporting from different countries, they should first get the clear picture of the current reporting culture.

Our study was useful as a preliminary study in detecting the attitudes and practice of PhV among health care professionals and distributors in SEE region. Results showed important obstacles in current PhV system and tools were proposed to overcome these obstacles. The tools that could be employed to tackle the underreporting problem in SEE region are the following:

- ✓ Availability of reporting forms
- ✓ Improved education about ADR reporting
- ✓ Feedback about ADR information available to reporters

Since this was the first study that evaluated the attitudes, practice and knowledge of health care professionals and distributors in SEE region, it would be useful to define some future steps that would help to improve the reporting of ADRs in the region and the following is proposed:

- ✓ To set up a group of medical experts and other representatives from the PhV group and plan how and to what extent the feedback information could be given.
- ✓ To perform an additional study that would include only nurses would greatly contribute to the overall picture of ADR reporting situation in the region and consequently to improve the situation.

## 7 Acknowledgment

This work was conducted by BK in partial fulfilment of the regulations governing the award of MSc Pharmacovigilance at the University of Herfordshire under the supervision of Dr S. Webley.

## 8 References

1. Mann, R. & Andrews, E.B. (2007). Introduction. In *Pharmacovigilance*. (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 3-11). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
2. Meyboom, R.H.B., et al. (1999). Pharmacovigilance in perspective. *Drug Safety*. 21(6), 429- 447.
3. Rabbur, R.S.M., Emmerton, L. (2005). And introduction to adverse drug reaction reporting system in different countries. *International Journal of Pharmacy Practice*. 13, 91 – 100.
4. Pirmohamed, M., et al. (2004). Adverse drug reactions as a cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *British Medical Journal*. 329; 15-19.
5. Hanzl-Dujmović, I., Sulić-Milišić, Z., Starešinić-Šernhorst, I. (2007). Issues with regulatory pharmacovigilance in east european countries: the industry perspective. *Toxicology Letters*. 168. 228-235.
6. Balkrishnan, R., Furberg, C.D. (2001). Developing an optimal approach to global drug safety. *Journal of Internal Medicine*. 250, 271 – 279.
7. International Society of Drug Bulletins (ISDB). (2005). Berlin declaration on pharmacovigilance. Berlin, Germany. Retrieved September 21, 2008 at [www.icf.uab.es/informacion/boletines/ISDB/Declaration.pdf](http://www.icf.uab.es/informacion/boletines/ISDB/Declaration.pdf).
8. World Health Organization (WHO).(2002). The importance of pharmacovigilance. Safety monitoring of medicinal products. Retrieved November 19, 2008 at [www.who.int/hq/2002/a75646.pdf](http://www.who.int/hq/2002/a75646.pdf).
9. Moride, Y., et al. (1997). Under-reporting of adverse drug reactions in general practice. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 43, 177 – 181.
10. British Medical Association (BMA). (May 2006). Reporting adverse drug reactions. A guide for health care professionals.
11. Brewer, T., Colditz, G.A. (1999). Postmarketing surveillance and adverse drug reactions: current perspectives and future needs. *JAMA*. 281(9), 824 – 829.
12. Daemrich, A. (2007). Pharmacovigilance and the missing denominator: the changing context of pharmaceutical risk mitigation. *AIHP*. 49 (2), 61 – 75.
13. Pickett, J. (2008). Safety report quality depends upon clinical expertise, direct questioning, HCP education. *Adverse Event Reporting News*. 5 (2), pp 4.
14. Macfarlane, N. & Brown, P. (2007). Legal basis – EU. In Mann, R. & Andrews, E.B. (Eds.) In *Pharmacovigilance*. (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 13-23). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
15. Andrew, I., Baker, S., Chalmers, A. (2001). Implementing a system for tackling under-reporting of adverse drug reactions within a district general hospital. *The International Journal of Pharmacy Practice*. 9, R17.
16. Thiessard, F., et al. (2005). Trends in Spontaneous Adverse Drug Reaction Reports to the French Pharmacovigilance System (1986 – 2001). *Drug Safety*. 28 (8), 731 - 740.
17. Subish, P., Izhm, M.I.M., Mishra, P. (2008). Evaluation of the knowledge, attitude and practices on adverse drug reactions and pharmacovigilance among healthcare professionals in Nepalese hospital: a preliminary study. *The Internet Journal of Pharmacology*. 6(1).
18. Toklu, H.Z., Uysal, M.K. (2008). The knowledge and attitude of the Turkish community pharmacists toward pharmacovigilance in the Kadikoy district of Istanbul. *Pharm world sci*. 30, 556-562.
19. Aziz, Z., et al. (2007). Reporting of adverse drug reactions: predictors of under-reporting in Malaysia. *Pharmacoepidemiology and Drug safety*. 16, 223-228.
20. Lexchin, J. (2006). Is there still a role for spontaneous reporting of adverse drug reactions? *CMAJ*. 174 (2), 191 -192.
21. Bäckström, M., Mjörndal, T. (2006). A small economic inducement to stimulate increased reporting of adverse drug reactions – a way of dealing with an old problem? *European Journal of Clinical Pharmacology*. 62, 381 – 385.
22. Lopez Gonzales, E., et al. (2009). Determinants of under-reporting of adverse drug reactions. *Drug Safety*. 32(1), 19-31.
23. Herderio, M.T., et al. (2005). Physicians' attitudes and adverse drug reaction reporting. A case-control study in Portugal. *Drug Safety*. 28(9), 825-833.
24. European Medicines Agency (EMA). (2007). Volume 9A of the rules governing medicinal products in the European Union. Guidelines on pharmacovigilance for medicinal products for human use. Retrieved April 13, 2007, from [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-9/pdf/vol9A\\_2007-01.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-9/pdf/vol9A_2007-01.pdf).
25. Voncina, L., Jemai, N., Merkur, S., Golna, C., Maeda, A., Chao, S., Dzakula, A.(2006) Croatia: Health system review. *Health Systems in Transition*. 8(7), 1–108.
26. Cain, J., et al. (2002). Bosnia and Herzegovina: health system review. *Health Systems in Transition*. 4(7), 1-103.
27. Gjorgjev, D., Bacanovic, A., Cicevalieva, S., Sulevski, Z., Grosse-Tebbe, S.(2006) The former Yugoslav Republic of Macedonia: Health system review. *Health Systems in Transition*.8(2), 1–98.
28. Vi descu, C., Scîntee, G., Olsavszy, V., Allin, S. and Mladovsky, P. (2008). Romania: Health system review. *Health Systems in Transition*. 10(3), 1-172.

29. Ordinance on the follow up of adverse drug Reactions to medicinal products. (2002). Official Gazette of the Federation BiH, No. 32/2002 (OG F BiH 32/2002).
30. Regulation on the manner of reporting, collecting and monitoring adverse drug reactions to medicinal products. (2006). Official Gazette of the RS, No. 99/2006 (OG RS 99/2006).
31. Law on Medicinal products of the Croatian Parliament of the 9 July 2007. Official Gazette No. 71/07 (OG 71/07).
32. The law on medicinal products. (1998). Macedonian Official Gazette, 8 May, 1998 (OG Mac, 1998).
33. Miljković, M. (2007). Serbian pharmacovigilance system. Retrieved March 12, 2008, from <http://www.who-umc.org/graphics/10891.pdf>.
34. Walonick, D.S. (2004). *Survival Statistics*. Bloomington: StatPac, Inc.
35. Bell, J. (2005). *Doing your research project*. (4<sup>th</sup> ed.). Maidenhead: McGraw-Hill International (UK) Ltd.
36. Davies, E.C., et al. (2006). Adverse drug reactions in hospital in-patients: a pilot study. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 31, 335 – 341.
37. Barrow, P., Waller, P., Wise, L. (2005). Comparison of hospital episodes with "drug – induced" disorders and spontaneously reported adverse drug reactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 61 (2), 233 – 237.
38. Hasford, J., et al. (2002). Pharmacoepidemiology report. Physician's knowledge and attitudes regarding the spontaneous reporting system for adverse drug reactions. *Journal of Clinical Epidemiology*. 55, 945-950.
39. McGettigan, P., et al. (1997). Reporting of adverse drug reactions by hospital doctors and the response to intervention. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 44, 98 – 100.
40. Belton, K. J. and the EU Pharmacovigilance research group. (1997). Attitude survey of adverse drug-reaction reporting by health professionals across the European Union. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 52, 423-427.
41. Republic of Croatia (CRO): Agency for medicinal products and medical devices. (2008). Reports on adverse drug reaction 2007. Retrieved December 2, 2008, from <http://www.almp.hr/?ln=hr&w=publikacije&d=nuspojave>.
42. Vallano, A., et al. (2005). Obstacles and solutions for spontaneous reporting of adverse drug reactions in the hospital. *British journal of Clinical Pharmacology*. 60(6), 653-658.

# Proučevanje razkužilnega učinka ozona na planktonske in biofilmske mikroorganizme v prečiščeni vodi v dinamičnem laboratorijskem in industrijskem okolju

## Investigation of ozon disinfection effect on planktonic and biofilm microorganisms in purified water in dynamic laboratory and industrial environment

Maja Florjanič, Julijana Kristl

**Povzetek:** Z rezultati na laboratorijskem modelu in z deset-letnim spremljanjem podatkov prečiščene vode v industrijskem sistemu, ki jo razkužuje ozon, smo celovito razložili obvladovanje njene mikrobiološke kakovosti. Laboratorijsko preskušanje učinkovitosti ozona na planktonske in biofilmske bakterije *Stenotrophomonas malthophilia*, kot prevladujoče v naši prečiščeni vodi, je pokazalo, da so biofilmske vsaj 533-krat bolj odporne na razkuževanje z ozonom kot istovrstne planktonske bakterije. Ozon v koncentraciji 70 ppb v petih minutah učinkovito uniči 99,98% planktonskih, medtem ko tudi 450 ppb ozona v 120 minutah ni zmanjšalo število biofilmskih bakterij te vrste. Po ozonaciji nastane sekundarni biofilm še hitreje kot je nastal primarni, ker so odmrli mikroorganizmi (MO) hrana za preživele. Kljub neučinkovitosti ozona na biofilmske MO, kaže pregled dolgoletnih rezultatov prečiščene vode iz industrijskega sistema trend stalnega vzdrževanja mikrobiološke kakovosti, ki ustreza zahtevam Ph Eur 7.0. Dobre mikrobiološke rezultate pripisujemo kroženju vode s planktonskimi MO skozi rezervoar s 70 ppb ozona, ki jih učinkovito uniči in majhni vsebnosti skupnega organskega ogljika. Rezultati kažejo, da MO niso razvili rezistence v preiskovanem deset letnem obdobju.

**Ključne besede:** biofilm, ozon, dezinfekcija, planktonski mikroorganizmi, prečiščena voda

**Abstract:** The continuous maintaining of acceptable quality of purified water in industrial purified water system that is disinfected by ozone is explained by results of laboratory studies and review of 10 years results of purified water. Laboratory study revealed that biofilm bacteria *Stenotrophomonas malthophilia*, that constitutes the majority of biofilm in our purified water, is more than 533 times more resistant to the ozone as planktonic bacteria of the same species. Ozone at 70 ppb killed 99.98% of planktonic microorganisms (MO) in 5 minutes, however, even 450 ppb of ozone had almost no impact on biofilm bacteria in 120 minutes. After ozonation, secondary biofilm has formed faster than primary due to the fact that dead MO represent nutrient to survived ones. In spite of inefficient impact of ozone on MO in biofilm, 10 years review has shown maintaining of microbial quality of purified water which is in compliance with Ph. Eur 7.0. Excellent microbial results could be attributed to constant recirculation of water through reservoir with 70 ppb of ozone that efficiently killed planktonic MO, and diminish total organic carbon. Results of this study confirmed that resistance of MO towards ozone was not developed in investigated period.

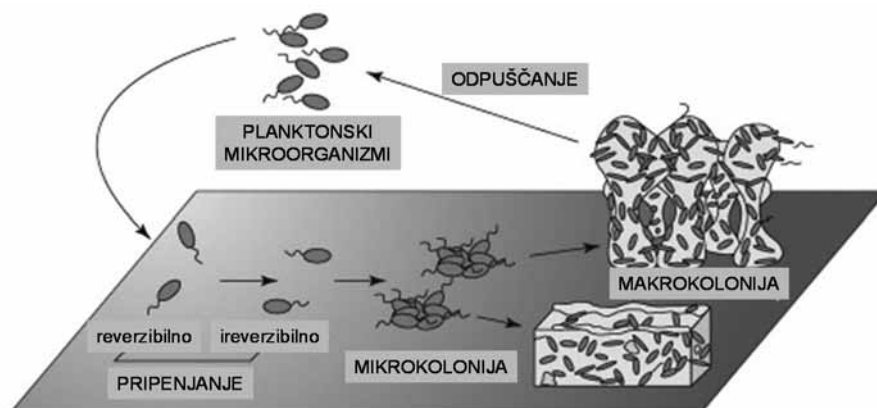
**Key words:** biofilm, ozone, disinfection, planktonic microorganisms, purified water

## 1 Uvod

Voda, ki jo uporabljamo za izdelavo farmacevtskih izdelkov, mora imeti ustrezno mikrobiološko in kemijsko kakovost. Danes predstavlja zagotavljanje mikrobiološke kakovosti vode v celotnem sistemu, ki obsega pripravo vode, shranjevanje in krožno zanko do uporabnikov, večji problem kot zagotovitev ustrezne kemijske kakovosti.

Mikroorganizmi (MO) vstopijo v sistem za pripravo farmacevtskih vod s pitno vodo ali na odjemnih mestih za prečiščeno vodo (1). V njem lahko tvorijo biofilm, ki predstavlja populacijo MO različnih rodov in vrst. Ti med seboj komunicirajo in koordinirajo rast s signalnimi molekulami, izven celično pa izločajo polisaharide, s katerimi se povežejo s površino in med seboj (2, 3). Vodni sistemi so zelo primerni za nastanek





Slika 1: Razvojni model nastanka biofilma (2).

Figure 1: Development model of biofilm (2).

biofilma, ker zagotavljajo štiri pomembne dejavnike za rast MO: vodo, hranljive snovi, površine in prisotnost planktonskih celic. Posamezne bakterijske celice v planktonskem stanju (se premikajo pasivno z vodnim tokom), se ob pomanjkanju hranljivih snovi pritrdijo na površino.

V zadnjih desetih letih opisujejo razvoj biofilma kot časovni proces, v katerem MO prehajajo skozi različne stopnje večcelične organizacije, za kar pa je potrebna namenska, programirana mreža genov (2). Te stopnje so: planktonska stopnja, adheriranje, nastanek mikrokolonij, nastanek makrokolonij ali biofilma in možnost vračanja v planktonsko obliko (slika 1). Iste in različne vrste MO lahko med seboj komunicirajo preko izvenceličnih signalnih molekul s katerimi regulirajo izražanje genov in s tem razvoj in velikost biofilma. Kot odgovor na zaznavanje določene kritične koncentracije signalnih molekul, MO spremenijo svoje obnašanje tako, da začnejo s tvorbo biofilma, z izločanjem izvenceličnih polisaharidov, zaviranjem ali induciranjem gibanja po površini (swarming motility), z odpuščanjem MO iz biofilma ali celo povzročijo lizo celic (4). Tako lahko hkrati obstaja heterogena populacija iz treh oblik iste vrste MO: planktonska oblika, fenotip, ki izloča izvencelične polisaharide in tisti, ki tvori spore (5). Posamezne med seboj povezane kolonije bakterij ločujejo vodni kanali, ki predstavljajo enostaven cirkulacijski sistem za dovajanje hrane tudi bakterijam v notranjost biofilma. Biofilm kot rezervoar različnih MO (tudi virusov, patogenih bakterij in drugih), ki se ujamejo v njegovo strukturo in občasno odpuščajo, lahko ogroža zdravje ljudi, kakovost izdelkov ali povzroča nadaljnjo kolonizacijo sistema (6, 7). Znano je, da so MO v biofilmu veliko bolj odporni na proti-mikrobna sredstva kot planktonski (8). Ugotovili so, da so biofilmi vzrok številnih kroničnih infekcij, na katere običajni odmerki antibiotikov ne delujejo (7, 9). Ocenjujejo, da stane zdravljenje biofilmsko povzročenih infekcij v Ameriki več kot 1 milijardo dolarjev letno (6).

Eden najbolj obetavnih in učinkovitih razkužil je ozon (10). Kot močan oksidant je močnejše razkužilo od klora in toplote, ter učinkuje na bakterije, viruse, pirogene in oksidira organski material v vodi (3). Ozon in hidroksilni radikali, ki nastanejo ob njegovi razgradnji, reagirajo s komponentami celic in oksidirajo vitalne celične komponente (11, 12). Objavljene raziskave o učinkovitosti ozona na določene MO so si včasih nasprotujoče in velikokrat manjkajo podatki o ostalih dejavnikih, ki tudi vplivajo na učinkovitost razkuževanja (koncentracija prisotnih

organskih snovi, hidrodinamični pogoji, temperatura, materiali itd). V večini raziskav so proučevali učinkovitost ozona na sevih planktonskih bakterij (13, 14). Znatno manj podatkov najdemo o delovanju ozona na biofilmske bakterije, pa še te predvsem v sistemih pitnih vod, v prehranski industriji in v zadnjem času tudi v biotehnoških procesih (15, 16).

Ozon lahko pridobivamo iz zraka, kisika ali z elektrolizo vode. Je relativno nestabilen, njegov razpolovni čas v destilirani vodi je 25 minut pri 20°C, zato ga moramo neprestano dovajati v sistem. Ozon sam je onesnaževalec prečiščene vode in ga moramo odstraniti pred uporabo le-te v farmacevtske namene z ultravijoličnimi žarki z valovno dolžino 254 nm (germicidna valovna dolžina), ki spremeni ozon v raztopini v kisik in v radikal kisika, ki dalje tvori z vodo hidroksilne radikale. Hidroksilni radikali reagirajo z raztopljenimi organskimi snovmi, pri čemer nastajajo nove spojine, CO<sub>2</sub> in voda. Kljub temu se ozon ne pojmuje kot dodana spojina (added substance), če ni presežena dovoljena vsebnost celokupnega organskega ogljika (TOC) in če ozon iz vode odstranimo pred uporabo (17).

Podatkov o delovanju ozona na biofilme v sistemu prečiščenih vod, o nastanku sekundarnega biofilma po razkuževanju ter o pojavu rezistence na ozon nismo našli. V naši prvi, štiri letni raziskavi smo ugotovili, da razkuževanje industrijskega sistema prečiščene vode (pri TOC pod 40 ppb, povprečno število bakterij manj kot 100 bakterij/100 ml) z ozonom pri 250 ppb v razkuževalnem in 70 ppb v vzdrževalnem režimu zagotavlja skladnost mikrobiološke kakovosti prečiščene vode s farmakopejskimi zahtevami (18). Današnji pristopi za proučevanje biofilmov predvsem s temeljnega raziskovalnega vidika vključujejo biofizikalne meritve dinamičnih procesov med adhezijo bakterij (19), analizo aktivnosti biofilma s kalorimetrijo (20), modeliranje vpliva difuzivnega in konvektivnega transporta substratov v biofilm (21) in drugo (16, 22).

Namen tokratne raziskave je proučiti odpornost istovrstnih planktonskih in biofilmskih MO na razkužilni učinek ozona v laboratorijski napravi Biofilm Annular Reactor (BAR) in s temi ugotovitvami razložili obvladovanje mikrobiološke kakovosti vode v industrijskem sistemu. V BAR smo simulirali nastanek primarnega in sekundarnega biofilma pri realnih hidrodinamičnih razmerah, pri različnih koncentracijah in času

ozonizacije vode, pri znani vsebnosti organskega ogljika, specifični prevodnosti in temperaturi. Poleg tega smo proučevali pojav potencialne rezistence MO zaradi dolgoletne uporabe ozona za razkuževanje prečiščene vode v industrijskem sistemu.

## 2 Materiali in metode

### 2.1 Prečiščena voda in ozonirana prečiščena voda

Prečiščena voda, ki je pridobljena iz pitne vode s filtracijo, ionsko izmenjavo in dvostopenjsko reverzno ozmozo, ima specifična prevodnost manj kot  $1.3 \mu\text{S}/\text{cm}$  pri  $25^\circ\text{C}$ , TOC pod 50 ppb in se shranjuje in razdeljuje po razdelilni zanki pri sobni temperaturi. Meritve skupnega organskega ogljika (TOC) smo izvedli z merilnikom Anatel monitor (Anatel corporation, Loveland, USA) in specifično prevodnost s konduktometrom Endress + Hauser conductivity sensor (Reinach, Switzerland).

Prečiščena voda je shranjena v rezervoarju, v katerega generator ozona (MEMBREL MkII; Ozonia, Duebendorf, Switzerland) dovaja ozon, ki konstantno nastaja z elektrolizo prečiščene vode. Tako pridobimo ozonirano prečiščeno vodo s 70 ppb, 250 ppb ali 450 ppb ozona, ki razkužilno deluje na MO v rezervoarju. Koncentracijo ozona merimo z vgrajeno napravo v vodni sistem Orbisphere (Orbisphere model 3600, Geneva, Switzerland), ki jo periodično kalibriramo po navodilih proizvajalca. Pred vstopom vode v distribucijsko zanko se ozon razgradi z izvorom UV žarkov (model RBE-8R, aquafine Corporation, Valencia, CA) in njegovo koncentracijo spremlja v sistem vgrajen ozonski detektor (Orbisphere).



**Slika 2:** Laboratorijska naprava za proučevanje biofilmov Biofilm Annular Reactor, ki je s cevjo direktno povezana na industrijski sistem za razdeljevanje prečiščene vode.

**Figure 2:** Biofilm annular reactor as a laboratory equipment for biofilm studies is directly connected to the industrial purified water distribution system.

### 2.2 Opis naprave Biofilm Annular Reactor in nastanek biofilma

Laboratorijsko napravo za proučevanje biofilmov Biofilm Annular Reactor - BAR, model 1320 (BioSurface Technologies, Bozeman, Montana, ZDA) (slika 2) sestavlja stekleno ohišje s prostornino 1L in dva koncentrična valja. Na notranji valj je nameščenih 20 ploščic s površino  $15 \text{ cm}^2$ . Slednje je mogoče posamično odvzeti ali nadomeščati. V napravi smo simulirali realne parametre kot so hidrodinamične razmere, zadrževalni čas vode v sistemu, vsebnost organskega ogljika, specifično prevodnost, temperaturo in vrsto materialov cevni površin. Pred poskusom smo napravo sterilizirali z avtoklaviranjem in vanjo aseptično pritrdili sterilizirane ploščice. Prečiščena voda iz industrijskega sistema vstopa na vrhu naprave s hitrostjo  $10 \text{ ml}/\text{min}$ , potuje navzdol med dvema, navpičnima koncentričnima valjema (notranji valj se vrti s hitrostjo 200 obratov/min, zunanji miruje) in izstopa na dnu. Ti pogoji posnemajo hidrodinamične pogoje v našem industrijskem sistemu. Biofilm iz naravno prisotnih MO v prečiščeni vodi iz industrijskega sistema je nastal na ploščicah v BAR v sedmih dneh.

### 2.3 Razkuževanje vzorcev *Stenotrophomonas malthophilia* z ozonirano vodo

V laboratorijskih poskusih smo ciljno proučevali razkužilni učinek ozona na planktonske bakterije v erlenmajericah in biofilmske *Stenotrophomonas malthophilia* v BAR. Sterilizirane erlenmajerice smo inokulirali s planktonskimi bakterijami *Stenotrophomonas malthophilia* in dodali toliko različno ozonirane vode, da je bilo začetno število bakterij  $10^4/100\text{ml}$ . Po določenem času razkuževanja smo določili število preživelih planktonskih MO. V napravi BAR smo v 7 dneh vzgojili biofilm, kot je opisano v točki 2.3, prekinili dotok prečiščene vode in začeli dovajati ozonirano prečiščeno vodo (s 70, 250 ali 450 ppb), ki je razkuževala biofilm določen čas.

### 2.4 Vzorčenje in določanje mikroorganizmov

Število preživelih planktonskih MO po razkuževanju v elermajericah smo določili z metodo membranske filtracije v skladu z evropsko farmakopejo (24). Vzorec smo prefiltrirali skozi membranski filter z normirano velikostjo por  $0,45 \mu\text{m}$  in ga vsadili na R2 agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) za 5 dni pri  $30 - 35^\circ\text{C}$ .

Posamezno vzorčno ploščico z biofilmom smo po določenem razkuževalnem času aseptično odstranili iz naprave BAR in z nje postrgali biofilm v sterilizirano erlenmajerico. Ploščico smo dvakrat sprali s sterilno raztopino peptona in stresali. Število bakterij v biofilmu smo določili enako kot je opisano zgoraj in jih izrazili kot število MO na vzorčni ploščici s površino  $15 \text{ cm}^2$  oz. kot število MO /  $\text{cm}^2$ . Na enak način smo določili število bakterij v biofilmu na vzorčni ploščici, ki ni bila razkužena (kontrola). Zaradi majhnega števila MO v 1 ml prečiščene vode iz našega industrijskega sistema navajamo mikrobiološke rezultate kot število planktonskih MO/100 ml. Število MO v biofilmu in mikrobiološki rezultati vode za preteklih 10 let so izraženi kot geometrično povprečje in razpon. TOC je prikazan kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija. Statistična značilnost je testirana na 0,05 nivoju tveganja.

## 2.5 Merilo odpornosti planktonskih in biofilmskih MO na ozon

Environment Protection Agency (EPA) predpisuje uporabo Ct-vrednosti za oceno razkužilnega učinka za določeno vrsto oz. za primerjavo odpornosti različnih MO na določeno razkužilo.

$$\log N = \log N_0 - C \times t$$

$N_0$  – število MO pred razkuževanjem

$N$  – število MO po razkuževanju določen čas (t) pri določeni koncentraciji razkužila (C)

C – koncentracija razkužila (mg/l)

t – kontaktni čas (min) razkužila z MO

Ct-vrednosti (mgmin/l) lahko uporabimo za napoved razkužilnega učinka različnih kombinacij koncentracije razkužilnega sredstva in časa.  $Ct_{90\%}$  je tisti zmnožek koncentracije razkužila in kontaktnega časa, ki zmanjša začetno število MO za 90% oz. za 1 logaritem. S primerjavo  $Ct_{90\%}$  lahko primerjamo učinkovitost nekega razkužila za različne vrste MO oz. opredelimo njihovo odpornost na razkužilo. Večja vrednost  $Ct_{90\%}$  pomeni večjo odpornost MO na določeno razkužilo (23).

## 2.6 Rast sekundarnega biofilma po ozonaciji v napravi BAR

V kolikor razkuževanje pri izbrani koncentraciji in času ne uniči vseh MO v biofilmu na vzorčnih ploščicah (primarne ploščice) in tudi na drugih površinah same naprave, lahko preživeli MO kolonizirajo nove površine in tvorijo sekundarni biofilm. Zato smo po končanem poskusu razkuževanja, t.j. po 120 minutah, odstranili primarne ploščice in jih nadomestili s sterilnimi (sekundarne ploščice) za ugotovitev ustreznosti razkuževanja oziroma možnosti nastanka sekundarnega biofilma. Ustavili smo vrtenje notranjega valja in dotok vode ter po dveh dneh določili število MO na vstavljenih ploščicah.

## 2.7 Primerjava učinkovitosti razkuževanja industrijskega sistema z ozonom in rezultatov laboratorijskega preskušanja njegove učinkovitosti

Pregledali smo desetletne rezultate mikrobiološke kakovosti prečiščene vode v industrijskem sistemu in jih primerjali z ugotovitvami laboratorijskega preskušanja učinkovitosti ozona na biofilmske in planktonske MO.

## 3 Rezultati

Pregled mikrobioloških rezultatov prečiščene vode iz industrijskega sistema v zadnjih letih je pokazal, da so v vodi največkrat prisotne planktonske bakterije *Stenotrophomonas maltophilia*. Tudi v biofilmu na vzorčnih ploščicah smo ugotovili, da tvorijo večino biofilma tovrstne bakterije. Drugi MO se v naši vodi pojavljajo le sporadično in sicer: različne vrste *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fluorescens* itd.), *Aeromonas*, *Corinebacterium* spp., *Mycobacterium* spp, *Micrococcus* spp. in druge. Iz tega je možno sklepati, da je ozon učinkovito razkužilo tudi za omenjene planktonske MO, saj jih le redko identificiramo. Podobne rezultate so dobili po ozonaciji pitne vode (13). Iz tega

sklepamo, da se bakterije prilagodijo na »sovažno« okolje z majhno vsebnostjo hranljivih snovi in stalno prisotnostjo ozona v rezervoarju, skozi katerega kroži prečiščena voda. Evropska farmakopeja predpisuje dovoljeno število planktonskih MO (100 MO / ml) kot mejo za ukrepanje za prečiščeno vodo (24), problematike biofilma in samega biofilma pa sploh ne omenja.

## 3.1 Razkužilni učinek ozona na planktonske MO

Rezultati razkuževanja z ozonom v območju od 70 – 250 ppb in času 5, 10 in 20 minut so pokazali, da 70 ppb ozona že v 5 minutah zmanjša začetno število planktonskih bakterij *Stenotrophomonas maltophilia* iz  $10^4$  MO/ml na 2 MO ml. Ozon je povzročil 3,7 logaritemsko oz. 99,98% zmanjšanje začetnega števila planktonskih bakterij. Izračunan razkužilni učinek  $Ct_{90\%}$  je 0,09 mgmin/l; le-ta zmanjša začetno število MO za 90% oz. za 1 logaritem. Izmerjen TOC vode pred dodatkom ozona je bil 35 ppb, specifična prevodnost manj kot 1.3  $\mu$ S/cm pri 25°C, temperatura vode 22,3 °C, pH 6,2.

## 3.2 Razkužilni učinek ozona na biofilmske MO

Predvidevali smo, da nižje koncentracije ozona ne bodo uničile biofilma, zato smo prvi poskus razkuževanja izvedli s 250 ppb ozona. Po 0, 15, 30, 60, 90 in 120 minutah smo v nastalem biofilmu nepričakovano ugotovili, da celo 250 ppb ozona niti v 120 minutah ni zmanjšal števila MO, zato v preglednici 1 ne navajamo vseh enakih vmesnih rezultatov. Po čiščenju in sterilizaciji naprave BAR smo v njej ponovno vzgojili biofilm in ga razkuževali s 450 ppb ozona 120 minut. Tudi 450 ppb ozona, 120 minut ni zmanjšalo števila MO v biofilmu (Preglednica 1). Izračunan  $Ct_{90\%}$  za biofilmske bakterije je 54 mgmin/l in je mnogo večji kot izračunani  $Ct_{90\%}$  za planktonske bakterije, kar kaže na veliko večjo odpornost prvih na ozon. TOC vode pred dodatkom ozona je bil 28 ppb, specifična prevodnost manj kot 1.3  $\mu$ S/cm pri povprečni temperaturi vode 22,6 °C, pH 6,5.

## 3.3 Rast sekundarnega biofilma po ozonaciji v napravi BAR

Po dveh dneh smo vstavljene, sekundarne ploščice odstranili in na njih določili skoraj enako količino biofilma (sekundarni biofilm, več kot 10 000 MO/ploščico oz. 667 MO /  $cm^2$ ) kot je nastala na primarno vstavljenih ploščicah (primarni biofilm, 10 800 MO/ploščico oz. 720 MO/ $cm^2$ ) v sedmih dneh.

## 3.4 Razlaga učinkovitosti razkuževanja industrijskega sistema z ozonom in laboratorijskega preskušanja njegove učinkovitosti

Industrijski sistem za shranjevanje in razdeljevanje prečiščene vode razkužujemo enkrat tedensko z 250 ppb ozona, 120 minut. V obdobju med dvema postopkoma razkuževanja sistema je 70 ppb ozona samo v vodi v rezervoarju, voda v krožni zanki do razdelišč je brez ozona, neodtočena pa se vrača nazaj v rezervoar. Čas zadrževanja vode v rezervoarju pri 70 ppb je večji od 30 minut, odvisno od potreb proizvodnje.

**Preglednica 1:** Učinek 250 in 450 ppb ozona na biofilmske bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* v 120 min v BAR.

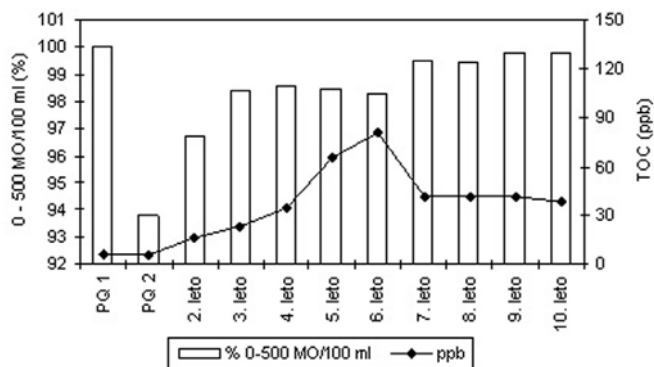
**Table 1:** Impact of 250 and 450 ppb of ozone on *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm in 120 min in BAR model.

Čas razkuževanja (min)	Biofilmski MO na ploščici pred in po razkuževanju s 250 ppb ozona		Biofilmski MO na ploščici pred in po razkuževanju s 450 ppb ozona	
	(MO / 15 cm <sup>2</sup> ) povp ± std dev	(log MO / 15 cm <sup>2</sup> ) log povp ± log std dev	(MO / 15 cm <sup>2</sup> ) povp ± std dev	(log MO / 15 cm <sup>2</sup> ) log povp ± log std dev
0	2123 ± 645	3,33 ± 2,80	10800 ± 920	4,03 ± 2,96
120	2425 ± 345	3,38 ± 2,54	10000 ± 810	4,00 ± 2,91

**Preglednica 2:** Mikrobiološki rezultati in TOC v vzorcih vode iz industrijskega sistema za shranjevanje in razdeljevanje prečiščene vode v desetletnem obdobju.

**Table 2:** Microbial results and TOC in samples of purified water from industrial purified water storage and distribution system in 10 year period.

Čas	Mikrobiološka kontrola: mesto vzorčenja in rezultati					TOC: mesto vzorčenja in rezultati	
	Začetek zanke	Vsa mesta na razdelilni zanki				Konec zanke	
	MO / 100 ml	MO / 100 ml	MO / 100 ml	0-500 MO / 100 ml	(ppb)		
	Povprečje	Povprečje	Razpon	(% vseh rezultatov)	Št. vzorcev	Povp ± std dev	Št. vzorcev
PQ 1	< 1	30	0 - 356	100.00	725	6.0 ± 5.4	29
PQ 2	< 1	122	0 - 10 400	93.77	1316	6.1 ± 5.3	240
2. leto	< 1	75	0 - 5320	96.73	1077	16.6 ± 7.9	256
3. leto	< 1	40	0 - 5120	98.39	968	22.9 ± 8.3	266
4. leto	< 1	49	0 - 5200	98.59	970	34.7 ± 17.8	244
5. leto	< 1	53	0 - 5100	98.47	916	65.5 ± 11.6	252
6. leto	< 1	32	0 - 5100	98.28	1047	81.1 ± 13.5	48
7. leto	< 1	30	0 - 5200	99.52	1037	41.0 ± 8.1	44
8. leto	< 1	16	0 - 5200	99.45	911	41.4 ± 12.8	42
9. leto	< 1	7	0 - 5100	99.77	888	41.4 ± 7.9	46
10. leto	< 1	5	0 - 900	99.77	856	38.9 ± 8.5	45



**Slika 3:** Mikrobiološki rezultati, izraženi kot % vseh rezultatov/leto v kategoriji 0 – 500 MO / 100 ml in povprečne vrednosti TOC (ppb) v desetletnem preiskovanju.

**Figure 3:** Microbial results, expressed as % of all results in category 0 – 500 MO / 100 ml and mean TOC values (ppb) in 10 year period.

Mikrobiološko in kemijsko kakovost prečiščene vode smo spremljali deset let, od postavitve sistema in analiz v PQ 1 (proučevanje kakovosti vode v samem sistemu) oz. PQ 2 (vpliv okolja, samega vzorčnega mesta in načina vzorčenja na kakovost vode) dalje. Pregled rezultatov

kakovosti prečiščene vode iz industrijskega sistema je pokazal, da se je % mikrobioloških rezultatov v kategoriji 0 – 500 MO / 100 ml povečal od 93,77 % (N=1316) v PQ 2 obdobju na 99,8 % (N=856) v 10. letu obratovanja sistema. Povprečna letna koncentracija TOC je bila v PQ1 in PQ 2 obdobju 6 ppb ± 5.4, nato je postopoma naraščala do 34,7 ppb ± 17,8 ppb v 4. letu, dosegla najvišjo vrednost 81,1 ppb ± 13,5 ppb v 6. letu in se nato postopoma zmanjševala do 38,9 ppb ± 8.5 ppb v 10. letu (Slika 3, preglednica 2).

Povprečno število MO v razdelilni zanki se je zmanjšalo iz 122 MO / 100 ml v PQ 2 (N=1316, razpon 0 – 10 400 MO / 100ml) na 5 MO / 100 ml v 10. letu (N = 856, razpon 0 – 900 MO / 100 ml). Povprečno število MO, ki so iz rezervoarja vstopali v razdelilno zanko, je bilo v celotnem obdobju manjše kot 1 MO /100ml. V celem preiskovanem obdobju je letno povprečje števila MO/100ml v vodi iz razdelilne zanke 5 – 122 krat večje od števila MO v vzorcih vode iz začetka razdelilne zanke, ki hkrati predstavljajo kakovost izstopne vode iz rezervoarja (Preglednica 2).

## 4 Razprava

Ugotovili smo, da je ozon v preskusnih pogojih učinkovito razkužljivo sredstvo za planktonske bakterije *Stenotrophomonas maltophilia*, ki jih največkrat identificiramo v prečiščeni vodi iz industrijskega sistema, na biofilmske iste vrste pa ne učinkuje.

Rezultati učinkovitosti vodnih raztopin ozona od 70 ppb do 250 ppb so pokazali, da že koncentracija 70 ppb v 5 minutah zmanjša začetno število planktonskih bakterij *Stenotrophomonas malthophilia* za 3,7 logaritme oz. za 99,98%. O podobni učinkovitosti ozona na naravno prisotne planktonske MO v vodi poročajo tudi drugi. Ugotovili so, da je 50 ppb ozona v 2 do 3 minutah zmanjšalo število naravno prisotnih MO v pitni vodi za 2,6 logaritma (13). Raziskave 1 minutnega delovanja ozona z 200 ppb na standardna planktonska seva *P. aeruginosa* ATCC 15442 in *E. coli* ATCC 25922 so pokazale zmanjšanje začetnega števila MO najmanj za 5 logaritmov (25).

V nasprotju z našimi pričakovanji in ugotovljeno učinkovitost na planktonske MO, pa 450 ppb ozona v 120 minutah ni zmanjšalo začetnega števila biofilmskih bakterij *Stenotrophomonas malthophilia* niti za 90% oz. za 1 logaritem. Objavljenih študij o učinkovitosti ozona na biofilmske MO je zelo malo. Poročajo, da je 600 ppb ozona v 10 minutah zmanjšalo začetno število bakterij v biofilmih, ki so jih tvorili standardni sevi *P. fragi* ATCC 4973 za 4,2 logaritma, *P. putida* ATCC 795 za 3,2 logaritma in *P. fluorescens* ATCC 948 za 2,9 logaritma (15). Glede na naše raziskave in raziskave ameriška agencija NASA pa so biofilmi, ki nastanejo iz naravno prisotnih MO v okolju, veliko bolj odporni na ozon kot standardni sevi. NASA poroča, da je 2000 ppb ozona v 2 urah uničilo samo 50 % biofilma, ki so ga tvorile naravno prisotne bakterije *Pseudomonas cepacia* v sistemu pitne vode na vesoljskem plovilu (26).

Primerjava razkužilnih učinkov  $Ct_{90\%}$  za bakterije *Stenotrophomonas malthophilia* kaže na 533 krat večjo odpornost biofilmskih od planktonskih bakterij iste vrste. Eden od možnih vzrokov za večjo odpornost biofilmskih MO je plast izven celičnih polisaharidov, ki obdaja posamezne celice in jih povezuje med seboj ter s površino. Te plasti planktonski MO nimajo. Verjetno je, da plasti izven celičnih polisaharidov ovirajo penetracijo ozona do MO, poleg tega pa se ozon kot močan oksidant porablja tudi za oksidacijo le-teh.. Zato je koncentracija ozona, ko prodre do bakterijskih celic veliko manjša kot pa je v sami razkužilni raztopini. Enako težnjo v odpornosti biofilmskih MO so dokazali tudi pri *Pseudomonas aeruginosa* in drugih MO po razkuževanju z vodikovim peroksidom, monoklor aminom, alkalijskim hipokloridom in klorosulfamati (27, 28).

Nadalje je zanimiva ugotovitev o rasti sekundarnega biofilma. Primarni biofilm, ki je nastal na notranji površini naprave in ga ozon pri 450 ppb ni uničil, je sproščal planktonske MO, ki so kolonizirali sekundarne vzorčne ploščice. Na teh je že v dveh dneh zrasla skoraj enaka količina sekundarnega biofilma kot v sedmih dneh na primarno vstavljenih ploščicah. Kljub temu, da nismo dokazali zmanjšanja biofilma na ploščicah po ozonizaciji, predvidevamo, da je ozon vseeno uničil določeno število bakterij, ki so postale hrana za preživele. V času rasti sekundarnega biofilma ni bilo niti pretoka vode skozi napravo niti ozona v njej, zato se živi ali mrtvi MO iz sistema niso sproti odstranjevali. Prav slednji so omogočili razmnoževanje preživelih MO in hitrejši nastanek sekundarnega biofilma v primerjavi s primarnim. Ti rezultati kažejo, da je nujno sprotno odstranjevanje odmrlih in tudi uničenje živih planktonskih MO v sistemu, ker se le tako lahko prepreči kolonizacija novih površin in rast sekundarnega biofilma.

Kljub v laboratorijski napravi BAR ugotovljeni neučinkovitosti 250 ppb oz. 450 ppb ozona na biofilmske bakterije *Stenotrophomonas*

*malthophilia*, kaže pregled deset letnih rezultatov o številu planktonskih MO v vzorcih vode iz industrijskega sistema ohranjanje njene mikrobiološke kakovosti. Od PQ obdobja do 10. leta se je povečeval odstotek bakterij v kategoriji 0 – 500 MO/100ml in zmanjševalo letno povprečno število planktonskih MO v 100 ml vode pri povprečni vrednosti TOC pod 50 ppb. Poudariti velja, da ti rezultati dokazujejo izredno dobro mikrobiološko kakovost prečiščene vode glede na zahteve evropske farmakopeje in iz njih lahko sklepamo, da MO v 10. letnem obdobju niso razvili rezistence na ozon.

V vzoredni laboratorijski raziskavi smo ugotovili, da gibanje vode v sistemu močno vpliva na količino biofilma, ki nastane pri določeni koncentraciji TOC. Dlje časa ko voda stoji, več biofilma nastane. Najmanj biofilma je nastalo takrat, ko je voda kontinuirano tekla skozi napravo BAR in sproti odnašala planktonske MO, ki so se sprostili iz biofilma (29).

Ker voda v zanki industrijskega sistema ves čas kroži skozi rezervoar z ozonom, nastane minimalna količina biofilma in krožeča voda sproti odnaša sproščene planktonske MO, ki jih 70 ppb ozona v rezervoarju učinkovito uniči (18). Učinkovitost 70 ppb ozona na planktonske MO smo poleg prej omenjenih laboratorijskih poskusov potrdili tudi s pregledom 10 letnih mikrobioloških rezultatov vode, ki iz rezervoarja teče v razdelilno zanko. V njej je vedno veliko manjše število planktonskih MO kot je povprečno število MO v zanki (preglednica 2). Manjše število MO na iztoku iz rezervoarja je merilo učinkovitega delovanja ozona v njem. Sklepamo, da je ozon poleg uničenja planktonskih MO tudi preprečil kopičenje organskih snovi iz umrlih MO tako, da jih je kot znan oksidant oksidiral do  $CO_2$  in vode.

Dokazali smo, da je bila v prečiščeni vodi koncentracija TOC 10-krat manjša kot jo dovoljuje veljavna evropska farmakopeja. Znano je, da visoka vsebnost organskega ogljika pospešujejo rast biofilma (12), majhna količina pa močno podaljša generacijski čas (čas, ko se število MO podvoji). Poudariti je potrebno, da se ob zadostni hrani poveča odpuščanje planktonski MO iz biofilma, ki povzročijo kolonizacijo novih površin, če jih sproti ne uničujemo. Zaključimo lahko, da le vzdrževanje stalnega pretoka vode ob učinkovitem razkuževanju iz biofilma odpuščenih planktonskih bakterij pri nizki koncentraciji TOC, lahko pojasni deset letne dobre mikrobiološke rezultate prečiščene vode v industrijskem sistemu.

## 5 Sklep

Preskušanje učinkovitosti ozona na planktonske in biofilmske MO na laboratorijskem modelu je pokazalo, da ozon v danih koncentracijah učinkovito deluje na planktonske MO, na biofilmske pa ne. Slednji so vsaj 533-krat bolj odporni proti razkuževanju kot planktonski MO iste vrste. Sekundarni biofilm nastane po ozonaciji hitreje kot je nastal primarni, če tekoča voda ne odstranjuje sproti odmrlih in iz biofilma sproščenih MO. Zato moramo pri načrtovanju in vzdrževanju industrijskih vodnih sistemov doseči, da se število planktonskih MO in obseg biofilma ne večata, kar pa zagotovimo s stalnim kroženjem vode skozi rezervoar z ustrežno razkužilno koncentracijo ozona. V desetih letih planktonski MO v industrijskem sistemu niso razvili rezistence na ozon. Torej, ozon je ustrežno razkužilo tudi za prečiščeno vodo, če hkrati zmanjšujemo dejavnike, ki pomembno vplivajo na razvoj biofilma.

## 6 Literatura

1. Florjanič M., Kristl J. Kakovost farmacevtskih vod glede na mikroorganizme in biofilme. *Farm Vestn* 2002; 53, 95-102.
2. Monds RD., O'Toole GA. The biofilm developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol* 2009; 17: 73-87.
3. Riedewald F. Biofilms in Pharmaceutical Waters. *Pharm Eng* 1997; 17: 8-20.
4. Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 67-84.
5. Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 2008; 22: 945-953.
6. Hamilton MA. Testing antimicrobials against biofilm bacteria. *J AOAC Int* 2002; 8: 479-485.
7. Hall-Stoodly, Costerton JW, Stoodly P. Bacterial biofilms: from environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108.
8. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
9. Parsek MR., Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 677-701.
10. Meltzer T. Ozone and its applications. In: Meltzer T. *Pharmaceutical Water System*. Tall oaks publishing Inc., 1997: 125-164.
11. Siddiqui MS, Amy GL, Murphy BD. Ozone enhanced removal of natural organic matter from drinking water sources. *Wat Res* 1997, 31: 3098-3106.
12. Hammes F, Salhi E, Koster O et al. Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during ozonation of drinking water. *Wat Res* 2006; 40: 2275 – 2286.
13. Lee JY, Deininger RA. Survival of bacteria after ozonation. *Ozone Sci Eng*, 2000, 22, 65-75.
14. Lezcano I, Perez R, Gutierrez MS et al. Ozone inactivations of microorganisms in water. Gram positive bacteria and yeast, *Ozone Sci Eng* 2001; 23: 183-187.
15. Dosti B, Guzel-Seydim Z, Greene AK. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *Int J Dairy Tech*, 2005; 58 (1), 19 - 24.
16. Plattes M, Henry E, Schosseler PM. A zero-dimensional biofilm model for dynamic simulation of moving bed bioreactor systems: Model concepts, Peterson matrix, and application to a pilot-scale plant. *Biochem Eng J* 2008; 40, (2):392-398.
17. Meltzer TH. Ozonation in Pharmaceutical Water – An added substance violation or not? *Ultrapure Water* 1998; 15 (6): 68-70.
18. Florjanič M, Kristl J. Microbiological Quality assurance of purified water by ozonation of storage and distribution system. *Drug Dev Ind Pharm* 2006; 32: 1113-1121.
19. Otto K. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion. *Research in Microbiology* 2008, 159 (6):415-422.
20. Lerchner J, Wolf A, Buchholz F et al. Miniaturized calorimetry — A new method for real-time biofilm activity analysis. *J Microbiol Meth* 2008; 74, August: 74-81.
21. Nazira Khabibor Rahman, Mohamad Zailani Abu Bakar, Mohamad Hekarl Uzir, Azlina Harun Kamaruddin. Modelling on the effect of diffusive and convective substrate transport for biofilm. *Mathem Biosci* 2009, 218, 130 - 137.
22. Russo ME, Maffettone PL, Marzocchella A et al. Bifurcational and dynamical analysis of a continuous biofilm reactor. *J Biotech* 2008, 135 (3):295-303.
23. Hoff JC. Strengths and weaknesses of Using C-t values to evaluate disinfection practice. *Proc. AWWA Seminar, Assurance of Adequate Disinfection, American Water Works Assoc*, 1987; 49-65.
24. *European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> Edition*. Strasbourg. Council of Europa 2010. 3224-5.
25. Restaino L, Frampton EW, Hemphill JB et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(9): 3471-3475.
26. Koenig DW, Mishra SK, Pierson DL. Removal of *Burkholderia cepacia* biofilms with oxidants. *Biofouling*, 1995, 9 (1): 51-62.
27. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microb* 2000; 88, 1: 22-30.
28. Stewart PS, Rayner J, Roe F et al. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates, *J Appl Microbiol* 2001; 91: 525-532.
29. Florjanič M, Kristl J. Study of biofilm development by simulation of the real conditions in industrial system for purified water. *Int. J. Pharm.* (sprejet v objavo).

# Farmakogenomika selektivnih zaviralcev privzema serotonina

## Pharmacogenomics of selective serotonin reuptake inhibitors

Polonca Ferk

**Povzetek:** Farmakogenomika ima velik potencial v zdravljenju depresivnih motenj. Za mnoge kandidatne genetske polimorfizme, ki naj bi jih uporabljali za napoved učinkovitosti in varnosti zdravljenja z antidepresivi, so rezultati kliničnih farmakogenomskih študij obetajoči. Končni cilj je nedvoumno potrditi klinično relevantne genetske označevalce ter uvesti njihovo testiranje v rutinsko klinično prakso, in sicer z namenom optimizacije in racionalizacije antidepresivnega zdravljenja. V prispevku je predstavljena farmakogenomika selektivnih zaviralcev privzema serotonina, ki se med antidepresivi dandanes najpogosteje predpisujejo.

**Ključne besede:** depresija, selektivni zaviralci privzema serotonina, farmakogenomika, genetski polimorfizmi, personalizirana terapija

**Abstract:** Pharmacogenomics has great potential in treatment of depressive disorders. Results of several clinical pharmacogenomic studies investigating candidate genetic polymorphisms for predicting efficacy and safety of antidepressant therapy are promising. The final goal is to unequivocally confirm clinically relevant genetic markers and introduce their testing into routine clinical practice in order to optimize and rationalize antidepressant therapy. The paper is focused on pharmacogenomics of selective serotonin reuptake inhibitors, the most widely prescribed antidepressant drugs nowadays.

**Key words:** depression, selective serotonin reuptake inhibitors, pharmacogenomics, genetic polymorphisms, personalized therapy

## 1 Depresija

Depresivne motnje so najpogostejše duševne motnje z življenjsko prevalenco 5-10% pri moških in 12-20% pri ženskah. Vključujejo veliko depresivno motnjo ali depresijo, distimijo in bipolarno motnjo. Prizadenejo človekovo razpoloženje, čustvovanje, mišljenje, kognitivne funkcije, psihomotorično aktivnost ter posledično pomembno zmanjšajo kakovost življenja in delovno sposobnost človeka (1).

### 1.1 Etiologija depresije

Etiologija depresije še vedno ni povsem pojasnjena, najverjetneje pa je posledica kombinacije bioloških in genetskih dejavnikov, stresa, dejavnikov okolja, osebnostnih lastnosti, telesnih bolezni, psihosocialnega vpliva (1).

Najstarejša teorija etiologije depresije je t. i. monoaminska teorija. Simptomi depresije naj bi bili posledica funkcionalnega pomanjkanja monoaminskih prenašalcev v osrednjem živčnem sistemu (OŽS), zlasti serotonina (tudi 5-hidroksitriptamin, 5-HT) in noradrenalina (NA), verjetno tudi dopamina (DA). S povečanjem koncentracij 5-HT, NA in DA v sinapsah in s tem z izboljšanim prenosom signalov v ustrezni sinapsi je mogoče tudi smiselno razložiti mehanizem delovanja antidepresivov (1).

Novejša je t. i. receptorska teorija depresije, ki predpostavlja razvoj depresivnih motenj kot posledico povečanja števila receptorjev za 5-HT, NA in DA. Predpostavko potrjuje dejstvo, da antidepresivi zmanjšajo število postsinaptičnih receptorjev za monoaminske prenašalce. Čas, ki je potreben, da se število receptorjev zmanjša na normalno raven, je 3-4 tedne; to je hkrati čas, potreben, da se učinek antidepresivov terapevtsko izrazi (1).

Po t. i. nevroplastični hipotezi je depresija posledica spremenjene občutljivosti oz. funkcionalne okvarjenosti receptorjev za 5-HT, NA in/ali DA in/ali molekul, udeleženih v znotrajceličnih signalnih poteh, ki se sprožijo po aktivaciji postsinaptičnih receptorjev za navedene prenašalce (2). Najnovejša hipoteza etiologije depresije pa je t. i. nevrokininska hipoteza oz. hipoteza substance P, ki izhaja iz ugotovitev, da imajo antagonisti nevrokininov med drugim tudi antidepresivne učinke (3).

### 1.2 Farmakološko zdravljenje depresije

Depresijo farmakološko zdravimo z antidepresivi, ki se v klinični praksi uporabljajo že več kot 50 let. Antidepresivi delujejo pretežno tako, da povečajo koncentracijo 5-HT, NA oz. DA v ustreznih sinapsah (2). Danes se med antidepresivi najpogosteje predpisujejo selektivni zaviralci privzema 5-HT (SSRI - selective serotonin reuptake inhibitors). V primerjavi s starejšimi antidepresivi imajo SSRI večji terapevtski

indeks, zato jih bolniki v splošnem bolje prenašajo. Cilj racionalne farmakoterapije s SSRI je zato postavitev modela za napoved uspešnosti zdravljenja s SSRI pri posameznem bolniku (1, 2).

## 2 Razlike v farmakološkem odgovoru med posamezniki

Bolniki se lahko na zdravljenje z določenim zdravilom ob določenem terapevtskem režimu odzovejo različno. Razlike so možne na farmakokinetičnem ali farmakodinamičnem nivoju, lahko pa pride tudi do idiosinkrazije (4).

Večina razlik v farmakološkem odgovoru je verjetno posledica genetske raznolikosti med posamezniki. S tega vidika pomembnejši genetski polimorfizmi so polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP-ji - single nucleotide polymorphisms), polimorfizmov indel (gre za insercijo oz. delecijo enega ali več nukleotidov), polimorfizmov spremenljivega števila tandemskih ponovitev (VNTR-ji - variable number of tandem repeats). Med njimi so z 90-odstotnim deležem daleč najpogostejši SNP-ji, pri katerih gre za spremembo v enem samem nukleotidu, bodisi v kodirajočih bodisi v nekodirajočih področjih genoma, frekvenca manj pogostega alela v populaciji pa mora biti vsaj 1%.

Prisotnost določenega alela je lahko vzrok odsotnosti terapevtskega učinka ali vzrok resnim neželenim stranskim učinkom (ADR) zdravljenja z izbranim zdravilom. Alelne različice, ki v največji meri vplivajo na farmakološki odgovor na zdravilo, so navadno del genov za proteinske tarčne molekule za zdravila ter za presnovne encime za zdravila. Polimorfizmi v kodirajočem področju gena navadno vplivajo na nastanek strukturno in posledično funkcionalno spremenjenega proteina, medtem ko polimorfizmi v regulatornih področjih gena vplivajo zlasti na transkripcijsko aktivnost gena in s tem na stopnjo izražanja ustreznega proteina (5).

Na raznolikost v farmakološkem odgovoru med posamezniki poleg genetskih dejavnikov vplivajo tudi starost, rasa, imunološki dejavniki, dejavniki okolja (prehrana, življenjski stil), spol, posebna fiziološka stanja (npr. nosečnost), zdravstveno stanje, še zlasti nekatera patološka stanja (npr. bolezni ledvic, bolezni jeter), interakcije med zdravili ter drugi dejavniki (4). V napovedni model za učinkovitost in varnost zdravljenja z izbranim zdravilom, odmerkom in režimom odmerjanja je potrebno vključiti vse dejavnike, ki določajo farmakološki odgovor.

## 3 Farmakogenomika selektivnih zaviralcev privzema serotonina

Farmakogenomika (FG) je interdisciplinarna veda, ki povezuje znanja farmakologije in genomike; ugotavlja, kako genetske razlike med posamezniki vplivajo na farmakološki odgovor.

Namen vključitve FG pristopa v farmakoterapijo je glede na bolnikov genetski profil že na začetku zdravljenja izbrati za bolnika maksimalno učinkovito terapijo z minimalnimi ADR. Izbor optimalne terapije pomeni izbor primerne zdravila, velikosti odmerka, intervala odmerjanja, načina dajanja in vrsto farmacevtske oblike (6).

FG ima med drugim velik potencial tudi v psihiatriji. Intenzivno potekajo zlasti študije povezave med genetskimi polimorfizmi in učinki antidepresivov, čeprav v klinični praksi izbor primerne terapije za bolnika z depresijo še vedno poteka pretežno s preizkušanjem (2, 7).

### 3.1 Kandidatni geni za napoved učinka selektivnih zaviralcev privzema serotonina

Kandidatni geni in genetski polimorfizmi so izbrani glede na njihovo potencialno oz. dokazano vlogo v etiologiji depresije ter v mehanizmu delovanja antidepresivov (preglednica 1).

V nadaljevanju je predstavljen kratek pregled rezultatov študij *in vitro*, *in vivo* ter predvsem kliničnih FG študij, ki se nanašajo na SSRI, zlasti na paroksetin, fluvoksamin, fluoksetin, citalopram in sertralini.

#### 3.1.1 Kandidatni geni na nivoju farmakodinamike

##### 3.1.1.1 Gen za triptofan-hidroksilazo

Biosinteza 5-HT poteka iz esencialne aminokislina L-triptofana v dveh stopnjah. Prvo stopnjo, hidroksilacijo L-triptofana, katalizira encim triptofan-hidroksilaza (TPH). Slednja ima verjetno eno ključnih vlog v uravnavanju učinkov antidepresivov. Podgane, ki so bile dolgotrajno izpostavljene sertralinu, so v večji meri izražale mRNA ter encim TPH. Povečana aktivnost TPH vodi do zvečanih koncentracij 5-HT, posledica pa je večja aktivnost serotoninskega sistema (2). V genu *TPH* so največ preučevali dva SNP-ja v intronu 7, in sicer A218C ter A779C. Polimorfizem A218C se nahaja znotraj vezavnega mesta za transkripcijske dejavnike GATA, zato verjetno spremeni izražanje gena *TPH*. Alel A, ki je manj pogost, zmanjšuje biosintezo 5-HT. V dveh kliničnih študijah na bolnikih z depresijo so dokazali, da je prisotnost homozigotnega genotipa A/A povezana s počasnejšim terapevtskim odgovorom na zdravljenje s fluvoksaminom. Nadalje je prisotnost genotipov A/A in A/C povezana s slabšo učinkovitostjo zdravljenja s paroksetinom. Rezultati podobne študije v japonski populaciji ne potrjujejo rezultatov pri belcih (2).

##### 3.1.1.2 Gen za monoamino-oksido A

Gen *MAOA* nosi zapis za izoencim monoamino-oksido A (MAOA), ki med drugim razgrajuje monoaminske prenašalce. Encim MAOA je tarčna molekula zgodovinsko prvih antidepresivov, ki preprečijo presnovo navedenih prenašalcev in s tem zvečajo njihovo aktivnost. Polimorfizem VNTR 30 baznih parov (bp) dolgega osnovnega motiva v promotorju gena *MAOA* vpliva na transkripcijsko aktivnost gena. V dosedanjih kliničnih FG raziskavah pa predvidenega vpliva navedenega polimorfizma na razlike v farmakološkem odgovoru na zdravljenje z antidepresivi niso uspeli potrditi (2, 7).

##### 3.1.1.3 Gen za katehol-O-metil-transferazo

Katehol-O-metil-transferaza (COMT) je encim, ki razgrajuje kateholamine, vključno z DA in NA. Nahaja se znotrajcelično v postsinaptičnih nevronih. V genu *COMT* so vsaj trije FG zanimivi polimorfizmi: Val158Met (rs4680), rs737865 in rs165599. Dokazali so, da funkcionalni polimorfizem Val158Met vpliva na kognitivne funkcije. Izooblika COMT z valinom na mestu 158 katabolizira DA do štirikrat hitreje kot izooblika COMT z metioninom na tem mestu. V primeru različice 158Val je tako zaradi manjše količine DA stimulacija dopaminskega sistema manjša. Rezultati dosedanjih kliničnih FG študij



**Preglednica 1:** Kandidatni geni, genetski polimorfizmi in proteini za napoved farmakološkega odgovora na zdravljenje s SSRI

**Table 1:** Candidate genes, genetic polymorphisms and proteins for prediction of pharmacological response of SSRI

Gen	Protein	Genetski polimorfizem	Klinična potrditev
<b>Vpliv na farmakodinamiko</b>			
<i>TPH1</i>	triptofan-hidroksilaza (TPH)	A218C A779C	+/?
<i>TPH2</i>	triptofan-hidroksilaza (TPH)	?	?
<i>MAOA</i>	monoamino-oksida A	VNTR	-
<i>COMT</i>	katehol-O-metil-transferaza	Val158Met (rs4680, G1947A)	?
		rs737865	?
		rs165599	?
<i>HTR1A</i>	serotoninški receptorji 5-HT <sub>1A</sub>	-1019C>G	+
		rs10042486C/C, rs6295G/G, rs1364043T/T (ter ustrezna haplotipska kombinacija)	+
<i>HTR2A</i>	serotoninški receptorji 5-HT <sub>2A</sub>	T102C (rs6313)	+
		-1438G/A	?
<i>HTR3A</i>	serotoninški receptorji 5-HT <sub>3A</sub>	C195T	-
		Pro16Ser (C178T)	-
<i>HTR3B</i>	serotoninški receptorji 5-HT <sub>3B</sub>	Tyr129Ser	-
		-100_-102AAG	+
<i>HTR6</i>	serotoninški receptorji 5-HT <sub>6</sub>	Ser267Lys (C267T)	-
<i>SERT</i> (5-HTT, <i>SLC6A4</i> )	prenašalec za serotonin (SERT oz. 5-HTT)	VNTR 5-HTTLPR (SERTPR) STin2	+ -
<i>DRD2</i>	dopaminski receptor D <sub>2</sub>	Ser311Cys (rs1801028, C1097G)	?
		Taq1A	+
<i>DRD4</i>	dopaminski receptor D <sub>4</sub>	VNTR	?
<i>DAT</i>	prenašalec za DA (DAT)	VNTR	-
<i>NOS1</i>	sintaza dušikovega oksida (NOS)	C276T	-
<i>ACE</i>	angiotenzin-konvertaza (ACE)	<i>indel</i>	+/?
<i>IL-1β</i>	interlevkin 1β (IL-1β)	-511C/T	+
<i>GRIK2</i>	podenota kainatnega ionotropnega receptorja za glutamat GluR6	rs2518224	+
<i>GRIA3</i>	podenota AMPA3 ionotropnega glutamatnega receptorja AMPA	rs4825476	+
<i>CREB1</i>	protein 1, ki veže odzivne elemente za cAMP	?	?
<i>ADRB1</i>	adrenergični receptor β <sub>1</sub>	Gly389Arg (G1165C)	+
<i>GNB3</i>	podenota β <sub>3</sub> proteina G	C825T	+
<i>FGF2</i>	osnovni rastni dejavnik za fibroblaste	haplotip rs1048201T-rs3747676T	+(ADR)
		haplotip rs308447T-rs308393C-rs1449683T	+
		rs1449683	+
		rs308393	+
		rs1048201	+(ADR)
<b>Vpliv na farmakokinetiko</b>			
<i>ABCB1</i>	P-glikoprotein	?	?
<i>CYP2D6</i>	citokrom P450 2D6 (CYP2D6)	različni SNP	+
<i>CYP2C19</i>	citokrom P450 2C19 (CYP2C19)	različni SNP	+

Legenda:

- + potrditev povezave med navedenim polimorfizmom in učinkovitostjo zdravljenja s SSRI
- povezave med navedenim polimorfizmom in izidom zdravljenja s SSRI niso uspeli potrditi
- ? rezultati dosedanjih študij so nasprotujoči oz. ustrezna študija še ni bila narejena
- (ADR) povezava z neželenimi stranskimi učinki

Legend:

- + association between the polymorphism and efficacy of SSRI therapy confirmed
- association between the polymorphism and efficacy of SSRI therapy not confirmed
- ? contradicting results or lack of results
- (ADR) association with adverse drug reactions

pri bolnikih z depresijo pa nepričakovano nakazujejo, da klinični odziv in remisija depresije pri zdravljenju s SSRI nista pomembno odvisna od polimorfizma Val158Met v genu *COMT* (8, 9).

### 3.1.1.4 Serotoninski sistem

Serotonin ima v OŽS ključno vlogo v uravnavanju razpoloženja ter sodeluje v uravnavanju prehranjevanja, spanja, spolnosti ter drugih nevroendokrinih funkcij. Serotoninski receptorji so strukturno in funkcionalno zelo raznoliki. Med njimi imajo na odziv na zdravljenje z antidepressivi najpomembnejši vpliv receptorji 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub> in 5-HT<sub>6</sub> (2).

#### 3.1.1.4.1 Geni za serotoninske receptorje

Med številnimi SNP-ji v genu za receptor 5-HT<sub>2A</sub> (gen *HTR2A*) se je kot klinično pomemben v povezavi s farmakološkim odgovorom na zdravljenje z antidepressivi izkazal predvsem polimorfizem T102C (rs6313). Prisotnost alela C zmanjša izražanje receptorjev 5-HT<sub>2A</sub>, posledica pa je večja aktivnost serotoninskega sistema. V kliničnih FG študijah so ugotovili, da se lahko pri bolnikih z genotipom C/C razvijejo celo resni ADR v primeru zdravljenja s paroksetinom oz. fluvoksaminom (2, 7).

V genu za receptor 5-HT<sub>1A</sub> (gen *HTR1A*) je prav tako veliko polimorfizmov, ki *in vitro* vplivajo na izražanje in funkcijo tega gena. Povezavo z depresijo so pri belcih potrdili za SNP -1019C>G (1), medtem ko so pri japonskih bolnikih z depresijo ugotovili značilno povezavo homozigotnih genotipov rs10042486C/C, rs6295G/G in rs1364043T/T ter ustrezne haplotipske kombinacije rs10042486-rs6295-rs1364043 z boljšim terapevtskim izidom pri zdravljenju s SSRI (10, 11).

Delecija AAG (polimorfizem -100\_-102AAG) v genu za receptor 5-HT<sub>3B</sub> (gen *HTR3B*) zavira translacijo mRNA v protein HTR<sub>3A</sub>. Posledica je manjše število receptorjev HTR<sub>3A</sub>, a se le-ti prej nasičijo s 5-HT. Aktivnost serotoninskega sistema se tako zveča, večja je tudi možnost ADR. Klinična FG študija na bolnikih z depresijo potrjuje, da je prisotnost delecije AAG povezana z večjo pogostostjo navzee ob jemanju paroksetina (7).

Študije na podganah so pokazale, da imajo številni antidepressivi veliko afiniteto tudi za serotoninski receptor 5-HT<sub>6</sub>. Polimorfna oblika receptorja 5-HT<sub>6</sub> s spremembo Ser267Lys, ki je posledica polimorfizma C267T v genu za receptor 5-HT<sub>6</sub> (gen *HTR6*), ima približno 10-krat večjo afiniteto za 5-HT kot nativna oblika receptorja. Povezave med tem genetskim polimorfizmom in farmakološkim odgovorom na zdravljenje z antidepressivi pa v klinični FG študiji doslej še niso potrdili (7).

#### 3.1.1.4.2 Gen za prenašalec za serotonin

Učinki številnih antidepressivov so posledica inhibicije prenašalca za 5-HT (SERT, 5-HTT). Gre za integralni membranski protein, odgovoren za prenos 5-HT iz sinapse nazaj v presinaptični nevron (2). Na učinkovitost transkripcije gena za SERT (gen *5-HTT* oz. *SLC6A4*) vpliva zlasti funkcijski VNTR na 5'-koncu regulatorne promotorske regije (polimorfizem SERTPR). Navedeni polimorfizem je bialelni: dolgi alel, tj. alel L, ima insercijo 44 bp, kratki alel, tj. alel S, pa ima delecijo 44 bp. Na celični liniji limfoblastov so dokazali značilno večjo bazalno transkripcijsko aktivnost gena *5-HTT* v primeru prisotnosti alela L kot v primeru prisotnosti alela S (12). V nasprotju z rezultati študij *in vitro* pa so v kliničnih FG študijah ugotovili, da je učinkovitost zdravljenja s

fluvoksaminom večja ob prisotnosti vsaj enega alela L, odgovor na zdravljenje s paroksetinom ob prisotnosti alela S pa slabo učinkovit in počasen (2, 7, 13).

Zanimiv za nadaljnje FG raziskave bi lahko bil tudi polimorfizem VNTR v intronu 2 gena *5-HTT*, ki prav tako vpliva na raven izražanja mRNA za SERT (14).

### 3.1.1.5 Dopaminski sistem

Nekateri antidepressivi delujejo tako, da spodbudijo prenos signalov v sinapsah z dopaminom. Dopamin ima med drugim pomembno vlogo pri usmerjanju pozornosti, vpliva na procese učenja in spominske funkcije, motivacijo in občutke zadovoljstva. Raziskave kažejo, da zvečane koncentracije DA v OŽS oslabijo terapevtske učinke antidepressivov (2).

#### 3.1.1.5.1 Gen za dopaminski receptor D<sub>2</sub>

Dopaminski receptor D<sub>2</sub> ima verjetno ključno vlogo pri uravnavanju apetita. Sklopljen je s proteinom G in zavira aktivnost adenilat-ciklaze, s tem pa zmanjšuje količino nastalega cAMP. V kodirajočem področju gena za receptor D<sub>2</sub> (gen *DRD2*) je prisotno polimorfizem Ser311Cys. Različica s cisteinom manj učinkovito zavira adenilat-ciklazo (2). Klinični FG pomen te ugotovitve bo potrebno opredeliti v nadaljnjih študijah.

Za polimorfizem *Taq1A* v genu *DRD2* so v poskusih *in vitro* v primeru prisotnosti alela A1 dokazali manjšo gostoto receptorjev D<sub>2</sub>. V ustrezni klinični FG študiji so potrdili, da se pri bolnikih z alelom A1 receptorji hitreje nasičijo z DA. Bolniki so posledično bolj dovzetni za razvoj ADR, povezanih s prekomerno stimulacijo dopaminskega sistema (ekstrapiramidni simptomi) (7).

#### 3.1.1.5.2 Gen za prenašalec za dopamin

Veliko SSRI ima afiniteto za prenašalec za DA na presinaptičnem nevronu (DAT - dopamine reuptake transporter). Povezave med VNTR v genu *DAT* in ADR pri uporabi SSRI niso uspeli potrditi (7).

#### 3.1.1.6 Gen za sintazo dušikovega oksida

Sintaza dušikovega oksida (NO-sintaza, NOS) je encim, ki katalizira pretvorbo L-arginina v dušikov oksid (NO). Med številnimi fiziološkimi vlogami, ki jih ima NO kot signalna molekula, je tudi vpliv na sinaptično plastičnost, posledično na učenje in spomin. V OŽS so potrdili prisotnost dveh izooblik encima NOS, in sicer NOS1 in NOS3 (2), ki imata morda pomembno vlogo tudi pri učinkih antidepressivov. Bolniki z depresijo imajo značilno večje plazemske koncentracije NO kot zdravi posamezniki, torej je aktivnost NOS pri bolnikih verjetno zvečana. Poleg tega antagonisti NOS izzovejo podobne učinke OŽS kot antidepressivi.

Rezultati edine dosedanje klinične FG študije kažejo, da polimorfizem C276T v genu *NOS1* verjetno ni povezan z večjim tveganjem za razvoj depresije in ne vpliva na učinkovitost zdravljenja s fluksetinom v japonski populaciji bolnikov (2).

#### 3.1.1.7 Gen za angiotenzin-konvertazo

Encim angiotenzin-konvertaza (ACE), imenovan tudi kininaza II, katalizira pretvorbo angiotenzina I v angiotenzin II. Najbolj raziskana je vloga ACE v uravnavanju krvnega tlaka, vendar ta encim opravlja še številne druge fiziološke funkcije. Aktivnost ACE v ŽS je povečana pri bolnikih, nagnjenih k samomorilnosti (1). Izboljšanje razpoloženja je (želen) stranski učinek zaviralcev ACE. V etiologijo depresije je

vpletena tudi snov P, ki jo razgrajuje ACE (2). Gen *ACE* nosi zapis za dve izoobliki encima. Kar približno 50% raznolikosti v plazemskih koncentracijah ACE med posamezniki je posledica polimorfizma in del v intronu 16 gena *ACE* (2). Klinična FG študija pri belcih je pokazala, da se je bolnikom, pri katerih je bil prisoten alel z delecijo, klinična slika depresije po štirih tednih zdravljenja s SSRI značilno izboljšala. Prav tako je bil pri navedenih bolnikih čas trajanja potrebne hospitalizacije značilno krajši v primerjavi z bolniki s prisotnim alelom z insercijo. Prisotnost alela z delecijo verjetno vpliva tudi na hitrejši terapevtski odziv antidepressivov, medtem ko so pri homozigotih z dvema aleloma z insercijo opazili zakasnen terapevtski učinek (15). Zgornjim ugotovitvam nasprotujejo rezultati nedavne študije, v kateri polimorfizma in del niso uspeli povezati z antidepressivnim učinkom fluoksetina (16).

### 3.1.1.8 Gen za interleukin 1 $\beta$

Interleukin 1 $\beta$  (IL-1) je skupno ime za dva različna proteina, IL-1 $\alpha$  in IL-1 $\beta$ , ki sodita v družino regulacijskih in vnetnih citokinov. V akutni fazi depresije je dokazano aktiviran vnetni obrambni sistem (17). Plazemske koncentracije IL-1 so pri bolnikih z depresijo in distimijo povišane (2). IL-1 pri samicah podgan povzroča značilen vzorec obnašanja: motorično manjzavzvitost, motnje spanja, zaspanost, anoreksijo, izgubo telesne mase, hiperalgezijo, zmanjšano željo po druženju, spolno disfunkcijo (2). Klinična FG študija je pokazala, da so imeli depresivni bolniki s homozigotnim genotipom -511T/T SNP-ja -511C/T v promotorju gena *IL-1 $\beta$*  depresivne simptome izražene v blažji obliki in so se učinkoviteje odzvali na zdravljenje s fluoksetinom kot bolniki s prisotnim alelom -511C (18).

### 3.1.1.9 Geni za ionotropne receptorje za glutamat

Glutamat je ključen ekscitacijski prenašalec v OŽS. V klinični FG študiji so ugotovili povezavo med nekaterimi genetskimi različicami v ionotropnih receptorjih za glutamat in samomorilnimi mislimi, in sicer: genotipa C/C (SNP rs2518224) v genu *GRIK2* (kodira podenoto kainatnega receptorja za glutamat GluR6) ter alela G (SNP rs4825476) v genu *GRIA3* (kodira podenoto AMPA3 glutamatnega receptorja AMPA) (19). Navedeni rezultati kažejo, da bo potrebno za poglobljeno razumevanje etiologije depresije ter farmakoterapije z antidepressivi podrobneje preučiti tudi pomen prenosa signalov v sinapsah z glutatomom.

### 3.1.1.10 Gen za vezavni protein 1 za odzivne elemente za ciklični adenzin monofosfat

Po aktivaciji postsinaptičnih receptorjev za monoaminske prenašalce pride do stimulacije signalnih poti, posredovanih s cAMP. Posledica je indukcija transkripcijske aktivnosti različnih genov. Pri tem ima pomembno vlogo protein CREB1, tj. vezavni protein 1, ki veže odzivne elemente za cAMP. Polimorfizem rs4675690 na 3'-koncu v genu *CREB1* so v klinični FG študiji povezali s samomorilnimi mislimi. V tem genu bi bilo smiselno iskati tudi potencialno klinično relevantne genske polimorfizme za napoved uspešnosti zdravljenja s SSRI (7).

### 3.1.1.11 Gen za adrenergični receptor $\beta_1$

Gen *ADRB1* nosi zapis za adrenergični receptor  $\beta_1$ , kateri je v OŽS pomembno udeležen v uravnavanju procesov, povezanih z obnašanjem, razpoloženjem, spominom, z neuroendokrinimi in avtonomnimi funkcijami. Imel naj bi tudi pomembno vlogo pri posredovanju učinkov antidepressivov. Polimorfizem G1165C v kodirajočem področju gena *ADRB1* vodi do zamenjave glicina z

argininom na mestu 389 v receptorski molekuli (Gly389Arg). Če je prisoten alel 1165C, je aktivnost adenilat-ciklaze večja. Klinična FG študija je pokazala povezavo med prisotnostjo homozigotnega genotipa C/C ter bolj učinkovitim in hitrejšim odzivom na zdravljenje s SSRI (2).

### 3.1.1.12 Gen za podenoto $\beta_3$ proteina G

Proteini G so ključne komponente znotrajceličnih signalnih poti v vseh celicah v telesu, tudi v nevronih. V trimerni obliki so neaktivni in povezani z receptorjem, imajo pa sposobnost disociacije monomera  $\alpha$  od dimera  $\beta$ - $\gamma$ , pri čemer se z dimera  $\beta$ - $\gamma$  odcepi gvanozin-trifosfat (GTP) in se poveže s podenoto  $\alpha$ . Pri kroničnem dajanju fluoksetina podganam so ugotovili, da oslabi vezava GTP na podenoto  $\gamma$ , posledica pa je desenzitizacija serotoninskih receptorjev 5-HT<sub>1A</sub> (2). Podenoto  $\beta$  lahko razdelimo na tri podtipa: 1, 2 in 3. Polimorfizem C825T v genu za podenoto  $\beta_3$  proteina G (gen *GNB3*) vpliva na hitrost signalne transdukcije. Klinična FG študija pri belcih je pokazala, da se bolniki s genotipom T/T najbolje odzovejo na zdravljenje z antidepressivi (2). Navedenega v japonski populaciji niso uspeli potrditi (10).

### 3.1.1.13 Gen za fibroblastni rastni dejavnik 2

Fibroblastni rastni dejavnik 2 (FGF2 - basic fibroblast growth factor) je verjetno udeležen v procesih sinaptične plastičnosti in nevrogeneze. Nizke koncentracije proteina FGF2 so značilno povezane s prisotnostjo anksioznosti. Pri bolnikih, zdravljenih z antidepressivi, so potrdili povečane koncentracije proteina FGF2. Polimorfizem rs1449683 v genu *FGF2* se je izkazal kot dober napovedni označevalec za koncentracijo mRNA in proteina FGF2 (2). V klinični FG študiji v japonski populaciji so ugotovili povezavo alela T polimorfizma rs1449683 ter alela C polimorfizma rs308393 v genu *FGF2* z bolj učinkovitim farmakološkim odgovorom na zdravljenje s SSRI. Prav tako so z večjo učinkovitostjo zdravljenja povezali haplotip rs308447T-rs308393C-rs1449683T (10).

## 3.1.2 Kandidatni geni na nivoju farmakokinetike

### 3.1.2.1 Gen za P-glikoprotein

V novejši študiji so ugotovili povezavo med genetskimi različicami v genu za P-glikoprotein (*ABCB1*), prenašalni protein za zdravila, in antidepressivnimi učinki, vendar bo zanesljivost tega rezultata potrebno potrditi v nadaljnjih študijah (20).

### 3.1.2.2 Geni za presnovne encime

Glavni presnovni encimi sodijo v družino jetrnih citokromov P450 (CYP), ki katalizirajo oksidacije in redukcije številnih endogenih in eksogenih spojin, tudi zdravil. V genih za CYP-e so prisotni številni genetski polimorfizmi, ki pomembno vplivajo na aktivnost encimov in s tem na hitrost presnavljanja zdravil. Encimi CYP katalizirajo tudi presnovne reakcije mnogih antidepressivov. Različni SSRI tudi aktivirajo oz. zavirajo specifične CYP-e (2).

#### 3.1.2.2.1 Gen za citokrom P450 2D6

Za gen *CYP2D6* je opisanih več kot 75 SNP-jev. Nekateri med njimi vodijo v nizko stopnjo ali celo odsotnost aktivnosti encima CYP2D6. Posledica so povišane koncentracije zdravila, ki se presnavlja s tem encimom, in s tem močnejši učinki zdravila, lahko tudi ADR. Fenotipsko so taki posamezniki počasni (slabi) presnavljalci (PM - poor metabolisers). Najpogostejši med aleli *CYP2D6*, kateri vodijo v odsotnost encimske aktivnosti, je alel *CYP2D6*\*4. Prisoten je pri

približno 5-10% belcev, medtem ko je v drugih rasah značilno manj pogost (2).

Nekateri SNP-ji v genu *CYP2D6* ter prisotnost več kopij gena *CYP2D6* zvečajo aktivnost encima CYP2D6. Posledica so manjše plazemske koncentracije zdravil, ki se presnavljajo s tem encimom. Ti posamezniki so fenotipsko močni presnavljalci (UM - ultrarapid metabolisers), zato bo pri njih farmakološki odgovor na zdravljenje s standardnimi odmerki zdravila najverjetneje nezadosten oz. odsoten (2).

Številni SSRI zavirajo encim CYP2D6: paroksetin, norfluoksetin, fluoksetin, sertralini, fluvoksamin, citalopram (navedeni po padajoči moči inhibicije) (2).

V klinični praksi se je bolnikov fenotip CYP2D6 doslej določal z merjenjem plazemske koncentracije 4-hidroksibrizokina, metabolita debrozokina. Slednji je selektivni substrat za encim CYP2D6. Od nedavnega pa je na voljo mikromreža DNA za določitev bolnikovega genotipa *CYP2D6* (in *CYP2C19*), na osnovi katerega predvidimo bolnikov fenotip (7).

### 3.1.2.2.2 Gen za citokrom P450 2C19

V genu *CYP2C19* so številni genetski polimorfizmi, ki pomembno določajo stopnjo katalitične aktivnosti izooblik encimov CYP2C19. Frekvenca fenotipa PM za encim CYP2C19 je pri belcih ocenjena na 2-5%, pri orientalcih pa na 20% (2). Trenutno še ni narejene klinične FG študije o vplivu posameznih genetskih polimorfizmov v genu *CYP2C19* na farmakološki odgovor na zdravljenje s SSRI (7).

## 4 Sklep

Število kandidatnih genov in klinično pomembnih genetskih polimorfizmov za napoved uspešnosti zdravljenja depresije s SSRI strmo narašča. Mnoge od dosedanjih kliničnih farmakogenomskih študij so dale nasprotujoče rezultate. Vzroki so verjetno v neenotnih kriterijih za sodelovanje bolnikov v raziskavah, v različnih terapevtskih protokolih, relativno majhnem številu preiskovancev ter v relativno kratkem času spremljanja bolnikov po začetku zdravljenja s SSRI. Kljub temu posamezne genetske različice v smislu značilnih povezav z izidom zdravljenja s SSRI izstopajo. Verjetno bo v prihodnosti vsaj nekatere med njimi mogoče in smiselno upoštevati pri izboru optimalnega zdravljenja za posameznega bolnika. FG informacije bo potrebno vključiti tudi v povzetke glavnih značilnosti zdravila (SmPC-je) ter v navodila za paciente (PIL-e).

Novejše raziskave so odprle tudi vpogled v nekatere nove molekularne mehanizme etiologije depresije in potencialnih možnosti zdravljenja z antidepresivi (21, 22).

## 5 Literatura

1. Kores-Plesničar B. Epidemilogija, etiologija, klinična slika in diagnostika depresije. Farm vestn 2006; 57: 241-244.
2. Serretti A, Artioli P. The pharmacogenomics of selective serotonin reuptake inhibitors. Pharmacogenomics J 2004; 4: 233-244.

3. Nielsen DM. Corticotrophin-releasing factor type-1 receptor antagonists: the next class of antidepressants? Life Sci 2006; 78: 909-919.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Pharmacology. Churchill Livingstone 2007: 712-723.
5. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Limited, 1996: 267-272.
6. Kalow W, Meyer UB, Tyndale RF. Pharmacogenomics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Taylor & Francis Group 2005.
7. Thomas KL, Ellingrod VL. Pharmacogenetics of selective serotonin reuptake inhibitors and associated adverse drug reactions. Pharmacotherapy 2009; 29: 822-831.
8. Arias B, Serretti A, Lorenzi C et al. Analysis of COMT gene (Val 158 Met polymorphism) in the clinical response to SSRIs in depressive patients of European origin. J Affect Disord 2006; 90: 251-256.
9. Illi A, Setälä-Soikkeli E, Kampman O et al. Catechol-O-methyltransferase val108/158met genotype, major depressive disorder and response to selective serotonin reuptake inhibitors in major depressive disorder. Psychiatry Res 2010; 176: 85-87.
10. Kato M, Wakeno M, Okugawa G et al. Antidepressant response and intolerance to SSRI is not influenced by G-protein beta3 subunit gene C825T polymorphism in Japanese major depressive patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2008; 32: 1041-1044.
11. Kato M, Fukuda T, Wakeno M et al. Effect of 5-HT1A gene polymorphisms on antidepressant response in major depressive disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2009; 150B: 115-123.
12. Lesch K, Bengel D, Heils A et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science 1996; 274: 1527-1530.
13. Smeraldi E, Zanardi R, Benedetti F et al. Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. Mol Psychiatry 1998; 3: 508-511.
14. Kaiser R, Müller-Oerlinghausen B, Filler D et al. Correlation between serotonin uptake in human blood platelets with the 44-bp polymorphism and the 17-bp variable number of tandem repeat of the serotonin transporter. Am J Med Genet 2002; 114: 323-328.
15. Baghai TC, Schule C, Zwanzger P et al. Possible influence of the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene on therapeutic outcome in affective disorders. Mol Psychiatry 2001; 6: 258-259.
16. Hong CJ, Wang YC, Tsai SJ. Association study of angiotensin I converting enzyme polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. J Neural Transm 2002; 109: 1209-1214.
17. Licinio J, Wong ML. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. Mol Psychiatry 1999; 4: 317-327.
18. Yu YW, Chen TJ, Hong CJ et al. Association Study of the interleukin-1beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response. Neuropsychopharmacology 2003; 28: 1182-1185.
19. Laje G, Paddock S, Manji H et al. Genetic markers of suicidal ideation emerging during citalopram treatment of major depression. Am J Psychiatry 2007; 164: 1530-1538.
20. Uhr M, Tontsch A, Namendorf C et al. Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. Neuron 2008; 57: 203-209.
21. Garriock HA, Kraft JB, Shyn SI et al. A genome-wide association study of citalopram response in major depressive disorder. Biol Psychiatry 2010; 67: 133-138.
22. Laje G, Perlis RH, Rush AJ et al. Pharmacogenetics studies in STAR\*D: strengths, limitations, and results. Psychiatr Serv 2009; 60: 1446-1457.

# Evropski komite za homeopatijo in smernice za prihodnost

Maruša Hribar

V Bruslju je med 13. – 14. novembrom potekala 7. generalna skupščina Evropskega komiteja za homeopatijo (ECH). Evropski komite združuje zdravnike in zdravnice s specializacijo iz homeopatije ter strokovne in specializirane odbore. Delovanje ECH je razvejano, saj v njegovem okviru delujejo odbori za: Raziskave, Farmacijo, Preizkušanje zdravil, Politiko, Uporabnike in uporabnice, Izobraževanje ter Dokumentacijo. Generalne skupščine se je udeležilo več kot 125 predstavnikov in predstavnic iz 25-ih evropskih držav. Slovenija je sodelovala na skupščini s predstavnico, predsednico Slovenskega farmacevtskega društva – homeopatske sekcije.

Dr. Ton Nicolai, predsednik ECH je poudaril, da se ljudje odločajo za homeopatsko zdravljenje zaradi njenega celostnega pristopa, cenovne ugodnosti in varnosti: 'Danes se prebivalci in prebivalke Evrope zavedajo odgovornosti za svoje zdravje in za svoje življenje. Pomoč v homeopatiji poiščejo takrat, ko jim običajno zdravljenje ne nudi zadovoljivih rezultatov, poleg tega so zaskrbljeni zaradi stranskih učinkov nekaterih zdravil. Izbira homeopatije zrcali njihove vrednote in filozofsko naravnost k celostnemu dojetju življenja in zdravja'.

ECH se v svojem delovanju zavzema za: znanstveni razvoj homeopatije; zagotavljanje visokih standardov v izobraževanju in prakticanju homeopatskih zdravnikov in zdravnic; harmonizacijo profesionalnih standardov v homeopatski praksi po vsej Evropi; zagotavljanje visoko kakovostne homeopatske obravnave v varnem okolju zdravstva; integracijo visoko kakovostne homeopatije v evropsko zdravstvo. ECH ima pomembno vlogo tudi pri usklajevanju lokalne zakonodaje različnih evropskih držav z zakonodajo Evropske unije. V ta okvir sodijo tudi zakonske regulacije s področja Komplementarne in alternativne medicine (CAM) v Evropi. ECH ocenjuje, da je v evropskem prostoru okvirno 45.000 zdravnikov in zdravnic, ki so se dodatno izobraževali iz področja homeopatije kot specifičnega načina zdravljenja. Zato tudi veliko število zdravnikov in zdravnic predpisuje homeopatska zdravila.

Ne le zdravniška stroka, temveč predvsem prebivalci in prebivalke Evropske skupnosti želijo posegati po homeopatskih zdravilih. Zato si želijo tudi primerne umestitve homeopatije v zdravstveni sistem. Na področju izobraževanja in ozaveščanja o homeopatiji sodelujejo na evropskem področju številne institucije, kot je na primer CAMbella in različne nevladne organizacije. Specifični pristop celostnih zdravljenj in homeopatije je spodbujanje samo-ozdravitvenih procesov v človeku. Šele v primeru, ko takšen postopek zdravljenja ne deluje, ker v večini primerov je uspešen, se posega po močnejših zdravilih. Na ta način se lahko zdravstvo izogne stroškom, ki jih zahtevajo kompleksni posegi in zmanjševanje stranskih učinkov. Celostni pristopi zdravljenja

so primarno usmerjeni v izboljšanje zdravja in preventivo in ne zmanjševanje že nastalih obolenj. Komplementarna in alternativna medicina je izbira milijonov prebivalcev in prebivalk v Evropski skupnosti, zato ima velik potencial, da humanizira pristope sodobne medicine in njeno pojmovanje zdravja in dobrega počutja (*well-being*) v najširšem pomenu.

Odbor za farmacijo ECH ima naslednje cilje in naloge: zagotovitev homeopatskih zdravil na tržišču; odgovornost za nomenklaturu homeopatskih zdravil; sodelovanje pri farmakopejskih monografijah in zakonodaji; izobraževanja za farmacevte in farmacevte; izdelava homeopatskih zdravil po dobri homeopatski praksi; ozaveščanje javnosti z informiranjem; aktivna farmacevtska skrb (*pharmaceutical care*) podkrepljena z nasveti in spremljanje poteka zdravljenja.

Na novo izvoljena predstavnica farmacevtskega odbora ECH gospa Gema Pons iz Španije je poudarila vlogo farmacevtov v homeopatiji na treh nivojih: dostopnost homeopatskih zdravil; zakonodaja in harmoniziranje lokalne zakonodaje z evropsko; poudarila je tudi vlogo izobraževanja farmacevtov. Udeleženi in udeležene smo proučili različne programe izobraževanja za farmacevte iz številnih evropskih držav. Tudi Slovenija je predstavila svoj program izobraževanja farmacevtov. Predstavniki odbora za farmacijo smo predlagali evropske smernice za izobraževanje farmacevtov (*Guidelines for pharmacist*). Pdane predloge bo preučil odbor za izobraževanje.

V okviru ECH deluje tudi odbor na področju sodelovanja z uporabniki in uporabnicami homeopatije (European Federation of Homeopathic Patients' Associations), kamor so vključena združenja uporabnikov in uporabnic homeopatskih zdravil. Delovanje tega odbora predstavlja pomemben vidik delovanja ECH, saj je ključnega pomena, da v dialogu, razvoju in osveščanju o homeopatiji sodelujejo vsi dejavniki civilne družbe – tako stroka kot nevladne organizacije in zainteresirana javnost. Samo na ta način bo lahko zastopana pluralnost različnih potreb in usmeritev znotraj celostnega homeopatskega zdravljenja. V Bruslju je delovanje tega odbora prevzela Angležinja gospa Emma Segall.

Nedavna generalna skupščina je odprla še eno pomembno vprašanje - dr. Yves Maile je poudaril pomembnost izobraževanja in potrebo po dialogu med klasičnimi homeopatskimi šolami in pluralističnim pristopom homeopatskega zdravljenja, ki predpisuje več homeopatskih zdravil hkrati.

Evropsko srečanje se je zaključilo s povabilom na evropski homeopatski kongres *Homeopathy between Art and Science*, ki bo potekal med 18. – 21. majem, 2011 v glavnem mestu Latvije, v Rigi ([www.homeopathy2011.org](http://www.homeopathy2011.org)).

# 7<sup>th</sup> EPSA Autumn Assembly

## Helsinki, Finska - 25. - 30. Oktober 2010

Katja Srpan

7. EPSA jesenska skupščina, drugi najpomembnejši EPSA dogodek leta, je potekal med 25. in 30. oktobrom v Helsinkih na Finskem. Približno 250 evropskih študentov farmacije se je zbralo v eni izmed najbolj severnih in hladnih prestolnic Evrope.

Kongres se je začel s sestankom predstavnikov držav članic (Liaison Secretaries) in članov EPSA tima, ki so na kratko predstavili delovanje organizacije. Sledil je slovesni sprejem v mestni hiši, družabni del pa se je nadaljeval v klubu "Butterfly Club", kjer smo imeli priložnost za ples in sprostitvev.



Zbor YFK (Yliopiston farmasiakunta)

Prvi dan konference je potekalo izobraževanje na temo podjetništva. Med predavatelji so bili mag. Aurélie Vandeputte (Evropska komisija - Generalni direktorat za podjetništvo in industrijo), dr. Barrie Kellam (Univerza v Nottinghamu), dr. Jo Klaveness (Univerza v Oslu), dr. Diogo Cruz (HolonGroup), Lorenz Hartung (Univerza v Münchnu), Mikko Veräjänkorva (Farenta) in Aku-Ville Lehtimäki (Aalto podjetništvo



Med izobraževalnoim delom konference

Society). Program kongresa je zajemal tudi delavnice in izobraževanja o različnih temah z namenom poučiti študente o podjetniški karieri.

Tretji dan kongresa je potekala 40. EPSA generalna skupščina, kjer so članice ocenile delo EPSA tima. K dosedanjim članicam se je priključila tudi nova in sicer AISFA (Associazione Italiana di Studenti Farmacia) iz Italije.



40<sup>th</sup> EPSA Generalna skupščina

V okviru kongresa so člani EPSA tima in uradni delegati članic obiskali sedež Združenja finskih Lekarn (AFP). Dr. Erkki Kostianen (direktor za komunikacije v AFP) in John Chave (generalni sekretar v PGEU) pa sta svoji združenji predstavila in odgovorila na vprašanja študentov.



Dr Erkki Kostiane s člani EPSA tima



*John Chave med predstavitvijo PGEU (Pharmaceutical Group of European Union)*

Kongres se je zaključil z gala večerjo, z zaključnim govorom vodje organizacijskega odbora, Inkatuuli Heikkinen in Anette Krokaas predsednice EPSA.



*Britanska in romunska delegacija na gala večerji*

Helsinki smo vsi zapustili z lepimi spomini in v pričakovanju naslednjega EPSA kongresa aprila 2011 v Lizboni.

# 50-letnica celovitega študija farmacije v Sloveniji

V četrtek, 2. decembra 2010 je potekala slovesnost ob 50-letnici celovitega študija farmacije v Sloveniji.

Uvodoma je goste pozdravili dekan Fakultete za farmacijo, prof. dr. Stanislav Gobec, ki je poudaril, da Fakulteta za farmacijo danes ponuja atraktivne, sodobne in poglobljene študijske programe, na katere se vpisujejo najboljši študenti, hkrati pa visoko strokovnost zaposlenih kažejo tudi rezultati raziskovalnega dela, tako na področju osnovnih kot aplikativnih raziskav z več kot 100 članki in 2.000 citati letno. S preko 50 patenti, podeljenimi za izume, pa fakulteta pomembno vpliva na kakovost in vitalnost naše farmacevtske industrije in farmacevtske stroke. Rektor Univerze v Ljubljani, prof. dr. Radovan Stanislav Pejovnik je izpostavil številna priznanja, ki jih prejemajo tako zaposleni, kot študentje ter sodelovanje z gospodarstvom, ki je lahko vzor ostalim fakultetam.

Slovesnost ob 50-letnici celovitega študija farmacije v Sloveniji je s svojo prisotnostjo počastil predsednik Državnega zbora Republike Slovenije dr. Pavel Gantar. V slavnostnem govoru se je med drugim dotaknil lekarniške stroke, za katero je značilno, da je kadrovsko podhranjena, zaradi česar so lekarniški farmacevti bistveno bolj obremenjeni kot njihovi kolegi v drugih državah EU.

Fakulteta za farmacijo se je s priznanji zahvalila posameznikom, podjetjem in ustanovam za njihov doprinos k prepoznavnosti in mednarodni uveljavljenosti fakultete ter za sodelovanje na strokovnem področju. Za razvoj fakultete in njenih študijskih programov sta priznanje prejela dolgoletna sodelavca fakultete *prof. dr. Jana Lukač Bajalo* in *prof. dr. Slavko Pečar*. V imenu dveh največjih farmacevtskih

podjetij v Sloveniji *Krke d.d. in Leka d.d.* pa sta priznanje za podporo pri razvoju fakultete in sodelovanje na strokovnem področju prevzela predsednik uprave in generalni direktor gospod Jože Colarič in predsednik uprave magister Vojmir Urlep. Za številne aktivnosti v slovenskem in mednarodnem prostoru so priznanje za prispevek k prepoznavnosti fakultete prejele tudi *štiri organizacije študentov farmacevtov*

Priznanje za sodelovanje na strokovnem področju in prispevek k prepoznavnosti fakultete je Fakulteta za farmacijo podelila tudi Slovenskemu farmacevtskemu društvu z utemeljivijo:

*Slovensko farmacevtsko društvo kot najširša povezovalna in krovna skupnost znotraj naše stroke opravlja pomembno poslanstvo pri zagotavljanju visokega strokovnega nivoja in ugleda farmacije pri nas, zelo pomembne so tudi aktivnosti društva pri mednarodni uveljavitvi slovenske farmacije. Odnos med Slovenskim farmacevtskim društvom in Fakulteto za farmacijo presega zgolj plodno sodelovanje dveh stanovskih inštitucij, saj lahko govorimo o soodvisnosti oziroma prepletu skupnih strokovnih in operativnih interesov ter nalog, ki se izražajo v doseganju odličnosti pri izvajanju številnih, za stroko izjemno pomembnih in odmevnih projektov.*

*Ob današnjem praznovanju zato Slovenskemu farmacevtskemu društvu izrekamo iskreno zahvalo in mu z velikim veseljem podeljujemo zaslužen priznanje. Želimo si, da bi tudi v prihodnje, tako kot do sedaj skupaj sooblikovali našo prihodnost ter skrbeli za naš ugled in prepoznavnost.*



**Slika 1:** Dekan Fakultete za farmacijo je izročil priznanje predsedniku Slovenskega farmacevtskega društva.



**Slika 2:** Prejemniki priznanj ob 50-letnici Fakultete za farmacijo s predsednikom Državnega zbora, dr. Gantarjem, rektorjem Univerze v Ljubljani, prof. Pejovnikom, prorektorico Univerze v Ljubljani, prof. Kristl in dekanom Fakultete za farmacijo, prof. Gobcem



# Novosti iz sveta farmacije

## Razvoj treh novih zdravil proti debelosti: ali bodo pozitivni učinki prevladali nad varnostjo?

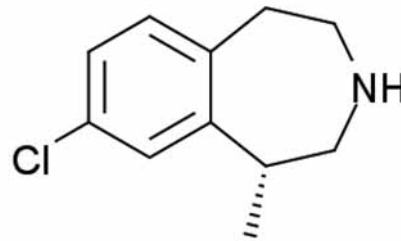
Prof.dr. Borut Štrukelj

V razvitem svetu, predvsem pa v ZDA, smo v zadnjem desetletju priča pravi pandemiji debelosti, saj je trenutno 74 odstotkov odraslih Američanov s prekomerno telesno maso (BMI: 25-30) oziroma predebelih (BMI 30 in več). Tudi odstotek mladostnikov in otrok s telesno težo nad normalno se naglo povečuje in je bil leta 2009 že 23%. Vzrokov je več, a nekako so si strokovnjaki edini, da so poglaviti vzroki prevelik vnos kalorij, ki izhajajo iz ogljikovih hidratov in predvsem enostavnih sladkorjev (fruktoza, glukoza, saharoza), prevelika količina hrane v obroku, premalo gibanja in procesirana hrana, ki se izjemno hitro razgradi do osnovnih gradnikov in absorbira iz lumna črevesja v telo. Poleg tega predstavlja hrana vedno bolj način potešitve stresnih situacij in neke vrste nagrada, zato se v razvoju novih učinkovin vedno bolj poudarja sociološko psihološki del pri nastanku debelosti. Podobno stanje, kot je v ZDA, je tudi v nekaterih drugih državah v razvitem svetu, debelost pa ni neznana tudi na Kitajskem, Indiji in nekaterih drugih razvijajočih državah. Zato ni presenetljivo, da sodobna farmacevtska industrija usmerja veliko sredstev v razvoj novih učinkovin, ki bi lahko neposredno ali posredno vplivala na zmanjšanje telesne mase. Obenem pa se raziskovalci zavedajo relativnega neuspeha v preteklosti, ko so takratne nove zdravilne učinkovine veliko obetale, pa so se vse po vrsti izkazale za neučinkovite ali pa so izkazovale preveč neželenih stranskih učinkov. Tako so v zgodnjih 60-ih letih veliko pričakovali od amfetaminov, a so se kasneje izkazali za močne psihometike s potenciranim adreneričnim delovanjem. Prav tako je neslavno propadla kombinacija dveh učinkovin: fenfluramin in fentermin, saj se je izkazalo, da lahko povzroči okvaro srčnih zaklopk. 16. januarja 2009 je EMA izdala negativno mnenje o učinkovini rimonabantu, kot selektivnem agonistu kanabinoidnih receptorjev zaradi večje verjetnosti razvoja depresij in nagnjenosti k samomorom, zadnji neuspeh pa predstavlja sibutramin, ki ga je EMA junija 2010 odsvetovala zaradi verjetnosti nastanka nenadnega srčnega infarkta oziroma kapi.

Edina učinkovina, ki se trži kot zdravilo na recept, oziroma v nižjem odmerku kot zdravilo brez recepta, je orlistat, katerega neželjene učinke povezujejo z gastrointestinalnimi motnjami, v redkih primerih pa z negativnim vplivom na jetrno funkcijo. Zaradi socio-psihološkega vpliva na razvoj debelosti trenutno potekajo končne raziskave na treh učinkovinah oziroma njihovih kombinacijah. Tako je družba Orexigen iz ZDA razvila kombinacijo dveh znanih učinkovin naltreksona in bupropiona, ki naj bi zmanjševale telesno maso zaradi zmanjšanja apetita in povečanja metabolizma. Zanimiv učinek kombinacije obeh

učinkovin je tudi zmanjševanje želje po nenadnem obroku oziroma po specifični hrani, prav tako pa vpliv obeh učinkovin zmanjšuje aktivnost tistega dela možgan, ki povezujejo hrano z užitek in nagrado.

Druga učinkovina v razvoju je lorkaserin (slika1), ki je sicer dobil dovoljenje za promet v ZDA septembra 2010, a je FDA 23. oktobra 2010 izdalo začasno negativno mnenje zaradi izsledkov na živalskih modelih. Ugotovili so, da se je po vnosu lorkaserina v odmerku nad 20 mg/kg telesne mase, povečal nastanek tumorjev v eksperimentalnih živalskih modelih. Lorkaserin, ki ga uvrščamo med benzodiazepine, bi lahko negativno vplival tudi na srčnožilni splet, predvsem zaradi velike strukturne podobnosti z deksfenfluraminom, ki je bil razvit kot anorektična učinkovina, a je izkazovala kardiotoksične učinke. Lorkaserin je selektivni agonist serotoninskih 5HT receptorjev: Aktivacija teh receptorskih mest vodi do aktivacije proopiomelanocortina (POMC), ki posredno zmanjšuje telesno maso zaradi občutka sitosti in majhnega apetita. FDA sicer spodbuja farmacevtsko družbo Arena Pharmaceuticals, naj nadaljuje z razvojem in hkratnim budnim spremljanjem neželenih učinkov.



Slika 1: Strukturna formula lorkaserina

Zadnja od treh učinkovin oziroma kombinacij učinkovin je Qnexa, kjer gre zopet za kombinacijo dveh znanih učinkovin z novo indikacijo. Farmacevtska družba Vivus Inc je namreč testirala kombinacijo topiramata in fentermina. Obe znani učinkovini povzročata zmanjšanje apetita in želje po hrani. Ideja družbe Vivus je, da naj bi kombinacija z manjšimi odmerki obeh učinkovin zmanjšala neželjene učinke, ki so jih opazili, a povečala anoreksično delovanje. Po večkratni dopolnitvi vloge za dovoljenje za promet z zdravilom Qnexa, je skupina za varnost pri FDA 28.oktobra 2010 izdala trenutno negativno mnenje, a prav tako pozvala farmacevtsko družbo Vivus Inc k nadaljnjemu razvoju in spremljanju neželenih učinkov, povezanih predvsem z nastankom depresije in teratogenosti.

To mnenje FDA je presenetilo strokovno javnost. Zaradi izjemno visokih kriterijev glede varnosti novih učinkovin namreč opažamo nov trend pri razvoju novih zdravil, ki obsega razvoj kombinacij sicer znanih in preizkušenih zdravilnih učinkovin za nove terapevtske indikacije. Farmacevtska podjetja namreč tako poskušajo uporabiti že znane farmakoepidemiološke podatke o učinkovinah, ki so že dolgo na tržišču. Če zmanjšajo odmerke teh učinkovin v novo razvijajočem se

zdravilu, bi morali s strališča varnosti dobiti vsaj enako dobre, če že ne boljše rezultate, kot veljajo za že registrirana zdravila z učinkovinami, ki so v kombinaciji novega zdravila. V kolikor ne gre za sinergistični neželeni učinek, si lahko trenutno negativno mnenje skupine za varnost razlagamo kot dejstvo, da je vprašljiva varnost nekaterih registriranih zdravil, ki so na tržišču že nekaj let.

Vir: *Scientific American*, September 2010

### **Bakterijska rezistenca proti antibiotikom: revolucionarno novo odkritje odpira možnosti razvoja novih protimikrobnih učinkovin**

Prof.dr. Borut Štrukelj

Raziskovalna skupina na medicinskem inštitutu Howard Hughes v Bostonu je v septembski številki revije *Nature*, ki sodi med najprestižnejše raziskovalne znanstvene publikacije, objavila presenetljivo odkritje v zvezi z mehanizmom rezistence proti antibiotikom. Preučevali so različne oblike nastanka bakterijske odpornosti proti antibiotikom in ugotovili, da je velikokrat kolonija bakterije *E. coli* odporna proti ampicilinu, ko pa osamimo posamezne bakterije in jih ponovno prenesemo na gojišče z antibiotikom, le te niso več odporne in ne zrastejo. Z večkratnim precepljanjem kolonij *E. coli* na gojišča brez antibiotika in z antibiotikom so ugotovili, da je odporna le manjša skupina bakterij, ki tvori neko kolonijo. Te posamezne bakterije se v gručah združijo v zaščitno plast, ki obda nerezistentne bakterije znotraj kolonije, ki jih je nekajtisočkrat več. Tako se rezistentne bakterije, skupaj z nerezistentnimi obnašajo v okolju z antibiotikom kot večcelični organizem, ki ima že diferencirane funkcije. Ko so raziskovalci pod vodstvom prof. Jamesa Collinsa ugotavljali, kakšen je molekularni mehanizem nastanka odpornosti, so ugotovili, da rezistentne bakterije sintetizirajo veliko količino indola, ki ga pridobijo

z encimsko deaminacijo z encimi iz družine triptofanaz, ki sintetizirajo indol iz aminokisliline triptofana. V genomu bakterij, ki so odporne, so našli bistveno več kopij omenjenega encima. Indol sicer upočasni rast odpornih bakterij, ki se »žrtvujejo« za dobro rast kolonije. Indol deluje v bakteriji na aktivacijo mehanizma za izločanje ksenobiotikov in povečuje selektivno prepustnost bakterijske membrane. Odkritje vodi do začetkov iskanja novih antimikrobnih učinkovin, ki bi delovale kot antagonisti indola ali pa inhibitorji bakterijskih triptofanaz, ki jih imajo nekatere vrste bakterij.

Vir: *Nature*, 467, 82-85 (2. september 2010)

### **Vigor-25: še en ponaredek s sildenafilom**

Prof.dr. Borut Štrukelj

NA internetnih straneh po celem svetu, predvsem pa na Nizozemskem, Veliki Britaniji in ZDA, se je pojavila spletna stran podjetja **Piston Corp**, ki spodbuja k nakupu »naravnega spolnega stimulant za moške«, ki naj bi bil še močnejši kot je Viagra, a hkrati narejen iz naravnih rastlinskih izvlečkov. Produkt so imenovali **Vigor-25**. Ker je pri uporabi tega proizvoda prišlo do zabeleženih več nenadnih srčnih dogodkov in smrti sicer zdravega šestindvajsetletnika, ki je použil trikratni priporočeni odmerek tablet **Vigor-25**, je FDA naročila analizo vsebnosti proizvoda in ugotovila, da poleg nekaterih rastlinskih izvlečkov tudi sildenafil v višjem odmerku kot je v originalnem zdravilu z največjo jakostjo. Posebna nevarnost preži v reklamiranju izdelka, saj lahko po njem posežejo tudi bolniki, ki sicer uživajo nitroglicerinske pripravke, misleč, da gre za nenevaren naravni izdelek.

Žal je na internetnih straneh, ki beležijo izjemen porast v trženju različnih zdravil in ostalih zdravju namenjenih proizvodov, še veliko podobnih primerov, ki jih bo potrebno najti in primerno sankcionirati.

Vir: **FDA Press Release : 19. november 2010**

## *Spoštovani recenzenti!*

*V imenu uredništva Farmacevtskega vestnika  
se vam želim ob koncu leta 2010 zahvaliti za sodelovanje.*

*V prihajajočem letu pa vam želimo veliko zdravja,  
novih delovnih vnm ter osebnih uspehov.*

*V upanju, da bomo še tako dobro sodelovali  
in naš/vaš Farmacevtski vestnik še izboljšali.*

*Naj izkoristim še priložnost in želje izrečem tudi vam dragi bralci,  
brez vas bi bil seveda ves naš trud zaman.*

*Z lepimi željami,  
Petra Slanc Može  
glavna urednica*

### Recenzenti:

izr. prof. dr. Saša Baumgartner • dr. Aleš Berlec • prof. dr. Borut Božič • doc. dr. Tomaž Bratkovič  
dr. Mateja Cegnar • dr. Andreja Čufar • izr. prof. dr. Vladka Čurin Šerbec • dr. Nataša Faganeli  
prof. dr. Mirjana Gašperlin • Igor Glavač, mag. farm. • prof. dr. Nataša Ihan Hren • dr. Tomaž Miha Jaklič  
doc. dr. Damjan Janeš • doc. dr. Matjaž Jeras • dr. Javor Kac • izr. prof. dr. Janez Kerč • asist. dr. Petra Kocbek  
dr. Klemen Kočevar • dr. Nina Kočevar Glavač • doc. dr. Nataša Kopitar Jerala  
doc. dr. Mitja Kos • dr. Metka Krašna • prof. dr. Aleš Krbavčič • prof. dr. Samo Kreft • dr. Katjuša Kreft  
prof. dr. Julijana Kristl • izr. prof. dr. Mojca Kržan Limpel • prof. dr. Tamara Lah • doc. dr. Mojca Lunder  
dr. Gašper Marc • izr. prof. dr. Janja Marc • prim. Martin Možina • prof. dr. Sonja Možina Smole  
dr. Srdjan Novaković • doc. dr. Nataša Obermajer • izr. prof. dr. Aleš Obreza  
doc. dr. Barbara Ostanek • dr. Matej Pavli • prof. dr. Slavko Pečar • izr. prof. dr. Odon Planinšek  
dr. Petra Slanc Može • Janika Slanc Vovk, spec. klin. farm. • asist. dr. Larisa Stojanovič • prof. dr. Borut Štrukelj  
dr. Urban Švajger • dr. Rihard Trebše • mag. Katarina Verhnjak • izr. prof. dr. Franc Vrečer • doc. dr. Anamarija Zega

# Liani – Bebi Mlinar (1936–2010)

## Magistri farmacije v slovo



*»Nič ni tako dragoceno  
kot tisti del tebe,  
ki je v drugih,  
in tisti del drugih,  
ki je v tebi.  
Tam zgoraj, visoko gori,  
je vse eno.«*

*P.T. de Chardin*

11. novembra popoldne je na poti iz celjske bolnišnice skoraj pred domačim pragom preminila naša kolegica Beba Mlinar za posledicami težke srčne bolezni, ki je bila kljub velikemu napredku sodobne medicine neozdravljiva.

Kolegica Beba se je rodila v Ljubljani v glasbeni družini Gregorc. Po maturi na poljanski gimnaziji se je vpisala na študij farmacije v Ljubljani in ga po končanem drugem letniku nadaljevala na Farmaceutski fakulteti v Zagrebu, kjer je leta 1964 diplomirala. Želja, da bi dobila trajno zaposlitev v domači Ljubljani se ji ni uresničila. Po krajšem službovanju na Inštitutu Borisa Kidriča, jo je poklicna pot pripeljala v Lekarno Center Celje, kjer je spoznala svojega bodočega soproga Toneta Mlinar, mag. farm., s katerim sta si spletla družinsko gnezdo v Celju. Tako je ostala v Celju. Svoje strokovne moči je posvetila organizaciji in vodenju galenskega laboratorija, ki je bil ustanovljen za potrebe lekarniških enot Celjskih lekarn v sklopu Lekarne Center in ga uspešno vodila vse do svoje upokojitve leta 1999. Farmacevti njene generacije so si izredno prizadevali za odpiranje galenskih laboratorijev in za sprejem pravilnika o specializacijah magistrstov farmacije. Napredek in novi predpisi na področju izdelave galenskih izdelkov so terjali dodatno strokovno izobraževanje. Zato je zaprosila za odobritev specializacije iz oblikovanja zdravil. Predpostavljeni so njeno prošnjo zavrnilo z obrazložitvijo, da specialist za delo v galenskem laboratoriju ni potreben in naj si specializacijo plača sama. Ta odločitev jo je zelo prizadela. Vzpostavila in ohranjala pa je stike s svojimi nekdanjimi študijskimi kolegi, kasnejšimi specialisti v Novi Gorici, Murski Soboti, Ljubljani, Mariboru in Kranju, ki so ji nesebično pomagali z nasveti in praktičnimi izkušnjami pri opremljanju laboratorija in tehnoloških postopkih. Tedaj je bil čas, ko je bilo zelo težko priti do potrebnih deviz. Danes pa je težko priti do informacij, ker so prave informacije ob pravem času konkurenčna prednost. Njeno dolgoletno prizadevanje in organizacijske sposobnosti so obrodili sadove, danes v sklopu Celjskih lekarn deluje verificiran sodobno opremljen galenski laboratorij, ki ga vodi specialistka iz oblikovanja zdravil, kakovost

izdelkov pa preverja kontrolno analni laboratorij, ki ga vodi specialist iz preizkušanja zdravil.

Kolegica Beba je bila po značaju realist in borec v človeški podobi. Ni se ustrašila preprek, načrtovala je in uspešno izvajala tako v poklicnem kot v zasebnem življenju. Pokončno in brez tarnanja je prenesla tudi krute udarce usode, ki ji je v najlepši mladosti uplenila sina Jorgija. Bolečine ni kazala navzven, le redkim se je razkrila in le redki so dojeli, kako trpi. Leporečja in vpludnega besedičenja ni prenašala, v debatah je imela rada odkrite dialoge brez parafraziranja, ki je tako zelo prisoten v sodobni družbi. Ljubila je svoj poklic farmacevtke, ki ga je vestno in odgovorno opravljala polnih 35 let. Redno se je udeleževala mesečnih strokovnih predavanj v okviru Celjske podružnice SFD. Upokojene kolegice so se kot » stara klapa iz Evrope » mesečno družile in srečevale v kavarni celjskega hotela Evropa. Organizatorica magistra Vera Gašperšič jih je znala navdušiti in povezati in Beba je nizala vtise s svojih potovanj. Bila je iskriča, iskrena, dobronamerna. Ni obremenjevala s svojimi problemi. Kot prva med njimi je odšla onstran. Za vedno. Pogrešale jo bodo.

Kako različne so človeške usode. Večina ne razmišlja o zadnjem dejanju življenja, kolegica Beba pa se je izredno pogumno in junaško soočala s hitro napredujočo mučno boleznijo. Hudo ji je bilo ob zadnjem obisku sina in njegove družine, saj se je zavedala, da se verjetno poslavljajo za vedno. Bebin oče, slovenski skladatelj Janko Gregorc je napisal glasbo za opereto Melodije srca. Človeško srce poje ubrane melodije, odvisno od spremljave in hrepeni po lepoti, uresničenosti do zadnjega utripa. Ritmično in ubrano, kot v glasbi – do zadnjega akorda, ko dirigent dvigne taktirko. Potem nastopi aplavz in tišina.

*»Ko je listje zašelestelo in rožice ovenele, zlato srce je onemelo.  
Tiha misel zablestela pred večernim krajem,  
duša odblestela z zlatim je sijajem.  
Tiha – kam odšla je duša zastrmela,  
kakor da je ptica večer preletela.«*

*S. Kosovel*

Počivaj v miru Beba! Hvala za vse, kar si bila in nam dala.

Na cilj – družinski grob na Plečnikovih Žalah smo te pospremili sorodniki, sošolci, sodelavci in prijatelji. Ob svojih sanjah o daljnih svetovih, v krajih, kjer vlada dobro in se ne godi zlo. Veter, ki bo vel nad tvojim grobom, ti bo prinašal naše pozdrave.

novembra 2010

*Marija Brenčič mag. farm., spec.  
Slavko Rataj, mag. farm., spec.*

# Farmacevtski vestnik

## Letnik 61, 2010 - Letno kazalo

### Pregledni znanstveni članki

Fotodinamično zdravljenje raka (Rojnik M, Kos J)	9	Generično predpisovanje zdravil (Fürst J)	122
Gensko zdravljenje raka (Kočevar N, Čemažar M)	14	Zdravniki družinske medicine in generično predpisovanje zdravil (Poplas Susič T)	124
Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov (Resnik M, Kerč J)	23	Vloga lekarniškega farmacevta pri generičnem predpisovanju zdravil (Čufar A)	127
Kokristali zdravilnih učinkovin (Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F)	30	Vpliv uvedbe sistema zamenljivih zdravil na bolnike - izkušnje bolnikov (Krapež M)	130
Vloga silicijevih spojin v živih organizmih (Hrast M, Obreza A)	37	Slovenska javna banka popkovnične krvi (Krašna M, Jazbec J, Černelč P, Domanovi D)	139
Matične celice iz maščobnega tkiva in njihova uporaba (Barlič A, Božikov K)	42	Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini (Černe D)	144
Depresija in bolečina (Kores Plesničar B)	59	Avtoimunost - mehanizmi in pomen redoks procesov (Omersel J, Božič B)	149
Celostni vidik anksioznosti (Zalar B)	63	Primerjava in razvoj naprav za oblaganje delcev (Luštrik M, Dreu R, Srčič S)	155
Pregled zdravilnih učinkovin za zdravljenje depresije (Anderluh M)	66	»In vitro-in vivo« korelacija (IVIVC) za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sproščanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali absorbirajo s prenašalci v prebavilih (Klančar U, Legen I, Kristl A, Mrhar A)	162
Pregled zdravilnih učinkovin za zdravljenje anksioznosti (Anderluh M)	73	Farmakološki učinki česnovih pripravkov in njihove interakcije z zdravilnimi učinkovinami (Berginc K, Kristl A)	171
Vloga kliničnega farmacevta pri zdravljenju duševnih motenj v bolnišnici (Tršinar M)	78	Hidrogelne obloge za vlažno celjenje ran s proteinsko učinkovino (Rošic R, Kristl J, Baumgartner S)	187
Interakcije z zdravili za zdravljenje duševnih motenj (Premuš Marušič A)	86	Uporaba orodij računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic (Perdih A, Kotnik M, Oblak M, Šolmajer T)	195
Farmacevtska skrb pri duševnih boleznih (Ignatov N, Abram T)	91	Nova generacija tehnik določanje nukleotidnega zaporedja: korak k osebni medicini (Berlec A, Štrukelj B)	203
Uravnavanje telesne mase (Lunder M)	95	Farmakopejske in sodobne analizne metode za proučevanje antibiotikov in njihovih zaostankov v bioloških vzorcih (Devjak Novak S)	209
Učinkovine za zmanjševanje čezmerne telesne mase in debelosti (Kikelj D)	101	Fiziološke posebnosti starostnikov in njihov vpliv na terapijo z zdravili (Vovk T)	221
Sodobni vidiki in načini zdravljenja motenj hranjenja (Serbec K)	106	Opozorilni simptomi in znaki nekaterih resnih obolenj (Drešček M, Klemenc-Ketiš Z)	227
Motnje hranjenja in avtoagresivnosti (Mrevlje V. G)	110		
Nefarmakološki pristop pri zdravljenju motenj hranjenja (Copak M, Uzman S)	113		
Vloga lekarniškega farmacevta pri obvladovanju čezmerne telesne mase (Cvirn Novak M, Mrhar A)	117		

Potencialno neustrezne terapije z zdravili pri starostnikih (Zorin T)	232
Medsebojno delovanje zdravil pri starostnikih (Trontelj J)	237
Komunikacija s starostniki v lekarni (Kobal Grum D, Rus V.S, Marčič R)	24
Paliativna oskrba bolnika in sodelovanje s svojci v luči interpersonalnih odnosov (Debeljak A)	254
Farmakogenomika Selektivnih Zaviralcev Prizvema Serotonina (Ferk P)	289

### Izvirni znanstveni članki

Navade slovenskih starostnikov pri uporabi zdravil (Pisk N)	213
Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu (Bogovič Matijašič B, Zorič Peternel M, Rogelj I)	263

Spontano poročanje neželenih učinkov: odnos in praksa zdravstvenih delavcev in distributerjev v Jugovzhodni Evropi (Kozamernik B)	271
Proučevanje razkužilnega učinka ozona na planktonske in biofilmske mikroorganizme v prečiščeni vodi v dinamičnem laboratorijskem in industrijskem okolju (Florjanič M, Kristl J)	282

<i>Zanimivosti iz stroke</i>	177, 295
------------------------------	----------

<i>Društvene novice</i>	3, 179, 300
-------------------------	-------------

<i>Novosti iz sveta farmacije</i>	298
-----------------------------------	-----

<i>Osebne vesti</i>	302
---------------------	-----

## Farmaceutski vestnik Volume 61, 2010 - Content

### Review scientific articles

Photodynamic therapy of cancer (Rojnik M, Kos J)	9
Cancer gene therapy (Kočevar N, Čemažar M)	14
Microbiological quality of pharmaceutical products (Resnik M, Kerč J)	23
Co-crystals of active pharmaceutical ingredients (Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F)	30
The role of silicon compounds in living organisms (Hrast M, Obreza A)	37
Stem cells from adipose tissue and their use (Barlič A, Božikov K)	42
Depression and pain (Kores Plesničar B)	59
Comprehensive anxiety (Zalar B)	63
Drugs for the treatment of depression (Anderluh M)	66
Drugs for the treatment of anxiety (Anderluh M)	73
The role of the clinical pharmacist in hospital departments in the treatment of mental disorders (Tršinar M)	78

Drug Interactions with drugs used to treat mental disorders (Premuš Marušič A)	86
Farmaceutska skrb pri duševnih boleznih (Ignatov N, Abram T)	91
Regulation of body weight (Lunder M)	95
Drugs for treatment of overweight and obesity (Kikelj D)	101
New aspects in the treatment of eating disorders (Serbec K)	106
Motnje hranjenja in avtoagresivnosti (Mrevlje V. G)	110
Non-pharmacological approach in the treatment of eating disorders (Copak M, Uzman S)	113
Community pharmacist's contribution to overweight management (Cvirn Novak M, Mrhar A)	117
Generično predpisovanje zdravil (Fürst J)	122
Family physicians and generic prescribing of drugs (Poplas Susič T)	124
The role of the community pharmacist in the generic prescribing of medicines (Čufar A)	127

Vpliv uvedbe sistema zamenljivih zdravil na bolnike - izkušnje bolnikov (Krapež M)	130	Warning signs and symptoms of potentially serious medical conditions (Drešček M, Klemenc-Ketiš Z)	227
Slovenian public cord blood bank (Krašna M, Jazbec J, Černelč P, Domanović D)	139	Potentially inappropriate drug therapy in elderly (Zorin T)	232
Contemporary use of cell-free nucleic acids analysis in laboratory medicine (Černe D)	144	Drug drug interactions in the elderly (Trontelj J)	237
Autoimmunity - mechanisms and significance of redox processes (Omersel J, Božič B)	149	Communication with the elderly in the pharmacy (Kobal Grum D, Rus V.S, Marčič R)	24
Comparison and development of particle coating devices (Luštrik M, Dreu R, Srčič S)	155	Patient palliative care and cooperation with relatives in the light of interpersonal relationships (Debeljak A)	254
In vitro in vivo correlation (IVIVC) for drugs in extended release formulations which are extensively metabolized or absorbed with transporters (Klančar U, Legen I, Kristl A, Mrhar A)	162	Farmakogenomika Selektivnih Zaviralcev Privzema Serotonina (Ferk P)	289
The pharmacological effects of garlic supplements and their interactions with prescribed therapy (Berginc K, Kristl A)	171	<i>Original scientific articles</i>	
Protein loaded hydrogels as dressing for moist wound healing (Rošic R, Kristl J, Baumgartner S)	187	The habits of Slovenian elderly people in the use of drugs (Pisk N)	213
The use of computational chemistry in the design and screening of novel lead compounds (Perdih A, Kotnik M, Oblak M, Šolmajer T)	195	Determination of labeled bacteria in probiotic food supplements and medicinal products (OTC) on Slovenian market (Bogovič Matijašič B, Zorič Peternel M, Rogelj I)	263
Next generation of nucleotide sequencing techniques: a step toward personalized medicine (Berlec A, Štrukelj B)	203	Spontaneous adverse drug reaction reporting: attitudes and practice of health care professionals and distributors in South East European region (Kozamernik B)	271
Pharmacopeial and modern analytical methods for investigation of antibiotics and their residues in biological samples (Devjak Novak S)	209	Investigation of ozon disinfection effect on planctonic and biofilm microorganisms in purified water in dynamic laboratory and industrial environment (Florjanič M, Kristl J)	282
Impact of physiological changes on pharmacotherapy in the elderly (Vovk T)	221		

## Avtorsko kazalo - index of authors

Abram T	91	Jazbec J	139	Omersel J	149
Anderluh M	66, 73	Kerč J	23	Perdih A	195
Barlič A	42	Kikelj D	101	Pisk N	213
Baumgartner S	187	Klančar U	162	Planinšek O	30
Berginc K	171	Klemenc Ketiš Z	227	Poplas Susič T	124
Berlec A	203	Kobal Grum D	24	Premuš Marušič A	86
Bogovič Matijašič B	263	Kočevar N	14	Resnik M	23
Božič B	149	Kores Plesničar B	59	Rogelj I	263
Božikov K	42	Kos J	9	Rojnik M	9
Copak M	113	Kotnik M	195	Rošic R	187
Cvirn Novak M	117	Kovačič B	30	Rus V.S	24
Čemažar M	14	Kozamernik B	271	Sernec K	106
Černe D	144	Krapež M	130	Srčič S	155
Černelč P	139	Krašna M	139	Šolmajer T	195
Čufar A	127	Kristl A	162, 171	Štrukelj B	203
Debeljak A	254	Kristl J	206, 282	Trontelj J	237
Devjak Novak S	209	Legen I	162	Tršinar M	78
Domanovi D	139	Lunder M	95	Ucman S	113
Drešček M	227	Luštrik M	155	Vovk T	221
Dreu R	155	Marčič R	24	Vrečer F	30
Ferk P	289	Mrevlje V. G	110	Zalar B	63
Florjanič M	282	Mrhar A	117, 162	Zorič Peternel M	263
Fürst J	122	Oblak M	195	Zorin T	232
Hrast M	37	Obreza A	37		
Ignatov N	91				





SLOVENSKO FARMACEVTSKO DRUŠTVO  
SLOVENIAN PHARMACEUTICAL SOCIETY

University of Ljubljana  
Faculty of pharmacy



4<sup>th</sup> BBBB International  
Conference on  
Pharmaceutical  
Sciences

## New Trends in Drug Discovery, Delivery Systems and Laboratory Diagnostics

Bled, Bled Festival Hall  
29<sup>th</sup> September – 1<sup>st</sup> October 2011

[www.bbbb-eufeps.org](http://www.bbbb-eufeps.org)

# Navodila avtorjem

**Spodnja poglavja podajajo pomembne informacije za avtorje. Priporočamo, da si avtorji vzamejo čas in preberejo navodila preden prispevek pošljejo v uredništvo Farmacevtskega vestnika.**

Strokovne članke in druge prispevke objavljamo v slovenskem, po dogovoru z uredništvom pa tudi v angleškem jeziku. Vsi poslani rokopisi morajo biti jezikovno in slogovno neoporečni. Uporabljena terminologija mora biti ustrezna, s posluhom za uveljavljanje ustreznih strokovnih izrazov v slovenskem jeziku. **Navajanje zaščitenih imen zdravil in drugih izdelkov ali imen proizvajalcev je nedopustno.** Dovoljeno je le v poglavju *Materiali in metode*, izjemoma pa še v primeru, če se objavi popoln seznam vseh na tržišču dostopnih izdelkov.

**Strokovni članki so recenzirani.** Uredništvo pošlje vsak strokovni članek najmanj dvema recenzentoma v strokovno oceno. Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmacevtskem vestniku je zagotovljena tajnost.

## Sprejem prispevka v uredništvo

Prispevek je sprejet v uredništvo, kadar v uredništvo poleg rokopisa, v elektronski obliki vloga vsebuje tudi:

### 1 Spremni dopis:

- naslov prispevka,
- imena in priimki avtorjev z vsemi nazivi,
- imena in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni,
- telefonska števila in elektronski naslov kontaktne osebe.

### 2 Izjavo:

Lastnoročno podpisana izjava, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo, ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji. V primeru ponatisa slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje založbe, ki ima avtorske pravice.

## Prva verzija rokopisa

Prav verzija rokopisa je poslana v uredništvo v elektronski obliki v kateri:

- avtorji niso imenovani,
- slike in preglednice so vključene v besedilo,
- obsega največ **20.000** znakov, vključno s presledki.

## 1 Oblika rokopisa

### Naslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak naslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

### Podnaslovi rokopisa

Times New Roman 12 pt, krepko, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

Vsak podnaslov je potrebno oštevilčiti z zaporedno številko ter naslovom, le-ta pa ne sme vsebovati števil, akronimov, okrajšav in ločil, prav tako naj ne preseže 90 znakov.

### Besedilo rokopisa

Times New Roman 12 pt, navadno, razmik vrstice 1,5; levo poravnano; enokolonsko.

## 2 Vsebina rokopisa

Rokopis naj bo sistematično strukturno urejen in razdeljena na poglavja.

**Izvirni znanstveni članki** naj imajo najmanj naslednja poglavja:

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Uvod,
- Materiali in metode,
- Rezultati in razprava,
- Sklep,
- Literatura.

**Pregledni članki** pa

- Povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed),
- Ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5),
- Poglavja in podpoglavja, ki si smiselno sledijo,
- Sklep,
- Literatura.

**Vsako trditev**

je potrebno potrditi z literaturnim virom, zaporedno številko literaturnega vira pa navesti na koncu trditve, v oklepaju pred piko. Če je referenc več, so številke ločene z vejicami in presledki, npr. (1, 3, 8). Na koncu prispevka naj bo navedenih največ 30 literaturnih virov, po vrstnem redu, kot se pojavljajo v besedilu.

**3 Slike, preglednice in grafikoni**

Slike preglednice in grafikoni morajo biti opremljene s pripadajočim besedilom v slovenskem in angleškem jeziku.

**3.1 Slike**

Slike naj merijo v širino in višino največ 18 cm. Dimenzijsko naj se slika čimbolj približa dejanski velikosti v tiskani verziji. Velikost besedila na sliki pa je lahko med 8 in 12 pt. (*opomba*: največkrat v tisku naletimo na velikost črk 10 pt).

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika\_1, slika\_2, itd).

Velikost se mora ujemati z prej omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk!

Vsaka slika mora biti ustrezno označena z zaporedno številko slike in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor lastnik slike. Pripadajoče besedilo se mora navajati pod sliko.

Primer:



**Slika 1.** Logo Slovenskega Farmacevtskega društva (1).

**Figure 1.** Logo of Slovenian Pharmaceutical Society (1).

Objava slik je v črno-beli tehniki, kar naj avtorji upoštevajo pri pripravi slik. Objava barvnih slik je možna samo v primeru, da avtor zagotovi pokritje dodatnih stroškov barvnega tiska.

**3.2 Preglednice**

Vsaka preglednica mora biti ustrezno označena z zaporedno številko preglednice in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bila povzeta, razen v primeru kadar je avtor preglednico pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad preglednico.

Primer:

**Preglednica 1.** Število objav v Farmacevtskem vestniku v letu 2009 (1).

**Table 1.** Number of publication in Journal of Pharmaceutical Society in 2009 (1).

Tip objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

**3.3 Grafikoni**

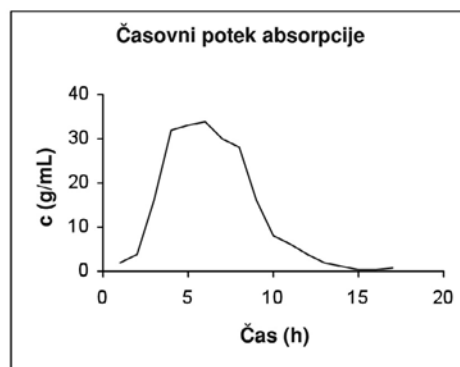
Vsaka grafikon mora biti ustrezno označen z zaporedno številko grafikona in naslovom ter ustrezno referenco, po kateri je bil povzet, razen v primeru kadar je avtor grafikon pripravil sam. Pripadajoče besedilo se mora navajati nad grafikonom.

Grafikoni iz Excela naj bodo uvoženi v besedilo kot »enhance metafile« z velikostjo teksta med 8 in 12 pt. Velikost pa naj ne presega v širino in višino 18 cm.

Primer:

**Grafikon 1.** Časovni potek absorpcije (1).

**Graph 1.** The time-course of absorption (1).

**4 Poimenovanja in okrajšave**

Poimenovanja in okrajšave je potrebno navajati skladno IUPAC, IUBMB in HUGO. Terminologijo izrazov pa tudi skladno s uveljavljenimi slovenskimi terminološkimi izrazi ter skladno s Formularium Slovenicum in SBD terminološkim slovarjem.

**5 Primer navajanja literature**

1. Obreza A. Vanadij v živem organizmu in farmaciji. Farm Vestn 2003; 54: 713–718.
2. Danesh A, Chen X, Davies MC et al. The discrimination of drug polymorphic forms from single crystals using atomic force microscopy. Pharm Res 2000; 17 (7): 887–890.
3. Doekler E. Cellulose derivatives. In: Peppas NA, Langer RS. Advances in polymer science 107; Biopolymers I. Springer-Verlag, 1993: 200–262.

4. Slovensko Farmacevtsko Društvo. <http://www.sfd.si/>. Dostop: 10-12-2008. (avtor spletne strani. Naslov prispevka. Spletni naslov. Dostopano: datum dostopa.)

### Končna verzija prispevka

Avtor strokovnega članka prejme po opravljenem recenzijskem postopku obvestilo o sprejemu članka oz. navodila glede potrebnih popravkih. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva upošteval in **najkasneje dva tedna po prejetju recenzij** poslal popravljen prispevek v elektronski obliki na naslov glavne urednice.

### Končna verzija rokopisa

**1 Naslovna stran prispevka** (prva stran rokopisa) mora vsebovati:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni
- Korespondenčnega avtorja z njegovimi kontakti

**2 Rokopis** (druga stran rokopisa) naj v nadaljevanju vsebuje:

- Naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku)
- Imena in priimke vseh avtorjev *brez z nazivov, imen in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni*, v pravilnem vrstnem redu
- Poglavlja rokopisa v vrstnem redu in obliki kot je navedeno zgoraj v katerih so razporejene slike, preglednice in grafikoni.

### 3 Spremljajoče slike

Slike morajo biti shranjene in poslane tudi neodvisno od rokopisa v ustreznem slikovnem zapisu:

- bitni zapis – jpg, png, tiff z ločljivostjo 300 dpi ali več
- vektorski zapis – eps, emf, wmf

Označene pa naj bodo glede na vrstni red v rokopisu (slika\_1, slika\_2, itd). Velikost se mora ujemati z prej

omenjeno velikostjo zaradi ohranjanja kvalitete in razmerji ob pripravi na tisk.

### Ostali prispevki

Prispevki za rubriko zanimivosti iz stroke in iz društvenega življenja imajo praviloma lahko največ **6.000 znakov** (vključno s presledki). Prispevki za rubriko osebne vesti ne smejo presežati **3.000 znakov** (vključno s presledki). Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubilejih, smrti ali za posebne dosežke v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

### Pošiljanje strokovnih prispevkov

Prispevke v elektronski obliki korespondenčni avtorji pošljejo na naslov:

#### Uredništvo Farmacevtskega vestnika

Slovensko farmacevtsko društvo

Dunajska 184 A, 1000 Ljubljana

T.: 01 569 26 01, Fax: 01 569 26 02

e-pošta:

glavna urednica: [urednica-fv@sfd.si](mailto:urednica-fv@sfd.si)

tajništvo: [tajnistvo-fv@sfd.si](mailto:tajnistvo-fv@sfd.si)

### Korekture

Krtačne odtise prispevka je avtor dolžan natančno pregledati in označiti nujne popravke (tiskarske škrate), s katerimi ne sme posegati v vsebino prispevka. Korekture pošlje avtor v treh delovnih dneh na zgoraj navedi naslov.

Prvi avtor prejme tri izvode Farmacevtskega vestnika brezplačno. Članki so objavljeni tudi na spletnem mestu v pdf obliki.





# STRNJENA VRSTA PRVOVRSTNIH.

Medis, d.o.o., Brežovska 1, Ljubljana, Republika Slovenija, telefon: 01 42 22 22, www.medis.si



**1** PRVO  
VRSTNO

Vrsta prvovrstnih izdelkov za zdravje, ki jih prinašamo na police lekarn, bolnišnic in vaših domov, je strnjena, saj je predolga, da bi jo lahko v celoti objavili.

V njej boste zlahka prepoznali odlične inovativne izdelke, ki jim že leta zaupate in jih znate svetovati tako, da so uporabniki zadovoljni.

Želimo vam obilo osebne sreče, veselja in optimizma v zavetju zdravih vrednot.

 **MEDIS** *zdrave  
vrednote*

**Naredimo vse,**  
da bi razumeli boleče grlo.



Zato smo se za vas v mrazu vozili pri odprtem oknu.  
In Septolete plus se pri vnetem grlu res izkažejo, saj:

- ✔ hitro lajšajo močnejšo bolečino,
- ✔ odpravljajo vzroke vnetja in
- ✔ preprečujejo nadaljnje okužbe.

www.krka.si

**Septolete®**  
In vaše grlo spet deluje.

**KRKA**

*Naša inovativnost in znanje  
za učinkovite in varne  
izdelke vrhunske kakovosti.*

Pred uporabo natančno preberite navodilo!  
O tveganju in neželenih učinkih se posvetujte z zdravnikom ali s farmacevtom.