

# FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 5



# KO JE DRUŽINA LAHKO DEL PRIHODNOSTI

## Uporaba zdravila COPAXONE® 20 mg/ml\* in 40 mg/ml<sup>†</sup> med nosečnostjo ni več kontraindicirana.<sup>1,2</sup>

TEVA

živeti  
življenje

<sup>1</sup> Študije na živalih niso pokazale vpliva na sposobnost razmnoževanja. Trenutni podatki o uporabi zdravila COPAXONE® 20 mg/ml pri nosečnicah ne kažejo na njegovo malformacijsko ali fetotoksikalno toksičnost. Do sedaj ni na voljo drugih relevantnih epidemioloških podatkov. Iz previdnostnih razlogov, se je uporaba zdravila COPAXONE® med nosečnostjo boljše izogibati, razen če koristi zdraviljenca za mater odtehta tveganje za plod.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Študije na živalih niso pokazale vpliva na sposobnost razmnoževanja. Trenutni podatki o uporabi zdravila COPAXONE® 40 mg/ml pri nosečnicah ne kažejo na njegovo malformacijsko ali fetotoksikalno toksičnost. Informacije o uporabi zdravila COPAXONE® 40 mg/ml, tr krat tedensko, v skladu s temi ugotovitvami. Do sedaj ni na voljo drugih relevantnih epidemioloških podatkov. Iz previdnostnih razlogov, se je uporaba zdravila COPAXONE® med nosečnostjo boljše izogibati, razen če koristi zdraviljenca za mater odtehta o tveganje za plod.<sup>2</sup>

Viri: 1. COPAXONE® 20 mg/ml Povzetek značilnosti zdravila, 2016. 2. COPAXONE® 40 mg/ml Povzetek značilnosti zdravila, 2017.



**COPAXONE®**  
(glatiramer acetat)

Informacije o predpisovanju

### SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA:

**IME ZDRAVILA:** Copaxone 20 mg/ml raztopina za injiciranje v napolnjeni injekcijski brizgi. **KAKOVOSTNA IN KOLIČINSKA SEŠTAVA:** 1 ml raztopine za injiciranje vsebuje 20 mg glatiramer acetata, kar ustreza 18 mg glatiramer baze v eni napolnjeni injekcijski brizgi. **FARMAČEVSKA OBLIKA:** Raztopina za injiciranje v napolnjeni injekcijski brizgi. Bistra raztopina brez vidnih delcev. Raztopina za injiciranje ima pH med 5,5-7,0 in osmolarnost približno 265 mOsmol/l. **TERAPEVTSKE INDIKACIJE:** Zdravilo Copaxone je indicirano pri bolnikih s primarno ali sekundarno napredujočo MS. **ODMERJANJE IN NAČIN UPORABE:** Priporočeni odmerek za odrasle je 20 mg glatiramer acetata (ena napolnjena injekcijska brizga), injicirano kot subkutana injekcija enkrat na dan. Trenutno ni podatkov, kako dolgo naj traja zdravljenje. Odločitev o dolgoročnem zdravljenju naj ležijo zdravnik sprejme za vsakega posameznega bolnika. **Pediatrska populacija:** Otroci in mladostniki: Klinična preskušanja ali farmakokinetične študije pri otrocih ali mladostnikih za zdravilo Copaxone niso bile izvedene. Za uporabo zdravila Copaxone 40 mg/ml trikrat na teden pri otrocih in mladostnikih, mlajših od 18 let, ni dovolj podatkov, ki bi priporočali glede njegove uporabe. Zdravilo Copaxone 40 mg/ml trikrat na teden se zato pri tej skupini bolnikov ne priporoča. **Način uporabe:** Zdraviljeno osebo mora bolnika poučiti o tehnikah samoinjiciranja in ga nadzorovati ob prvi uporabi zdravila Copaxone ter 30 minut po tem. Možnost draženja ali bolečine na mestu injiciranja zmanjšamo tako, da vsak dan izberemo drugo mesto injiciranja. Mesto samoinjiciranja lahko izberemo na trebuhu, nadlaktki, bokali ali stegnih. **POVZETEK KONTRAINDIKACIJ:** Zdravilo Copaxone je kontraindicirano pri: preobčutljivosti za zdravilo učinkovino glatiramer acetat ali mantil. **POVZETEK POSEBNIH OPOZORIL IN PREVIDNOSTNIH UKREPOV:** Zdravilo Copaxone uporabljamo samo subkutano. Ne smemo ga uporabljati intravensko ali intramuskularno. Uvajanje zdravljenja z zdravilom Copaxone mora nadzorovani nevrolog ali zdravnik z izkušnjami z zdravljenjem MS. **POVZETEK MESEBOJNEGA DELOVANJA Z DRUGIMI ZDRAVILI IN DRUGE OBLIKE INTERAKCIJ:** Mesebno delovanje zdravila Copaxone z drugimi zdravili uradno ni ovrednoteno. **POVZETEK NEŽELNIH UČINKOV:** V vseh kliničnih preskušanjih so bili najpogostejši neželeni učinki, povezani z zdravljenjem z zdravilom Copaxone, reakcije na mestu injiciranja, saj je o njih poročalo večina bolnikov. V nadzorovanih študijah je bil delež bolnikov, ki so poročali o vsaj enkratni reakciji na mestu injiciranja večji pri bolnikih, zdravljenih z zdravilom Copaxone (70 %), kot pri bolnikih, ki so prejeli placebo. Zelo pogosti: Zelo pogosti neželeni učinki: okužba, gripa, anksioznost, depresija, glavobol, vazodilatacija, dispneja, izpuščaji, navzea, artralgija, bolečina v križu, dvojni vid, boleznii očii, boleznii ušes, palpitacije, tahikardija, kašelj, sezonski rinitis, anorektilne bolezni, zaprtje, zobni karies, dispneja, diastolija, nezmožnost zadrževanja blata, bruhanje, nenormalni jetrni testi, ekhimoza, prekomerno znojenje, srbecica, boleznii kože, kapravnica, bolečina v vratu, urgentca odvajanja urina, polakisurija, zadrževanje urina, drgetanje, edem obraza, atrofija na mestu injiciranja, lokalna reakcija, periferni edem, edem, vročina. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET:** H/07/00419/001-004 **NAČIN IN REŽIM IZDAJE ZDRAVILA:** Predpisovanje in izdaja je le na recept. **DATUM ZADNJE REVIZIJE BESEDILA:** 02.12.2016.

astenija, bolečina v prsih, reakcija na mestu injiciranja, bolečina. Pogosti neželeni učinki: bronhitis, gastroenteritis, Herpes simplex, vnetje srednjega ušesa, rinitis, zobni absces, vaginialna kandidiala, benigna novotvorba na koži, novotvorba, limfadenopatija, preobčutljivost/anoreksija, povečanje telesne mase, živčnost, dispneja, hipertenzija, migrena, motnje govora, sinkop, tremor, dvojni vid, boleznii očii, boleznii ušes, palpitacije, tahikardija, kašelj, sezonski rinitis, anorektilne bolezni, zaprtje, zobni karies, dispneja, diastolija, nenormalni jetrni testi, ekhimoza, prekomerno znojenje, srbecica, boleznii kože, kapravnica, bolečina v vratu, urgentca odvajanja urina, polakisurija, zadrževanje urina, drgetanje, edem obraza, atrofija na mestu injiciranja, lokalna reakcija, periferni edem, edem, vročina. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET:** Teva Pharmaceuticals Ltd, Ridgely, P.O. Box 100, Ridgely, TN 37179, USA. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET:** H/07/00419/001-004 **NAČIN IN REŽIM IZDAJE ZDRAVILA:** Predpisovanje in izdaja je le na recept. **DATUM ZADNJE REVIZIJE BESEDILA:** 02.12.2016.

**IME ZDRAVILA:** Copaxone 40 mg/ml raztopina za injiciranje v napolnjeni injekcijski brizgi. **KAKOVOSTNA IN KOLIČINSKA SEŠTAVA:** 1 ml raztopine za injiciranje vsebuje 40 mg glatiramer acetata, kar ustreza 36 mg glatiramer baze v eni napolnjeni injekcijski brizgi. **TERAPEVTSKE INDIKACIJE:** Zdravilo Copaxone 40 mg/ml je indicirano za zdravljenje recidivne oblike multipleskleleroze (MS). **ODMERJANJE IN NAČIN UPORABE:** Priporočeni odmerek za odrasle je 40 mg glatiramer acetata (ena napolnjena injekcijska brizga), injicirano kot subkutana injekcija trikrat na teden v vsaj 48 urim presledkom. **Pediatrska populacija:** Otroci in mladostniki: Klinična preskušanja ali farmakokinetične študije pri otrocih ali mladostnikih za zdravilo Copaxone niso bile izvedene. Za uporabo zdravila Copaxone 40 mg/ml trikrat na teden pri otrocih in mladostnikih, mlajših od 18 let, ni dovolj podatkov, ki bi priporočali glede njegove uporabe. Zdravilo Copaxone 40 mg/ml trikrat na teden se zato pri tej skupini bolnikov ne priporoča. **Starejši bolniki:** Uporaba zdravila Copaxone pri starejših bolnikih ni bila posebej raziskana. Bolniki z okvaro ledvic: Uporaba zdravila Copaxone pri bolnikih z okvaro ledvic ni bila posebej raziskana. **Način uporabe:** Zdraviljeno osebo mora bolnika poučiti o tehnikah samoinjiciranja in ga nadzorovati ob prvi uporabi zdravila Copaxone ter 30 minut po tem. Možnost draženja ali bolečine na mestu injiciranja zmanjšamo tako, da za vsako injiciranje izberemo drugo mesto. Mesto samoinjiciranja lahko izberemo na trebuhu, nadlaktki, bokali ali stegnih. **POVZETEK KONTRAINDIKACIJ:** Zdravilo Copaxone je kontraindicirano pri: preobčutljivosti za zdravilo učinkovino glatiramer acetat ali mantil. **POVZETEK POSEBNIH OPOZORIL IN PREVIDNOSTNIH UKREPOV:** Zdravilo Copaxone uporabljamo samo subkutano. Ne smemo ga uporabljati intravensko ali intramuskularno. Uvajanje zdravljenja z zdravilom Copaxone mora nadzorovani nevrolog ali zdravnik z izkušnjami z zdravljenjem MS. **POVZETEK MESEBOJNEGA DELOVANJA Z DRUGIMI ZDRAVILI IN DRUGE OBLIKE INTERAKCIJ:** Mesebno delovanje zdravila Copaxone z drugimi zdravili uradno ni ovrednoteno. **POVZETEK NEŽELNIH UČINKOV:** Večina podatkov o možnosti zdravila Copaxone je bilo zbranih za zdravilo Copaxone 20 mg/ml, aplicirano v obliki

subkutane injekcije enkrat na dan. V tem poglavju so zbrani podatki o varnosti iz štirih s placebom nadzorovanih preskušanj z zdravilom Copaxone 20 mg/ml, apliciranim enkrat na dan, in iz enega s placebom nadzorovane preskušanja z zdravilom Copaxone 40 mg/ml, apliciranim trikrat na teden. Neposredne primerjave varnosti zdravila Copaxone 20 mg/ml (apliciranega dnevno) in 40 mg/ml (apliciranega trikrat na teden) v isti študiji niso opravili. Zdravilo Copaxone 20 mg/ml (aplicirano enkrat na dan) v vseh kliničnih preskušanjih za zdravilo Copaxone 20 mg/ml so bili najpogostejši neželeni učinki, povezani z zdravljenjem z zdravilom Copaxone, reakcije na mestu injiciranja, saj je o njih poročalo večina bolnikov. V nadzorovanih študijah je bil delež bolnikov, ki so poročali o vsaj enkratni reakciji na mestu injiciranja večji pri bolnikih, zdravljenih z zdravilom Copaxone 20 mg/ml (70%), kot pri bolnikih, ki so prejeli placebo (37%). **Navzvenkrat so se na mestu injiciranja pojavili eritem, bolečina, zardina, srbecje, edem, vnetje in preobčutljivost, ki so bili pogostejše opaženi pri bolnikih, ki so prejeli zdravilo Copaxone 20 mg/ml, kot pri bolnikih, ki so prejeli placebo. Za reakcije, ki se pojavijo takoj po injiciranju zdravila, je značilen vsaj eden od naslednjih simptomov:** vazodilatacija, bolečina v prsih, dispneja, palpitacije ali tahikardija. Reakcija se lahko pojavi v nekaj minutih po injiciranju zdravila Copaxone. Vsaj eden od simptomov reakcije, ki se pojavijo takoj po injiciranju zdravila, se je vsaj enkrat pojavil pri 31% bolnikov, ki so se zdravili z zdravilom Copaxone 20 mg/ml in pri 13% bolnikov, ki so prejeli placebo. Zelo pogosti neželeni učinki: okužba, gripa, anksioznost, depresija, glavobol, vazodilatacija, dispneja, izpuščaji, navzea, artralgija, bolečina v križu, astenija, bolečina v prsih, reakcija na mestu injiciranja, bolečina. Pogosti neželeni učinki: bronhitis, gastroenteritis, Herpes simplex, vnetje srednjega ušesa, rinitis, zobni absces, vaginialna kandidiala, benigna novotvorba na koži, novotvorba, limfadenopatija, preobčutljivost/anoreksija, povečanje telesne mase, živčnost, dispneja, hipertenzija, migrena, motnje govora, sinkop, tremor, dvojni vid, boleznii očii, boleznii ušes, palpitacije, tahikardija, kašelj, sezonski rinitis, anorektilne bolezni, zaprtje, zobni karies, dispneja, diastolija, nezmožnost zadrževanja blata, bruhanje, nenormalni jetrni testi, ekhimoza, prekomerno znojenje, srbecica, boleznii kože, kapravnica, bolečina v vratu, urgentca odvajanja urina, polakisurija, zadrževanje urina, drgetanje, edem obraza, atrofija na mestu injiciranja, lokalna reakcija, periferni edem, edem, vročina. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET:** Teva Pharmaceuticals Ltd, Ridgely, P.O. Box 100, Ridgely, TN 37179, USA. **IMETNIK DOVOLJENJA ZA PROMET:** H/07/00419/001-004 **NAČIN IN REŽIM IZDAJE ZDRAVILA:** Predpisovanje in izdaja je le na recept. **DATUM ZADNJE REVIZIJE BESEDILA:** 30.03.2017.

Samo za strokovno javnost.

Za podrobnejše informacije o zdravilu, prosimo, preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila, ki je objavljen na spletni strani Centralne baze zdravil ([www.czbj.si](http://www.czbj.si)) ali se obrnite na zastopnika imetnika dovoljenja za promet z zdravilom v Sloveniji, Pfliva Ljubljana d.o.o., Pot k semškemu 35, 1231 Ljubljana-Črnuče, tel: 01 58 90 399, e-mail: [info@tevasi.si](mailto:info@tevasi.si).

Datum priprave informacije: oktober 2017  
SN/CPX/17/0014



ODGOVORNI UREDNIK:  
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:  
Nina Kočevar Glavač

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

IZDAJATELJSKI SVET:  
Cvetka Bačar Bole  
Mateja Cvirn Novak  
Mirjana Gašperlin  
Janez Ilaš  
Smilja Milošev Tuševljak  
Maja Petre  
Nina Pisk

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

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

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

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM  
Fotografija na naslovnici: Shutterstock  
Naklada: 3.500 izvodov

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

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

## UVODNIK

*Bliža se konec leta, ko običajno vsak zase miselno preleti dogodke zadnjega leta. Predvsem se radi spomnimo uspehov in dosežkov, saj nas utrjujejo v prepričanju, da smo na pravi poti. Verjamem, da vsak lahko našteje nekaj veselih dogodkov, uspehov, prijetnih srečanj, kar nas umiri in obda z lepimi občutki. In prav taki trenutki nam dajo tudi moč za naslednje leto, za nove podvige.*

*V tem letu so nevrofiziologi iz skupine znanstvenikov z Univerze Kalifornija, Berkeley (Del Bonis-O'Donnell s sodelavci), z natančnim merjenjem sproščanja dopamina dokazali, da je zadovoljstvo ob pričakovanju novega dogodka za naše možgane bolj stimulirajoče in prijetno kot dogodek sam. Zato se veselimo prihoda novega leta in delimo srečo tudi bližnjim in okolici.*

*Tudi v številki Farmacevtskega vestnika, ki jo držite v rokah, smo naredili zgodovinski »pogled nazaj«: spoštovana profesorja, dr. Krbavčič in dr. Pečar, sta pripravila zanimivo branje o odkritju morfina in poti do njegove uveljavitve kot zdravilne učinkovine, ki je v široki uporabi še po dvesto letih. Članek kolegov Muminovića in prof. Malešiča pojasnjuje nevarnosti hipervitaminov C in D, izvorni znanstveni članek Mohar Lorbegove in Bogovič Matijašičeve pa se dotika področja kakovosti probiotičnih prehranskih dopolnil z vidika zakonodaje o zdravstvenih trditvah. Zadnjih nekaj let, ko predstavljajo inovativna biološka in podobna biološka zdravila vedno večji del sodobne farmakoterapije, je potencialna imunogenost eno od najpomembnejših vprašanj z vidika varnosti. Kako do tega neželenega pojava pride in kakšna mora biti kakovost biološkega zdravila, da pojav imunogenosti zmanjšamo oziroma preprečimo, se bomo poučili v preglednem znanstvenem članku, ki ga je pripravil dr. Tomaž Bratkovič.*

*V imenu uredniškega odbora Farmacevtskega vestnika želimo vsem bralcem uspehov in zdravja polno leto 2018!*

Prof. dr. Borut Štrukelj  
Odgovorni urednik



## VSEBINA / CONTENT

### STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

- 315 Aleš Krbavčič, Slavko Pečar  
Od prve objave odkritja morfina (1805) do njegovega mednarodnega priznanja (1817)  
*From the first report on discovery of morphine (1805) to its international recognition (1817)*
- 326 Boštjan Muminović, Ivan Malešič  
Nevarnosti in ugotavljanje hipervitaminoz askorbinske kisline in vitamina D  
*Dangers and determination of ascorbic acid and vitamin D hypervitaminosis*

### ORIGINALNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 332 Petra Mohar Lorbeg, Bojana Bogovič Matijašič  
Kakovost probiotičnih prehranskih dopolnil na slovenskem trgu v luči zakonodaje o zdravstvenih trditvah na živilih  
*Quality of probiotic supplements on the Slovenian market in the light of legislation on health claims on foodstuffs*

### PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 345 Tomaž Bratkovič  
Imunogenost bioloških zdravil  
*Immunogenicity of biological drugs*

### 355 NOVI DOKTORJI ZNANOSTI – NEW DOCTORS OF SCIENCE

### 365 NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

### DRUŠTVENE VESTI – ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

- 367 Izpopolnjevalno izobraževanje iz klasične homeopatije
- 369 7. konferenca farmacevtskih znanosti Balaton-Baltic-Bled-Bospour
- 372 Osebne vesti
- 374 Letno kazalo



# OD PRVE OBJAVE ODKRITJA MORFINA (1805) DO NJEGOVEGA MEDNARODNEGA PRIZNANJA (1817) FROM THE FIRST REPORT ON DISCOVERY OF MORPHINE (1805) TO ITS INTERNATIONAL RECOGNITION (1817)

AVTOR / AUTHOR:

Prof. dr. Aleš Krbavčič, mag. farm.

Prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

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

## 1 UVOD

Leto 2017 predstavlja dvestoletnico priznanja odkritja morfina. Ob tej priložnosti bomo osvetlili okolje in pomen tega

### POVZETEK

Ob dvestoletnici uradnega priznanja odkritja morfina predstavljamo Friedricha Wilhelma Adama Sertürnerja, njegovo življenjsko pot od lekarniškega pomočnika do lekarnarja in raziskovalca, ki je prvi izoliral morfin iz opija, ga preizkusil (na živalih in na ljudeh), uspel po več kot desetih letih prepričati o svojem odkritju tudi strokovno javnost in sklenil svoje življenje kot prvi odvisnik od morfina. Njegovo odkritje je spremenilo poglede na izolacijo učinkovin iz rastlinskega materiala in posledično izolacijo novih alkaloidov, sprožilo je razvoj eksperimentalne farmakologije ter kemijskih modifikacij izoliranih spojin.

### KLJUČNE BESEDE:

Izolacija morfina, opij, Sertürner, 1803–1805, 1817

### ABSTRACT

This year marks a 200th anniversary of the first isolation of morphine from opium conducted by Friedrich Wilhelm Adam Sertürner. He was working as a pharmacy assistant and later became a researcher whose discovery had a significant influence on the isolation of other alkaloids from plants. Sertürner gave an impetus to development of experimental pharmacology and improvement of isolation techniques, semi-synthetic and total synthetic chemistry, and structure-activity studies in the pharmaceutical chemistry. He tested the isolated compound in animals and humans, managed to convince the professional community of his discovery after more than ten years, and became the first morphine addict.

### KEY WORDS:

Isolation of morphine, opium, Sertürner, 1803-1805, 1817

dogodka. Poskušali bomo tudi potegniti vzporednice med takratnimi in današnjimi časi z ambicijo poiskati odgovore na hipotetično vprašanje, ali bi bilo v današnjih časih še mogoče odkriti morfin.

Nenavaden primer je enemu od avtorjev tega prispevka (prof. Krbavčiču) pred leti omogočil dostop do originalnega tipkopisa, posvečenega 150. obletnici rojstva Friedricha Wilhelma Adama Sertürnerja (v nadaljevanju Sertürner). Tipkopis (1) mu je zaupala magistra Breda Bernot (slika 1)





*Slika 1: Breda Bernot\* na oknu lekarnе Raths-Apotheke v Hamelnu (slika je iz osebnega arhiva B. Bernot).*

*Figure 1: Breda Bernot in pharmacy Raths-Apotheke in Hameln (photo: personal archive of B. Bernot).*



*Slika 2: Lekarna Raths-Apotheke (slika je iz osebnega arhiva B. Bernot).*

*Figure 2: Pharmacy Raths-Apotheke (photo: personal archive of B. Bernot).*

\* Breda Požar Bernot (rojena 17. 07. 1921 v Narinu, občina Pivka) se je po italijanski okupaciji Istre in Primorske z družino preselila v Brežice. Po končani gimnaziji v Ljubljani je začela s študijem farmacije na Vseučilišču v Zagrebu. Zaradi vojne je študij delno prekinila in diplomirala 29. julija 1947. Takoj po diplomi je bila razporejena na delo v Ljubljano, v Lekarno Miklošič v zgradbi Zavoda za zdravstveno zavarovanje. Zaradi številnih ambulant zdravstvenega doma v tej stavbi je imela lekarna pomembno vlogo pri oskrbovanju pacientov z galenskimi in magistralnimi zdravili ter s takrat prihajajočimi gotovimi zdravili. Magistra Breda Bernot je svetovala pri izdelavi galenskih zdravil v laboratoriju, predvsem pa je bila priljubljena pri neposredni izdaji zdravil pacientom. V tej lekarni je delovala vse do upokojitve. Za zasluge v lekarništvu in za delo v društvu je na simpoziju Slovenskega farmacevtskega društva v Portorožu 2006 prejela Minařikovo priznanje. Od magistre Brede Bernot smo se poslovili 20. avgusta 2015 na ljubljanskih Žalah.

kot spomin na svoje delo v lekarni Raths-Apotheke v Hamelnu (slika 2), ki je še danes aktivna lekarna v rokah družine Kerstein, naslednikov Sertürnerja. Magistra Bernot, ki je bila zaposlena kot farmacevtka *receptarius* v Lekarni Miklošič v Ljubljani, je prišla v Raths-Apotheke na izpopolnjevalni študijski obisk v obdobju od 2. 1. 1957 do 1. 4. 1957. Njen obisk v tej lekarni, katere prvotni lastnik je bil Sertürner, tako povezuje našo farmacijo z odkriteljem morfina.

Avtor zgoraj omenjenega tipkopisa (1), dr. Günther Gustav Kerstein (1904–1979), je bil v petdesetih letih prejšnjega stoletja lastnik lekarnе Raths-Apotheke. To lekarno je Sertürner pridobil leta 1820. Lekarna je bila najprej nameščena v hiši mestnega sveta, ki jo je tudi ustanovil; od tod njeno ime (*die Rathausapotheke* oz. skrajšano *die Raths-Apotheke*). Na tak način so nastajale lekarnе tudi v drugih severnonemških mestih, medtem ko so se v južnonemških mestih imenovalе mestna lekarna oz. v nemščini *die Stadt-*

*sapotheke*. Sčasoma so te lekarne prešle v zasebno last lekarnarjev, pogosto pa so kot znamenje pomembnosti obdržale prejšnje ime.

Po Sertürnerjevi smrti je lekarno prevzel njegov sin Viktor Sertürner (1834–1887), ki je lekarno preselil v sosednjo stavbo. Viktor Sertürner gospodarsko ni bil posebno uspešen. Po njegovi smrti je bil od leta 1890 dalje lastnik te lekarne dr. Wilhelm Kerstein in od takrat do danes lekarno vodijo njegovi nasledniki.

Magistra Bernot se je v času svojega študijskega izpopolnjevanja priljubila lekarniški družini Kerstein ne le zaradi strokovnega znanja, temveč tudi zaradi svoje prisrčne osebnosti. Po vrnitvi v Ljubljano je do smrti vzdrževala pisne stike z njimi. O tem priča tudi spominski album, iz katerega sta sliki 1 in 2, ter podarjeni tekst (1) dr. Kersteina (originalni tipkopis) o Sertürnerjevem življenju in delu. Dr. Kerstein je imel poleg lekarniškega dela tudi predavateljsko mesto za zgodovino kemije in farmacije na Univerzi J. W. Goethe v Frankfurtu. Povzel je nekatere po družinskem izročilu še dostopne podatke in to strnil v opisu Sertürnerjevega dela (2), ki ga je magistra Bernot prevedla in v uredništvu magistre Marije Brenčič izdala kot publikacijo Sekcije seniorjev Slovenskega farmacevtskega društva (2005) (3). Bivanje magistre Bernot v nekdanji Sertürnerjevi lekarni in njene pisne vire (1, 2, 3) izkoriščamo, da bralcem približamo takratne razmere in predstavimo okoliščine odkritja morfina tudi z vidika današnjih razmer raziskovanja.

## 2 SERTÜRNER IN OKOLIŠČINE IZOLACIJE MORFINA

Sertürner se je rodil 19. 6. 1783 v kraju Schloß Neuhaus, ki je danes del Paderborna. Umril je 20. 2. 1841 zaradi uremije. Pri petnajstih letih je v enem letu (1798) izgubil očeta in kmalu zatem še botra ter tako ostal brez sredstev za preživljanje. Zato se je leta 1799 zaposlil pri tamkajšnjem provizorju, lekarnarju Franzu Antonu Cramerju, v knežješkofijski lekarni v Paderbornu. Začel je kot učenec (*discipulus*) brez ustrezne predhodne izobrazbe, ko je bil star šestnajst let. Ob koncu šolanja je kot pomočnik pristopil k izpitu za samostojnega lekarniškega delavca (*laboratorius*) pri deželnem zdravniku (*physicus*) dr. Schiffrerju. Z izbranimi pohvalami mu je ta leta 1803 izstavil spričevalo in Sertürner je potem še pet let delal v Paderbornu, do leta 1808. Ko so knežješkofijsko lekarno ukinili, je nadaljeval lekarniško prakso v lekarni v mestu Einbeck

na Spodnjem Saškem. Leta 1809 je opravil še lekarniški izpit, vendar zaradi spremenjenih zakonov po koncu Napoleonove vladavine ni mogel obdržati koncesije. Leta 1820 mu je uspelo kupiti lekarno v mestu Hameln ob Wezeri, kjer je delal do smrti. Pri rutinskih delih v lekarni mu je veliko pomagala žena Leonore von Rettberg, s katero se je poročil leta 1821. Njegov provizor v Hamelnu je bil vsa leta lekarnar Carl Firnhaber, ki ga je razbremenil pri lekarniškem delu in mu omogočal poglobljeno raziskovalno delo (1, 2, 4).

Danes bi lahko rekli, da se je Sertürner izobraževal »ob delu«. Pri tem je bil uspešen, saj je prehodil pot od učenca do lekarnarja. Žal takratna akademska stroka, predvsem zdravniški krogi, izobraževanja »ob delu« ni priznavala. Odsotnost akademske izobrazbe mu je ves čas povzročala težave in mu grenila življenje, kar se je odražalo tudi na njegovem psihičnem počutju.

Med trdim delom lekarniškega pomočnika se je srečal s težavo odmerjanja pri izdelavi pripravkov iz opija. Sertürner in tudi mnogi drugi so poskušali najti rešitev za spremenljivo in nepredvidljivo moč opijeve tinkture, opijevih trituracij in takratnih drugih pripravkov iz opija. Znano je, da so opij v tistih časih pogosto ponarejali in da je bil odvisno od geografskega izvora ter načina nabiranja različno učinkovit zaradi razlik v vsebnosti učinkovine (*principium somniferum*) pri različnih dobavah opija (5).

Sertürner se je kot zagnan mladenič lotil iskanja in izolacije *principium somniferum* iz opija. Pri delu je uporabljal skromno opremo, ki je bila na voljo v lekarni, delal pa je v času, ko je bila lekarna zaprta. Najbolj pomembno pa je bilo, da je imel za raziskovalno delo proste roke in ga lastnik lekarne pri delu ni oviral (1).

Če dogajanje predstavimo v luči današnjega časa: Sertürner (mladi raziskovalec brez mentorja) se je samoiniciativno lotil raziskovalnega projekta, ki je na začetku kazal značilnosti aplikativnega projekta brez predvidljivih posledic in gospodarskih učinkov. Raziskoval je v svojem prostem času in brezplačno. Ni imel napisane niti odobrene vsebine raziskovalnega projekta, nihče tudi ni recenziral njegove ideje, ki bi jo, gledano skozi današnjo optiko, z veliko verjetnostjo zavrnili zaradi čisto banalnih dejstev: izvajalec projekta ni imel mentorja, ustrezne izobrazbe niti ustrezne opreme. Tudi vsebinski zadržki recenzentov bi bili najbrž uničujoči za projekt, ker Sertürner na začetku svojega iskanja *principium somniferum* ni vedel, da bo imel njegov produkt alkalne lastnosti. V tem delu njegova raziskava že posega v področje temeljnih raziskav, ker je odkril, da so v opiju alkalne spojine z močnim biološkim delovanjem. Odkritje je kasneje pripeljalo do izolacij še številnih novih alka-

loidov iz drugih rastlin. Če bi v »projektu« navedel, da bo izoliral alkalne komponente, bi ga recenzenti gladko zavrnili, ker je v tistih časih splošno veljalo mnenje Carla Scheeleja, da so v rastlinah samo kisle ali nevtralne spojine. Scheele je namreč pred tem iz rastlin izoliral citronsko, jabolčno, oksalno in galno kislino, kar naj bi bil zadosten dokaz, da so v rastlinah samo kisline. Vidimo torej, da je bilo Sertürnerjevo delo »čisto« raziskovanje, ki bi ga zelo težko delili na temeljno oziroma aplikativno. Rezultati so bili tako praktično uporabni kot temeljni, ker so pomenili prelom s starimi pogledi.

Današnji kriteriji za prijavljanje raziskovalnih projektov bi torej mladega Sertürnerja ustavili že na samem začetku. Takratne razmere k sreči niso bile tako strukturirane in tako podrobno opredeljene kot danes. Žal pa so obstajali drugi razlogi, ki bi lahko mladega Sertürnerja onemogočili že na začetku, če bi širša okolica vedela za njegovo početje. Na slednje sklepamo preko kasnejših dogodkov, ko mu zdravniška stroka dolgo časa ni dala priznanja za njegovo odkritje, niti se ni zavedala pomena odkritih alkalnih spojin v rastlinah. Zato je bila dejanska prehojena pot mladega Sertürnerja povsem logična: raziskave so potekale v odsotnosti vedenja strokovne javnosti ter v manj poznanem oz. nepoznanem kraju na obrobju glavnih znanstvenih in raziskovalnih tokov. Sertürner je imel samo močno voljo, motivacijo in jasen cilj, ki ga je želel doseči. Sproti je logično reševal težave ovrednotenja delnih in končnih rezultatov ter, kar je glavno, imel je proste roke pri delu. Tako je odkritje *principium somniferum* leta 1805 prišlo povsem nepričakovano iz majhnega nemškega mesta Paderborn v Vestfaliji po sedmih letih raziskovalnega dela. Zaradi obrobnosti Paderborna je odkritje ostalo nepoznano širši stroki še dvanajst let.

Raziskovalci so že v Sertürnerjevih časih o svojih dosežkih poročali v znanstvenih revijah. Tudi takrat je veljalo, da objava dosežka v manj poznani reviji in v nacionalnem jeziku (nemščina) ne pomeni kaj dosti. Opisano se je zgodilo tudi Sertürnerju. Svoje poskuse je opisal v dveh pismih, ki ju je leta 1805 poslal uredniku Johannu Bartholomäusu Trommsdorffu, ki je takrat izdajal farmacevtsko revijo *Journal der Pharmazie*. Leta 1806 je v 14. zvezku izšlo poročilo z naslovom *Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen vom Herrn Sertürner in Paderborn* (Opis čiste makove (opijeve) kisline in kemijske raziskave opija s posebnim poudarkom na v njem novo odkrito snov in s pripadajočimi opombami gospoda Sertürnerja iz Paderborna) (2).

Trommsdorff je bil do Sertürnerjevih prispevkov zadržan in je v uvodu k članku svetoval ponovitve poskusov z večjo količino opija. Sertürner je svetovane ponovitve razumel kot nezaupanje in se na to mnenje ni takoj odzval, a je ob svojem lekarniškem delu nadaljeval s poskusi. Skupno jih je izvedel več kot 57, ponovno pa se je oglasil šele deset let kasneje, ko je že delal v Ratsapotheke v Einbecku (2). Morda bi bilo danes povsem drugače, ker bi imel »današnji« Sertürner svojo domačo spletno stran, kjer bi objavil svoje odkritje in verjetno bi ga kmalu opazili.

Ob odkritju morfina, ko je Sertürner leta 1805 že imel v rokah izolirani morfin, se je torej na prizorišču pojavil dvom urednika. Kaj je botrovalo nezaupljivosti Trommsdorffa, ne vemo. Njegova reakcija pa na Sertürnerja ni delovala najbolj spodbudno, saj se je zavil v molk kar za deset let. Danes lahko razmišljamo tudi, da Sertürnerjeva odločitev da, s pismom uredniku revije strokovno javnost seznaniti s svojim odkritjem, ni bila prava pot, ker je bila revija lokalnega dosega, nemščina pa takrat ni bila jezik znanstvene elite Evrope.

Če pogledamo, kaj se je v tistih časih dogajalo v širših okvirih, ne moremo mimo Charlesa Derosneja, ki je bil lekarnar in kemik v Parizu. Tudi on se je ukvarjal z opijem. V svojih raziskavah se je leta 1803 z ekstrakcijo opija z etanolom in z obarjanjem z vodno raztopino amonijevega karbonata dokopal do zmesi alkaloidov opija. Dobljena zmes je dajala alkalno reakcijo, kar je Derosne zmotno pripisal onečiščenju z amonijakom. Njegovi naporji za odstranitev te »nečistote« niso bili uspešni, ker pa je tudi sam razmišljal v skladu s takratnim vedenjem, da so v rastlinskem materialu le kisle ali nevtralne spojine, je zaradi alkalne reakcije izolata opustil nadaljnje delo. Derosne, ki je svoje raziskave objavil v Parizu v francoščini, za razliko od Sertürnerja, učinkov svojega izolata ni biološko vrednotil (1, 6). Gledano širše je bilo morda celo pozitivno, da Sertürner, ki je leta 1803 začel svoje raziskave v knežješkofijski lekarni v Paderbornu, objav Derosneja ni poznal.

Ker so Sertürnerju oporekali primat pri odkritju morfina (pripisovali so ga Derosneju), je veliko kasneje Pierre Robiquet na *Ecole Supérieure de Paris* na prošnjo francoskega fizika in naravoslovca Josepha Louisa Gay-Lussaca podrobno raziskal Derosnejev izolat in ugotovil, da je vseboval narкотin, danes bolj znan pod imenom noskapin (slika 3) (6). S tem je odkritje morfina dokončno pripadlo Sertürnerju, leto odkritja pa je postalo 1805. Za razumevanje pomembnosti tega dogodka se je pomembno spomniti, da v takratnem svetu nizke komunikacijske intenzitete raziskovalca sploh nista vedela drug za drugega. Opozoriti pa moramo še na nekaj: znanstvene elite so bile takrat locirane v pre-



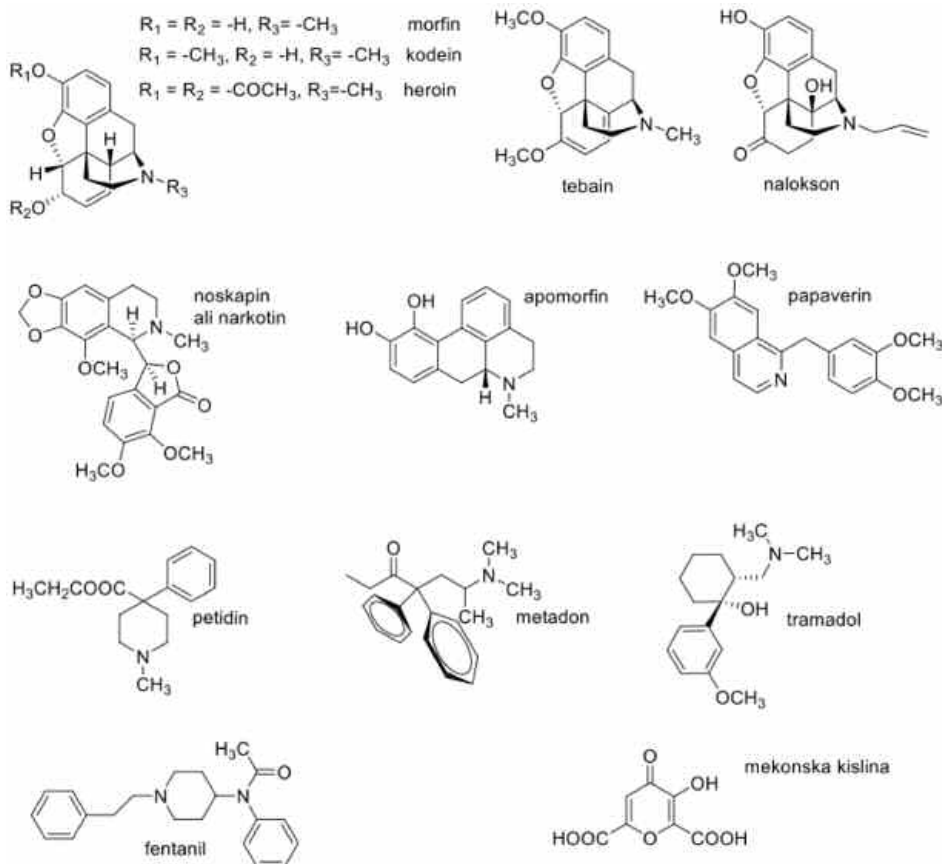
stolnicah Evrope, med katerimi sta bila Pariz in francoščina pred drugimi, in lekarniški asistent v lekarni v Paderbornu ni bil del te elite.

### 3 SERTÜRNERJEVA IZOLACIJA MORFINA IN NJEGOVO VREDNOTENJE

Sertürner je uspel najprej iz opija izolirati dotlej neznano kislino, ki jo je poimenoval opijska kislina. Danes jo imenujemo mekonska kislina ali 3-hidroksi-4-okso-4H-piran-2,6-dikarboksilna kislina (slika 3). To odkritje se je skladalo s Scheelejevim nazorom, da so v rastlinah kisle ali nevtralne snovi. Na tej stopnji pa je Sertürner napravil odločilen pre-

boj. S poskusom na psu je ugotovil, da mekonska kislina ne deluje uspavalno, kar je pomenilo, da je ta kislina le ena izmed sestavin opija, ni pa nosilka uspavalnega delovanja (2).

Povsem logičen je bil nadaljnji korak. Sertürner je vso pozornost posvetil matičnici, ki je ostala po odstranitvi mekonske kisline. Iz nje je po naalkaljenju z amonijakom izoliral trdno snov, ki je kristalizirala iz raztopine v etanolu. Ugotovil je, da izolirana snov ni topna v vodi, dobro pa se topi v očetni kislini. Z dobljenimi kristali mu je tokrat uspelo uspavati psa, ki se je kmalu prebudil, bruhal in je bil potem še dolgo nemiren. Temni, aromatično dišeči filtrat, ki je ostal po odstranitvi trdne snovi, ni imel nikakršnega učinka: poskusna miš je preživela aplikacijo filtrata brez škode (2). Sertürnerja lahko zato upravičeno proglasimo tudi za začetnika farmacevtske kemije.



Slika 3: Strukture mekonske kisline, alkaloidov iz opija (morfin, kodein, noskapin, papaverin in tebain), polysinteznih derivatov morfina (heroin in apomorfin), antagonist morfina (nalokson) in sinteznih analgetikov (petidin, metadon, fentanil in tramadol).

Figure 3: Structures of meconic acid, alkaloids from opium (morphine, codeine, noscapine, papaverine and thebaine), semi-synthetic derivatives of morphine (heroin and apomorphine) morphine antagonist (naloxone) and synthetic analgesics (pethidine, methadone, fentanyl, tramadol).

Sertürner je nadaljeval preizkušanje delovanja morfina na sebi, potem ko so mu prijatelji, ki so sprva sodelovali v preizkušanju, zaradi neugodnih in močnih učinkov odpovedali sodelovanje (7). Žal Sertürner v tej stopnji svojih raziskav ni vedel, da izolirana snov povzročča zasvojenost. Danes bi ga v skladu z današnjo zakonodajo najbrž celo kazensko preganjali zaradi posedovanja, uporabe, pridelave oziroma izdelave prepovedanih drog. Iz tako različnih pristopov v obdobju dvestotih let lahko zaključimo, da mora biti vsako odkritje umeščeno v svoj zgodovinski okvir in okoliščine (čas in prostor), ki odkritje spremljajo. Mnogo odkritij, ki so prehitevala svoj čas, niso sprejeli in pravilno ovrednotili ali pa so bila celo smrtno nevarna za odkritelje. Šele leta 1816 je Sertürner o izolaciji *principium somniferum*, kakor je odkrito snov sam imenoval, poročal v reviji *Gilbert's Annalen der Physik*, kjer je opisal tudi samopreizkus delovanja izolirane snovi. S prijatelji je zaužil v približno 45 minutah trikrat po pol grana (1 gran je približno 60 mg) v razredčenem etanolu raztopljenega morfina, skupno vsak 1,5 grana, torej skoraj 90 mg. Pred uspavanjem so se komaj rešili z zaužitjem močnega kisa, ki je takrat veljal za protistrup pri zastrupitvi z opijem. Rešilo jih je bruhanje, ki so ga blažili z magnezijevim karbonatom. Nato so za več ur zaspali. Morda jih je rešila tudi kakšna primes v izoliranem alkaloidu, npr. noskapin. Od tega trenutka dalje ni bilo več nobenega dvoma: *principium somniferum* oz. morfin je bil odkrit (8).

Danes vemo, da odmerek 200 mg morfina povzroči smrt pri odraslem človeku, ki se še ni srečal z njim. Pri preobčutljivih ljudeh je lahko dovolj že 60 mg, odvisniki pa po daljšem času lahko prenesejo tudi 3 g na dan (7).

Članek v *Gilbert's Annalen der Physik* je opazil Gay-Lussac, takratni urednik revije *Annales de chimie et de physique*, ki je takoj spoznal pomembnost odkritja. Kot zanimivost povejmo, da se je bolj kot na pomembnost odkritja »alkalne in učinkovite« spojine v rastlinskem materialu, osredotočil na vprašanje, zakaj je bilo odkritje toliko časa spregledano, in na novost, da spojina tvori kristalno sol s kislino. Zaradi njegove ocene o pomembnosti odkritja je že spomladi leta 1817 poskrbel za prevod dela v francoščino in objavo v *Annales de chimie et de physique* (3). S tem je vest o odkritju morfina postala dostopna vsej strokovni javnosti in zato letos zaznamujemo dvestoletnico od priznanja odkritja morfina.

Sertürner je iz opija izolirano snov z izrazitim uspavalnim učinkom imenoval *Morphium* (*Morpheus* je bil grški bog spanja). Nekoliko kasneje je Gay-Lussac na osnovi odkritja morfina predlagal za alkalne snovi rastlinskega porekla enotno končnico *-in* (slovenščina) oz. *ine* (angleščina) in je

Sertuernerjev morfij preimenoval v morfin. Že leta 1819 (leto po objavi) je nemški kemik Wilhelm Meissner predlagal za vse snovi z alkalno lastnostjo, izolirane iz rastlinskih virov, skupno ime alkaloidi (9). Morfin je torej prvi alkaloid, izoliran iz rastlinskega materiala.

Na tem mestu se ponovno srečamo z vlogo urednika, ki je bila za Sertürnerja in za razvoj naravoslovnih znanosti tokrat ugodnejša, čeprav bi lahko iz reakcije Gay-Lussaca sklepali, da se takrat še ni v celoti zavedal pomembnosti Sertürnerjevega odkritja. Taka situacija je po svoje razumljiva, ker pomembna odkritja dobijo praviloma svojo vrednost in pomen šele v letih, ki sledijo odkritju. Spoznanje o prisotnosti alkaloidov, alkalnih spojin v rastlinah, ki tvorijo kristalne soli s kisljinami in imajo raznovrstne in navadno močne fiziološke učinke, je sprožilo plaz izolacij drugih alkaloidov, kar je ena najpomembnejših posledic Sertürnerjevega odkritja.

Sertürner je s to objavo izšel iz anonimnosti majhnega nemškega mesteca in med prvimi ga je v Nemčiji leta 1817 s priznanjem počastila *Sozietät für Gesammte Mineralogie*, ki ga je imenovala za zunanjega rednega člana z naslednjo utemeljitvijo: »Na osnovi Vaših posebnih zaslug na področju kemijskih znanosti Vam podpisano društvo podeljuje zunanje izredno članstvo«. Povejmo še, da je bil podpisnik priznanja takratni predsednik društva Johann Wolfgang von Goethe, bolj znan kot pesnik, pisatelj, dramatik a tudi znanstvenik in državnik v Weinmaru. Prav Goethe je dosegel, da je filozofska fakulteta v Jeni Sertürnerju, ki sicer ni imel formalne akademske izobrazbe, podelila častni naziv *dr. phil. honoris causa* (2).

Temu priznanju je sledilo še več drugih (v mestih Marburg, Berlin, St. Petersburg, Passau in Pariz), žal pa tudi nasprotniki in zavistneži med nemškimi in francoskimi znanstveniki niso mirovali. Ti so dolgo menili, da primat pri odkritju morfina pripada Derosneju ali Seguinu. Oba sta sicer izolirala nekatere sestavine opija, a nista spoznala njihovih alkalnih lastnosti, niti nista imela dokaza o uspavalnem delovanju svojih produktov (6). Kot smo že omenili, so za Derosnejev izolat kasneje ugotovili, da sploh ni vseboval morfina, temveč alkaloid noskapin.

Ko je bil led prebit in ko so razpolagali z izoliranim morfinom, se je nadaljnji razvoj usmeril v optimiziranje postopkov in doseganje večje čistote. Že leta 1831 je dr. William Gregory, profesor, zdravnik in kemik v Edinburgu, ugotovil, da je bil tudi Sertürnerjev morfin kljub čiščenju kontaminiran z noskapinom. Zato je izboljšal postopek izolacije, ki je tokrat dal zelo čist morfin (10).

Istega leta (1831) in štirinajst let po mednarodni objavi so člani *Institute de France* ugotovili, da je bilo Sertürnerjevo

odkritje tako pomembno, da so mu podelil Montyonovo denarno nagrado (2000 takratnih frankov) za odkritja v naravoslovju z utemeljitvijo: »Za prepoznanje alkalne narave morfina in tudi za odprtje poti, ki je privedla do velikih medicinskih odkritij.« Na tem mestu bi lahko to vest zaključili, vendar bomo za celovitejši vpogled v takratno dogajanje dodali še nekaj stavkov, ki kažejo na nacionalno (ali politično) komponento dogajanja. Dodatek bo morda koga od bralcev napeljal na iskanje vzporednic z današnjim dogajanjem v svetu. Skratka, leta 1831 so nagradili Sertürnerja z 2000 franki, dve leti pred tem (1829) pa dva Francoza, ki sta uporabila Sertürnerjevo metodo za izolacijo kinina iz skorje kininovca, s približno petkrat višjo denarno nagrado (4, 11). Avtorja članka meniva, da je to lep primer, da je dvesto let prekratek čas za večje spremembe v človeških glavah.

## 4 VPLIV ODKRITJA MORFINA NA ŠIRŠEM PODROČJU NARAVOSLOVNIH IN MEDICINSKIH ZNANOSTI

Odkritje morfina, njegove alkalne narave in njegovega delovanja je odprlo pot novim velikim odkritjem na naravoslovnem in medicinskem področju. Sertürner je spremljal odmeve na svoje dosežke v javnosti od leta 1803, ko je začel s poskusi v Paderbornu, do leta 1817, ko je dočakal mednarodno publikacijo z objavo v *Annales de chimie et de la physique*. Njegov dosežek ni samo odpravil ozkega in omejevalnega Scheelejevega gledanja, kakšne snovi so v rastlinah, temveč je odprl tudi razvoj novega ekstraktivnega pridobivanja rastlinskih učinkovin in posledično njihovega farmakološkega vrednotenja ter tako spodbudil razvoj eksperimentalne farmakologije.

Njegovo odkritje je pospešilo razvoj racionalne in optimizirane izolacije alkaloidov v povečanem merilu in s tem omogočilo nastanek farmacevtske industrije in industrijskega pridobivanja učinkovin iz rastlinskih virov. Iz lekarniških laboratorijev so se na primer razvili: Pelletierjeva in Caventoujeva tovarna alkaloidov kininovca v Parizu, Merckovo podjetje v Darmstadt, ki je začelo industrijsko pridobivanje alkaloidov iz uspavalnega maka (*Papaver somniferum* L.) in za njima še številna druga podjetja. Za industrijsko pridobivanje alkaloidov je bilo odkritje racionalne ekstrakcije morfina po zaslugi prof. Gregoryja ključnega pomena (10). Zaradi posebne lastnosti morfina, ki v molekuli združuje tako alkalne lastnosti terciarnega dušika v izokinolinskem delu kot kisle lastnosti fenolne hidroksilne skupine v aro-

matskem obroču, je pri izolaciji razumljiva zahteva po zelo natančnem doseganju pH, pri katerem pride do optimalnega obarjanja alkaloida iz vodne raztopine (5).

Leta 1832 je Pierre-Jean Robiquet iz opija izoliral alkaloid kodein (slika 3), ki ga je v opiju do 2 %. Kodein ima uporabno delovanje kot antitusik. Danes ga zaradi majhne vsebnosti v opiju pridobivamo polsintezno iz morfina ali iz tebaina. V letu 2013 je bila poraba kodeina na svetovni ravni okoli 249 ton (12). Leta 1849 je George Merck, sin ustanovitelja družbe Merck, iz matičnice izoliral še papaverin (slika 3). Njegovo spazmolizno delovanje so odkrili veliko kasneje, šele na začetku dvajsetega stoletja (6, 13).

Ko se je morfin pojavil v dovolj čisti obliki in v večjih količinah, se je začelo obdobje kemijskih modifikacij morfina, čeprav njegove strukture takrat sploh še niso poznali. Govorimo lahko o začetku farmacevtske kemije, predvsem področja, ki se ukvarja z raziskovanjem povezav med spremembo strukture učinkovine in njenim farmakološkim delovanjem. Tako je leta 1853 Henry How z Univerze v Glasgowu segreval morfin z različnimi alkiljodidi v etanolu s ciljem pridobiti kodein. Cilja ni dosegel, izdelal pa je prve polsintezne analoge morfina. Pri tej reakciji je prišlo do kvaternizacije na dušiku morfina, produkti pa so imeli kurariformno delovanje. Podobno so obdelali tudi druge takrat znane alkaloidne, ki so prav tako v poskusih pokazali kurariformno delovanje, npr. delo Alexandra Cruma Browna (Univerza v Edinburgu) leta 1869. Istega leta sta Augustus Mathiessen in Charles Alder Wright s segrevanjem morfina s klorovodikovo kislino pripravila apomorfina (slika 3), ki ima močno centralno povzročeno emetično delovanje. Strukturo apomorfina so ugotovili šele leta 1902 (14).

Pomembno je bilo tudi leto 1874, ko je angleški kemik in zdravnik Charles Romley Alder Wright sintetiziral diacetilmorfin (slika 3) (14). Takratno odkritje ni bilo deležno večje pozornosti. Morda je bilo odkritje bolj posledica pojava acetanhidrida, ki so ga začeli v industrijskem merilu uporabljati kor reagent za acetiliranje. Z acetanhidridom je povezana tudi sinteza acetilsalicilne kisline, ki so jo začeli proizvajati v podjetju Bayer.

Triindvajset let kasneje (1897) sta v Bayerju diacetilmorfin »ponovno« sintetizirala kemika Albert Eichengrün in Felix Hoffman, ki sta delala pod vodstvom Heinricha Dreserja. Slednji je vodil farmakološko preizkušanje. Želeli so napraviti kodeinu podobno učinkovino oziroma z acetiliranjem povečati biološko uporabnost morfina. To jim je tudi uspelo, ker je bil dobljeni diacetilmorfin (heroin) peroralno dvakrat učinkovitejši od morfina. Glede na raziskave Heinricha Dreserja so diacetilmorfin označili kot analgetik. Od 1898 do 1910 ga je Bayer tržil pod imenom Heroin. Šele leta 1913



so ugotovili, da povzročča odvisnost, zato so prenehali z njegovo proizvodnjo. Kot zanimivost povejmo, da so do leta 1912 prodajali heroin v ZDA v tabletah brez recepta (pakiranje sto tablet s po 30 mg heroina) kot antitusik za ceno 1 \$ (6, 14).

V zgodovini morfina sta pomembna še dva časovna mejnika: leta 1923 so odkrili strukturo morfina (John Masson Gulland in Robert Robinson, Univerza Sv. Andreja, Škotska) in leta 1950 so to strukturo potrdili s totalno sintezo tega alkaloida (Marshall Gates in Gilg Tschudi, Univerza Rochester, New York).

S tem pa razvoj analgetikov z močnim delovanjem še zdaleč ni bil končan. Dodati moramo še alkaloid tebain (slika 3), ki so ga izolirali iz iranskega maka (*Papaver bracteatum* Lindl.) leta 1832 (Tribouméry). Naravni tebain nima pomembnejših farmakoloških učinkov, je pa zelo primeren alkaloid za nadaljnje kemijske spremembe in za pripravo številnih farmakološko pomembnih učinkovin. V letu 2012 so v te namene izolirali 146 ton tebaina (12). Nadaljnji razvoj analgetikov z močnim delovanjem se je iz naravnih alkaloidov in njihovih kemijskih modifikacij prevesil na področje sinteznih spojin, ki v svoji strukturi posnemajo posamezne strukturne elemente morfina, za katere so ugotovili, da so bistveni za analgetično delovanje (6).

Preden nadaljujemo s predstavitvijo dogodkov iz zadnjega obdobja pretečenih dvestotih let, moramo omeniti še pomembno odkritje leta 1853. Do takrat so bili morfin in njegovi pripravki namenjeni izključno peroralni uporabi. Za lajšanje bolečin je bil morfin v obliki različnih soli sorazmerno drago peroralno zdravilo, ki pa so ga znali zelo natančno odmerjati. Velik napredek je bil prehod iz peroralne aplikacije na parenteralno. Zasluge za to ima zdravnik Alexander Wood, ki je leta 1853 uvedel uporabo podkožne injekcijske brizgalke (15). Po injiciranju raztopine soli morfina se pokaže takojšnje protibolečinsko delovanje, kar je pomenilo velik napredek v kirurgiji in interni medicini. Temna stran tega napredka je bilo približno 40.000 odvisnikov kot posledica intenzivne parenteralne uporabe morfina med državljansko vojno v Ameriki (1861–1865) (16, 17).

## 5 RAZVOJ ANALGETIKOV Z MOČNIM DELOVANJEM V DVAJSETEM STOLETJU

Sertürnerjeva izolacija morfina, možnost pridobivanja večjih količin čistega alkaloida in kemijske modifikacije molekule

morfina so postopoma vodile v globlje razumevanje pomena posameznih strukturnih delov kompleksne molekule alkaloida. Razvoj kemije je omogočil pripravo spojin, ki imajo v svojih, praviloma preprostejših, strukturah za analgetično delovanje odgovorne strukturne elemente molekule morfina (6, 13). Raziskave sta v glavnem poganjala dva pomembna dejavnika. Želeli so dobiti učinkovite analgetike, ki ne bi povzročali zasvojenosti, hkrati pa novi analgetiki ne bi bili odvisni od rastlinskih virov.

Tik pred začetkom druge svetovne vojne (1937) so v Nemčiji v Farbwerke Hoechst sintetizirali spojino z oznako Hoechst 10820 s potencialnim analgetičnim delovanjem. Učinkovino danes poznamo pod imenom metadon (slika 3). Patent za spojino so vložili 11. 9. 1941, po vojni pa so zavezniki (ZDA) zaplenili vso dokumentacijo in leta 1947 se je učinkovina pojavila pod imenom metadon. V ZDA so ga uporabljali kot analgetik (Eli Lilly and Company) pod zaščitenim imenom Dolophine (6).

Leta 1939 je Otto Eisleb pri iskanju novih sinteznih antiholinergikov sintetiziral petidin. Otto Schaumann (IG Farben) je nato ugotovil, da spojina ni antiholinergik, temveč deluje kot analgetik. Po vojni so sledile še nove sintezne generacije analgetikov z močnim delovanjem, na primer anilidopiperidinski analgetik fentanil (Paul Janssen: sinteza leta 1959, uporaba leta 1960 kot intravenozni anestetik; slika 3), cikloheksanski analgetik tramadol (sinteza leta 1962, uporaba leta 1977; slika 3) in drugi (6).

Ker so bile zastrupitve z morfinom (prevelik odmerik in zloraba) dokaj pogoste, so intenzivno iskali tudi v smeri učinkovin, ki bi imele morfinu nasprotno delovanje pri učinkih na dihalni center. Z modifikacijo molekule (6, 13, 18, 19) so našli prve učinkovite antagoniste morfina, npr. nalokson (slika 3). Nalokson je pripravil je Jack Fishman leta 1961 (New York). Učinkovina po parenteralni aplikaciji takoj odstrani depresijo dihalnega centra, ki jo povzročča morfin (6, 19). Deluje kot čisti morfinski antagonist.

Naslednji in najbrž zadnji velik korak pri razvoju ter razumevanju delovanja analgetikov z močnim delovanjem so bila odkritja v letih 1970 do 1975, da v našem telesu obstajajo endogeni receptorji za morfin in njegove derivate (13). Še več, ugotovili so, da so ti receptorji namenjeni endogenim snovem (peptidom) z analgetičnimi in drugimi učinki. Odkritje endogenih opioidov (endorfinov in enkefalinov) in njihova pomembnost pri uravnavanju širokega spektra fizioloških funkcij sta morfin, njegove derivate in sintezne analoge postavila v popolnoma nov položaj. Morfin, njegovi polysintezni derivati oziroma sintezni močni analgetiki so naenkrat postali učinkovine, ki bolj ali manj učinkovito posnemajo fiziološke endorfine in enkefaline. Oboji



so peptidni prenašalci živčnih impulzov, ki delujejo v kompleksnem enkefalinergičnem delu centralnega živčnega sistema in na periferiji (13, 20).

Najprej so bili znani le trije tipi receptorjev za endorfine, MOR-m, KOR-k in DOR-d, ki se jim je kasneje pridružil še četrti, NOR (21, 22). Pri posameznih tipih receptorjev so našli tudi podtippe. Nato so se raziskave nadaljevale po popolnoma novih smernicah in danes iščemo selektivne agoniste oziroma antagoniste za posamezen tip oz. podtip receptorja. Od omenjenih raziskav si obetamo »čistejše« farmakološke učinke oziroma analgetično delovanje brez povzročanja zasvojenosti.

Kljub vsemu pa je morfin po dvestotih letih še vedno uporabna in učinkovita zdravilna učinkovina (12), kar pomeni, da se je Sertürner s svojim odkritjem neizbrisno zapisal v zgodovino. Malo je takih odkritij, ki za seboj v nadaljnjem razvoju povzročijo spremembe na tako širokem področju: od farmacevtske kemije, farmakologije do odkritja mehanizma delovanja ter razumevanja procesov regulacije

## 6 DOGODKI, POVEZANI Z MORFINOM V NAŠIH OKOLJIH

Med obema vojnama je bil pri nas zaradi čistote zelo cenjen makedonski opij, zlasti s področij Velesa in Kavadarja. To je posebej veljalo za opij, pridobljen z zarezovanjem nezrelih makovih glavic. Na zraku posušeni mleček se oblikovali v hlebčke in ga previdno sušili. Na sliki 4 je pribor za pridobivanje mlečka makovih glavic iz Vrgočevega učbenika *Uputa u farmakognoziju* (5). Kemijski praktikum farmacevtsko-biokemijske fakultete v Zagrebu je v šestdesetih letih prejšnjega stoletja nudil študentom farmacije enkratno izkušnjo separacije alkaloidov makedonskega opija na osnovi Gregoryjevega postopka.

Manj znano je, da je potekalo pridobivanja morfina iz opija tudi v Sloveniji. V Kemični tovarni v Hrastniku, ki jo je ustanovil Tržačan Jurij Gossleth leta 1860, so na začetku izdelovali zlasti anorganske kemikalije. Leta 1931 so nemški lastniki odprli obrat Alka in do leta 1939 so v njem pridobili okoli 1200 kg alkaloidov opija. Proizvajali so med drugim pantopon, morfin in iz slednjega polysintezno kodein ter apomorfin. Po vojni so od jeseni 1945 do leta 1946 iz makedonskega opija v Hrastniku ponovno pridobivali alkaloidne opija. Vemo, da so od 1. do 15. oktobra 1945 izdelali 3900 g morfina (baze) in 6690 g kodeina (baze). Delovali so pod imenom Državna tovarna alkaloidov Hrastnik vse



Slika 4: Pribor za zbiranje posušenega mlečka z makovih glavic (5).  
Figure 4: Tools for collecting opium (5).

do leta 1950, ko so vso tehnologijo obrata Alka oddali tovarni Alkaloid v Skopju (22). Kasneje je predelavo opija v celoti prevzel Alkaloid.

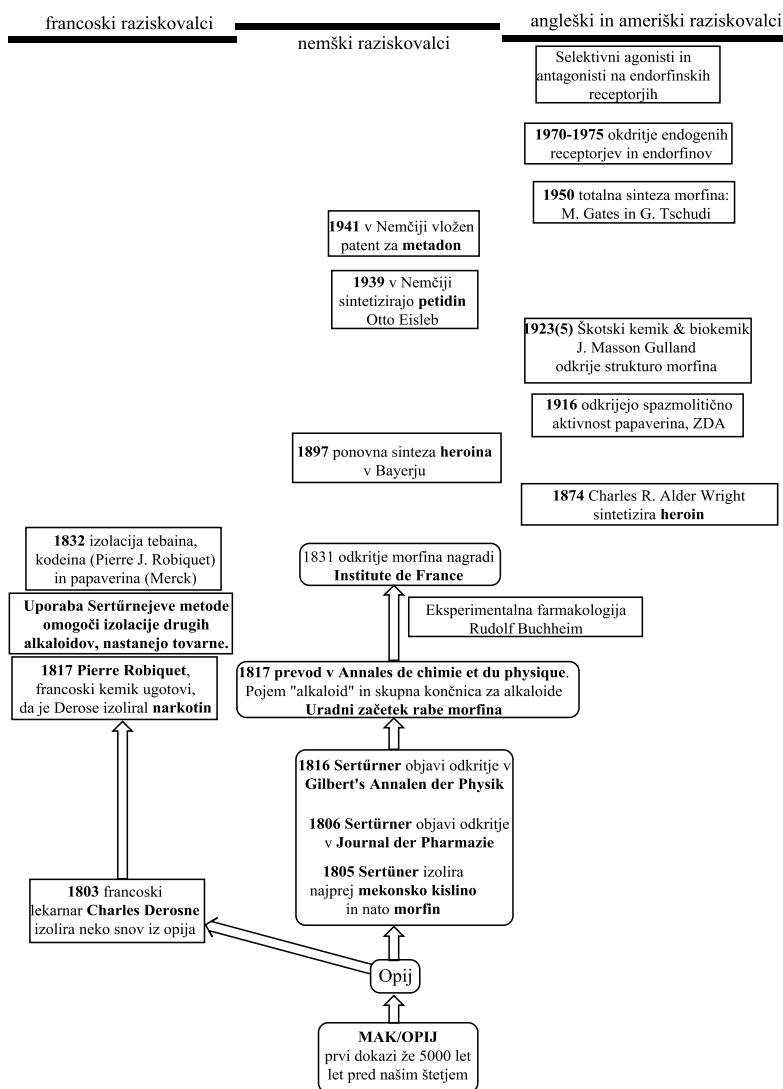
## 7 SKLEP

Sertürnerjevo odkritje morfina je v pretečenih dvestotih letih neizbrisno zaznamovalo velik del naravoslovnih, medicinskih in z medicino povezanih področij. Prehojena razvojna pot je pripeljala do tolikšnega števila novih odkritij (slika 5), da podobne primere na drugih področjih znanosti težko najdemo. Poleg tega je morfin danes še vedno v uporabi, njegov diacetilirani derivat heroin pa kraljuje med prepovedanimi drogami. Odkritje morfina ni ostalo v ozkih farmacevtskih in medicinskih okvirih, temveč se je dotaknilo tudi drugih področij naravoslovnih znanosti.

V tem vzorcu vidimo delno vzporednico s Sertürnerjem. Njegovo delo ni bilo ključno vezano in posvečeno samo izolaciji morfina iz opija, ukvarjal se je tudi s številnimi drugimi težavami tedanjega časa. Njegova razmišljanja so bila pred takratnim časom in jih zato njegovi sodobniki niso sprejeli. Vemo na primer, da je raziskoval možnost pridobivanja dietiletra iz etanola in žveplove(VI) kisline. Kot prvi je predpostavil, da je kolera infekcijska bolezen, ki jo povzročajo mikroorganizmi. Žal si je v obeh primerih nakopal neugodovanje drugih »strokovnjakov« in njegovih idej niso sprejeli, njegove članke pa so zavračali, čeprav se je v

omenjenih primerih kasneje izkazalo, da je imel prav. Zaradi teh »strokovnih« zavračanj je v zadnjem obdobju življenja trpel za kronično depresijo, svoje pa je prispevala tudi odvisnost od morfina. Verjetno je bilo njegovo časovno omejeno in uspešno ter s priznanjem nagrajeno raziskovanje na področju načrtovanja ročnega strelnega orožja, razvoja nabojev in drugega streliva, le kompenzacija za zavračanje njegovih prej omenjenih dosežkov. Če na koncu strmemo vse napisano, nam pretečena dvestoletna razvojna pot ponudi še nekaj zanimivih zaključkov.

Brez dvoma so bili francoski raziskovalci (lekarnarji in kemiki) v tedanji Franciji pomemben del znanstvene elite. Vendar je preboj (izolacija morfina) prišel iz Nemčije (Paderborn). V Nemčiji so napravili tudi prve sintezne analgetike (petidin in metadon). To bi lahko bila potrditev, da so imeli v Nemčiji dobro razvito kemijo. V začetku dvajsetega stoletja, zlasti pa po vojni, se je raziskovalno polje premaknilo na anglosaško (angleško) področje, hkrati pa so začele izginjati nacionalne meje med raziskovalci. Znanost je postala ena sama, globalna znanost.



Slika 5: Glavni mejniki v dvesto let trajajoči razvojni poti od izolacije morfina do danes. Dosežki so razvrščeni po času in po nacionalnosti raziskovalcev.

Figure 5: The most important mile stones during the last 200 years from isolation of morphine to present. The contributions are presented according to time and nationality of the researchers.

Čisto na koncu se vprašajmo, ali bi Sertürner dandanes lahko odkril morfin. Raziskava bi morala najbrž potekati v okviru raziskovalnega projekta, kjer bi takoj nastopilo več težav: Sertürner ne bi mogel sodelovati v raziskavi, ker ni imel ustrezne izobrazbe, ker ni imel mentorja (če bi ga obravnavali kot mladega raziskovalca), ker do takrat še ni ničesar objavil in ker ni imel primernih sredstev za raziskovanje. Poleg tega bi tako aplikativni kot temeljni projekt zelo verjetno naletela na neodobranje recenzentov, ker v prvem primeru ne bi kazal možne gospodarske učinkovitosti, v drugem pa bi bilo težko prepričati recenzente o obstoju alkalnih spojin v rastlinskem materialu. Sertürner se je takrat z zagnanostjo podal v reševanje težav odmerjanja pripravkov opija, vse drugo se je pojavljalo sproti in če ni bilo rešitev, jih je pač moral odkriti. Sreča, ki jo je imel pri delu, je bila v tem, da je imel proste roke pri raziskovanju in možnost nemotenega dela. Nekateri svetovni korporacije danes že nudijo podobne raziskovalne razmere svojim raziskovalcem.

## 8 LITERATURA

1. Kerstein W. *Tipkopis: F. W. Sertürner zum 150. Geburtstag. Hammeln 1933. Zapuščina strokovnih dokumentov pokojne Brede Bernot, mag. farm.*
2. Kerstein G. *Über den Zeitpunkt der Entdeckung des Morphiums durch Sertürner. Dtsch. Apotheker-Ztg 1954; 94: 986.*
3. Bernot B. *Članek o Sertürnerju ob 200. obletnici odkritja morfina. SFD, Sekcija seniorjev; 2005: 1-11.*
4. Lockemann G. *Friedrich Wilhelm Sertürner, the Discoverer of Morphine. J Chem Educ 1951; 28: 277-279.*
5. Vrgoč A. *Uputa u farmakognoziju. Tiskara Dragutina Spulera u Samoboru; 1931: 163, 167-168.*
6. Sneader W. *Drug Discovery, A history. John Wiley & Sons; 2005: 88-105, 114-150.*
7. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Int Ed. McGraw-Hill; 1996: 537.*
8. Müller-Hester H. *Morphium. Die Lebensgeschichte seines Entdeckers, Köln, 1953. Zapuščina strokovnih dokumentov Brede Bernot, mag. farm.*
9. Christoph F. *Die Entdeckung des Morphins vor 200 Jahren. Das »principium somniferum«. Österreichische Apotheker-Zeitung 2004; 58: 1004-1006.*
10. Gregory W. *Über eine neue Methode zur Abscheidung der Morphium aus dem Opium. Justus Liebigs Annalen der Chemie Ann 1833; 7: 261-264.*
11. Delepine M. *Joseph Pelletier and Joseph Caventou. Journal of Chemical Education 1951; 28: 454-461.*
12. *International Narcotic Control Board. Narcotic Drugs Estimated World Requirements for 2015, Statistics for 2013. United Nations; 2015.*
13. Fries DS. *Opioid Analgetics. In: Lemke TL, Williams DA, Roche VF et al. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins; 2008: 652-678.*
14. Sneader W. *The discovery of heroin. The Lancet 1998; 352: 1697-1699.*
15. Schmitz K. *Zur Erfindungsgeschichte der subkutanen Injektionen. Archiv für Geschichte der Medizin 1925; 16: 217-220.*
16. Wehner CC. *Did the Civil War create a lot of Morphine Addicts? <http://www.soldierstudies.org/blog/2013/03/did-the-u-s-civil-war-create-a-lot-of-morphine-addicts/>. Dostop: 26-11-2017.*
17. Courtwright DT. *Opiate addiction as a consequence of the civil war. Civil War History 1978; 24: 101-111.*
18. Foldes FF. *The Human Pharmacology of Clinical Use of Narcotic Antagonists. Med Clin North Am 1964; 48: 421-443.*
19. Martin WR. *History and development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists. Br J Clin Pharm 1979; 7: 273S-279S.*
20. Hilal-Dandan R, L., Brunton LL. *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, Int Ed. McGraw-Hill; 2008: 349-350.*
21. Trescot AM, Datta S, Lee M et al. *Opioid Pharmacology. Pain Physician 2008; 11(2 Suppl): S133-153.*
22. Pathan H, Williams J. *Basic opioid pharmacology: an update. Br J Pain 2012; 6(1): 11-16.*
23. Premru L. *Pričevanja o Leku. Lek, 2002; 12-13.*



# NEVARNOSTI IN UGOTAVLJANJE HIPERVITAMINOZ ASKORBINSKE KISLINE IN VITAMINA D

## DANGERS AND DETERMINATION OF ASCORBIC ACID AND VITAMIN D HYPERVITAMINOSIS

AVTOR / AUTHOR:

Boštjan Muminović

Zas. prof. dr. Ivan Malešič, mag. farm.,  
spec. med. biokem.

*Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta Maribor,  
Taborska ulica 8, 2000 Maribor*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: ivan.malesic@telemach.net

## 1 UVOD

Vitamini so esencialne organske molekule, ki jih ne moremo sintetizirati sami, a jih med drugim tudi nujno potrebujemo

### POVZETEK

Askorbinska kislina (vitamin C) in vitamin D v obliki prehranskih dopolnil sta izjemno pogosto uporabljana pri zdravih ljudeh z raznovrstno prehrano, kljub nedokazanemu ugodnim učinkom jemanja pri tej populaciji. Uporaba vitaminov je v večini primerov dolgotrajna in ni nadzorovana s strani strokovnjakov, kar ima lahko za posledico toksične učinke zaradi presnove in kopičenja teh snovi in njihovih produktov v telesu. V članku predstavljamo nevarnosti hipervitaminoz askorbinske kisline in vitamina D, kako jih ugotavljamo ter kakšen vpliv imajo previsoki vnosi teh dveh vitaminov na organe in organske sisteme.

### KLJUČNE BESEDE:

vitamina C in D, hipervitaminoza, prehransko dopolnilo, toksični učinki

### POVZETEK

Vitamins C and D are very common as dietary supplements in healthy people who have good nutrition habits, even though actual beneficial properties of these products have not been demonstrated. Usage of these dietary supplements is, in most cases, chronic and not controlled by medical professionals, which can result in toxic effects due to metabolism and accumulation of vitamins and their products in the human body. This article will interpret dangers of hypervitaminosis of ascorbic acid and vitamin D, how to determine them and the effects of hypervitaminosis on the human body.

### KEY WORDS:

vitamins C and D, hypervitaminosis, dietary supplement, toxic effects

za metabolizem. Večina vitaminov je prekurzorjev koencimov, nekateri pa so prekurzorji hormonov ali pa delujejo kot hormoni ali antioksidanti (1). Prehranska dopolnila z vitamini (zelo pogosto C in D) so iz dneva v dan bolj priljubljena. Oglase vidimo v trgovinah, časopisih, na televiziji in spletu. Ko pridemo v stik z vitamini v obliki prehranskih dopolnil, navadno vidimo le pozitivne učinke, saj nam mediji zagotavljajo boljše zdravje in bolj kakovostno življenje, saj naj bi delovali po zmotnem principu »čim več, tem bolje«. Uživanje prehranskih dopolnil z vitamini izvira iz dejstva, da le-te tretiramo kot varne snovi, ki naj ne bi dosegale toksičnih vrednosti v telesu. Kot prehranska dopolnila tudi



niso izpostavljeni varnostnim testom, specifičnim za zdravila. Kupimo pa jih lahko tudi v lekarni (2, 3).

Žal koncentracij vitaminov pri osebah, ki jemljejo prehranska dopolnila z vitamini, ne določamo, a bi jih pogosto morali, da ne bi prišlo do hipervitaminoz (preobilja vitaminov v telesu in motenj, ki iz tega izvirajo). Dnevne potrebe po vitaminih pri ljudeh se razlikujejo, saj so odvisne od stanja presnove posameznika, spola, starosti, fizioloških stanj, kot so nosečnost, dojenje, fizična aktivnost in prehrana (1, 4, 5). Raznovrstna prehrana zagotovi dnevne potrebe po vitaminih pri zdravih posameznikih, a je potrebno upoštevati npr. izgube vitamina C, ki se pojavijo zaradi načina skladiščenja in priprave hrane (kuhanje, oksidacija, alkalno okolje itd.) (1,6-11).

Koncentracije vitaminov v kliničnih preiskavah redko določamo. Slednje bi morali izvajati pogosteje, saj pri hipovitaminozah navadno še ni kliničnih znakov, ti so opazni šele pri avitaminozah. Koristno bi bilo tudi spremljati koncentracije vitaminov pri vitaminski terapiji, saj bi se s tem izognili hipervitaminozam (12).

## 1.1 ASKORBINSKA KISLINA – VITAMIN C

Po količini potrebuje človek, od vseh vitaminov, največ askorbinske kisline (6). Pred odkritjem askorbinske kisline, so se ljudje seznanili s simptomi in znaki, ki se pojavijo ob njenem pomanjkanju. Severnoevropski mornarji so bolezen poznali pod imenom skorbut. Do slednjega je prišlo zaradi pomanjkanja vitamina C, ker na ladji niso imeli svežega sadja in zelenjave.

Biološko aktivna oblika vitamina C je L-askorbinska kislina, ki je močan reducent in se reverzibilno oksidira do dehidroaskorbinske kisline. Slednja ima majhno fiziološko aktivnost, a je kot reducent enakovredna L-askorbinski kislini (10). Rastline in večina živali lahko askorbinsko kislino sintetizirajo same iz glukoze preko vmesnih produktov, kot so D-glukoronska kislina, L-glukonska kislina in L-glukonolakton. S pomočjo L-glukonolakton-oksidade pretvorijo L-glukonolakton v askorbinsko kislino. Slednjega procesa nekateri sesalci, vključno z ljudmi, niso zmožni, zato so zanje edini viri askorbinske kisline sveže sadje in zelenjava (citrusi, jagode, melone, paradižnik, brokoli itd.), pozimi pa sta to krompir in zelje (5-7, 10).

Potrebna količina askorbinske kisline, ki preprečuje klinične znake skorbuta, znaša 10 miligramov na dan (mg/d), kar je najverjetneje blizu minimalnih dnevnih potreb za odraslo osebo. Pomembno je poudariti, da 10 mg/d ni zadostna količina za vzdrževanje primerne koncentracije askorbinske kisline v tkivih organizma (10). V literaturi navajajo različne vrednosti dnevnih potreb človeka po askorbinski kislini. Ve-

čina jih priporoča med 1,0 in 1,2 mg na kilogram telesne mase oziroma približno 75 mg/d za ženske in 90 mg/d za moške (5, 10). Potrebe so višje pri kadilcih, nosečnicah in doječih materah ter bolnikih s kroničnimi boleznimi, pri uporabi kortikosteroidov in antikoncepcijskih sredstev (5, 6). Zmanjšane vrednosti askorbinske kisline v serumu so ugotovili pri različnih vnetjih, virozah, po možganski kapi, pri alkoholnem hepatitisu, cirozi in karcinomu jeter, virusnem hepatitisu, sladkorni bolezni in arterijski bolezni koronarnih žil. Povečana potreba po askorbinski kislini se pojavi tudi pri stresu in različnih travmah, ker pride do padca koncentracije v plazmi. Večina askorbinske kisline se v teh primerih mobilizira iz celega telesa v nadledvično žlezo ali pa na področje travme. Če se v teh stanjih odločimo za nadomeščanje askorbinske kisline, je vsekakor koristna in pomembna predhodna laboratorijska ugotovitev njenega pomanjkanja v telesu (5). Za dojenčke je izjemno pomembno, s kakšnim mlekom jih hranimo, saj materino mleko vsebuje več askorbinske kisline kot kravje mleko. To je tudi eden izmed razlogov, da je zelo priporočeno dojenje otroka vsaj do prvega leta starosti. Materino mleko vsebuje v povprečju približno 50 mg/L askorbinske kisline. Dojeni otroci dobivajo na začetku dohranjevanja, med četrtem in šestim mesecem življenja, dovolj askorbinske kisline. Tovarniško pripravljena adaptirana mleka, ki jih uporabljamo v primeru, ko mati nima mleka, so obogatena z askorbinsko kislino v zadostni količini. Če dojenčka hranimo s kravjim mlekom, moramo v prvih mesecih življenja askorbinsko kislino dodajati v obliki prehranskih dopolnil, v odmerku 30 mg/d. Običajna mešana prehrana (dohranjevanje), s katero pričnemo med četrtem in šestim mesecem otrokovega življenja, zagotavlja otroku zadostno količino askorbinske kisline (13).

Referenčne vrednosti askorbinske kisline so odvisne od časa meritve, saj uživamo v različnih letnih časih različno hrano, kar pa vpliva na njeno koncentracijo v serumu. Referenčni interval za skupni vitamin C (askorbinska kislina in dehidroaskorbinska kislina) v plazmi, določen s spektrofotometrično metodo, znaša 23–85  $\mu\text{mol/L}$  (14). Leta 1999 sta Malešič in Meško objavila referenčne vrednosti askorbinske kisline, določene zdravim ljudem februarja in marca, ki so znašale 27,6–93,6  $\mu\text{mol/L}$  (5). Starostniki imajo manjše vrednosti. Pomanjkanje vitamina C je izrazito pri koncentracijah, ki so manjše od 11  $\mu\text{mol/L}$  (5). Pri starostnikih je zato smiselno pomanjkanje ustrezno popraviti, zlasti če se pojavijo tudi simptomi.

## 1.2 VITAMIN D

Vitamin D (kalciferol, 25(OH)D) spada v skupino lipidotopnih vitaminov, zaradi česar se skladišči v telesu v adipoznem

tkivu za daljše obdobje. Cirkulirajoče vrednosti 25(OH)D so večje poleti in manjše pozimi, a le pri ogroženih skupinah, kot so starejši, vegetarijanci in osebe, odvisne od alkohola. Najpogostejša vzroka pomanjkanja vitamina D sta malabsorpcija maščob ter huda obolenja ledvic ali jeter (pri slednjih zato, ker ne pride do hidroksilacije vitamina D<sub>3</sub> ali D<sub>2</sub> do kalcifediola) (15).

Razpolovni čas vitamina D in njegovih metabolitov prikazuje preglednica 1. Za razliko od vodotopnih vitaminov, kot sta vitamina C in B, vitamini, topni v maščobah, ne delujejo kot koencimi (16). Vitamin D je vitamin, ki nastane tudi endogeno v koži, pod vplivom ultravijolične svetlobe (UV), kot vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) in z absorpcijo iz hrane v prebavilih, kot vitamin D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>). Vitamin D se nato v telesu metabolizira s hidroksilacijo vitaminov D<sub>2</sub> in D<sub>3</sub> v aktivno obliko; 1,25-dihidroksiholekalciferol [1,25-(OH)<sub>2</sub>-D], poimenovan tudi kalcitriol, ki se veže na znotrajcelične receptorje in stimulira ali zavre transkripcijo tarčnih genov. Vitamin D igra pomembno vlogo pri uravnavanju plazemskih koncentracij kalcija in fosfata (17, 18). S hrano pridobimo največ vitamina D iz ribjega olja, jeter in jajčnega rumenjaka. Mleko ni dober vir vitamina D, razen če le-tega dodamo. Materino mleko ga prav tako vsebuje premalo, zato priporočamo dodajanje vitamina D dojenim otrokom (16, 18, 19).

Vitamin D dajemo otrokom v obliki farmacevtskega pripravka (tablete ali kapljice), neprekinjeno od prvega meseca do konca prvega leta življenja, vsak dan v odmerku 400 IU (tj. kontinuirana profilaksa). V drugem in tretjem letu dajemo isti odmerek, a le v zimskih mesecih. Pri nedonošenih otrocih in/ali dvojčkih, ki se rodijo z manjšimi zalogami kalcija in vitamina D ter hitro rastejo, se profilaksa rahitisa prične že v drugem tednu življenja, običajno z nekoliko večjim odmerkom vitamina D, in sicer 1000 IU/d (13). Pri nekaterih dojenčkih se lahko pojavi hiperreaktivnost na majhne odmerke vitamina D. Do toksičnih vrednosti vitamina D lahko, pri majhnih otrocih, pripelje nenamerno zaužitje tablet, ki so namenjene odraslim, zato je potrebno pazljivo rokovanje s pripravki z vitaminom D (17).

Manjše serumske koncentracije 25(OH)D so prisotne pri premajhni izpostavljenosti soncu, nezadostnem vnosu vitamina D s hrano, malabsorpciji, hepatocelularni bolezni, pri

povečanemu katabolizmu zaradi terapije z antikonvulzivi ter pri preveliki izgubi zaradi nefrotskega sindroma. Manjše koncentracije 1,25(OH)<sub>2</sub>D opazimo pri stanjih, kot so: ledvična odpoved, hiperfosfatemija, hipomagnezemija, hipoparatiroidizem in pri psevdoparatiroidizmu. Referenčne vrednosti vitamina D so odvisne od metode, s katero jih določamo.

Reprezentativne vrednosti so: 25(OH)D – (25–162 nmol/L) ter 1,25(OH)<sub>2</sub>D – (36–144 pmol/L) (16). Priporočeni dnevni vnosi vitamina D za osebe, stare 70 let ali manj, znašajo 600 IU (1 µg vitamina D = 40 IU) ter 800 IU/d za starejše od 70 let (20). Priporočene zgornje vrednosti dolgotrajnega jemanja vitamina D so 1000 IU za otroke, mlajše od enega leta starosti, ter 2000 IU za starejše otroke in odrasle. Hipervitaminoza lahko nastane zaradi prevelikega vnosa sinteznih analogov vitamina D (25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D). Intoksikacija z vitaminom D ne more nastati kot posledica prevelike izpostavljenosti soncu, najverjetneje zaradi tega, ker lahko UV žarki spremenijo D<sub>3</sub> in njegove prekurzorje v neaktivne metabolite. Čeprav vitamin D poveča absorpcijo kalcija v črevesju, je dominanten mehanizem hiperkalcemije močno povečana resorpcija kostnine (21). Na produkcijo vitamina D<sub>3</sub> v koži vplivajo zemljepisna širina, letni čas, staranje, uporaba kozmetičnih izdelkov za zaščito proti soncu in pigmentacija kože (17, 19, 21).

Koncentracije cirkulirajočih metabolitov vitamina D variirajo s starostjo in so zvečane med nosečnostjo. Koncentracija 1,25(OH)<sub>2</sub>D je mnogo večja med nosečnostjo in v otroški dobi v primerjavi z odraslimi osebami. Četudi obstajajo dognanja, da se koncentraciji 25(OH)D in 1,25(OH)<sub>2</sub>D v krvi z leti zmanjšujeta, naj bi bilo to posledica slabe prehrane in zmanjšane izpostavljenosti soncu. Koncentracije teh metabolitov se s starostjo niso spreminjale v raziskavah, ki so bile omejene na zdrave in fizično aktivne posameznike (16, 22).

### 1.3 PRIPOROČENI DNEVNI VNOSI TER DOPUSTNA ZGORNJA MEJA VNOSA ASKORBINSKE KISLINE IN VITAMINA D

Priporočeni dnevni vnosi in zgornje meje so prikazani v preglednici 2.

*Preglednica 1: Vitamin D in njegovi metaboliti v plazmi (16).*

*Table 1: Vitamin D and its plasma metabolites (16).*

Snov	Koncentracija (nmol/L)	Prosta oblika (%)	Razpolovni čas
Vitamin D	< 0.5–52	/	1–2 dni
25(OH)D	25–162	0,03	2–3 tedne
1,25(OH) <sub>2</sub> D	0,036–0,144	0,4	4–6 ur

Preglednica 2: Priporočeni dnevni vnosi\* ter dopustna zgornja meja vnosa askorbinske kisline in vitamina D (10, 23).

Table 2: Recommended daily intake and upper tolerable limit of ascorbic acid and vitamin D (10, 23).

Starost	Priporočeni dnevni vnos askorbinske kisline (mg/d)	Priporočeni dnevni vnos vitamina D (µg/d) <sup>a,b</sup>	Dopustna zgornja meja vnosa askorbinske kisline (mg/d)	Dopustna zgornja meja vnosa vitamina D (µg/d)
Dojenčki 0–12 mesecev	40–50	5	ni določeno	25
Otroci 1–3 leta	15	5	400	50
Otroci 4–8 leta	25	5	650	50
Moški 14–18 let	75	5	1800	50
Moški 19–50 let	90	5	2000	50
Moški 51–70 let	90	10	2000	50
Moški > 70 let	90	15	2000	50
Ženske 14–18 let	65	5	1800	50
Ženske 19–50 let	75	5	2000	50
Ženske 51–71 let	75	10	2000	50
Ženske > 70 let	75	15	2000	50
Nosečnost	85	5	1800–2000	50
Laktacija	120	5	1800–2000	50

\* Priporočeni dnevni vnosi predstavljajo povprečno zaužito koncentracijo na dan, ki zagotovi prehranske potrebe večine (97–98 %) zdrave populacije.

<sup>a</sup> V obliki holkalciferola, pri čemer velja, da je 1 µg holkalciferola enako 40 IU vitamina D.

<sup>b</sup> Te vrednosti veljajo za ljudi, ki niso zadosti izpostavljeni sončni svetlobi.

Dopustna zgornja meja je maksimalna vrednost vnesenega hrana na dan, ki verjetno ne bo imela neželenih učinkov na zdravje pri splošni populaciji.

## 2 RAZPRAVA

### 2.1 TOKSIČNOST ASKORBINSKE KISLINE

Toksičnost askorbinske kisline je relativno majhna. Pri aplikaciji 2–4 g/d se lahko pojavi iritacija gastrointestinalnega sistema. Najpogosteje se kaže kot trebušni krči in diareja, ki pa je posledica osmoze zaradi neabsorbirane askorbinske kisline (10). Zaenkrat nimamo dokazov, ki bi nakazovali na kancerogenost ali teratogenost askorbinske kisline. Glavni izpostavljeni organi toksičnim učinkom askorbinske kisline so gastrointestinalni trakt, ledvice in krvni sistem (24). Pri posameznikih, ki imajo pomanjkanje glukoza-6-fosfat-

dehidrogenaze, se ob velikih odmerkih askorbinske kisline lahko pojavi hemolitična anemija (25).

Objavljene so številne raziskave, ki dokazujejo ali zavračajo povezavo med tvorbo oksalata in povečano pojavnostjo ledvičnih kamnov. Nekateri avtorji opozarjajo, da morajo pacienti s ponavljajočo se tvorbo ledvičnih kamnov in tisti, ki imajo ledvično okvaro z motnjo v metabolizmu askorbinske kisline ali oksalata, omejiti dnevni vnos askorbinske kisline na 100 mg/d (26).

Askorbinska kislina poveča absorpcijo Fe<sup>2+</sup> v gastrointestinalnem traktu ter regulira privzem celičnega železa in njegov metabolizem. Slednje omogoča s stimulacijo sinteze feritina, inhibira lizosomsko degradacijo feritina in zmanjša iztok celičnega železa. Prav tako askorbinska kislina stimulira privzem železa iz nizkomolekulskih železo-citratnih kompleksov (27). Askorbinska kislina ima vpliv na status zaloga železa v telesu, a ne more privedi do kopičenja toksičnih vrednosti le-tega pri zdravih ljudeh (28). Maksimalna dovoljena koncentracija askorbinske kisline v serumu je 193 µmol/L, zato je pri dolgotrajni terapiji potrebno nadzorovati raven askorbinske kisline v serumu,



predvsem pri bolnikih, ki so na kronični intermitentni hemodializi (29).

## 2.2 TOKSIČNOST VITAMINA D

Vedno večje zanimanje za prehranska dopolnila z vitaminom D je privedlo do porasta njihove uporabe in posledično do večjega tveganja za hipervitaminoze ter tudi možne toksične učinke na organizem. Znaki intoksikacije organizma z vitaminom D so povezani s hiperkalcemijo, saj vitamin D povzroči povečano resorpcijo kalcija iz gastrointestinalnega trakta ter stimulira demineralizacijo kosti. Znaki hiperkalcemije so zaprtje, letargija, zmedenost, poliurija in polidipsija. Posledično lahko privede do povečane kalcifikacije mehkih tkiv, kar vodi v konjunktivitis, ektopične kalcifikacije, hipertenzijo in srčne aritmije (30-33).

Posebno pozornost je potrebno nameniti uvoženim in/ali nereguliranim prehranskim dopolnilom. Prav tako je pomembno ozaveščanje o zdravilcih, ki ponujajo tako imenovana naravna zdravila, ki pa niso regulirana tako kot prava zdravila in je zato velika verjetnost za prisotnost napačnih koncentracij sestavin v pripravku, kar lahko hitro privede do negativnih izidov. Najpogostejši vzroki z vitaminom D inducirane hiperkalcemije, so napake v odmerjanju različnih oblik vitamina D, predvsem 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Slednji je indiciran pri hipoparatiroidizmu, renalni osteopatiji in malabsorpciji. Vitaminske preparate z vitaminom D pogosto uporabljamo tudi za zdravljenje osteoporoz. Hiperkalcemija pri pacientih z osteoporozo lahko nastopi že pri vnosu 0,5 µg kalcitriola dvakrat na dan ob hkratnem vnosu kalcija 0,5 g/d. Prav tako lahko nastopi hiperkalcemija zaradi zgoraj navedene terapije pri pacientih s psoriazom. Zaradi nepravilnega odmerjanja in nekontrolirane terapije raste pojavnost hiperkalcemij. Polovični razpolovni čas hiperkalcemije pri vnosu prekomernega odmerka traja približno tri tedne (34). Hipervitaminoza vitamina D je zlasti nevarna pri pacientih, ki prejemajo zdravila s kardiotioničnimi glikozidi škrlatnega naprstca (*Digitalis purpurea*), ker hiperkalcemija poveča toksičnost te terapije (17).

## 3 ZAKLJUČKI

Pri številnih bolezenskih stanjih je potreben vnos askorbinske kisline. Vsekakor je pred tem koristna laboratorijska ugotovitev pomanjkanja askorbinske kisline v telesu. Na

žalost trenutno pri nas v laboratorijih klinične biokemije rutinsko ne določajo askorbinske kisline.

Terapija z vitaminom D v kombinaciji s preparati kalcija je zelo nevarna, zato je pri kateri koli indicirani uporabi nujno laboratorijsko spremljanje. Dolgotrajno zdravljenje s pripravki vitamina D je lahko nevarno, saj ne poznamo antidota ob prekomernem vnosu. Rutinska kontrola, ki nam prikaže dejansko stanje vitamina D v telesu, je določanje oblike 25(OH)D, kar je sicer precej drago. Če pa slednje ni možno, moramo pri dolgotrajni terapiji vsaj kontrolirati serumske koncentracije kalcija.

## 4 LITERATURA

1. Koolman J, Roehm KH. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme; 2005: 360-368.
2. Rutkowski M, Grzegorzcyk K. Adverse effects of antioxidative vitamins. *Int J Occup Med Environ Health* 2012; 25(2): 105-121.
3. Garcia-Cortez M, Robles-Diaz M, Ortega-Alonso A, Medina-Caliz I, Andrade RJ. Hepatotoxicity by Dietary Supplements: A Tabular Listing and Clinical Characteristics. *Int J Mol Sci* 2016; 17(4): 537.
4. *Dietary Balances; Regulation of Feeding; Obesity and Starvation; Vitamins and Minerals*. In: Guyton AC, Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier; 2011: 843-855.
5. Malešič I, Meško M. Vrednosti askorbinske kisline v krvnem serumu zdravih ljudi in bolnikov. *Farm Vestn* 1999; 50: 416-419.
6. Marcus R, Coulston AM. *Water-Soluble Vitamins: The Vitamin B Complex and Ascorbic Acid*. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill; 2001: 1753-1771.
7. Domitrović R. Vitamin C u prevenciji i liječenju bolesti. *Biochemia Medica* 2006; 16(2): 107-125.
8. Sauberlich EH. *Laboratory Tests for the Assessment of Nutritional Status*. CRC Press; 1999. [https://books.google.si/books?hl=sl&lr=&id=nay1MOcFRSkC&oi=fnd&pg=PR17&dq=Sauberlich+Vitamin+C+Laboratory+tests+for+assessment+of+nutritional+status&ots=QDZ8y0pfJC&sig=0aJcY0q\\_CsTCC9pt\\_XZhMrZXiM&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.si/books?hl=sl&lr=&id=nay1MOcFRSkC&oi=fnd&pg=PR17&dq=Sauberlich+Vitamin+C+Laboratory+tests+for+assessment+of+nutritional+status&ots=QDZ8y0pfJC&sig=0aJcY0q_CsTCC9pt_XZhMrZXiM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false). Dostop: 27-11-2017.
9. Harvard Health Publications, Harvard Medical School. *Getting your vitamins and minerals through diet*. <http://www.health.harvard.edu/womens-health/getting-your-vitamins-and-minerals-through-diet>. Dostop: 27-11-2017.
10. Shenkin A, Baines M, Fell GS et al. *Vitamins and Trace Elements*. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *TIETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier; 2006: 1075-1164.
11. Russel RM, Suter PM. *Vitamin and Trace Mineral Deficiency and Excess*. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL et al. *Principles of Harrison's Internal Medicine*. McGraw-Hill; 2008: 441-450.



12. Štraus B. *Medicinska biokemija. Medicinska naklada*; 1992: 731-770.
13. Gjurić G. *Prehrana. In: Mardešić D. Pedijatrija. Školska knjiga*; 2003: 231-301.
14. Štraus B. *Medicinska biokemija. Medicinska naklada*; 2009: 387-388.
15. Chaney SG. *Principles of Nutrition II: Micronutrients. In: Devlin TM. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Wiley-Liss*; 2006: 1091-1120.
16. Endres DB, Rude RK. *Mineral and Bone Metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier*; 2006: 1891-1965.
17. Marcus R. *Agents Affecting Calcification and Bone Turnover: Calcium, Phosphate, Parathyroid Hormone, Vitamin D, Calcitonin and Other Compounds. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill*; 2001: 1715-1743.
18. Ferrier DR. *Vitamins. In: Harvey RA. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins*; 2014: 373-394.
19. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM et al. *Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL et al. Principles of Harrison's Internal Medicine. McGraw-Hill*; 2008: 2365-2377.
20. Ross AC, Manson JE, Abrams SA et al. *The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(1): 53-58.
21. Greenbaum LA. *Rickets and Hypervitaminosis D. In: Kliegman RM, Stanton BF, Schor NF et al. Nelson Textbook of Pediatrics. Elsevier*; 2011: 200-209.
22. Eastell R, Yergay AL, Vierira NE et al. *Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function and age in women: evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. J Bone Miner Res* 1991; 6:125-132.
23. Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. *Dietary Reference Intakes The Essential Guide to Nutrient Requirements. https://fnic.nal.usda.gov/sites/fnic.nal.usda.gov/files/uploads/DREssentialGuideNutReq.pdf. Dostop: 27-11-2017.*
24. *National Research Council. Recommended Dietary Allowences. The National Academies Press*, 1989.
25. Rees DC, Kelsey H, Richards JD. *Acute haemolysis induced by high dose ascorbic acid in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. BMJ* 1993; 306(6881): 841-842.
26. Gerster H. *No contribution of ascorbic acid to renal calcium oxalate stones. Ann Nutr Metab* 1997; 41(5): 269-282.
27. Lane DJ, Richardson DR. *The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption! Free Radic Biol Med* 2014; 75:69-83.
28. Cook JD, Watson SS, Simpson KM et al. *The effect of high ascorbic acid supplementation on body iron stores. Blood* 1984; 64(3): 721-726.
29. Malešič I, Mršek J, Kasum S. *Problematika određivanja mokraćne kiseline kod dializnih pacienata. Österreichisch-Jugoslawisches Symposium über Lebererkrankungen, Abstrakt Buch. Graz*, 1989.
30. Whiting SJ, Calvo MS, Stephensen CB. *Current Understanding of Vitamin D Metabolism, Nutritional Status, and Role in Disease Prevention. In: Coulston AM, Boushey CJ. Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. Elsevier*; 2008: 807-832.
31. Mawer EB, Hann JT, Berry JL et al. *Vitamin D metabolism in patients intoxicated with ergocalciferol. Clin Sci (Lond)* 1985; 68(2): 135-141.
32. Pérez-Barrios C, Hernández-Álvarez E, Blanco-Navarro I et al. *Prevalence of hypercalcemia related to hypervitaminosis D in clinical practice. Clin Nutr* 2016. DOI: 10.1016/j.clnu.2016.02.017.
33. Hathcock JN, Shao A, Vieth R et al. *Risk assessment for vitamin D. Am J Clin Nutr* 2007; 85(1): 6-18.
34. Lothar T, Ansorg R, Arndt T et al. *Labor und Diagnose Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH Books*; 2005: 338-370.



# KAKOVOST PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNIL NA SLOVENSKEM TRGU V LUČI ZAKONODAJE O ZDRAVSTVENIH TRDITVAH NA ŽIVILIH

## QUALITY OF PROBIOTIC SUPPLEMENTS ON THE SLOVENIAN MARKET IN THE LIGHT OF LEGISLATION ON HEALTH CLAIMS ON FOODSTUFFS

AVTOR / AUTHOR:

Dr. Petra Mohar Lorbeg, dipl. živil. tehnol.  
Znan. svet. dr. Bojana Bogovič Matijašič\*,  
dipl. živil. tehnol.

*Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek  
za zootehniko, Inštitut za mlekarstvo in probiotike,  
Grobje 3, 1230 Domžale*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: bojana.bogovic@bf.uni-lj.si

### POVZETEK

Trg probiotikov v Evropski uniji je močno zaznamovala Uredba o prehranskih in zdravstvenih trditvah za živila, ki je v Sloveniji stopila v polno veljavo leta 2013. Kljub prizadevanju industrije in kopičenju znanstvenih dokazov o učinkih probiotikov na gostitelja v registru dovoljenih zdravstvenih trditvev za živila še vedno ni nobene za probiotike. Poleg tega raziskovalci že vrsto let opozarjajo na nezadostno kakovost probiotičnih izdelkov glede vsebnosti in živosti deklariranih mikroorganizmov. Namen te raziskave je bil ugotoviti, kako se omenjene regulatorne spremembe odražajo na označevanju in kakovosti probiotičnih prehranskih dopolnil iz slovenskih lekarn. Ugotovili smo, da se je večina proizvajalcev odzvala na nova pravila, saj so opustili navajanje zdravstvenih trditvev. Kakovost izdelkov se je nekoliko izboljšala, saj jih je 42 % popolnoma ustrezalo deklaraciji, medtem ko je bilo v raziskavi iz leta 2009 takšnih le 25 %.

### KLJUČNE BESEDE:

probiotična prehranska dopolnila, zdravstvene trditve, kakovost probiotičnih izdelkov, PCR

### ABSTRACT

The EU probiotics market has been strongly affected by the Regulation on nutrition and health claims for foods, which came into full effect in Slovenia by 2013. Despite efforts of the industry and accumulation of scientific evidence on the effects of probiotic microorganisms to the host, there are still no probiotic claims in the EU register of authorised health claims for foods. In addition, researchers have been pointing out for many years the insufficient quality of probiotic products related to the content and viability of declared microorganisms. The aim of the present study was to determine how these regulatory changes are reflected in the labeling and quality of probiotic supplements from Slovenian pharmacies. We found out that most producers considered the new rules, as they abandoned the health claims on the labels. The overall quality of the products on the market was slightly improved, as 42 % of them were in agreement with the label compared to only 25 % in the previous testing in 2009.

## KEY WORDS:

probiotic food supplements, health claims, quality of probiotic products, PCR

# 1 UVOD

Probiotične bakterije zaužijemo pretežno z živil in prehranskimi dopolnili, v manjši meri pa z zdravili in živila za posebne prehranske namene. Za prehranska dopolnila v Evropski uniji (EU) na splošno veljajo zakonska določila in smernice, ki urejajo varnost, kakovost in označevanje živil. V Sloveniji je za prehranska dopolnila od leta 2014 pristojno Ministrstvo za zdravje, pri čemer nadzor nad prehranskimi dopolnili izvaja Zdravstveni inšpektorat RS (ZIRS). Pomembnejše novosti je leta 2013 prinesel Pravilnik o prehranskih dopolnilih (1), ki je ukinil zahtevo po prijavljanju prehranskih dopolnil, ki so v prometu v Sloveniji. Obveščanje o novem prehranskem dopolnilu, preden pride na slovenski trg, pa je obvezno za tista prehranska dopolnila, ki so označena z zdravstvenimi trditvami (2, 3). Za to področje je pristojna Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ki deluje v okviru Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

V EU trenutno prehranskih dopolnil s probiotičnimi mikroorganizmi ni dovoljeno označevati, predstavljati ali oglaševati z zdravstvenimi trditvami, ker v registru prehranskih in zdravstvenih trditvev za živila še ni nobene dovoljene zdravstvene trditve za probiotike (4). Razlog za to tiči v zelo strogih stališčih Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) glede zdravstvenih trditvev. Z namenom zagotavljanja visoke ravni varstva potrošnikov tudi na tem področju je leta 2006 izšla Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (5). Za odobritev zdravstvene trditve za živila, med katera uvrščamo tudi prehranska dopolnila, je treba predložiti agenciji EFSA trdne znanstvene dokaze, pridobljene v obsežnih kontroliranih kliničnih raziskavah. Kljub dolgoletnim raziskavam in prizadevanjem raziskovalcev in industrije ter številnim znanstvenim dokazom za posamezne probiotične seve zaenkrat skozi sito presoje organov EFSA še ni prišla nobena zdravstvena trditvev za probiotike. Edina primera odobritve uporabe zdravstvenih trditvev za probiotike na področju Evrope (brez Rusije), v Švici, sta »podpora prebavi s skrajšanjem časa prehoda« za probiotični sev HOWARU *Bifidobacterium lactis* HN019 (Danone, DuPont), ki ga je

Švicarski zvezni urad za varno hrano in veterino odobril leta 2014, ter »prispeva k normalnemu delovanju prebavil z izboljšanjem konsistence blata in skrajšanjem časa prehoda« za *Lactobacillus casei* Yakult, ki ga je isti organ odobril leto kasneje (6).

Drugje po svetu je nadzor nad prehranskimi dopolnili, vključno s probiotičnimi, zelo različno urejen. V Kanadi, na primer, so lahko probiotična prehranska dopolnila, ki jih uvrščajo v t. i. »naravne izdelke za zdravje«, opremljena z informativnimi zdravstvenimi trditvami, ki jih po presoji dokumentacije odobri organizacija *Health Canada* (7, 8). V ZDA ima podobno vlogo *Food and drug administration* (FDA), ki pri prehranskih dopolnilih dovoljuje trditve o zmanjšanju tveganja za razvoj bolezni (9, 10). Bolj razširjene so trditve, ki opisujejo vlogo določene sestavine (npr. probiotičnih bakterij) pri vzdrževanju zdravja oz. vpliv na določene funkcije organizma, ne smejo pa omenjati bolezni in za razliko od zdravstvenih trditvev ne potrebujejo odobritve s strani FDA pred vstopom izdelka na trg. V azijsko-pacifiški regiji probiotične izdelke, kot so pri nas prehranska dopolnila, uvrščajo v kategorijo funkcionalne hrane. V Indiji nova zakonodaja, ki bo stopila v veljavo 2018, ne bo dovoljevala trditvev o zdravljenju bolezni, pač pa trditve o izboljšanju funkcij, ohranjanju zdravja, zmanjšanju tveganja za bolezni, vplivanju na imunski sistem in proti staranju (11, 12). Na Japonskem je leta 2015 začela veljati nova zakonodaja, ki je dopolnila prejšnji strožji sistem Foshu (*food for specified health uses*) in ki dopušča uporabo odobrenih trditvev o delovanju tudi pri živilih (13).

V Sloveniji je Uredba o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih, po prehodnem obdobju, ko je začel tudi register dovoljenih zdravstvenih trditvev (Register Skupnosti v zvezi s prehranskimi in zdravstvenimi trditvami, 20. člen Uredbe 1924/2006) (2-5), stopila v polno veljavo z letom 2013, ko je Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin začela izvajati inšpekcijski nadzor. Na nove zahteve so se morali odzvati tudi številni proizvajalci probiotičnih živil in prehranskih dopolnil, pri katerih so bile bolj ali manj neposredne zdravstvene trditve zelo razširjene. Te omejitve ne veljajo za zdravila s probiotiki ali za živila za posebne zdravstvene namene s probiotiki, ki sodijo v domeno Zakona o zdravilih (14) oz. Pravilnika o živilih za posebne zdravstvene namene (15).

Slovenska raziskava iz leta 2009 o kakovosti probiotičnih izdelkov, naprodaj v slovenskih lekarnah (16), kot tudi sorodne raziskave v drugih evropskih državah v tistem obdobju so pokazale vrsto pomanjkljivosti tovrstnih izdelkov, med katerimi so prevladovala nedoseganje deklariranega števila živih probiotičnih bakterij, odsotnost deklariranih



bakterij in uporaba nepravilnih ali pomanjkljivih imen prisotnih sevov (17-22).

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 PROBIOTIČNI IZDELKI

Probiotične izdelke smo kupili v lekarnah in spletnih lekarnah v Sloveniji. Do analize smo jih shranjevali v razmerah, navedenih na ovojnini izdelka.

### 2.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA DEKLARIRANIH BAKTERIJSKIH SKUPIN Z METODO ŠTETJA NA PLOŠČAH

Število mikroorganizmov posameznih skupin, rodov oz. vrst smo ugotavljali z nacepljanjem vzorcev na selektivna gojišča. Število bifidobakterij smo ugotavljali v skladu s standardom ISO 29981:2010 (23): gojišče TOS (Yakult) z mupirocinom (50 mg/L), anaerobna inkubacija, 72 ur pri 37 °C. Skupno število laktobacilov smo ugotavljali na gojišču Rogosa (Merck) z anaerobno inkubacijo 72 ur pri 37 °C. Število laktobacilov vrste *Lactobacillus acidophilus* smo ugotavljali v skladu z ISO 20128:2006 (24) na gojišču MRS (Merck) z dodatkom klindamicina (0,1 mg/L) in ciprofloksacina (10 mg/L), z anaerobno inkubacijo 72 ur pri 37 °C. Število bakterij vrste *Streptococcus thermophilus* smo ugotavljali na gojišču M17 (Merck), po 24-urni inkubaciji pri 37 °C. Število enterokokov smo ugotavljali na gojišču CAE (HiMedia) z dodatkom 2,3,5-tripenteniltetrazolijevga klorida (0,01 %) po 72-urni inkubaciji pri 37 °C. Za ugotavljanje števila bakterij vrste *Bacillus coagulans* smo primarne razredčitve vzorcev najprej 10 min segrevali pri 80 °C ter nato nacepili na gojišče TSA, ki smo ga inkubirali 72 ur pri 30 °C.

### 2.2 IZOLACIJA DNA

Za ugotavljanje prisotnosti deklariranih bakterijskih vrst smo uporabili DNA, ki smo jo izolirali iz mešanice kolonij, zraslih na ustreznih selektivnih gojiščih. Pri izdelkih, pri katerih nismo uspeli potrditi določenih vrst, smo uporabili še DNA, izolirano neposredno iz izdelka. DNA smo izolirali z uporabo komercialnega kompleta reagentov Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Najprej smo bakterijske celice lizirali, tako da smo suspenziji bakterijskih kolonij oz. su-

spenziji izdelka (30 do 50 mg izdelka v 600 µl 50 mM EDTA, pH 8,0) dodali lizocim (10 mg/ml; Sigma) in mutanolizin (25 U/ml; Sigma) ter inkubirali 60 min pri 37 °C. Ostale korake izolacije smo izvedli po navodilih proizvajalca.

### 2.3 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH BAKTERIJSKIH VRST S PCR

Prisotnost posameznih vrst probiotičnih bakterij smo ugotavljali s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR), pri čemer smo uporabili za posamezno vrsto specifične začetne oligonukleotide, in sicer za *Bifidobacterium (B.) animalis* ssp. *lactis*, *B. longum* (25), *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *infantis* (26) in *B. breve* (27); *Lactobacillus (L.) acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei* (28), *L. plantarum*, *L. salivarius* (29), *L. reuteri* in *L. rhamnosus* (30), *L. gasseri* (27) in *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (31); *Enterococcus faecium* (32); *Streptococcus thermophilus* (33) in *Bacillus coagulans* (34).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pregled ponudbe prehranskih dopolnil s probiotičnimi bakterijami oz. z živimi mlečnokislinskimi bakterijami ali bifidobakterijami v slovenskih lekarnah v letu 2016 je pokazal, da se izbor tovrstnih izdelkov delno pokriva z izborom iz leta 2009 (8 izdelkov), nekaterih izdelkov ni več naprodaj (13 izdelkov), nekaj pa je novih (10 izdelkov) (16). Naleteli smo tudi na probiotični izdelek, ki je uvrščen v skupino živil za posebne zdravstvene namene. V pregled smo ga vključili zato, ker je po sestavi in formulaciji zelo podoben sorodnim izdelkom, ki se tržijo kot prehranska dopolnila. Opisi na ovojnini ali priloženih lističih pri sedmih izdelkih, s katerimi smo se srečali že leta 2009, so bili precej spremenjeni (preglednica 1).

Večina so proizvajalci opustili navajanje pomoči pri vzpostavitvi porušene črevesne mikroflore, blagodejnega delovanja na imunski sistem, preventivnega delovanja 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), prispevanja k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi ali boljšega počutja oseb v zrelih letih. Omenjeni opisi, ki smo jih zasledili v prejšnji raziskavi, sicer niso ne-

Table 1: Descriptions on the probiotic dietary supplements from Slovenian pharmacies

Opis v času predhodne raziskave (2009)	Opis danes
»pomembni pri hitrem vzpostavljanju bakterijske flore in delovanja črevesja po zdravljenju z antibiotiki, diareji, stresu in prehranskih motnjah«	»žive mlečnokislinske bakterije in vitamini«; na spletu: »izdelek je koristen med in po zdravljenju z antibiotiki, pri zaprtju na potovanju, pri zastrupitvah doma in na počitnicah, kadar imamo oslABLJENO odpornost, tudi zaradi stresa«
»za osebe v zrelih letih – po 50. letu starosti, da bi ostale aktivne, vitalne, da bi se dobro počutile«; »probiotiki prispevajo k dobri presnovi esencialnih hranilnih snovi v prebavilih«; »aktivator zdravja, prehransko dopolnilo z živimi kulturami mlečnokislinskih bakterij, vitamini, minerali, rastlinskimi izvlečki in luteinom«	»bakterije v kombinaciji z ostalimi sestavinami sodelujejo pri presnovi in pomagajo ohraniti zdrav imunski sistem«
»pomaga ohraniti in vzpostavljati ravnovesje v črevesni mikroflori, ki preprečuje razmnoževanje škodljivih MO«	»probiotične tablete«; »ta bakterija je prilagojena na bivanje v prebavilih in je varna (klinične študije)«
»pomaga hitro uravnorežiti črevesno floro pri spremenjenih črevesnih funkcijah«; »probiotične bakterije zagotavljajo normalno prebavno in imunsko funkcijo črevesja«	»kombinacija probiotičnih kultur in vitaminov skupine B«; »mlečnokislinske bakterije (probiotične kulture) so sestavni del črevesne mikroflore, ki zagotavlja normalno prebavo in imunsko funkcijo črevesja«
»ta bakterija sodi med naravno mikrofloro materinega mleka pri zdravih materah«; »v telesu nastopa kot naravna sestavina črevesne flore«; »pomaga ohraniti in vzpostavljati ravnovesje v črevesni mikroflori, ki preprečuje razmnoževanje škodljivih MO«	»probiotične tablete«; »ta bakterija je prilagojena na bivanje v prebavilih in je varna (klinične študije)«
»izdelek je namenjen za ohranjanje ravnorežja v črevesni mikroflori med zdravljenjem z antibiotikom in po njem ter s tem poveča raven koristnih bakterij v črevesju«	»žive probiotične bakterije, ki se optimalno dopolnjujejo in so običajno prisotne v naših prebavilih«
»vpliva na ravnovesje črevesne flore«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»prispeva k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi (vitamini, minerali)«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»probiotične bakterije, ki jih ta prašek vsebuje, delujejo zaviralno na škodljive bakterije in tako pomagajo vzdrževati ravnorežje v črevesni mikroflori«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»za izboljšanje splošnega počutja pri zaprtju«; »za izboljšanje normalne prebave«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»uravnava ravnorežje mikroflore v gastrointestinalnem traktu v primeru diareje, gastrointestinalnih infekcij pri zdravljenju z antibiotiki«; »spodbuja imunski sistem«; »zmanjša alergične reakcije«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>





»izboljša stanje bakterijske flore«; »probiotiki ugodno delujejo na prebavo in pomagajo vzdrževati črevesno mikrofloro«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»pomaga pri vzpostavitvi porušene črevesne mikroflore«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»blagodejno deluje na imunski sistem«; »vzpostavi probiotično ravnotežje«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»blagodejni vpliv na prebavo, saj vzpostavi ravnovesje črevesne mikroflore«; »izdelek uporabljamo preventivno, pri dietah, pri bolezenskih stanjih: driska odraslih in otrok, preprečevanje driske ob antibiotični terapiji, kronične vnetne bolezni črevesja, atopijski dermatitis, različne alergije in kronična zaprtja«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»naravni regulator črevesne flore, ki pomaga pri ohranjanju in vzpostavitvi ravnovesja normalne črevesne flore«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
»probiotiki sodelujejo pri krepitevi naravne obrambe telesa«	<b>Izdelka ni več na trgu</b>
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»vsebuje žive kulture mlečnokislinskih bakterij«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»kombinacija 8 različnih vrst koristnih bakterij«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»probiotični kompleks s prebiotiki«:na spletu: »probiotični kompleks vsebuje probiotike ter prebiotike - oboji odlično vplivajo na samo prebavo in so nam v precejšnje pomoč«, »prehransko dopolnilo je primerno jemati ob terapijah z antibiotiki, saj tako nadomešča odmrle bakterije«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»vsebuje koristne bakterije in prebiotična vlakna«;»za osveževanje črevesne flore«;»priporočljivo po tretiranju z antibiotiki in po črevesnih infekcijah, za ponovno vzpostavitev mikrobnega ravnotežja«;na spletu: »vsebuje 7 različnih vrst koristnih probiotičnih bakterijskih kultur«, »priporočamo za namene dobre prebave in kot dodatek pri najrazličnejših antibiotičnih terapijah«, »zagotavlja vsesplošno dobro počutje«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»probiotik za usta, grlo in ušesa«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»probiotik z živimi mlečnokislinskimi bakterijami«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»probiotik za zdravo črevesje in prebavo«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»mlečnokislinske bakterije in probiotiki«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»za uravnoteženo črevesno mikrofloro«
<b>Izdelka še ni bilo na trgu</b>	»tablete z mlečnokislinskimi bakterijami za odpornost«; »vsebuje sedem različnih, naravnih, človeku lastnih sevov mlečnokislinskih bakterij (Laktobacili in Bifidobakterije)«;»priporočljiv med potovanji, med zdravljenjem z antibiotiki ter ob spremenjeni prehrani.«

posredne zdravstvene trditve, pa vendarle potrošnika nagovarjajo k uporabi pri določenih bolezenskih stanjih, zato danes niso sprejemljivi. Pri večini izdelkov, s katerimi smo se srečali že v prejšnji raziskavi, na obojnini ne najdemo opisov, ki bi omenjali učinkovanje dodanih bakterij, pač pa omenjajo, da so te bakterije žive, dobro prilagojene na življenje v prebavilih in varne. Pri enem izdelku smo samo na spletni strani zasledili opis, da je dopolnilo koristno pri zdravljenju z antibiotiki, zaprtju na potovanjih, zastrupitvah in oslABLjeni imunosti (35). Pri treh izdelkih smo zabeležili opise, ki omenjajo prebavo oz. presnovo in imunsko funkcijo črevesja, kar pa je že vprašljivo glede zahteve iz Pravilnika o prehranskih dopolnilih, da pri označevanju, predstavljanju in oglaševanju prehranskim dopolnilom ne smemo pripisovati lastnosti preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh (1, 36). Trditve se sicer ne nanašajo neposredno na seve v izdelku, nakazujejo pa možne načine delovanja.

Med prehranskimi dopolnili, ki jih leta 2009 še ni bilo na slovenskem trgu, smo se pri šestih srečali z nedovoljenimi trditvami, kot so »vplivajo na prebavo«, »primerno jih je jemati ob terapijah z antibiotiki«, »probiotik za usta, grlo in ušesa«, »probiotik za zdravje črevesa in dobro prebavo«, »za uravnoteženo črevesno mikrofloro«, »mlečnokislinske bakterije za odpornost« ali »priporočljiv med potovanji, med zdravljenjem z antibiotiki ter ob spremenjeni prehrani«.

Zanimiv je primer enega od proizvajalcev, ki je določen čas tržil tri izdelke z istim sevom in različnimi formulacijami, pri čemer sta bila dva deklarirana kot prehransko dopolnilo, eden pa kot živilo za posebne zdravstvene namene. Pri tem sta bili ciljna populacija in farmacevtska oblika izdelka, ki so ga tržili kot živilo za posebne zdravstvene namene, in enega od prehranskih dopolnil identični. V tem primeru se lahko vprašamo o upravičenosti uvrščanja takih izdelkov v povsem različne kategorije. Ni presenetljivo, da so se očitno razlikovale tudi oznake na omenjenih izdelkih, saj je bilo živilo za posebne zdravstvene namene opremljeno z nekaj zdravstvenimi trditvami (»za dietetsko uravnavanje prebavnih motenj pri dojenčkih od rojstva dalje in otrocih«, »driske med zdravljenjem z antibiotiki«, »vzdrževanje uravnotežene črevesne mikrobiote«), prehransko dopolnilo pa ne. Kasneje so sicer izdelek, ki je bil v iz kategorije živil za posebne zdravstvene namene, prekvalificirali v prehransko dopolnilo, zdravstvene trditve pa strnili v »za uravnoteženo črevesno mikrofloro«, vendar pa pri opisih izdelka v nekaterih spletnih lekarnah še vedno ostajajo zapisane prvotne trditve (37, 38).

Če povzamemo rezultate prvega dela raziskave, v katerem smo pregledali oznake pri 18 prehranskih dopolnilih (ne-

katere so bile pri dveh izdelkih identične, zato je zapisov v preglednici 1 manj), lahko zaključimo, da je izraz probiotik zapisan pri 11 od 18 pregledanih prehranskih dopolnil (61 %), ostali proizvajalci pa namesto tega navajajo opis »mlečnokislinske bakterije« ali »koristne bakterije«. Čeprav neposrednih zdravstvenih trditev, da probiotiki zdravijo ali preprečujejo določene bolezni, nismo zasledili, pa so skoraj pri polovici pregledanih prehranskih dopolnil deklaracije vprašljive zaradi trditev, ki lahko navajajo na zdravstvene učinke. Od decembra 2012 v EU izraza »probiotik« pri živilih, vključno s prehranskimi dopolnili, ne bi smeli uporabljati, saj že sama beseda namiguje na to, da izdelek lahko vpliva na zdravje. Mnogi so mnenja, da je tako omejevanje pretirano, če je izdelek kakovosten (ustrezno število živih mikroorganizmov, natančno opredeljenih sevov). V okviru slovenskega ciljnega raziskovalnega projekta »Prehranske in zdravstvene trditve na živilih« iz let 2011–2013 so navedbe »probiotik«, »probiotične kulture« in »probiotične bakterije«, ki so jih zasledili pri 33 % pregledanih jogurtov in fermentiranih mlečnih napitkov, obravnavali kot splošne zdravstvene trditve, ki so znanstveno neutemeljene (39). Sicer pa uporabo izraza »probiotik« ali »probiotični« v Sloveniji tudi po letu 2013 na splošno toleriramo.

Zelo razumno se zdi stališče odbora uglednih znanstvenikov, delujočih v okviru Mednarodnega znanstvenega združenja za probiotike in prebiotike ISSAP (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) (40), naj pojem »probiotični« uporabljamo samo za izdelke, ki vsebujejo ustrezno število živih, natančno opredeljenih sevov mikroorganizmov, za katere je mogoče pričakovati, da bodo delovali v korist zdravja in dobrega počutja gostitelja. Razlikujejo med tremi kategorijami izdelkov: tistimi brez zdravstvenih trditev, tistimi z zdravstvenimi trditvami in probiotičnimi zdravili. Uvrščanje v posamezno kategorijo bi bilo mogoče samo na osnovi dokazov iz kliničnih raziskav, pri čemer za prvo kategorijo ne bi bilo potrebno dokazovanje za seve v izdelku, ampak bi zadostovali podatki v literaturi za to vrsto, v drugih dveh kategorijah pa bi bilo to dokazovanje potrebno. Od probiotikov brez zdravstvenih trditev bi pričakovali splošne učinke pri ohranjanju zdravja, od tistih z zdravstvenimi trditvami učinke pri podpori zdravljenju, od probiotičnih zdravil pa neposredne učinke vplivanja na bolezen, pri čemer bi se trditve za zdravila in druge probiotike seveda razlikovale. Menijo, da bi taka ureditev prispevala k napredku in zagotovila nadaljnji interes in vlaganja s strani industrije.

Kar zadeva navajanje imen sevov, kar je za probiotike zelo pomembno in je zapisano že v smernicah FAO/WHO iz

leta 2002 (41), rezultati te raziskave kažejo, da je stanje dobro, saj le pri treh izdelkih nismo našli oznak za seve, ampak samo imena vrst (preglednica 2). Pri prejšnji raziskavi (16) pri več kot polovici izdelkov (11 od 20) oznak za seve

ni bilo. Nekateri proizvajalci so dopolnili deklaracije z imeni sevov, en proizvajalec pa je pri dveh izdelkih popravil napačno poimenovanje vrste iz *Lactobacillus sporogenes*, ki je zastarelo ime, v pravilno *Bacillus coagulans*.

**Preglednica 2:** Ustreznost probiotičnih prehranskih dopolnil ( $n = 18$ ) in živil za posebne zdravstvene namene ( $n = 1$ ) iz slovenskih lekarn glede prisotnosti deklariranih bakterijskih vrst in njihovega števila.

**Table 2:** Suitability of probiotic dietary supplements ( $n=18$ ) and foods for special medical purposes ( $n=1$ ) from Slovenian pharmacies in terms of the presence of labelled bacterial species and their number.

Deklarirani sevi	Čas do izteka (mesece)	Deklarirano število	Ugotovljeno število	Ustreznost
<b>Prehranska dopolnila</b>				
<i>L. acidophilus</i> LAB ATCC7050 <i>L. acidophilus</i> LA-14 <i>L. paracasei</i> LPC-37 <i>L. plantarum</i> LP-115 <i>B. lactis</i> BL-04	18	$1,6 \times 10^{10}$ cfu /stekleničko; $1,1 \times 10^{10}$ cfu /stekleničko <i>L. acidophilus</i> LAB ATCC7050 ter $0,5 \times 10^{10}$ cfu/stekleničko mešanice ostalih štirih sevov	Bifidobakterije: $< 10^5$ cfu/stekleničko Laktobacili: $< 10^5$ cfu/stekleničko;	<b>ne ustreza</b> – premajhno število (podobno tudi leta 2009)
<b>L. gasseri</b> PA 16/8 <b>B. bifidum</b> MF 20/5 <b>B. longum</b> SP 07/3	19	$10^7$ cfu/tableto	$3,9 \times 10^7$ cfu/tableto	<b>ustreza</b> (ustrezno tudi leta 2009)
<b>L. reuteri</b> Protectis DSM 17938	9	$10^8$ cfu/tableto	$9,9 \times 10^7$ cfu/tableto	<b>ustreza</b> (leta 2009 je bilo število premajhno)
<b>L. acidophilus</b> La-14 <b>L. bulgaricus</b> Lb-64 <b>B. coagulans</b> BC599 <b>S. thermophilus</b> St-21 <b>B. animalis lactis</b> BI-04 <b>B. breve</b> Bb-03	16	$7,5 \times 10^8$ cfu/kapsulo	$2,5 \times 10^8$ cfu/kapsulo	<b>delno ustreza</b> – število je 0,48 log cfu manjše od deklariranega (leta 2009 izdelek ni bil ustrezen)
<b>L. acidophilus</b> La-14L. <i>bulgaricus</i> Lb-64 <b>B. coagulans</b> BC599 <b>S. thermophilus</b> St-21 <b>B. animalis lactis</b> BI-04 <b>B. breve</b> Bb-03	16	$1,5 \times 10^9$ cfu/vrečko	$1,2 \times 10^9$ cfu/vrečko	<b>delno ustreza</b> – število je za 0,1 log manjše od deklariranega, prisotnosti ene od deklariranih vrst nismo uspeli potrditi (leta 2009 izdelek ni bil ustrezen)
<b>L. reuteri</b> Protectis	14	$10^8$ cfu/5 kapljic	$2,1 \times 10^7$ cfu/5 kapljic	<b>ne ustreza</b> – premajhno število (enako leta 2009)

<b>B. bifidum</b> <b>B. lactis</b> <b>L. acidophilus</b> (2×) <b>L. paracasei</b> <b>L. plantarum</b> <b>L. rhamnosus</b> <b>L. salivarius</b> <b>E. faecium</b>	9	5 × 10 <sup>9</sup> cfu/vrečko	1,1 × 10 <sup>10</sup> cfu/vrečko	<b>ustreza</b> (ustrezen tudi leta 2009)
<b>L. gasseri</b> PA 16/8 <b>B. bifidum</b> MF 20/5 <b>B. longum</b> SP 07/3	25	1,0 × 10 <sup>7</sup> cfu/tableto	3,6 × 10 <sup>7</sup> cfu/tableto	<b>ustreza</b> (leta 2009 število ni bilo deklarirano)
<b>L. acidophilus</b> (La-14) <b>L. casei</b> (Lc-11) <b>L. rhamnosus</b> (Lr-32) <b>L. salivarius</b> (Ls-33) <b>S. thermophilus</b> (St-21) <b>B. bifidum</b> (Bb-02) <b>B. longum</b> (BI-05) <b>B. lactis</b> (BI-04)	15	Ob proizvodnji: 1,1 × 10 <sup>10</sup> cfu /kapsulo Konec roka uporabnosti: 4 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo; <b>L. acidophilus</b> (La-14): 1,2 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo <b>L. casei</b> (Lc-11): 6 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>L. rhamnosus</b> (Lr-32): 6 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>L. salivarius</b> (Ls-33): 6 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>S. thermophilus</b> (St-21): 4 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>B. bifidum</b> (Bb-02): 2 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>B. longum</b> (BI-05): 2 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>B. lactis</b> (BI-04): 2 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo Laktobacili skupaj: 3 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 6 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo	Laktobacili skupaj: 1,1 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 1,7 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>S. thermophilus</b> : 7,1 × 10 <sup>7</sup> cfu/kapsulo Skupaj: 1,3 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo	<b>ne ustreza</b> – število je premajhno (laktobacili za 0,44 log cfu, bifidobakterije za 0,55 log cfu, <i>S. thermophilus</i> za 0,75 log cfu)
<b>L. plantarum</b> <b>L. casei</b> <b>L. rhamnosus</b> <b>L. acidophilus</b> <b>B. lactis</b>	18	<b>L. plantarum</b> : 1 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo <b>L. casei</b> : 8 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>L. rhamnosus</b> : 7 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>L. acidophilus</b> : 5 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <b>B. lactis</b> : 5 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo Laktobacili skupaj: 3,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 5,0 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo (ob času izdelave)	Laktobacili skupaj: 5,6 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 5,6 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo	Podatek o vsebnosti je podan le ob času izdelave, zato ocena ustreznosti ni mogoča. Ene od deklariranih vrst v izdelku nismo uspeli potrditi.



<b>L. rhamnosus</b> LrGG-100 <b>B. breve</b> BB S01 <b>S. thermophilus</b> ST-228 <b>L. casei subsp. casei</b> LC-88 <b>L. bulgaricus</b> LB-271 <b>L. acidophilus</b> LA-99 <b>B. longum</b> BL-11	12	1,6 × 10 <sup>9</sup> cfu/2 kapsuli	2,6 × 10 <sup>9</sup> cfu/2 kapsuli	<b>ustreza</b>
<i>L. acidophilus</i> <i>S. salivarius</i> K12	10 dni	3,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo; <i>L. acidophilus</i> : 2,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo <i>S. salivarius</i> : 1,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo	< 1000 cfu/kapsulo	<b>ne ustreza</b> – število je premajhno
<b>L. rhamnosus</b> LR-32 <b>B. lactis</b> BL-04	16	2,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/2 vrečki	Skupaj: 6,4 × 10 <sup>9</sup> cfu/2 vrečki	<b>ustreza</b>
<b>B. bifidum</b> (HA-132) <b>B. longum</b> (HA-135) <i>L. acidophilus</i> (HA-122) <b>L. paracasei</b> (HA-196) <b>L. rhamnosus</b> (HA-111)	16	2,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo Laktobacili skupaj: 1,6 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 4,0 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <i>L. acidophilus</i> : 2,0 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo	Laktobacili skupaj: 1,8 × 10 <sup>9</sup> cfu/g kapsulo Bifidobakterije skupaj: 2,7 × 10 <sup>8</sup> cfu/kapsulo <i>L. acidophilus</i> : 2,1 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo Skupaj 4,2 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo	<b>ustreza</b>
<b>L. rhamnosus</b> GG	21	1,4 × 10 <sup>9</sup> cfu/7 kapljic	1,8 × 10 <sup>9</sup> cfu/7 kapljic	<b>ustreza</b>
<b>L. rhamnosus</b> GG	10	1,4 × 10 <sup>9</sup> cfu/7 kapljic	3,1 × 10 <sup>8</sup> cfu/7 kapljic	<b>ne ustreza</b> – število je premajhno
<b>L. rhamnosus</b> GG	21	1,0 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo	5,4 × 10 <sup>9</sup> cfu/kapsulo	<b>delno ustreza</b> (število je za 0,27 log cfu manjše od deklariranega)
<b>L. acidophilus</b> <b>L. casei</b> <b>L. plantarum</b> <b>L. reuteri</b> <b>L. rhamnosus</b> <b>B. longum</b> <b>S. thermophilus</b>	10	10 <sup>9</sup> cfu/tableto	8,0 × 10 <sup>8</sup> cfu/tableto	<b>delno ustreza</b> (število je za 0,10 log cfu manjše od deklariranega)



ŽIVILA ZA POSEBNE ZDRAVSTVENE NAMENE

<p><b>S. thermophilus</b> DSM 24731  <i>B. breve</i> DSM 24732  <b>B. longum</b> DSM 24736  <i>B. infantis</i> DSM 24737  <b>L. acidophilus</b> DSM 24735  <b>L. plantarum</b> DSM 24730  <b>L. paracasei</b> DSM 24733  <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSM 24734</p>	15	4,5 × 10 <sup>11</sup> probiotičnih bakterij/vrečko	8,0 × 10 <sup>11</sup> cfu/vrečko	<b>ne ustreza</b> – število sicer ustreza deklaraciji, vendar nismo uspeli potrditi prisotnosti treh deklariranih vrst
---	----	---	-----------------------------------	--

*B.* rod *Bifidobacterium*

*L.* rod *Lactobacillus*

*B.* rod *Bacillus*

*S.* rod *Streptococcus*

*E.* rod *Enterococcus*

cfu število kolonijskih enot (*colony forming units*)

Imena deklariranih vrst, ki smo jih v izdelku potrdili z za vrsto specifično PCR, so odebeljena.

Kar zadeva število in prisotnost deklariranih bakterij, nismo zasledili bistvenega izboljšanja glede na predhodno raziskavo, ki je opozorila na premajhno število živih bakterij kar pri 75 % pregledanih izdelkov (16). Pri osmih izdelkih, ki so bili vključeni v obe raziskavi, smo pri polovici ugotovili število kolonijskih enot, manjše od deklariranega, v obeh raziskavah (pri dveh tokrat za manj kot 0,5 log<sub>10</sub>). Dva izdelka sta se izkazala za ustrezna v obeh raziskavah, dva pa le v zadnji. Od izdelkov, s katerimi smo se prvič srečali v tej raziskavi, so bili štiri izdelki ustrezni, pet pa jih je vsebovalo manj živih bakterij od deklariranih, pri čemer jih v enem izdelku sploh nismo zasledili, pri dveh pa so bila odstopanja manjša od 0,5 log<sub>10</sub>. Razlik, manjših od polovice log<sub>10</sub>, navadno ne obravnavamo kot pomembno odstopanje od deklariranih vrednosti, saj moramo upoštevati tudi običajna odstopanja metode štetja na ploščah (42). Pri enem izdelku je bil deklariran podatek o številu probiotičnih bakterij ob času proizvodnje, tako da o ustreznosti ne moremo soditi. Eden izmed izdelkov, ki smo ga kupili v spletni lekarni, je imel ob dobavi do izteka roka trajanja le še 30 dni. Ker je v izdelku 90 kapsul, zaužili pa naj bi eno na dan, ni mogoče, da bi vse tablete zaužili znotraj navedenega roka trajanja. Ob naročilu izdelka nas na to niso opozorili, medtem ko smo pri drugi spletni lekarni opazili, da so probiotični izdelek, ki je bil tik pred iztekom roka uporabnosti, prodajali po 50 % nižji ceni.

Izdelek iz skupine živil za posebne zdravstvene namene je glede števila živih bakterij v izdelku ustrezal navedbam na deklaraciji, vendar pa nismo uspeli potrditi prisotnosti kar

treh od osmih deklariranih bakterijskih vrst. Pri prehranskih izdelkih je večina izdelkov (13 od 16) vsebovala vse deklarirane vrste, pri treh izdelkih pa prisotnosti ene od petih oz. šestih deklariranih vrst nismo potrdili.

Skladnost vsebnosti probiotičnih bakterij z deklariranimi števili kolonijskih enot (cfu/g ali cfu/enoto izdelka) ter pravilnost pri navajanju drugih podatkov (pravilna imena sevov, priporočeni odmerki izdelka, podatki o drugih sestavinah) mora biti zagotovljena že zaradi upoštevanja krovne živilske zakonodaje (Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo), v kateri je zapisano, da morajo biti vsa prehranska dopolnila varna za uživanje in primerno označena (36).

Na pomanjkljivosti probiotičnih izdelkov, predvsem prehranskih dopolnil s probiotiki, raziskovalci opozarjajo že vrsto let (16-22). Tudi nedavne raziskave kažejo, da kakovost še vedno ni zadovoljiva. Od 52 probiotičnih prehranskih dopolnil z ameriškega tržišča jih 33 % ni zadostilo deklariranim številom kolonijskih enot, še več (42 %) pa je bilo takih s pomanjkljivimi taksonomskimi podatki, manjkajočimi vrstami ali prisotnostjo nedeklariranih vrst (43). Samo en izdelek od 16, prav tako z ameriškega tržišča, je vseboval prav vse deklarirane vrste oz. podvrste bifidobakterij (44). Prehranska dopolnila z italijanskega tržišča (14) so se nekoliko bolje odrezala glede števila kolonijskih enot, saj na polovici roka uporabnosti le pri treh izdelkih število ni dosegalo deklariranega, tri mesece pred iztekom pa pri petih. Poleg tega je bil en sev napačno poimenovan (*L. casei* namesto *L. paracasei*) (45). V pet let starejši raziskavi (2011), v kateri so zajeli 24 prehranskih dopolnil s



probiotiki z italijanskega tržišča, so našli več neustreznih (42 %), kar zadeva število kolonijskih enot. Poleg tega pri štirih izdelkih niso izsledili živih predstavnikov katere od deklariranih vrst, pri dveh od teh pa so posamezne vrste izostale tudi pri molekularnih analizah, kjer zajamemo tudi nežive bakterije (42). Pregled 25 izdelkov s poljskega tržišča, med katerimi je bilo največ prehranskih dopolnil (16), nekaj živil za posebne zdravstvene namene (7) in dva medicinska izdelka, je prav tako pokazal nekaj pomanjkljivosti (46). Pri treh izdelkih so odkrili neujemanje deklariranih vrst z najdenimi, pri treh pa živih bakterij niso detektirali. Veliko izdelkov je vsebovalo premalo živih bakterij, pri čemer so bile opazne velike razlike med serijami in glede na čas, ki je minil od proizvodnje. V predhodni slovenski raziskavi smo s preiskovanjem bakterijskih kolonij z za vrsto specifično PCR večinoma (pri 14 izdelkih od 20) potrdili prisotnost navedenih vrst, z izjemo izdelkov z velikim številom različnih bakterijskih sevov (6-8 sevov), pri katerih v nobenem primeru med živimi bakterijami nismo našli vseh navedenih vrst (16).

Medtem ko za ugotavljanje števila živih probiotikov v izdelkih ne moremo brez klasičnega štetja na ploščah, vsaj dokler bodo proizvajalci navajali število probiotikov v teh enotah, pa so za potrjevanje deklariranih vrst ali podvrst nujne molekularne metode. Kot kažejo zgoraj omenjene raziskave, je najbolj razširjena za te namene metoda verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR). Moramo pa upoštevati, da skupno bakterijsko DNA lahko pridobimo neposredno iz izdelka ali pa iz izraslih kolonij. V prvem primeru nam rezultati analiz ne povedo ničesar o živosti predstavnikov najdene vrste, v drugem primeru pa ciljamo le na žive bakterije v izdelku oz. natančneje na kultivabilne bakterije. Danes so na voljo tudi izboljšane metode, kot je metoda PCR v realnem času, ki v kombinaciji s tretiranjem vzorcev s propidijevim monoazidom (PMA-PCR) omogoča razlikovanje nepoškodovanih bakterij od mrtvih (47). Tudi tekočinska citometrija se uveljavlja kot standardna metoda za preiskovanje živosti probiotičnih bakterij v izdelkih, vendar za razliko od PMA-PCR ne omogoča razlikovanja med vrstami (48).

Kar zadeva kontaminante, jih najlaže izsledimo z zmogljivimi molekularnimi metodami, kot so sekvenciranje nove generacije (NGS, *next generation sequencing*) ali hibridizacija na mikromrežah DNA. S temi analizami morebitne kontaminante sicer odkrijemo, ne vemo pa, ali so dejansko živi, neživi ali pa smo zasledili le DNA, ki pripada nedeklariranim vrstam, zato v teh primerih proizvajalcem težko očitamo odstopanje od kakovosti. Toda tudi taki pristopi si utirajo pot v kontrolo kakovosti probiotičnih izdelkov.

Tako imenovana »*FDA GutProbe*«, na primer, je uporabna za identifikacijo deklariranih bakterij v izdelkih z zmesjo probiotičnih sevov, do ravni vrste in seva, ter za ugotavljanje razlike v sestavi med serijami, kar je uporabno predvsem za zagotavljanje dobre proizvodne prakse (49). Uporabno in vse dostopnejše je tudi masovno globinsko sekvenciranje pomnožkov za 16S rDNA, ki je najbolj razširjen filogenetski označevalec, pri čemer uporabimo celotno bakterijsko DNA iz vzorcev in lahko za veliko vzorcev naenkrat dobimo vrstno sestavo in kvantitativno relativno zastopanost posameznih vrst (43). Tak pristop je možen šele danes, ko so na voljo celi genomi za številne bakterijske vrste in ko je ugotavljanje celih genomov pri industrijskih sevih postalo dosegljivo. Dokler genomi posameznih industrijskih sevov niso javno dostopni, pa prednosti lahko izkoristijo le proizvajalci sami. Morovic in sod. (43), na primer, so izkoristili tako javno dostopne genome kot tiste iz lastne podatkovne zbirke (*Du Pont Nutrition and Health*), da so skonstruirali začetne oligonukleotide za multiplex PCR, ki so jo uspešno uporabili za potrjevanje deklariranih in detekcijo nedeklariranih vrst ali podvrst v komercialnih probiotičnih izdelkih na ameriškem trgu.

Dejstvo, da metoda štetja na ploščah, ki jo tradicionalno uporabljamo za ugotavljanje kakovosti probiotičnih izdelkov, ni najprimernejša, je splošno sprejeto. Med glavnimi pomanjkljivostmi te metode je nezadostna selektivnost razpoložljivih gojišč, kar lahko vodi v precenjeno število posameznih probiotičnih bakterij. Upoštevati moramo tudi, da sposobnosti razmnoževanja oz. kultivabilnosti probiotičnih bakterij v laboratorijskih razmerah ne moremo enačiti z živostjo in aktivnostjo. A dokler proizvajalci deklarirajo probiotične bakterije na izdelkih v enotah cfu/g ali cfu/enoto izdelka, štetje na ploščah (50) ostaja nepogrešljiva metoda za ugotavljanje kakovosti, vsaj kar zadeva deklarirano število probiotičnih sevov v izdelku. Hitrejše in velikokrat tudi cenejše naprednejše metode pa so le dobrodošla alternativa, uporabna v rutinski kontroli med proizvodnjo. Za potrjevanje identitete sevov ali vrst pa so omenjene alternativne metode povsem primerne. Metodi PCR ali multiplex PCR ostaja še vedno najuporabnejša za potrjevanje vrste ali podvrste, pri čemer najbolj razširjen filogenetski označevalec 16S rDNA v zadnjem času nadomeščajo z drugimi, kot je npr. gen za glukoza-6-fosfat izomerazo (*pgi*) (43).

V času, ko smo soočeni s spreminjanjem urejanja področja probiotikov, ne samo v Evropi, ampak tudi v drugih delih sveta, je pomembno slediti spremembam in razvoju metod, ki so uporabne tudi za kontrolo kakovosti probiotičnih izdelkov.

# 4 SKLEP

Proizvajalci so se do neke mere odzvali na nova pravila EU o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih, ki veljajo tudi za prehranska dopolnila. To je opazno v označevanju izdelkov na deklaracijah (ovojnina oziroma priloženi lističi z informacijami) in njihovem oglaševanju ter trženju, kjer so proizvajalci, razen redkih izjem, opustili navajanje pričakovanih učinkov na zdravje ljudi. Podobno kot smo ugotovili že v raziskavi kakovosti probiotičnih izdelkov iz slovenskih lekarn pred sedmimi leti, tudi izsledki te raziskave kažejo na nezadostno kakovost probiotičnih prehranskih dopolnil, ki se kaže v odstopanju pri številu živih probiotičnih bakterij oz. v odsotnosti deklariranih vrst, ter na potrebo po redni kontroli kakovosti tovrstnih izdelkov.

# 5 LITERATURA

1. *Pravilnik o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 82/03, 44/04, 72/05, 22/07, 104/10 in 66/13).*
2. *Uredba o izvajanju uredbe (ES) Evropskega Parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (Uradni list RS, št. 80/07).*
3. *Uredba o izvajanju uredbe (ES) Evropskega Parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (Uradni list RS, št. 38/07).*
4. *European Commission. EU register on nutrition and health claims. [http://ec.europa.eu/food/safety/labelling\\_nutrition/claims/register/public/?event=register.home](http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home). Dostop: 27-9-2017.*
5. *Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih.*
6. *Starling S: Yakult wins Swiss probiotic health claim. <http://www.Nutraingredients.Com/regulation-policy/yakult-wins-swiss-probiotic-health-claim>. Dostop: 27-9-2017.*
7. *Reid G. Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Cl Ga* 2016; 30: 17-25.*
8. *Health Canada. Guidance document for the use of probiotic microorganisms in food.*
9. *Sanders ME, Levy DD. The science and regulations of probiotic food and supplement product labeling. *Ann Ny Acad Sci* 2011; 1219: E1-E23.*
10. *FDA. Label claims for conventional foods and dietary supplements. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/Labeling/Nutrition/ucm111447.htm>. Dostop: 27-9-2017.*
11. *Arora M, Sharma S, Baldi A. Comparative Insight of Regulatory Guidelines for Probiotics in USA, India and Malaysia: A Critical Review. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 2013; 2: 51-64.*
12. *Food Safety and Standards Authority of India. Direction under section 16(5) of Food Safety and Standards Act, 2006 regarding operationalisation of standards of Health Supplements, Nutraceuticals, Food for Special Dietary Use, Food for Special medicinal Purpose, Functional Food and Novel Food. [http://old.fssai.gov.in/Portals/0/pdf/Direction\\_Operationalisation\\_HS\\_SMP\\_NF\\_Nutra\\_24\\_11\\_2016.pdf](http://old.fssai.gov.in/Portals/0/pdf/Direction_Operationalisation_HS_SMP_NF_Nutra_24_11_2016.pdf). Dostop: 27-9-2017.*
13. *Consumer Affairs Agency, Government of Japan. What are foods with function claims. [http://www.caa.go.jp/foods/pdf/151224\\_1.pdf](http://www.caa.go.jp/foods/pdf/151224_1.pdf). Dostop: 27-9-2017.*
14. *Zakon. o zdravilih (Uradni list RS, št. 9/96, 19/96 – popr., 101/99 – ZZMP, 52/00 – ZZUZIS in 17/14 – ZZdr-2).*
15. *Pravilnik o živilih za posebne zdravstvene namene (Uradni list RS, št. 54/07, 2/09 in 38/14).*
16. *Bogovič Matjašič B, Zorič Peternel M, Rogelj I. Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu. *Farm Vest* 2010; 61: 263-269.*
17. *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.*
18. *Temmerman R, Pot B, Huys G et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol* 2003; 81(1): 1-10.*
19. *Elliot E, Teversham K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. *S Afr Med J* 2004; 94(2): 121-4.*
20. *Aureli P, Fiore A, Scalfaro C et al. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *Int J Food Microbiol* 2010; 137(2-3): 265-273.*
21. *Huff BA. Caveat emptor. "Probiotics" might not be what they seem. *Can Fam Physician* 2004; 50: 583-7.*
22. *Bogovič Matjašič B, 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.*
23. *ISO 29981: Milk products – enumeration of presumptive bifidobacteria – colony count technique at 37 °C, 2010.*
24. *ISO 20128: Milk products – enumeration of presumptive Lactobacillus acidophilus on a selective medium - colony-count technique at 37 °C, 2006.*
25. *Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T et al. Comparison of real-time PCR with SYBR green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 2003; 149: 269-277.*
26. *Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Env Microbio*, 1999; 65: 4506-4512.*
27. *Song Y-L, Kato N, Liu C-X et al. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex pcr assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 187: 167-173.*
28. *Ward LJH, Timmins MJ. Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 90-92.*
29. *Chagnaud P, Machinis K, Coutte LcA et al. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: Application to six common Lactobacillus species. *J Microbiol Meth* 2001; 44: 139-148.*



30. Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A et al. Detection and identification of gastrointestinal lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Env Microbiol* 2000; 66: 297-303.
31. 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 Env Microbiol* 1999; 65: 4351-4356.
32. 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.
33. 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.
34. Liu Y, Liu S, Zhou F et al. Study on rapid detection of *Bacillus coagulans* by PCR. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* 2010; 4: 712-713.
35. Lekarnar.com, spletna poslovalnica Lekarne Nove Poljane. <http://www.lekarnar.com/izdelki/yogermi-100-kapsule>. Dostop: 09-06-2017.
36. Zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (Uradni list RS, št. 42/02 in 47/04).
37. Moja lekarna, spletna poslovalnica Lekarne Žužemberk. <https://www.moja-lekarna.com/waya-lgg-probiotice-kapljice-za-dojencke-in-otroke-10-ml>. Dostop: 26-04-2017.
38. Lekarnar.com, spletna poslovalnica Lekarne Nove Poljane. <http://www.lekarnar.com/izdelki/waya-lgg-probiotice-kapljice-za-dojencke-in-otroke>. Dostop: 26-04-2017.
39. Pravst I, Kušar A, Pohar J et al. Prehranske in zdravstvene trditve na živilih v Sloveniji. Zaključno poročilo CRP projekta V7-110, 2011; [http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/D ELOVNA\\_PODROCJA/Zivila/trditve/CRP-Zagotovimo\\_si\\_hrano-Zakljucno\\_porocilo.pdf](http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/D ELOVNA_PODROCJA/Zivila/trditve/CRP-Zagotovimo_si_hrano-Zakljucno_porocilo.pdf). Dostop: 27-9-2017
40. Hill C, Guarner F, Reid G et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastro Hepa*, 2014; 11:506-514.
41. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, April 30 – May 1, 2002. [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1). Dostop: 27-9-2017.
42. Toscano M, de Vecchi E, Rodighiero V et al. Microbiological and genetic identification of some probiotics proposed for medical use in 2011. *J Chemotherap*, 2013; 25:156-161.
43. Morovic W, Hibberd AA, Zabel B et al. Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases. *Front Microbiol* 2016; 7.
44. Lewis ZT, Shani G, Masarweh CF et al. Validating bifidobacterial species and subspecies identity in commercial probiotic products. *Pediatr Res* 2016; 79:445-452.
45. Blandino G, Fazio D, Petronio GP et al. Labeling quality and molecular characterization studies of products containing *Lactobacillus* spp. strains. *Int J Immunopath Ph* 2016; 29:121-128.
46. Zawistowska-Rojek A, Zareba T, Mrówka A et al. Assessment of the Microbiological Status of Probiotic Products. *Pol J Microbiol* 2016; 65:97-104.
47. Kramer M, Obermajer N, Bogovič Matijašič B et al. 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.
48. ISO 19344 (IDF 232): Milk and milk products – starter cultures, probiotics and fermented products – quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry, 2015.
49. Patro JN, Ramachandran P, Lewis JL et al. Development and utility of the FDA 'GutProbe' DNA microarray for identification, genotyping and metagenomic analysis of commercially available probiotics. *J Appl Microbiol* 2015; 118:1478-1488.
50. ISO 7889 (IDF 117): Yogurt — enumeration of characteristic microorganisms — colony-count technique at 37 °C, 2003.

# IMUNOGENOST BIOLOŠKIH ZDRAVIL

## IMMUNOGENICITY OF BIOLOGICAL DRUGS

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Sodobna biološka zdravila omogočajo spoprijemanje z boleznimi, ki so še pred nekaj desetletji veljale za neobvladljive. Številnih bolezenskih stanj seveda tudi danes ne znamo ozdraviti, a z razkritji molekularnih mehanizmov patofizioloških procesov se je močno razširil nabor prijemašč, na katera lahko zelo selektivno delujemo s strukturno zapletenimi (proteinskimi) učinkovinami in posledično vsaj učinkovito zavremo napredovanje bolezni ali izboljšamo kakovost bolnikovega življenja. Proteinske učinkovine izdelujemo z genskim inženirstvom (npr. hormone, citokine, dejavnike koagulacije in terapevtske encime), sintezno (le zelo majhne proteine, zgrajene iz do ~50 aminokislinskih ostankov) ali s hibridno tehnologijo (monoklonska protitelesa). Izražamo jih v celičnih kulturah ali transgenih organizmih, ki jih gojimo v nadzorovanih laboratorijskih pogojih, in jih izoliramo ter prečistimo v večstopenjskih procesih. Proizvodni proces izrazito vpliva na kakovost biološke učinkovine in je eden osrednjih dejavnikov, ki sooblikujejo njen imunogeni potencial (1). Aplikacija bioloških zdravil pri mnogih pre-

## POVZETEK

Odziv imunskega sistema prejemnika na učinkovino je eden od najpomembnejših in hkrati najpogostejših neželenih učinkov, povezanih z aplikacijo bioloških zdravil. Protitelesa, usmerjena proti učinkovini, lahko vplivajo na metabolizem in zadrževanje učinkovine v organizmu ali neposredno tekmujejo z endogenimi receptorji za njeno vezavo in so zato odgovorna za znižano učinkovitost zdravljenja. Dejavniki, ki vplivajo na imunogenost, so številni in ne povsem pojasnjeni. Prispevek poskuša povzeti aktualno razumevanje zapletenih procesov, ki vodijo do indukcije protiteles, in na osnovi tega pojasniti, katere ukrepe lahko sprejmemo za omejevanje imunogenosti v vseh fazah življenjskega cikla biološkega zdravila.

## KLJUČNE BESEDE:

biološka zdravila, imunogenost, protitelesa proti učinkovini

## ABSTRACT

Immunogenicity is one of the most important as well as most common adverse effects accompanying the application of biological drugs. Anti-drug antibodies can either affect metabolism and biological half-life of therapeutic proteins or compete with endogenous receptors for drug binding, thereby being responsible for the loss of efficacy over time. Factors contributing to immunogenicity are diverse and not fully understood. In the paper, current understanding of complex processes leading to induction of anti-drug antibodies is presented. Appropriate actions to mitigate immunogenicity of biological drugs are also discussed.

## KEY WORDS:

biological drugs, immunogenicity, anti-drug antibodies

jemnikih izzove imunski odziv, kar se največkrat kaže kot pojav protiteles proti učinkovini. Protitelesa so odgovorna za spremenjeno farmakokinetiko biološke učinkovine, lahko pa z vezavo na učinkovino neposredno onemogočijo njeno vezavo na receptor (2). Nekatera biološka zdravila pri subpopulacijah bolnikov sprožijo alergijske reakcije ali sindrom sproščanja citokinov, ki veljata za resna neželena učinka. V prispevku bomo pojasnili klinične posledice imunogenosti in jih podkrepili s primeri. Predstavili bomo imunske me-





hanizme, ki vodijo do pojava protiteles proti biološkim učinkovinam, in dejavnike, ki vplivajo na imunogenost. Na kratko bomo povzeli metodološke pristope za napovedovanje imunogenosti učinkovine med predkliničnimi raziskavami in za spremljanje imunogenosti biološkega zdravila v okviru kliničnih vrednotenj. Orisali bomo tudi ukrepe za omejevanje imunogenosti.

## 2 KLINIČNE POSLEDICE IMUNOGENOSTI BIOLOŠKIH ZDRAVIL

Protitelesa ali imunoglobulini (Ig) pripadajo več strukturnim in funkcijskim razredom. Zreli naivni limfociti B proizvajajo transmembranska nizkoafinitetna protitelesa razredov M ali D, t. i. B-celične receptorje (BCR). Aktivacija limfocitov B zahteva interakcijo pripadajočih antigenov z BCR in (običajno) sodelovanje limfocitov T (glejte tudi **3**). To vodi v proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B, izločanje protiteles in afinitetno maturacijo ter zamenjavo izotipa imunoglobulinov v protitelesa razredov G, A ali E. Celice potomke aktiviranega limfocita B tako proizvajajo protitelesa z nespremenjeno antigensko specifičnostjo, a z novimi funkcijami, ki jih določa konstantna regija imunoglobulina. Posledice imunskega odziva na učinkovino so med drugim odvisne od razreda in podrazreda protiteles (**3**). Tako na primer IgE povežujemo z alergijskimi reakcijami, IgM zaradi visoke valence vezavnih mest za antigene (navkljub nizki afiniteti) učinkovito aktivirajo komplement in premrežijo Fc-receptorje na imunskih celicah, IgG<sub>4</sub> imajo visok nevtralizacijski potencial itd. Odziv imunskega sistema na biološko učinkovino kot tujek je razmeroma pogost pojav, a v večini primerov so neželeni učinki blagi ali s kliničnega vidika celo neopazni. Pred razvojem tehnologije rekombinantne DNA, ko so terapevtske proteine pridobivali izključno z izolacijo iz živalskih ali človeških tkiv in so uporabljali manj sofisticirane metode čiščenja učinkovin, je bila verjetnost alergijskih reakcij pri prejemnikih bioloških zdravil neprimerno večja. Danes so iatrogene anafilaktične reakcije razmeroma redke. Do njih pride, kadar pacient biološko zdravilo prejme večkrat. Ob prvem stiku z učinkovino (senzitivizaciji) imunski sistem tvori protitelesa razreda E, ki se s konstantno regijo usidrajo na receptorje FcεR na bazofilcih in mastocitih, pri naslednji aplikaciji zdravila pa učinkovina z vezavo na protitelesa izzove degranulacijo teh imunskih celic in sproščanje vnetnih mediatorjev histamina, levkotrienov in prostaglandinov (**4**). Druga vrsta t. i. infuzijskih reakcij, sindrom sproščanja citokinov, ni po-

gojena s predhodno senzitivizacijo, temveč sloni na aktivaciji nespecifičnih imunskih komponent, kot so sistem komplementa, fagociti in naravne celice ubijalke. Značilna je za monoklonska protitelesa, usmerjena proti površinskim antigenom (rakavih) celic, kakršna sta rituksimab in alemtuzumab. Iz uničenih celic (kot tudi iz rekrutiranih imunskih celic) se lahko sprostijo večje količine citokinov (**4**, **5**). V obeh primerih simptomi segajo od blagih, kot so srbečica, rdečica in povišana telesna temperatura, ki jih blažimo z antihistaminiki in antipiretiki, do življenjsko ogrožajočih, ki zahtevajo prekinitev infuzije in urgentno zdravljenje.

Protitelesa, ki jih tvori prejemnikov imunski sistem proti učinkovini, praviloma pospešijo njeno izločanje na račun obsežnega odstranjevanja s fagociti retikuloendotelijskega sistema (**2**, **6**). Pogosto zato beležimo upad učinkovitosti zdravljenja s časom. Dejstvo, da so biološke učinkovine imunogene, zaplete odnos med farmakokinetiko in farmakodinamiko in s tem otežuje napovedovanje odzivnosti na zdravilo. V nekaterih primerih protitelesa podaljšajo biološki razpolovni čas učinkovine. Če so imunski kompleksi relativno majhni, predstavljajo slabše substrate za fagocitozo; k daljšemu zadrževanju učinkovine v telesu pripomorejo z recikliranjem prek vezave na neonatalne Fc-receptorje v endosomih endotelijskih celic ter z omejevanjem glomerulne filtracije (**2**, **6**, **7**).

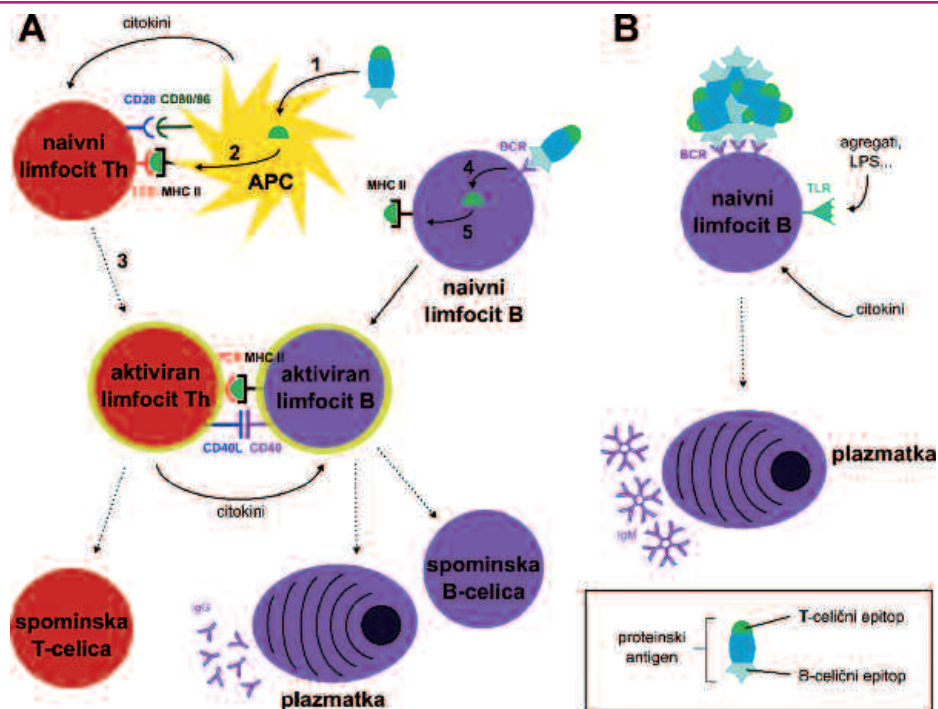
Posebna vrsta protiteles proti biološki učinkovini so nevtralizacijska protitelesa (**2**). Ta zasedejo vezavna mesta za receptor na površini molekule terapevtskega proteina, s čimer z receptorji tekmujejo za vezavo učinkovine. Neposreden vpliv protiteles na farmakodinamiko so med drugim opisali za rekombinantni rastni hormon (**8**), eritropoetin (**9**) in dejavnik koagulacije VIII (**10**). Številne biološke učinkovine so posnetki endogenih molekul, zato obstaja nevarnost, da nevtralizacijska protitelesa ob navzkrižni reaktivnosti onemogočijo delovanje tudi telesu lastnim proteinom. Najbolj razvpit je izbruh popolne aplazije rdečih krvničk pri bolnikih, zdravljenih z rekombinantnim eritropoetinom (**9**) (glejte **3.2.2**). Edini preostali terapevtski poseg pri neodzivnosti na eritropoetin je redna transfuzija.

## 3 IMUNSKI MEHANIZMI, ODGOVORNI ZA POJAV PROTITELES PROTI BIOLOŠKIM UČINKOVINAM

Proteinske učinkovine lahko v splošnem sprožijo tvorbo protiteles po dveh poteh. V prvi pri aktivaciji limfocitov B

sodelujejo T-celice pomagalk (1, 11), zato jo imenujemo *od limfocitov T odvisna aktivacija limfocitov B* (slika 1A). Povezujemo jo predvsem z (rekombinantnimi) proteinskimi učinkovinami, ki ne izhajajo iz človeškega organizma (torej s takimi, ki v strukturi nosijo tuje T-celične epitope). Pri tem

nastajajo visokoafinitetna protitelesa razreda IgG, ki so prisotna v visokih titrih. Značilno je tudi oblikovanje imunskega spomina, saj nekateri aktivirani limfociti B postanejo dolgožive spominske celice B, ki se v primeru ponovnega stika z antigenom hitro preobrazijo v efektorske celice (plaz-



**Slika 1:** Dve poti proženja tvorbe protiteles proti proteinski učinkovini (prirejeno po (12)). A. *Od limfocitov T odvisna aktivacija limfocitov B:* Antigen predstavljena celica (APC) fagocitira protein [1], ga razgradi na krajše antigenske peptide, ki jih predstavi na svoji površini vezane na poglobilni histokompatibilnostni kompleks razreda II (major histocompatibility complex class II, MHC II) [2]. Naivna T-celica pomagalka (Th) s T-celičnim receptorjem (TCR) »prepozna« pripadajoči T-celični epipov in sočasno prejme še dodatne aktivacijske signale (posredovane s CD80/86 na CD28), kar sproži aktivacijo in proliferacijo Th [3]. Naivni limfocit B »prepozna« B-celični epipov enakega antigena z B-celičnim receptorjem (BCR), antigen internalizira [4], razgradi in predstavi T-celične epipove na MHC II [5]. Slednje »spoznajo« predhodno aktivirani limfociti Th, ki spodbudijo proliferacijo specifičnih limfocitov B in njihovo diferenciacijo do plazmatk in dolgoživih spominskih limfocitov B. Podobno kot pri aktivaciji Th tudi aktivacija limfocitov B zahteva dodatno stimulatorno signalizacijo (vezavo CD40L na CD40). B. *Neposredna (od limfocitov T neodvisna) aktivacija limfocitov B:* Ponavljajoči epipovi na površini proteinskega agregata so odgovorni za združevanje BCR na površini naivnih limfocitov B, kar sproži znotrajcelično signalizacijo, ki vodi v aktivacijo in diferenciacijo do plazmatk. Kostimulatorni signali v obliki ligandov receptorjev TLR tudi prispevajo k aktivaciji, proliferaciji in diferenciaciji limfocitov B, podobno velja za nekatere citokine, ki jih izločajo naravne celice ubijalke in limfociti T. LPS – lipopolisaharid.

**Figure 1:** Two pathways leading to anti-drug antibodies (adopted from (12)). A. *T-cell dependent B-cell activation:* Antigen-presenting cell (APC) takes up a protein by phagocytosis, processes it and displays short antigenic peptides bound to major histocompatibility complex II (MHC II). Naive helper cell (Th) "recognizes" the cognate T-cell epitope via T-cell receptor (TCR). Concurrent stimulatory signals (conveyed by CD80/86 binding to CD28) trigger activation and proliferation of Th lymphocytes. Naive B-cell "recognizes" the B-cell epitope of the same antigen via B-cell receptor (BCR), internalizes the antigen, processes it and displays T-cell epitopes bound to MHC II. These, in turn, are "recognized" by previously activated Th-cells, responsible for proliferation of specific B-cells and inducing their differentiation into antibody-producing plasma cells and long-lived memory B-cells. As with Th-cell activation, activation of B-cells requires additional stimulatory signaling (binding of CD40L to CD40). B. *Direct (T-cell independent) activation of B-cells:* Epitope arrays on the surface of protein aggregates induce clustering of BCRs on naive B-cells, leading to intracellular signaling, resulting in activation and differentiation into plasma cells. Co-stimulatory signals, such as TLR ligands, contribute to the activation, proliferation and differentiation of B-cells, as do cytokines secreted by natural killer cells and T-cells. LPS – lipopolysaccharide.



matke). Alternativno aktivacija limfocitov B lahko poteka tudi brez pomoči T-celic pomagalk, pri čemer sodelujejo periferne dendritične celice, ki predstavijo antigen limfocitom B (1). *Neposredna aktivacija limfocitov B* (slika 1B) je pogojena s prisotnostjo agregatov – topnih ali netopnih skupkov proteinov v nativni ali denaturirani obliki, povezanih s kovalentnimi ali nekovalentnimi vezmi – ki s ponavljajočimi površinskimi epitopi izzovejo združevanje B-celičnih receptorjev, in sekundarnih signalov – snovi, ki izzovejo aktivacijo nespecifičnih imunskih mehanizmov (eksogenih ali endogenih ligandov t. i. vzorčno prepoznavnih receptorjev (*pattern-recognition receptors*), npr. receptorjev TLR (*Toll-like receptors*)) (12). Po tej poti nastala protitelesa so praviloma nizkoafinitetna in pretežno pripadajo razredu IgM. Brez sodelovanja T-celic pomagalk se imunski spomin ne oblikuje.

### 3.1 IMUNOGENOST ČLOVEŠKIH PROTEINOV

Imunski sistem se načeloma ne odziva na avtologne (endogene) proteine (in rekombinantne »posnetke« endogenih proteinov). Razlog za to sta negativna selekcija limfocitov, ki med dozorevanjem v primarnih limfatičnih organih pridejo v stik s telesu lastnimi proteini, in odsotnost kostimulacije ob stiku zrelih limfocitov z avtoantigenom. Nasprotno je verjetnost odziva na telesu tuje proteine (neoantigene) bistveno večja – pojav je relativno hiter in obsežen. Kljub temu opazamo, da tudi človeški proteini lahko sprožijo tvorbo protiteles. To se kaže tako v primeru avtoimunskih bolezni kot (relativno pogosto) pri aplikaciji rekombinantnih učinkovin. Govorimo o pojavu *porušena tolerance* do lastnih antigenov. Domnevno je toleranca do lastnih antigenov nepopolna (tj. limfociti B in T, specifični za posamezne avtoantigene, med procesom dozorevanja ne odmrejo v celoti), kadar je stopnja izražanja endogenega proteina nizka (1). Preživeli limfociti ob stiku z (rekombinantnim) antigenom, a brez dodatnih stimulatornih signalov, postanejo anergični (11). Če pa prejmejo še kostimulatorne signale (*danger signals*; npr. snovi, ki se sproščajo iz poškodovanih tkiv, evolucijsko ohranjene sestavne dele patogenov ali proteinske agregate), pride do imunskega odziva (12). Pojav protiteles proti učinkovini kot posledica porušena imunske tolerance je dolgotrajen proces in je običajno povezan s kronično aplikacijo biološkega zdravila.

### 3.2 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA IMUNOGENOST BIOLOŠKIH UČINKOVIN

Dejavniki, ki vplivajo na imunogenost proteinskih učinkovin, so raznovrstni in jih ne razumemo popolnoma. V splošnem

jih lahko razdelimo na 1) dejavnike, povezane s samim produktom (npr. narava proteina, izbran ekspresijski sistem, pogoji, ki jim je učinkovina izpostavljena v fermentorju, med procesom izolacije, formulacije in pri shranjevanju, učinkovitost odstranitve nečistot), 2) dejavnike, povezane s prejemnikom (npr. morebitna imunokompromitiranost, bolezensko stanje, genetsko ozadje) in 3) dejavnike, povezane z zdravljenjem (npr. koterapija z imunosupresivnimi zdravili, pogostost aplikacije, odmerek).

#### 3.2.1 Vpliv narave proteina in izbire ekspresijskega sistema na imunogenost proteinske učinkovine

Čeprav vsi proteini, torej tudi človeški, lahko inducirajo nastanek protiteles, je pojav bistveno bolj verjeten pri bioloških učinkovinah s tujimi T-celičnimi epitopi. Primeri takšnih učinkovin so streptokinaza, trombolitik iz beta-hemolitičnih streptokokov, ali himerna protitelesa, ki vsebujejo dobršen del strukture mišjih imunoglobulinov. Določene bolezni, ki so posledica odsotnosti endogenih proteinov zaradi mutacij v genih, ki jih kodirajo, zdravimo z aplikacijo eksogenih, običajno pridobljenih s tehnologijo rekombinantne DNA (pristopu pravimo nadomestno zdravljenje). V teh primerih predstavljajo tudi človeški proteini za prejemnika neoantigene, saj limfociti med dozorevanjem ne naletijo nanje. To pojasni opažanja, da pri bolnikih s hujšo obliko hemofilije A (ko dejavnik koagulacije VIII (fVIII) endogeno sploh ne nastaja), ki jih zdravimo z rekombinantnim fVIII, pogosto pride do indukcije protiteles (t. i. inhibitorjev) (13, 14), ki močno znižajo učinkovitost zdravljenja.

Pomemben dejavnik imunogenosti je intrinzična biološka aktivnost proteina (15). Na primer, incidenca indukcije protiteles pri zdravljenju z imunostimulatornimi molekulami, kot so aldeslevkin (rekombinantni človeški interleukin 2 (rhIL-2)) in interferoni, je relativno visoka. Po drugi strani so rhIL-2 in interferoni izjemno slabo topni, kar utegne biti vzrok za agregacijo učinkovine (1).

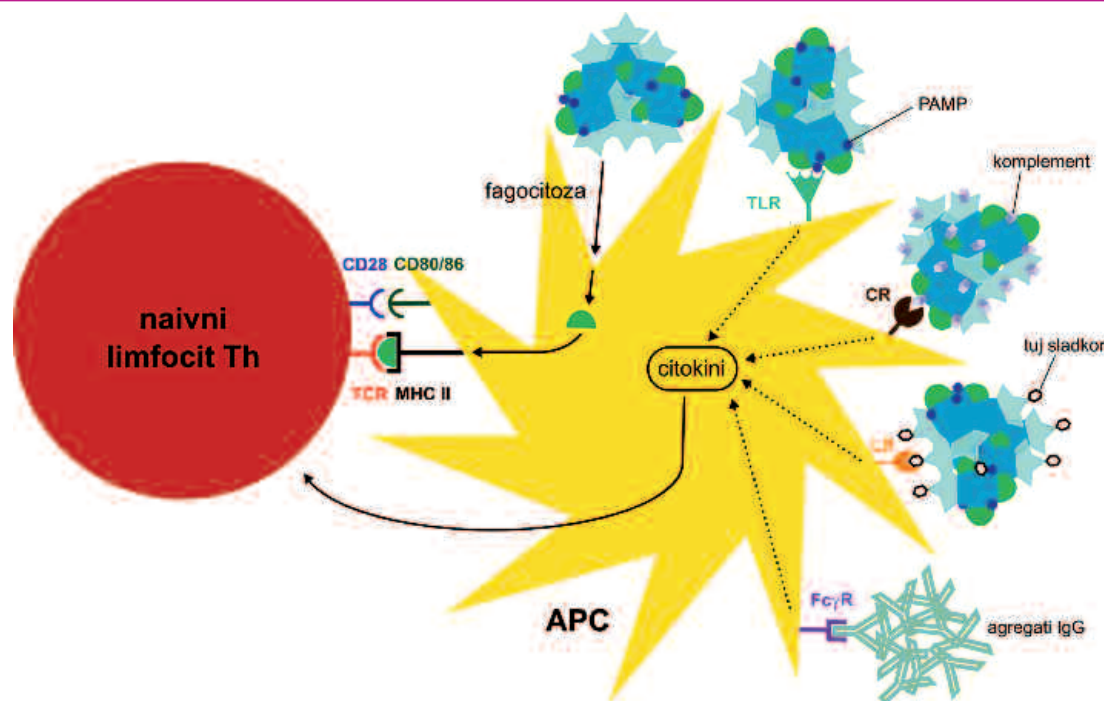
Biološka aktivnost nekaterih terapevtskih proteinov je odvisna od glikozilacije, kar narekuje izbiro ekspresijskega sistema (le evkariontske celice so namreč sposobne konjugacije proteinov s sladkornimi komponentami, zato za izražanje proteinov z bolj zapleteno zgradbo uporabljamo predvsem sesalske celične kulture in kvasovke). Kvasovke pripenjajo sladkorje tudi na položaje, na katerih jih v človeških proteinih ni, poleg tega se glikozilacijski profil pri kvasovkah (sladkorji so sestavljeni pretežno iz manoznih ostankov, t. i. hipermanozilacija) močno razlikuje od tistega pri sesalcih (kjer je nabor sladkorjev širši). Napačen glikozilacijski profil je lahko vzrok povišane imunogenosti, saj tuji

oligosaharidi okrepijo fagocitozo antigen-predstavitvenih celic prek vezave na lektinske vzorčno prepoznavne receptorje (16) (zlasti v primeru tvorbe agregatov (glejte **3.2.2**)) ali predstavljajo neoepitope (17). Izrazit primer je v tem pogledu sladkorni epitop Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R (krajše  $\alpha$ -Gal). Primati smo med evolucijo izgubili funkcionalnost encima UDP-Gal:3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc  $\alpha$ 1-3-galaktoziltransferaze, odgovornega za sintezo epitopa  $\alpha$ -Gal, in pri ljudeh zaradi senzitivacije s hrano ali s piki klosov predstavljajo protitelesa, usmerjena proti  $\alpha$ -Gal, kar do 1 % vseh imunoglobulinov, vključujoč razred E (18). Dokumentirani so primeri, ko so pacienti pri infuziji cetuksimaba (himernega protitelesa, izraženega v glodalski celični liniji CHO (ovarijske celice kitajskega hrčka; *Chinese hamster ovary cells*)) do-

živeli anafilaktično reakcijo zaradi prisotnosti epitopa  $\alpha$ -Gal (19, 20).

Aktivnost nekaterih terapevtskih proteinov je sicer neodvisna od glikozilacije in jih posledično lahko ekonomično izražamo v bakteriji *Escherichia coli*, a sladkorne komponente domnevno maskirajo potencialne epitope in izboljšajo topnost (tj. preprečujejo agregacijo učinkovine). Tako je neglikozilirani interferon  $\beta$ 1b, ki ga izražamo v *E. coli*, bolj imunogen od glikoziliranega  $\beta$ 1a, izraženega v celicah CHO (21).

Profil nečistot, ki lahko učinkujejo kot adjuvanti (npr. lipo polisaharidi iz zunanje membrane *E. coli*, nemetilirani motivi CpG bakterijske DNA in rezidualni proteini gostiteljskih celic), je primarno odvisen od izbranega ekspresijskega si-



**Slika 2:** Interakcije proteinskih agregatov z antigen predstavitvenimi celicami (APC) (prirejeno po (12)): Receptorji TLR vežejo agregate, ki spominjajo na molekularne vzorce, povezane s patogeni (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Receptorji komplementa (CR) prepoznavajo s komplementom opsonizirane (gliko)proteinske agregate. Na lektinske receptorje (LR) se vežejo glikoproteini s telesu tujimi sladkorji. Agregati terapevtskih protiteles se lahko vežejo na receptorje za imunoglobulinsko regijo Fc (Fc $\gamma$ R). Opisane interakcije so pogoj za receptorsko posredovano fago- in endocitozo (ni prikazano) kot tudi proženje signalizacijskih poti, ki vodijo v aktivacijo antigen predstavitvenih celic in s tem sproščanje citokinov ter povišano izražanje MHC II in ligandov kostimulatornih receptorjev (npr. CD80 in CD86). Ti procesi prispevajo k aktivaciji naivnih limfocitov Th in posledični aktivaciji limfocitov B (glejte sliko 1).

**Figure 2:** Interactions of (glyco)protein aggregates with antigen-presenting cells (APC) (adopted from (12)): TLR receptors bind aggregates mimicking pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Complement receptors (CR) interact with complement-opsonized aggregates. Lectin receptors (LR) bind foreign saccharides. Aggregates of therapeutic antibodies are bound by Fc receptors (Fc $\gamma$ R). In addition to providing stimulatory signals via receptor binding, aggregates are taken up by receptor-mediated phago-/endocytosis (not shown). APC activation results in cytokine secretion and upregulation of MHC II and co-stimulatory receptors (e.g., CD80 and CD86). The described processes contribute to activation of naïve Th-cells and (indirectly) B-cells (see Figure 1).



stema, njihova vsebnost pa od procesa čiščenja učinkovine (glejte **3.2.2**).

### 3.2.2 Vpliv proizvodnega procesa in razmer shranjevanja biološkega zdravila na imunogenost proteinske učinkovine

Proizvodni proces določa lastnosti biološkega zdravila. Glikozilacijski profil rekombinantnega proteina je primarno odvisen od izbranega ekspresijskega sistema, a na porazdelitev glikozilacijskih izooblik močno vplivajo tudi razmere v fermentorju (22-24). Katere nečistote in v kakšnem obsegu bodo prisotne v končnem zdravilu, je med drugim odvisno od tega, ali celice rekombinantni protein izločajo v gojišče (v nasprotnem primeru je celice potrebno lizirati, pri čemer se iz njih ob rekombinantni učinkovini sprostijo tudi celični proteini) in kako načrtujemo proces izolacije in čiščenja, npr. afinitetna kromatografija je izjemno specifična in omogoča odstranitev večine nečistot, povezanih z ekspresijskim sistemom, že v enem koraku (25). Razmere, ki jim je biološka učinkovina izpostavljena v fermentorju, med izolacijo, čiščenjem in formulacijo (povišana temperatura ali zamrzovanje, prisotnost kisika, svetloba, visok tlak, hidroliza s proteazami in glikozidazami, ekstremi pH in ionske jakosti, adsorpcija na površine, velika koncentracija učinkovine, z učinkovino nekompatibilne pomožne snovi), lahko privedejo do sprememb na (gliko)proteinu, kot so denaturacija, agregacija, fragmentacija, deamidacija in oksidacija, ki spremenijo imunogeni profil učinkovine (1). Podobno moramo biti pozorni tudi na razmere med shranjevanjem in transportom zdravila ter pri izdaji pacienta opozoriti na posebnosti biološkega zdravila.

Agregati proteinske učinkovine predstavljajo največji dejavnik tveganja za pojav imunogenosti. Antigen predstavljene celice namreč učinkoviteje vzorčijo proteinske antigene v agregirani obliki v primerjavi z monomeri, kar je osnovni razlog za večjo verjetnost vpletenosti limfocitov Th v oblikovanje imunskega odziva proti učinkovini (12). Ne le da so agregati boljši substrat za fagocitozo, prek interakcij z raznovrstnimi receptorji (slika 2) spodbudijo aktivacijo antigen predstavitevnih celic, kar se odraža v izločanju provnetnih citokinov in povišanem izražanju MHC II ter kostimulatornih membranskih proteinov. Podobno lahko tudi rezidualni proteini gostiteljskih celic, lipopolisaharidi, bakterijska DNA ali afinitetni ligandi, sproščeni iz kromatografskih kolon, aktivirajo površinske in znotrajcelične vzorčno prepoznavne receptorje antigen predstavitevnih celic.

V znanstveni literaturi je opisanih nekaj primerov imunogenosti proteinskih učinkovin, ki so verjetno posledica prisotnosti agregatov v biološkem zdravilu (12). Vzročna analiza

je sicer težavna, saj na pojav protiteles vplivajo številni drugi dejavniki, ki jih slabo razumemo, kot je genetika (glejte **3.2.3**), pa tudi kvantitativna analitika agregatov je težavna, saj zajemajo zelo široko območje velikosti (od topnih dimerov pa vse do makroskopskih delcev). Veliko je poročil o povišani imunogenosti proteinov, izpostavljenih stresnim dejavnikom, na živalskih modelih, medtem ko je vrednotenje imunogenosti med kliničnim preizkušanjem zdravila težavno (tako zaradi relativne redkosti pojavnosti kot pomanjkanja standardiziranih metod (glejte **4**)). Najbolje dokumentiran pojav indukcije nevtralizacijskih protiteles proti biološki učinkovini, zaznan s farmakovigilancnim nadzorom, sega v pozna devetdeseta leta in je povezan s spremembo formulacije in/ali zamenjavo primarne ovojnine rekombinantnega eritropoetina, epoetina alfa (9, 26). Pred tem časom so kot ekscipient uporabljali humani serumski albumin, izoliran iz plazme krvodajalcev, nakar ga je proizvajalec za evropsko tržišče s ciljem stabilizacije učinkovine zamenjal s sintezniema polisorbatom 80 in glicinom. Hkrati so spremenili vsebnik – iz večodmerne viala so prešli na enoodmerne brizge. Produktno spremembo je spremljal skokovit porast v frekvenci pojavnosti nevtralizacijskih protiteles proti učinkovini med prejemniki v Evropi. Vzrok zanjo so pripisali vgrajevanju epoetina v micelle polisorbata 80 in s tem posnemanju strukture proteinskih agregatov z vidika ponavljajočih se površinskih epitopov (26). Druga hipoteza skuša pojasniti vzrok za nenadno povišano imunogenost biološkega zdravila s sproščanjem adjuvantov iz gumijastih batnih tesnil brizg (26). Zanimiv je tudi pojav nevtralizacijskih protiteles proti epoetinu alfa, opisan med kliničnim vrednotenjem podobnega biološkega zdravila, zaradi česar so raziskavo prekinili (27). Kot vzrok imunogenosti so identificirali sproščanje volframovih spojin iz sten steklenih brizg, kamor so zašle med proizvodnjo primarne ovojnine. V kasnejših poskusih *in vitro* so dokazali, da različne volframove spojine že v koncentracijah 200 ppm izzovejo denaturacijo in agregacijo epoetina (28).

### 3.2.3 Dejavniki, povezani s prejemnikom, ki vplivajo na imunogenost biološke učinkovine

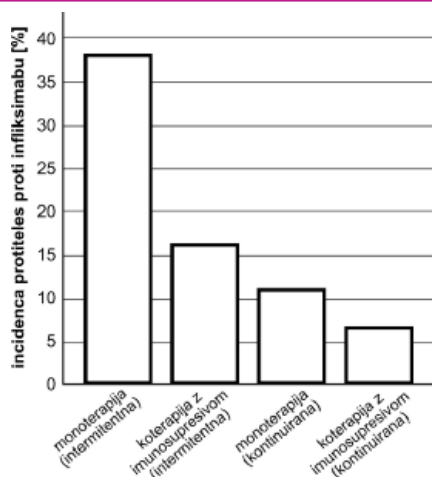
Protitelesa proti učinkovini se pri nekaterih pacientih pojavijo relativno hitro, pri drugih pozno ali sploh ne. Razlogi za to niso povsem pojasnjeni, a verjetno ima pomemben vpliv genetsko ozadje, saj so v več raziskavah potrdili povezavo med alelnim polimorfizmom genov *HLA*, ki kodirajo komponente MHC II, in indukcijo protiteles pri bolnikih, zdravljenih z biološkim zdravilom (29, 30). Predpostavljajo, da različice MHC II vežejo posamezne antigenske peptide z različno afiniteto. Imunokompetenca prejemnika je še en



pomemben dejavnik – pri starejših bolnikih (ki jim imunski sistem peša) in tistih, ki sočasno prejemajo imunosupresivne učinkovine, je verjetnost indukcije protiteles manjša (31) (glejte **3.2.4**).

### 3.2.4 Vpliv terapevtskega režima in koterapije na imunogenost biološke učinkovine

Kratkotrajno zdravljenje z biološkimi zdravili povezujemo z manjšo verjetnostjo indukcije protiteles proti učinkovini, kot to velja za kronično terapijo. Pri dolgotrajnem zdravljenju so manjši odmerki praviloma bolj imunogeni kot veliki odmerki, kar se sklada s popolnejšo tolerančnostjo imunskega sistema do obsežneje izraženih lastnih antigenov. Strategijo večjih odmerkov in krajših odmernih intervalov na začetku zdravljenja zato včasih izkoriščamo za omejevanje imunogenosti biološkega zdravila (31, 32). Podoben pristop uporabljamo tudi, kadar skušamo doseči indukcijo tolerance, ko se protitelesa pri pacientu že pojavijo. V nekaterih primerih, npr. pri zdravljenju kroničnih vnetnih črevesnih bolezni, je tudi z vidika omejevanja imunogenosti biološkega zdravila (in ne zgolj za doseg sinergističnega učinka) smiselna sočasna aplikacija imunosupresivnih učinkovin (slika 3) (31). Poročajo tudi o večji incidenci indukcije protiteles pri intermitentnem zdravljenju v primerjavi z enakomernim odmerjanjem zdravila (slika 3).



**Slika 3:** Incidenca pojava protiteles, usmerjenih proti infliksimabu, med 72-tedensko raziskavo pri pacientih s Crohno boleznijo, ki so prejemali zdravilo občasno ali v rednih intervalih (tj. kontinuirano), bodisi kot monoterapijo ali v kombinaciji z imunosupresivom ((33), povzeto po (31)).

**Figure 3.** Incidence of anti-infliximab antibodies at any time during 72-week-trial in Crohn disease patients receiving the drug as monotherapy or in combination with an immunosuppressive, either episodically or continuously ((33), adopted from (31)).

Način aplikacije sicer ni dejavnik, ki bi sam po sebi določal imunogenost biološkega zdravila, a je znano, da je verjetnost oblikovanja protiteles proti učinkovini največja pri subkutani aplikaciji (34). Podkožna tkiva so namreč bogata z antigen predstavitvenimi celicami, ključnimi za oblikovanje močnega imunskega odziva (slika 1). Učinkovina tvori na mestu aplikacije depo, od koder se le počasi sprošča in njena lokalna koncentracija je tam zelo velika, kar prispeva k večji verjetnosti vzorčenja in imunskega procesiranja proteinske učinkovine. Tudi bezgavke, kjer se zbirajo zreli naivni limfociti, so v neposredni bližini podkožja.

## 4 SPREMLJANJE IMUNOGENOSTI MED RAZVOJEM ZDRAVIL

Evropska agencija za zdravila (EMA) je že pred več kot desetletjem oblikovala smernice za ovrednotenje imunogenosti učinkovin in zdravil med njihovim razvojem; prenovljena splošna smernica bo stopila v veljavo z decembrom 2017 (35). Ker je napovedna vrednost ocen imunogenosti med predkliničnim razvojem omejena (vezana je na uporabo živalskih modelov, večina terapevtskih proteinov pa je človeške narave in so zaradi medvrstnih razlik za živali imunogeni), EMA ne zahteva spremljanja odziva imunskega sistema na učinkovino že v tej fazi razvoja. V nekaterih primerih je kljub temu smiselno izvesti poskuse na živalih, npr. kadar želimo pridobiti informacije o posledicah imunskega odziva na učinkovino, s katero nimamo bogatih izkušenj. Nekatere alternative poskusom na živalih v zgodnjih fazah razvoja so napovedovanje T-celičnih epitopov *in silico*, vrednotenje vezave na MHC II *in vitro* (npr. kompeticija proteinskih fragmentov (sinteznih peptidov) z visokoafinitetnimi agretopi (tj. peptidi, ki se vežejo na MHC II)) in spremljanje citokinskega odziva na učinkovino *in vitro*, zlasti s kokultivacijo dendritičnih celic in limfocitov T, izoliranih iz naivnih prostovoljcev, v prisotnosti potencialnega imunogena (indukcijo citokinov, ki je indikator aktivacije celične komponente imunskega odziva, nato spremljamo s tehniko elispot ali s pretočno citometrijo) (11). Tudi ti pristopi imajo le omejeno napovedno vrednost. Zanimivi so tudi modeli transgenih miši, ki bodisi izražajo človeški protein, katerega imunogenost vrednotimo, s čimer v osnovi izkazujejo imunsko toleranco do učinkovine, ali nosijo v genomu zapis za človeške gene *HLA* in tako bolje posnemajo imunsko procesiranje antigenov pri človeku (11).



Med kliničnim vrednotenjem zdravila EMA izrecno zahteva analizo imunogenosti, običajno vezano na spremljanje pojava in karakterizacijo protiteles proti učinkovini, tipično v korelaciji z učinkovitostjo (tj. vpliv na farmakokinetiko in farmakodinamiko) in varnostjo. Protitelesa v serumu pacientov je potrebno spremljati celoten čas raziskave. Tako lahko ocenimo, ali je imunski odziv le prehodnega značaja (torej s časom izzveni) ali pa je persistenten. Analitika protiteles proti učinkovini poteka po korakih. Praviloma najprej uporabimo zelo občutljiv presejalni test, ki mu sledi potrditveni test, s katerim izločimo lažno pozitivne rezultate. V nadaljevanju z biološkimi testi preverimo, ali imajo protitelesa nevtralizacijski značaj, in ocenimo še njihov titer, afiniteto, izotip in/ali kartiramo pripadajoče antigenske determinante na proteinski učinkovini. Pri validaciji testov uporabljamo tako pozitivno kontrolo (v idealnem primeru humani serum z visokim titrom protiteles proti učinkovini, a ga smemo nadomestiti tudi z živalskim serumom) kot negativno kontrolo (serum naivnih prostovoljcev). Vsakemu pacientu odvzamemo še serum pred začetkom zdravljenja z biološkim zdravilom za oceno nespecifične reaktivnosti z učinkovino (*baseline signal*).

V nekaterih primerih so resni neželeni učinki, povezani z imunogenostjo zdravila, izjemno redki in jih zato ne znamo med kliničnimi raziskavami. EMA zaradi tega predpisuje spremljanje imunogenosti zdravila tudi po sprostitvi na trg v okviru farmakovigilančnega nadzora, katerega pomemben del je načrt obvladovanja tveganja. Ta mora med drugim vsebovati navedbo kazalcev imunskega odziva, podrobne opise metod za detekcijo, kvantifikacijo in karakterizacijo protiteles, ukrepe za minimizacijo tveganja in omejevanje imunogenosti (npr. načrt prehoda na intravensko aplikacijo zdravila), navodila zdravstvenim delavcem, kako ravnati ob pojavu protiteles (npr. povečanje odmerka, skrajšanje odmernega intervala ali prekinitve zdravljenja) ter komunikacijske kanale ob detekciji neželenih učinkov. Spremljanje imunogenosti je tudi v tej stopnji vrednotenja zdravila precej problematično, saj testi niso robustni in standardizirani. Tako prihaja do precejšnjih odstopanj med rezultati različnih analizi laboratorijev. Največ so v uporabi imunokemijski testi (npr. encimskoimunski test (ELISA: direktna, indirektna, premostitvena, kompetitivna) ali radioimunski test (RIA)) in biosenzorji na osnovi površinske plazmonske resonance, s katerimi spremljamo protitelesa proti učinkovini. Kot komplementarne pristope uporabljamo teste stimulacije (sproščanje citokinov) ali proliferacije limfocitov Th ob stiku z antigen predstavitevimi celicami, ki so procesirale učinkovino.

## 5 SKLEP

Odziv imunskega sistema na učinkovino je najpogostejši neželeni učinek, povezan z aplikacijo bioloških zdravil. Klinične posledice je težko napovedati in so zelo raznolike: od nezaznavnih do življenje ogrožajočih. Številne dejavnike, ki vplivajo na imunogenost, slabo poznamo, zato je toliko pomembneje, da posvečamo večjo pozornost kakovosti zdravila. Nedvomno lahko z optimizacijo proizvodnje na vseh korakih (od izbire genske informacije, ki kodira rekombinantni protein, do ekspresijskega sistema, ki izvaja zahtevane posttranslacijske modifikacije, učinkovitega čiščenja učinkovine (npr. zagotavljanje odsotnosti agregatov in/ali kontaminantov, ki bi utegnili delovati kot adjuvant) in pazljive formulacije, ki ohranja nativno konformacijo terapevtskega proteina) močno omejimo imunogenost, ne moremo pa je povsem odpraviti. Spregledati ne gre niti pravilnega shranjevanja biološkega zdravila, saj v nasprotnem primeru tvegamo, da nastajajo s produktom povezane imunogene nečistote tudi kasneje med življenjskim ciklom zdravila. Kot učinkovit pristop za omejevanje imunskega odziva sta se v nekaterih primerih izkazala modulacija terapevtskega režima in koterapija z imunosupresivi. Učinkovita strategija zniževanja imunogenega potenciala je konjugacija proteinske učinkovine s hidrofilno verigo polietilenglikola (t. i. PEGilacija) (36). PEGilacija izboljša topnost proteinov (posredno omejuje agregacijo), ovira procesiranje proteina v antigen predstavitevni celici, maskira epitope (preprečuje dostop protiteles do učinkovine) ter upočasni eliminacijo iz organizma (posledica so manjša nihanja v plazemskih koncentracijah učinkovine). Zgolj na eksperimentalnem nivoju se kot možnost omejevanja imunogenosti omenja mutageneza proteinov s ciljem odstranjevanja agretopov ali T-celičnih epitopov (11). Težavo pri tem predstavlja nevarnost, da s poseganjem v strukturo proteinov izgubimo biološko aktivnost ali oblikujemo nove antigenske determinante.

Vsakršen poseg v proizvodni proces teoretično lahko vodi v spremembo imunogenega potenciala rekombinantne učinkovine, kar utegne biti posledica že minimalnih fizikalno-kemijskih ali strukturnih sprememb proteina, ki jih z analizi metodami morebiti ne zaznamo. Pri *spremembah proizvodnega procesa* je zato običajno potrebno potrditi, da je incidenca protiteles proti učinkovini (ter njihov potencialen vpliv na varnost in učinkovitost) pri pacientih, zdravljenih z novim produktom, *primerljiva* s tisto, ki jo

opazimo pri bolnikih, zdravljenih z zdravilom, pripravljenim po starem postopku. *Podobna biološka zdravila* so relativno nova kategorija zdravil, pri razvoju katerih se naslanjamo na izkušnje z referenčnim biološkim zdravilom (37, 38). Pripravljamo jih s proizvodnim procesom, ki je drugačen od tistega, s katerim je izdelano referenčno zdravilo. To seveda pomeni, da je moč pričakovati razlike v imunogenosti obeh zdravil. Čeprav je potrebno v sklopu celovitega vrednotenja podobnih bioloških zdravil (*similarity exercise*) dokazati tudi *podobno* imunogenost, obstaja tveganje, da morebitnih manjših razlik v imunogenosti zaradi redkega pojava med kliničnim vrednotenjem ne bomo zaznali. S tega vidika in predvsem zaradi interindividualnih razlik v dovzetnosti za odziv imunskega sistema na učinkovino *avtomatična* zamenljivost, kakršna velja za generična zdravila, za podobna biološka zdravila ni priporočljiva, zlasti pri bolnikih s kronično boleznijo (ki zahteva dolgotrajno zdravljenje), ki se stabilno odzivajo na aktualno terapijo (osebno mnenje avtorja). V odgovoru na vprašanje Mednarodnega foruma znanstvenoraziskovalnih farmacevtskih družb (GIZ) o zamenljivosti in nadomestljivosti med podobnimi biološkimi zdravili ter (referenčnimi) originalnimi biološkimi zdravili je Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) podala naslednje stališče: »JAZMP podpira uvajanje PBZ [podobnih bioloških zdravil], ker mora biti podobnost oz. primerljivost PBZ v razmerju do zadevnih referenčnih bioloških zdravil z vidika kakovosti, varnosti in učinkovitosti dokazana v okviru postopka pridobitve dovoljenja za promet za vsako PBZ. [...] Odločitev o njihovi uporabi oz. njihovo zamenjevanje (terapevtski preklap) lahko poteka v le v kliničnem oz. ambulantnem okolju in mora biti predmet medicinske obravnave vsakega posameznega bolnika.« (39). Ob tem velja izpostaviti, da klinične raziskave, osredotočene na primerjavo učinkovitosti in varnosti (vključno z imunogenostjo), niso zaznale značilnih razlik pri pacientih, ki so jim referenčna zdravila zamenjali za podobna biološka zdravila, in tistih, ki so obdržali prvotno terapijo (40).

## 6 LITERATURA

1. Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci* 2011; 100(2): 354-387.
2. Smith A, Manoli H, Jaw S et al. Unraveling the effect of immunogenicity on the PK/PD, efficacy, and safety of therapeutic proteins. *J Immunol Res* 2016; 2016: 2342187.
3. Krishna M, Nadler SG. Immunogenicity to biotherapeutics - the role of anti-drug immune complexes. *Front Immunol* 2016; 7: 21.
4. Asselin B. Immunology of infusion reactions in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol* 2016; 12(13): 1609-1621.
5. Breslin S. Cytokine-release syndrome: overview and nursing implications. *Clin J Oncol Nurs* 2007; 11(1 Suppl): 37-42.
6. Zhao L, Ren TH, Wang DD. Clinical pharmacology considerations in biologics development. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(11): 1339-1347.
7. Chirmule N, Jawa V, Meibohm B. Immunogenicity to therapeutic proteins: impact on PK/PD and efficacy. *AAPS J* 2012; 14(2): 296-302.
8. Chernauek SD. Growth hormone-resistant syndromes: long-term follow-up. *Endocr Dev* 2009; 14: 135-142.
9. Casadevall N, Nataf J, Viron B et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002; 346(7): 469-475.
10. van den Berg HM. Different impact of factor VIII products on inhibitor development? *Thromb J* 2016; 14(Suppl 1): 31.
11. Jawa V, Cousens LP, Awwad M et al. T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation. *Clin Immunol* 2013; 149(3): 534-555.
12. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS et al. Immunogenicity of therapeutic protein aggregates. *J Pharm Sci* 2016; 105(2): 417-430.
13. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012; 119(12): 2922-2934.
14. Pratt KP. Inhibitory antibodies in hemophilia A. *Curr Opin Hematol* 2012; 19(5): 399-405.
15. Gribble EJ, Sivakumar PV, Ponce RA et al. Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3(2): 209-234.
16. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3): 226-234.
17. Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(6): 678-684.
18. Macher BA, Galili U. The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780(2): 75-88.
19. Chung CH, Mirakhor B, Chan E et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008; 358(11): 1109-1117.
20. Bosques CJ, Collins BE, Meador JW, 3rd, et al. Chinese hamster ovary cells can produce galactose-alpha-1,3-galactose antigens on proteins. *Nat Biotechnol* 2010; 28(11): 1153-1156.
21. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P et al. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004; 251 Suppl 2: II15-II24.
22. Ahn WS, Jeon JJ, Jeong YR et al. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2008; 101(6): 1234-1244.
23. Gawlitzeck M, Estacio M, Furch T et al. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103(6): 1164-1175.
24. Nam JH, Zhang F, Ermonval M et al. The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental

- alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 2008; 100(6): 1178-1192.
25. Wang X, Hunter AK, Mozier NM. Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103(3): 446-458.
  26. Schellekens H, Jiskoot W. Erythropoietin-associated PRCA: Still an unsolved mystery. *J Immunotoxicol* 2006; 3(3): 123-130.
  27. Haag-Weber M, Eckardt KU, Horl WH et al. Safety, immunogenicity and efficacy of subcutaneous biosimilar epoetin-alpha (HX575) in non-dialysis patients with renal anemia: a multi-center, randomized, double-blind study. *Clin Nephrol* 2012; 77(1): 8-17.
  28. Seidl A, Hainzl O, Richter M et al. Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity. *Pharm Res* 2012; 29(6): 1454-1467.
  29. Barbosa MD, Vielmetter J, Chu S et al. Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clin Immunol* 2006; 118(1): 42-50.
  30. Billiet T, Vande Casteele N, Van Stappen T et al. Immunogenicity to infliximab is associated with HLA-DRB1. *Gut* 2015; 64(8): 1344-1345.
  31. Hindryckx P, Novak G, Van de Casteele N et al. Incidence, prevention and management of anti-drug antibodies against therapeutic antibodies in inflammatory bowel disease: A practical overview. *Drugs* 2017; 77(4): 363-377.
  32. Strober BE. Why biologic therapies sometimes lose efficacy. *Semin Cutan Med Surg* 2016; 35(4 Suppl 4): S78-S80.
  33. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(7): 542-553.
  34. Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 Suppl 6: vi3-9.
  35. CHMP, EMA. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2017/06/WC500228861.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2017/06/WC500228861.pdf). Dostop: 20. 6. 2017.
  36. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* 2008; 22(5): 315-329.
  37. Markus R, Liu J, Ramchandani M et al. Developing the totality of evidence for biosimilars: Regulatory considerations and building confidence for the healthcare community. *BioDrugs* 2017; 31(3): 175-187.
  38. Štrukelj B. Varnost, kakovost in učinkovitost originalnih in podobnih bioloških zdravil. *Farm Vest* 2015; 66(3): 256-259.
  39. JAZMP, Odgovori na vprašanja GlZ Foruma o uvajanju podobnih bioloških zdravil, junij 2014. [https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Uvajanje\\_PodBiolZdr\\_QA\\_GlZForum\\_junij\\_2014.pdf](https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Uvajanje_PodBiolZdr_QA_GlZForum_junij_2014.pdf). Dostop: 20-06-2017.
  40. Moots R, Azevedo V, Coindreau JL et al. Switching between reference biologics and biosimilars for the treatment of rheumatology, gastroenterology, and dermatology inflammatory conditions: Considerations for the clinician. *Curr Rheumatol Rep* 2017; 19(6): 37.



# NOVI DOKTORJI ZNANOSTI

## NEW DOCTORS OF SCIENCE

UREDILI / EDITED BY:

Mateja Terčič, univ. dipl. sociol.

Doc. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Nove doktorje znanosti Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani so promovirali na promocijah 20. aprila, 30. junija in 26. oktobra 2017.

**Marina Gjorgjieva, mag. farm.**

## NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B Z BENZOTIAZOLSKIM SKELETOM

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj

Somentorica: prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Odpornost bakterij proti večini protibakterijskih učinkovin postaja vse večji problem, zato se potreba po novih protibakterijskih učinkovinah povečuje in dejstvo, da posveča farmacevtska industrija premalo pozornosti odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin, postaja vse bolj skrb vzbujajoče. ATP vezavno mesto bakterijske DNA giraze ponuja dobro priložnost za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin. Podobnost v strukturi med bakterijsko girazo B in podenoto topoizomeraze IV Par E odpira možnost za načrtovanje protibakterijskih učinkovin s sinergističnim delovanjem na dve tarči v bakterijski celici.

V okviru doktorskega dela je doktorandka načrtovala, sintetizirala in biološko ovrednotila potencialne pirolkarboksamidne inhibitorje DNA giraze z benzotiazolskim skeletom kot nadaljevanje raziskav inhibitorjev DNA giraze s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazolnim ogrodjem, ki so jih odkrili nedavno. Pripravljene spojine so izkazovale močno inhibitorno aktivnost *in vitro* na DNA girazo *Escherichia coli*, nekatere spojine pa tudi zaviralno aktivnost na DNA girazo *Staphylococcus aureus*. Najboljši inhibitor DNA giraze *E. coli* je imel vrednost  $IC_{50}$  33 nM. Določene spojine so pokazale dvojno zaviralno delovanje, tako na DNA girazo iz *E. coli* in *S. aureus* kot tudi na topoizomerazo IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Vezavo pripravljenih inhibitorjev v ATP vezavno mesto DNA giraze smo potrdili s kristalno strukturo kompleksa giraze B iz *E. coli* z enim od pripravljenih inhibitorjev. Sintetizirane inhibitorje DNA giraze in topoizomeraze IV smo testirali tudi na protibakterijsko aktivnost na po Gramu pozitivne (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis*) in po Gramu negativne bakterijske seve (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), vendar niso pokazali znatne protibakterijske aktivnosti. Za eno od spojin smo pokazali, da je substrat efluksne črpalke AcrAB-tolC, s čimer lahko razložimo njeno slabo protibakterijsko aktivnost na testirane po Gramu negativne bakterijske seve.

Pripravljene spojine so bile vključene tudi v projekt rešetanja spojin, namenjen odkrivanju spojin s protivirusnim delovanjem, in nekateri benzotiazolni inhibitorji giraze B so izkazali aktivnost proti virusom influence A in influence B. Ker je struktura ATP vezavnega mesta DNA giraze zelo podobna strukturi ATP vezavnega mesta šaperona Hsp90 in ker je Hsp90 šaperon pomemben pri replikaciji virusa influence, se je v okviru doktorske disertacije porodila ideja, da je protivirusna aktivnost benzotiazolnih inhibitorjev giraze B morda posledica inhibicije Hsp90. Z mikroforeznim testom so finski partnerji na projektu dokazali vezavo benzotiazolnih inhibitorjev giraze B na Hsp90. Najboljše benzotiazolne spojine so imele vrednosti  $K_d$  v nanomolarnem območju, kar je primerljivo z vrednostjo  $K_d$  znanega inhibitorja Hsp90, 17-desmetoksi-17-N,N-dimetilaminoetilaminogeldanamicina (17-DMAG).

V okviru doktorskega dela je doktorandka tako uspela pripraviti spojine, ki imajo inhibitorno delovanje na DNA girazo kot tudi na topoizomerazo IV bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Kristalna struktura ene od njih v kompleksu z DNA girazo B iz *E. coli* daje priložnost za nadaljnjo optimizacijo teh spojin za izboljšanje njihovih inhibitornih aktivnosti. Ugotoviti, da imajo pripravljene benzotiazolne inhibitorje giraze tudi delovanje proti virusu influence in da se vežejo na šaperon Hsp90, dajeta dobro izhodišče za nadaljnje načrtovanje in





razvoj učinkovin, ki bi imele protibakterijsko in protivirusno delovanje.

Rezultate, dobljene v okviru doktorske disertacije Marine Gjorgijeve, smo objavili v članku v ugledni reviji *Journal of Medicinal Chemistry*.

**Ivana Klopčič, mag. farm.**

## RAZISKAVE ENDOKRINIH UČINKOV FENOLNIH ANALOGOVS BISFENOLA A IN NJIHOVIH MEŠANIC *IN SILICO* IN *IN VITRO*

Mentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Somentor: izr. prof. dr. Janez Mavri

V svojem delu se je Ivana Klopčič osredotočila na identifikacijo potencialnih hormonskih motilcev fenolnih analogov bisfenola A (BPA) iz skupin zdravil, onesnažil in kozmetičnih sestavin, na njihovo pleiotropno delovanje ter proučevanje hormonskih učinkov njihovih mešanic. Z metodo *in silico* je s pomočjo prosto dostopnega programskega orodja *Endocrine Disruptome* napovedala afiniteto vezave z dvanajstimi različnimi jedrnimi receptorji za izbran niz spojin. Predvsem se je osredotočila na bromirane zaviralce gorenja ter aminofenolne analoge BPA iz skupine zdravil (npr. diklofenak, paracetamol) ter nekatere kozmetične sestavine (npr. avobenzon) ter njihove metabolite. Testirala jih je tudi *in vitro* na celičnih linijah s poročevalskim genom za luciferazo. Za spojine, ki so izkazovale glukokortikoidno in androgeno moduliranje, je izvedla še potrditveni test vezave *in vitro*. Med prvimi je za prej omenjene spojine dokazala njihove različne hormonske učinke na estrogenskem, androgenem, glukokortikoidnem in tiroidnem receptorju pri koncentracijah, ki smo jim ljudje lahko izpostavljeni. V drugem delu doktorske disertacije je dokazala, da je hormonski učinek proučevanih spojin na zgoraj omenjene receptorje odvisen od hkratne prisotnosti drugih snovi in da imajo hormonsko aktivni fenolni analogi BPA pleiotropni učinek. Poleg modulacije jedrnih receptorjev se je namreč osredotočila tudi na njihovo genotoksično in imunomodulatorno delovanje. Rezultati na celični liniji LCL kažejo, da imajo določeni aminofenolni analogi BPA imunomodulatorno delovanje pri koncentracijah, najdenih v človeški plazmi, ter da na njega znatno vpliva metabolizem teh spojin. Dokazala je, da lahko predvsem fenolni analogi BPA kot hormonski motilci glu-

kokortikoidnega receptorja spremenijo imunski odziv izpostavljenih posameznikov. Ker je še vedno odprto vprašanje o genotoksičnosti paracetamola, ki ga je izbrala kot eno izmed spojin, ki jo uvrščamo med fenolne analoge bisfenola A iz skupine zdravil in ima endokrino delovanje, je s pomočjo kvantno-kemijskih metod skupaj s sodelavci prva predstavila mehanizem direktne interakcije med DNA in toksičnim metabolitom paracetamola (NAPQI) in predpostavila, v kakšnih pogojih v celici do teh poškodb DNA lahko pride.

Učinke mešanic izbranih spojin iz skupin onesnažil in kozmetičnih sestavin je določila na celičnih linijah na enak način kot hormonske učinke posameznih spojin. Glede na dobljene rezultate je zaključila, da testirane komponente mešanic interagirajo ena z drugo. Pokazala je, da učinki mešanic niso zanemarljivi ter da jih je nujno vklopiti v oceno tveganja za zdravje ljudi in njihov vpliv na okolje. Ti rezultati kažejo, da je potrebno natančno določiti strategijo za testiranje mešanic spojin, ki bo temeljila na ustreznih toksikoloških testih (že obstoječe metode *in silico* in *in vitro*, novi biološki testi ter modelna orodja za testiranje mešanic Euromix).

Rezultate svojega raziskovalnega dela v okviru doktorata je Ivana Klopčič objavila v šestih izvornih raziskovalnih člankih v revijah z visokim dejavnikom vpliva, štiri članki pa so poslani v objavo. Svoje delo je predstavila tudi na več mednarodnih in domačih znanstvenih konferencah.

**Jure Peklari, mag. farm.**

## ZDRAVJE STAROSTNIKOV IN OSEB S POSEBNIMI POTREBAMI TER NJIHOVA UPORABA ZDRAVIL IN PREHRANSKIH DOPOLNIL

Mentor: izr. prof. dr. Mitja Kos

Somentor: prof. dr. Martin Henman

Kandidat je raziskoval zdravje starostnikov in oseb s posebnimi potrebami ter njihovo uporabo zdravil in prehranskih dopolnil, in sicer na podlagi irske longitudinalne raziskave staranja TILDA ter raziskave oseb s posebnimi potrebami IDS-TILDA.

17 % starostnikov je poročalo o redni uporabi prehranskih dopolnil, 14 % pa o redni sočasni uporabi tako prehranskih dopolnil kot tudi zdravil. 4,5 % primerov sočasnih uporab bi lahko privedlo do klinično pomembnih interakcij.

Sedativno breme zdravil predstavlja pomemben vpliv na zdravstveni status starostnikov. Zdravila, ki imajo tudi sedativne učinke, je uporabljalo 19 % starostnikov, in sicer najbolj pogosto hipnotike in antidepresive. Njihova uporaba je bila pozitivno povezana s sindromom krhkosti pri starostnikih. Zdravila s sedativnim učinkom je uporabljalo 46 % starostnikov, ki so imeli razvit sindrom krhkosti, 23 % starostnikov s predstopnjo krhkosti in 9 % oseb, ki niso imele razvitega sindroma krhkosti.

Uporaba zdravil in prehranskih dopolnil je med osebami s posebnimi potrebami skoraj dvakrat višja v primerjavi s populacijo, proučevano v raziskavi TILDA. Breme zdravljenja z zdravili tako predstavlja pomemben vidik ustrezne obravnave teh oseb.

---

**Katarina Bolko Seljak, mag. farm.**  
**TEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA  
RAZVOJ NA LIPIDIH  
OSNOVANIH TRDNIH  
SISTEMOV**

Mentorica: prof. dr. Mirjana Gašperlin  
Somentor: prof. dr. Janez Kerč

Področje doktorske disertacije Katarine Bolko Seljak je razvoj novih na lipidih osnovanih sistemov za izboljšanje biofarmaceutskih lastnosti vanje vgrajenih učinkovin ter pretvorba teh sistemov v trdne farmacevtske oblike, tako enoenotne (tablete) kot večnotne (mikrokapsule). Za modelno učinkovino smo izbrali polifenol naravnega izvora resveratrol, katerega širšo terapevtsko uporabo ovirata njegova slaba topnost in predsystemski metabolizem.

V nalogi je doktorandka razvila inovativen na lipidih osnovan samomikroemulgirajoči sistem z resveratrolom, s katerim je uspela značilno izboljšati njegovo topnost in obseg sproščanja ter na modelu podganjega črevesa in celic Caco 2 dokazati značilno zmanjšan efluks njegovih metabolitov zaradi zaviranja sekretornih prenašalcev, pri čemer formulacija ni vplivala na integriteto in vitalnost celične linije *in vitro*. V zadnjem delu je doktorandka uspešno načrtovala in izvedla adsorpcijo tekočih SMES na trdne nosilce, ki so omogočili izdelavo tablet, pri čemer so se ohranile samomikroemulgirajoče lastnosti. Tako je potrdila, da so SMES-i perspektiven dostavni sistemi za izboljšanje biofarmaceutskih, farmakokinetičnih in toksikoloških lastnosti resveratrola.

Rezultati doktorske naloge so mednarodno primerljivi in objavljeni v štirih člankih z dejavnikom vpliva, petega pa smo poslali v objavo.

Z novimi dognanji, pridobljenimi na podlagi kompleksnih rezultatov doktorske naloge, je kandidatka doprinesla pomemben znanstveni prispevek k tehnološki in industrijski konkurenčnosti trdnih SMES za peroralno dostavo slabo topnih učinkovin.

---

**Samo Rožman, mag. farm., spec. klin. farm.**  
**FARMAKOKINETIČNE  
LASTNOSTI IN KLINIČNA  
UČINKOVITOST RITUKSIMABA  
PRI BOLNIKI Z DIFUZNIM  
VELIKOCELIČNIM LIMFOMOM B**

Mentor: prof. dr. Iztok Grabnar  
Somentorica: izr. prof. dr. Barbara Jezeršek Novaković

V doktorski disertaciji je Samo Rožman obravnaval biološko zdravilo rituksimab. Rituksimab v kombinaciji s kemoterapijo izboljša preživetje bolnikov z difuznim velikoceličnim limfomom B. Prognostični dejavniki, ki bi napovedovali uspešnost zdravljenja, pa so slabo opredeljeni. Nekatere raziskave kažejo, da je kljub enakim odmerkom serumska koncentracija rituksimaba večja pri bolnikih, ki se na zdravljenje odzovejo, kot pri bolnikih, pri katerih zdravljenje ni uspešno. Spremljanje farmakokinetike bi zato morda lahko služilo kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja in za identifikacijo bolnikov, ki potrebujejo večje odmerke ali več krogov zdravljenja.

Za preskus te hipoteze je Samo Rožman izvedel klinično raziskavo na bolnikih z novoodkritim velikoceličnim limfomom B. Bolnikom je v vsakem krogu zdravljenja določil koncentracijo rituksimaba v krvnem serumu z encimsko-immunsko metodo. Določil je tudi genski polimorfizem receptorja Fc-gama. Za farmakokinetično analizo je uporabil pristop populacijske farmakokinetične analize z nelinearnim modeliranjem mešanih učinkov. Klinični odgovor je bil ocenjen v skladu s Chesonovimi kriteriji.

Samo Rožman je ugotovil, da farmakokinetiko rituksimaba najbolje opisuje dvoprostorni model s konstantnim in časovno spremenljivim očistkom. Konstantni očistek je nižji pri starejših bolnikih in tistih z manjšo telesno maso, volumen centralnega prostora pa je večji pri moških. Bolniki, pri katerih je prišlo do napredovanja bolezni, so imeli počasnejši



upad časovno spremenljivega očistka rituksimaba in zato višji celokupni očistek ter manjše serumske koncentracije rituksimaba. Hitrost upada časovno spremenljivega očistka rituksimaba zato lahko služi kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja. Med različnimi genotipi receptorja Fc-gama kandidat ni ugotovil značilno različnega odgovora na zdravljenje. Opazil pa je trend boljšega odgovora pri bolnikih, ki so homozigoti za valin na mestu 158.

Rezultati disertacije so inovativni v mednarodnem merilu, predstavljajo pomemben doprinos k znanosti, imajo pa tudi potencialno uporabno vrednost pri izboljšanju zdravljenja bolnikov z difuznim velikoceličnim limfomom B.

**Tomaž Nerat, mag. farm.**

## VPLIV VODLJIVOSTI BOLNIKOV S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 2 NA BREME BOLEZNI IN STROŠKOVNO UČINKOVITOST ZDRAVIL

Mentor: izr. prof. dr. Mitja Kos

Kandidat je ovrednotil sodelovanje bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 pri zdravljenju z zdravili ter njegov vpliv na breme bolezni in stroškovno učinkovitost.

Bolniki s sladkorno boleznijo tipa 2 v Sloveniji dobro sodelujejo pri zdravljenju z zdravili (91 %). V primeru ustrezne prehrane so bolniki srednje sodelujoči (60 %) in v primeru telesne aktivnosti dobro sodelujoči (90 %). Kljub visoki stopnji sodelovanja pri jemanju zdravil pa so imeli vključeni bolniki sorazmerno slabo urejeno glikemijo. Breme plačnika zdravstvenega varstva (obvezno in dopolnilno zavarovanje) v Sloveniji je bilo ovrednoteno na 99.120.419 EUR oz. 4,18 % planiranih javnih stroškov za zdravstvo. Navedeni delež je primerljiv z rezultati v drugih zahodno evropskih državah.

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 so najbolj učinkovite naslednje intervencije, ki vplivajo na sodelovanje bolnikov: intervencije, ki vplivajo na sodelovanje bolnikov pri zdravljenju z zdravili, mediteranska dieta, aerobna, rezistentna in kombinirana telesna aktivnost. Doživljenjska simulacija napredka bolezni z vključenimi intervencijami ni prinesla celokupnega prihranka za plačnika. Med navedenimi vodenimi intervencijami so bile z vidika plačnika najbolj učinkovite tiste, ki vplivajo na sodelovanje bolnikov pri zdravljenju z zdravili.

Rezultati disertacije nakazujejo, da upoštevanje informacij o sodelovanju pacientov pri zdravljenju z zdravili pomembno vpliva na rezultate stroškovne učinkovitosti.

## Luka Kristanc, dr. med., dipl. biol. UČINKI POROTVORNEGA NISTATINA NA LIPIDNE MEHURČKE CELIČNIH VELIKOSTI

Mentor: doc. dr. Bojan Božič

Somentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

V svoji disertaciji je Luka Kristanc pomembno nadgradil obstoječe znanje o delovanju polienskega antimikotika nistatina na fosfolipidne membrane. Za področje polienov je uporabil izviren metodološki pristop, saj je proučeval odzive posamičnih fosfolipidnih mehurčkov celičnih velikosti. Pri teh mehurčkih je lahko sledil nastajanju membranskih izrastkov in različnim vrstam pokov, kar je omogočalo kvantitativno opredelitev delovanja nistatina na membrane. Njegov največji prispevek k znanosti je dognanje, da že pri koncentracijah znotraj območja klinično priporočenih serumskih koncentracij nistatina pride pri membranah, ki vsebujejo ergosterol, do enakih sprememb kot pri membranah, ki vsebujejo holesterol, pri skoraj desetkrat večjih koncentracijah nistatina. Raziskave na mehurčkih je primerjal z odzivi pri celicah, zato imamo sedaj bistveno boljši vpogled na delovanje nistatina pri celicah.

V doktorski disertaciji je predstavil vsebino treh svojih član- kov, ki so objavljeni v uglednih mednarodnih revijah.

**Jernej Luzar, mag. farm.**

## IDENTIFIKACIJA IN OVREDNOTENJE MIMOTOPOV IZBRANIH ALERGENOV FEL D 1 IN ARA H 2

Mentorica: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Somentor: izr. prof. dr. Peter Korošec

Jernej Luzar je v svoji doktorski nalogi razvijal nove pristope za specifično imunoterapijo alergij. Specifična imunoterapija z alergeni je sicer učinkovit vzročni način zdravljenja, vendar

njeno uporabo pri nekaterih alergijah omejuje tveganje za anafilaktične reakcije. Jernej Luzar je zato svoje raziskave usmeril v iskanje ustreznih fragmentov alergenov z zmanjšano ali odsotno alergogenostjo. Identificiral je peptidne mimetike epitopov najpomembnejšega alergena pri alergiji za mačko in alergiji za arašide. Z računalniškim prileganjem je določil najverjetnejše mesto na alergenu, ki ga mimotopi posnemajo. Pokazal je, da mimotopi ohranijo afiniteto do IgE iz serumov alergičnih pacientov, vendar ne aktivirajo njihovih efektorskih celic in posledično ne sprožijo izločanja mediatorjev alergijskih reakcij oziroma niso alergogeni. Mimotope je nato s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA izrazil na površini imunogenih nosilcev, ki bi omogočili sublingvalno dostavo, spodbudili ustrezen imunski odziv in omogočili razvoj imunske tolerance na alergen. Kot imunogeni nosilec za mimotope mačjega alergena je uporabil nitaste bakteriofage in za mimotope alergena iz arašidov mlečnokislinske bakterije. Pokazal je, da imunogeni nosilci z izraženimi mimotopi spodbudijo T celični imunski odziv, usmerjen v tip 1.

Rezultati njegovega dela pomembno prispevajo k razvoju pripravkov za varno in učinkovito zdravljenje alergij.

---

**Alja Plošnik, univ. dipl. kem. tehnol.**

## ENDOKRINE IN GENOTOKSIČNE LASTNOSTI SESTAVIN KOZMETIČNIH IZDELKOV IZ PODATKOVNE BAZE COSING Z METODAMI IN SILICO IN LUCIFERAZNIMI REPORTERSKIMI TESTI

Mentor: doc. dr. Marjan Vračko Grobelšek  
Somentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

V svoji disertaciji je Alja Plošnik obravnavala kemikalije, ki jih uporabljamo v kozmetični industriji in ki jih na evropskem trgu ureja Evropska kemijska uredba REACH in Evropska kozmetična uredba. Ti uredbi predpisujeta tudi oceno njihovih fizikalno-kemijskih, ekotoksikoloških in toksikoloških lastnosti. Kandidatka je izbrala iz baze kozmetičnih sestavin CosIng nabor spojin, za katere je določila genotoksične in endokrine lastnosti z metodami *in silico* in *in vitro*. V delu je združila tri sklope raziskav: modeliranje QSAR, kjer je uporabila programski paket CAESAR; molekulska

sidranje na jedrne receptorje, kjer je uporabila program DISRUPTOME, in teste *in vitro*, ki jih je izvedla na dveh celičnih linijah, ki izražata tri receptorje: MDA-kb2 za androgene in glukokortikoidni receptor in GH3.TRE-Luc za tiroidni receptor.

Doktorandka je z uporabo omenjenih metod predstavila hiter in učinkovit sistem za presejevanje nizov spojin glede na izbrane toksikološke lastnosti. Takšna obravnava velikih nizov spojin igra pomembno vlogo v zakonski regulaciji kemikalij. Disertacija pa je tudi prispevek k bazični znanosti, saj je obravnavala toksikološke učinke vzdolž celotne toksikološke poti, to je od učinkov na molekulski in celični ravni (sidranje in testi *in vitro*) do učinkov na organizmi in populaciji (modeli QSAR). Disertacija opisuje dokaze, ki kažejo na povezavo med vezavo na jedrne receptorje, mutagenostjo, kancerogenostjo in razvojno toksičnostjo. Iz svoje doktorske disertacije je Alja Plošnik objavila tri članke v uglednih mednarodnih revijah, eden pa je poslan v objavo.

---

**Osama Fathy Abdelwahab Mohamed Aly Mousa, mag. med. biokem.**

## VLOGA PROTEINOV KLOTHO IN CYR61 PRI ZGODNJEM ODKRIVANJU AKUTNE POŠKODBE LEDVIC PO OPERACIJI SRCA

Mentor: izr. prof. dr. Milan Skitek  
Somentor: doc. dr. Aleš Jerin

Osama Mousa je na osnovi podatkov iz literature oblikoval hipotezi o novih označevalcih pri zgodnji diagnostiki akutne ledvične poškodbe. Raziskoval je možne korelacije med ravnimi proteina Klotho in proteina 61 (CYR61), bogatega s cisteinom, v serumu ter zgodnjim napovedovanjem akutne ledvične okvare pri hospitaliziranih bolnikih po operaciji srca s kardiopulmonalnim obvodom.

Doktorand je v okviru disertacije razvil metode, podprte s tehnologijami, ki jih uspešno uporabljamo v podobnih raziskavah. Dokazal je, da lahko CYR61 v serumu uporabljamo kot prihodnje orodje za stratifikacijo in razvrščanje akutne ledvične okvare po stopnjah glede na resnost, da protein Klotho v serumu lahko odkrije bolnike z visokim tveganjem za resno akutno ledvično okvaro v prvih časovnih intervalih operacije srca s kardiopulmonalnim obvodom



(diagnostična moč proteina Klotho v serumu ni bila zadostna zaradi verjetnih vplivov starosti, oksidativnega stresa in ateroskleroze) in da je kombinacija proteina Klotho in kreatinina v serumu lahko uporabna za napoved odpovedi ledvic v daljšem časovnem obdobju po kardiopulmonalnem obvodu.

Disertacija predstavlja pomemben doprinos k znanosti na področju spoznavanja in pojasnjevanja dogajanja pri akutni ledvični poškodbi, zlasti po operacijah na srcu. Iz svoje doktorske disertacije je Osama Fathy Abdelwahab Mohamed Aly Mousa objavil dva članka v uglednih mednarodnih revijah, dva pa sta poslana v objavo.

**Barbara Zorec, mag. farm.**

## PROUČEVANJE FIZIKALNIH METOD IN DOSTAVNIH SISTEMOV ZA POVEČANJE DERMALNEGA VNOSA UČINKOVIN

Mentorica: doc. dr. Nataša Pavšelj

Somentorica: prof. dr. Julijana Kristl

Barbara Zorec je v svoji doktorski disertaciji proučevala povečanje dermalnega vnosa zdravilnih učinkovin. Zaradi zaščitne funkcije kože je pasivni prehod zdravilnih učinkovin preko kože v zadostnih količinah praktično nemogoč, zato v ta namen uporabljamo različne metode pospeševanja dermalnega in transdermalnega vnosa. Doktorsko delo je bilo osredotočeno na tri aktivne metode pospeševanja: elektroporacijo kože z uporabo kratkih visokonapetostnih električnih pulzov, kontrolirano mikroablacijo zunanjih plasti kože s frakcionalnim laserjem in sonoporacijo kože z nizkofrekvenčnim ultrazvokom, tem metodam pa je dodan pasivni pristop z enkapsulacijo učinkovine v različne tipe nanoveziklov.

V doktorski disertaciji je doktorandka s kombinacijo teoretičnega in eksperimentalnega pristopa prispevala pomembno znanje na področju mehanizmov delovanja omenjenih treh fizikalnih metod pospešitve dermalnega in transdermalnega vnosa. Z uporabo eksperimentalnega modela in protokolov, ki se približajo razmeram *in vivo*, je povečala relevantnost svojega raziskovalnega dela. Znanje, pridobljeno na omenjenem področju, predstavlja pomemben prispevek k znanosti in bo pripomoglo k nadaljnjemu razvoju novih načinov vnosa molekul v telo preko kože.

Svoje dosedanje delo je doktorandka objavila v sedmih izvornih znanstvenih člankih (od tega v štirih kot prva avtorica), enemu preglednemu članku in petih znanstvenih prispevkih na konferencah z mednarodno udeležbo.

**Ana Mitrović, mag. farm.**

## VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV B IN X IN NJUNIH INHIBITORJEV PRI EPITELNO-MEZENHIMSKEM PREHODU TUMORSKIH CELIC

Mentor: prof. dr. Janko Kos

Ana Mitrović je v doktorskem delu raziskovala vlogo katepsinov B in X v epitelno-mezenhimskem prehodu tumorskih celic, procesu, ki poveča migracijsko zmogljivost in invazivnost tumorskih celic in njihovo odpornost na apoptozo. V ta namen je razvila različne celične modele in sledila izražanje in aktivnost katepsinov B in X ter vrednosti primerjala z epiteljskimi in mezenhimiškimi označevalci in celičnim fenotipom. Ovrednotila je tudi veliko število spojin, ki bi lahko bile potencialni zaviralci omenjenih katepsinov, ter preverila njihovo delovanje na *in vitro* in *in vivo* modelih tumorske migracije, invazije, angiogeneze in metastaziranja, procesov, ki so povezani z epitelno mezenhimiškim prehodom. Dokazala je, da so večje koncentracije katepsinov B in X povezane z invazivnim mezenhimiškim celičnim fenotipom in spodbujajo epitelno mezenhimiški prehod. Nasprotno pa lahko obraten proces mezenhimiško-epitelnega prehoda sprožimo z njunim hkratnim utišanjem. Kot močnejši promotor epitelno mezenhimiškega prehoda se je izmed obeh katepsinov izkazal katepsin B, katerega izražanje je odvisno od transformirajočega rastnega dejavnika  $\beta 1$ , čigar signalna pot je ključna za sprožitev epitelno mezenhimiškega prehoda pri raku. Izmed velikega števila testiranih zaviralcev katepsina B, ki lahko preprečijo epitelno-mezenhimiški prehod, se je kot primeren izkazal že znani antibiotik nitroksolin, še boljše farmakološke lastnosti in protitumorno delovanje pa so izkazovali nekateri njegovi derivati. Kot učinkovit inhibitor katepsina B je identificirala tudi kompleks kliokinola z rutenijem.

Ana Mitrović je rezultate doktorskega dela do sedaj objavila v sedmih znanstvenih člankih v uglednih revijah z dejavnikom vpliva in jih predstavila na mednarodnih konferencah.



Damijan Knez, mag. farm.

## NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE POTENCIALNIH UČINKOVIN ZA ZDRAVLJENJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI Z MULTIPLIM MEHANIZMOM DELOVANJA

Mentor: prof. dr. Stanislav Gobec

Alzheimerjeva bolezen je napredujoča motnja centralnega živčnega sistema, ki vodi v propad nevronov v specifičnih predelih možganov, posledično izgubo spomina ter motnje drugih kognitivnih funkcij. Kompleksna patofiziologija bolezni, v kateri so udeleženi številni patološki procesi, nakazuje, da je za uspešno zdravljenje te bolezni potrebno ciljati na več tarč hkrati. Encim butirilholin-esteraza predstavlja eno izmed atraktivnih tarč za lajšanje simptomov Alzheimerjeve bolezni v njenih poznih stadijih. V svoji disertaciji je Damijan Knez na osnovi strukture selektivnih zaviralcev butirilholin-esteraze načrtoval, sintetiziral in biokemijsko ovrednotil spojine, ki zavirajo ta encim, poleg tega pa imajo še dodatne učinke, pomembne za terapijo Alzheimerjeve bolezni. V prvi seriji multifunkcionalnih spojin na osnovi nitroksolina je tako pripravili derivat, ki selektivno kelira Cu(II) ione in preprečuje agregacijo amiloida  $\beta$  do toksičnih fibrilov. Na osnovi znanega pikomolarnega zaviralca butirilholin-esteraze, razvitega na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, je nadalje sintetiziral dva derivata 8-hidroksikinolina, ki poleg kelacije dvovalentnih ionov, udeleženih pri Alzheimerjevi bolezni, delujeta antioksidativno, nevroprotektivno pred toksičnimi oblikami amiloida  $\beta$ , preprečita redoks aktivnost keliranih bakrovih ionov in znižata znotrajcelični nivo reaktivnih kisikovih zvrsti. V svoji disertaciji je doktorand razvil tudi serijo dualnih zaviralcev butirilholin-esteraze in monoamin-oksidge B. Kot najboljši se je izkazal derivat N-propargilpiperidina, ki v nizkem mikromolarnem območju zavira oba encima, *in vitro* prehaja krvno možgansko pregrado in deluje nevroprotektivno pred toksičnim amiloidom  $\beta$ .

Iz svojega dosedanjega raziskovalnega dela je Damijan Knez v soavtorstvu objavil 17 izvirnih znanstvenih člankov in en pregledni članek, vse v uglednih mednarodnih revijah z dejavnikom vpliva, dva članka pa sta poslana v objavo.

Alenka Premuš Marušič, mag. farm.

## POJAVNOST PLJUČNE EMBOLIJE IN GLOBOKE VENSKE TROMBOZE V POVEZAVI S FARMAKOTERAPIJO HOSPITALIZIRANIH KIRURŠKIH BOLNIKOV V POMURJU

Mentor: prof. dr. Aleš Mrhar

Somentor: prof. dr. Danijel Petrovič

Alenka Premuš Marušič je v svoji doktorski disertaciji predstavila prikaz obvladovanja venske tromboze pri izbranih bolnikih. Doktorandka je pokazala, da lahko po trenutno veljavnih smernicah kirurške bolnike razvrstimo v ustrezne razrede tveganja za pojav venske tromboze s pomočjo Caprinijevega modela. Pri vsakem bolniku glede na dejavnike tveganja določimo, kakšna je za bolnika ustrezna tromboprofilaksa. Ključna kandidatkinja ugotovitev je, da je v kontrolni skupini terapijo za preprečevanje venske tromboze v skladu s smernicami prejelo 77 % bolnikov, medtem ko je ta delež v testni skupini znašal le 56 %. Verjetnost za pojav venske tromboze je značilno večja, če preventivna antikoagulantna terapija z zdravili za preprečevanje venske tromboze ni v skladu s smernicami.

Zdravljenje s koncentriranimi eritrociti je bilo povezano z večjim tveganjem za pojav pljučne embolije pri kirurških bolnikih, ne pa tudi pri bolnikih globoko vensko trombozo. Zato bi bilo potrebno bolnike, ki med zdravljenjem prejmejo koncentrirane eritrocite, bolj previdno spremljati v pooperativnem obdobju.

Polifarmakoterapija pri kirurških bolnikih je povezana z večjo verjetnostjo za nastanek venske tromboze, večja verjetnost za dogodke venske tromboze pa je prisotna predvsem pri bolnikih z interakcijami tipa X med zdravili v njihovi farmakoterapiji. Povezava med večjo pojavnostjo venske tromboze pri kirurških bolnikih ob uporabi nekaterih zdravil ni bila statistično značilno dokazana, povezava med hiponatriemijo, trombocitopenijo ali trombocitozo in pooperativno pojavnostjo venske tromboze pa je pri hiponatriemiji nakazana.

Predložena disertacija z metodološkimi pristopi in dobljenimi rezultati predstavlja pomemben izvorni prispevek k



znanosti na področju trombotične profilakse in zdravljenja z zdravili pri hospitaliziranih kirurških bolnikih. Poseben prispevek predstavlja ugotovitev, da sta polifarmakoterapija in zdravljenje s koncentriranimi eritrociti pomembna dejavnika, ki bi ju morali vključiti v Caprinijev model in ovrednotiti vsaj z eno točko.

**Samo Lešnik, mag. farm.**

## RAZVOJ RAČUNALNIŠKE BAZE BIOIZOSTERNIH ZAMENJAV IN PROGRAMA ZA VIRTUALNO REŠETANJE NA OSNOVI LIGANDA

Mentor: doc. dr. Janez Konc

Somentor: prof. dr. Stanislav Gobec

V svoji disertaciji je Samo Lešnik razvil novo bazo, program in spletni strežnik za virtualno reševanje na osnovi liganda, ki omogočajo prepoznavo podobnosti med molekulami na osnovi bioizosternih zamenjav. Razvil je bazo bioizosternih zamenjav, tako da je prilegal vsako vezavno mesto na vsakem proteinu iz proteinske baze PDB z vsemi drugimi vezavnimi mesti. Kokristalizirane ligande v prileganih vezavnih mestih je nato fragmentiral in izmeril stopnje prileganja med vsemi pari fragmentov. Predpostavil je, da so fragmenti, ki so prostorsko dovolj blizu v prileganih vezavnih mestih proteinov, bioizosterno zamenljivi.

Razvil je program za virtualno reševanje na osnovi liganda, ki je bil uspešno eksperimentalno validiran na primeru inhibitorjev butirilholin-esteraze. Program je v bazi več milijonov malih molekul prepoznal aktivne, a skeletno raznolike spojine. Nekaj od teh je tudi bolj aktivnih kot izhodiščna aktivna molekula. Razvil je tudi spletni strežnik, ki omogoča hitro in preprosto iskanje bioizosternih zamenjav.

Rezultati doktorandovega dela so izviren znanstveni prispevek na področju farmacije in bodo prispevali k hitremu iskanju novih, skeletno različnih zdravilnih učinkovin. Programe, ki jih je razvil Samo Lešnik, so že večkrat uporabili tudi tuji avtorji, saj omogočajo uspešen, učinkovit in z eksperimenti podprt razvoj novih kandidatov za zdravilne učinkovine.

Iz svoje doktorske disertacije je Samo Lešnik objavil deset člankov v uglednih mednarodnih revijah, od tega je pri petih člankih prvi avtor.

**Snežana Marković, univ. dipl. kem.**

## UPORABA NIR SPEKTROSKOPIJE ZA ŠTUDIJ KLJUČNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV NEKATERIH FARMACEVTSKIH OBLIK

Mentor: prof. dr. Janez Kerč

Doktorska disertacija Snežane Marković je osredotočena na področje raziskav s pomočjo NIR-spektroskopije v laboratoriju (*off-line*) in med tehnološkim procesom (*in-line*). Glavni cilji disertacije so bili proučiti informacije, skrite v NIR-spektrih, in razširiti uporabo te spektroskopske metode pri raziskovanju procesnih mehanizmov in lastnosti farmacevtskih oblik med razvojem in proizvodnjo farmacevtskih oblik in določanju fizikalno-kemijskih parametrov, ki so povezani z različnimi mehanizmi sproščanja zdravilne učinkovine iz proučevanih farmacevtskih oblik (pelete s prirejenim sproščanjem in obložene tablete s prirejenim sproščanjem), ter interakcij zdravilne učinkovine s pomožnimi snovmi v liofilizatu.

Doktorandka je v disertaciji potrdila postavljeni hipotezi in dokazala, da lahko z NIR-metodami kvalitativno in kvantitativno ugotavljamo ključne parametre polizdelkov in končnih izdelkov. Ugotovila je, da so značilnosti gastrorezistentne obloge, kot sta debelina in sestava obloge, kritični parametri za zagotavljanje kakovosti in funkcionalnosti farmacevtskega izdelka. Z novo inovativno tehniko interprocesne NIR-metode z medprocesnim vzorčenjem je dosegla enako dobre rezultate kot z zelo obsežno multivariantno analizo statistične kontrole procesa (MSPC). Prav tako je z NIR-metodo uspešno dokazala ter kvalitativno in kvantitativno analizirala medmolekularno estrsko vez med zdravilno učinkovino in manitolom v strukturi liofilizirane pogače, kar z drugimi metodami ni bilo možno.

Doktorska disertacija predstavlja izvirne prispevke k znanosti, od katerih so bile nekatere že objavljene v mednarodnih znanstvenih revijah z dejavnikom vpliva. Njeno delo in rezultati bodo bistveno prispevali k izboljšanju razumevanja lastnosti in mehanizmov izbranih tehnoloških procesov za izdelavo proučevanih, pa tudi drugih farmacevtskih oblik.

Mateja Lumpert, mag. farm., univ. dipl. mikrobiol.

## ETNOFARMAKOLOŠKE RAZISKAVE UPORABE RASTLIN IN GLIV NA OBMOČJU KRASA IN DOLENJSKE S PRIMERI FITOKEMIJSKE KARAKTERIZACIJE

Mentor: prof. dr. Samo Krefc

Somentorica: doc. dr. Nina Kočevar Glavač

Mateja Lumpert je v okviru svojega doktorata raziskovala ljudsko uporabo zdravilnih rastlin v Sloveniji. Pri tem je kombinirala metodo terenskih intervjujev, nabiranje rastlin in laboratorijske analize. Njeno delo je obsegalo tri sklope, ki so objavljeni vsak v svojem znanstvenem članku.

V prvem sklopu je primerjala uporabo zdravilnih rastlin na Krasu in pod Gorjanci. Evidentirala je uporabo 94 vrst rastlin in pri vsaki tudi enega ali več načinov in namenov uporabe. Ugotovila je, da ljudje kljub različnim klimatskim in kulturno-zgodovinskim okoliščinam uporabljajo zelo podoben nabor rastlin. Zelo pogosto uporabljane rastline (bezeg, šipek, kamilica, žajbelj in rman) uporabljajo približno enako pogosto v obeh regijah. Razlike so samo pri redkeje uporabljenih rastlinah, kot sta šetraj in komarček, katerih uporabo je na Krasu navedla približno polovica sogovornikov, na Gorjancih pa nihče. Pri pljučniku je situacija obratna, doktorandka je ugotovila nekaj uporabe na Gorjancih, medtem ko ga na Krasu niso uporabljali. Več razlik je ugotovila pri namenu uporabe, npr. kamilico so na območju Gorjancev uporabljali za zdravljenje okužb dihal, boleznih prebavil in vnetja oči, na Krasu pa kot pomirjevalo.

V drugem delu doktorata je Mateja Lumpert raziskovala uporabo rdeče mušnice za lovljenje muh. Tako na Krasu kot na Gorjancih so to gobo poznali skoraj vsi informanti. Toda na Krasu so od 25 informantov le trije, ki so bili po rodu iz drugih delov Slovenije, vedeli za njeno uporabo za lovljenje muh. Na Gorjancih je 13 informantov od 25 opisalo to uporabo. Skupno je kandidatka zabeležila devet različnih metod priprave rdeče mušnice, ki so se razlikovali po tem, ali in koliko so mušnico zdrobili, ali so jo kuhali ter ali so jo pripravili z mlekom ali z vodo. V laboratorijski raziskavi je ugotovila, da količina sproščenih ibotenske kisline in muscimola, ki sta glavni učinkovini v mušnici, s časom na-

rašča. Sproščanje ni bilo odvisno od topila, pa vendar so ljudje večkrat uporabljali mleko kot vodo. Dodatna toplotna in mehanska obdelava sta pospešili sproščanje učinkovin. V tretjem delu doktorata je Mateja Lumpert potrdila obstoj redke tradicije uporabe strupene rastline preobjede (*Aconitum napellus*) v zdravilne namene na Solčavskem. Tinkture korenin so uporabljali peroralno proti vročini, bolečinam, kašlju in za splošno stimulacijo telesa. Z laboratorijsko analizo je doktorandka dokazala vsebnost akonitina v ekstraktih, dobljenih pri informantih.

Ana Krese, mag. farm.

## VPLIV HIDRODINAMSKO- MEHANSKIH DOGODKOV IN SESTAVIN HRANE NA SPROŠČANJE UČINKOVINE IZ OGRODNIH TABLET

Mentorica: prof. dr. Marija Bogataj

Farmacevtske oblike (tablete) so po peroralni aplikaciji izpostavljene širokemu spektru različnih pogojev, od katerih je močno odvisno sproščanje zdravilne učinkovine, pa tudi njena absorpcija in v končni fazi terapevtski učinek. Kako se bo učinkovina sproščala iz farmacevtske oblike, je odvisno od same oblike, od njene sestave in od pogojev na mestu sproščanja. V okviru svoje naloge je doktorandka najprej določila pogoje v napravi za testiranje sproščanja, razviti na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, v katerih se hitrost gibanja tablete in frekvenca spreminjanja njene hitrosti približata parametrom *in vivo* gibanja tablete. Sledila je opredelitev izbrane farmacevtske oblike, tablet s hidrokspipilmetilcelulozo, z vidika vrste polimera in ionske moči medija ter prisotnosti sladkorjev in pektina, kot komponent hrane, v medijih. Poleg sproščanja je spremljala tudi nabrekanje tablet in sodelovala pri uvedbi nove metode s kamerami. V tretjem segmentu naloge je smiselno povezala prva dva: mehanske vplive in vplive sestave medija na sproščanje iz ogrodnih tablet. Testiranje sproščanja v dveh sistemih z različnimi mehanskimi obremenitvami oblike je pokazalo večjo mehansko občutljivost hidrokspipilmetilceluloznih ogrodij v medijih z večjimi koncentracijami topljencev.

Dobljene rezultate je Ana Krese objavila v dveh znanstvenih člankih v revijah z dejavnikom vpliva.



Marko Krošelj, mag. farm.

## NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE RADIOOZNAČENIH LIGANDOV ZA SOMATOSTATINSKE IN HOLECISTOKININSKI-2 RECEPTOR

Mentorica: doc. dr. Tanja Gmeiner

Somentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan

V svoji disertaciji je Marko Krošelj načrtoval, sintetiziral in ovrednotil nove radiooznačene analoge minigastrina, pomembne za razvoj varnejše in učinkovitejše terapije bolnikov z rakom, ter uspešno sintetiziral hibridno molekulo, ki združuje minigastrinski in somatostatinski del in je potencialno sposobna vezave na različne tipe receptorjev, ki so izraženi na neuroendokrinih tumorjih. Novi analogi izkazujejo izboljšano serumsko stabilnost *in vitro* ter izboljšano razmerje kopičenja v tumorju in ledvici na živalskem modelu *in vivo*, kar je pomembno s stališča izboljšanja varnostnega profila radiofarmaka in njegove učinkovitosti.

Iz svoje doktorske disertacije je doktorand v uglednih mednarodnih revijah objavil pet člankov, ki celovito pokrivajo problematiko razvoja radiofarmaka – od načrtovanja in vrednotenja radiooznačenih ligandov ter avtomatizirane priprave radiofarmakov do vpliva geometrije virov sevanja pri izvajanju meritev radioaktivnosti pri pripravi in odmerjanju radiofarmakov.

Rezultati raziskav so na predkliničnem nivoju pokazali, da so novi radiooznačeni analogi minigastrina, ki jih je Marko Krošelj razvil v okviru disertacije, potencialno varnejši in učinkovitejši od analogov, ki so v fazi kliničnega preskušanja za uporabo pri obravnavi bolnikov z medularnim rakom ščitnice. Primerni so za označevanje z različnimi radioaktivnimi izotopi, ki so v uporabi v diagnostične ali terapevtske namene, kar omogoča t. i. teranostični pristop obravnave onkoloških bolnikov. Uspešno razvita metoda za avtomatizirano radiooznačevanje minigastrinskih analogov omogoča nižjo sevalno obremenitev osebja in omogoča hitrejšo oziroma lažjo translacijo novih izsledkov v klinično prakso in personaliziran pristop pri obravnavi bolnikov.

Izvirni rezultati in zaključki so osnova in pomemben prispevek v razvoju multireceptorskega pristopa prikazovanja in ciljne terapije neuroendokrinih tumorjev in medularnega karcinoma ščitnice.

# NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

PRIPRAVIL:

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo*

## NOVA GENSKA ZDRAVILNA UČINKOVINA ZA ZDRAVLJENJE HUNTINGTONOVE BOLEZNI

Huntingtonova bolezen je neozdravljiva nevrodegenerativna genetska okvara, ki nastane zaradi mutacije na enem od alelov gena za protein huntingtin, ki ga najdemo na četrtem kromosomu. V okvarjenem genu je nekaj deset kopij tripleta baz CAG, kar vodi do tvorbe nenormalnega proteina in vpliva na mišično koordinacijo in na nekatere kognitivne funkcije. Prvi znaki bolezni se navadno pojavijo med 32. in 40. letom starosti, v nekaterih primerih pa že prej, tudi pred 20. letom. Bolezen prizadene 4 do 15 posameznikov na 100.000 prebivalcev v Evropi, medtem ko je na Japonskem zelo redka. Bolezen prizadene enako pogosto moške in ženske. Trenutno še nimamo zdravila za zdravljenje Huntingtonove bolezni, njene simptome lahko le blažimo. Farmacevtska družba Ionis Pharmaceuticals je razvila zdravilno učinkovino na osnovi protismiselne tehnologije DNA z delovnim imenom Ionis-HTTRx, ki se veže na informacijsko RNA za huntingtin in zmanjša število okvarjenih kopij RNA, kar posledično vodi do izboljšanja bolezenskih znakov. Trenutno poteka faza II kliničnega preskušanja, ki vključuje 46 bolnikov v Kanadi, Nemčiji in Veliki Britaniji. To je prvi primer zmanjšanja proteina, ki vodi do znakov bolezni, v centralnem živčnem sistemu. Družba Ionis Pharmaceuticals je skupaj s partnersko družbo Roche za zdravilo z učinkovino Ionis-HTTRx pripravila dokumentacijo za registracijo zdravila s statusom zdravila sirote na obeh agencijah za zdravila, ameriški FDA in evropski EMA.

Vir: <https://www.medscape.com>, 11. 12. 2017

## FDA JE ODOBRILA BUPRENORFIN V PARENTERALNI OBLIKI ZA APLIKACIJO ENKRAT MESEČNO

Ameriška Agencija za hrano in zdravila je odobrila subkutano obliko buprenorfina, ki ga apliciramo enkrat mesečno. Buprenorfin, ki ga uporabljamo za zdravljenje odvisnosti od opiatov, je bil doslej na voljo le v obliki podjezičnih tablet ali polimernih filmskih ploščic. Zaradi specifičnosti bolnikov, ki pogosto nimajo dostopa do dnevniških odmerkov buprenorfina oziroma pacientu prijaznejše oblike glede na oddaljenost od zdravstvenih centrov, je družba Indivior Inc. razvila subkutano obliko buprenorfina z imenom Sublocade. Je v obliki prednapolnjene injekcije za enkratno uporabo, kot vehikel pa vsebuje hidrofilni polimer, ki omogoča počasno sproščanje učinkovine. Varnost in učinkovitost pripravka so dokazali v dveh kliničnih raziskavah na 848 bolnikih z diagnosticirano srednje do močno opiatno odvisnostjo, ki so za vzpostavitev primarnega odmerka najprej začeli z zdravljenjem s podjezično tableto, po vzpostavitvi stabilnega odmerka pa nadaljevali s subkutano obliko buprenorfina enkrat mesečno. Rezultati obeh raziskav so pokazali, da je bil učinek buprenorfina dosežen skozi daljši čas (merili so pojav morfinskih metabolitov v urinu kot znak ponovnega jemanja morfina oziroma derivatov), kot najpogostejše neželene učinke pa so opisali zaprtost, slabost, bruhanje, srbenje in glavobol. Nova oblika je namenjena odraslim v starosti nad 17 let in starostnikom do 65. leta. Vir: FDA Press Release, 2. 12. 2017

## MODRA TABLETKA V VELIKI BRITANiji KOT RECEPTA PROSTO ZDRAVILO

V Veliki Britaniji bo od marca 2018 sildenafil, ki ga po svetu tržijo pod imenom Viagra, na voljo v jakosti 50 mg na tableto kot recepta prosto (OTC) zdravilo. Odločitev, ki jo je sprejela angleška Agencija za zdravila (MHRA) je temeljila na zadnjem poročilu o izjemni porasti ponarejenih zdravil za zdravljenje erektilne disfunkcije. V zadnjih petih letih so samo inšpektorji MHRA zasledili za 150 milijonov funtov ponarejenih tablet z dvomljivima kakovostjo in varnostjo (nekateri pripravki so bili brez sildenafil, nekateri z različnimi nedovoljenimi dodatki in večinoma so bile tablete na-





rejene izven okolja dobre proizvodne prakse). OTC-zdravilo s tabletami v 50 mg jakosti bo na voljo pod imenom Viagra Connect, posebej pa bo označeno, da ni primerno za bolnike s hujšimi težavami s srcem in ožiljem ter jetrnimi in ledvičnimi disfunkcijami.

Vir: <https://www.medscape.com>, 11. 12. 2017

## POMENSTRUALNA MIGRENA: PREDLAGAJMO ŽELEZO!

Raziskovalci z Univerze v Severni Karolini so v znanstveni reviji *Headache* objavili raziskavo, kjer so proučevali 119 žensk, ki so pogosto tožile zaradi pojava pomenstrualnih migrenskih napadov. Ta se lahko pojavi z avro ali brez nje in nastopi takoj po končani menstruaciji ali v zadnjih dnevih menstruacijskega cikla. V povprečju so bile bolnice stare 36,8 let, z indeksom telesne mase 26,6, od tega jih je bilo 88 % bele rase. Vsem bolnicam, ki so tožile zaradi pomenstrualne migrene, so ugotavljali vrednosti spolnih hormonov in proteina feritina, ki v telesu deluje kot skladiščna beljakovina za železove ione. Ugotovili so vzročno povezavo med nizkim nivojem feritina (pod 50 ng/ml, ki velja za spodnjo normalno mejo, v povprečju so imele bolnice 21,9 ng/ml) in jakostjo migrenskega glavobola.

Vir: <https://www.medscape.com>, 21. 11. 2017

## TRIPTANI VARNI V NOSEČNOSTI

Raziskava, ki so jo raziskovalci objavili v julijski številki znanstvene revije *Cephalgia*, dokazuje, da triptani niso teratogeni in ne povzročajo splavov ali prezgodnjih porodov, torej so varni za uporabo v času nosečnosti. Predhodna spoznanja so namreč dopuščala možnost, da naj bi triptani, ki jih uporabljamo kot protibolečinske zdravilne učinkovine za lajšanje simptomov migrenskih glavobolov, lahko povzročali prezgodnje porode, splave in celo teratogeno delovali na plod. V prospektivni raziskavi so proučili izsledke pri 432 nosečnicah, ki so med celo nosečnostjo jemale triptane, ki so jih primerjali z izsledki 475 nosečnic, ki niso jemale triptanov, a so imele migrenske napade, ter z rezultati pri 1733 nosečnicah brez migrenskih napadov. Nosečnice so uvrstili v enotne skupine glede starosti, kajenja, pitja alkohola, telesne mase, števila predhodnih otrok in splavov. Izsledki raziskave kažejo, da pri nosečnicah, ki so med celo nosečnostjo jemale triptane (sumatripan, zolmitriptan ali rizatripan) ni bilo statistično značilnih odstopanj pri prezgodnjih porodih, prelahkih novorojenč-

kih, številu spontanih splavov, preeklampsiji ali teratogenih poškodbah plodu.

Vir: <https://www.medscape.com>, 20. 11. 2017

## Z NOVO TEHNOLOGIJO PROTI DOPINGU

Raziskovalna skupina sodelavcev Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (izr. prof. dr. Mojca Lunder, doc. dr. Tomaž Bratkovič, asist. dr. Peter Molek in prof. dr. Borut Štrukelj kot vodja projekta) v sodelovanju z doc. dr. Lovrom Žiberno z Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, prof. dr. Joškom Osredkarjem z Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in s Slovensko protidopinško agencijo je kot prva pripravila prototip splošne platforme na osnovi detekcije neznanih peptidov, proteinov ali peptidomimetikov, kar je po intenzivni strokovni evalvaciji Svetovna protidopinška agencija WADA prepoznala kot izjemno obetavno novo tehnologijo in projektu namenila dodatna finančna sredstva.

Platforma temelji na detekciji katere koli (znane in neznane) snovi, ki se veže na receptorje oziroma ligande in s tem izzove stimulativen fiziološki učinek. Glavni prednosti predlaganega sistema sta torej univerzalnost in visoka stopnja občutljivosti, kar bo zagotovo pripomoglo k uspešnejšemu dokazovanju prepovedanih snovi v športu.

# DRUŠTVENE VESTI

## ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

### IZPOPOLNJEVALNO IZOBRAŽEVANJE IZ KLASIČNE HOMEOPATIJE

**Lidija Blažič, mag. farm., Urška Hočevar, mag. farm., Indira Zanco, mag. farm.**

Na *Mednarodni akademiji za klasično homeopatijo* v Grčiji so tudi letos organizirali poletne večdnevne osnovne in izpopolnjevalne seminarje iz klasične homeopatije ter seminarje za obravnavo težkih primerov (od 29. 5. do 7. 6. 2017). Že več let se tem izobraževalnim skupinam z med-

narodno udeležbo homeopatov pridružujemo tudi magistri farmacije, zdravniki in veterinarji iz Slovenije. Letošnjega izpopolnjevalnega seminarja smo se, poleg 130 udeležencev s celega sveta, udeležile tri magistre farmacije: Lidija Blažič, Urška Hočevar in Indira Zanco. Večina slovenskih udeležencev izpopolnjevalnega seminarja je osnovno znanje iz klasične homeopatije po Georgu Vithoulkasu že pridobila na dvoletnem intenzivnem izobraževanju preko e-učenja, individualno ali v organizirani skupini pod vodstvom slovenske koordinatorke Katarine Lucije Glas, dr. med. Gre za v svetu priznano in razširjeno izobraževanje, akreditirano s strani številnih medicinskih in farmacevtskih fakultet in ustanov. V letošnjem letu je akreditacijo sprejel tudi *Zdravstveni svet Srbije*.

Cilj izpopolnjevalnega izobraževanja iz klasične homeopatije je utrditi znanje homeopatije na temeljnih originalnih Hahnemannovih dognanjih, spoznati različne pristope pri homeopatski obravnavi pacienta in razjasniti vprašanja, ki se porajajo pri vsakdanjem delu. Na *Mednarodni akademiji za klasično homeopatijo* poteka učenje z obravnavo primerov iz prakse in z analizo težav, ki jih predstavijo pacienti v živo. Ob tem se praviloma razvijejo živahne razprave, ki posegajo tako na področje homeopatske teorije kot tudi na področje repertorizacije in materije medike. Na podlagi teorije o ravneh zdravljenja ocenimo prognozo in predviden potek zdravljenja ter določimo, katera potencia izbranega



zdravila je za obravnavanega pacienta najoptimalnejša. Ob tem se velikokrat dotaknemo tudi navodil in priporočil, ki so zapisani v Hahnemannovem priročniku Organonu, ki je še danes neprecenljiv vir znanj in izkušenj, tudi za sodobne in že izkušene homeopate.

Na letošnjem izpopolnjevalnem izobraževanju iz klasične homeopatije smo obravnavali več kot petnajst različnih primerov, tudi zelo zahtevnih. Zelo zanimiv in poučen je bil primer 9-letnega dečka z blago cerebralno disfunkcijo, ki se je kazala kot motnje spomina in branja. Pri jemanju anamneze ga je prof. Vithoulkas podrobno izprašal in ugotovili smo, da ima težave predvsem z imeni in branjem. Prvo polovico besede je še uspel prebrati pravilno, naprej pa ni šlo. Še vedno je močil posteljo, uhajalo mu je tudi blato. Zelo rad je imel mleko, neprestano bi ga pil, ter sladkarije. Zelo občutljiv je bil na mraz. Takrat mu je največjo težavo v šoli povzročala motnja pozornosti (ADHD) ter občasno agresivno obnašanje. Ko se je razjezil, je kričal in tolkel okoli sebe, nato pa stekel v sobo, zaloputnil z vrati in nikogar ni spustil blizu.

Na osnovi simptomov in rezultatov repertoriziranja je prof. Vithoulkas dečku predpisal *Rhus toxicodendron* visoke potence v enkratnem odmerku.

Iz tega primera je razvidno, da se fizični nemir in okorelost, ki sta značilna za *Rhus toxicodendron*, lahko pojavita tudi na mentalno-emocionalni ravni. V mirovanju so sklepi otrdeli, kot bi bili zarjaveli, in le z neprestanim gibanjem postanejo bolj gibljivi (fizična raven). Emocionalno se okorelost kaže kot nezmožnost izražanja spontane topline ter kot hladnost in odmaknjenost. Mentalno pa se okorelost kaže

kot fiksne ideje in kot motnje spomina. Pravimo, da bolnik mentalno otrdi.

*Rhus toxicodendron* torej ni samo zdravilo za odpravljanje težav pri bolečinah v mišicah in sklepih, ki jih spremlja togost prizadetega dela. Uporaba tega zdravila je razširjena pri duševnih motnjah, globokih patologijah živčnega sistema, srca in skoraj vseh drugih organskih sistemov. Lahko ga uporabljamo praktično za vsako stanje, ki vsebuje ključne simptome *Rhus toxicodendron*, kot so praznoverje, ritualistično obnašanje, občutek zastrupljenosti, strah za posel in strah za otroke. Veliko teh simptomov izhaja iz okorelosti in nemira. Od fizičnih simptomov so za *Rhus toxicodendron* značilni zelo srbeči kožni izpuščaji z mehurčki, ki se izboljšajo v topli kopeli, pokanje v sklepih in rdeča konica jezika. V postelji so takšni bolniki nemirni in se neprestano obračajo, ko pa vstanejo, se jim v glavi pogosto zvrtili. Težave se poslabšajo na mrazu in v hladnem ter vlažnem vremenu, izboljšajo se po gibanju. Bolnik je žejen in bi neprestano pil mrzlo mleko, kar je bilo zelo izrazito tudi pri našem pacientu.

Praktični primeri in primeri in živo so neprecenljive vrednosti za nabiranje izkušenj in širjenje znanja, zato na izobraževanju na *Mednarodni akademiji za klasično homeopatijo* ni presenetljiva številčna udeležba homeopatov s celega sveta.

Tako pridobljena znanja iz klasične homeopatije in nove mednarodne povezave, ki nastajajo v Grčiji med homeopatskimi strokovnjaki, so prava pot k izgradnji kakovostnega homeopatskega svetovanja, tudi v slovenskih lekarnah.

## 7. KONFERENCA FARMACEVTSKIH ZNANOSTI BALATON-BALTIC-BLED- BOSPOUR

**Prof. dr. Julijana Kristl, Fakulteta za farmacijo,  
Univerza v Ljubljani**

Med 5. in 7. oktobrom 2017 je v Balatonfüredu ob Blatnem jezeru na Madžarskem potekala že sedma mednarodna konferenca farmacevtskih znanosti Balaton-Baltic-Bled-Bospour (7. BBBB) pod pokroviteljstvom EUFEPS-a in v organizaciji Madžarskega farmacevtskega društva *Societas Scientiarum Pharmaceuticarum Hungarica*. BBBB je ena izmed pomembnejših konferenc farmacevtskih znanosti, ki povezuje strokovnjake od severa do juga Srednje Evrope, kar se je odrazilo v pestri mednarodni udeležbi, celo iz Bližnjega in Daljnega vzhoda. Predstavniki Slovenskega farmacevtskega društva smo solidno zastopali slo-

vensko farmacevtsko znanost, tako po vsebini kot številu. Sodelovali smo že v organizacijskih pripravah, na sami konferenci pa smo izčrpno predstavili svoje raziskovalne dosežke in bili vključeni v moderiranje predavanj, posterjev in razprav.

Program je obsegal enajst plenarnih predavanj, ki so bila razdeljena v štiri tematske sklope: Trendi v razvoju zdravil in inovacij, Novosti pri zdravljenju rakavih bolezni, Translacijska medicina in biofarmacevtiki ter Biološko podobna zdravila. V obliki ustnih predstavitev je bilo podanih 67 prispevkov o aktualnih farmacevtskih temah, kot so sinteza novih spojin, analiza zdravil, odkrivanje novih tarč, razvoj novih dostavnih sistemov, bolnišnična farmacija, biofarmacevtiki, nanofarmacevtiki, novosti v proizvodnji ter regulativa zdravil. Razvoj na vseh področjih se nenehno spreminja ter vnaša nove predpise in obveznosti za celotno področje zdravil, od ideje v razvoju do trženja in spremljanja uporabe.

Vabljeni predavanja iz Slovenije so imeli prof. dr. Aleš Mrhar (*Translation of clinical pharmacy research into practice: a Slovenian case*), izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos (*Changes in pharmacokinetics in patients with chronic heart failure*), izr. prof. dr. Petra Kocbek (*Development of hollow nanostruc-*



Udeleženci iz Slovenije (z leve proti desni: mag. Matjaž Tuš, predsednik SFD, ter izr. prof. dr. Rok Dreu, prof. dr. Aleš Mrhar, asist. dr. Špela Zupančič, asist. Janja Mirtič, asist. dr. Matevž Luštrik, prof. dr. Mirjana Gašperlin, prof. dr. Stane Srčič, izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, prof. dr. Julijana Kristl, izr. prof. dr. Petra Kocbek, asist. Tanja Potrč, asist. Maja Bjelošević in doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani).



tures for magnetically-assisted drug delivery) in asist. dr. Špela Zupančič (*Nanofibers – a promising delivery system for beneficial bacteria*).

Izpostavljene so bile predvsem novosti na področju (nano in bio)tehnologije in načrtovanja eksperimentov, klinične farmacije in translacijske medicine. Če smo v Sloveniji lahko ponosni na razvoj (nano)tehnologije in klinične farmacije, ker so udeleženci z navdušenjem sprejeli naše predstavitve na predavanjih in posterjih, pa smo bistveno šibkejši na področju razvoja translacijske medicine v primerjavi s predstavitvijo Madžarov. Njihove translacijske centre tvorijo interdisciplinarni timi za določeno klinično indikacijsko področje, ki so povezani s sorodno evropsko in svetovno mrežo. To vodi do zadostnega števila kliničnih primerov, števila zdravnikov specialistov in raziskovalcev (informatikov, biokemikov, genetikov, diagnostikov in drugih), ki hkrati raziskujejo in si izmenjujejo klinične izkušnje in raziskovalne rezultate v medsebojnih razpravah. Poleg tega pa jim to predstavlja tudi lažji dostop do sredstev EU in rešitev na zastavljeni izziv (pankreatitis), pa ne le za tim, ki je z idejo začel, pač pa za celotno mrežo.

Na konferenci so predstavili 188 raziskovalnih posterjev, med njimi tudi sedem posterjev iz Katedre za farmacevtsko tehnologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Novost so bile raznovrstne vsebine, razdeljene v šestnajst tematskih sekcij po deset do dvanajst posterjev, z virtualno (elektronsko) in ustno predstavitvijo ob elektronskih posterjih. Udeleženci smo si lahko sami ogledovali posterje, v času, namenjen predstavitvam, pa je vsak prvi avtor ustno pojasnil vsebino svojega posterja v nekaj minutah, nakar je bil čas za eno ali več vprašanj. Ta novi način

kratkih predstavitev je celovitejši, hkrati pa bistveno zahtevnejši, saj pride v kratkem času do izraza še več avtorjevih kompetenc (sposobnost priprave znanstveno relevantne vsebine, njegovih komunikacijskih in retoričnih sposobnosti, pa tudi grafičnega oblikovanja). Dodatna posebnost tovrstne tehnične možnosti je sprotno evidentiranje ogledov posameznega posterja in nabiranje točk.

Žirija je pregledala ocene vseh posterjev in predstavitev ter izbrala dva najboljša prispevka in ju nagradila. Asist. Janjo Mirtič s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani so izbrali in nagradili za najboljši raziskovalni poster (*Microencapsulation of probiotics as biotherapeutic agents for their local delivery*) na 7. BBBB. Čestitke!

Na srečanju predstavnikov društev za aktivnosti BBBB iz Estonije in Finske, Madžarske, Slovenije (prof. J. Kristl in prof. M. Gašperlin) in Turčije je tekla beseda o uspehu dosedanjih srečanj in o načrtih za prihodnost. Soglasno smo se dogovorili, da bo 8. BBBB v Turčiji, mestu Izmir, v oktobru 2019 in 9. BBBB leta 2021 v Sloveniji, tradicionalno v organizaciji Slovenskega farmacevtskega društva in Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Po predavanjih in ob posterjih smo imeli tudi priložnost za navezovanje stikov z raziskovalci iz drugih društev, univerz in inštitutov ter izmenjavo izkušenj na njihovem področju raziskovalnega dela in delovanja. Organizator 7. BBBB v Balatonfüredu je poskrbel, da smo spoznali tudi madžarske kulinarične stvaritve in nacionalno tradicijo.

Ocenjujemo, da smo udeleženci 7. BBBB iz Slovenije uspešno predstavili naša inovativna raziskovalna področja, dobili nagrado in navezali nekaj novih stikov, kar skupaj odtehta ure in dneve, potrebne za raziskave in razvoj.



Nagrajenka Janja Mirtič s predstojnico Katedre za farmacevtsko tehnologijo prof. Mirjano Gašperlin, mentorico prof. Julijano Kristl in izr. prof. Petro Kocbek.



Prof. Ildiko Csoka in prof. Aleš Mrhar, soorganizatorja dvanajstega simpozija CESPT sta obvestila in povabila udeležence v Szeged na Madžarsko med 20. in 22. septembrom 2018.



## *Dragi bralci Farmacevtskega vestnika, dragi avtorji in recenzenti,*

v imenu uredništva Farmacevtskega vestnika se Vam ob koncu leta toplo zahvaljujem za vse ideje, prizadevnost in pomoč, kritike, pohvale in seveda za vaš dragoceni čas, ki ste ga namenili soustvarjanju Farmacevtskega vestnika. Naj vas tudi tokrat spodbudim k prihodnjim sodelovanjem, da bodo naše vsebine še bolj zanimive, kakovostne in uporabne. Zelo veseli bomo vaših razmišljanj, aktualnih prispevkov in strokovnih vsebin, s katerimi bomo nadgrajevali svoja znanja.

Naj vam leto, ki prihaja, prinese veselja, zadovoljstva in veliko drobnih radosti.

Naj bo bogato zdravja in dobre volje ter drobnih in neponovljivih trenutkov, ki nas delajo srečne.

Vse najlepše v 2018!

doc. dr. Nina Kočevar Glavač, glavna urednica Farmacevtskega vestnika

### Recenzenti:

dr. Alenka Premuš Marušič • prof. dr. Aleš Mrhar • prof. dr. Aleš Obreza • doc. dr. Barbara Artnik  
doc. dr. Bojan Doljak • prof. dr. Borut Štrukelj • dr. Boštjan Martinc • Cvetka Bačar • Cvetka Pernat  
izr. prof. dr. Damjan Janeš • Danila Hriberšek • prof. dr. Darko Černe • Demetrij Petrica • dr. Dominik Gaser  
prof. dr. Franc Vrečer • Helena Pavšar • izr. prof. dr. Igor Locatelli • asist. dr. Irena Prodan Žitnik  
prof. dr. Iztok Grabnar • mag. Jana Kodrič • Janez Toni • izr. prof. dr. Janez Mravljak • prof. dr. Joško Osredkar  
dr. Jure Peklar • dr. Katja Čvan Trobec • asist. dr. Lea Knez • izr. prof. dr. Leja Dolenc Grošelj  
prof. dr. Lucija Peterlin Mašič • asist. Maja Jošt • Maja Petre • prof. dr. Marija Bogataj  
izr. prof. dr. Marija Petek-Šter • doc. dr. Martina Gobec • prof. dr. Marko Anderluh • Matej Dobravc Verbič  
prof. dr. Mirjana Gašperlin • prof. dr. Mitja Kos • izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos • izr. prof. dr. Mojca Lunder  
Mojca Stubelj • doc. dr. Monika Štalc • dr. Nada Rotovnik Kozjek • doc. dr. Nina Kočevar Glavač  
mag. Nina Pisk • asist. dr. Peter Molek • Polonca Drogenik  
prof. dr. Samo Kreft • izr. prof. dr. Tanja Hojs Fabjan • Tanja Zorin • doc. dr. Tomaž Bratkovič  
izr. prof. dr. Tomaž Vovk • Vesna Farič Tuš

## RAZPIS ZA PODELITEV DRUŠTVENIH PRIZNANJ V LETU 2018

Odbor za podeljevanje društvenih priznanj objavlja razpis za podelitev društvenih priznanj v letu 2018. Podružnice in sekcije prijavijo kandidate skladno z določili Pravilnika o podeljevanju društvenih priznanj najkasneje do **31. januarja 2018.**

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 presejal svoje obveznosti, ki izhajajo iz opisa del in nalog delovnega mesta, ki ga zaseda. Predlogi morajo biti pripravljeni 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**

in v enem izvodu v tiskani obliki tajništvo Slovenskega farmacevtskega društva **najkasneje do 31. januarja 2018.**

Elektronsko oddane prijave, posredovane po elektronski pošti, morajo biti popolnoma enake kot pisne, poslana z navadno pošto.



## MAG. SCI. ELIZABETA RUSTJA

Kako čas hitro beži. Še danes se spomnim, kako je daljnega leta 1956 v laboratorij v kleti Realke prišlo nasmejeno dekle, stopilo do moje delovne mize in reklo: »Jaz sem Eli.« Tako sva se spoznala in pričelo se je dolgoletno prijateljevanje in sodelovanje. V študentskih letih prepisovanje dnevnikov vaj, posojanje zapiskov in izmenjava znanj, ne zavedajoč se, kaj nas čaka v bodočnosti. Eli je bila štipendist lekarnarice iz Novega mesta, vendar je kar hitro prešla v Krko, ki je bila tedaj še v povojih. Tu se je hitro znašla. Njena strokovna usposobljenost, prizadevnost in dobro znanje tujih jezikov jo je pripeljalo v oddelek za nove proizvode, ki je bil za Krko motor razvoja. V njem so sprejemali odločitve o sodelovanju s tujimi farmacevtskimi tovarnami in prevzemanju licenčnih proizvodov v program Krkinega razvoja. S svojo neposrednostjo, znanjem in resnostjo je znala navezati ne samo poslovne, temveč tudi prijateljske vezi z vrhunskimi strokovnjaki iz farmacije in medicine širom sveta. Tako je sodelovala s Krkinimi poslovnimi partnerji v Švici, Angliji, Nemčiji, Rusiji, Ameriki, na Nizozemskem, Poljskem in Japonskem. V Krko je pripeljala mnoga pomembna zdravila in s tem omogočila njihovo uporabo na prostoru nekdanje Jugoslavije, Krki pa omogočila prodor s svojimi proizvodi v države Vzhodne Evrope in s tem njen nepričakovano hiter razvoj iz male v veliko farmacevtsko tovarno. Zato lahko rečemo, da sta Krko, kakršna je danes, zasnovala mag. Miloš Kovačič in mag. Elizabeta Rustja. Kljub obilici dela je Eli našla čas tudi za izpopolnjevanje svojega znanja. Vpisala se je na podiplomski študij na tedanji VTOZD Farmacija v Ljubljani in ga leta 1990 uspešno zaključila z zagovorom magistrske naloge s področja farmakokinetike. Leta 1991 so jo imenovali za direktorico Sektorja za razvoj in raziskave Krke. Tedaj je bila Krka že velika farmacevtska tovarna, vendar so se razmere v svetu močno spremenile. Slovenija je postala samostojna država kot tudi mnoge druge države po svetu. Zakoni o zdravilih v novo nastalih državah so se močno spremenili. Spremenili pa so se tudi licenčni odnosi. Kot direktorica Sektorja za razvoj in raziskave je morala preusmeriti sodelovanje v slovenske centre znanja, da bi oblikovala močne ekipe za razvoj tehnologije kemijskih sintez, fermentativne tehnologije učinkovin in novih tehnologij oblikovanja zdravil. Povezala se je z ustreznimi fakultetami in inštituti in tako oblikovala strategijo razvoja generičnih zdravil v Krki, ki je danes eden najpomembnejših proizvajalcev generičnih zdravil na svetu. S tem pristopom je pomagala tudi slovenskim raziskovalnim organizacijam. Podprla je mnoge nji-

hove aplikativne raziskovalne projekte, ki so se tako lahko kadrovske okrepili in opremili z mnogimi za raziskave nujnimi aparati. Ves čas je podpirala tudi ustanovitev samostojne farmacevtske fakultete v Ljubljani in pomagala pri izgradnji nujno potrebne zgradbe fakultete.

In kje je najino dolgoletno sodelovanje? Tako kot je Eli iz lekarnarice prešla v tovarno, sem sam z Zavoda prešel na fakulteto. Zato se je name obrnila z mnogimi problemi, s katerimi se je srečala. Skupaj sva organizirala prvi laboratorij za stabilnost zdravil, laboratorij za biofarmacijo in farmakokinetiko. Ob pomoči Fakultete za farmacijo, ki je izvedla od leta 1992 do leta 2003 več kot 90 bioekvivalenčnih raziskav, je Krka uspešno registrirala svoja zdravila doma in v svetu. In ne samo to. Po osamosvojitvi Slovenije sva skupaj tujim strokovnjakom predstavljala našo novo zakonodajo na področju registracije zdravil, da bi pridobila njihovo zaupanje in naklonjenost za nadaljnje sodelovanje. Vrsto let sva sodelovala tudi v Slovenskem farmacevtskem društvu. Skupaj sva organizirala mnoga strokovna srečanja, ki so se jih farmacevti iz vse Jugoslavije radi udeleževali. Zato ji je Slovensko farmacevtsko društvo leta 1994 podelilo Minařikovo odličje.

Še danes se rad spominjam tega sodelovanja, predvsem pa veselim vsakokratnega srečanja. In Eli je ostala Eli, predana, tudi v pokoju, svoji Krki. Ko sem ji na zadnjem srečanju potarnal o bolečinah v rami, mi je hitro postregla z Nalgesinom S, ki je najboljšo protibolečinsko zdravilo na svetu.

Želim Ti še veliko srečnih let in uspešnega sodelovanja.

Franc Kozjek

## MAG. ROMAN DOBROVOLJC

Poznam ga že več kot 60 let in vedno se mi je zdel malo trmast, vendar čuteč Gorenc. Nekoč mi je rekel, da čeprav nisem Gorenc, sem tudi »fejst« fant. To sem štel kot veliko pohvalo, zlasti ko mi je ob novem letu napisal: »Kje ste stari prijateljji? Ali vas bom še kdaj našel?«

Tako kot še pri mnogih drugih je tudi pri njem pri odločitvi za študij farmacije odločilno vlogo odigrala štipendija, ki mu jo je podelila lekarna iz Kamnika. To je bilo za njega in za njegove starše velika finančna razbremenitev. Spoznal pa je tudi, da je študij farmacije zanimiv in poklic magistra farmacije upoštevan. Med študijem farmacije se nisva prav veliko družila. Deloma zato, ker nisva obiskovala istega letnika, deloma pa zato, ker je Roman vsak prosti čas izkoristil, da je pobegnil v rojstni Kamnik. Tudi po končanem študiju se kar nekaj časa nisva srečevala. Takoj se je zaposlil v lekarni v Kamniku, da odsluži svojo štipendijo, in je v Ljubljano prišel šele po nekaj letih. Na prigovarjanje prof. Dušana Karbe je sprejel službo analitika na Zavodu za farmacijo in kontrolo zdravil. Sprva mu ni bilo lahko, ker je razlika med lekarniškim in laboratorijskim analiznim delom zelo velika. Samo ob podpori in spodbudah tedanje direktorice Zavoda mag. Brecljeve in prof. Karbe je vztrajal, se vpisal na podiplomski študij iz analitike zdravil v Beogradu in ga tudi končal.

Leta 1977 je končno prevzel vodenje Zavoda za farmacijo in pričel z njegovo kadrovsko in prostorsko prenovo. Poznavajoč dejavnosti evropskih nadzornih medicinskih laboratorijev je vpeljal nove metode analitike zdravil in poskrbel za moderno analizno opremo, kar naj bi Zavodu zagotovilo enako kakovost dela, kot so jo imeli drugi jugoslovanski in tudi evropski tovrstni laboratoriji.

Prišlo je leto osamosvojitve in pričele so se povsem druge razmere za delo Zavoda. Zavod ni bil več samo eden od jugoslovanskih kontrolnih laboratorijev, temveč najpomembnejši državni laboratorij za analizo kakovosti zdravil, registriranih v Sloveniji. Potrebno je bilo urediti zahtevano zakonodajo, ponovno registracijo vseh zdravil, ki so bila v uporabi na področju Slovenije, uvesti njihovo evidenco in se povezati z ustreznimi evropskimi institucijami. Cilj mag. Romana Dobrovoljca je bil, da bi Zavod za farmacijo in kontrolo zdravil postal »mala FDA« za Slovenijo. Dosegel je, da je Zavod postal član Združenja evropskih nadzornih medicinskih laboratorijev (OMCL), kar je pomenilo, da so bile njegove analize in ekspertize povsem ekvivalentne analizam drugih evropskih držav. Vendar mu je zdravstvena politika v Sloveniji to preprečila. Ustanovila je Agencijo za

zdravila, Zavod priključila Agenciji, s čimer se je njegov pomen za slovensko farmacijo bistveno spremenil. Mag. Dobrovoljc se je takrat umaknil, odšel v pokoj in prepustil usodo Zavoda mlajšim generacijam, ki se pomembnosti te ustanove niso nikoli zavedali.

Mag. Dobrovoljc je bil aktiven tudi izven okvira Zavodovih dejavnosti. Vrsto let je bil asistent pri predmetu analiza zdravil na fakulteti za farmacijo. Tako je mnoge generacije bodočih farmacevtov seznanjal s problemi kakovosti zdravil in njihovo kontrolo. Na tem področju je oral ledino, pripravljaj navodila za laboratorijske vaje, jih izvajal v laboratoriju in postavljaj temelje bodočih predmetov s področja analize zdravil na študiju farmacije.

Člani Slovenskega farmacevtskega društva so ga leta 1981 izvolili za predsednika društva z dveletnim mandatom. V tem času si je prizadeval za napredek farmacije v Sloveniji in njen ugled v Jugoslaviji in v svetu. Zavzemal se je predvsem za nenehno izpopolnjevanje farmacevtskega kadra, saj se je zavedal, kako hitro se na področjih medicine in farmacije znanja dopolnjujejo. Poleg tega je v tem času iskal tudi rešitve za prostorske težave Zavoda. Združil je moči in sredstva vse farmacevtske stroke in nadgradil stavbo Zavoda. S tem je omogočil ne samo izvajanje novih dejavnosti Zavoda, temveč tudi Slovenskemu farmacevtskemu društvu, ki je iskalo poslovne prostore, omogočil večletno gostovanje v teh prostorih. V teh letih je Zavod za farmacijo resnično predstavljal dom slovenske farmacije. Ne samo velik farmacevt, Roman je tudi odličen fotograf. Na vseh naših srečanjih, ga je spremljal fotografski aparat, s katerim je beležil »rajske lepote naše domovine«, kot se je rad izrazil. Nastajale so prave fotografske umetnine, ki jih žal hrani samo za sebe. Ob njih in pesnitvah Gregorčiča, Prešerna, Lermontova, La Fontaine-a in drugih umetnikov pesniške besede se povsem razneži in zaživi. Zato, čeprav sam pravi, da nima več načrtov, nam s svojo življenjsko energijo in upornostjo lahko pripravi še marsikatero lepo presenečenje.

Franc Kozjek



## STROKOVNI ČLANKI – PROFESSIONAL ARTICLES

Poraba protimikrobnih in protiglivičnih zdravil v Sloveniji / <i>Consumption of antibiotics and antimycotics</i> (Fúrst J)	3
Antibiotična kirurška profilaksa – osnovni principi in trajanje / <i>Antibiotic surgical prophylaxis – basic principles and duration of treatment</i> (Nadrah K)	6
Zdravljenje z lokalnimi antimikotiki. Kje so težave? (Glavnik T)	10
Prilagajanje odmerkov protimikrobnih zdravil / <i>Dose adjustments of the antimicrobial drugs</i> (Drofenik P)	14
Uporaba metilenskega modrila v zdravljenju septičnega šoka / <i>The use of methylene blue in the treatment of septic shock</i> (Jereneč K, Markota A, Ferk P)	25
Mejne vrednosti ostankov zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi po čiščenju v proizvodnih prostorih / <i>Exposure limits of residues of active ingredients and excipients after cleaning in production facilities</i> (Kragelj Lapanja N, Sollner Dolenc M)	32
Uporaba zdravilnih rastlin pri zdravljenju živali / <i>The use of medicinal plants in the treatment of animals</i> (Munda M, Lipičnik Rozman L)	187
Od prve objave odkritja morfina (1805) do njegovega mednarodnega priznanja (1817) / <i>From the first report on discovery of morphine (1805) to its international recognition (1817)</i> (Krbavčič A, Pečar S)	315
Nevarnosti in ugotavljanje hipervitaminoz askorbinske kisline in vitamina D / <i>Dangers and determination of ascorbic acid and vitamin D hypervitaminosis</i> (Muminović B, Malešič I)	326

## PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

Androgeni in rak endometrija – možnosti novih pristopov zdravljenja / <i>Androgens and endometrial cancer – potential novel therapeutical approaches</i> (Knific T, Lanišnik Rižner T)	38
Miti ter znanstveno podprti dokazi o smislu in možnosti vplivanja na kislinobazno in elektrolitsko homeostazo človeškega organizma / <i>Myths and scientifically backedup proofs regarding the sense and possibility of influencing acido-base and electrolytic homeostasis in humans</i> (Jeras M)	59
Miti in resnice o detoksifikaciji jeter z zdravilnimi rastlinami in prehranskimi dopolnili / <i>Myths and truths about detoxification of liver with medicinal plants and food supplements</i> (Kreft S)	69
Doping in uporaba prehranskih dopolnil v športu / <i>Doping and use of nutritional supplements in sports</i> (Žiberna L)	77
»Fat burners« – čudežna prehranska dopolnila za izgorevanje maščob: od mitov do resnice / <i>»Fat burners« – miraculous weight-loss dietary supplements: from myth to reality</i> (Jakopin Ž)	85
Starostniki: od epidemiologije do specifičnih lastnosti populacije - nekateri spregledani (javno)zdravstveni problemi starejših / <i>Older adults: from epidemiology to the specific characteristics of the population - some of the overlooked (public) health problems of the older adults population</i> (Gabrijelčič Blenkuš M, Robnik M)	97
Zakaj je lahko učinek zdravil pri starostnikih drugačen? / <i>Why drugs act differently in elderly?</i> (Kerec Kos M, Vovk T)	107
Starostnikom prijazne farmacevtske oblike / <i>Older patients friendly dosage forms</i> (Gašperlin M, Zvonar Pobirk A)	115



Demenca je izziv sodobne družbe / Dementia is a challenge of modern society (Gregorič Kramberger M)	123
Ishemična možganska kap - posebnosti pri zdravljenju starostnikov / <i>Ischemic stroke - specificities in the treatment of the elderly</i> (Cvetojevič Z, Pretnar Oblak J)	129
Nefarmakološko zdravljenje nespečnosti pri starostnikih / <i>Nonpharmacological treatment of late-life insomnia</i> (Štukovnik V)	137
Obseg in značilnosti neprimerne predpisovanja zdravil za starostnike v Sloveniji / <i>Extent and nature of inappropriate medication prescribing among elderly in Slovenia</i> (Jazbar J, Locatelli I, Kos M)	145
Zdravljenje depresije pri starostnikih / <i>Treating depression in the elderly</i> (Tršinar M)	153
Zaviralci poli (adenozin difosfat-riboza) polimeraze pri zdravljenju raka / <i>Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy</i> (Kenig S)	203
Gensko zdravljenje z virusnimi vektorji / <i>Viral vectors in gene therapy</i> (Šink A)	210
Sodobna zdravila za zdravljenje multiple skleroze in trendi v prihodnosti / <i>Modern medicines for the treatment of multiple sclerosis and future trends</i> (Lučev U)	216
Zaviralci in stabilizatorji interakcij med proteini / <i>Inhibitors and stabilizers of protein-protein interactions</i> (Bergant K, Perdih A)	224
Mezenhimske matične celice: uporaba in potencial za zdravljenje ter diagnostiko mišično-skeletnih bolezni / <i>Mesenchymal stem cells: applications and potential in treatment and diagnosis of musculoskeletal disorders</i> (Zupan J, Čamernik K, Jeras M, Barlič A, Drobnič M, Marc J)	234
Zdravila za zdravljenje Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa / <i>Medicines for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis</i> (Jakopovič K)	267
Klinična prehrana in kronična vnetna črevesna bolezen / <i>Clinical nutrition and inflammatory bowel disease</i> (Peklaj E)	273
Primer bolnice s Crohnovo boleznijo v zunanji lekarni / <i>An example of a Crohn's disease patient in community pharmacy</i> (Madjar B)	278
Ulcerozni kolitis-klinični primer / <i>Ulcerative colitis-clinical case</i> (Vilč L)	283
Novosti v zdravljenju multiple skleroze / <i>New treatments of multiple sclerosis</i> (Horvat Ledinek A)	288
Obvladovanje simptomov pri multipli sklerozi / <i>Symptoms control in multiple sclerosis</i> (Stare K)	292
Monoklonska protitelesa: kako naprej? / <i>Monoclonal antibodies: What 's next?</i> (Marc G)	298
Imunogenost bioloških zdravil / <i>Immunogenicity of biological drugs</i> (Bratkovič T)	345

## KRATKI ZNANSTVENI ČLANKI – SHORT SCIENTIFIC ARTICLES

Optimizacija zdravljenja z nekaterimi zdravili pri bolnici po možganski kapi z disfagijo (Pisk N)	161
Vloga in pričakovani učinki zdravil pri srčnem popuščanju s prikazom dveh primerov (Morgan T)	167
Težave povezane z zdravljenjem nespečnosti pri starostnikih - primer iz prakse farmacevta svetovalca (Milfelner – Ferk R)	173
Izzivi in nove priložnosti pri obravnavi dementnega bolnika v lekarni / <i>Challenges and new opportunities in management of a dementive patient in a community pharmacy</i> (Glavnik T)	177





## ORIGINALNI ZNANSTVENI ČLANKI – ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

Kronična urtikarija in njen vpliv na kakovost življenja bolnikov / <i>Chronic urticaria and its influence on patients' quality of life</i> (Kramberger U, Kecejl Leskovec N, Jeras M)	194
Navade pri uporabi zdravil ter prehranskih dopolnil za krepitev odpornosti med odraslo slovensko populacijo / <i>Ways in the use of medicines and dietary supplements to enhance resistance among adult Slovenian populations</i> (Banović A, Pisk N, Lisjak Rijavec N, Pavšar H)	303
Kakovost probiotičnih prehranskih dopolnil na slovenskem trgu v luči zakonodaje o zdravstvenih trditvah na živilih / <i>Quality of probiotic supplements on the Slovenian market in the light of legislation on health claims on foodstuffs</i> (Mohar Lorbeg P, Bogovič Matijašič B)	332

## NOVI DOKTORJI ZNANOSTI / NEW DOCTORS OF SCIENCE 48, 355

## NOVICE IZ SVETA FARMACIJE 365

## ZANIMIVOSTI IZ STROKE – BRANCH NEWS

Generalna skupščina Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov, GA EAHP 2016	51
Poročilo iz evropskega homeopatskega kongresa na Dunaju	53
Častni doktorat prof. dr. Stanetu Srčiču	55

## DRUŠTVENE VESTI – ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

42. skupščina SFD	249
Podelitev društvenih priznanj v letu 2017	251
Izpopolnjevalno izobraževanje iz klasične homeopatije	267
7. konferenca farmacevtskih znanosti Balaton-Baltic-Bled-Bospour	269
Osebnosti	262, 372
Letno kazalo	374



## INDEX AVTORJEV / INDEX OF AUTHORS

Banović A	303	Munda M	187
Barlič A	234	Nadrah K	6
Bergant K	224	Pavšar H	303
Bogovič Matijašič B	332	Pečar S	315
Bratkovič T	345	Peklaj E	273
Cvetojevič Z	129	Perdih A	224
Čamernik K	234	Pisk N	161, 303
Drobnič M	234	Pretnar Oblak J	129
Drofenik P	14	Robnik M	97
Ferk P	25	Sollner Dolenc M	32
Fürst J	3	Stare K	292
Gabrijelčič Blenkuš M	97	Šink A	210
Gašperlin M	115	Štukovnik V	137
Glavnik T	10, 177	Tršinar M	153
Gregorič Kramberger M	123	Vilč L	283
Horvat Ledinek A	288	Vovk T	107
Jakopin Ž	85	Zupan J	234
Jakopovič K	267	Zvonar Pobirk A	115
Jazbar J	145	Žiberna L	77
Jeras M	194, 234, 59		
Jereneč K	25		
Kecelj Leskovec N	194		
Kenig S	203		
Kerec Kos M	107		
Knific T	38		
Kos M	145		
Kragelj Lapanja N	32		
Kramberger U	194		
Krbavčič A	315		
Kreft S	69		
Lanišnik Rižner T	38		
Lipičnik Rozman L	187		
Lisjak Rijavec N	303		
Locatelli I	145		
Lučev U	216		
Madjar B	278		
Malešič I	326		
Marc G	298		
Marc J	234		
Markota A	25		
Mohar Lorbeg P	332		
Morgan T	167		
Milfelner – Ferk R	173		
Muminović B	326		



### Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovca 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 lekarnе in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

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

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



# NAVODILA ZA AVTORJE

**Spodnja poglavja podajajo pomembne informacije za avtorje. Prosimo, da jih pri pripravi člankov dosledno upoštevate.**

**Strokovne in znanstvene članke** ter **druge prispevke** objavljamo v slovenskem jeziku, po dogovoru z uredništvom tudi v angleščini. Vsa besedila morajo biti jezikovno in slogovno neoporečna. 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 tudi v primeru, če je naveden popoln seznam vseh na tržišču dostopnih izdelkov.

**Strokovni in znanstveni članki so recenzirani.** Uredništvo pošlje vsak strokovni in znanstveni članek v recenzijo najmanj dvema recenzentoma. Med postopkom ugotavljanja primernosti prispevka za objavo v Farmacevtskem vestniku zagotavljamo tajnost avtorstva.

## SPREJEM PRISPEVKA V UREDNIŠTVO

Članke in druge prispevke sprejemamo v uredniški postopek, če vloga za objavo, poslana po elektronski pošti, poleg članka ali drugega prispevka, vsebuje tudi spremni dopis z izjavo. Izjavo lahko avtor odda tudi preko spletnega obrazca.

### 1. Spremni dopis

- naslov članka ali drugega prispevka;
- imena in priimki avtorjev z njihovimi nazivi;
- imena in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni;
- telefonska številka in elektronski naslov korespondenčnega avtorja;
- izjava, da članek oziroma prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji.

## 2. Dovoljenje za objavo slik:

V primeru ponatisa ali minimalnih sprememb slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje lastnika avtorskih pravic za objavo v Farmacevtskem vestniku.

## PRVA VERZIJA ČLANKA

V prvi verziji strokovnega ali znanstvenega članka, ki jo avtorji pošljejo uredništvu v recenzijo, avtorji niso imenovani. Celotni obseg članka ne sme presegati **20.000** znakov, vključno s presledki, obseg kratkega strokovnega članka pa ne sme presegati **10.000** znakov, vključno s presledki. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

### 1. Oblika

#### Osnovna navodila

- Pisava *Times New Roman*; obojestranska poravnava. Avtorji naj se izogibajo urejanju in oblikovanju besedila (razen enostavnih ukazov, kot so krepko (*bold*), ležeče (*italics*), podčrtano (*underline*) itd.).
- **Naslov:** ne vsebuje števil in okrajšav ter ne presega 90 znakov, vključno s presledki.
- **Naslov poglavja/podpoglavja:** oštevilčen je z zaporedno številko, ne vsebuje okrajšav in ne presega 90 znakov, vključno s presledki.

### 2. Vsebina članka

Članek je ustrezno strukturiran na poglavja/podpoglavja.

#### 2.1 Izvirni znanstveni članek:

- 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;
- razprava\*;
- sklep;
- literatura.

\* Rezultati in razprava so lahko združeni.

#### 2.2 Pregledni strokovni ali znanstveni članek:

- 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.

### 2.3 Kratki strokovni članek – primer iz klinične prakse:

- povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed);
- ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5);
- uvod v primer (splošno o bolezni, epidemiologija, farmakoekonomika);
- prikaz primera (opis pacienta, dosedanje zdravljenje in pacientov odziv, anonimizacija vseh osebnih podatkov);
- razprava (povzeto po literaturi – opredelitev dokazov, ki vplivajo na obravnavo pacienta, npr. smernice, raziskave, obstoječe klinične prakse itd.);
- ukrepanje s svetovanjem (predstavitev ukrepov in svetovanja oz. vodenja pacienta na podlagi zbranih podatkov);
- sklep (pacientov odziv na predlagane ukrepe in klinična uporabnost zbranih podatkov);
- literatura.

Vsaka trditve je podkrepjena z literaturnim virom, zaporedna številka literaturnega vira pa je navedena na koncu trditve v oklepaju. Če je literaturnih virov več, so številke ločene z vejicami in presledki, na primer (1, 3, 8) ali (1-3, 5). Prispevek vsebuje največ **40** literaturnih virov, ki so navedeni v vrstnem redu, kot se pojavljajo v besedilu.

### 3. Slike in preglednice

Slike in preglednice so v besedilu članka oziroma prispevka. Označene so z zaporedno številko ter opremljene s pripadajočim besedilom v slovenskem in angleškem jeziku, ki je navedeno pod sliko (primer 1) oziroma nad preglednico (primer 2). V besedilu slike ali preglednice so navedeni tudi ustrezni literaturni viri, razen v primeru, kadar je avtor članka oziroma prispevka tudi avtor slike ali preglednice.

Primer 1:



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

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

Primer 2:

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

**Table 1:** Number of publications in the Journal of Pharmaceutical Society in 2009 (1).

Vrsta objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

Slike merijo v širino in višino največ 17 cm. Dimenzijsko se morajo čim bolj približati dejanski velikosti v tiskani verziji. Zaželena velikost besedila na sliki ali grafu je med 8 in 10 pt pri velikosti 1 : 1. Grafi in slike iz excela so uvoženi v besedilo kot »*enhanced metafile*«. Slike mora avtor poslati skupaj s končno verzijo prispevka tudi neodvisno od besedila prispevka v ustreznem slikovnem zapisu: bitni zapis – jpg, png ali tiff – z ločljivostjo najmanj 300 dpi, vektorski zapis – eps, emf ali wmf.

### 4. Poimenovanja in okrajšave

Poimenovanja in okrajšave so navedeni skladno po IUPAC, IUBMB in HUGO. Terminologija je skladna s Farmacevtskim terminološkim slovarjem, Formulariumom Slovenicumom in terminološkim slovarjem Slovenskega biokemijskega društva.

### 5. Navajanje literature

Za navajanje literaturnih virov uporabljamo »*Vancouver reference style*«. Spodaj podajamo najpogostejše primere navajanja literature iz članka (1) in članka v elektronski reviji (2), knjige (3) in elektronske knjige (4), poglavja v knjigi (5) in poglavja v elektronski knjigi (6) ter spleta (7). Če je avtorjev posameznega članka več kot šest, navedemo le prvih šest, nato sledi »et al.«. Podrobnejša navodila in drugi primeri navajanja referenc so dostopni v dokumentu »*Quick reference guide: Vancouver Citing & Referencing style*« (<http://guides.lib.monash.edu/citing-referencing/vancouver>).

1. Hallal AH, Amortegui JD, Jeroukhimov IM, Casillas J, Schulman CI, Manning RJ, et al. Magnetic resonance cholangiopancreatography accurately detects common bile duct stones in resolving gallstone pancreatitis. *J Am Coll Surg.* 2005 Jun;200(6):869-75.
2. Stockhausen L, Turale S. An explorative study of Australian nursing scholars and contemporary scholarship. *J Nurs Scholarsh [Internet].* 2011 Mar [cited 2013 Feb 19];43(1):89-96. Available from: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.monash.edu.au/docview/858241255?accountid=12528>



3. Carlson BM. *Human embryology and developmental biology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.
4. Shreeve DF. *Reactive attachment disorder: a case-based approach* [Internet]. New York: Springer; 2012 [cited 2012 Nov 2]. 85 p. Available from: <http://ezproxy.lib.monash.edu.au/login?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1647-0>
5. Blaxter PS, Farnsworth TP. *Social health and class inequalities*. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health*. 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.
6. Halpen-Felsher BL, Morrell HE. *Preventing and reducing tobacco use*. In: Berlan ED, Bravender T, editors. *Adolescent medicine today: a guide to caring for the adolescent patient* [Internet]. Singapore: World Scientific Publishing Co.; 2012 [cited 2012 Nov 3]. Chapter 18. Available from: [http://www.worldscientific.com/doi/pdf/10.1142/9789814324496\\_0018](http://www.worldscientific.com/doi/pdf/10.1142/9789814324496_0018)
7. *Diabetes Australia. Diabetes globally* [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/Diabetes-Globally/>

## KONČNA VERZIJA ČLANKA

Korespondenčni avtor članka prejme po opravljenem recenzijem postopku obvestilo o sprejemu ali zavrnitvi članka oziroma navodila glede potrebnih popravkov. Uredništvo pričakuje, da bo avtor pripombe recenzentov in uredništva dosledno upošteval in **najkasneje dva tedna po prejetju recenzij** popravljeni prispevek v elektronski obliki poslal na naslov glavne urednice. Vse popravke mora vidno označiti.

### 1. Naslovna stran (prva stran) vsebuje:

- naslov prispevka (v slovenskem in angleškem jeziku);
- imena in priimke vseh avtorjev z nazivi, skupaj z imeni in naslovi ustanov, v katerih so zaposleni;
- ime korespondenčnega avtorja in njegov elektronski naslov.

### 2. Besedilo

Poglavja in podpoglavja članka si sledijo v vrstnem redu in obliki, kot je navedeno pri navodilih za prvo verzijo članka, vključno s slikami in preglednicami.

### 3. Slike

Slike mora avtor poslati tudi neodvisno od besedila članka ali prispevka v ustreznem slikovnem zapisu. Velikost slik se mora ujemati s prej navedenimi zahtevami zaradi ohranjanja kakovosti in razmerij ob pripravi na tisk.

## DRUGI PRISPEVKI

Prispevki za rubrike »Zanimivosti iz stroke«, »Iz društvenega življenja«, »Predstavitev knjige« vsebujejo praviloma največ **6.000 znakov**, vključno s presledki. Prispevki za rubriko »Osebnosti« ne smejo presežati **3.000 znakov**, vključno s presledki. Prispevke o osebnih vesteh objavlja uredništvo ob jubileju, smrti ali za posebne dosežke članov Slovenskega farmacevtskega društva v aktualnem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

## KOREKTURE IN TISKANA OBLIKA FARMACEVSTKEGA VESTNIKA

Krtačne odtise oblikovanega prispevka morajo avtorji natančno pregledati in označiti nujne popravke, s katerimi ne smejo posegati v vsebino prispevka. Korektore vrne korespondenčni avtor v uredništvo v **elektronski obliki** najkasneje v treh delovnih dneh.

Prvi avtor prejme tri izvode tiskanega Farmacevtskega vestnika.

## POŠILJANJE PRISPEVKOV

Avtorji pošljejo članke in druge prispevke v elektronski obliki na naslov glave urednice: [urednica-fv@sfd.si](mailto:urednica-fv@sfd.si).

## FARMACEVTSKI VESTNIK NA SPLETU

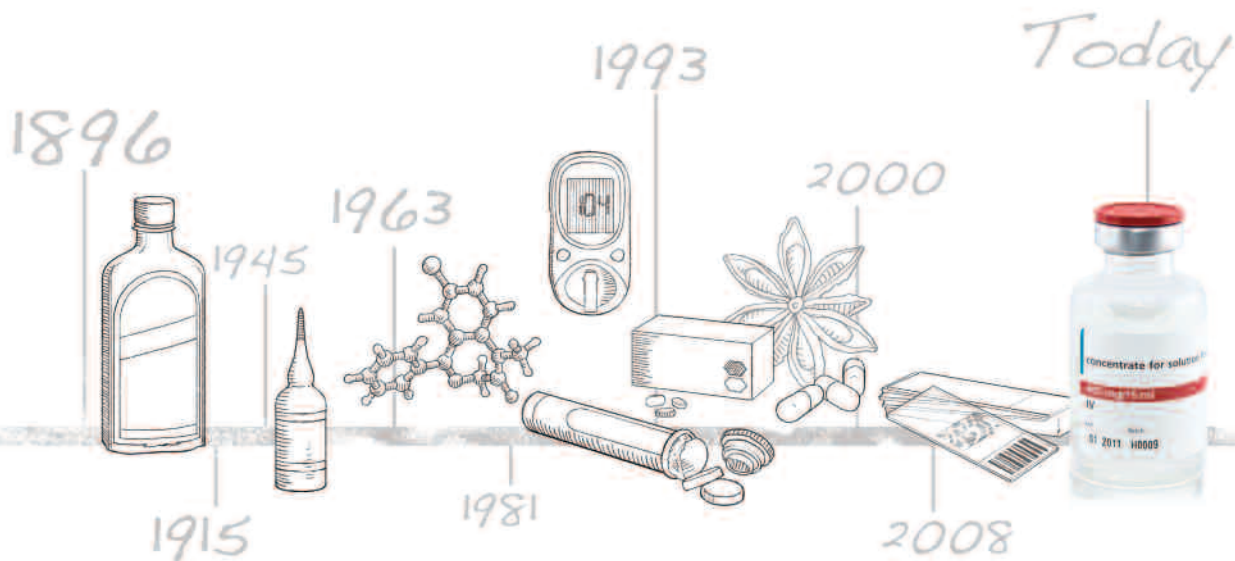
Farmacevtski vestnik je v pdf obliki **prosto dostopen** na spletni strani Slovenskega farmacevtskega društva (<http://www.sfd.si/?viewPage=19>).

## AVTORSKE PRAVICE

### © Slovensko farmacevtsko društvo

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





*Za boljše življenje. Že vse od 1896.*

Tradicija napredka znanosti in  
medicine. Včeraj, danes in jutri.



DOL ŽE EZINOFILCI, DOL S POSLABŠANJI, GOR S FEV1,



NAPREJ Z ŽIVLJENJEM...<sup>1,2</sup>



Huda eozinofilna astma lahko nadzoruje življenje.<sup>3,4</sup> Z novo obliko zdravljenja z zdravilom CINQAERO® proti IL-5, lahko pripomorete k nadzoru ravni eozinofilcev.<sup>1,2</sup> Zdravilo CINQAERO® dokazano zmanjšuje poslabšanja, izboljšuje FEV1 in povečuje kakovost življenja pri odraslih s hudo astmo in z  $\geq 400$  celic/ $\mu$ L eozinofilcev v krvi, katerih astma ostaja neustrezno nadzorovana, kljub standardom oskrbe.<sup>1,2</sup> Študije kažejo, da so ti trije učinki zdravila CINQAERO® zgodnji in trajni.\*<sup>1,2</sup>

**Trije učinki zdravila CINQAERO® - kot novo dodatno zdravljenje pri odraslih bolnikih s hudo eozinofilno astmo, ki kljub uporabi visokih odmerkov inhalacijskih kortikosteroidov z drugim zdravilom za vzdrževalno zdravljenje ni ustrezno urejena.<sup>1,2</sup>**

\* Indikacija, ki je bila v Evropi odobrena za uporabo zdravila CINQAERO®, ni bila prisotna pri vseh bolnikih, ki so bili del populacije v študiji. Zdravilo CINQAERO® se lahko predpisuje zgolj v skladu s Povzetkom glavnih značilnosti zdravila ter bolnikom, za katere je indicirano. **Viri:** 1. CINQAERO® SmPC, april 2017. 2. Castro M, Zangrilli J, Wechsler ME et al. Lancet Respir Med, 2015; 3: 355-66. 3. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2015. Dostopno na internetu na naslovu: <http://www.ginasthma.org>. Accessed March 2016. 4. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL et al. Eur Respir J, 2014; 43: 343-73.

#### Skrajšan povzetek glavnih značilnosti zdravila CINQAERO®

▼ Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti. Tako bodo hitreje na voljo nove informacije o njegovi varnosti. Zdravstvene delavce naprošamo, da poročajo o katerem koli domnevem neželenem učinku zdravila.

**Ime zdravila** CINQAERO 10 mg/ml koncentrat za raztopino za infundiranje. **Kakovostna in količinska sestava** En ml koncentrata vsebuje 10 mg reslizumaba (10 mg/ml). Ena viala z 2,5 ml vsebuje 25 mg reslizumaba. Ena viala z 10 ml vsebuje 100 mg reslizumaba. Reslizumab je humanizirano monoklonsko protiteleso, pridobljeno iz mišjih mielomskih celic (NSO) s tehnologijo rekombinantne DNA. **Farmacevtska oblika** koncentrat za raztopino za infundiranje (sterilen koncentrat). Bista do rahlo motna, opalescentna, brezbarvna do rahlo rumena raztopina s pH 5,5. Prisotni so lahko beljakovinski delci. **Terapevtske indikacije** Zdravilo CINQAERO je indicirano kot dodatno zdravljenje pri odraslih bolnikih s hudo eozinofilno astmo, ki kljub uporabi visokih odmerkov inhalacijskih kortikosteroidov z drugim zdravilom za vzdrževalno zdravljenje ni ustrezno urejena. **Povzetek odmerjanje in načina uporabe** Odmerjanje Zdravilo CINQAERO se daje kot intravenska infuzija enkrat na štiri tedne. *Bolniki pod 35 kg ali nad 199 kg:*

Prilagojeni odmerki so 3 mg/kg telesne mase. Potrebno količino (v ml) iz vial(e) je treba izračunati kot je navedeno:  $0,3 \times \text{bolnikova telesna masa (v kg)}$ . *Bolniki med 35 kg in 199 kg:* Prilagojeni odmerki se dosežejo z uporabo režima odmerjanja na osnovi vial v preglednici 1 v SmPC. Prilagojeni odmerki temeljijo na bolnikovi telesni masi in ga je treba prilagoditi samo za znatne spremembe v telesni masi. *Trajanje zdravljenja* Zdravilo CINQAERO je namenjeno dolgotrajnemu zdravljenju. **Način uporabe** intravenska uporaba. Zdravilo CINQAERO je samo za intravensko infundiranje. Ne sme se uporabljati subkutano, peroralno ali intramuskularno. **Povzetek kontraindikacije** Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov. **Povzetek posebnih opozoril in previdnostnih ukrepov** Reslizumab se ne sme uporabljati za zdravljenje akutnih poslabšanj astme. Med zdravljenjem se lahko pojavijo simptomi, povezani z astmo, ali poslabšanja. Bolnikom je treba naročiti, naj takoj poiščejo zdravniško pomoč, če astma po uvedbi zdravljenja ostane neurejena ali se poslabša. **Preobčutljivostne in z dajanjem povezane reakcije** V povezavi z reslizumabom so poročali o akutnih sistemskih reakcijah, vključno z anafilaktičnimi reakcijami. Te neželeno učinke so opazili med infundiranjem

ali v 20 minutah po koncu infundiranja. Bolnike je treba spremljati med dajanjem reslizumaba in še ustrezen čas po tem. Če se pojavi anafilaktična reakcija, je treba dajanje reslizumaba takoj ustaviti in nuditi ustrezno zdravljenje; zdravljenje z reslizumabom je treba trajno prekiniti. **Infestacije s paraziti (helmiti)** Eozinofili so lahko vpleteni v imunski odziv na nekatere infestacije s helminti. Bolnike z obstoječimi infestacijami s helminti je treba zdraviti pred uvedbo zdravljenja z reslizumabom. Če se bolniki okužijo med zdravljenjem z reslizumabom in se ne odzovejo na zdravljenje z anthelmintiki, je treba razmisliti očasnem prenehanju zdravljenja. **Varnostna** To zdravilo vsebuje manj kot 1 mmol natrija (23 mg) na odmerek, kar v bistvu pomeni „brez natrija“. **Povzetek medsebojnega delovanja z drugimi zdravili in druge oblike interakcij** Formalnih kliničnih študij medsebojnega delovanja zdravil z reslizumabom niso izvedli. Podatki *in vitro* kažejo, da ni verjetno, da bi IL-5 in reslizumab vplivala na aktivnost CYP1A2, 3A4 ali 2B6. Na podlagi značilnosti reslizumaba se medsebojno delovanje z zdravili ne pričakuje. Rezultati analize populacijske farmakokinetike potrjujejo, da sočasna uporaba antagonistov levkotrienskih receptorjev ali sistemskih kortikosteroidov ne

vpliva na farmakokinetiko reslizumaba. Reslizumaba niso preučili pri bolnikih, ki sočasno jemljejo imunosupresivna zdravila, razen peroralnih kortikosteroidov (PKS), zato je profil varnosti in učinkovitosti reslizumaba pri teh bolnikih neznan. Reslizumaba niso preučili pri bolnikih, ki so prešli živa cepiva. **Povzetek neželenih učinkov** Najpogostejši neželeni učinek, o katerem so poročali med zdravljenjem, je bila zvečana vrednost kreatin-fosfokinaze v krvi, ki se je pojavila pri približno 2 % bolnikov. Anafilaktična reakcija se je pojavila pri manj kot 1 % bolnikov. O migralgiji so poročali pri 0,97 % bolnikov (10 od 1.028) v skupini s 3 mg/kg reslizumaba v študijah astme, nadzorovanih s placebom, v primerjavi z 0,55 % bolnikov (4 od 730) v skupini s placebom. **Imetnik dovoljenja za promet** Teva Pharmaceuticals Limited, Ridings Point, Whistler Drive Castleford, West Yorkshire, WF10 5HX, Velika Britanija. **Način in režim izdaje zdravila** ZZ - Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo pa se uporablja samo v javnih zdravstvenih zavodih ter pri pravnih in fizičnih osebah, ki opravljajo zdravstveno dejavnost. **Datum zadnje revizije zdravila** april 2017. Samo za strokovno javnost. Datum priprave: november 2017

Za podrobnejše informacije o zdravilu, prosimo, preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila, ki je objavljen na spletni strani Evropske agencije za zdravila ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) ali se obrnite na zastopnika imetnika dovoljenja za promet z zdravilom v Sloveniji, Pliva Ljubljana d.o.o., Pot k sejmišču 35, 1231 Ljubljana-Črnuče, tel: 01 58 90 399, e-mail: [info@tevasi.si](mailto:info@tevasi.si).

SN/CINQ/17/0003

TEVA

PLIVA

Respiratory