

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1



MINERALI, VITAMINI in druge izbrane snovi

K^+

Zn^{2+}

Fe^{2+}

Mg^{2+}

Ca^{2+}

Chemical structures of various vitamins and minerals are shown, including:

- $HO-CH_2-CH(OH)-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin C)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin E)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin B1)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin B2)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin B3)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin B6)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin B12)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin K)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin D)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin A)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin H)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin I)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin J)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin L)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin M)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin N)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin O)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin P)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin Q)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin R)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin S)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin T)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin U)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin V)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin W)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin X)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin Y)
- $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ (Vitamin Z)

Uredniki
Lucija Peterlin Mašič,
Aleš Obreza,
Tomaž Vovk



STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1 | marec 2024 | letnik 75

ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočever Glavač

UREDNIŠKI ODBOR:
Žiga Jakopin
Marjetka Korpar
Mitja Kos
Anja Pišlar
Andrea Šetina
Matjaž Tuš
Dunja Urbančič
Tomaž Vovk
Alenka Zvonar Pobirk

IZDAJATELJSKI SVET:
Matejka Cvirn Novak
Mirjana Gašperlin
Sara Kenda
Smiljana Milošev Tuševljak
Janez Mravljak
Helena Pavšar
Aljaž Sočan

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

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

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

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

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

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

Dragi bralci,

ob pogledu na napredek sodobnega časa, ki nas spremlja tako na naših profesionalnih kot osebnih poteh, se nama v misli pogosto prikradejo bistroumne besede enega največjih znanstvenikov, Alberta Einsteina:

»Tega sem se naučil v svojem dolgem življenju: v primerjavi z realnostjo sveta je vsa naša znanost primitivna in otročja – pa vendar ... znanost je najdragocenejša, kar imamo.«

Res je, za nas kot stroko so izsledki in izkušnje znanosti neprecenljivi, saj so gonilna sila napredka. Tako vam v prvi letošnji številki Farmacevtskega vestnika predstavljamo izbor raznolikih in aktualnih tematik, ki bodo na svojih področjih krojile prihodnost stroke in znanosti v prihodnosti. Na kratko ...

Kolegi s Katedre za socialno farmacijo UL FFA so raziskali prakso in nezadovoljene potrebe, vezane na sodelovanje pri zdravljenju z zdravili med zdravstvenimi delavci, ter etično presojanje študentov farmacije na primerih etičnih dilem iz lekarniške prakse. S področja farmacevtske tehnologije smo proučili uporabo koprocisiranih pomožnih snovi pri izdelavi orodisperzibilnih tablet ter razvoj dostavnih sistemov na osnovi liposomov z vgrajeno kakovostjo. Te teme že imajo neposredno uporabno vrednost v praksi, kar je seveda končni cilj vseh bazičnih raziskav. Da bodo slednje pomembno vplivale na prihodnost zdravljenja rakavih, nevrodegenerativnih in vnetnih bolezni pa dokazujejo članki, ki zaokrožujejo vsebino te številke: članek o vplivu živčnega rastnega dejavnika na vnetje, celjenje in obnovo tkiv, članek o pomenu nevrotrofičnih dejavnikov pri nevrodegenerativnih boleznih ter članek o cepivih za preprečevanje razvoja in zdravljenje rakavih bolezni.

Naj v sklepnih mislih še enkrat spomniva na zgornje Einsteinove besede. Znanost je zagotovo dragocena, tako dragocena, da se nam pogosto zdi tudi popolna. Toda znanost je popolna le do mere, kot smo jo sposobni razumeti v danem trenutku. Razumevanje in znanje pa gresta z roko v roki s časom, ki ga namenjamo študiju novosti.

Zato vas spodbujava, da še naprej sledite napredku, in vam zagotavljava, da ste z branjem Farmacevtskega vestnika na odlični poti.

Izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač, glavna urednica

Prof. dr. Borut Štrukelj, odgovorni urednik



VSEBINA / CONTENT

IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI / ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 3** Ana Kodrič
Obravnava sodelovanja pacientov pri zdravljenju z zdravili s strani zdravnikov in farmacevtov v Sloveniji
Medication adherence management in physicians' and pharmacist's practices in Slovenia
- 13** Maša Ošlak, Blaž Stres, Nejc Horvat
Etično presojanje študentov farmacije na primerih etičnih dilem iz lekarniške prakse
Ethical judgement of pharmacy students through analysis of ethical dilemmas in pharmacy practice

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI / REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 21** Ilonka Ferjan
Vpliv živčnega rastnega dejavnika na vnetje ter celjenje in obnovo tkiv
Influence of nerve growth factor on inflammation, healing process and regeneration of tissues
- 26** Milica Perišić Nanut
Cepiva za preprečevanje razvoja in zdravljenje rakavih bolezni: razvojne platforme in trenutni napredek
Prophylactic and therapeutic cancer vaccines: Development platforms and current progress
- 34** Ana Baumgartner
Uporaba koprocesiranih pomožnih snovi pri izdelavi orodisperzibilnih tablet
Use of coprocessed excipients in orodispersible tablets
- 43** Nejc Klemenc, Barbara Sterle Zorec, Alenka Zvonar Pobirk
Razvoj dostavnih sistemov na osnovi liposomov z vgrajeno kakovostjo
Development of liposomal delivery systems by quality by design approach
- 55** Selena Horvat, Anja Pišlar
Pomen nevrotrofičnih dejavnikov pri neurodegenerativnih boleznih
The importance of neurotrophic factors in neurodegenerative disorders

65 NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

69 DRUŠTVENE VESTI

OBRAVNAVA SODELOVANJA PACIENTOV PRI ZDRAVLJENJU Z ZDRAVILI S STRANI ZDRAVNIKOV IN FARMACEVTOV V SLOVENIJI

MEDICATION ADHERENCE MANAGEMENT IN PHYSICIANS' AND PHARMACIST'S PRACTICES IN SLOVENIA

AVTORICA / AUTHOR:

asist. dr. Ana Kodrič, mag farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ana.kodric@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Zagotavljanje ustreznega sodelovanja pacientov pri zdravljenju z zdravili je v veliki meri odvisno od aktivnosti zdravstvenih delavcev. V članku predstavljamo slovenske rezultate mednarodne presečne raziskave, katere namen je bil raziskati trenutno prakso in nezadovoljene potrebe, vezane na sodelovanje pri zdravljenju z zdravili, med zdravstvenimi delavci. Raziskava je potekala v obliki spletne ankete, naslovljene na lekarniške in klinične farmacevte ter zdravnike družinske medicine. Med 178 anketiranci je bilo 21 % zdravnikov in 79 % farmacevtov. Zdravniki v praksi redno spremljajo sodelovanje pri zdravljenju kroničnih bolezni z zdravili, medtem ko to redno počne dobra četrtina farmacevtov. Glavni razlogi za to so pomanjkanje časa ter metod za vrednotenje sodelovanja pri zdravljenju z zdravili in pa mnenje, da to ni del običajne prakse. Nesodelovanje pacientov pri zdravljenju tako zdravniki kot farmacevti najpogosteje naslavljajo s svetovanjem in motiviranjem, kot ključen izziv pa navajajo slabo ozaveščenost med pacienti glede pomena sodelovanja. Pri tem se zavedajo pomembnosti ustreznega pristopa k pacientu in potrebe po izobraževanju na področju sodelovanja pri zdravljenju z zdravili.

KLJUČNE BESEDE:

farmacevti, sodelovanje pri zdravljenju z zdravili, spletna anketa, zdravniki

ABSTRACT

Ensuring medication adherence depends largely on healthcare professionals' roles. This article presents the Slovenian findings from an international cross-sectional survey examining current practices and unmet needs in medication adherence among healthcare practitioners. We administered an online survey to community pharmacists, clinical pharmacists and family physicians. Of 178 respondents, 21% were physicians and 79% were pharmacists. Physicians routinely monitor medication adherence in their practice, while only a quarter of pharmacists do so regularly. This is mainly due to time constraints, a lack of adherence assessment methods and the perception that it falls outside routine practice. Nonadherence is primarily addressed through



counselling and motivation by both physicians and pharmacists, with a central challenge being patient awareness of medication adherence's importance. Healthcare practitioners acknowledge the critical need for a patient-centric approach and increased education on medication adherence.

KEY WORDS:

medication adherence, online survey, pharmacists, physicians

1 UVOD

Sodelovanje pri zdravljenju kroničnih bolezni z zdravili je v razvitih državah v povprečju 50-odstotno, v manj razvitih državah pa še nižje. Mnogo pacientov ima torej težave pri izvajanju terapije v skladu z dogovorjenimi priporočili zdravstvenih delavcev (1). Pomanjkanje sodelovanja pacientov pri zdravljenju z zdravili bistveno zmanjšuje učinkovitost in varnost zdravstvene obravnave pacientov, s čimer ključno vpliva na zdravje prebivalstva, ne le z vidika pacientov oz. kakovosti njihovega življenja, temveč tudi zdravstvenega sistema oz. stroškov za zdravstvo.

Intervencije, namenjene izboljšanju sodelovanja pri zdravljenju z zdravili, prinašajo korist tako z vidika delovanja na dejavnike tveganja za slabo sodelovanje pri zdravljenju kot tudi preprečevanja neugodnih zdravstvenih izidov. Slabemu sodelovanju pri zdravljenju lahko botrujejo mnogi razlogi, vezani na pacienta, zdravljenje, zdravstveno stanje, družbeno-ekonomske dejavnike ali zdravstveni sistem (1). Poznavanje le-teh lahko ključno vpliva na uspešnost intervencij, katerih namen je optimizacija sodelovanja pri zdravljenju.

V raziskavah so preizkušali več intervencijskih strategij z različno učinkovitostjo v smislu izboljšanja sodelovanja pri zdravljenju z zdravili. Čeprav so bili rezultati pogosto nekonsistentni, raziskave kažejo, da najbolje delujejo intervencije, ki združujejo tehnološke in vedenjske strategije. Te vključujejo intervencije za poenostavitev režima odmerjanja zdravil ali opominjanja pacientov, svetovanje škatlic za zdravila ali pripravo pretisnih omotov z dnevnimi odmerki zdravil v lekarni, izobraževanje ter motiviranje in spremljanje pacientov (2). Uspešnost reševanja problematike nezadostnega sodelovanja pri zdravljenju povečuje tudi individualna, pacientu prilagojena obravnava, zlasti če le-ta

upoštevata, ali gre za namerno ali nenamerno vrsto nesodelovanja oz. vzroke zanj (3).

Učinkovitost intervencij za optimizacijo sodelovanja pri zdravljenju z zdravili pa je treba proučiti v širšem kontekstu, ki vključuje tudi vlogo zdravstvenih delavcev. V klinični praksi izvajalci zdravstvenega varstva pogosto ne vedo, kako spremljati sodelovanje pri zdravljenju z zdravili in ukrepati ob slabem sodelovanju pri posameznih pacientih. Izboljšanje sposobnosti zdravstvenih delavcev za ustrezno oceno tveganja za nesodelovanje pri zdravljenju z zdravili ter izvajanje intervencij za zmanjšanje le-tega lahko vodi v bolj učinkovito podporo pacientom pri jemanju predpisanih zdravil. Da bi bolje razumeli in v prihodnosti učinkoviteje reševali te izzive, je pomembno raziskati poglede in vsakodnevno prakso zdravstvenih delavcev v zvezi z nesodelovanjem pri zdravljenju z zdravili. Podatki o tem, v kolikšni meri se zdravstveni delavci posvečajo obravnavi sodelovanja pri zdravljenju in kakšne aktivnosti z namenom podpore sodelovanju pri zdravljenju izvajajo, bi pomembno prispevali k oblikovanju bodočih zdravstvenih storitev, izobraževanja zdravstvenih delavcev, zdravstvene politike in raziskav (4).

V okviru programa COST (*The European Cooperation in Science and Technology*), podprtega s strani EU Obzorje 2020, so oblikovali projekt *European Network to Advance Best Practices & TechnoLogY on medication adherence* (ENABLE), katerega cilj je razširjanje multidisciplinarnega znanja o sodelovanju pri zdravljenju z zdravili ter ozaveščanju o tehnoloških rešitvah za izboljšanje sodelovanja pri zdravljenju (5).

Namen te raziskave je pridobiti vpogled v trenutno prakso z vidika aktivnosti slovenskih zdravnikov in farmacevtov, vezanih na sodelovanje pri zdravljenju z zdravili in na identifikacijo spodbujevalcev in ovir na ravni pacientov, zdravstvenih delavcev in sistema pri sodelovanju pri zdravljenju z zdravili.

2 METODE

Raziskava je bila zasnovana kot presečna študija, namenjena zdravstvenim delavcem na različnih ravneh zdravstvene dejavnosti. V raziskavi smo se osredotočali na to, kako zdravstveni delavci obravnavajo sodelovanje pri zdravljenju z zdravili pri pacientih s kronično terapijo v svoji vsakodnevni praksi. Anketa je vsebovala 13 vprašanj zaprtega

tipa, vezanih na pet tematskih sklopov: demografski podatki, spremljanje sodelovanja pri zdravljenju, dokumentiranje pacientovega (ne)sodelovanja, izvajanje aktivnosti za izboljšanje sodelovanja in nezadovoljene potrebe, vezane na sodelovanje pacientov pri zdravljenju.

Možni odgovori na vprašanja so bili oblikovani na podlagi rezultatov predhodne ankete s ključnimi mnenjskimi voditelji iz 35 držav (1 do 8 na državo, skupno 140 oseb), ki je vsebovala odprta vprašanja o strategijah obravnavanja sodelovanja pri zdravljenju in razpoložljivih intervencijah za izboljšanje le-tega. Pilotna raziskava je bila izvedena med najmanj petimi zdravstvenimi delavci iz osmih držav (Bolgarija, Hrvaška, Finska, Italija, Srbija, Španija, Švedska, Turčija). Anketa je bila zasnovana v spletni platformi Webropol v angleškem jeziku in prevedena v slovenščino.

V Sloveniji je anketa potekala v novembru 2022. Uporabili smo namensko vzorčenje; vabilo v spletno anketo smo poslali na elektronske poštne sezname lekarniških in kliničnih farmacevtov ter zdravnikov družinske medicine.

V analizo podatkov smo vključili vse anketirance, z izjemo dveh, katerih poklic je bil fizioterapevt/ka oz. nejasen (označen z »drugo«). Podatke smo analizirali z metodami opisne statistike, primerjavo med skupinama zdravnikov in farmacevtov smo opravili s testom Hi kvadrat oz. Fisherjevim natančnim testom (stopnja tveganja 5 %). Za analize smo uporabili program IBM SPSS Statistics V28.

3 REZULTATI

Med 178 sodelujočimi je bilo 37 (21 %) zdravnikov in 141 (79 %) farmacevtov. Večina sodelujočih zdravnikov (97 %) deluje v primarnem zdravstvu, vključno z medicino dela, večina sodelujočih farmacevtov pa v zunanjih lekarnah (87 %). Značilnosti anketirancev so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Značilnosti anketirancev.

Table 1: Respondents' characteristics.

Značilnosti anketirancev	Zdravniki (N = 37)	Farmacevti (N = 141)
Delovno mesto* (%)		
Primarno zdravstvo (brez zunanjih lekarn)	97,3	0,7
Bolnišnica	0	10,6
Zunanja lekarna	0	87,2
Dom starejših občanov	2,7	0
Drugo	0	1,4
Delovne izkušnje (%)		
Manj kot 5 let	2,7	14,9
5–9 let	24,3	17,7
10–20 let	35,1	39,0
Več kot 20 let	37,8	28,4
Območje (%)		
Mestno	48,6	63,1
Podruželsko	35,1	13,5
Oboje	16,2	23,4
Vrsta izvajalca zdravstvene dejavnosti (%)		
Javni	86,5	85,8
Zasebni	13,5	14,2

*Delovno mesto se nanaša na delovno mesto, kjer ima anketiranec stik s pacienti. V primeru, da ima anketiranec več delovnih mest, se nanaša na tisto, kjer se anketiranec najpogosteje srečuje s težavami, povezanimi s sodelovanjem pri zdravljenju.



3.1 SPREMLJANJE SODELOVANJA PRI ZDRAVLJENJU Z ZDRAVILI

Sodelovanje pri zdravljenju z zdravili pri pacientih s kronično terapijo spremlja statistično značilno več zdravnikov kot farmacevtov ($p < 0,001$). Vsi zdravniki so odgovorili, da spremljajo sodelovanje pri zdravljenju, 89 % jih to počne pri vseh ali večini pacientov, 11 % pa pri nekaterih pacientih. Med farmacevti pri vseh ali večini pacientov pozornost sodelovanju pri zdravljenju posveča le dobra četrtina (28 %) farmacevtov, 60 % pa jih sodelovanje pri zdravljenju preveri pri nekaterih pacientih. Najpogosteje tako zdravniki kot farmacevti pacientovo sodelovanje pri zdravljenju ocenijo na podlagi podatkov o zgodovini izdaj, preverijo predpisane recepte ali pa vprašajo pacienta oz. njegovega svojca (slika 1).

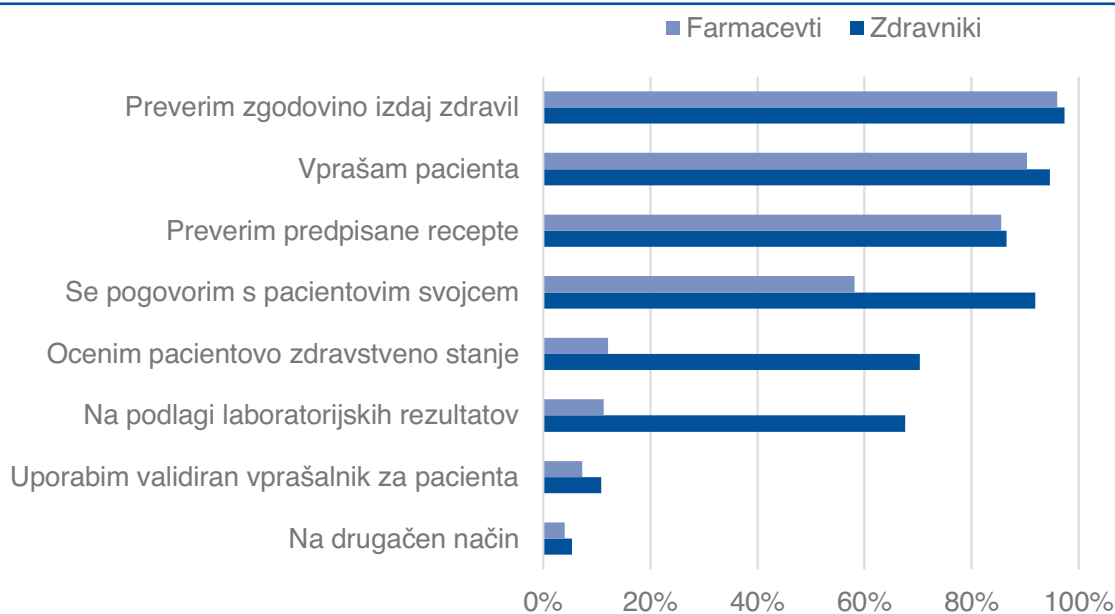
Za razliko od zdravnikov 12 % farmacevtov sodelovanja pri zdravljenju pri pacientih ne spremlja. Polovica farmacevtov kot razlog za to navaja pomanjkanje časa (53 %) ali metod za oceno sodelovanja pri zdravljenju (47 %) in pa, da tega ne počnejo, ker to ni običajna praksa (47 %). Ostali razlogi so prikazani na sliki 2 (odgovarjali so le anketiranci, ki so izjavili, da sodelovanja pri zdravljenju ne spremljajo). V primeru, da pacient ne dosega ciljev zdravljenja, nekoliko več farmacevtov preveri njegovo sodelovanje pri zdravljenju, in sicer 42 % v vseh ali večini primerov ter 54 % v nekaterih primerih. Peščica farmacevtov (4 %) tudi v takih primerih

pacientovega sodelovanja pri zdravljenju ne preveri, polovica teh meni, da to ni njihova naloga.

Vsi sodelujoči zdravniki so poročali, da pri pacientu odkrito slabo sodelovanje tudi dokumentirajo, najpogosteje v pacientovi zdravstveni dokumentaciji (97 %) ali obvestijo svojce (51 %). Za razliko od zdravnikov farmacevti v manj kot polovici primerov (44 %) dokumentirajo pacientovo nesodelovanje, 5 % pa jih je izjavilo, da nesodelovanja pri zdravljenju pri pacientu še niso odkrili. Najpogosteje ob odkritem neustreznem sodelovanju pri zdravljenju pacienta obvestijo njegovega osebnega zdravnika (62 %), nekateri pa informacijo vnesejo v pacientovo zdravstveno dokumentacijo (29 %) ali obvestijo pacientovega svojca (31 %). Kot najpogostejša razloga za odsotnost poročanja oz. dokumentiranja, navajajo to, da ne vedo, kako bi to lahko storili, ali pa nimajo te možnosti. Drugi razlogi za odsotnost dokumentiranja oz. poročanja nesodelovanja pri zdravljenju so prikazani na sliki 3 (odgovarjali so le anketiranci, ki so izjavili, da nesodelovanja pri zdravljenju ne dokumentirajo oz. poročajo).

3.2 INTERVENCIJE ZA IZBOLJŠANJE SODELOVANJA PRI ZDRAVLJENJU

V primeru odkritega nesodelovanja pri zdravljenju so tako zdravniki kot farmacevti proaktivni pri reševanju težave. Približno tri četrtine (73 % zdravnikov in 72 % farmacevtov)



Slika 1: Načini spremljanja sodelovanja pri zdravljenju pri pacientih med zdravniki ($N = 37$) in farmacevti ($N = 124$).

Figure 1: Ways of monitoring patients' medication adherence among doctors ($N=37$) and pharmacists ($N=124$).



Slika 2: Razlogi za odsotnost spremljanja sodelovanja pri zdravljenju med farmacevti (N = 17).

Figure 2: Reasons for the lack of medication adherence monitoring among pharmacists (n=17).

jih s ciljem izboljšanja sodelovanja pri zdravljenju ukrepa v vseh ali večini primerov, četrtnina (27 % zdravnikov in 25 % farmacevtov) pa v določenih primerih.

Najpogosteje tako zdravniki kot farmacevti skušajo pacientom s slabim sodelovanjem pri zdravljenju svetovati oz. jih

motivirati za rednejše jemanje zdravil, npr. s pogovorom o pomenu jemanja zdravil (97 % zdravnikov in 99 % farmacevtov). Za pregled zdravil, tj. strukturiran pregled pacientovih zdravil z namenom ovrednotenja terapije (npr. odkrivanja težav, povezanih z zdravili), se odloči 78 %



Slika 3. Razlogi za odsotnost dokumentiranja oz. poročanja nesodelovanja pri zdravljenju med farmacevti (N = 90).

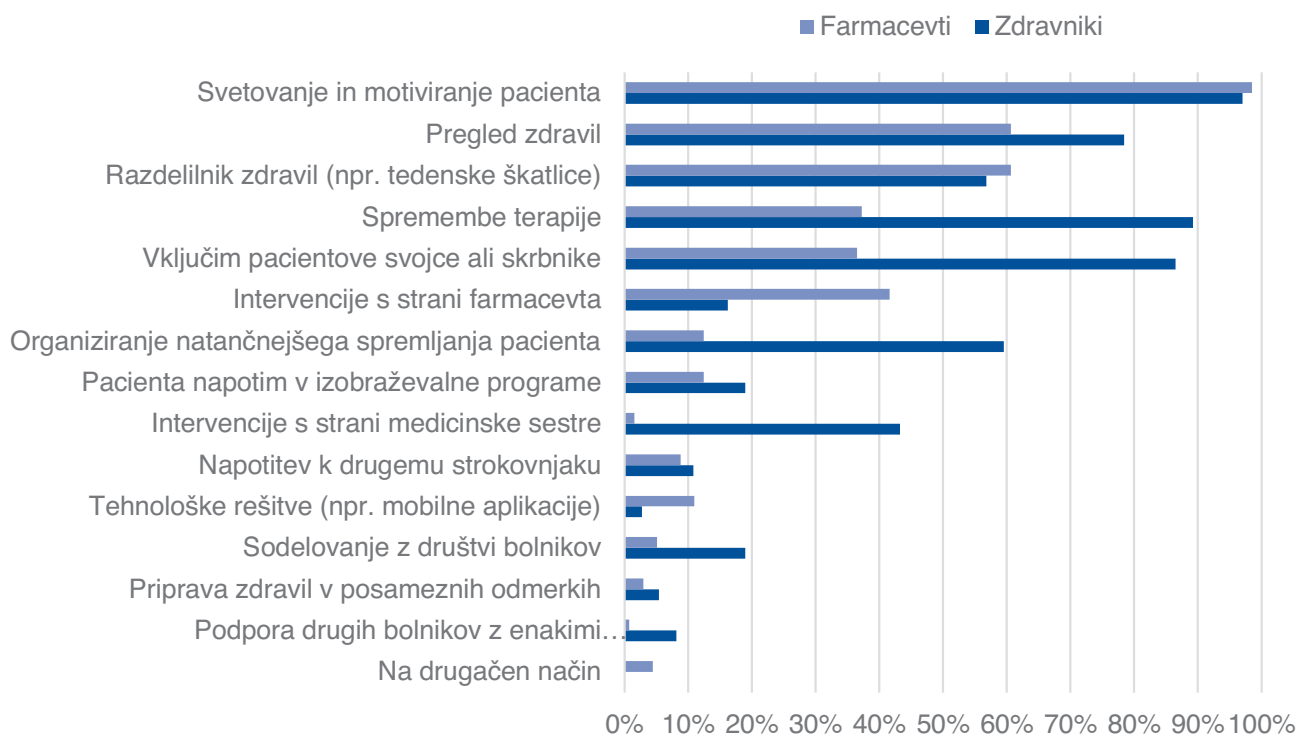
Figure 3. Reasons for the absence of documentation or reporting of medication nonadherence among pharmacists (n=90).



zdravnikov in 61 % farmacevtov, pogosto pa pacientom svetujejo tudi uporabo razdelilnikov za zdravila, npr. tedenskih škatlic (57 % zdravnikov in 61 % farmacevtov). Statistično značilno več zdravnikov (89 %) ukrepa v obliki sprememb terapije, kot je poenostavitev režima odmerjanja ali izbira druge farmacevtske oblike zdravila, v primerjavi s farmacevti (37 %; $p < 0,001$). Zdravniki značilno pogosteje kot farmacevti v reševanje slabega sodelovanja pri zdravljenju vključujejo pacientove svojce ali skrbnike (87 % proti 37 %; $p < 0,001$) in organizirajo natančnejše spremljanje pacienta (60 % proti 12 %; $p < 0,001$). Zdravniki za razliko od farmacevtov slabo reševanje večkrat rešujejo tudi s pomočjo medicinskih sester (43 % proti 2 %; $p < 0,001$), medtem ko se na farmacevte obrnejo le redko (16 %). Po drugi strani skoraj polovica farmacevtov izvaja samostojne intervencije z namenom izboljšanja sodelovanja pri zdravljenju (43 %; $p < 0,001$). Značilno več zdravnikov kot farmacevtov pacientom svetuje aktivnosti v društvih bolnikov ($p = 0,012$) ali podporo drugih pacientov z enakimi težavami ali zdravili ($p = 0,031$). Ostale načine ukrepanja za izboljšanje sodelovanja pri zdravljenju prikazuje slika 4.

3.3 NEZADOVOLJENE POTREBE, VEZANE NA SODELOVANJE PRI ZDRAVLJENJU, MED ZDRAVNIKI IN FARMACEVTI

Tako zdravniki kot tudi farmacevti so kot glavna izziva izpostavili pomanjkanje časa (76 % zdravnikov in 72 % farmacevtov) in slabo ozaveščenost pacientov glede pomena sodelovanja pri zdravljenju (73 % zdravnikov in 51 % farmacevtov). Farmacevti so v večji meri poročali tudi o pomanjkanju komunikacije in sodelovanja med zdravstvenimi delavci (62 %), tretjina med njimi pa ima težave tudi z dostopnostjo zdravnika ob ugotovljenem pacientovem nesodelovanju. Farmacevti (50 %) so v primerjavi z zdravniki (27 %) v večji meri izpostavili težavo pomanjkanja podatkov o pacientovem sodelovanju pri zdravljenju, ob tem pa je polovica zdravnikov in farmacevtov izrazila potrebo po boljših tehnoloških rešitvah v smislu dostopa do zdravstvene dokumentacije pacientov in povezav med različnimi informacijskimi sistemi. Farmacevti si, za razliko od zdravnikov, želijo več podpore sistema, saj v večji meri pogrešajo smer-



Slika 4: Načini ukrepanja za izboljšanje sodelovanja pri zdravljenju s strani zdravnikov ($N = 37$) in farmacevtov ($N = 137$).

Figure 4: Strategies for improving medication adherence in patients, used among physicians ($N=37$) and pharmacists ($N=137$).

nice in nacionalne standarde na temo sodelovanja pri zdravljenju. Izzivi oz. nezadovoljene potrebe, vezane na sodelovanje pri zdravljenju, so prikazane na sliki 5.

3.4 ŽELJA PO USPOSABLJANJU NA TEMO SODELOVANJA PRI ZDRAVLJENJU MED ZDRAVNIKI IN FARMACEVTI

Statistično značilno več farmacevtov kot zdravnikov je v anketi izrazilo željo po izobraževanju na temo sodelovanja pri zdravljenju (82 % proti 51 %; $p < 0,001$). Tako zdravniki (65 %) kot farmacevti (46 %) si v največji meri želijo usposabljanja glede tega, kako spodbuditi paciente, da prevzamejo aktivno vlogo pri sodelovanju pri zdravljenju. Večina zdravnikov namreč verjame, da leži odgovornost za ustrezno sodelovanje pri zdravljenju na pacientih (6). Obe skupini zdravstvenih delavcev sta izrazili tudi željo po usposabljanju glede pristopa k pacientu v smislu tega, kako spremljati in ocenjevati sodelovanje pri zdravljenju (22 % zdravnikov in 40 % farmacevtov) in kako se o tej temi pogovarjati s pacienti (30 % zdravnikov in 31 % farmacevtov). Glavna razlika v prepoznanih potrebah glede usposabljanja je bila v temi sodelovanja med zdravstvenimi delavci, ki jo je izpostavila tretjina farmacevtov (34 %), a le en zdravnik (3 %).

4 RAZPRAVA

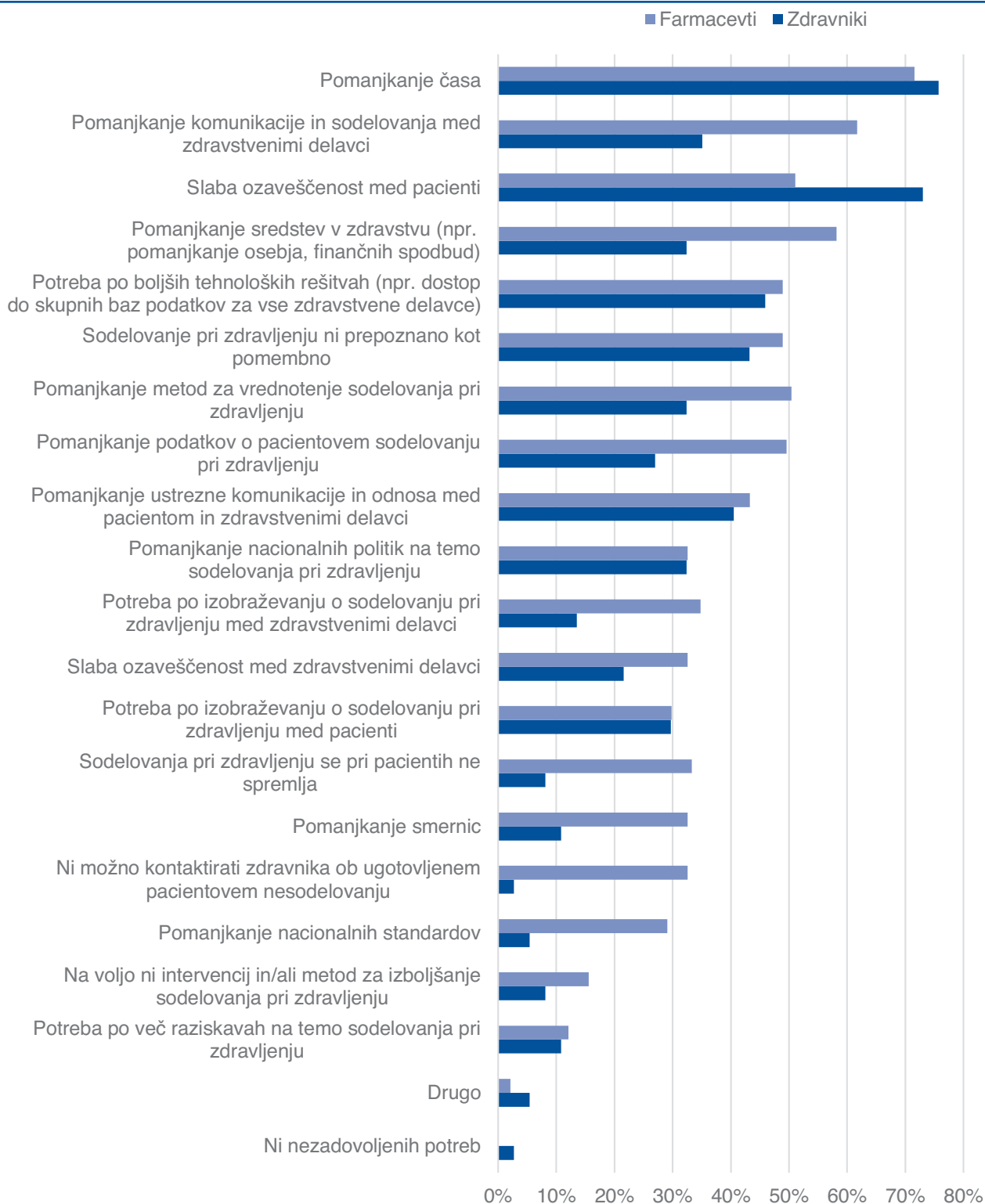
Večjo pozornost sodelovanju pri zdravljenju v praksi posvečajo zdravniki, saj večina med njimi sodelovanje spremlja pri vseh ali večini pacientov, medtem ko to redno počne le dobra četrtina farmacevtov. Enak vzorec kažejo rezultati mednarodne raziskave, v kateri so sodelovali zdravniki, farmacevti in medicinske sestre iz Avstrije, Belgije, Anglije, Francije, Nemčije, Madžarske, Nizozemske, Poljske, Portugalske in Švice. Za farmacevte v tuji raziskavi je bilo v primerjavi z zdravniki skoraj petkrat manj verjetno (OR = 4,6), da pogosto ali vedno vprašajo paciente, ali so izpustili kakšen odmerek svojega zdravila (4). Tudi raziskava iz Belgije in Nizozemske je pokazala, da imajo farmacevti v obeh državah omejeno vlogo pri podpori sodelovanja pri zdravljenju v primerjavi z drugimi zdravstvenimi delavci (7). Farmacevti so zdravstveni delavci s posebno usposobljenostjo na področju zdravil, vendar v praksi ne prevzemajo

ključne vloge v smislu podpore pacientov pri uporabi zdravil. Pri tem jih lahko omejuje fizično okolje lekarne, ki ne zagotavlja ustrezne mere zasebnosti, ter, kot je poročala polovica anketirancev, pomanjkanje časa. Slednje so, kljub temu da sodelovanje pri zdravljenju pri pacientih redno spremljajo, kot glavno nezadovoljeno potrebo navedli tudi zdravniki. Po drugi strani je polovica farmacevtov kot razlog za to, da sodelovanja pri zdravljenju pri pacientih ne spremljajo, navedla mnenje, da to ni del običajne prakse. Iz tega sledi, da bi vsaj nekateri farmacevti sodelovanje lahko spremljali, a tega ne dojemajo kot del osnovne obravnave pacienta in zato ne izvajajo. Glede na to, da so farmacevti tisti zdravstveni delavci, ki paciente s kronično terapijo za razliko od zdravnika srečujejo v rednih časovnih intervalih, bi bile njihove aktivnosti na temo sodelovanja pri zdravljenju izjemno dobrodošle. Hkrati je spremljanje sodelovanja pri zdravljenju izredno pomembno, saj zdravstveni delavci sodelovanje praviloma precenijo, če le-tega dejansko pri pacientu ne preverijo (6, 8).

Tako zdravniki kot farmacevti si pri vrednotenju sodelovanja najpogosteje pomagajo s pregledom zgodovine izdanih zdravil oz. skušajo informacijo pridobiti v pogovoru s pacientom. V primerjavi z zdravniki se farmacevti manj pogosto odločijo za pogovor s svojci pacientov. Zdravniki pogosto pacientovo sodelovanje pri zdravljenju vrednotijo na podlagi ocene zdravstvenega stanja ali laboratorijskih izvidov, kar pa ne velja za farmacevte, ki imajo omejen dostop do pacientove zdravstvene dokumentacije. Morda je prav pristop zdravnikov k obravnavi pacientov, ki zajema oceno zdravstvenega stanja in laboratorijskih rezultatov, ključen dejavnik za dosledno vrednotenje sodelovanja pri zdravljenju z zdravili, tudi kot enega od možnih vzrokov v situacijah, ko bolezen pacienta ni ustrezno obvladana. Drugih načinov vrednotenja sodelovanja pri zdravljenju, kot je uporaba validiranih vprašalnikov, se poslužujejo redki, čeprav lahko nekateri ponudijo enostaven, standardiziran način za prepoznavanje in vpogled v vrsto nesodelovanja pri zdravljenju (9).

Tako zdravnikom kot tudi farmacevtom vrednotenje sodelovanja pri zdravljenju predstavlja izziv, pomanjkanje metod za njegovo vrednotenje pa je kot nezadovoljeno potrebo izpostavila tretjina zdravnikov in polovica farmacevtov. Medtem ko prepoznano pacientovo nesodelovanje pri zdravljenju zdravniki konsistentno dokumentirajo oz. o tem poročajo, to počne le tretjina farmacevtov. Ti se soočajo predvsem s težavo, kje oz. na kakšen način to narediti, saj pogosto nimajo možnosti te informacije kjer koli zabeležiti, tretjina pa ima težave tudi s kontaktiranjem pacientovega osebnega zdravnika ob ugotovljenem nesodelovanju. V





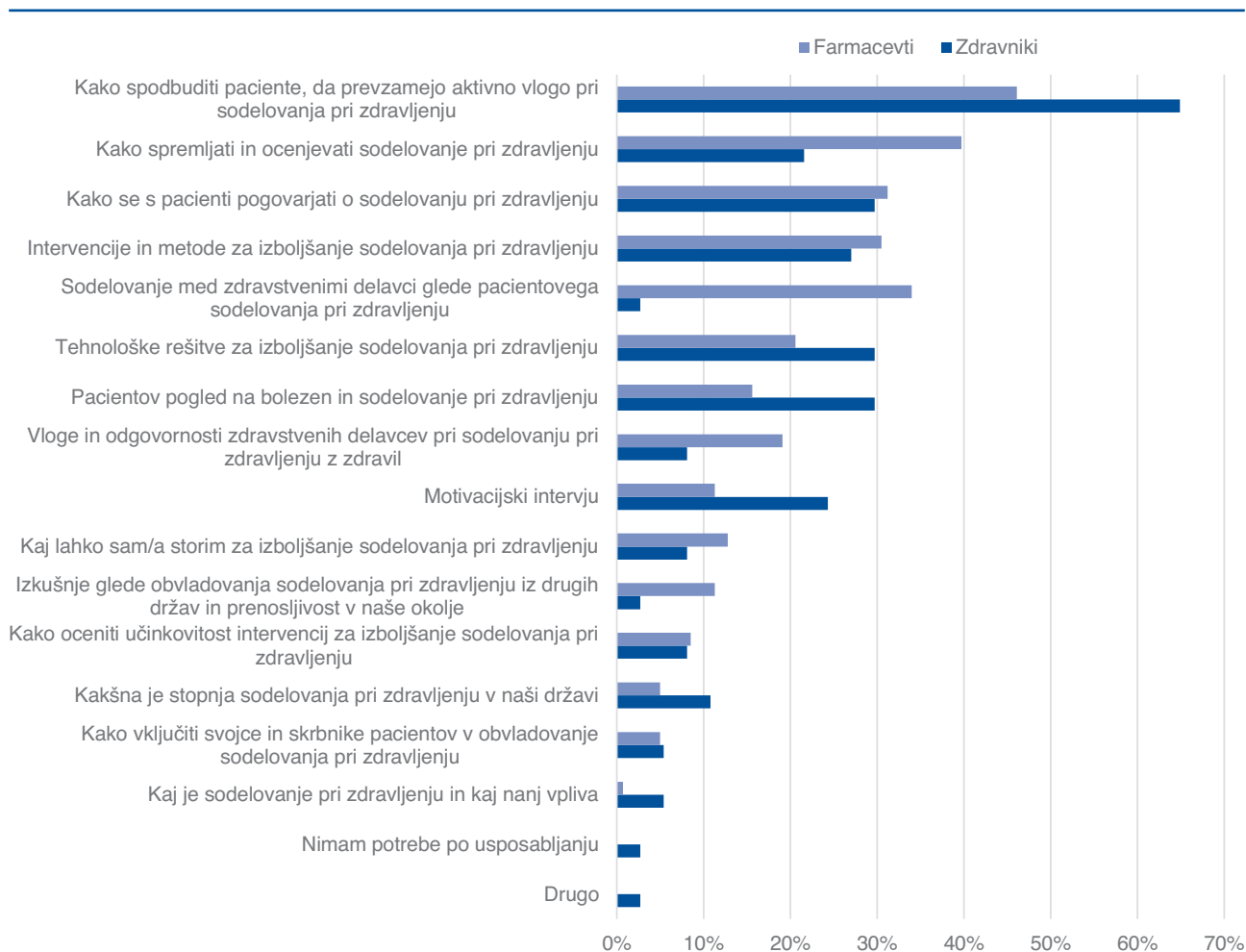
Slika 5: Nezadovoljene potrebe, vezane na sodelovanje pri zdravljenju z zdravili, med zdravniki in farmacevti (N = 178).

Figure 5: Unmet needs among physicians and pharmacists regarding medication adherence (N=178).

tem pogledu bi jih torej podprla sistemska ureditev možnosti dokumentiranja in pa oblikovanje smernic na to temo, saj jih je polovica za odsotnost poročanja nesodelovanja pacientov pri zdravljenju z zdravili navedla razlog, da ni na voljo smernic o dokumentiranju. Raziskava Clynove in sod. je sicer pokazala, da smernice za upravljanje sodelovanja pri zdravljenju, če so dostopne, ne prinašajo pomembnega izboljšanja spremljanja sodelovanja pri zdravljenju (10). Poleg farmacevtov tudi zdravniki vidijo potrebo po boljših tehnoloških rešitvah, kot je dostop do podatkov o pacientih za vse zdravstvene delavce.

Večina anketirancev ob prepoznanem nesodelovanju ukrepa s svetovanjem in motiviranjem pacientov. Razlog je morda v tem, da tri četrtine zdravnikov in polovica farmacevtov kot glavni izziv pri nesodelovanju prepozna slabo

ozaveščenost med pacienti. Zdravniki zelo pogosto z namenom reševanja nesodelovanja pri zdravljenju uvedejo spremembo terapije, npr. poenostavitev režima odmerjanja ali spremembo farmacevtske oblike, kar redkeje storijo farmacevti, verjetno predvsem zaradi svojih omejenih pristojnosti. Zdravniki v primerjavi s farmacevti v reševanje pacientovega nesodelovanja pri zdravljenju pogosteje vključujejo tudi druge, bodisi zdravstvene delavce (medicinske sestre ali redkeje farmacevte) ali pa društva bolnikov in pacientove svojce. Skoraj dvakrat več farmacevtov kot zdravnikov je prepoznalo izziv v pomanjkanju komunikacije in sodelovanja med zdravstvenimi delavci, desetkrat več pa jih je ta izziv opredelilo kot eno izmed glavnih potrebnih tem za usposabljanje. Tako zdravniki kot tudi farmacevti zelo redko uporabljajo tehnološke rešitve, kot so mobilne apli-



Slika 6: Prepoznane glavne potrebne teme za usposabljanje med zdravniki in farmacevti (N = 178).

Figure 6: Identified major training needs among physicians and pharmacists (N=178).



kacije ali SMS-sporočila, čeprav raziskave kažejo na njihovo učinkovitost (11). Podobno kaže mednarodna raziskava, v kateri so zdravstveni delavci nesodelovanje najpogosteje naslavljali s pogovorom s pacienti, redko pa so se odločali za uporabo intervencij, ki vključujejo tehnološke pristope (10). Tako iz rezultatov iz drugih držav kot slovenske raziskave ni moč razbrati, ali zdravstveni delavci tovrstnih intervencij nimajo možnosti izvajati ali jim zgolj niso naklonjeni. Farmacevti v večji meri prepoznajo potrebo po usposabljanju na področju sodelovanja pri zdravljenju. Na podlagi rezultatov mednarodnih raziskav se zdi, da bi usposabljanje farmacevtov o sodelovanju pri zdravljenju lahko privedlo do sprememb v njihovi praksi obravnave pacientov, saj kaže, da zdravstveni delavci, ki so prejeli takšno izobraževanje, pogosteje preverjajo sodelovanje pri pacientih in izvajajo ukrepe za izboljšanje sodelovanja pri zdravljenju z zdravili (6, 10).

Tako farmacevti kot zdravniki si v sklopu usposabljanj najbolj želijo nadgraditi sposobnost spodbujanja pacientov, da bi le-ti prevzeli aktivnejšo vlogo v procesu zdravljenja. Zdravniki, v primerjavi s farmacevti, v večji meri prepoznajo potrebo po okrepitvi komunikacijskih veščin za učinkovit dialog s pacientom o sodelovanju pri zdravljenju. To predstavlja pomemben vidik obravnave pacientov, saj raziskave kažejo, da so dobre komunikacijske spretnosti pri izvajanju zdravstvene oskrbe tesno povezane z izboljšanim sodelovanjem pacientov.

Poleg tega usposabljanje zdravnikov za izboljšanje komunikacije izkazuje pozitiven vpliv na stopnjo sodelovanja njihovih pacientov pri zdravljenju z zdravili (12). Zdravniki si želijo tudi dodatnih veščin za učinkovitejše raziskovanje pacientovega pogleda na bolezen in sodelovanje pri zdravljenju ter motiviranje (motivacijski intervju). Farmacevti po drugi strani bi v sklopu usposabljanj bolj kot dodatne komunikološke spretnosti želeli pridobiti več znanja o tem, kako spremljati in ocenjevati sodelovanje pri zdravljenju.

5 SKLEP

V praksi obstaja še mnogo priložnosti za nadgradnjo obravnave pacientov z vidika sodelovanja pri zdravljenju z zdravili, tako pri zdravnikih, še zlasti pa pri farmacevtih. Slednji pogrešajo predvsem večjo podporo sistema ter več komunikacije in sodelovanja med zdravstvenimi delavci. Pacientovo nesodelovanje pri zdravljenju tako zdravniki kot farmacevti najpogosteje naslavljajo s svetovanjem in moti-

viranjem, kot ključen izziv pa navajajo slabo ozaveščenost med pacienti glede sodelovanja pri zdravljenju. V tem kontekstu zdravstveni delavci prepoznajo pomembnost ustreznega pristopa k pacientu in potrebo po izobraževanju, še posebej za krepitev komunikacijskih veščin, ki bi omogočile učinkovit dialog s pacienti. S tem bi lahko pacientom pomagali, da prevzamejo aktivnejšo vlogo v procesu zdravljenja, kar bi pripomoglo k izboljšanju sodelovanja pri zdravljenju in zdravstvenih izidov.

6 LITERATURA

1. Sabate E. *Adherence to long-term therapies: evidence for action*. Geneva: World Health Organization; 2003. 196 p.
2. Janežič A, Locatelli I, Kos M. Z dokazi podprte intervencije za izboljšanje sodelovanja pri zdravljenju z zdravili. *Farmaceutski Vestnik*. 2015;66.
3. ABC project. *Ascertaining barriers for compliance: policies for safe, effective and cost-effective use of medicines in Europe. Final report of the ABC project*. 2012.
4. Clyne W, Mshelia C, Hall S, McLachlan S, Jones P, Dobbels F, et al. *Management of patient adherence to medications: protocol for an online survey of doctors, pharmacists and nurses in Europe*. *BMJ Open*. 2011;1(1):e000355.
5. van Boven JF, Tsiligianni I, Potocnjak I, Mihajlovic J, Dima AL, Nabergoj Makovec U, et al. *European Network to Advance Best Practices and Technology on Medication Adherence: Mission Statement*. *Front Pharmacol*. 2021;12:748702.
6. Patel UD, Davis MM. *Physicians' attitudes and practices regarding adherence to medical regimens by patients with chronic illness*. *Clin Pediatr (Phila)*. 2006;45(5):439-45.
7. Timmers L, Boons CC, Verbrugge M, van den Bemt BJ, Van Hecke A, Hugtenburg JG. *Supporting adherence to oral anticancer agents: clinical practice and clues to improve care provided by physicians, nurse practitioners, nurses and pharmacists*. *BMC Cancer*. 2017;17(1):122.
8. Clyne W, McLachlan S, Mshelia C, Jones P, De Geest S, Ruppert T, et al. "My patients are better than yours": optimistic bias about patients' medication adherence by European health care professionals. *Patient Prefer Adherence*. 2016;10:1937-44.
9. Anghel LA, Farcas AM, Oprean RN. *An overview of the common methods used to measure treatment adherence*. *Med Pharm Rep*. 2019;92(2):117-22.
10. Clyne W, Mshelia C, McLachlan S, Jones P, de Geest S, Ruppert T, et al. *A multinational cross-sectional survey of the management of patient medication adherence by European healthcare professionals*. *BMJ Open*. 2016;6(2):e009610.
11. Chan A, De Simoni A, Wileman V, Holliday L, Newby CJ, Chisari C, et al. *Digital interventions to improve adherence to maintenance medication in asthma*. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022;6(6):CD013030.
12. Zolnieriek KB, Dimatteo MR. *Physician communication and patient adherence to treatment: a meta-analysis*. *Med Care*. 2009;47(8):826-34.

ETIČNO PRESOJANJE ŠTUDENTOV FARMACIJE NA PRIMERIH ETIČNIH DILEM IZ LEKARNIŠKE PRAKSE

ETHICAL JUDGEMENT OF PHARMACY STUDENTS THROUGH ANALYSIS OF ETHICAL DILEMMAS IN PHARMACY PRACTICE

AVTORJI / AUTHORS:

Maša Ošlak, mag. farm.^{1,2}

prof. dr. Blaž Stres^{2,3,4,5}

doc. dr. Nejc Horvat, mag. farm.¹

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

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

³ Kemijski inštitut, Hajdrihova ulica 19, 1000 Ljubljana

⁴ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo
in geodezijo, Jamova cesta 2, 1000 Ljubljana

⁵ Institut Jožef Stefan,
Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: nejc.horvat@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Intuitivno se zdi, da je uporaba etičnih načel na področju lekarniške dejavnosti jasna. Področje etičnega ravnanja med slovenskimi lekarniškimi farmacevti usmerjata Kodeks lekarniške deontologije in Kodeks farmacevtske etike članov Slovenskega farmacevtskega društva, etična usposobljenost študentov farmacije pa temelji na seznanjenosti z njima ter védenju, ki ga pridobijo v študijskem procesu in s praktičnim usposabljanjem v učnih centrih. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kakšne etične referenčne okvirje razvijejo študenti farmacije skozi uporabo etičnih načel na podlagi reševanja scenarijev, ki prikazujejo etične dileme. S pregledom literature smo pripravili ustrezno vsebino za vprašalnik za spletno anketiranje namenskega vzorca študentov farmacije. Etična načela – koristiti, ne škoditi, avtonomija, odkritost, zaupnost in pravičnost se odražajo v odgovorih študentov na primerih etičnih dilem in jih lahko uporabljamo za vrednotenje etično sprejemljivega ravnanja. Predlagamo prestrukturiranje kodeksov, ki so trenutno namenjeni strokovnemu opravljanju dela, za zagotovitev vira načel in poenotenega pristopa pri reševanju etičnih dilem.

KLJUČNE BESEDE:

etične dileme, etična načela, etično presojanje, lekarniška praksa, študenti farmacije

ABSTRACT

Intuitively, the application of ethical principles to pharmacy seems clear. The Code of Pharmacy Deontology and the Code of Pharmacy Ethics of the members of the Slovenian Pharmaceutical Society guide the ethical conduct of Slovenian pharmacists, and the ethical competence of pharmacy students is based on their familiarity with them and the knowledge they acquire during the study process and through practical training in learning centres. The aim of our research was to identify the ethical frames of reference developed by pharmacy students through the application of ethical principles based on the solution of scenarios depicting ethical dilemmas. Through a literature review, we developed appropriate content for a questionnaire for an online survey of a purposive sample of pharmacy students. The ethical principles of beneficence,



non-maleficence, autonomy, honesty, confidentiality and justice are reflected in students' responses to examples of ethical dilemmas and can be used to evaluate ethically acceptable behaviour. We propose to restructure the codes currently designed for professional practice to provide a source of principles and a consistent approach to resolving ethical dilemmas

KEY WORDS:

ethical dilemmas, ethical principles, ethical judgement, pharmacy students, pharmacy practice.

1 UVOD

Temelj za razumevanje trenutnega pristopa k ocenjevanju etičnih vidikov v zdravstvu so štiri osnovna etična načela – koristiti, ne škoditi, avtonomija in pravičnost – ki sta jih razvila Beauchamp in Childress in so izjemno vplivala na področje medicinske etike ter so prevladujoč pristop poučevanja in vrednotenja etičnih dilem (1, 2). Na podlagi situacij, s katerimi so se lekarniški farmacevti srečali v praksi, sta Veatch in Haddad na primerih iz prakse samostojno obravnavala tudi načeli odkritosti in zaupnosti, ki sta v okviru teorije avtorjev Beauchamp in Childress vključeni v načelo avtonomije (3). Velik del bioetike ne temelji na opredeljevanju načel, temveč vključuje analiziranje argumentov na podlagi etičnih načel, ki predstavljajo različne rešitve etičnih dilem, tj. reševanje študije primerov (4).

Na področju lekarniške dejavnosti v Sloveniji etično ravnanje usmerjata Kodeks lekarniške deontologije in Kodeks farmacevtske etike članov Slovenskega farmacevtskega društva. V uvodu Kodeksa farmacevtske etike članov Slovenskega farmacevtskega društva so našeta temeljna načela – neškodljivost, skrb za zdravje (znotraj katerega opisuje tudi odkritost), strokovna neodvisnost, zaupnost, avtonomnost pacienta in pravičnost. V nadaljevanju Kodeksa so opisana ravnanja, ki jih usmerja posamezno temeljno načelo. Kodeks lekarniške deontologije pa v sklopu členov za skrb pacienta in odgovornost do družbe opisno podaja, kako naj deluje farmacevtski strokovni sodelavec, ne da bi bilo pri tem navedeno, katero etično načelo se upošteva pri ravnanju, ki je opisano (5, 6).

Etična usposobljenost študentov farmacije temelji na seznanjenosti s kodeksom ter védenju, ki ga pridobijo v štu-

dijskem procesu in s praktičnim usposabljanjem v učnih centrih. Na odločitve pri reševanju etičnih dilem vplivajo osebne vrednote, pravni standardi in moralna prepričanja kot tudi letnik študija, spol, veroizpoved ter tip naselja, v katerem živijo, vendar pa razmerja med njimi niso znana (7, 8). Zato smo v raziskavi na vzorcu študentov farmacije (od 1. do 5. letnika, vključno z absolventi) ovrednotili etično presojanje na podlagi reševanja scenarijev, ki prikazujejo etične dileme. Na ta način smo preverili usklajevanje strokovnih odločitev z etičnimi načeli – katerim izmed njih dajejo prednost v obliki izbranega ravnanja farmacevta v opisanem scenariju – in povezavo med zgoraj navedenimi spremenljivkami in etičnim presojanjem.

2 METODE

Vrednotenje etične presoje študentov z namenom ugotoviti, kako študenti načela etike uporabljajo za utemeljevanje potencialnih rešitev etičnih dilem, smo izvedli s spletnim anketnim vprašalnikom. Vsebino slednjega smo oblikovali s pomočjo pregleda literature.

2.1 PREGLED LITERATURE

Pregled literature smo izvedli 21. septembra 2022 v podatkovni bazi PubMed. Rezultate smo filtrirali z iskalnim profilom: »(pharmacy student) AND (ethical dilemma)« in izbrali znanstvene objave, ki se navezujejo na študente farmacije. Osredotočili smo se na reševanje etičnih dilem. Znanstvene objave o vplivu internih učnih programov posameznih univerz na etično usposobljenost študentov smo pregledali z namenom ugotoviti, ali seznanjenost študentov s situacijskimi dilemami v lekarniški praksi in poznavanje kodeksa farmacevtske etike, ki je sprejet v njihovi državi, v času izobraževanja vpliva na njihove poglede na strokovna stališča in ravnanja, ki jih zahteva današnja poklicna praksa.

2.2 SPLETNI ANKETNI VPRAŠALNIK

Vprašalnik je sestavljen iz treh sklopov. Prvi vsebuje šest scenarijev z etično dilemo in predlagano rešitvijo (preglednica 1), prirejenih po knjigi *Case studies in pharmacy ethics*, avtorjev Veatch in Haddad (3). Scenariji vključujejo situacije, v katerih si določena etična načela nasprotujejo; v konfliktih so: koristiti pacientu, spoštovanje avtonomije,

pravičnost, odkritost in zaupnost. Pri posameznem scenariju predvidevamo uporabo določenega načela glede na opisano ravnanje oz. odločitev farmacevta, ki predstavlja potencialno rešitev konflikta. Različni primeri iz lekarniške prakse v scenarijih zahtevajo različne utemeljitve, ki izhajajo iz različnih etičnih načel.

V tem sklopu so študenti po prebranem scenariju iz lekarniške prakse izbrali svojo stopnjo strinjanja z ravnanjem farmacevta po Likertovi lestvici od »ne strinjam se« do »se strinjam«, nato v eni do dveh povedih navedli razloge za svojo odločitev, ki smo jih avtorji članka neodvisno kodirali za etično načelo, uporabljeno v utemeljitvi. Predpostavljali smo načela koristiti pacientu, ne škoditi pacientu, spoštovanje avtonomije, odkritost, zaupnost in pravičnost. Utemeljitev, ki jih ni bilo mogoče povezati z omenjenimi etičnimi načeli, in odgovore, ki niso vsebovali utemeljitev, smo kodirali posebej. Z utemeljitvijo anketiranca smo ugotovili, katero etično načelo je prepoznal kot vodilo k rešitvi dileme in je vplivalo na njegovo stopnjo strinjanja.

V drugem sklopu vprašalnika smo spraševali po največjem izzivu pri etično sprejemljivi odločitvi. Ugotoviti smo želeli, katerim etičnim načelom je študentom težje zadostiti pri izbiri ustrezne rešitve. Zanimalo nas je tudi, ali so študenti seznanjeni s Kodeksom lekarniške deontologije in Kodeksom farmacevtske etike članov Slovenskega farmacevtskega društva in ali obstaja povezava med poznavanjem njune vsebine in utemeljitvijo rešitve scenarija. S tretjim vprašanjem smo želeli pridobiti informacijo samoocene študentov glede trenutne stopnje ustreznega etičnega znanja.

Tretji sklop so predstavljala vprašanja o socialno-demografskih podatkih: spol, letnik študija, tip naselja in veroizpoved,

ki so po pregledu literature v podatkovni bazi PubMed pokazali vpliv na to, katerim etičnim načelom dajejo anketiranci prednost.

Vključeni so bili študenti, ki so bili v študijskem letu 2022/2023 del enovitega magistrskega študijskega programa farmacije (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani), od 1. do 5. letnika, vključno z absolventi. Za spletno anketo smo uporabili platformo 1KA. Povezavo do spletnega anketnega vprašalnika smo poslali s pomočjo študentskega informacijskega sistema (ŠIS) Fakultete za farmacijo. Odločili smo se, da spletni anketni vprašalnik delimo tudi s pomočjo Facebook skupin posameznih letnikov v dogovoru s Študentskim svetom FFA.

2.3 OBDELAVA PODATKOV

SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) smo uporabili za ugotavljanje značilnosti povezav med socialno-demografskimi podatki in reševanjem etičnih dilem, vprašani ovrednotenja stopnje strinjanja z ravnanjem farmacevta v opisani etični dilemi na lestvici od »ne strinjam se« do »se strinjam« in utemeljitvami rešitev scenarija. Za vrednotenje statistično značilne povezanosti med dvema spremenljivkama smo uporabili χ^2 test (hi-kvadrat, *chi-square*) zaradi atributivne vrste spremenljivk in izbrali stopnjo tveganja (α), tj. $p < 0,05$. Pearsonov hi-kvadrat test (*Pearson's chi-squared test*) smo uporabili pri izpolnjenih pogojih: več kot 20 % pričakovanih frekvenc ne sme biti manjših od pet in najmanjša pričakovana frekvenca mora biti vsaj ena. Kadar ta dva pogoja nista bila izpolnjena, smo uporabili hi-kvadrat test razmerij verjetnosti (*likelihood ratio chi-square*).

Preglednica 1: Vsebina šestih scenarijev z etičnimi dilemami (ED1–ED6) v spletnem anketnem vprašalniku.

Table 1: Content of the six scenarios with ethical dilemmas (ED1–ED6) in the online survey questionnaire.

Vsebina etičnih dilem	
ED1	Prednostna farmacevtska obravnava mame z bolnim otrokom pred gospo, ki se precej časa pogovarja s farmacevtom o svojih zdravilih.
ED2	Predaja informacij o tveganjih, tudi glede zanositve, pri kemoterapiji raka dojke gospe, ki pa se o teh tveganjih ne želi pogovarjati.
ED3	Svetovanje gospodu, ki želi retinojsko kislino, predpisano na beli recept, uporabljati za odpravo gub.
ED4	Farmacevtska obravnava bolnika, ki je hudo bolan.
ED5	Izdaja antiepileptikov gospodu, ki dela pri krovcu, vendar delodajalca ni obvestil o svoji diagnozi epilepsije.
ED6	Svetovanje o neustreznem deljenju tablet antihipertenziva med možem in ženo zaradi doplačila zdravil, ki si ga ne moreta privoščiti.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 PREGLED LITERATURE

S pomočjo iskalnega profila v podatkovni bazi PubMed smo našli 43 znanstvenih objav in izločili tri, ki niso bile napisane v angleščini. Ostale smo razdelili v štiri sklope glede na področje, na katerega so se navezovale:

- prvi sklop je predstavljal znanstvene objave, ki pokrivajo področje reševanja etičnih dilem, pri čemer nekatere vsebujejo tudi ugotovitve vpliva demografskih in socialnih dejavnikov, osebnih vrednot in moralnih prepričanj na reševanje etičnih dilem;
- drugi sklop je zajemal znanstvene objave, ki proučujejo vpliv internih izobraževalnih pristopov posameznih univerz na etično usposobljenost njihovih študentov;
- tretji sklop je obravnaval etične dileme, ki se ne navezujejo na odnos med farmacevtom in pacientom, na katerega smo se osredotočili v nadaljevanju raziskave, temveč na področje interakcij v medpoklicnem okolju (farmacevt-zdravnik), področje smrtne kazni in nadomestne nosečnosti (ni legalnega uveljavljanja v slovenskem prostoru);
- v četrti sklop so spadale znanstvene objave, ki vključujejo različna mnenja o etičnem odločanju, predstavljajo vrste etičnih načel in etičnih dilem ter navajajo izkušnje študentov z etičnimi dilemami.

Reševanje etičnih dilem z uporabo osnovnih etičnih načel

Eden ključnih ciljev v vsakem zdravstvenem izobraževalnem programu je razviti etično in razumno prakso, zato je pomembno, kako se študenti farmacije odzovejo in obravnavajo etične dileme v svojem delovnem okolju. Etična načela, ki sta jih razvila Beauchamp in Childress, veljajo za osnovo poučevanja in vrednotenja etičnih dilem, zato se je avtorjem raziskav zdelo smiselno preveriti, kako so študenti opredelili svoje reševanje etičnih dilem na danih hipotetičnih kliničnih primerih in usklajevali odgovore z omenjenimi načeli (7, 9, 10).

Rezultati več raziskav kažejo, da je osnovna štiri etična načela – koristiti pacientu, ne škoditi pacientu, spoštovanje avtonomije in pravičnost – mogoče uporabiti pri odločitvah študentov glede reševanja etičnih dilem (7, 9–11). Raziskava Univerze v Aucklandu na Novi Zelandiji je pokazala, da je 73 % odgovorov študentov mogoče kodirati z izklju-

čno enim od štirih etičnih načel, čeprav je bolj sporne dileme, ki vključujejo vprašanja z zakonsko podlago, težje kategorizirati (7). Ugotovitve kvalitativne analize, izvedene na Nizozemskem, so pokazale, da različni primeri zahtevajo različne utemeljitve v zvezi z vsakim scenarijem, zato so se v analizi pojavile tudi druge vrednote, povezane s pojmom sprejemljivosti/dopustnosti, ki bi jih bilo mogoče uporabiti za prilagoditev temeljnih načel, kar bi omogočilo boljše poznavanje etičnih dilem v praksi (9). Ugotovitve raziskav dajejo vpogled v etični okvir, ki ga razvijejo študenti in s pomočjo katerega opravičujejo svoje ravnanje v klinično težkih situacijah. Študenti na Univerzi v Connecticutu v ZDA se najpogosteje zanašajo na načelo koristiti pacientu (10).

Povezava med demografskimi in socialnimi dejavniki, osebnimi vrednotami in moralnimi prepričanji ter reševanjem etičnih dilem

V nekaterih znanstvenih objavah so ugotavljali tudi vpliv socialno-demografskih dejavnikov in moralnih prepričanj na sprejetje določenega načina ravnanja (7, 11–14). Z vprašalnikom v raziskavi Univerze v Aucklandu na Novi Zelandiji, izvedene na enkratni populaciji študentov 2. in 4. letnika farmacije in medicine, so v izbranem scenariju, kjer bi zdravnik lahko pomagal svojemu bolniku samo tako, da bi ukradel zdravilo, ugotovili pomembne statistične razlike med spoloma. Ženske (83 %) so dajale večjo prednost načelu pravičnosti v primerjavi z moškimi. V hipotetičnem scenariju nedvoumnega primera, pri katerem je bilo dejanje »očitno« dopustno z upoštevanjem načela koristiti pacientu, so študenti 4. letnika videli primer bolj preprost – 48 % jih je sledilo temu načelu in zgolj 7 % načelu spoštovanja avtonomije. Študenti 2. letnika pa so svoje ravnanje utemeljili tako z načelom koristiti pacientu (41 %) kot tudi z načelom spoštovanja avtonomije (28 %) (7). Do podobnih ugotovitev so prišli v raziskavi, katere proučevano populacijo so predstavljali zunanji farmacevti, saj tudi pri njih starost, spol, delovne izkušnje in stopnja izobrazbe vplivajo na odločanje pri soočanju z etičnimi dilemami (14).

Vpliv izobraževalnih pristopov in pomen farmacevtskega etičnega kodeksa

V skladu s kurikulumom v izobraževanju farmacevtov želimo doseči razvoj etičnih in profesionalnih veščin, ki jih zahteva današnja lekarniška praksa. V znanstvenih objavah, kjer so proučevali interne pristope posameznih univerz, so ugotovili, da predmeti in izobraževalni procesi na nekaterih fakultetah pozitivno vplivajo na razvoj spretnosti, potrebnih za izvajanje strokovne presoje (15–22). Raziskava v Zdru-

ženem kraljestvu je pokazala, da je problemsko učenje na podlagi etičnih dilem iz lekarniške prakse, ki vključuje preizkušanje različnih poti in načinov reševanja, izboljšalo timsko delo (81,1 %), ustno komunikacijo (89,1 %) in večšine reševanja etičnih problemov (61,7 %) (21).

Ugotovitev raziskave na Queen's Univerzi v Belfastu v Severni Irski, kjer je 83,9 % študentov menilo, da je smiselno, da poklicni kodeks velja vedno, potrjuje pomembnost vira načel in pravil ter ohranjanja etičnih standardov za strokovno opravljanje farmacevtskega dela (23). V anketi, kjer so primerjali način reševanja etičnih dilem med farmacevti in pripravniki v Queenslandu v Avstraliji, je bil etični kodeks prepoznan kot vir, ki ga anketirani najpogosteje uporabljajo, ko se soočajo z etičnimi dilemami (24). Rezultati v raziskavi bolnišničnih farmacevtov v Združenem kraljestvu kažejo, da zaradi pomanjkanja enotnega pristopa obstajajo precejšnje razlike v mnenju anketirancev glede potencialnih rešitev scenarijev (25). V raziskavi so prišli do pomembnih ugotovitev, ki jasno potrjujejo potrebo po etičnih smernicah za farmacevtsko stroko (11, 13, 23–26). V znanstvenih objavah, ki potrjujejo pozitiven vpliv izobraževalnih pristopov na etično usposobljenost študentov, ugotavljajo, da uporaba Kodeksa farmacevtske etike vpliva na lažjo argumentacijo stališč in vedenj študentov, povezanih s strokovnostjo in etiko (27, 28).

3.2 SPLETNI ANKETNI VPRAŠALNIK

Spletni anketni vprašalnik je izpolnilo 214 študentov (23 % od 933 vpisanih v študijskem letu 2022/2023). Pri analizi smo upoštevali vse odgovore, ki smo jih pridobili od sodelujočih v posameznih sklopih (29). Prvi sklop vključuje reševanje etičnih dilem, drugi sklop vsebuje vprašanja glede ovrednotenja reševanja etičnih dilem, tretji sklop pa vprašanja o socialno-demografskih podatkih.

Preglednica 2: Rezultati najbolj citiranih etičnih načel študentov glede na predpostavljene konflikte etičnih načel.

Table 2: Results of the most cited ethical principles of students in relation to the assumed conflicts of ethical principles.

Scenarij	Konflikt etičnih načel	Predlagana rešitev v scenariju	Najbolj citirano etično načelo študentov
ED1	koristiti pacientu ali pravičnost	koristiti pacientu	koristiti pacientu
ED2	avtonomija ali odkritost	avtonomija	avtonomija
ED3	avtonomija ali koristiti pacientu	koristiti pacientu	koristiti pacientu
ED4	kontrola, nedvoumen primer	koristiti pacientu	koristiti pacientu
ED5	zaupnost ali koristiti pacientu	zaupnost	avtonomija (ali odkritost)
ED6	avtonomija ali koristiti pacientu	avtonomija	koristiti pacientu

Primeri etičnih dilem in kodiranih utemeljitev kot etičnih načel

Preglednica 2 prikazuje etična načela, ki so bila v konfliktu posameznega scenarija od ED1 (etična dilema 1) do ED6 (etična dilema 6), in etično načelo, ki mu je sledila predlagana rešitev farmacevtskega ravnanja v scenariju. Utemeljitve študentov so bile kodirane v etično načelo, ki ga je bilo mogoče prepoznati v študentovi utemeljitvi – v preglednici je izpostavljeno najbolj citirano etično načelo študentov.

S primerom ED4 (kontrolni primer) smo potrdili, da študenti prepoznajo etično dilemo. S pomočjo scenarijev ED3 in ED6, ki vsebujeta konflikt istih načel, smo ugotovili, da študenti v obeh etičnih dilemah izberejo koristiti pacientu pred spoštovanjem avtonomije, kljub predvidenima različnima rešitvama scenarijev. Zgolj v primeru ED5 so študenti favorizirali konflikt etičnih načel, ki jih nismo predvideli, to je avtonomija ali odkritost, ne pa predvideno načelo zaupnosti ali koristiti pacientu. ED5 je študentom predstavljala največji izziv pri odločitvi o stopnji strinjanja in njeni utemeljitvi. Ugotovili smo, da je etičnemu načelu spoštovanja avtonomije med študenti težje zadostiti. Študenti so namreč pri izbiri scenarija, ki je predstavljal največji izziv pri etično sprejemljivi odločitvi, izbrali tistega, ki je sledil predlagani rešitvi spoštovanja avtonomije. Ugotovili smo, da se študenti najpogosteje zanašajo na etično načelo koristiti pacientu.

Povezava med utemeljitvijo rešitve scenarija in socialno-demografskimi podatki

Statistično pomembno razliko smo prepoznali med uporabljenimi etičnimi načeli in spolom v primeru ED1, kjer so ženske svoje strinjanje z ravnanjem farmacevta pogosteje utemeljevale z etičnim načelom pravičnosti kot moški (Pearsonov hi-kvadrat: $\chi^2 = 6,707$; $p = 0,010$). Študenti 1., 2., 3. in 4. letnika so v primeru ED3 favorizirali izbor koristiti



pacientu, študenti 5. letnika in absolventi pa spoštovanje avtonomije (hi-kvadrat razmerja verjetnosti: $\chi^2 = 33,844$; $p = 0,027$). Ena izmed možnih razlag za opaženo razliko je lahko različna seznanjenost s kodeksom farmacevtske etike, saj študenti v 5. letniku pridobijo določeno znanje o kodeksih. V študijskem procesu se namreč srečajo s praktičnim usposabljanjem v učnih zavodih in ena izmed delavnic pri pripravi na praktično usposabljanje, ki poteka na Fakulteti za farmacijo, je »Etika v lekarniški dejavnosti, pacientove pravice in dolžnosti«. Absolventi pa so seznanjeni s kodeksom tudi zaradi preverjanja kompetenc po končanem praktičnem usposabljanju. Tudi pri ED5 je različna zastopanost EN glede na letnik študija statistično pomembna (hi-kvadrat razmerja verjetnosti: $\chi^2 = 32,237$; $p = 0,041$), a nima značilnega vzorca, da bi to lahko povezali s študijskim kurikulumom.

Povezava med ovrednotenjem reševanja etičnih dilem in socialno-demografskimi podatki

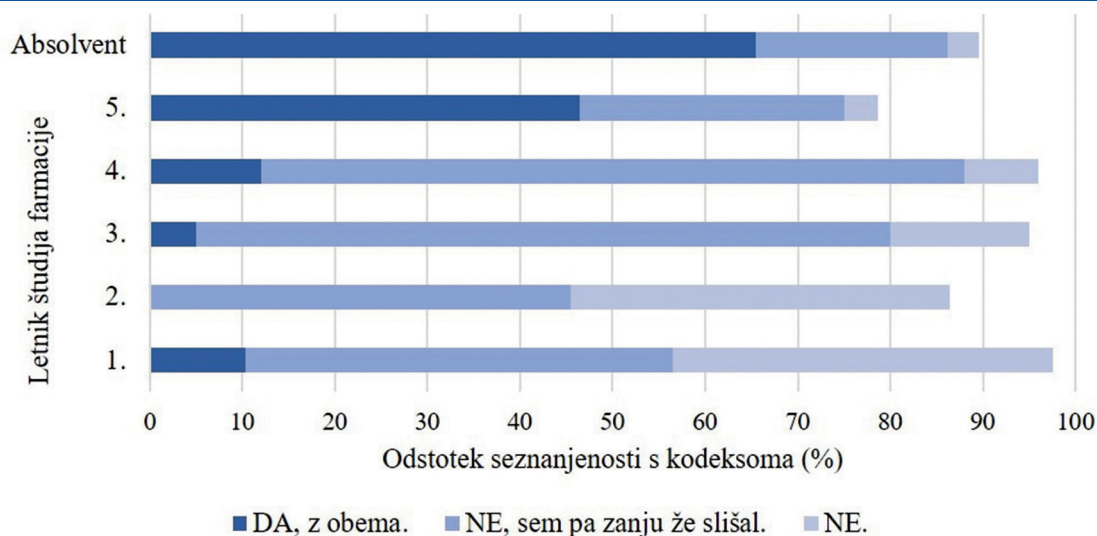
Študenti 1. in 2. letnika dosegajo isti odstotek seznanjenosti s kodeksom (odgovor »Ne.«), prav tako tudi študenti 3. in 4. letnika (odgovor »Ne, sem pa zanj že slišal.«); slika 1 prikazuje odstotke seznanjenosti s kodeksom po letnikih študija (hi-kvadrat razmerja verjetnosti: $\chi^2 = 99,367$; $p < 0,001$).

Na prehodu iz 2. v 3. letnik se odstotek poznavanja kodeksa zviša, zanj so namreč v večjem odstotku že slišali. Skle-

pamo, da je to povezano s kurikulumom, saj pridobijo študenti v 3. letniku v okviru predmeta socialna farmacija razumevanje osnov javnega zdravstva, načinov upravljanja z zdravjem in z zdravili ter poznavanje vpliva zdravil na posameznika kot člana sodobne družbe in na družbo kot celoto. Slika 2 prikazuje dendrogram podobnosti razporeditve odstotkov posameznih odgovorov o seznanjenosti s kodeksom po letnikih študija, ki smo ga pripravili s programom PAST (*PAleontological Statistics*) (30). Zaradi hkratne uporabe večjega števila kategorij odgovorov smo lahko izvedli multivariatno analizo in izračunali dendrogram podobnosti z uporabo indeksa podobnosti Bray-Curtis (31). Rezultati kažejo tri različne skupke razporeditev odgovorov o seznanjenosti s kodeksom, ki jih tvorijo odgovori 1. in 2. letnika, 3. in 4. letnika ter 5. letnika in absolventov. Naslednje večje tvorijo odgovori 1., 2., 3. in 4. letnika, ki se ločijo od odgovorov 5. letnikov in absolventov. Vertikalna os predstavlja odstotek podobnosti (30, 31).

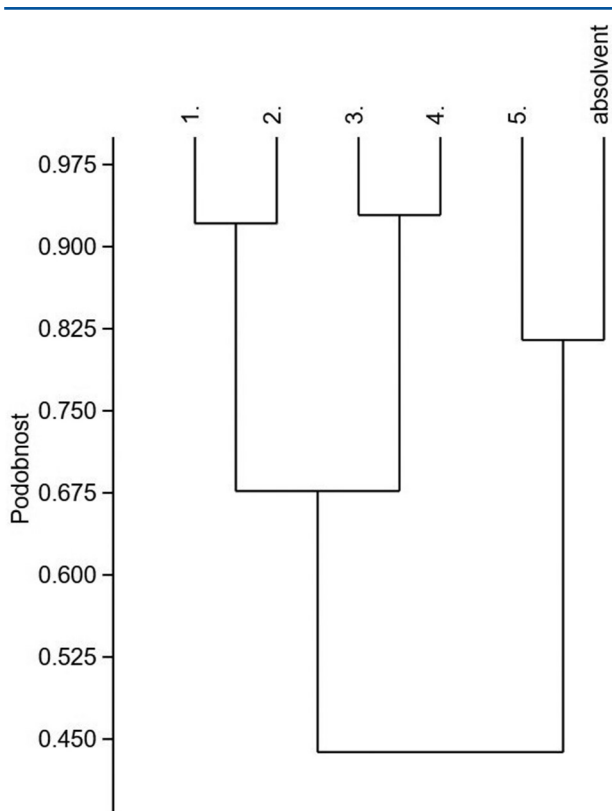
Z višino letnika se viša tudi odstotek samoocene delno ustreznega etičnega znanja (hi-kvadrat razmerja verjetnosti: $\chi^2 = 61,319$; $p < 0,001$). Študenti 5. letnika in absolventi so se že srečali s situacijami v lekarniški praksi, se nanje odzvali in obravnavali etične dileme, zato lahko trdimo, da njihov odstotek seznanjenosti s kodeksom in samoocena delno ustreznega etičnega znanja izvirata iz uporabe v praksi.

Študentom, ki živijo v mestih ali urbanih naseljih, je največji izziv predstavljala ED5, študentom, ki živijo na podeželju ali



Slika 1: Odstotki seznanjenosti s kodeksom na podlagi odgovorov na vprašanje: »Ali ste seznanjeni s Kodeksom lekarniške deontologije ali Kodeksom farmacevtske etike članov Slovenskega farmacevtskega društva (SFD)?«.

Figure 1: Percentage of familiarity with the two codes based on answers to the question: »Are you familiar with the Code of Pharmacy Deontology or the Code of Pharmacy Ethics of the members of the Slovenian Pharmaceutical Society (SFD)?«.



Slika 2: Podobnost razporeditve odstotkov seznanjenosti s kodeksoma po letnikih študija.

Figure 2: Similarity of the distribution of the percentages of familiarity with the codes by academic year.

ruralnih naseljih, pa ED2 (hi-kvadrat razmerja verjetnosti: $\chi^2 = 11,429$; $p = 0,044$). V primeru ED5 so študenti iz ruralnih področij izbrali odkritost, kar je mogoče utemeljiti s pregledom iz literature, da na podeželskih območjih poročajo o pogostejšem sodelovanju s skupnostjo pri prepoznavanju in pomoči pri reševanju zdravstvenih težav (bolj individualno in ciljno k pacientu naravnana lekarniška dejavnost); v manjših krajih se ljudje med sabo poznajo, več časa lahko namenijo pogovoru v farmacevtski obravnavi. Sicer so odkritost izbrali tudi v ED2, vendar so tam pogosteje utemeljevali svojo odločitev tudi z »ne škoditi« potencialnemu zarodku prejemnice kemoterapije. Zato je mogoče, da je tematika etične dileme prispevala k težji odločitvi za izbor etičnega načela.

Omejitve raziskave

V naših rezultatih je prepoznati veliko razdrobljenost podatkov po podskupinah, kar predstavlja kompleksnejšo sliko. Statistično pomembne razlike med socialno-demo-

grafskimi podatki in utemeljitvami rešitev scenarija bi bile morda izrazitejše v primeru, da bi pridobili večji vzorec anketiranih. Za preseganje omejitve, da je bila raziskava izvedena na enkratnem vzorcu študentov farmacije v razponu od prvega letnika do absolventskega staža, predlagamo nadaljnje sledenje spreminjanju lastnosti študentov skozi čas šestih zaporednih let s tipiziranimi vprašalniki, vzpostavljenimi v magistrski nalogi Maše Ošlak (29). Na vzorcu šestih generacij bi s tem omogočili vpogled v spremembe razumevanja etičnih načel zaradi menjave generacij in povečali število odgovorov na letnik, s čimer bi zmanjšali razpršenost odgovorov po kategorijah. Hkrati bi s tem spremljali eno generacijo skozi celoten študij od prvega letnika do absolventskega staža. Predlagamo uvedbo takega vprašalnika kot del samoevalvacije delovanja študija farmacije.

4 SKLEP

Etična načela lahko uporabljamo za vrednotenje etično sprejemljivega ravnanja. Etičnemu načelu spoštovanja avtonomije je med študenti težje zadostiti, najpogosteje pa se zanašajo na etično načelo koristiti pacientu. Ženske so svoje strinjanje z ravnanjem farmacevta pogosteje utemeljevale z etičnim načelom pravičnosti. Študenti so se glede na letnik razlikovali pri izbiri etičnih načel, s katerimi so utemeljevali svoje strinjanje z etično odločitvijo farmacevta v opisani etični dilemi. Študenti višjih letnikov so bolj seznanjeni s kodeksoma, z višino letnika pa se viša tudi odstotek samoocene delno ustreznega etičnega znanja. Študenti iz mestnih in ruralnih področij so se razlikovali v tem, katera etična dilema jim je predstavljala največji izziv. Na etični referenčni okvir študentov vplivajo izobraževalni proces, praktično usposabljanje in seznanjenost s kodeksoma. Menimo, da bi bilo smiselno prestrukturirati kodekse, ki so trenutno namenjeni strokovnemu opravljanju dela, da bi zagotavljali vir načel in poenoten pristop tj. model reševanja etičnih dilem. Predlagamo, da so členi kodeksov definirani kot etična načela, ki jim sledijo primeri njihove uporabe na resničnih situacijah iz lekarniške prakse, vključno z argumentacijo sprejetja različnih odločitev farmacevta ob upoštevanju dotičnega etičnega načela. Na ta način bi omogočili tudi vrednotenje doseženega nivoja etičnega presojanja za opravljanje farmacevtskega dela v skladu s spreminjajočo se paradigmo v lekarniški dejavnosti.



5 LITERATURA

1. Beauchamp TL, Childress, JF. *Principles of Biomedical Ethics*. 8th ed. New York: Oxford University Press; 2013.
2. Page K. *The four principles: Can they be measured and do they predict ethical decision making?*. *BMC Med Ethics*. 2012; 13: 1–10.
3. Veatch RM, Haddad A. *Case studies in pharmacy ethics*. 2nd edition. New York: Oxford University Press; 2008.
4. Harris J. *In praise of unprincipled ethics*. *Institute of medicine, law and bioethics*. *J Med Ethics*. 2003; 29: 303–306.
5. Kodeks lekarniške deontologije. *Lekarniška zbornica Slovenije*; 2019 [cited 2023 Oct 25]. Available from: <https://www.lzs.si/o-zbornici/pravni-akti-pravila-in-kodeks/>
6. Kodeks farmacevtske etike članov SFD. *Slovensko farmacevtsko društvo*; 2018 [cited 2023 Oct 25]. Available from: <https://www.sfd.si/o-drustvu/drustveni-akti/kodeks-farmacevtske-etike-clanov-sfd/>
7. Henning MA. *Students' responses to scenarios depicting ethical dilemmas: a study of pharmacy and medical students in New Zealand*. *J Med Ethics*. 2016; 42: 466–473.
8. Šolaja T. *Ovrednotenje moralnega presojanja študentov fakultete za Farmacijo Univerze v Ljubljani*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani; 2014.
9. Kruijtbosch M, Göttgens-Jensen W, Floor-Schreuderling A, van Leeuwen E, Bouvy ML. *Moral dilemmas reflect professional core values of pharmacists in community pharmacy*. *Int J Pharm Pract*. 2019; 27(2): 140–148.
10. Schlesselman LS. *A cross-sectional study of applied bioethical reasoning in pharmacy students and preceptors*. *Pharm Pract*. 2014; 12(4): 401.
11. Alkhuzaei FS, Ali M, Goh KW, AL-Worafi YM, Ming LC. *Situational judgement using ethical reasoning in Saudi undergraduate pharmacy students*. *BMC Med Ethics* 2022; 23: 1–9.
12. Henning MA. *Academic dishonesty and ethical reasoning: Pharmacy and medical school students in New Zealand*. *Med Teach*. 2013; 35: 1211–1217.
13. Fino LB, Basheti IA, Chaar BB. *Exploring Ethical Pharmacy Practice in Jordan*. *Sci Eng Ethics*. 2020; 26(5): 2809–2834.
14. Rajiah K, Venaktaraman R. *The Effect of Demographic and Social Factors on the Decision-Making of Community Pharmacists in Ethical Dilemmas*. *J Res Pharm Pract*. 2019; 8(3): 174–177.
15. Okoro RN. *Investigation of final year pharmacy students' views on professionalism and ethics in pharmacy practice: an interventional study*. *Int J Pharm Pract*. 2020; 28(2): 130–133.
16. Allinson M, White S, Black P. *Pharmacy graduates' perceived impact of long-term undergraduate use of an ethical decision-support tool on their early practice*. *Curr Pharm Teach Learn*. 2021; 13(7): 760–769.
17. Asao S, Lewis B, Harrison JD, Glass M, Brock TP, Dandu M, Le P. *Ethics Stimulation in Global Health Training (ESIGHT)*. *MedEdPORTAL*. 2017; 13:10590.
18. Fino LB, Alsayed AR, Basheti IA, Saini B, Moles R, Chaar BB: *Implementing and evaluating a course in professional ethics for and undergraduate pharmacy curriculum: A feasibility study*. *Curr Pharm Teach Learn*. 2022; 14(1): 88–105.
19. Ashfaq T, Ishaq A, Shahtad F, Saleem F. *Knowledge and perception about bioethics: A comparative study of private and government medical college students of Karachi Pakistan*. *J Family Med Prim Care*. 2021; 10(3): 1161–1166.
20. Smith MG, Dinkins MM. *Early Introduction to Professional and Ethical Dilemmas in a Pharmaceutical Care Laboratory Course*. *Am J Pharm Educ*. 2015; 79(10): 156.
21. Wright D, Wickham J, Sach T. *Problem-based learning: an exploration of student opinions on its educational role in one UK pharmacy undergraduate curriculum*. *Int J Pharm Pract*. 2014; 22(3): 223–30.
22. Lerkiatbundit S, Utaipan P, Laohawiryanon C, Teo A. *Impact of the Konstanz method of dilemma discussion on moral judgment in allied health students: a randomized controlled study*. *J Allied Health*. 2006; 35(2): 101–8.
23. Hanna LA, Gillen J, Hall M. *An investigation of final year pharmacy students' moral reasoning ability, and their views on professionalism and fitness to practice panel determinations: a questionnaire study*. *Curr Pharm Teach Learn*. 2017; 9(4): 652–659.
24. Hattingh HL, King MA, Hope DL, George E. *Pharmacy ethical reasoning: a comparison of Australian pharmacists and interns*. *Int J Clin Pharm*. 2019; 41(4): 1085–1098.
25. Wills S, Brown D, Astbury S. *A survey of ethical issues surrounding supply of information to members of the public by hospital pharmacy medicines information centres*. *Pharm World Sci*. 2002; 24(2): 55–60.
26. Myers JR, Kiersma ME, Plake KS. *Assessment of student pharmacists' ethical decision-making*. *Curr Pharm Teach Learn*. 2017; 9: 996–1002.
27. Okoro RN. *Investigation of final year pharmacy students' views on professionalism and ethics in pharmacy practice: an interventional study*. *Int J Pharm Pract*. 2020; 28(2): 130–133.
28. Smith MG, Dinkins MM. *Early Introduction to Professional and Ethical Dilemmas in a Pharmaceutical Care Laboratory Course*. *Am J Pharm Educ*. 2015; 79(10): 156.
29. Ošlak M. *Ovrednotenje etičnega presojanja študentov Enovitega magistrskega študijskega programa farmacije na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, na primerih etičnih dilem iz lekarniške prakse*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani; 2023. [cited 2023 Oct 25]. 86 p. Available from: <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?lang=slv&id=150840>
30. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. *PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis*. *Palaeontologia Electronica*. 2001; [cited 2023 Oct 25];4(1):9pp. Available from: <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>
31. Bray JR, Curtis JT. *An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin*. *Ecological Monographs*. 1957; 27:325-349.

VPLIV ŽIVČNEGA RASTNEGA DEJAVNIKA NA VNETJE TER CELJENJE IN OBNOVO TKIV

INFLUENCE OF NERVE GROWTH FACTOR ON INFLAMMATION, HEALING PROCESS AND REGENERATION OF TISSUES

AVTORICA / AUTHOR:

asist. dr. Ilonka Ferjan, dr. med., mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za
farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo,
Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ilonka.ferjan@mf.uni-lj.si

1 UVOD

Živčni rastni dejavnik nastaja v živčnih celicah in ga uvrščamo med nevrotrofične dejavnike (1). Uravnava rast, normalen razvoj in delovanje centralnih in perifernih nevronov (2, 3). Po-

POVZETEK

Živčni rastni dejavnik je protein, ki je potreben za normalen razvoj in preživetje živčnega sistema. Nastaja v živčnih celicah, proizvajajo pa ga tudi številne celice, ki sodelujejo pri različnih vnetnih in drugih imunskih procesih. Na površini teh celic so prisotni specifični tirozin kinazni receptorji, na katere se veže živčni rastni dejavnik. Posledica te vezave je sproščanje topnih celičnih dejavnikov oz. vnetnih mediatorjev, ki sodelujejo pri vnetju in povzročajo zgodnji in pozni vnetni odziv tkiv. Mediatorji vnetja histamin, serotonin, tripsaza in nekateri interleukini so odgovorni za nastanek hitrega vnetnega in imunskega odziva tkiv. Nekateri citokini, predvsem interleukini in rastni dejavniki, ki se iz vnetnih celic sprostijo kasneje, pa sodelujejo pri celjenju in obnovi poškodovanih tkiv.

KLJUČNE BESEDE:

celjenje tkiv, vnetne celice, vnetne reakcije, živčni rastni dejavnik

ABSTRACT

Nerve growth factor is a protein that regulates the normal differentiation and survival of the nerve system. It is produced in neurons and in several non-nervous cells which are involved in certain inflammatory and immunological processes. Inflammatory cells express specific tyrosine kinase receptors. Binding of the nerve growth factor to these receptors activates inflammatory cells which in turn secrete many soluble inflammatory mediators. These mediators, histamine, serotonin, trypsin and some interleukins, are involved in early responses of inflammatory cells. On the other hand, the cytokines and growth factors that are produced later in the inflammatory process activate fibroblasts and other cell types, which participate in healing processes of damaged tissues.

KEY WORDS:

healing process, inflammation, inflammatory cells, nerve growth factor

treben je za diferenciacijo in preživetje simpatičnih in senzornih nevronov kot tudi holinergičnih nevronov v možganih (3). Poleg živčnih celic ga proizvajajo tudi številne druge celice v različnih tkivih, med katerimi so tudi tiste, ki sodelujejo pri vnetnih procesih in imunskih odzivih tkiv (4, 5).



Živčni rastni dejavnik se nahaja tako v vnetnih kot tudi strukturnih celicah, ki sodelujejo pri vnetju (6). Med vnetne celice sodijo mastociti, bazofilci, limfociti B in T, nevtrofilci, makrofagi in eozinofilci. Med strukturne tkivne celice pa v tem kontekstu uvrščamo mišične, endotelijske in fibroblastne celice. Živčni rastni dejavnik vpliva na rast, diferenciacijo in preživetje teh celic (7). Poleg tega vpliva tudi na sintezo imunoglobulinov, kemotakso nevtrofilcev in sproščanje vnetnih mediatorjev iz aktiviranih mastocitov, nevtrofilcev, bazofilcev in makrofagov (8). Na ta način lahko torej živčni rastni dejavnik sodeluje pri različnih imunskih boleznih in vnetnih procesih.

2 RECEPTORJI ZA ŽIVČNI RASTNI DEJAVNIK

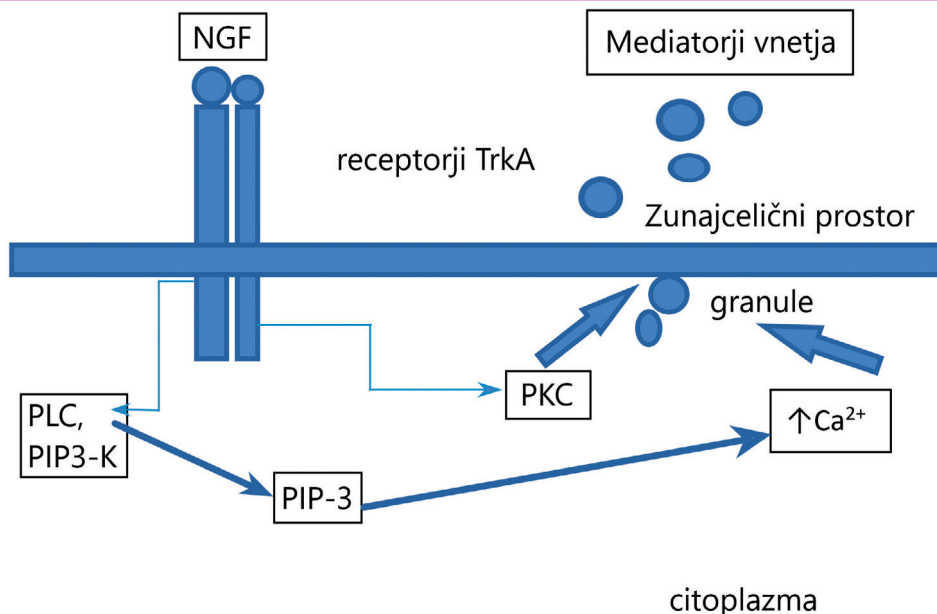
V različnih tkivih so izraženi receptorji, na katere se veže živčni rastni dejavnik in tako povzroči svoje učinke. Veže se tako na visokoafinitetne tropomiozin kinaza A receptorje (receptorji TrkA) kot nizkoafinitetne receptorje p75 (8, 9).

Receptorji TrkA so specifični za vezavo živčnega rastnega dejavnika (8). Receptorji P75 pa niso specifični samo za vezavo živčnega rastnega dejavnika, saj se nanje vežejo tudi drugi nevtrofični dejavniki, ki prav tako uravnavajo preživetje celic (8).

Živčni rastni dejavnik povzroči večino svojih učinkov z vezavo na receptorje TrkA. Receptorji TrkA so transmembranski proteini iz znotrajceličnega tirozin kinaznega dela in zunajceličnega dela, ki je odgovoren za vezavo živčnega rastnega dejavnika (8). Receptorji TrkA so izraženi v večini tkiv, in sicer na živčnih, strukturnih, tkivnih in vnetnih celicah.

3 MEHANIZEM SPROŠČANJA MEDIATORJEV VNETJA IZ VNETNIH CELIC PO DELOVANJU ŽIVČNEGA RASTNEGA DEJAVNIKA

Vezava živčnega rastnega dejavnika na receptorje TrkA na vnetnih celicah povzroči podvojitev receptorja in fosforilacijo tirozinskih ostankov na znotrajcelični strani receptorja.



Slika 1: Mehanizem sproščanja mediatorjev vnetja iz vnetnih celic po delovanju živčnega rastnega dejavnika (NGF). Vezava NGF na receptorje TrkA aktivira fosfolipazo C (PLC), fosfatidilinozitol-3-kinazo (PIP-3-K) in protein kinazo C (PKC). Nastane fosfatidilinozitol-3-fosfat (PIP-3). Zveča se koncentracija prostih Ca²⁺ v celici, ki je stimulus za sproščanje granule z mediatorji vnetja iz vnetne celice.

Figure 1: The mechanism of the release of inflammatory mediators from inflammatory cells. Binding of the nerve growth factor (NGF) to TrkA receptors activates phospholipase C (PLC), phosphatidylinositol-3-kinase (PIP-3-K) and protein kinase C (PKC). Phosphatidylinositol-3-phosphat (PIP-3), which is produced, increases intracellular free Ca²⁺ and leads to degranulation of inflammatory cells.

Na fosforilirana mesta se vežejo različni encimi, ki se jim po fosforilaciji poveča encimska aktivnost (4). Tako se po vezavi živčnega rastnega dejavnika na zanj specifičen receptor aktivirajo encimi fosfolipaza C (PLC), protein kinaza C (PKC) in fosfatidilinozitol-3-kinaza (PIP-3-K). Pri tem aktivacija encimov PLC in PIP-3-C omogoča nastanek fosfatidil-inozitoltrifosfata (PIP₃), ki sprošča Ca²⁺ iz znotrajceličnih zalog. Tako se zveča koncentracija prostih Ca²⁺ v citoplazmi vnetne celice, kar je stimulus za sproščanje mediatorjev vnetja (4). Aktivacija PKC pa ima vlogo pri preureditvi citoskeleta v tkivnem bazofilcu in tako olajša premikanje granul z mediatorji vnetja k celični membrani. Sledi proces sprostitve granul iz vnetne celice (4). Iz granul se nato sprostijo z degranulacijo številni mediatorji vnetja (slika 1).

4 VPLIVI ŽIVČNEGA RASTNEGA DEJAVNIKA PRI IMUNSKIH BOLEZNIH

Živčni rastni dejavnik sodeluje pri nekaterih imunskih boleznih, in sicer alergijskih reakcijah in različnih avtoimunskih patoloških stanjih. Med alergijskimi reakcijami so najpogostejše kožne alergije in astma (9). Med avtoimunske bolezni v povezavi z živčnim rastnim dejavnikom uvrščamo npr. multiplo sklerozo in revmatoidni artritis (10).

Alergije so preobčutljivostni odzivi organizma na alergene. Med njimi so najpogostejše hitre preobčutljivostne reakcije ali alergijske reakcije tipa I. V tem primeru gre za takojšen preobčutljivostni odziv v različnih delih organizma, in sicer z lokalno ali sistemsko izraženo simptomatiko (10). Urtikarija ali koprivnica je primer hitre preobčutljivostne reakcije, izražene na koži. V dihalih pa lahko po vdihovanju alergena pride do alergijskega rinitisa ali astmatičnega napada. Huda, življenje ogrožajoča alergijska reakcija, ki prizadene celotni organizem, je anafilaktični šok (10).

Preobčutljivostno reakcijo sproži predhodna senzibilizacija imunskih celic (limfocitov, mastocitov, krvnih bazofilcev in eozinofilcev) z določenim antigenom (10, 11). Limfociti B začnejo tvoriti protitelesa IgE, ki se s svojimi konstantnimi predeli vežejo na zanje specifične receptorje Fc, izražene na mastocitih in bazofilcih. Epitopi alergena se vežejo na variabilne predele oz. paratope dveh protiteles IgE, ki ju povežejo med seboj, to pa nato aktivira mastocite, bazofilce, eozinofilce in nekatere druge vnetne celice. Posledično se iz njih sprostijo številni mediatorji vnetja, ki posredujejo pri imunskem odzivu organizma.

Imunske celice, ki so efektorske celice pri alergijah, po aktivaciji z alergeni sintetizirajo in sproščajo tudi živčni rastni dejavnik, katerega zvišane koncentracije so prisotne v krvi bolnikov z določenimi oblikami alergijskih reakcij (12). Kot smo že omenili, ta po vezavi na receptorje TrkA, izražene na vnetnih celicah, sproži še dodatno sproščanje mediatorjev vnetja (12). Iz mastocitov se z degranulacijo znotrajceličnih granul sprošča histamin, pa tudi drugi mediatorji, ki povzročajo takojšnji alergijski odziv v tkivih (11). Kasneje se iz mastocitov in eozinofilcev sproščajo tudi številni citokini, ki imajo ključno vlogo pri poznem alergijskem odzivu (12, 13).

Astma je imunska reakcija, za katero je značilno vnetje v sluznicah dihal in posledična preobčutljivost dihalnih poti, ki se kaže z njihovo konstrikcijo oz. zožitvijo dihalnih poti (bronhijev). V bronhijih nastaja živčni rastni dejavnik tako v različnih vnetnih (mastociti, eozinofilci, bazofilci) kot strukturnih celicah (gladkomišične, endoteljske, fibroblastne in živčne celice). Njegovo delovanje na vnetne celice povzroči zgodnji preobčutljivostni odziv z vnetno reakcijo v bronhijih, učinkovanje na strukturne celice pa njihov preobčutljivostni odziv z zožitvijo bronhijev (12, 13, 14).

5 VLOGA ŽIVČNEGA RASTNEGA DEJAVNIKA V ZGODNJEM ODZIVU VNETNIH CELIC

Mediatorji vnetja, ki povzročijo zgodnji vnetni odziv (slika 2), so biogeni amini (histamin in serotonin), encim triptaza in nekateri interlevkini (IL), npr. IL-6 in IL-8 (8). Skupaj sodelujejo pri nastanku alergijskih reakcij s hitrim vnetnim odzivom (15, 16). Poleg tega se vežejo na specifične receptorje, ki se nahajajo na žilnem endoteliju, s čimer večajo njegovo prepustnost in povzročijo vazodilatacijo. S tem je omogočen olajšan prehod levkocitov in drugih vnetnih celic iz krvi, kjer lahko nato sodelujejo pri kasnejšem vnetnem odzivu (17, 18).

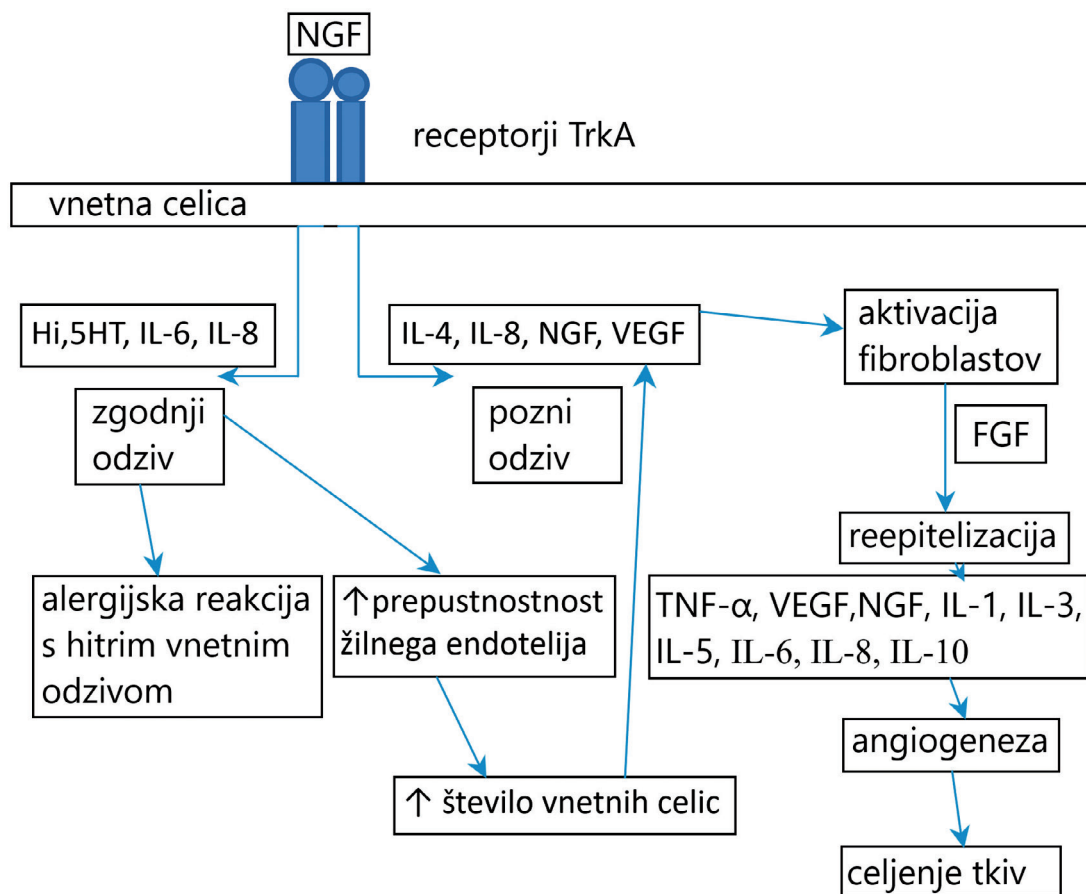
6 POZNI ODZIV VNETNIH CELIC IN VLOGA ŽIVČNEGA RASTNEGA DEJAVNIKA V PROCESIH CELJENJA IN OBNOVE TKIV

Iz vnetnih celic, ki zaradi vazodilatacije prispejo na mesto vnetja, se sprostijo interlevkini in rastni dejavniki (slika 2).



Med interleukini omenimo IL-4 in IL-8, med rastnimi dejavniki pa žilni endotelni rastni dejavnik (VEGF) ter živčni rastni dejavnik (19). Poleg tega fibroblasti, ki so jih aktivirali mediatorji vnetja, sproščeni iz vnetnih celic po delovanju živčnega rastnega dejavnika v zgodnji fazi, izločajo fibroblastni rastni dejavnik. Fibroblastni rastni dejavnik omogoči dozorevanje fibroblastov, ki imajo glavno vlogo pri celjenju in obnovi tkiv (20). Fibroblastni rastni dejavnik, IL-4 in IL-8

omogočajo nastanek ugodnega okolja, v katerem zreli fibroblasti tvorijo kolagen, proteoglikane in elastin ter tako sodelujejo pri reepitelizaciji in obnovi tkiv (21). Številni drugi interleukini (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10) in rastni dejavniki (dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α), VEGF in živčni rastni dejavnik) sodelujejo tudi pri nastanku novih žil (angiogenezi), ki so nujno potrebne za prehranjevanje novonastalega tkiva (5).



Legenda: živčni rastni dejavnik (NGF), tropomiozin kinaza A receptorji (receptorji TrkA), histamin (Hi), serotonin (5HT), interleukini (IL), žilni endotelni rastni dejavnik (VEGF), dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α), fibroblastni rastni dejavnik (FGF)

Slika 2: Vpliv živčnega rastnega dejavnika (NGF) na zgodnji in pozni odziv vnetnih celic. Vezava NGF na receptorje TrkA povzroči sproščanje histamina, serotonina, IL-6 in IL-8 ter zgodnji odziv vnetnih celic. Pri tem se poveča prepustnost žilnega endotelija in olajšan je prehod vnetnih celic iz krvi. Iz vnetnih celic se nato sprostijo interleukini (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10) in rastni dejavniki (NGF, FGF, TNF- α , VEGF), ki povzročijo pozni odziv vnetnih celic.

Figure 2: The effect of the nerve growth factor (NGF) on the early and late response of inflammatory cells. Binding of NGF to TrkA receptors induces a rapid release of some mediators (histamine, serotonin, interleukin-6, interleukin-8) that are involved in the early response of inflammatory cells. Mast cells mediators including interleukins (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10) and growth factors (NGF, FGF, TNF- α , VEGF), contribute to the late response of inflammatory cells.

7 SKLEP

Živčni rastni dejavnik je pomembna molekula, ki uravnava normalen razvoj živčnega sistema, sodeluje pa tudi pri različnih vnetnih procesih in določenih imunsko pogojenih boleznih. Vpliva na povečano sproščanje številnih topnih mediatorjev vnetja. Nekateri od teh se sprostijo iz vnetnih celic takoj po njihovi aktivaciji z živčnim rastnim dejavnikom in povzročijo zgodnjo vnetno reakcijo. Tisti mediatorji, ki se sprostijo kasneje po začetni aktivaciji celic, pa sodelujejo pri celjenju in obnovi poškodovanih tkiv. Živčni rastni dejavnik je tako udeležen pri različnih vrstah alergij, avtoimunskih boleznih, pa tudi pri obnovi tkiv. Temeljito poznavanje delovanja živčnega rastnega dejavnika na številne celične procese bo pripomoglo k zdravljenju različnih imunsko pogojenih bolezni in vnetnih stanj. Mednje sodijo predvsem različne zgodnje alergijske reakcije, pa tudi procesi, ki omogočajo celjenje in obnovo tkiv.

8 LITERATURA

1. Levi-Montalchini R., Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 1996 Nov;19(11):514-20.
2. Yankner BA, Shooter EM. The biology and mechanism of action of nerve growth factor. *Annu Rev Biochem* 1982;51:845-68.
3. Mahmoud G, Baassiri E, Dosh L, Haidar H, Gerges A, Baassiri S et al. Nerve growth factor and burn wound healing: Update of molecular interactions with skin cells. *Burns*. 2023 Aug;49(5):989-1002.
4. Stephen D. Skaper. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology* 2017 May;151(1):1-15.
5. Kennelly R, Conneely JB, Bouchier-Hayes d, Winter DC. Mast cells in tissue healing: from skin to the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 2011;17(34):3772-75.
6. Mukai K, Tsai M, Saito H. Mast cells as sources of cytokines, chemokines and growth factors. *Immunol Rev*. 2018 Mar;282(1):121-50.
7. Kioussis D, Pachinis V. Immune and nervous systems: More than just a superficial similarity. *Immunity* 2009 Nov;31(5):705-10.
8. Minnone G, Benedetti F and Bracci-Laudiero L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. *Int J Mol Sci* 2017 May;18(5):1028.
9. Frossard N, Freund V, Advenier C. Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004 Oct;500(1-3):453-65.
10. Skaper SD. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology*. 2017 May;151(1):1-15.
11. Kritas SK, Caraffa A, Antinolfi P, Saggini A, Pantalone A, Rosati M, Tei M, Speziali A, Saggini R, Pandolfi F, Cerulli G and Conti P. Nerve growth factor interactions with mast cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2014 Jan-Mar;27(1):15-19.
12. Micera A, Puxeddu I, Aloe L, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 Oct;14(5):369-74.
13. Olgart Hoglund C, Frossard N. Nerve growth factor and asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2002;1(1)5:51-60.
14. Štempelj M, Ferjan I. Živčni rastni dejavnik – njegova vloga pri astmi in alergijskih reakcijah. *Zdrav Vestn* 2005;74(5):307-9.
15. Ferjan I. Regulatorna vloga Ca²⁺ ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov. *Farm Vest* 2009;60(3):165-68.
16. Štempelj M, Ferjan I. Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2005;54:344-49.
17. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli S. Mast cells as sources of cytokines, chemokines and growth factors. *Immunol Rev*. 2018 Mar;282(1):121-50.
18. Hoyle GW. Neurotrophins and lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 Dec;14(6):551-8.
19. Micera A, Puxeddu I, Aloe L, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct;14(5):369-74.
20. Komi DE, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A review of the contribution of mast cells in wound healing: involved molecular and cellular mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 2020 Jun;58(3):298-312.
21. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med* 2016 Oct-Dec;64(4):171-7.



CEPIVA ZA PREPREČEVANJE RAZVOJA IN ZDRAVLJENJE RAKAVIH BOLEZNI: RAZVOJNE PLATFORME IN TRENUTNI NAPREDEK

PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC CANCER VACCINES: DEVELOPMENT PLATFORMS AND CURRENT PROGRESS

AVTORICA / AUTHOR:

dr. Milica Perišić Nanut, dipl. biol.

Institut Jožef Stefan, Jamova 39, Ljubljana, Slovenija

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: milica.nanut@ijs.si

POVZETEK

Cepiva so zdravila, ki imunski sistem pripravijo na to, da najde in uniči škodljive mikroorganizme in celice. Cepimo se v vseh življenjskih obdobjih, da se zaščitimo pred nalezljivimi boleznimi, ki jih povzročajo bakterije ali virusi. Obstajajo tudi cepiva proti raku, tako cepiva za preprečevanje raka kot cepiva za zdravljenje raka. Cepiva za preprečevanje raka nas ščitijo pred virusnimi okužbami, ki lahko izzovejo (pred)rakave spremembe. Cepiva za zdravljenje raka ali terapevtska cepiva so imunoterapevtiki, ki usmerijo in okrepijo imunski sistem za boj proti raku. Za razliko od preventivnih cepiv, ki ščitijo pred virusi, cepiva za zdravljenje raka ščitijo pred rakavimi celicami, ki so bolj podobne zdravim celicam, zaradi česar je razvoj teh cepiv težji. V preglednem članku razpravljamo o novostih na področju cepiv proti raku, o uspehu cepiv za preprečevanje raka in izzivih pri razvoju cepiv za zdravljenje raka.

KLJUČNE BESEDE:

antigeni, povezani s tumorjem, cepiva, imunoterapija raka, klinična raziskava

ABSTRACT

Vaccines are medicines that train the immune system to find and destroy harmful germs and cells. Vaccinations we receive throughout the life prevent common bacterial and virus illnesses. In addition, there are vaccines to prevent or treat certain types of cancer. Preventive cancer vaccines have proven successful in reducing the incidence of several cancers that are induced by viral infections. Therapeutic vaccines are immunotherapeutics that guide and boost the immune system to fight cancer. Unlike prophylactic vaccines that target viruses, therapeutic vaccines target cancer cells that closely resemble normal, healthy cells, making their development more difficult. In this review new developments in the field of cancer vaccines, success of prophylactic vaccines and challenges in the development of therapeutic cancer vaccines will be discussed.

KEY WORDS:

cancer immunotherapy, clinical trials, tumor associated antigens, vaccines

1 UVOD

Cepiva so se izkazala za učinkovita pri preprečevanju številnih bolezni, ki jih povzročajo virusi in bakterije. Vse od njihovega odkritja pred več kot 200 leti močno prispevajo k izkoreninjenju številnih bolezni. S cepivi imunskemu sistemu predstavimo oslABLJENE ali uničene različice povzročitelja bolezni oz. njegove dele. Imunski sistem se tako poduči o specifičnih sestavinah virusov ali bakterij, imenovanih antigeni, ter vzpostavi učinkovit in dolgotrajen odziv proti njim (1). Posebna skupina imunskih celic (antigen predstavitvene celice, APC), kot so dendritične celice, zajamejo proteinske antigene iz cepiva, jih predelajo v peptidne epitope in predstavijo limfocitom T, vezane na proteine poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (*major histocompatibility complex*, MHC). Če limfociti T prepoznajo epitop kot tujek, se aktivirajo specifični imunski odzivi in imunске celice prepoznajo in uničijo celice, ki izražajo tuji antigen (2). Poleg tega dendritične celice z izločanjem citokinov usmerjajo diferenciacijo naivnih limfocitov T in tako vplivajo na delovanje pridobljene celične imunosti (3). Cepiva vsebujejo različne pomožne snovi, ki izboljšujejo učinek cepiva ter prispevajo k njegovemu boljšemu prenašanju in dostavi ali pa pomagajo imunskemu sistemu prepoznati antigen in vzpostaviti učinkovit imunski odziv (4).

2 PREVENTIVNA CEPIVA PROTI RAKU

Virusne okužbe so odgovorne za razvoj več vrst raka. Tako so z okužbo s človeškim papiloma virusom (*human papillomavirus*, HPV) povezani vaginalni, vulvarni, analni, penilni raki in nekateri raki ustne votline in grla. Hepatitis je vnetje jeter, ki ga tudi lahko povzročijo nekateri virusi. Dolgotrajno okužba z virusom hepatitisa B (HBV) poveča tveganje za raka jeter. Preventivna cepiva proti raku dajemo zdravim ljudem po možnosti pred stikom z virusom in preden se razvije rak. Razvili so več cepiv, ki lahko preprečijo okužbo s HPV in HBV ter posledično ščitijo pred nastankom s HPV in HBV povezanih rakavih bolezni. Ta cepiva so osnovana na virusu podobnih delcih. Virusu podobni delci vsebujejo rekombinantne proteine, značilne za ovojnico virusa, in ne vsebujejo genetskega zapisa virusov. Delci, na katerih so zasnovana cepiva, kot so tri različna cepiva proti HPV (Gardasil®, Cervarix® in Gardasil 9®), ki so trenutno na voljo, vsebujejo virusu podobne delce različnih sevov HPV (preglednica 1). Virusu podobni delci imajo takšno strukturo, da sprožijo močan odziv limfocitov B in T ter dolgotrajen imunski odziv. Ta cepiva ščitijo pred okužbo s tipi HPV, ki so najpogosteje povezani s predrakavimi stanji in rakom materničnega vratu. Gardasil 9 ščiti tudi pred drugimi različicami HPV (5).

Preglednica 1: Odobrena preventivna cepiva proti raku.

Table 1: Approved preventive cancer vaccines.

Cepivo	Virusu podobni delci	Vrsta raka
Cervarix®	glavni kapsidni protein, L1 HPV serotipov 16 in 18	analni rak, rak materničnega vratu, glave in vratu, penisa, vulve in vagine, povezani z okužbo s HPV
Gardasil®	glavni kapsidni protein, L1 HPV serotipov 6, 11, 16 in 18	analni rak, rak materničnega vratu, glave in vratu, penisa, vulve in vagine, povezani z okužbo s HPV
Gardasil-9®	glavni kapsidni protein, L1 HPV serotipov 6, 11, 16, 18, 31,33, 45 in 52	analni rak, rak materničnega vratu, glave in vratu, penisa, grla, vulve in vagine, povezani z okužbo s HPV; preprečevanje genitalnih bradavic, ki jih povzroča HPV serotipa 6 ali 11
HEPLISAV-B®	površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg)	rak jeter, povezan z okužbo s HBV

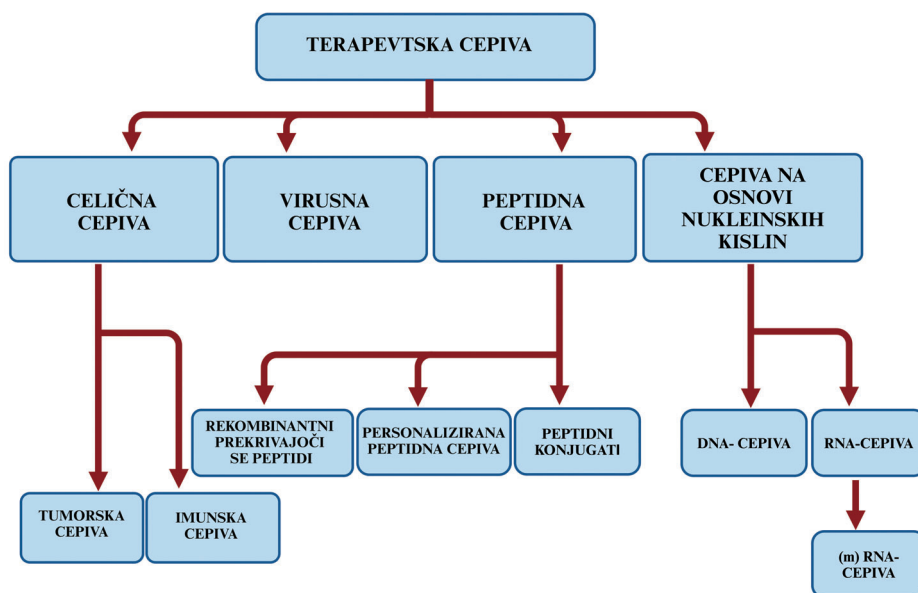


Dosedanje raziskave so pokazale, da imajo preventivna cepiva pomembno vlogo pri zmanjšanju tveganja za razvoj raka. Tako je škotska raziskava pokazala, da je sistematično cepljenje deklic, starih od 12 do 13 let, z bivalentnim cepivom proti HPV ob analizi pri 20. letu starosti privedlo do 89-odstotnega zmanjšanja cervikalne intraepitelijske neoplazije stopnje 3 v primerjavi z necepljenimi ženskami (6). Cepivo proti HBV je bilo prvo odobreno preventivno cepivo proti raku (7). Pojavnost raka jeter pri mlajših osebah je na splošno redka in zato spremembe v pojavnosti lahko pokažemo le v državah, kjer je breme bolezni veliko in je zbiranje podatkov zanesljivo (8). Tajvan je bil prva država, kjer so s prepričljivimi epidemiološkimi podatki pokazali, da se je pojavnost raka jeter pri cepljenih tajvanskih otrocih, starih od 6 do 14 let, ki so bili ob rojstvu cepljeni proti HBV, zmanjšala za približno 70 % (9, 10).

3 TERAPEVTSKA CEPIVA PROTI RAKU

Terapevtska cepiva proti raku delujejo na enak način kot protivirusna in protibakterijska cepiva, in sicer usposobijo naš imunski sistem, da prepozna in napade celice, ki izražajo enake ali podobne antigene, kot jih vsebuje cepivo.

Zelo pomembno dejstvo je, da se za razliko od bakterij in virusov, ki so za naš imunski sistem tujki, antigeni rakavih celic manj razlikujejo od antigenov normalnih celic, zaradi česar je načrtovanje cepiva proti raku težje. Kljub temu je mogoče določene antigene, povezane s tumorjem (*tumor-associated antigens*, TAA), identificirati le v rakavih celicah (11). Trenutno obstajajo štiri različne platforme za razvoj cepiv proti raku: celična cepiva, virusna cepiva, peptidna cepiva in cepiva na osnovi nukleinskih kislin (slika 1). Celična terapevtska cepiva proti raku vključujejo cepiva na osnovi tumorskih celic in cepiva na osnovi imunskih celic. Ta cepiva vsebujejo cele TAA in jih nadalje razvrstimo v avtologna (pripravljena iz celic bolnika) ali alogena (pripravljena iz celic zdravih posameznikov) (13). Izražanje velikega števila TAA ima za posledico, da imunski odziv ni usmerjen proti točno določenemu TAA. V tem primeru je cepivu dodan adjuvans, ki pripomore k rekrutiranju različnih imunskih celic na mesto injiciranja. Imunske celice nato prenašajo antigen v drenažne bezgavke, da sprožijo specifični imunski odziv. Takšno cepivo proti raku je GVAX[®]. To cepivo sestavljajo tumorske celice, ki so obsevane, da bi preprečili njihovo nadaljnje pomnoževanje, in gensko spremenjene, da izločajo citokin – granulocitne makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), ki deluje kot adjuvans. Cepivo obstaja kot avtologno in alogensko (14). GVAX[®] je leta 1993 razvil Glenn Dranoff s sod. (15). Od takrat so cepivo preiz-



Slika 1. Terapevtska cepiva proti raku (12).
Figure 1: Therapeutic cancer vaccines (12).

kusili v več kot 40 kliničnih raziskavah na bolnikih z različnimi tipi raka (podatki za klinične raziskave so pridobljeni na spletni strani:

<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=G VAX&cntry=&state=&city=&dist>, dostop avgust 2023).

TAA so lahko normalni proteini, ki jih rakave celice obsežno izražajo, npr. kislja fosfataza pri celicah raka prostate. Na tej podlagi so razvili cepivo sipuleucel-T (Provenge®). To je bilo prvo terapevtsko cepivo proti raku na osnovi dendritičnih celic, odobreno pred več kot desetletjem. Cepivo sipuleucel-T so pripravljali iz avtolognih dendritičnih celic, ki so jih po odvzemu namnožili *ex vivo* v prisotnosti fuzijskega proteina PA2024. Fuzijski protein (PA2024) je sestavljen iz dveh delov, kislje fosfataze prostate in GM-CSF, ki spodbuja razvoj in zorenje mieloidnih celic ter diferenciacijo in preživetje dendritičnih celic. Spremenjene avtologne dendritične celice so intravensko vrnilo bolniku. Dendritične celice so ključnega pomena za sprožanje protitumorskega imunskega odziva, ker poleg aktivacije citotoksičnih limfocitov T in celic pomagalk z izločanjem citokinov izzovejo inaktivacijo regulatornih limfocitov T (16). Cepivo sipuleucel-T je bilo namenjeno bolnikom z razširjenim in hormonsko neodzivnim rakom prostate (17).

V klinični raziskavi IMPACT (NCT 00065442), na podlagi katere je cepivo dobilo dovoljenje za promet, je sodelovalo 512 bolnikov z asimptomatskim ali minimalno simptomatskim razsejanjem, proti kastraciji odpornim rakom prostate. Pacienti so bili naključno razporejeni v dve skupini v razmerju 2 : 1. Pacienti v kontrolni skupini so prejeli placebo, ki je vseboval dve tretjini manj avtolognih dendritičnih celic, gojenih brez fuzijskega proteina PA2024. Pacienti so prejeli en odmerek cepiva Sipuleucel-T ali placebo intravenozno v obdobju ene ure. To cepivo je izboljšalo triletno preživetje bolnikov, ki so prejeli sipuleucel-T, za 4,5 mesecev (mediana) glede na kontrolo skupino (18).

Virusna cepiva proti raku vsebujejo inaktivirane (replikacijsko onesposobljene) oz. oslABLJENE viruse ali podenote virusov. Gensko spremenjene viruse imenujemo virusni vektorji in jih uporabljamo za dostavo TAA ali ustreznega gena v telo pacienta. Imunski sistem se odzove na virusni vektor, kar pomaga imunskemu sistemu, da prepozna TAA in se nanj odzove. Virusna cepiva spodbujajo protitumorski imunski odziv z aktivacijo imunskih celic (19). Najpogosteje uporabljena virusna vektorja sta virus herpes simpleks in adenovirus (20). Zaenkrat edini odobren je T-VEC oz. talimogen laherparepvek (Imlygic®), ki vsebuje gensko spremenjen virus herpes simpleks tipa 1 (HSV1). Funkcionalna delecija gena ICP34.5 oslabi virusno patogenost in omogoči selektivno razmnoževanje virusa v

tumorjih, medtem ko delecija gena ICP47 zmanjša z virusom posredovano supresijo predstavitve antigenov in poveča izražanje gena HSV US11, kar posledično spodbuja pomnoževanje virusa v tumorskih celicah. (21, 22). Imunogenost T-VEC-a je dodatno podprta z izražanjem gena za GM-CSF. GM-CSF spodbuja preživetje celic preko fosfatidilinozitol-3-kinaze in signalnih poti JAK/STAT-Bcl-2, kar ima za posledico povečano migracijo mieloidnih celic, kot so dendritične celice, spremembe izražanja receptorjev, izraženih na površini celic, in sprožanje imunsko-vnetne kaskade. Slednje omogoča sprožanje systemskega imunskega odziva po vnosu cepiva neposredno v predel lezije (slika 2) (23, 24). Cepivo T-VEC je namenjeno bolnikom z napredovalim neoperabilnim melanomom (24). Podatki iz klinične raziskave (NCT00769704), na podlagi katere so T-VEC odobrili, so pokazali 31,5-odstotno stopnjo odziva s 16,9-odstotno stopnjo popolnega odziva pri bolnikih z melanomom. Pri bolnikih z zgodnjim razširjenim melanomom in pri bolnikih, ki predhodno niso prejeli systemskega zdravljenja melanoma, je prišlo tudi do bistvene in statistično pomembnega izboljšanja preživetja. Skupina v zgodnejši fazi je imela zmanjšano tveganje smrti za približno 50 %. V nadaljnjih kliničnih raziskavah je uporaba T-VEC pokazala stopnjo odziva do 88,5 % s stopnjami popolnega odziva do 61,5 % (25). Trenutno učinkovitost T-VEC vrednotijo v zgodnjih kliničnih preskušanjih za zdravljenje raka trebušne slinavke, sarkoma mehkega tkiva ter ploščatoceličnega raka glave in vratu (podatki za klinične raziskave so pridobljeni na spletni strani:

<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=T-VEC&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>; dostop avgust 2023).

Peptidna cepiva vsebujejo izbrane peptide, za katere se je izkazalo, da so značilni za rakave celice in se razlikujejo od običajnih proteinov. Lahko so usmerjena proti enemu ali več antigenom. Cepiva na osnovi peptidov so šibkejša pri spodbujanju imunskega odziva, zato so potrebni adjuvansi za povečanje njihove imunogenosti (26). Tako je peptidno cepivo, imenovano Rindopepimut® ali CDX-110, usmerjeno proti mutiranemu receptorju za epidermalni rastni dejavnik (EGFR), sestavljeno iz neoplazemskega epitopa mutiranega EGFR, vezanega na hemocianin iz morskih polžev, ki predstavlja epitop v številnih kopijah in ima vlogo spodbujajočega dejavnika monocitnih in granulocitnih imunskih celic.

Zadnjo skupino predstavljajo cepiva na osnovi nukleinskih kislin, ki nosijo zapis za enega ali več TAA s kodirajočim zapisom za imunomodulatorne molekule ali brez njega. Lahko



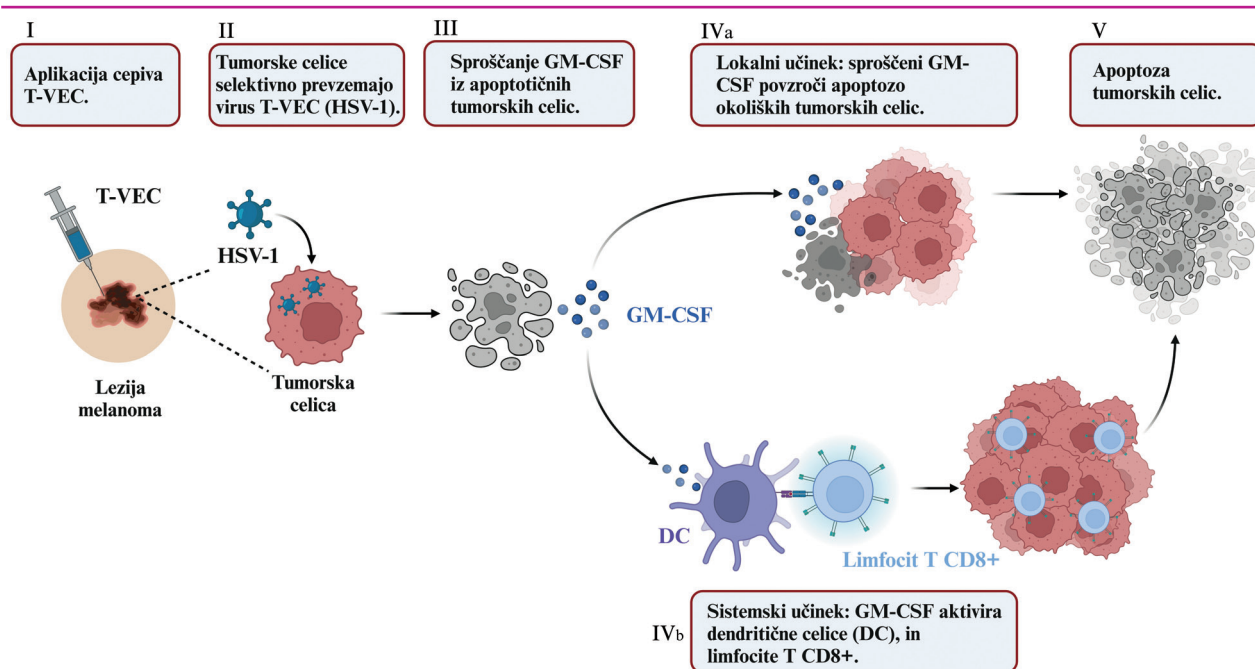
so v obliki deoksiribonukleinske kisline (DNA) ali v obliki informacijske mRNA (27). mRNA-cepiva so se izkazala za učinkovito alternativo cepivom na osnovi DNA, imunskih celic in peptidov. Njihove prednosti so, da ne izzovejo insercijske mutageneze, da lahko kodirajo več antigenov in da jih lahko pacienti bolje prenašajo, saj povzročajo manj neželenih učinkov. Ta cepiva imajo tudi prednost hitre, poceni in obsežne proizvodnje. Poleg tega imajo mRNA-cepiva sposobnost višje stopnje izražanja proteina kot DNA-cepiva. Zaradi vseh teh razlogov so mRNA-cepiva eden izmed najbolj obetavnih imunoterapevtskih pristopov (28).

Rak trebušne slinavke je eden izmed najbolj smrtonosnih rakov, saj petletno preživetje po diagnozi znaša 12 %. Ker so simptomi težko prepoznavni, diagnozo raka trebušne slinavke praviloma postavijo prepozno. V klinični raziskavi NCT04161755, v kateri sodelujejo bolniki z rakom slinavke, ki so primerni za operativno zdravljenje, preizkušajo učinke personaliziranega mRNA-cepiva, ki ga izražajo avtologne rakave celice, pridobljene po operativnem posegu. Najnovejši, vmesni rezultati te raziskave kažejo, da personalizirano mRNA-cepivo povzroči učinkovit in trajen imunski odziv. V prvi klinični fazi so 16 bolnikov, izbranih za sodelovanje, najprej zdravili operativno, nato pa so prejeli personalizirano mRNA-cepivo, ki je vsebovalo zapise za do 20 neoantigenov iz avtolognih rakavih celic, identificiranih z upo-

rabo sekvenciranja naslednje generacije. Pri 8 od 16 proučevanih bolnikov je cepivo povzročilo močan T-celični odziv in aktiviralo citotoksične limfocite T, ki prepoznajo celice raka trebušne slinavke in jih uničijo. Pri bolnikih, pri katerih cepivo ni povzročilo aktivacije limfocitov T, se je rak ponovil približno 13 mesecev po operaciji, medtem ko se pri bolnikih z močnim T-celičnim odzivom 18 mesecev po operaciji rak ni ponovil (29).

4 IZZIVI UPORABE CEPIV ZA ZDRAVLJENJE RAKA IN PRIHODNJE PERSPEKTIVE

Rakave celice se razvijejo iz telesu lastnih zdravih celic, njihovo preoblikovanje pa zajema spremembe izražanja antigenskih struktur ter spremembe v izražanju rastnih dejavnikov in tvorbi citokinov, ki pripomorejo, da se rakave celice izognejo nadzoru imunskih celic. Z aktivnim poseganjem v funkcije imunskih celic, kot sta regulacija tvorbe citokinov in polarizacija efektorskih celic v korist stimulacije imunске supresije, rakave celice zmanjšajo prepoznavnost tumorskih antigenov in pripeljejo do tolerance za imunске celice ter imunskega pobeга. Nekateri konven-



Slika 2. Način delovanja cepiva T-VEC (24). Ustvarjeno z BioRender.com.
Figure 2: T-Vec mode of action (24). Created with BioRender.com.

cionalni postopki zdravljenja raka lahko oslabijo človekov imunski sistem. Poleg tega je pri starejših ali pri pacientih, ki že imajo druge kronične bolezni, imunski sistem šibek in po prejemu cepiva ne morejo ustvariti močnega imunskega odziva (30). Vse to omejuje učinkovitost cepiv, zato je razvoj novih platform, ki bi dosegle visoko imunogenost, ključnega pomena.

Za boljši protitumorski imunski odziv je potrebno tudi upoštevanje posameznih variacij tumorskih antigenov. Odkritje neoantigenov, ki nastanejo zaradi mutacije tumorskih celic, je odprlo vrata prilagojenim ali individualiziranim terapevtskim cepivom proti raku. Razvoj teh cepiv sloni na uporabi sekvenciranja naslednje generacije za identifikacijo specifičnih mutacij pri bolnikih z rakom, kar omogoča prilagajanje terapevtskih posegov mutiranim proteinom in s tem močnejši in trajnejši protitumorski T-celični odziv (31).

Stadij bolezni, pri katerem cepiva najbolje delujejo, je še eno področje, ki ga je treba pojasniti. Trenutno so v prvi vrsti bolniki, ki bodo prejeli tumorsko cepivo, tisti, pri katerih konvencionalna terapija ni bila uspešna, vendar večje in bolj napredovane tumorje težko odstranimo le s cepljenjem. To je eden izmed razlogov, zakaj protitumorska cepiva kombiniramo z drugimi terapevtskimi pristopi. Tako je v kombinaciji z radioterapijo, ki poveča migracijo nevtrofilcev v tumorsko mikrookolje in posledično poveča koncentracijo reaktivnih kisikovih zvrsti in apoptozo tumorskih celic, moč doseči boljše učinkovitost celičnih tumorskih cepiv (32).

Kombinacija terapevtskih cepiv z zaviralci imunskih kontrolnih točk je tudi dala obetavne rezultate zaradi preprečevanja izčrpanosti limfocitov T, s čimer potenciramo protitumorski imunski odziv (33). Primer je kombinacija cepiva proti tumorju GVAX[®] z ipilimumabom, ki spodbudi močnejši imunski odziv pri adenokarcinomu trebušne slinavke (34). T-VEC trenutno preskušajo v zgodnjih kliničnih raziskavah v kombinaciji z zaviralcema imunskih kontrolnih točk ipilimumabom (35) in pembrolizumabom (36). Rezultati po za-

ključeni II. fazi klinične raziskave (NCT01740297) kažejo, da je bila stopnja odziva bistveno višja pri kombinaciji v primerjavi z ipilimumabom samim (35).

Učinkovitost različnih kombinacij peptidnih cepiv so ovrednotili v kliničnih raziskavah tretje faze, kjer so poročali le o omejenem uspehu (preglednica 2). Raziskavo učinkovitosti antigena Nelipepimut-S[®] (NP-S) pri preprečevanju raka dojke so predčasno prekinili, saj so odkrili v skupini bolnikov, ki so prejeli NP-S, 54,1-odstotno asimptomatsko širjenje raka v primerjavi z 29,2-odstotnim pri placebo skupini bolnikov (37). Prav tako neuspešna je bila raziskava kombinacije peptidnega cepiva gp100 in ipilimumaba, kjer niso zaznali statistično značilnih razlik v preživetju bolnikov z razširjenim melanomom, zdravljenih z gp100 in z ipilimumabom, v primerjavi z bolniki, zdravljenimi z ipilimumabom (38). Klinična raziskava učinkovitosti gp100 v kombinaciji z visokim odmerkom aktivacijskega interlevkina-2 (IL-2) pri bolnikih z razširjenim melanomom je pokazala, da je kombinacija pripeljala do boljšega kliničnega odziva in preživetja v primerjavi s samim IL-2 (39).

5 ZAKLJUČEK

Terapevtska cepiva proti raku ponujajo privlačno alternativo uporabi gensko spremenjenih celic T pri imunoterapiji raka zaradi njihove ekonomičnosti, specifičnosti in dolgotrajnega odziva zaradi stimulacije oblikovanja imunskega spomina. Na žalost so številni poskusi razvoja učinkovitih terapevtskih cepiv proti raku prinesli razočaranje. Natančna ocena dosedanjih neuspehov bo v kombinaciji z nenehnimi tehnološkimi izboljšavami vodila do identifikacije optimalnih tumorskih antigenov. Istočasno bo razvoj ustreznih strategij dostave, izbora adjuvansov in kombiniranih oblik

Preglednica 2. Seznam peptidnih cepiv proti raku na osnovi antigenov, povezanih s tumorjem.

Table 2: List of peptide cancer vaccines based on tumor-associated antigens.

Tip raka	Peptidno cepivo	Status	NCT številka	Vir
Rak dojke	Nelipepimut S	zaključena	NCT01479244	(37)
Melanoma	MDX-1379 (gp100)	zaključena	NCT00094653	(38)
	gp100	zaključena	NCT00019682	(39)
Multipli mielom	MAGE-A3/NY- ESO-1	zaključena	NCT00090493	N.V.
Rak požiralnika/rak želodca	G17DT	zaključena	NCT00020787	N.V.

N.V. rezultati niso na voljo

zdravljenja za preprečevanje imunosupresivnega tumorskega mikrookolja zagotovil želeno izboljšanje kliničnega izida bolnikov z rakom. V naslednjih letih bomo zagotovo priča vse bolj spodbudnim podatkom o cepivih proti raku in pomembnemu napredku pri uresničevanju njihovega potenciala za zdravljenje raka.

6 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat projekta J3-2516, financiranega s strani ARIS.

7 LITERATURA

- Barman S, Soni D, Brook B, Nanishi E, Dowling DJ. Precision Vaccine Development: Cues From Natural Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 2023 Aug 10];12. Available from: [/pmc/articles/PMC8866702/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35866702/)
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. T Cells and MHC Proteins [Internet]. Garland Science; 2002 [cited 2023 Aug 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26926/>
- Amon L, Hatscher L, Heger L, Dudziak D, Lehmann CHK. Harnessing the Complete Repertoire of Conventional Dendritic Cell Functions for Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Aug 10];12(7):1–83. Available from: [/pmc/articles/PMC7408110/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3408110/)
- Lee W, Suresh M. Vaccine adjuvants to engage the cross-presentation pathway. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Aug 10];13. Available from: [/pmc/articles/PMC9376467/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/376467/)
- Kamolratanakul S, Pitisuttithum P. Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Aug 11];9(12). Available from: [/pmc/articles/PMC8706722/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3706722/)
- Palmer T, Wallace L, Pollock KG, Cuschieri K, Robertson C, Kavanagh K, et al. Prevalence of cervical disease at age 20 after immunisation with bivalent HPV vaccine at age 12–13 in Scotland: retrospective population study. *BMJ* [Internet]. 2019 Apr 3 [cited 2023 Aug 13];365. Available from: <https://www.bmj.com/content/365/bmj.l1161>
- Meireles LC, Marinho RT, Van Damme P. Three decades of hepatitis B control with vaccination. *World J Hepatol* [Internet]. 2015 Aug 28 [cited 2023 Aug 11];7(18):2127–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26328023>
- Tsai HJ. Clinical cancer chemoprevention: From the hepatitis B virus (HBV) vaccine to the human papillomavirus (HPV) vaccine. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Aug 13];54(2):112–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25951712/>
- Lin HH, Wang LY, Hu CT, Huang SC, Huang LC, Lin SSS, et al. Decline of hepatitis B carrier rate in vaccinated and unvaccinated subjects: sixteen years after newborn vaccination program in Taiwan. *J Med Virol* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2023 Aug 14];69(4):471–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12601753/>
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* [Internet]. 1997 Jun 26 [cited 2023 Aug 14];336(26):1855–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9197213/>
- Buonaguro L, Tagliamonte M. Selecting Target Antigens for Cancer Vaccine Development. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Aug 11];8(4):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33080888/>
- Elsheikh R, Makram AM, Huy NT. Therapeutic Cancer Vaccines and Their Future Implications. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Aug 10];11(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36992245/>
- DeMaria PJ, Bilusic M. Cancer Vaccines. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019 Apr 1;33(2):199–214.
- Hege KM, Jooss K, Pardoll D. GM-CSF Gene-Modified Cancer Cell Immunotherapies: Of Mice and Men. <http://dx.doi.org/10.1080/08830180600992498> [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2023 Aug 10];25(5–6):321–52. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08830180600992498>
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Apr 4 [cited 2023 Jul 31];90(8):3539. Available from: [/pmc/articles/PMC46336/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1246336/)
- Higham EM, Shen CH, Wittrup KD, Chen J. Cutting Edge: Delay and Reversal of T Cell Tolerance by Intratumoral Injection of Antigen-Loaded Dendritic Cells in an Autochthonous Tumor Model. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jun 6 [cited 2023 Jul 31];184(11):5954. Available from: [/pmc/articles/PMC3061230/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/203061230/)
- Anassi E, Ndefo UA. Sipuleucel-T (Provenge) Injection: The First Immunotherapy Agent (Vaccine) For Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Pharmacy and Therapeutics* [Internet]. 2011 Apr [cited 2023 Jul 31];36(4):197. Available from: [/pmc/articles/PMC3086121/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2086121/)
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2010 Jul 29 [cited 2023 Jul 14];363(5):411–22. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1001294>
- Liu J, Fu M, Wang M, Wan D, Wei Y, Wei X. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *Journal of Hematology & Oncology* 2022 15:1 [Internet]. 2022 Mar 18 [cited 2023 Jul 14];15(1):1–26. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01247-x>
- Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Jul 14];6(1):140. Available from: <https://jitc.bmj.com/content/6/1/140>
- Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties.

- Gene Ther [Internet]. 2003 [cited 2023 Aug 14];10(4):292–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12595888/>
22. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2023 Aug 14];30(7):658–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22781695/>
 23. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 Jul 31];107(10):1373–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cas.13027>
 24. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F, Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Mar 2 [cited 2023 Aug 10];13(6):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35003308/>
 25. Franke V, Berger DMS, Klop WMC, van der Hiel B, van de Wiel BA, ter Meulen S, et al. High response rates for T-VEC in early metastatic melanoma (stage IIIB/C-IVM1a). *Int J Cancer* [Internet]. 2019 Aug 15 [cited 2023 Jul 31];145(4):974–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30694555/>
 26. Khong H, Overwijk WW. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2016 Sep 20 [cited 2023 Jul 14];4(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27660710/>
 27. Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Pappa A, Chlichlia K. DNA vaccines to attack cancer: Strategies for improving immunogenicity and efficacy. *Pharmacol Ther*. 2016 Sep 1;165:32–49.
 28. Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer* 2021 20:1 [Internet]. 2021 Feb 25 [cited 2023 Jul 14];20(1):1–23. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-021-0133-5>
 29. Rojas LA, Sethna Z, Soares KC, Olcese C, Pang N, Patterson E, et al. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature* 2023 618:7963 [Internet]. 2023 May 10 [cited 2023 Aug 16];618(7963):144–50. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06063-y>
 30. Granier C, Gey A, Roncelin S, Weiss L, Paillaud E, Tartour E. Immunotherapy in older patients with cancer. *Biomed J* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Aug 14];44(3):260–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33041248/>
 31. Blass E, Ott PA. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021 18:4 [Internet]. 2021 Jan 20 [cited 2023 Jul 14];18(4):215–29. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-020-00460-2>
 32. Takeshima T, Pop LM, Laine A, Iyengar P, Vitetta ES, Hannan R. Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Oct 4 [cited 2023 Jul 14];113(40):11300–5. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1613187113>
 33. Mougel A, Terme M, Tanchot C. Therapeutic cancer vaccine and combinations with antiangiogenic therapies and immune checkpoint blockade. *Front Immunol*. 2019 Mar 14;10(MAR):432525.
 34. Le DT, Lutz E, Uram JN, Sugar EA, Onners B, Solt S, et al. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J Immunother* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Jul 14];36(7):382–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23924790/>
 35. Chesney JA, Puzanov I, Collichio FA, Singh P, Milhem MM, Glaspy J, et al. Talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab versus ipilimumab alone for advanced melanoma: 5-year final analysis of a multicenter, randomized, open-label, phase II trial. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2023 May 4 [cited 2023 Aug 11];11(5):6270. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35003308/>
 36. Chesney JA, Ribas A, Long G V, Kirkwood JM, Dummer R, Puzanov I, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Global Phase III Trial of Talimogene Laherparepvec Combined with Pembrolizumab for Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2023 Jan 20;41(3):528–40.
 37. Mittendorf EA, Lu B, Melisko M, Hiller JP, Bondarenko I, Brunt AM, et al. Efficacy and Safety Analysis of Nelpipimut-S Vaccine to Prevent Breast Cancer Recurrence: A Randomized, Multicenter, Phase III Clinical Trial. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 10];25(14):4248–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31036542/>
 38. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2010 Aug 19 [cited 2023 Aug 10];363(8):711–23. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1003466>
 39. Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, et al. gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2011 Jun 2 [cited 2023 Aug 10];364(22):2119–27. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1012863>



UPORABA KOPROCESIRANIH POMOŽNIH SNOVI PRI IZDELAVI ORODISPERZIBILNIH TABLET

USE OF COPROCESSED EXCIPIENTS IN ORODISPERSIBLE TABLETS

AVTORICA / AUTHOR:

asist. Ana Baumgartner, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ana.baumgartner@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Ko govorimo o razvoju bolnikom prijaznih farmacevtskih oblik, pogosto mislimo na zdravila, namenjena otrokom in starostnikom, saj gre za bolj občutljive in ranljive populacije s posebnimi zahtevami glede odmerkov in aplikacij. V zadnjih dveh desetletjih je prišlo do več pobud za reševanje te

POVZETEK

V zadnjih letih dajemo v farmacevtskem razvoju vse več poudarka na razvoj bolnikom prijaznih farmacevtskih oblik. Mednje spadajo tudi orodisperzibilne tablete, ki v ustih razpadejo, še preden jih bolniki pogoltnejo. S tem lahko ključno prispevamo k sodelovanju bolnikov pri zdravljenju. Najbolj enostaven in stroškovno ugoden način izdelave orodisperzibilnih tablet je direktno stiskanje, za kar pa potrebujemo zmes prahov za tabletiranje z ustreznimi lastnostmi. Pri tem nam lahko pomaga uporaba koprocesiranih pomožnih snovi. V njih je združenih več posameznih pomožnih snovi, s čimer se njihove fizikalne lastnosti spremenijo na način, ki ga ni mogoče doseči s preprostim fizikalnim mešanjem, ter brez bistvenih kemijskih sprememb. Na trgu že obstaja več koprocesiranih pomožnih snovi, ki so posebej namenjene za izdelavo orodisperzibilnih tablet z direktnim stiskanjem. Poudariti pa je treba, da je cena koprocesiranih snovi še vedno višja kot pri enostavnih pomožnih snoveh ter da je pridobivanje dovoljenja za promet tovrstnega zdravila bolj zapleteno.

KLJUČNE BESEDE:

bolnikom prijazne farmacevtske oblike, direktno stiskanje, koprocesirane pomožne snovi, orodisperzibilne tablete

ABSTRACT

In the last years, there is a growing tendency for development of patient-friendly dosage forms. Among these, orodispersible tablets show great potential, as they disintegrate in the oral cavity before patients swallow them, which can improve patient compliance. The simplest and economically favourable approach for their production is direct compression. However, this requires the powder blend to have adequate properties, which can be achieved by implementing coprocessed excipients. These are a mixture of more excipients, in which physical properties of separate components are altered in a way that is not achievable by simple physical blending, and without any significant chemical changes. There are already a few coprocessed excipients on the market, intended for production of orodispersible tablets by direct compression. Nev-

ertheless, it has to be acknowledged that the price of coprocessed excipients is still higher than for one-component excipients and that their registration is more complicated from a regulatory perspective.

KEY WORDS:

coprocessed excipients, direct compression, orodispersible tablets, patient-friendly dosage forms

problematike predvsem za pediatrično populacijo in sprejeli so tudi nekaj regulatornih okvirjev oz. smernic glede kliničnih raziskav in razvoja primernih farmacevtskih oblik za otroke (1). Za starostnike je teh vodil sicer manj, a se na nivoju regulativnih organov, kot sta Mednarodna konferenca o usklajevanju (*International Conference on Harmonisation, ICH*) in Evropska agencija za zdravila (*European Medicines Agency, EMA*), vseeno vzpostavljajo skupine, ki se predvsem v zadnjem desetletju intenzivno ukvarjajo s potrebnimi geriatrične populacije (2).

Skupna težava tako otrok kot starejših je pogosto požiranje tablet, kar lahko negativno vpliva na sodelovanje pri zdravljenju. Zato je bilo razvitih več vrst trdnih farmacevtskih oblik, ki rešujejo to težavo. Farmacevtske oblike, kot so praški, zrnca, pelete in minitablete, v nasprotju z običajnimi tabletami zaradi manjše velikosti veliko lažje pogoltnemo, možno pa je tudi, da jih zaužijemo pomešane s hrano (3). Drug pristop reševanja omenjene težave pa so farmacevtske oblike, ki jih izdelamo trdne, zaužijemo pa jih kot tekočino, npr. disperzibilne tablete, šumeče tablete in orodisperzibilne tablete. Medtem ko za prve dvoje velja, da jih moramo še pred zaužitjem raztopiti ali dispergirati v predpisanem volumnu tekočine glede na navodila proizvajalca, orodisperzibilne tablete zaužijemo trdne, vendar razpadejo takoj ob stiku s slino oz. še preden jih pogoltnemo (1, 3, 4). Zaradi te lastnosti orodisperzibilne formulacije pogosto omenjajo kot optimalne za bolnike s težavami s požiranjem, njihova priljubljenost pa se kaže tudi v porastu zdravil v obliki orodisperzibilnih tablet v zadnjih letih (5).

2 DEFINICIJA ORODISPERZIBILNIH TABLET

Orodisperzibilne tablete so v Evropski farmakopeji opredeljene kot neobložene tablete, ki v ustih razpadejo hitro oz. preden jih bolniki pogoltnejo, njihov razpadni čas v vodi

pa naj ne bi presegal treh minut (6). Zahteve ameriške Agencije za zdravila FDA (Food and Drug Administration) so še nekoliko strožje, saj morajo izdelki, ki jih označujejo kot orodisperzibilne tablete, razpasti v manj kot 30 sekundah, tehtati pa morajo 500 mg ali manj (7). Kot smo že omenili, uporabo orodisperzibilnih tablet pogosto povezujejo z boljšim sodelovanjem pri zdravljenju predvsem otrok in starostnikov, zelo ugodne pa so tudi za zdravljenje bolnikov v psihiatrični obravnavi. Pomembna lastnost orodisperzibilnih formulacij je tudi prikrivanje okusa zdravilnih učinkovin ali pomožnih snovi, ki imajo neprijeten okus (8). Zdravila s tehnologijo orodisperzibilnih tablet so začeli razvijati v 80. letih prejšnjega stoletja. Vse od takrat interes in povpraševanje po njih raste. Prvo tako zdravilo, ki mu leta 1996 odobrila dovoljenje za promet FDA, je vsebovalo loratidin, izdelano pa je bilo s tehnologijo Zydis®. Gre za tehnologijo, ki jo je razvilo podjetje R. P. Scherer Corporation (danes spada pod Catalent Pharma Solution), temelji pa na tem, da zdravilno učinkovino z liofilizacijo vgradijo v želatinsko ogrodje, kar vodi v nastanek zelo hitro razpadnih tablet. Zdravilno učinkovino najprej raztopijo oz. dispergirajo v vodni raztopini želatine (v kasnejših izdelkih tudi manitola), nato pa to suspenzijo avtomatsko dozirajo v pretisni omot. Temu sledi zamrzovanje vode v komori s tekočim dušikom, pri čemer sta tako čas kot temperatura zamrzovanja natančno nadzorovana. Zamrznjen izdelek (tj. zamrznjeno suspenzijo v pretisnem omotu) nato naložijo v sušilnik, kjer poteka odstranitev vode s sublimacijo, pri čemer v pretisnem omotu nastanejo zelo porozne enote. Po sušenju pretisni omot zapečatijo s primerno krovno plastjo, npr. aluminijasto folijo. Izdelku z loratidinom je sledila še odobritev orodisperzibilnih tablet s klonazepamom in rizatriptanom, ki prav tako temeljita na opisani tehnologiji. V Evropski farmakopeji se je definicija orodisperzibilnih tablet prvič pojavila leta 2004 oz. v njeni peti izdaji (9–12).

Poudariti moramo, da uradno priznanih regulativnih zahtev za orodisperzibilne tablete in metod za njihovo karakterizacijo, na katere bi se lahko oprli pri njihovem razvoju, še vedno primanjkuje. V Evropski farmakopeji je omenjen le test razpadnosti v vodi, ki je sicer eden od ključnih parametrov za doseganje tarčnega profila kakovosti izdelka (*quality target product profile, QTPP*), težava pa je, da se čas razpada *in vivo*, v ustni votlini, pogosto ne ujema s časom razpada pri pogojih *in vitro*. Za vrednotenje okusa in enostavnosti požiranja sicer obstaja več metod (test sproščanja *in vitro*, elektronski jeziki, testi *in vivo* na prostovoljcih), vendar so smernice in zahteve glede izvedbe in želenih rezultatov zelo ohlapne (8, 13). Težava se lahko pojavi tudi pri doseganju ustrezne mehanske trdnosti orodisperzibilnih



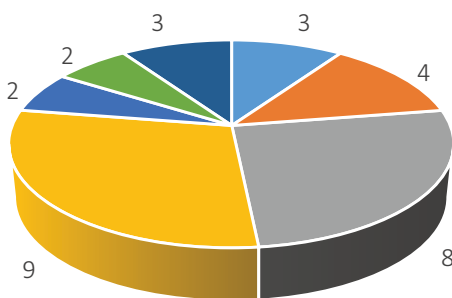
tablet, zaradi česar je pogosto potrebno previdno rokovanje z njimi. Izziv predstavlja tudi njihovo shranjevanje, saj orodisperzibilne tablete pogosto zelo hitro absorbirajo vlago, kar je treba upoštevati pri izbiri ovojnine, pri morebitnem deljenju odmerkov pa je treba zato neuporabljeni del zavreči (1, 14).

3 ORODISPERZIBILNE TABLETE NA SLOVENSKEM TRGU

Slika 1 predstavlja izdelke, ki so opredeljeni kot orodisperzibilne tablete in so na voljo na slovenskem trgu, pri čemer so nekateri izdelki na voljo tudi v več jakostih. Območje mas odmerkov sega od 0,5 mg (risperidon) do 500 mg (paracetamol), najbolj zastopan pa je interval med 5 in 20 mg (v tem območju so na voljo desloratidin, aripiprazol, bilastin, perindopril, escitalopram, donepezil, loratidin, mirtazepin, rivastigmin, olanzapin, rizatriptan in zolmitriptan). Veliko izdelkov spada med zdravila za zdravljenje psihiatričnih bolezni (psihoanaleptiki, psiholeptiki), kar ni presenetljivo, glede na to, da so orodisperzibilne tablete lahko zelo koristne z vidika sodelovanja bolnikov s psihičnimi motnjami. Več je tudi predstavnikov zdravil iz skupine antihistaminikov in analgetikov, pri katerih želimo čim hitrejši nastop učinka

in je zato smiselno doseči čim hitrejši razpad in sproščanje. Zastopanost ostalih terapevtskih skupin je precej manjša; v skupinah, kjer sta po dva izdelka, gre pri obeh za isto zdravilno učinkovino (v skupini zdravil z delovanjem na renin-angiotenzinski sistem (RAS) je to perindopril, v skupini zdravil za bolezni sečil pa sildenafil).

Slika 2 predstavlja najpogostejše pomožne snovi, ki se pojavljajo v orodisperzibilnih tabletah na slovenskem trgu. Ni presenetljivo, da največkrat v izdelkih zasledimo magnezijev stearat, ki ima funkcijo maziva oz. antiadheziva. Zelo pogosto se pojavlja mikrokristalna celuloza, ki je hkrati vezivo in razgrajevalo, ima pa tudi dobre lastnosti stiskanja. Prisotni so tudi sladkorni alkoholi, predvsem manitol, saj imajo v primerjavi z mikrokristalno celulozo prijeten okus. Glede na raziskavo avtorjev Al-khattawi in Mohammed (16) je od leta 1995 do 2010 naraščalo število objav, kjer so kot glavno sestavino orodisperzibilnih tablet uporabili sladkorne alkohole namesto mikrokristalne celuloze, kar prav tako kaže na razvoj formulacij, ki bi zagotavljale večje sodelovanje bolnikov. V mnogih formulacijah zasledimo uporabo superrazgrajeval (npr. krosprovidona, natrijeve kroskarmeloze, natrijevega karboksimetilškroba, preželatini-ziranega škroba itd.), kar ni presenetljivo glede na to, da želimo hiter razpadni čas. Omeniti velja tudi uporabo sestavin, ki prispevajo k izboljšanju okusa in prijetnemu občutku v ustih. V to kategorijo spadajo arome in sladila, npr. aspartam in sukraloza.



- Analgetiki
 - Psihoanaleptiki
 - Zdravila z delovanjem na RAS
 - Ostale terapevtske skupine
- Antihistaminiki za sistemsko uporabo
 - Psiholeptiki
 - Zdravila za bolezni sečil

Slika 1: Izdelki iz orodisperzibilnih tablet na slovenskem trgu (15).
 Figure 1: Orodispersible tablet products in Slovenian market (15).



Slika 2: Najpogostejše pomožne snovi v orodisperzibilnih tabletah na slovenskem trgu; velikost besede na sliki je sorazmerna s frekvenco pojavnosti v izdelkih. Rdeča – drsilo, mazivo, antiadheziv; zelena – polnilo; rumena – razgrajevalo; rožnata – pomožna snov za izboljševanje okusa; modra – drugo. Slika je bila generirana na spletni strani <https://www.wordclouds.com/>.

Figure 2: Most commonly used excipients in orodispersible tablets on Slovenian market; font size correlates with frequency of their occurrence in products. Red – glidant, lubricant, antiadhesive; green – functionalized excipient for ODT; yellow – disintegrant; pink – excipient for taste masking; blue – other. Figure was generated by <https://www.wordclouds.com/>.

4 METODE IZDELAVE ORODISPERZIBILNIH TABLET

Obstaja več načinov izdelave orodisperzibilnih tablet, od česar so pogosto odvisne tudi njihove končne lastnosti. V literaturi navajajo liofilizacijo, granuliranje s talinami, vlivanje (*moulding*), sušenje z razprševanjem, metodo *cotton candy*, direktno stiskanje itd. Med temi pristopi velja direktno stiskanje za najlažji in cenovno najugodnejši postopek (17, 18).

V nasprotju z ostalimi tehnologijami direktno stiskanje ne vključuje postopka predhodnega granuliranja temveč zgolj stiskanje suhe mešanice prahov. Vendar pa pogosto uporabo tega načina izdelave tablet preprečujejo slabe pretlačne lastnosti tabletirne zmesi, nagnjenost k segregaciji in slaba stisljivost zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi. Glede na to, da večina formulacij vsebuje večje količine pomožnih snovi kot zdravilnih učinkovin, imajo pomožne snovi pogosto ključno vlogo za doseganje ustreznih lastnosti tabletirne zmesi. Če želimo uporabiti postopek di-

rektnega stiskanja, moramo torej natančno premisliti, katere pomožne snovi bomo pri tem uporabili, pri čemer nam lahko koristi uporaba koprocisiranih pomožnih snovi (19, 20).

5 KOPROCESIRANE POMOŽNE SNOVI

Koprocisirane pomožne snovi so materiali s kombinacijo dveh ali več pomožnih snovi, ki so namenjene spreminjanju fizikalnih lastnosti teh pomožnih snovi na način, ki ga ni mogoče doseči s preprostim fizikalnim mešanjem, ter brez bistvenih kemijskih sprememb (21). Najpogosteje jih pripravljamo s postopkom sušenja z razprševanjem, mokrim granuliranjem in kokristalizacijo (19). Koprocisirane pomožne snovi načrtujemo v povezavi z njihovo funkcionalnostjo oz. namenom uporabe. Nekaj primerov tovrstnih koprocisiranih pomožnih snovi in njihovih prednosti v povezavi z direktnim stiskanjem predstavljamo v preglednici 1.

Preglednica 1: Primeri koprocesiranih pomožnih snovi na trgu (17, 20, 22–25).

Table 1: Examples of coprocessed excipients on the market (17, 20, 22–25).

Tržno ime	Sestavine	Tehnologija izdelave	Prednosti materiala za direktno stiskanje
F-Melt® Type C	manitol ksilitol MCC krospovidon fujicalin	sušenje z razprševanjem	izboljšana stisljivost in pretočne lastnosti
Prosolv®	koloidni SiO ₂ MCC	sušenje z razprševanjem	izboljšana stisljivost, manjša variabilnost mase polnitve, manjša občutljivost na vrsto in količino maziva
Cellactose®	α-laktoza celuloza	sušenje z razprševanjem	izboljšane pretočne lastnosti in dilucijski potencial, tj. sposobnost snovi, da jo lahko združimo z določeno količino zdravilne učinkovine in z zmesjo izdelamo tablete zadostne mehanske trdnosti
Ludipress®	α-laktoza monohidrat PVP premreženi polivinilpirolidin	podatek ni na voljo	izboljšane pretočne lastnosti, nizka higroskopnost, manjša občutljivost na hitrost tabletiranja
Pharmaburst® 500	manitol sorbitol premreženi polivinil pirolidin SiO ₂	podatek ni na voljo	izboljšan dilucijski potencial, izboljšana stisljivost
Ludiflash®	manitol premreženi polivinilpirolidon suspenzija polivinil acetata	podatek ni na voljo	nizka higroskopnost, izboljšana pretočnost, možnost visoke hitrosti tabletiranja brez vpliva na natezno trdnost
StarLac®	α-laktoza monohidrat koruzni škrob	sušenje z razprševanjem	izboljšane pretočne lastnosti, robusten proces tabletiranja in lastnosti tablet

Legenda: MCC – mikrokristalna celuloza; PVP – polivinil pirolidon

Leta 2017 je EMA objavila osnutek monografije za koprocesirane pomožne snovi (26). Poleg definicije tega termina monografija vključuje tudi mnogo zahtev: njihov postopek izdelave je treba natančno opisati, z ustreznimi analizami je treba zagotoviti, da med postopkom izdelave ni prišlo do tvorbe kovalentnih vezi ter da ne gre zgolj za preprosto

fizikalno zmes, zahtevani so tudi določeni dodatni testi (npr. topnost, izguba pri sušenju, nečistote in drugi relevantni testi) za boljše razumevanje lastnosti teh snovi. Takšne zahteve lahko bistveno otežijo pridobivanje dovoljenja za promet novih zdravil, če ta vsebujejo koprocesirane pomožne snovi, saj je treba nabrati več podatkov, s čimer

pridejo tudi dodatni stroški. Marsikatero farmacevtsko podjetje je zato zadržano pri uporabi teh snovi, saj predstavljajo večje tveganje v registracijskem postopku kot uporaba enostavnih pomožnih snovi. Vsekakor sta negativna vidika koprocесiranih pomožnih snovi tudi njihova visoka cena v primerjavi z enostavnimi pomožnimi snovmi ter dejstvo, da jih po navadi izdeluje le en proizvajalec (27).

Koprocесirane pomožne snovi pogosto načrtujemo z namenom izdelave orodisperzibilnih tablet z direktnim stiskanjem. V zadnjem času so proizvajalci razvili več tovrstnih pomožnih snovi, ki so dandanes komercialno dostopne in jih že uporabljajo v zdravilih na trgu (preglednica 2). Vidimo lahko tudi, katere od ostalih PS najpogosteje uporabljamo v teh formulacijah. Poleg drsil in antiadhezivov (magnezijev stearat, natrijev stearat fumarat, smukec) je pogosta uporaba različnih sladil in arom, kar ni presenetljivo, glede na to, da je cilj razvoja orodisperzibilnih tablet doseči tudi prijeten okus. Zasedimo tudi uporabo dodatnih razgrajeval in superrazgrajeval, ki še pospešijo razpad tovrstnih trdnih farmacevtskih oblik.

Sledi predstavitev nekaj izbranih primerov koprocесiranih pomožnih snovi v povezavi z raziskavami, kjer so bile uporabljene.

5.1 PHARMABURST® 500

Pharmaburst® 500 je bila prva koprocесirana pomožna snov na trgu, namenjena direktnemu stiskanju orodisperzibilnih tablet. Sestavljajo jo manitol (85 %) in sorbitol (< 10 %), ki sta pripravljena s sušenjem z razprševanjem, silicijev dioksid (< 10 %) ter krospovidon (premreženi polivinilpirolidin) (19). Glede na trditve proizvajalca naj bi tablete, narejene s to pomožno snovjo, razpadle v manj kot 30 sekundah, imele naj bi dober okus in ustrezno mehansko trdnost (23). Treba je sicer poudariti, da je to precej odvisno tudi od ostalih sestavin formulacije in dejavnikov v procesu, ki prav tako neposredno vplivajo na te lastnosti.

Glavna sestavina Pharmabursta®, torej manitol, je pogosta sestavina orodisperzibilnih tablet zaradi sladkega okusa, hitrega raztapljanja in nizke higroskopsnosti. Silicijev dioksid v formulaciji pripomore k boljšim pretočnim lastnostim, krospovidon zagotavlja še hitrejši razpad, sorbitol pa ima poleg vloge veziva tudi zelo dobro stisljivost (17, 18). Na trgu se nahaja že več kot 60 izdelkov, ki vsebujejo Pharmaburst® 500.

Močbel in sod. (31) so proučevali lastnosti orodisperzibilnih tablet z različnimi koprocесiranimi pomožnimi snovmi (Phar-

Preglednica 2: Primeri nekaterih orodisperzibilnih tablet s koprocесiranimi pomožnimi snovmi v zdravilih na trgu (28–30).

Table 2: Examples of orodispersable tablets containing coprocessed excipients in marketed products (28–30).

Ime zdravila	Proizvajalec	Zdravilna učinkovina in masa v eni enoti	Koprocесirana pomožna snov in masa v eni enoti	Ostale pomožne snovi in količina
Levitra ODT	Bayer	vardeafil, 10 mg	Pharmaburst® 500, 159,15 mg	magnezijev stearat, 4,5 mg aspartam, 1,8 mg aroma mete, 2,7 mg
Novo Humorap	Laboratorios Bago	escitalopram, 10 mg	Pharmaburst® 500, 366 mg	etilceluloza, 15 mg aspartam, 25 mg sukraloza, 4 mg krospovidon, 50 mg barvilo, 10 mg aroma vanilije, 10 mg natrijev stearat fumarate, 10 mg
Ilduc ODT	Baliarda	amlodipin, 5 mg	Ludiflash® 148,19 mg	krospovidon, 3,5 mg natrijeva karboksimetilceluloza, 3,5 mg sukraloza, 1,23 mg aroma mete, 0,35 mg natrijev stearat fumarate, 4,4 mg



maburst® 500, Starlac®, Pearlito® flash, Prosoolv® odt, F-melt®) in kloroksazonom v deležih 33, 50 in 67 %. Tablete s Pharmaburstom® so pri vseh deležih zdravilne učinkovine razpadle najhitreje, kar so avtorji pripisali veliki količini superrazgrajevala krosprovidona. Najhitrejše je bilo tudi sproščanje zdravilne učinkovine iz teh formulacij, zato so tisto z najnižjim deležem le-te testirali na prostovoljcih. Čas razpada *in vivo* je bil tudi ustrezen, poleg tega pa so bili prostovoljci zadovoljni z okusom in občutkom v ustih pri zaužitju orodisperzibilnih tablet. Avtorji so torej uspešno pripravili formulacijo s Pharmaburstom® 500 in relativno visokim deležem zdravilne učinkovine, ki bi lahko pripomogla k sodelovanju bolnikov.

Tudi Tayel in sod. (32) so pri pripravi in vrednotenju orodisperzibilnih tablet s sumatriptanom in različnimi koprocesiranimi pomožnimi snovmi ugotovili, da so formulacije s Pharmaburstom® najboljše z vidika hitrega omočenja, razpada in sproščanja. V najboljšo formulacijo s Pharmaburstom®, ki je imela delež zdravilne učinkovine 29 %, so nato dodali še različne mukoadhezivne polimere, da bi dobili podjezično mukoadhezivno orodisperzibilno tableto s podaljšanim časom zadrževanja na mestu absorpcije. Najboljše rezultate *in vitro* so dobili pri dodatku hidroksipropilmetil celuloze tipa K4M CR kot mukoadhezivnega polimera, zato so to formulacijo testirali tudi na prostovoljcih in jo primerjali z izdelkom, dostopnim na trgu. Niso sicer uspeli doseči bioekvivalence, so bili pa farmakokinetični parametri njihove formulacije (biološka uporabnost, maksimalna plazemska koncentracija) višji kot pri izdelku na trgu. Najverjetneje je bilo to posledica absorpcije zdravilne učinkovine v ustni votlini, zaradi česar ni prišlo dometabolizma prvega prehoda, ki sicer pri sumatriptanu poteče v precej velikem obsegu in omejuje njegovo biološko uporabnost (33). Vidimo torej, da je z orodisperzibilnimi tabletami možno doseči tudi način aplikacije, kjer se izognemo metabolizmu prvega prehoda, in hkrati dosežemo zelo hiter nastop učinka.

5.2 LUDIFLASH®

Ludiflash® sestavljajo manitol (90 %), krosprovidon (5 %) in polivinil acetat (5 %), ki ima vlogo veziva in tvorilca por. Zaradi visoke vsebnosti manitola ima zelo nizko higroskopnost, hkrati pa se ob stiku s slino zelo hitro v celoti omoči ne glede na silo stiskanja in trdnost tablete (18). Poleg tega proizvajalec navaja prijeten občutek v ustih in dober okus (24).

Lura in sod. (34) so v raziskavi primerjali Ludiflash® s funkcionaliziranim oz. procesiranim izomaltom pri izdelavi oro-

dispersibilnih minitabliet s hidroklorotiazidom (30-odstotni delež v formulaciji) oz. enalaprilom (16-odstotni delež v formulaciji). Medtem ko je formulacija z Ludiflashom® vsebovala zgolj še drsilo, so v formulacijah z aglomeriranim izomaltom (galenIQ™ 721), ki ima dobre lastnosti stiskanja in primerno pretočnost za direktno stiskanje, variirali tudi vrsto in količino superrazgrajevala. Pri večini lastnosti so se orodisperzibilne tablete z Ludiflashom® odrezale slabše; zmes je imela slabše pretočne lastnosti ter zato tudi manjšo enakomernost mase in vsebnosti ter večinoma daljše čase razpada in sproščanja zdravilne učinkovine. Treba se je torej zavedati, da formulacije s koprocesiranimi pomožnimi snovmi niso nujno boljše kot multikomponentne formulacije, saj imamo pri slednjih precej večjo fleksibilnost glede sestave in optimizacije.

5.3 STARLAC®

StarLac® je sestavljen iz α -laktoze monohidrata (85 %) in koruznega škroba (15 %), ki sta združena v koprocesirano pomožno snov s sušenjem z razprševanjem. Del laktoze je zaradi tega procesa v amorfnem stanju, kar še pospeši hitrost razpada te pomožne snovi. Slike z elektronskim mikroskopom kažejo zelo pravilne sferične delce, kar prispeva k zelo dobrim pretočnim lastnostim, po drugi strani pa je lahko tudi razlog za izzive pri doseganju homogenosti tabletirne zmesi in njeno morebitno razslojevanje. Poleg tega proizvajalec zagotavlja tudi neobčutljivost procesa tabletiranja in lastnosti tablet od vrste in količine drsila (25).

V nekaterih raziskavah so raziskovali tudi orodisperzibilnih tablet s StarLacom®, a so se te formulacije izkazale kot slabše v primerjavi z drugimi koprocesiranimi pomožnimi snovmi. Na slovenskem trgu najdemo izdelek, ki je kategoriziran kot orodisperzibilne tablete ter vsebuje StarLac® in zdravilno učinkovino perindopril (35).

6 SKLEP

Orodisperzibilne tablete so zagotovo ena izmed farmacevtskih oblik, ki imajo velik potencial pri doseganju večjega sodelovanja pri zdravljenju bolj občutljivih populacij, npr. otrok, starostnikov in psihiatričnih bolnikov. Čeprav na trgu najdemo kar nekaj tovrstnih izdelkov, menimo, da vsaj v Sloveniji še vedno ni dovolj zdravil z zdravilnimi učinkovinami, ki so bolj aktualne za potrebe otrok.

Trg se prilagaja razvoju orodisperzibilnih tablet tudi s snovanjem koprocesiranih pomožnih snovi, funkcionaliziranih specifično za izdelavo tovrstnih farmacevtskih oblik z direktnim stiskanjem, kar je z vidika industrijske izdelave zelo ugodno. Raziskave, ki proučujejo lastnosti formulacij s temi materiali, potrjujejo njihov potencial za izdelavo orodisperzibilnih tablet. V prihodnosti bi bilo smotno načrtovati raziskave, kjer bi pripravljali formulacije z večjim deležem zdravilnih učinkovin. Več pa bi se bilo smiselno ukvarjati tudi s prikrivanjem okusa in občutkom v ustih, saj sta to dejavnika, ki lahko ključno vplivata na sodelovanje bolnikov in s tem potek zdravljenja.

7 LITERATURA

- Walsh J, Ranmal SR, Ernest TB, Liu F. Patient acceptability, safety and access: A balancing act for selecting age-appropriate oral dosage forms for paediatric and geriatric populations. *Int J Pharm.* 2018 Feb 5;536(2):547–62.
- van Riet-Nales DA, Hussain N, Sundberg KAE, Eggenschwyler D, Ferris C, Robert JL, et al. Regulatory incentives to ensure better medicines for older people: From ICH E7 to the EMA reflection paper on quality aspects. *Int J Pharm.* 2016 Oct 30;512(2):343–51.
- van Riet-Nales DA, Schobben AFAM, Vromans H, Egberts TCG, Rademaker CMA. Safe and effective pharmacotherapy in infants and preschool children: importance of formulation aspects. *Arch Dis Child.* 2016 Jul;101(7):662–9.
- Dziemidowicz K, Lopez FL, Bowles BJ, Edwards AJ, Ernest TB, Orlu M, et al. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets-Part 2: Patient Acceptability. *AAPS PharmSciTech.* 2018 Aug;19(6):2646–57.
- Slavkova M, Breitzkreutz J. Orodispersible drug formulations for children and elderly. *Eur J Pharm Sci.* 2015 Jul 30;75:2–9.
- Council of Europe. *European Pharmacopoeia 10th Edition.* Strasbourg: Council of Europe; 2019.
- Chinwala M. Recent Formulation Advances and Therapeutic Usefulness of Orally Disintegrating Tablets (ODTs). *Pharmacy (Basel).* 2020 Oct 10;8(4).
- Hanning SM, Lopez FL, Wong ICK, Ernest TB, Tuleu C, Orlu Gul M. Patient centric formulations for paediatrics and geriatrics: Similarities and differences. *Int J Pharm.* 2016 Oct 30;512(2):355–9.
- Zydis [Internet]. [cited 2024 Feb 6]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Zydis>
- Orally disintegrating tablet [Internet]. [cited 2024 Feb 6]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Orally_disintegrating_tablet
- Briak W, Jachowicz R, Pelka P. The practical approach to the evaluation of methods used to determine the disintegration time of orally disintegrating tablets (ODTs). *Saudi Pharm J.* 2015 Sep;23(4):437–43.
- Seager H. Drug-delivery products and the Zydis fast-dissolving dosage form. *J Pharm Pharmacol.* 1998 Apr;50(4):375–82.
- Bastiaans DET, Immohr LI, Zeinstra GG, Strik-Albers R, Pein-Hackelbusch M, van der Flier M, et al. In vivo and in vitro palatability testing of a new paediatric formulation of valaciclovir. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 Dec;83(12):2789–97.
- Kakar S, Ram, Singh eep, Kumar S. ORODISPERSIBLE TABLETS: AN OVERVIEW. *International Journal of Recent Advances in Science and Technology [Internet].* 2018; Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:145886677>
- Centralna baza zdravil [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView)
- Al-khattawi A, Mohammed AR. Compressed orally disintegrating tablets: excipients evolution and formulation strategies. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013 May;10(5):651–63.
- Garg N, Dureja H, Kaushik D. Co-processed excipients: a patent review. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2013 Apr;7(1):73–83.
- Stoltenberg I, Breitzkreutz J. Orally disintegrating mini-tablets (ODMTs)—a novel solid oral dosage form for paediatric use. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Aug;78(3):462–9.
- Bowles BJ, Dziemidowicz K, Lopez FL, Orlu M, Tuleu C, Edwards AJ, et al. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets—Part 1: Manufacturability. *AAPS PharmSciTech.* 2018 Aug 1;19(6):2598–609.
- Saha S, Shahiwala AF. Multifunctional coprocessed excipients for improved tableting performance. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009 Feb;6(2):197–208.
- Council TIP. Co-processed Excipient Guide for Pharmaceutical Excipients [Internet]. [cited 2021 Mar 1]. Available from: https://www.gmp-navigator.com/files/guidemgr/20171030_Co-processed_Excipient_Guide/FINAL_FOR_PUBLICATION.pdf.
- F-Melt Type C: Technical Data Sheet [Internet]. [cited 2021 Feb 19]. Available from: https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/05/Technical-Data-Sheet_F-MELT-C_Pharma.pdf.
- SPI Pharma. Pharmaburst® 500 [Internet]. [cited 2022 Sep 21]. Available from: <https://www.spipharma.com/media/3307/pharmaburst-sell-sheet-final.pdf>
- BASF. Ludiflash®. 2019.
- Meggle. Technical brochure StarLac [Internet]. [cited 2021 Feb 22]. Available from: https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/03/MEGGLE_StarLac_brochure.pdf.
- Council of Europe. Co-processed excipients. *Pharmeuropa* 29.4; 2017.
- Cynthia A. Challenger. Development of Coprocessed Excipients. *Pharm Tech.* 2022;46(6):24–26,49.
- Levitra ODT [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/marzo_2012/Dispo_15_75-12.pdf
- Ketorolac Fabra SL [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/febrero_2017/Dispo_1_326-17.pdf.
- Ilduc ODT [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/Noviembre_2016/Dispo_12371-16.pdf
- Moqbel HA, ElMeshad AN, El-Nabarawi MA. Comparative study of different approaches for preparation of chlorzoxazone orodispersible tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 May;43(5):742–50.
- Tayel SA, El Nabarawi MA, Amin MM, AbouGhaly MHH. Comparative Study Between Different Ready-Made Orally



- Disintegrating Platforms for the Formulation of Sumatriptan Succinate Sublingual Tablets. AAPS PharmSciTech. 2017 Feb;18(2):410–23.*
33. Shivanand K, Raju S, Nizamuddin S, Jayakar B. *In vivo bioavailability studies of sumatriptan succinate buccal tablets. Daru. 2011;19(3):224–30.*
34. Lura A, Luhn O, Suarez Gonzales J, Breitzkreutz J. *New orodispersible mini-tablets for paediatric use - A comparison of isomalt with a mannitol based co-processed excipient. Int J Pharm. 2019 Dec 15;572:118804.*
35. *Bioprexanil: Povzetek glavnih značilnosti zdravila [Internet]. [cited 2021 Feb 22]. Available from: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7C3CA1010FB5F567C12579EC001FFDF/\\$File/s-021667.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7C3CA1010FB5F567C12579EC001FFDF/$File/s-021667.pdf).*

RAZVOJ DOSTAVNIH SYSTEMOV NA OSNOVI LIPOSOMOV Z VGRAJENO KAKOVOSTJO

DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL DELIVERY SYSTEMS BY QUALITY BY DESIGN APPROACH

AVTORJI / AUTHORS:

Nejc Klemenc, mag. farm.¹

doc. dr. Barbara Sterle Zorec, mag. farm.²

izr. prof. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.²

¹ Lek d. d., Razvojni Center Slovenija,
Farmacevtski razvoj,

Verovškova ulica 57, 1526 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: barbara.sterle.zorec@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Z naraščajočo intenzivnostjo raziskav in razvoja na področju liposomov kot dostavnih sistemov, ki se odraža v številnih s strani regulativnih organov odobrenih izdelkih, se nazorno kaže tudi široka uporabnost teh sistemov. Zaradi kompleksne narave liposomskih formulacij pa je zelo pomembno, da preiščeno pristopamo k razvoju tovrstnih farmacevtskih izdelkov. Kot močna strategija za obvladovanje te kompleksnosti se pojavlja pristop vgrajene kakovosti (QbD), ki poudarja, da sta za nadzor kakovosti ključna tako razumevanje formulacije, procesa in izdelka na osnovi znanstvenih dognanj kot sočasno učinkovito obvladovanje morebitnih tveganj. Za identifikacijo kritičnih dejavnikov in optimizacijo tako formulacij kot procesov je ključen sistematičen in načrtovan pristop k načrtovanju eksperimentov, ki vključuje vhodne spremenljivke (materiali, procesi, načrtovanje eksperimentov) in upošteva ključne attribute kakovosti liposomskih formulacij. Takšen pristop k razvoju nam omogoča, da kakovost vgradimo v izdelek, bolnikom pa nudimo kakovosten, varen in učinkovit napredni dostavni sistem.

KLJUČNE BESEDE:

kritične lastnosti vhodnih materialov, kritični atributi kakovosti, kritični procesni parametri, liposomi, vgrajena kakovost

ABSTRACT

With the increasing intensity of research and development in the field of liposomes as delivery systems, reflected in numerous regulatory approved products, the broad applicability of these systems is evident. However, due to the complex nature of liposomal formulations, it is crucial to approach the development of such pharmaceutical products thoughtfully. An effective strategy for managing this complexity is the quality by design (QbD) approach, which focuses on understanding the formulation, process and product based on scientific evidence, while effectively managing potential risks. To identify critical factors and optimize both formulations and processes, a systematic and planned approach to experimental design is crucial. This approach includes input variables (materials, processes, exper-



imental design) and considers the key quality characteristics of liposomal formulations. Such a development approach enables us to integrate quality into the product and provide patients with a high quality, safe and effective advanced drug delivery system.

KEY WORDS:

critical material attributes, critical process parameters, critical quality attributes, liposomes, quality by design

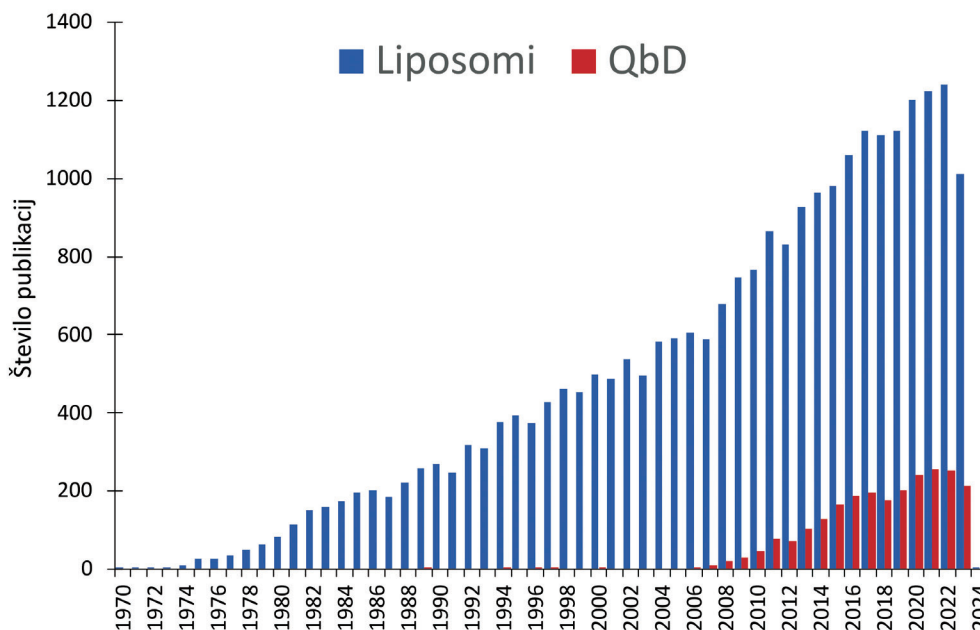
na osnovi liposomov, ki so namenjeni terapiji raka, glivičnih boleznih, protibolečinski terapiji idr. Zasedimo tudi liposomska protivirusna cepiva in pripravke za fotodinamično terapijo. Prvi liposomski dostavni sistem (Doxil[®], zdravilna učinkovina doksorubicin), ki je na trgu že od leta 1995 (2), je svoj prvi generični ekvivalent dobil šele februarja leta 2013 (Lipodox[®]), kar je bila ključna prelomnica za generično industrijo na področju liposomskih formulacij (3). Razvoj zdravil je v tem času zelo napredoval tudi zaradi vse bolj sistematične obravnave, ki vedno bolj podpira in upošteva vidik vgrajene kakovosti (*quality by design, QbD*). Kot je razvidno s slike 1, je tudi QbD v literaturnih virih vse bolj zastopan (4, 5).

1 UVOD

V skladu z večanjem intenzivnosti raziskav in razvoja na področju liposomov kot dostavnih sistemov že vse od prve objave leta 1964 kontinuirano narašča tudi število nanje vezanih publikacij (1), kar priča o njihovi široki uporabnosti (slika 1). Slednjo na področju farmacevtske tehnologije potrjujejo številni na trgu prisotni dostavni sistemi

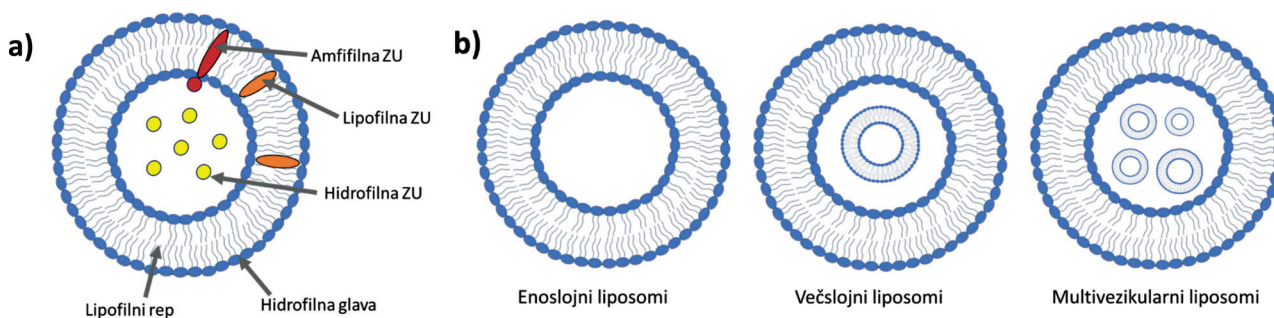
2 NAMEN UPORABE IN ZGRADBA LIPOSOMOV

Liposomi so sferični vezikli, sestavljeni iz enega ali več koncentričnih fosfolipidnih dvoslojev, ki v notranjosti zaobjemajo hidrofilno vsebino (6). Prvič sta jih opisala Bangham in Horne leta 1964 (6), in sicer predvsem v vlogi membranskih



Slika 1: Število objavljenih raziskav po letih, od leta 1970 do danes, s ključnima besedama »liposome« in »quality by design« v naslovu ali povzetku članka.

Figure 1: Number of studies published over the years, from 1970 to the present, with the key terms "liposomes" and "quality by design" in the title or abstract of the article.



Slika 2: a) Zgradba liposoma z vgrajenimi hidrofilnimi (v vodnem jedru liposoma), lipofilnimi (v lipidnem dvosloju) in amfilipilnimi zdravilnimi učinkovinami (v medfazi); b) prikaz enoslojnega, večslojnega in multivezikularnega liposoma.

Figure 2: a) Structure of liposomes with incorporated hydrophilic (in the aqueous core of the liposome), lipophilic (in the lipid bilayer) and amphiphilic molecules (in the interphase); b) representation of unilamellar, multilamellar and multivesicular liposomes.

modelov. Dandanes jih večinoma uporabljamo kot nosilce zdravilnih učinkovin ali kozmetično aktivnih sestavin, saj jim zgradba v obliki fosfolipidnega dvosloja omogoča vgrajevanje tako hidrofilnih kot tudi lipofilnih in amfilipilnih spojin (slika 2) (7).

Poleg tega lahko z vgradnjo v liposome povečamo topnost vgrajenih zdravilnih učinkovin (karvedilol, fenofibrat, indometacin, lovastatin ...) oz. preprečimo njihovo kemijsko ali biološko razgradnjo (8). Zmanjšamo lahko tudi njihovo toksičnost, kar vodi v zmanjšanje neželenih učinkov inkapsuliranih učinkovin (kot v primeru amfotericina B). Z ustreznim načrtovanjem lahko na površino liposomov pripravimo tudi specifične ligande (npr. protitelesa) in tako omogočimo ciljano dostavo in tam sproščanje vgrajenih učinkovin. Poleg farmacevtske industrije majhne lipidne vezikle uporabljajo tudi v prehrabeni in kozmetični industriji ter v diagnostične namene (7).

Liposomi so sestavljeni iz naravnih ali sintezno pridobljenih fosfolipidov, kot so fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin in fosfatidilglicerol, ki v vodnih raztopinah tvorijo enega ali več koncentričnih dvoslojev. Njihove polarne glave so orientirane k vodnemu mediju, nepolarne verige zae-strenih maščobnih kislin pa obrnjene druga proti drugi in sestavljajo notranjo strukturo dvosloja (slika 2). Poleg razvrščanja liposomov na osnovi njihove velikosti, ki se lahko giblje od nanometrskih do mikrometrskih velikosti (50 nm do 5 μ m), jih razvrščamo tudi glede na število dvoslojev. Ločimo med enoslojnimi (sestavljajo jih en lipidni dvosloj) in večslojnimi (več koncentričnih lipidnih dvoslojev) vezikli. Slednji so večji od 0,5 μ m, v primeru enoslojnih pa ločimo majhne in velike unilamelarne vezikle (*small/large unilamellar vesicles, SUV/LUV*) velikosti 20–100 nm oz. 100–500 nm (slika 2) (9). Poznamo tudi multivezikularne liposome, kjer

en zunanji dvosloj obdaja več manjših notranjih veziklov (10). Na interakcijo liposom-celica močno vpliva tudi narava in gostota naboja na površini veziklov, kar pa je odvisno od vrste fosfolipida.

Glede na funkcionalne lastnosti in namen uporabe pa liposome delimo še na konvencionalne, dolgo cirkulirajoče liposome, imunoliposome z modificirano površino za ciljano sproščanje vgrajenih učinkovin, kationske liposome za dostavo genske učinkovine in na pH odzivne liposome (7).

3 RAZVOJ Z VGRAJENO KAKOVOSTJO

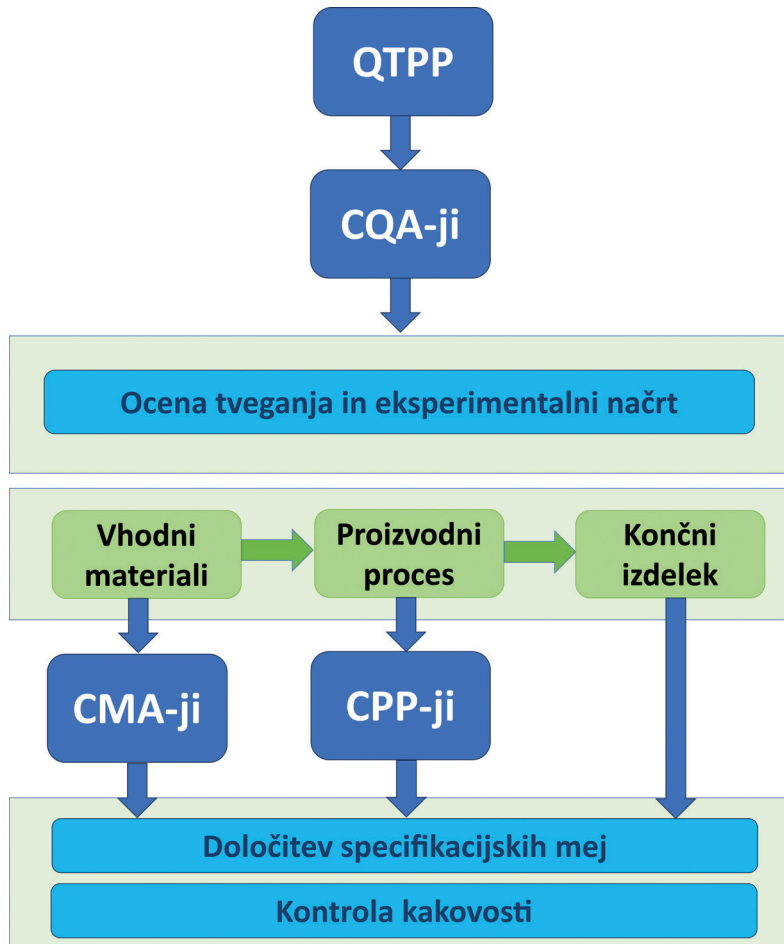
Vgrajena kakovost – QbD je sistematičen pristop k razvoju, ki temelji na vnaprej določenih ciljih, poudarja razumevanje izdelka in procesa ter omogoča nadzor kakovosti na podlagi znanosti in ustreznega upravljanja tveganj (11). Koncept QbD je leta 1992 razvil Joseph M. Juran, ki je verjel, da mora biti kakovost izdelka vanj »vgrajena«, saj večina kasnejših težav izhaja ravno iz neoptimalnega načina razvoja in priprave samega izdelka (12).

Ob sodelovanju FDA (*Food and Drug Administration*) in EMA (*European Medicines Agency*) so nastale smernice ICH za kakovost (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), ICH 8 in ICH 9, v katerih podajajo informacije o načinih implementiranja koncepta izdelka z vgrajeno kakovostjo v prakso (4, 5). Cilji takšnega pristopa pri razvoju izdelka so naslednji:

- določiti smiselne specifikacije, ki ustrezno opisujejo kakovost izdelkov – zdravil in zagotavljajo klinično učinkovitost;
- povečati zmogljivost procesa, zmanjšati variabilnost in pomanjkljivosti izdelka na podlagi razumevanja procesa oz. izdelka in ustrezne kontrole kakovosti;
- povečati učinkovitost razvoja in proizvodnje izdelkov;
- izboljšati analizo temeljnih vzrokov (*root cause analysis*) in upravljanje sprememb.

QbD v farmacevtski industriji služi kot orodje, ki omogoča razumevanje vplivov vhodnih materialov, procesnih parametrov in lastnosti izdelanega produkta na kakovost farmacevtskih izdelkov. Na tak način definiramo sestavo izdelka in razvijemo proces, ki omogoča izdelavo farmacevtskega izdelka z vnaprej določenimi atributi kakovosti (slika 3). Vidik QbD je sestavljen iz naslednjih elementov:

- določitev ciljnega profila kakovosti izdelka (*quality target product profile, QTPP*), v katerem za slednjega identificiramo tudi kritične attribute kakovosti (*critical quality attributes, CQA*);
- razvoj in razumevanje izdelka, vključno z identifikacijo kritičnih lastnosti vhodnih materialov (*critical material attributes, CMA*);
- razvoj in razumevanje procesa, vključno z identifikacijo kritičnih procesnih parametrov (*critical process parameters, CPP*) in razumevanjem »scale-up« principov s povezovanjem CMA-jev, CPP-jev s CQA-ji;
- kontrolna strategija, ki vključuje specifikacije za zdravilne učinkovine, pomožne snovi in končne izdelke kot tudi kontrolne parametre za vsak korak proizvodnje;
- spremljanje sposobnosti (tehnološkega) procesa in njegove nenehne izboljšave (11).



Slika 3: Načrt QbD ter ključni elementi QTPP in CQA-jev; povzeto po (13).

Figure 3: QbD plan and key elements of QTPP and CQAs; summarised from (13).

4 OPREDELITEV CILJNIH PROFILOV KAKOVOSTI IZDELKA IN IDENTIFIKACIJA KRITIČNIH ATRIBUTOV KAKOVOSTI LIPOSOMOV

QTPP v smernicah ICH definirajo kot povzetek vseh atributov kakovosti zdravila, ki morajo biti doseženi za zagotovitev njegovih varnosti in učinkovitosti. Izdelan je na podlagi predhodnega znanja o izbranem farmacevtskem izdelku in njegovem obnašanju *in vivo*. V QTPP-ju moramo navesti način aplikacije, farmacevtsko obliko, dostavni sistem, lastnosti, ki vplivajo na stabilnost in sterilnost, ter farmakokinetiko in profil sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine (11). V nadaljevanju predstavljamo primer QTPP-ja za parenteralno liposomsko formulacijo s ciljano dostavo.

Pripravljen je na podlagi smernic za liposomske izdelke, ki jih je leta 2018 izdala FDA (preglednica 1) (11).

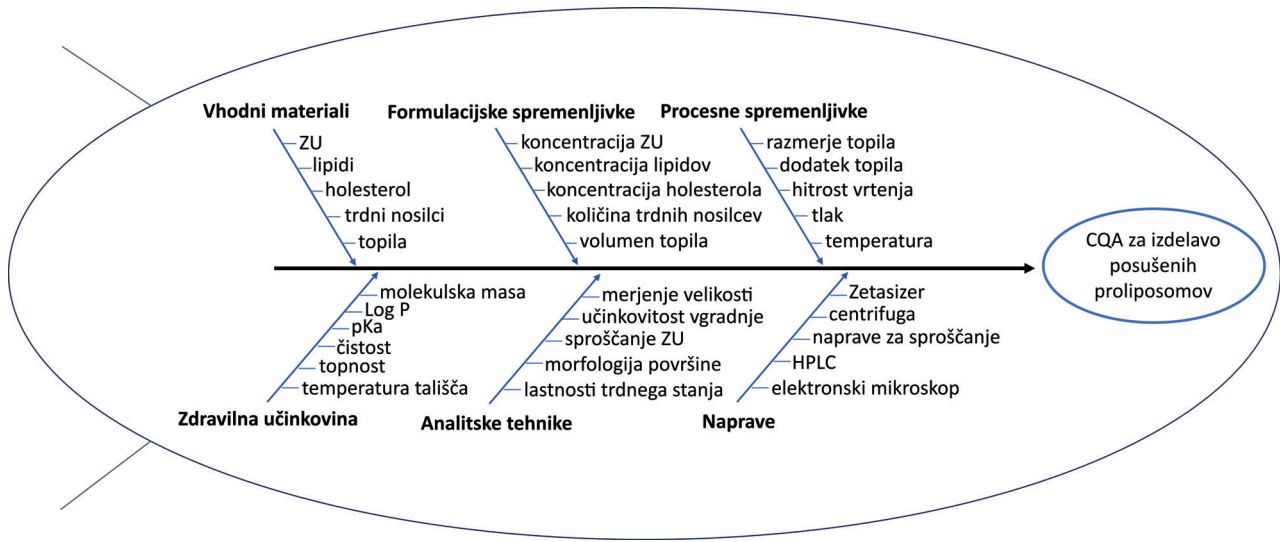
Naslednji korak pri uporabi pristopa QbD je definiranje CQA-jev izdelka, ki so v ICH Q8 definirani kot fizikalne, kemične, biološke ali mikrobiološke lastnosti, ki morajo biti znotraj definiranega razpona, vrednosti ali distribucije, da zagotavljajo ustrezno kakovost izdelka (4). Običajni CQA-ji liposomskih formulacij so povprečna velikost in porazdelitev velikosti liposomov ter zeta potencial (fizikalni CQA-ji), vsebnost zdravilne učinkovine (kemijski CQA), stabilnost *in vivo* in profil sproščanja zdravilne učinkovine (biološki CQA) ter sterilnost (mikrobiološki CQA). Na podlagi vzorčnih diagramov (diagrami Ishikawa) analiziramo, kateri dejavniki (lastnosti vhodnih materialov in učinkovin, procesni parametri itd.) bi lahko vplivali na izbrane CQA-je liposomov, in na osnovi tega izdelamo oceno tveganja (slika 4) (13, 15).

Preglednica 1: Primer QTPP-ja za liposomsko formulacijo, namenjeno parenteralni aplikaciji in ciljani dostavi.

Table 1: Example of a QTPP for a liposomal formulation for parenteral administration and targeted delivery.

Elementi QTPP		Cilj
Farmacevtska oblika Način sproščanja Način aplikacije Odmerek		nanoformulacija za injiciranje ciljno sproščanje parenteralna aplikacija, enkratna aplikacija x mg/mL oz. x mg/vialo
Atributi kakovosti liposomskega izdelka	biokompatibilnost mikrobiološka kakovost bakterijski endotoksini	brez hemolitske aktivnosti sterilen izdelek odsotni; apirogen izdelek
	fizikalne lastnosti (velikost in morfologija liposomov, lamelarnost, pH, površinske lastnosti, viskoznost, zeta potencial, osmolarnost, izgled) Identifikacija zdravilne učinkovine vsebnost (koncentracija, učinkovitost vgradnje in vsebnost) stabilnost <i>in vivo</i> sproščanje zdravilne učinkovine razpadni produkti/nečistote zaostanki topil	morajo ustrezati standardom specifikacije podobnega odobrenega izdelka oz. specifikaciji, postavljeni na podlagi raziskav
Ovojnina		ustrezna ovojnina, ki vzdržuje sterilnost in stabilnost izdelka med celotnim rokom uporabe
Stabilnost		rok uporabe: 24 mesecev pri sobni temperaturi





Slika 4: Analiza dejavnikov, ki bi lahko vplivali na kritične attribute kakovosti (CQA) liposomov, s pomočjo vzročnega diagrama Ishikawa; povzeto po (14).

Figure 4: Analysis of factors that could influence the critical quality attributes (CQA) of liposomes using an Ishikawa cause-effect diagram (adapted from (14)).

4.1 VELIKOST LIPOSOMOV

Povprečna velikost liposomov in porazdelitev velikosti liposomov sta glavna fizikalna CQA-ja liposomskih formulacij, saj zelo pomembno vplivata na porazdeljevanje *in vivo* ter sproščanje in sposobnost ciljane dostave zdravilnih učinkovin. Manjši liposomi (20–30 nm) se iz telesa izločijo skozi ledvice, medtem ko so večji (do 300 nm) privzeti v retikuloendotelijski sistem. Z zmanjšanjem velikosti liposomov pod 100 nm lahko bistveno zmanjšamo privzem v retikuloendotelijski sistem in omogočimo njihovo ciljano dostavo na planirano mesto delovanja (17). V primeru liposomov velikosti pod 200 nm je olajšana tudi priprava sterilnih formulacij, saj lahko poleg aseptične priprave izvedemo tudi membransko filtracijo (18). Tudi pri filtraciji manjših liposomov lahko mašenje filtrov predstavlja velik izziv. Velikost liposomov vpliva tudi na kinetiko sproščanja zdravilne učinkovine; z zmanjševanjem velikosti povečamo razmerje med površino in volumnom, kar pomeni, da je več molekul učinkovine bližje površini liposoma in se posledično hitreje sproščajo (19). Pomemben fizikalni parameter, povezan z velikostjo liposomov, je tudi polidisperzni indeks, ki definira homogenost porazdelitve velikosti liposomov; za liposomske formulacije so ustrezni polidisperzni indeksi manjši od 0,3 (idealno čim bližje vrednosti 0), ki nakazujejo na monodisperznost formulacije (19).

4.2 ZETA POTENCIAL

Zeta potencial je merilo za električni naboj na površini delcev in je zelo pomemben parameter za karakterizacijo stabilnosti liposomov. Delci z visokim negativnim ali pozitivnim zeta potencialom (več kot 30 mV) se medsebojno odbijajo, kar omogoča njihovo fizikalno stabilnost. Zmanjšanje zeta potenciala na nevtralno vrednost lahko vodi v agregacijo. Vrsta naboja takih sistemov vpliva na čas kroženja liposomov v telesu in na njihovo interakcijo s tkivi. Kationski liposomi imajo večjo afiniteto do negativno nabitih (rakavih) celičnih membran kot nevtralni ali negativni, kar se kaže tudi v njihovi večji selektivnosti in posledično učinkovitosti. Prav zaradi tega lahko z vgradnjo v kationske liposome izboljšamo varnost in učinkovitost zdravilnih učinkovin, ki se uporabljajo v terapiji rakavih bolezni (20, 21). Vendar tega ne moremo posplošiti na vse liposomske formulacije, saj so v nekaterih raziskavah poročali tudi o nasprotnih rezultatih (22).

4.3 VSEBNOST ZDRAVILNE UČINKOVINE

Vsebnost zdravilne učinkovine v liposomih podamo na tri različne načine, in sicer kot koncentracijo zdravilne učin-

kovine (mg/mL disperzije), kot učinkovitost vgradnje (entrapment/encapsulation efficiency), ki podaja (v %) količino v notranjost liposomov vgrajene učinkovine v primerjavi s celotno količino učinkovine, in vsebnost učinkovine (*drug loading*), ki večinoma opisuje maso učinkovine glede na celotno maso liposomov v formulaciji (16, 17).

4.4 STABILNOST *IN VIVO*

Stabilnost *in vivo* je še zlasti pomembna pri parenteralni aplikaciji liposomov s podaljšanim sproščanjem, pri čemer hidro- oz. lipofilnost njihove površine vpliva na obseg interakcij med liposomi in krvjo. Bolj kot so liposomi lipofilni, večja je verjetnost za njihovo fagocitozo, saj se v večjem obsegu vežejo na plazemske proteine (19). Z vezavo hidrofilnih polimerov na površino liposomov (npr. PEG) lahko povečamo njihovo hidrofilitnost in tako preprečimo njihovo hitro eliminacijo preko retikuloendotelijskega sistema (t. i. »*stealth*« liposomi) oz. podaljšamo čas zadrževanja liposomov v krvnem obtoku (t. i. dolgo cirkulirajoči liposomi) (24, 25).

4.5 SPROŠČANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Poleg stabilnosti je za doseganje zelene učinkovitosti liposomskih formulacij bistven tudi optimalen profil sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine. Naloga liposomov je, da učinkovino v ustreznem odmerku dostavijo na točno določeno mesto v organizmu ob zelenem času. Za ciljno dostavo liposomov je pri tem bistvena identifikacija interakcij s tarčnimi celicami. Ligandi, vezani na površino liposomov, morajo biti primerni, da se ustrezno vežejo na tarčne receptorje celic, kar vodi v endocitozo liposomov in posledično sproščanje učinkovine na tarčnem mestu. Za ciljno dostavo na površino liposomov priprimo ligande, kot so monoklonska protitelesa, fragmenti protiteles, peptidi, proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati, pa tudi nekatere male molekule (24).

5 IZDELAVA OCENE TVEGANJA ZA LIPOSOMSKE DOSTAVNE SISTEME IN VREDNOTENJE VPLIVOV NA RAZLIČNE CQA-JE

Lastnosti vhodnih materialov in izbrane procesne parametre, ki lahko vplivajo na CQA-je izdelka, identificiramo preko

izdelave ocene tveganja (*risk assessment*). To običajno naredimo s pomočjo načrtovanja eksperimentov (*design of experiments – DoE*), s čimer tudi ovrednotimo interakcije med različnimi dejavniki in jih kvantificiramo. Na podlagi pridobljenih podatkov nato izdelamo kontrolno strategijo, v kateri definiramo sprejemljiv razpon identificiranih kritičnih parametrov (npr. CMA, CPP) (11).

5.1 IZDELAVA OCENE TVEGANJA

Na začetku razvoja izdelka postavimo začetno oceno tveganja, kjer na podlagi trenutnega znanja ocenimo vplive različnih materialov in procesnih korakov na izbrane CQA. V preglednici 2 je prikazan primer začetne ocene tveganja za liposomsko formulacijo, ki vključuje zdravilno učinkovino, fosfolipide, holesterol in trdni nosilec. Primer je postavljen na procesu, pri katerem učinkovino in lipide raztopimo v mešanici organskih topil, nato pa primešamo vodotopen trdni nosilec. Nastalo mešanico posušimo z vakuumskim sušenjem, da dobimo proliposomski prašek. Prašek hidratiramo pred aplikacijo v vodnem mediju, pri čemer nastanejo liposomi (15).

Visoka in srednje velika tveganja med razvojem podrobneje raziskujemo, da ovrednotimo in razumemo njihov vpliv. Na podlagi novih eksperimentov in pridobljenega znanja o vplivu različnih dejavnikov na CQA-je tveganja med razvojem ustrezno zmanjšujemo, definiramo CMA-je, CPP-je in kontrolno strategijo.

5.2 VREDNOTENJE VPLIVOV NA VSEBNOST ZDRAVILNE UČINKOVINE

Vsebnost zdravilne učinkovine večinoma optimiziramo glede na doseženo učinkovitost vgradnje (EE), ki nam pove več o učinkovitosti in robustnosti procesa izdelave liposomov kot podatek o koncentraciji učinkovine v disperziji. Najpomembnejši parametri, ki vplivajo na učinkovitost vgradnje, so lastnosti učinkovine in lipidov ter molsko razmerje med lipidi in učinkovino, koncentracija holesterola, interakcije med vhodnimi materiali ter različni procesni parametri. Večja količina lipidov tako vodi v oblikovanje večjega števila liposomov z večjim notranjim volumnom in višjo učinkovitostjo vgradnje učinkovine (17). Večja količina holesterola pa povzroči nastanek t. i. žepkov v fosfolipidnem dvosloju, v katerega se lahko potem vgradijo tudi hidrofilne učinkovine (26). Slednje pa lahko vpliva na stabilnost lipidnega dvosloja in posledično tudi na njegovo permeabilnost.



Preglednica 2: Primer začetne ocene tveganja za izdelavo proliposomskega praška z lopinavirom; povzeto in priljubeno po (15).

Table 2: Example of an initial risk assessment for the preparation of proliposomal powder with lopinavir; adapted and summarized from (15).

Začetna ocena tveganja										
CQA	ZU	Fosfolipid	Holesterol	Trdni nosilec*	Topila	Priprava mešanice ZU:lipidi:trdni nosilec	Odpapevanje topil	Rehidracija praška	Pakiranje	
Vsebnost ZU	visoko	visoko	visoko	visoko	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	
Vsebnost (fosfo)lipidov	nizko	visoko	visoko	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	
Učinkovitost vgrajenje (EE)	visoko	visoko	visoko	visoko	visoko	srednje	srednje	srednje	srednje	
Velikost liposomov	srednje	srednje	srednje	visoko	srednje	srednje	nizko	visoko	srednje	
Morfologija	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	nizko	visoko	srednje	
Lamelarnost	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	srednje	nizko	visoko	srednje	
pH	srednje	visoko	visoko	srednje	nizko	nizko	nizko	nizko	nizko	
Zeta potencial	visoko	visoko	visoko	srednje	srednje	nizko	nizko	nizko	srednje	
Sproščanje	srednje	visoko	visoko	visoko	srednje	srednje	nizko	visoko	srednje	
Razpadni produkti	visoko	visoko	visoko	srednje	visoko	srednje	srednje	srednje	nizko	
Zaostanki topil	nizko	nizko	nizko	nizko	srednje	srednje	visoko	nizko	nizko	
Stabilnost in-vivo	visoko	visoko	visoko	srednje	visoko	srednje	nizko	visoko	srednje	
Vidni in s prostim očesom nevidni delci	srednje	srednje	srednje	srednje	nizko	srednje	nizko	srednje	srednje	

Legenda: ZU – zdravilna učinkovina, *npr. maltodekstrin, sorbitol, mikrokristalna celuloza, manitol.



Če povečamo količino učinkovine in zmanjšamo količino lipidov, se učinkovitost vgradnje zniža (27). Učinkovitost vgradnje zdravilne učinkovine, ki imajo od pH odvisno topnost, lahko povečamo tudi z dodatkom pufrov, ki imajo učinkovini prilagojeno vrednost pH (22). CPP-ji, ki vplivajo na učinkovitost vgradnje, so temperatura medija za hidratacijo in število ciklov zamrzovanja-odtajanja s tekočim dušikom, ki jim je bila izpostavljena hidratirana zmes; večje število ciklov in višja temperatura hidratacije sta negativno vplivala na vgradnjo učinkovine (28). Pri filmski metodi izdelave liposomov uporaba visokih temperatur (tj. nad temperaturo steklastega prehoda lipidov) prav tako negativno vpliva na učinkovitost vgradnje učinkovine (zaradi vpliva na prepustnost membrane liposomov), medtem ko hitrost vrtenja bučke vpliva na debelino in na hitrost hidratacije nastalega lipidnega filma (29).

5.3 VREDNOTENJE VPLIVOV NA VELIKOST LIPOSOMOV

V okviru optimizacije velikosti liposomov moramo ovrednotiti več različnih parametrov, kot so koncentracija fosfolipidov, količina zdravilne učinkovine, razmerje med fosfolipidi in holesterolom, pH vrednost pufrnih raztopin, procesna temperatura idr. Višja koncentracija lipidov ponavadi vodi v nastanek večjih liposomov z ožjo porazdelitvijo velikosti (30).

5.4 VREDNOTENJE VPLIVOV NA ZETA POTENCIAL

Na zeta potencial vplivajo predvsem formulacijske spremenljivke, kot so ionska moč in pH uporabljenega pufrja, naboj lipidov in sestava dvosloja ter procesni parametri, kot je čas soniciranja (v primeru homogenizacije disperzije z uporabo ultrazvoka). Za uravnavanje zeta potenciala imamo na voljo različne stabilizatorje, kot so stearilamin, diacetil fosfat in modificirani lipidi, pri čemer je za doseganje optimalne stabilnosti končnega izdelka njihovo koncentracijo potrebno prilagoditi posamezni formulaciji (31).

5.5 VREDNOTENJE VPLIVOV NA STABILNOST *IN VIVO* IN SPROŠČANJE

Povečano stabilnost *in vivo* lahko dosežemo z izbiro ustrezne sestave lipidnega dvosloja. Njegovo stabilnost lahko izboljšamo z dodatkom holesterola, kar zmanjša obseg

fagocitoze liposomov. Slednjo lahko tudi sterično oviramo; v tem primeru za izdelavo liposomov uporabimo določene pomožne snovi (npr. fosfatidil inozitol) ali pa liposome PEG-iliramo. Pri tem molekulska masa PEG predstavlja CMA (32). V raziskavi (33) navajajo, da so formulacije z rahlo negativno nabito površino izkazovale večji privzem v tumorske celice in manjši privzem v jetra, kar je podaljšalo zadrževanje v telesu. V primeru na pH občutljivih liposomov lahko sproščanje načrtujemo z izbiro (in koncentracijo) pomožnih snovi, ki destabilizirajo membrane liposomov pri določeni vrednosti pH (22).

6 OPREDELITEV KRITIČNIH LASTNOSTI MATERIALOV IN KRITIČNIH PROCESNIH PARAMETROV ZA LIPOSOMSKE DOSTAVNE SISTEME

6.1 KRITIČNE LASTNOSTI MATERIALOV

V okviru kritičnih lastnosti (vhodnih) materialov (CMA) vrednotimo vse sestavine formulacije; v primeru liposomskih izdelkov so to zdravilne učinkovine, lipidi in pufrne raztopine (11).

Fizikalno kemijske lastnosti posameznih učinkovin lahko pomembno vplivajo na kakovost izdelka. Glede na njeno hidro- oz. lipofilnost se lahko učinkovina vgradi ali v vodno jedro ali v lipidni dvosloj liposomov. Pri sočasnem vgrajevanju več različnih učinkovin je potrebno oceniti še njihov medsebojni vpliv na proces vgradnje. Pozorni moramo biti tudi na porazdelitveni koeficient; v eni izmed raziskav so dokazali, da učinkovina z zelo nizkim porazdelitvenim koeficientom (pod $-2,66$) izkazujejo podaljšano sproščanje iz liposomov, medtem ko so pri vrednostih slednjega med $-0,3$ in $1,7$ opazili hitro sproščanje učinkovine (32).

Na lastnosti liposomov pomembno vplivajo tudi fizikalno-kemijske lastnosti lipidov. Lipidi z večjo vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin so bolj dovzetni za oksidacijo in hidrolizo, medtem ko imajo lipidi z večjim deležem nasičenih maščobnih kislin višjo temperaturo faznega prehoda. Pomembna je tudi dolžina lipidnih verig; fosfolipidi s kratko-verižnimi maščobnimi kislinami tvorijo liposome s tanjšim dvoslojem in večjim notranjim volumnom, v katerega lahko vgradimo hidrofilne zdravilne učinkovine. Lastnosti lipidov vplivajo tudi na naboj in fluidnost fosfolipidnega dvosloja in

posledično na permeabilnost snovi skozi liposomsko membrano (15).

V času razvoja je potrebno ustrezno ovrednotiti tudi sestavine, s katerimi modificiramo površinske lastnosti liposomov, saj lahko vplivajo na sproščanje vgrajene učinkovine. V primeru hitosana je znano, da njegove topnost, koncentracija in molekulska masa vplivajo na velikost izdelanih liposomov. Še bolj izrazit vpliv je značilen za PEG, katerega molekulska masa in gostota na površino liposoma pripetih verig vplivata tako na velikost izdelanih liposomov kot tudi na njihovo kasnejšo porazdelitev v telesu. Pomembni pa niso le materiali, ki jih uporabljamo pri izdelavi liposomov, temveč tudi njihovo masno razmerje. V različnih raziskavah zasledimo, da na lastnosti liposomov pomembno vplivajo tako razmerje med holesterolom in fosfolipidi kot med zdravilno učinkovino in lipidi, razmerje med organsko in vodno fazo ter sestava organske faze (npr. razmerje med kloroformom in metanolom) (34).

6.2 KRITIČNI PROCESNI PARAMETRI

Za pripravo liposomov uporabljamo različne metode, kot so metoda tankih filmov, metoda z injiciranjem, metode na osnovi visokih tlakov in metoda odparevanja organske faze. Najpogosteje uporabljamo prvo, ki vključuje hidratacijo tankega lipidnega filma. Kritični procesni parametri (CPP), ki vplivajo na učinkovitost vgrajevanja zdravilne učinkovine pri tej metodi, so temperatura in hitrost vrtenja bučke v fazi izhlapevanja topila ter faza hidratacije. Ker po hidrataciji nastanejo veliki multilamelarni liposomi, je za pripravo enoslojnih liposomov disperzijo potrebno še homogenizirati, da zmanjšamo in poenotimo velikost liposomov. V ta na-

men lahko uporabimo metodo ekstruzije skozi polimerno membrano, pri kateri so kot CPP-ji identificirani velikost membranskih por, število prehodov skozi membrano, temperatura in tlak filtracije. V industrijskem merilu sta bolj uporabni ultrazvočna homogenizacija (pri kateri sta kot CPP identificirana kritična amplituda in čas soniciranja) in metoda (ponavljajočega) zamrzovanja in odtajevanja s številom ciklov kot glavnim CPP (35).

7 KONTROLNA STRATEGIJA

Za zagotavljanje ponovljive kakovosti zdravila, je potrebno postaviti ustrezno kontrolno strategijo, s katero nadzorujemo vhodne materiale, procesne parametre, vmesne produkte, ovojnino in končni izdelek (11). Smernice ICH kontrolno strategijo definirajo kot načrtovan niz kontrol, ki izhajajo iz trenutnega znanja o izdelku in procesa ter zagotavljajo učinkovitost procesa in kakovosten izdelek (5). Kontrolna strategija lahko vključuje parametre in lastnosti tako zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi, opreme, proizvodnih pogojev kot tudi medprocesne kontrole, specifikacije končnega produkta ipd. V preglednici 3 predstavljamo primer kontrolne strategije za izdelavo proliposomskega praška z lopinavirom (15). Poleg spremljanja in preverjanja sposobnosti procesa pa je potrebno zagotavljati tudi njegove nenehne izboljšave. Le tako lahko sočasno s proizvodnjo učinkovitega, varnega in kakovostnega farmacevtskega izdelka sledimo tudi željam in trendom trga.

Preglednica 3: Primer kontrolne strategije za izdelavo proliposomskega praška z lopinavirom; prirejeno po (15).

Table 3: Example of control strategy for the preparation of proliposomal lopinavir powder; adapted from (15).

Faktor	Zahteva	Način kontrole
Tip lipida	fosfolipid s steklastim preходом pri 54 °C	analiza ob sproščanju materiala
Povprečni premer delcev Pearlitola® d50	< 160 µm	analiza ob sproščanju materiala
Razmerje lipid : zdravilna učinkovina	10 : 1	definirano v postopku
Razmerje kloroform : metanol	60 : 40	definirano v postopku
Temperatura rotirajoče bučke	54 ± 2 °C	definirano v postopku
Hitrost vrtenja bučke	100 ± 5 rpm	definirano v postopku

8 SKLEP

Liposomski izdelki veljajo za dokaj kompleksne sisteme, zato je za uspešen razvoj takšnih farmacevtskih izdelkov zelo pomembna izbira ustreznega razvojnega pristopa. Za najbolj sistematičnega velja pristop QbD, ki ga priznavajo tudi regulativne agencije, kot sta FDA in EMA. Takšen pristop poudarja, da je formulacijo, proces in izdelek potrebno razumeti na podlagi znanstvenih dognanj in istočasno ustrezno upravljati z morebitnimi tveganji. Pri liposomskih formulacijah kot kritične lastnosti kakovosti največkrat spremljamo velikost liposomov, zeta potencial, vsebnost zdravilne učinkovine, stabilnost *in vivo* in sproščanje. Da zagotovimo ustrezno kakovost končnega liposomskega produkta, je na podlagi razumevanja tako izdelka kot procesa potrebno definirati in nadzorovati tudi CMA-je in CPP-je. Le z ustreznim načrtovanjem razvoja dostavnih sistemov na osnovi liposomov lahko namreč kakovost vgradimo v izdelek, bolnikom pa nudimo kakovostno, varno in učinkovito zdravilo.

9 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat projekta P1-0189, financiranega s strani ARIS.

10 LITERATURA

1. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*. 1964 Jan 1;8(5):660-670.
2. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017 Mar 27;9(2):12.
3. Gaspari S, Milani B. Access to liposomal generic formulations: beyond AmBisome and Doxil/Caelyx - *GaBI Journal*. *GaBI Journal*. 2013 Apr 30;2(2):60-2.
4. EMA. European Medicines Agency. 2018 [cited 2023 Nov 27]. Quality: Quality by Design (QbD). Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/quality/quality-quality-design-qbd>
5. U.S. Food and drug administration. Q8(R2) Pharmaceutical Development [Internet]. FDA; 2020 [cited 2023 Nov 27]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q8r2-pharmaceutical-development>
6. Agarwal K. Liposome Assisted Drug Delivery: An Updated Review. *Indian J Pharm Sci*. 2022 Aug;84(4):797-811.
7. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev*. 2015 Oct 14;115(19):10938-66.
8. Lee MK. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics*. 2020 Mar 13;12(3):264.
9. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006 Sep;1(3):297-315.
10. Lu B, Ma Q, Zhang J, Liu R, Yue Z, Xu C, et al. Preparation and characterization of bupivacaine multivesicular liposome: A QbD study about the effects of formulation and process on critical quality attributes. *Int J Pharm*. 2021 Apr 1;598:120335.
11. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J*. 2014 May 23;16(4):771-83.
12. Juran JM. *Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality Into Goods and Services*. Simon and Schuster; 1992. 552 p.
13. Alshaer W, Nsairat H, Lafi Z, Hourani OM, Al-Kadash A, Esawi E, et al. Quality by Design Approach in Liposomal Formulations: Robust Product Development. *Molecules*. 2022 Dec 20;28(1):10.
14. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. ICH Q8(R2) Pharmaceutical Development. Workshop: Quality by Design in pharmaceutical. 2009;8(November):28.
15. Patel GM, Shelat PK, Lalwani AN. QbD based development of proliposome of lopinavir for improved oral bioavailability. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Oct 15;108:50-61.
16. Zhou Y, Gong XJ, Yang JB. Introduction to the guidance for industry on liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation issued by FDA. *Chinese Journal of New Drugs*. 2018 Aug 30;27:1835-40.
17. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. *Int J Pharm*. 2012 Feb 28;423(2):543-53.
18. Gabizon A. Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research [Internet]*. 2001 Feb 1 [cited 2023 Nov 27]; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Stealth-liposomes-and-tumor-targeting%3A-one-step-in-Gabizon/296936015e52248679aa92efc0f7a74d1e8e11f4>
19. Panigrahi D, Sahu PK, Swain S, Verma RK. Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles. *SN Appl Sci*. 2021 May 17;3(6):638.
20. He K, Tang M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. *Chem Biol Interact*. 2018 Nov 1;295:13-9.
21. Shekholeslami B, Lam NW, Dua K, Haghi M. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their *in vivo* fate. *Life Sci*. 2022 Jul 1;300:120574.



22. Rehman AU, Omran Z, Anton H, Mély Y, Akram S, Vandamme TF, et al. Development of doxorubicin hydrochloride loaded pH-sensitive liposomes: Investigation on the impact of chemical nature of lipids and liposome composition on pH-sensitivity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018 Dec 1;133:331–8.
23. Li M, Du C, Guo N, Teng Y, Meng X, Sun H, et al. Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem*. 2019 Feb 15;164:640–53.
24. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Feb;66:2–25.
25. Taher M, Susanti D, Haris MS, Rushdan AA, Widodo RT, Syukri Y, et al. PEGylated liposomes enhance the effect of cytotoxic drug: A review. *Heliyon*. 2023 Mar 1;9(3):e13823.
26. Xu X, Costa AP, Khan MA, Burgess DJ. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *Int J Pharm*. 2012 Sep 15;434(1–2):349–59.
27. Porfire A, Tomuta I, Muntean D, Luca L, Licarete E, Alupeu MC, et al. Optimizing long-circulating liposomes for delivery of simvastatin to C26 colon carcinoma cells. *J Liposome Res*. 2015;25(4):261–9.
28. Toyota H, Asai T, Oku N. Process optimization by use of design of experiments: Application for liposomalization of FK506. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017 May 1;102:196–202.
29. Sylvester B, Porfire A, Muntean D, Vlase L, Tomuta I. Formulation optimization of pravastatin loaded long-circulating liposomes using a design of experiments. *FARMACIA*. 2016;Vol. 64(3):449–58.
30. Tefas LR, Sylvester B, Tomuta I, Sesarman A, Licarete E, Banciu M, et al. Development of antiproliferative long-circulating liposomes co-encapsulating doxorubicin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1605–21.
31. Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Sep;409(24):5779–87.
32. Abu Lila AS, Ishida T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(1):1–10.
33. Aghahari V, Aghahari V. Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities. *Drug Discov Today*. 2018 May;23(5):974–91.
34. Porfire A, Achim M, Barbalata C, Rus I, Tomuta I, Cristea C. Pharmaceutical Development of Liposomes Using the QbD Approach. Catala A, editor. 2019 Sep 4 [cited 2023 Dec 4]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/liposomes-advances-and-perspectives/pharmaceutical-development-of-liposomes-using-the-qbd-approach>
35. Simões A, Veiga F, Figueiras A, Vitorino C. A practical framework for implementing Quality by Design to the development of topical drug products: Nanosystem-based dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018 Sep 5;548(1):385–99.

POMEN NEVROTROFIČNIH DEJAVNIKOV PRI NEURODEGENERATIVNIH BOLEZNIH

THE IMPORTANCE OF NEUROTROPHIC FACTORS IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Selena Horvat, mag. farm.
izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: anja.pislar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Funkcija živčnega sistema je odvisna od visokospecifičnih stikov, ki se tvorijo med nevroni med njihovim razvojem. Iz nevitov se razvijejo posamezni aksoni in multipli dendriti, ki so potrebni za tvorbo stikov, pri čemer pa je za pravilno razporeditev v centralnem živčevju odgovorna nevroglia

POVZETEK

Proteini z nevrotrofično aktivnostjo, t. i. nevrotrofični dejavniki, omogočajo preživetje, diferenciacijo, regeneracijo in vzdrževanje nevronov v centralnem živčnem sistemu. Zaradi svojega delovanja so pomembni pri neurodegenerativnih boleznih, saj zaščitijo poškodovane nevrone pred propadom in spodbujajo njihovo regeneracijo. Posnemanje delovanja nevrotrofičnih dejavnikov in molekul, ki izkazujejo nevrotrofično aktivnost, tako predstavlja možnosti za razvoj novih terapevtskih pristopov za zdravljenje neurodegenerativnih bolezni.

KLJUČNE BESEDE:

nevrotrofični dejavniki, nevrotrofini, neurodegeneracija, neurodegenerativne bolezni, trofična podpora

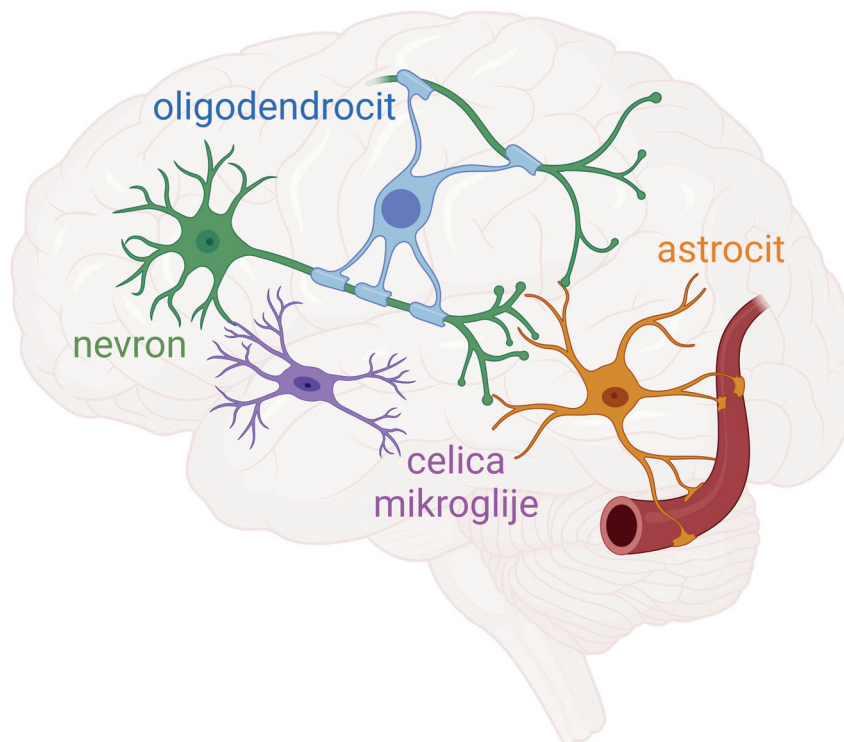
ABSTRACT

Proteins exerting neurotrophic activity, so-called neurotrophic factors, promote cell survival, differentiation, regeneration and maintenance of neurons in the central nervous system. Because of their action, they are important in neurodegenerative diseases, as they protect neurons from neuronal damage and promote their regeneration. Mimicking the mode of action of neurotrophic factors and molecules that exert neurotrophic activity thus presents opportunities for the development of new therapeutic approaches for the treatment of neurodegenerative diseases.

KEY WORDS:

neurodegeneration, neurodegenerative diseases, neurotrophic factors, neurotrophins, trophic support

(slika 1). Slednje predstavljajo samostojne celice; astrociti, oligodendrociti in celice mikroglije. Astrociti vzdržujejo homeostazo, prenos hranil, vode in kisika do nevronov ter zagotavljajo nevrotrofično podporo, medtem ko je glavna naloga oligodendrocitov tvorba mielinske ovojnice in s tem izboljšanje prevajanja električnih impulzov po nevronih. Celice mikroglije delujejo kot specializirani makrofagi, katerih naloga je zagotavljanje imunskega nadzora v centralnem živčnem sistemu (1). Slednjim poleg pasivne podporne vloge pripisujejo dve nasprotujoči si delovanji: nevrotoksično delovanje, ki vključuje sproščanje vnetnih citokinov in radikalov, ter nevroprotektivno delovanje, ki



Slika 1: Celice in njihove povezave v centralnem živčnem sistemu. Poleg nevronov se v centralnem živčnem sistemu nahajajo tudi celice glije, ki se delijo na astrocite, oligodendrocite in mikroglijo ter skupaj delujejo kot podporne celice nevronom. Ustvarjeno z BioRender.com.

Figure 1: Cells and their connections in the central nervous system. Besides neurons, the central nervous system comprises glial cells, divided into astrocytes, oligodendrocytes, and microglia, which collectively serve as supporting cells for neurons. Created with BioRender.com.

temelji na izločanju antioksidantov in nevrotrofičnih dejavnikov (2, 3).

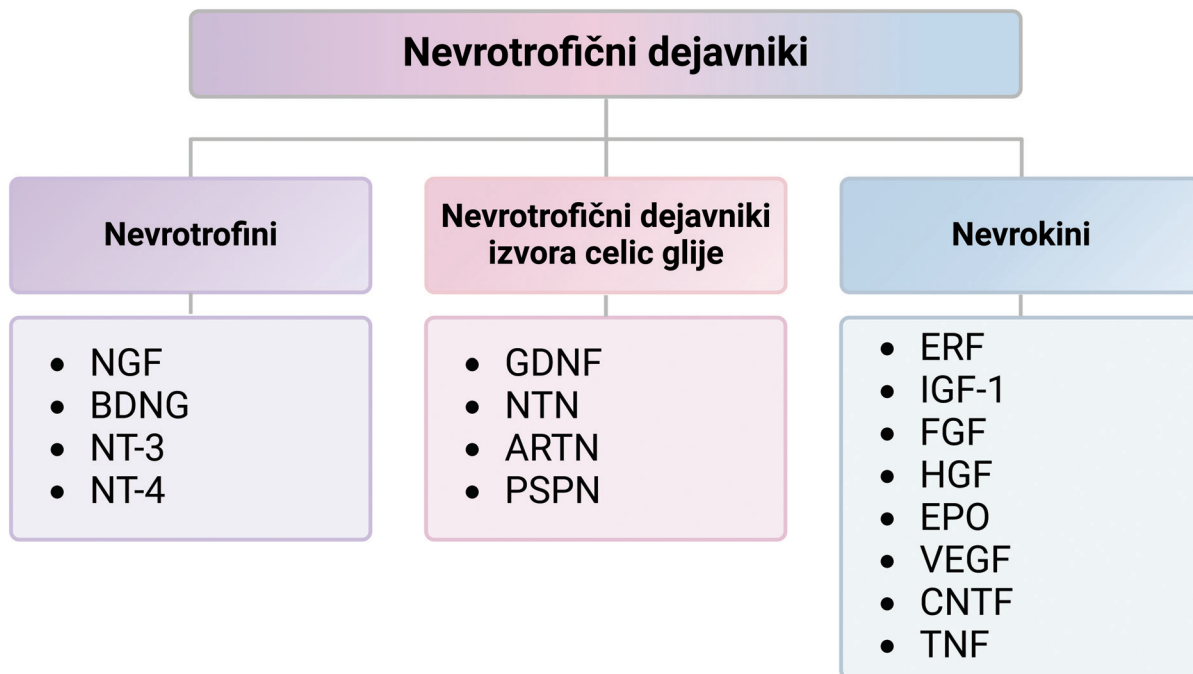
Za razvoj nevronov so ključnega pomena prav nevrotrofični dejavniki. Ti s svojim delovanjem, nudenjem trofične podpore, omogočajo preživetje, proliferacijo, diferenciacijo, regeneracijo ter vzdrževanje nevronov in njihovih povezav. Med razvojem nastaja prekomerno število nevronov, zato so slednji primorani tekmovati za omejene količine nevrotrofičnih dejavnikov. Nevroni, ki dobijo zadostno količino nevrotrofičnih dejavnikov, preživijo, drugi pa v procesu programirane celične smrti umrejo (4). Na ta način se uravnava število nevronov in nevronske povezave v razvijajočem se centralnem živčnem sistemu (5).

Nevrotrofični dejavniki s svojim delovanjem spodbujajo izražanje genov, ki so ključni za preživetje, hkrati pa z zaviranjem »samomorilskih genov«, ki lahko spodbudijo apoptozo, delujejo zaščitno in preprečijo smrt nevronske celice (6, 7). Nevrotrofični dejavniki so zato pomembni pri nevrodegenerativnih boleznih, kjer pride do izgube nevronov,

saj imajo sposobnost, da zaščitijo poškodovane nevrone pred propadom in sprožijo njihovo razrast preko delovanja na znotrajcelične signalne poti (5, 8, 9).

2 NEVROTROFIČNI DEJAVNIKI

Nevrotrofični dejavniki so endogeni proteini, ki so odgovorni za rast, diferenciacijo in preživetje nevronov ter njihovo regeneracijo, poleg tega pa pomagajo tudi pri vzpostavitvi sinaptičnih povezav, ki so nujno potrebne za normalno delovanje nevronske celice (10). Nevrotrofične dejavnike delimo v tri večje skupine, in sicer nevrotrofine, nevrotrofične dejavnike izvora celice glije in nevrokine (slika 2) (10). Do danes so največ znanstvene pozornosti namenili nevrotrofinom, med katere štejemo živčni rastni de-



Slika 2: Razvrstitev neurotrofičnih dejavnikov glede na njihovo strukturo in funkcijo. NGF, živčni rastni dejavnik; BDNF, neurotrofični dejavnik možganskega izvora; NT-3, neurotrofin 3; NT-4, neurotrofin 4; GDNF, rastni dejavnik glialnega izvora; NTN, neurturin; ARTN, artemin; PSPN, persephin; EGF, epidermalni rastni dejavnik; IGF-1, insulinu podoben rastni dejavnik 1; FGF, rastni dejavnik fibroblastov; HGF, hepatocitni rastni dejavnik; EPO, eritropoetin; VEGF, žilni endoteljski rastni dejavnik; CNTF, ciliarni neurotrofični dejavnik; TNF, dejavnik tumorske nekroze.

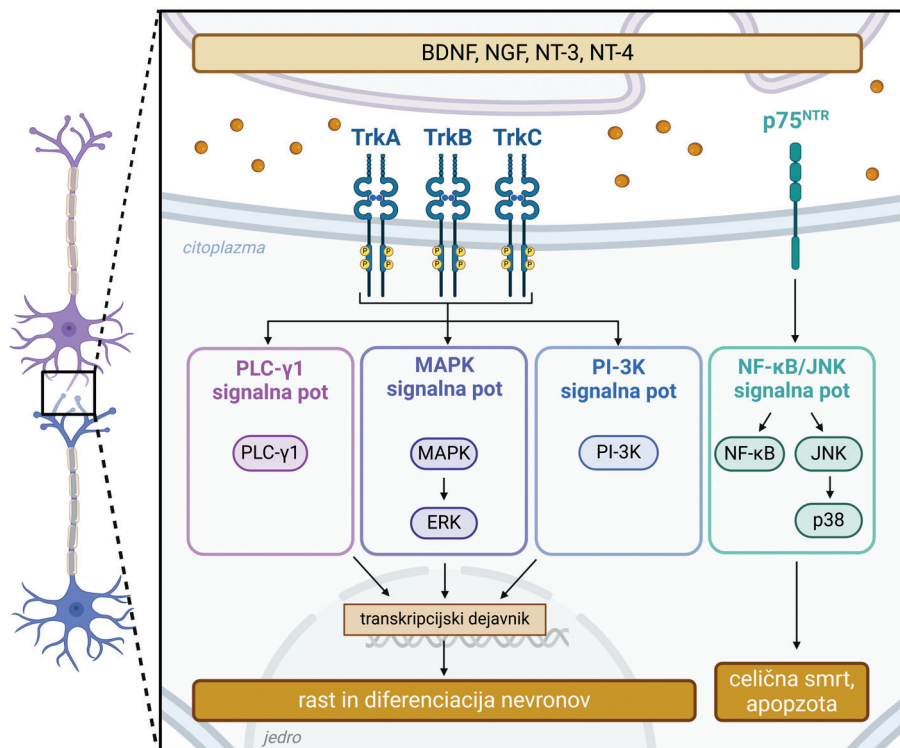
Figure 2: Classification of neurotrophic factors according to their structure and function. NGF, nerve growth factor; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; NT-3, neurotrophin-3; NT-4, neurotrophin-4; GDNF, glial-derived neurotrophic factor; NTN, neurturin; ARTN, artemin; PSPN, persephin; EGF, epidermal growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; EPO, erythropoietin; VEGF, vascular endothelial growth factor; CNTF, ciliary neurotrophic factor; TNF, tumor necrosis factor.

javnik (NGF), neurotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF), neurotrofin 3 (NT-3) in neurotrofin 4/5 (NT-4/5) (9, 11).

Neurotrofini delujejo preko dveh vrst receptorjev (slika 3), in sicer preko receptorjev družine tropomiozinu sorodne kinaze (Trk) in preko neurotrofinskega receptorja p75 (p75^{NTR}), ki spada v naddružino receptorjev za dejavnik tumorske nekroze. Receptorji družine Trk, med katere uvrščamo receptorje TrkA, TrkB in TrkC, so visokoafinitetni receptorji z intrinzično tirozin kinazno aktivnostjo in so pri vezavi ligandov selektivni. NGF je specifičen ligand za receptor TrkA, ki je transmembranski protein s tirozin kinazno aktivnostjo in ima dve vezavni mesti; eno je nespecifično, drugo pa specifično za interakcijo z NGF. Receptor TrkB predstavlja receptor za neurotrofina BDNF in NT-4, receptor TrkC pa predstavlja receptor za neurotrofin NT-3 (12). Po vezavi liganda na receptor iz družine Trk sledita dimerizacija ter avtofosforilacija receptorja, kar vodi do sproženja znotrajceličnih signalnih poti (9).

Najpomembnejše signalne poti, ki so vključene v preživetje in diferenciacijo nevronov, so z mitogenom aktivirana protein kinazna pot (MAPK), fosfatidilinozitol-3-kinazna pot (PI-3K) in fosfolipazna C-1 γ (PLC- γ 1) pot (13). Vloga signalne poti PI-3K je spodbujanje preživetja nevronov in rasti aksonov (14), signalna pot MAPK pa igra pomembno vlogo pri diferenciaciji nevronov, pri čemer je za učinek potrebna aktivacija serin-treoninskih kinaz Raf ter z zunajceličnim signalom regulirane proteinske kinaze (ERK) (15, 16). Pot PLC- γ 1 je pomembna tudi pri uravnavanju celične diferenciacije in preživetja (3).

Pomembno vlogo v procesih diferenciacije in nevitogeneze imajo tudi GTP-aze Rho, ki so ključni regulatorji organizacije aktinskega citoskeleta. Dinamično preoblikovanje citoskeleta je bistveno za rast nevitov, iz katerih se razvijejo posamezni aksoni in multipli dendriti. Med bolj raziskanimi člani družine sta Cdc42 in Rac2, ki sta pozitivna regulatorja rasti nevitov (17), ter RhoA, ki zavira podaljševanje nevitov in upočasnjuje proces nevitogeneze (18).



Slika 3: Znotrajcelične signalne poti, povezane z delovanjem nevrotrofinov. Vezava nevrotrofina na receptor iz družine Trk (TrkA, TrkB in TrkC) spodbudi aktivacijo signalnih poti PLC- γ 1 in MAPK, kar povzroči prednostno rast in diferenciacijo nevronov, medtem ko aktivacija signalne poti PI-3K primarno spodbudi celično preživetje. Aktivacija signalne poti preko receptorja p75^{NTR} je odgovorna za uravnavanja celične smrti. Ustvarjeno z BioRender.com.

Figure 3: Intrinsic signalling pathways associated with neurotrophin action. Neurotrophin binding to the Trk family receptor (TrkA, TrkB and TrkC) induces activation of the PLC- γ 1 and MAPK signalling pathways that primarily leads to growth and differentiation of neurons, while activation of the PI-3K signalling pathway primarily promotes cell survival. Activation of the p75^{NTR} signalling pathway is responsible for regulating cell death. Created with BioRender.com.

Poleg vezave na tirozin kinazne receptorje, ki vodijo v izkazovanje nevrotrofičnih učinkov, se nevrotrofini vežejo tudi na nizkoafinitetni nevrotrofinski receptor p75^{NTR}, ki je udeležen pri uravnavanju celičnega preživetja in apoptoze (19). Na receptor p75^{NTR} se lahko v nasprotju s selektivnejšim receptorjem iz družine Trk vežejo vsi nevrotrofini. Interakcije, ki jih povzročajo nevrotrofini z vezavo bodisi na receptorje iz družine Trk bodisi na receptor p75^{NTR} imajo pogosto nasprotno posledice. Slednje so delno pojasnili v raziskavah, ki so pokazale, da imata dva različna razreda receptorjev, Trk in p75^{NTR}, različna prednostna liganda za vezavo nanje, in sicer se na receptor p75^{NTR} prednostno vežejo prooblike nevrotrofinov, torej pronevrotrofini, medtem ko se na receptorje iz družine Trk vežejo zrele oblike nevrotrofinov (20). Tako vezava pro-NGF na receptor p75^{NTR} sproži aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti, med njimi

signalne poti NF- κ B in preko aktivacije kinaz JNK in p38 signalno pot MAPK, kar vodi v apoptozo nevronov (21–23). Za delovanje nevrotrofinov in izkazovanje trofične podpore je pomembna tudi medsebojna interakcija njihovih receptorjev, do katerih pride tako na ravni receptorjev kot tudi na ravni znotrajcelične signalizacije (9, 24).

3 PROTEINI Z IZKAZANIM NEVROTROFIČNIM DELOVANJEM

Vse več proteinov je prepoznanih, da poleg opravljanja svoje osnovne funkcije prek različnih mehanizmov prispevajo tudi k nevrotrofični podpori nevronske celice ter vplivajo

na procese, kot so rast, preživetje in diferenciacija. Nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje izkazuje tudi izoencim enolaze, γ -enolaza, saj poveča preživetje kortikalnih nevronov (25, 26). Dosedanje raziskave so pokazale, da C-končni del γ -enolaze izkazuje nevrotrofično aktivnost na plazemski membrani nevrnskih celic (25–27). Po prenosu γ -enolaza spodbuja preživetje celic, diferenciacijo in rast nevrinov z aktivacijo dveh signalnih poti, preko katerih vršijo svojo trofično aktivnost tudi nevrotrofini, in sicer z aktivacijo signalnih poti PI-3K in MAPK (28). Hkrati so pokazali, da je receptor Trk vezni partner γ -enolaze in da je tirozin kinazna aktivnost receptorja Trk potrebna za nevrotrofično signalizacijo, posredovano z γ -enolazo, kar je značilno tudi za delovanje nevrotrofinov (29).

Protein z izkazanim nevrotrofičnim delovanjem je tudi nevrolevkin, saj delovanje slednjega poveča preživetje nevronov in tvorbo nevrinov (30, 31). Podobno je protein laminin, ki je glikoprotein in glavna sestavina bazalne membrane, ena od ključnih molekul, ki sodelujejo pri uravnavanju adhezije, rasti in diferenciacije celic (32). Raziskave so poročale, da laminin spodbuja izražanje nevrinov v nevronih pri odraslih miših v odsotnosti nevrotrofinov (33) ter spodbuja izražanje nevrinov v človeških mezenhimskih matičnih celicah z aktivacijo signalne poti MAPK v odsotnosti seruma in diferenciacijskih faktorjev, kar nakazuje na njegove nevrotrofične lastnosti v možganih (34, 35).

Nadalje, sintaza dušikovega oksida (NOS) presega svojo primarno vlogo proizvodnje dušikovega oksida (NO), molekule, ki je vključena v procese vazodilatacije in imunskega odziva. Raziskave so pokazale, da NO, pridobljen iz endotelijske NOS, izkazuje nevroprotektivne učinke, medtem ko NO, pridobljen iz inducibilne NOS, prispeva k nevrotoksičnosti (36). Podobno antioksidativni encim superoksid dismutaza (SOD) z zmanjšanjem ravni superoksidnih radikalov prispeva k celični homeostazi in preprečuje poškodbe, ki bi sicer vodile do apoptoze (37). Raziskave na mišjem modelu so pokazale, da prekomerno izražanje SOD, izooblike SOD-1, ščiti nevrone pred nevrotoksičnimi učinki amiloida beta, medtem ko izguba SOD-1 pospeši s staranjem povezane patologije (38–40). Poleg tega se je pokazalo, da ima signalna pot PI-3K ključno vlogo pri zaščiti nevronov in zaviranju apoptoze s povečanjem izražanja SOD (41).

Protein S100B je citoplazemski protein, ki z visoko afiniteto veže kalcij in se značilno izraža v celicah gljive (42). Nevrotrofični učinek proteina S100B so dokazali pri nizkih nanomolarnih koncentracijah, na račun spodbujanja podaljševanja nevrinov, zaščite preživetja nevronov, preprečevanja nevrotoksičnih poškodb in povečane aktivnosti livilcev

reaktivnih kisikovih zvrsti (43–45). Nasprotno pa S100B povzroča toksične, provnetne učinke pri visokih mikromolarnih koncentracijah (46–48). Odkritja različnih proteinov, ki presegajo svoje osnovne funkcije in prispevajo k nevrotrofični podpori, poudarjajo kompleksnost mehanizmov v živčnem sistemu.

4 POMEN NEVROTROFIČNE AKTIVNOSTI PRI NEVRODEGENERACIJI

Nevrodegeneracija oz. nevrodegenerativne motnje so skuppek kompleksnih patoloških stanj, kjer so primarno prizadeti nevroni v centralnem živčnem sistemu. Najpogosteje se pojavijo v srednji ali pozni starosti, zato predvidevamo, da bodo zaradi starajočega se prebivalstva predstavljale vedno večji zdravstveni problem. Nevrotrofični dejavniki zaradi trofičnega delovanja izkazujejo potencialno vlogo pri zdravljenju nevrodegenerativnih boleznih, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, Huntingtonova bolezen, multipla skleroza in amiotrofična lateralna skleroza. Raven izražanja nevrotrofinov in preostalih nevrotrofičnih dejavnikov ter njihovo delovanje je okrnjeno pri številnih nevrodegenerativnih boleznih, kar končno vodi v degeneracijo nevronov in njihov propad (10).

V centralnem živčnem sistemu ima BDNF vlogo glavnega nevrotrofina zaradi obilnega izražanja receptorja TrkB. Več raziskav je poudarilo povezavo med Alzheimerjevo boleznijo in ravno izražanja BDNF. Zmanjšane ravni proteina BDNF kot tudi ravni mRNA v neokorteksu in hipokampusu kažejo, da ima BDNF pomembno vlogo pri patologiji te bolezni. Podobno so poročali o pomembnem znižanju ravni BDNF v periferni krvi bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (49), raven BDNF pa je bila prav tako znatno zmanjšana v možganih, serumu in cerebrospinalni tekočini pri bolnikih z blago obliko Alzheimerjeve bolezni (50). Raziskave na transgenih mišjih modelih Alzheimerjeve bolezni so pokazale, da je povišana raven izražanja BDNF bistveno izboljšala kognitivne funkcije miši (50–52).

Nižje ravni BDNF so prav tako pokazali v serumih bolnikov z multiplo sklerozo, zmanjšano izločanje BDNF iz imunskih celic pa se je odražala v zmanjšani zaščitni vlogi le-teh (53, 54). Raven izražanja BDNF je povezana tudi s patologijo Parkinsonove bolezni. Več raziskav je pokazalo znatno znižanje serumskih ravni BDNF pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo, kar se odraža v kognitivnih motnjah in sindromu nemirnih nog (49). Poleg tega so pokazali, da so nižje ravni



BDNF pomembno povezane z degeneracijo nigrostriatnega sistema, kar je značilnost patologije Parkinsonove bolezni (55), hkrati pa so pokazali zmanjšane ravni izražanja BDNF v dopaminergičnih nevronih črnega jedra v možganih s patologijo Parkinsonove bolezni (56). Nadalje so pokazali, da so zmanjšane ravni izražanja BDNF in receptorja TrkB v perifernem živčevju pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo neposredno povezane z degeneracijo dopaminergičnih nevronov (57). Pri Huntingtonovi bolezni je transport BDNF od kortikalnih do striatnih nevronov pomanjkljiv, kar prispeva k selektivni izgubi striatnih nevronov in prostovoljnih gibov mišic pri bolnikih s to boleznijo (58, 59).

V perifernem živčnem sistemu je NGF prevladujoči nevrotrifin, ki deluje na simpatične in senzorične nevrone. V centralnem živčnem sistemu NGF zagotavlja trofično podporo holineričnim nevronom bazalnega sprednjega dela možganov, ki izražajo TrkA, kar je znatnega pomena pri preprečevanju patologije Alzheimerjeve bolezni. Pokazali so znižane ravni NGF predvsem v bazalnih holineričnih nevronih sprednjega dela možganov in kortikalnih projekcijah v možganskem tkivu s patologijo Alzheimerjeve bolezni ter v plazmi bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (10, 60). Podobno so opazili spremembe v ravni izražanja NGF v predkliničnih raziskavah na živalih kot tudi v kliničnih vzorcih bolnikov s Parkinsonovo boleznijo. Pokazali so znižano raven NGF v dopaminergičnih nevronih v črnem jedru, ki so podvrženi propadu med napredovanjem te bolezni (61). Spremembo v ravni izražanja NGF kot tudi BDNF so pokazali tudi v nišah matičnih celic, pri čemer se je izkazalo, da nevrotrifina spodbujata regeneracijo tkiv zunaj živčnega sistema (62).

Nenazadnje imata nevrotrifina NT-3 in NT-4/5 prav tako obetaven potencial, čeprav sta manj raziskana. NT-3 z vezavo na receptor TrkC uravnava preživetje nevronov, podpira diferenciacijo nevronov in spodbuja njihovo rast in diferenciacijo novih nevronov in sinaps (63, 64). Rezultati raziskav *in vivo* nakazujejo na sposobnost regenerativnega delovanja NT-3, saj se je izkazalo, da je udeležen pri preoblikovanju tkiva v poškodovani hrbtenjači in s tem spodbujanju regeneracije poškodovanih nevronov v živčnem sistemu (64, 65).

5 KLINIČNA UPORABNOST NEVROTROFIČNIH DEJAVNIKOV

Kljub potencialni terapevtski vlogi nevrotrifinčnih dejavnikov so raziskave opozorile na številne težave, povezane z nji-

hovo klinično uporabo (66). Večina nevrotrifinčnih dejavnikov ima kratek razpolovni čas *in vivo*, slabe farmakokinetične lastnosti in zelo nizke stopnje prehoda skozi krvno-možgansko pregrado (67). Hkrati je njihov dostop do tarčnih celic omejen zaradi proteolitične razgradnje, različnih mehanizmov njihovega odstranjevanja, potencialne imunogenosti in sekvenciranja z vezavo drugih proteinov ter sestavin krvi in perifernih tkiv (67). Dostavni sistem nevrotrifinčnih dejavnikov z neposredno intracerebroventrikularno infuzijo se je izkazal za neuspešen, saj so raziskave razkrile pomembne neželene učinke z malo klinične koristi (68, 69). Z namenom premostiti omejitve trenutnih dostavnih sistemov in izboljšati terapevtski potencial nevrotrifinčnih dejavnikov so raziskovalci usmerjeni v razvoj inovativnih strategij, ki bi omogočale bolj ciljano usmerjeno dostavo neposredno k tistim nevronskim fenotipom, značilno prizadetim v boleznih (60). Med te pristope sodi uporaba genetsko modificiranih mezenhimskih matičnih celic ali nevrnalnih matičnih celic za izločanje nevrotrifinčnih dejavnikov, ki je pokazala visoko stopnjo učinkovitosti pri različnih živalskih modelih (52). Ta pristop je uspešno zmanjšal degenerativne spremembe in kognitivno upadanje, ki so značilni za proces staranja, ne da bi pri tem povzročil neželene učinke, opažene pri intracerebroventrikularni infuziji (70, 71). Zmožnost teh celic, da vzdržujejo aktivno izločanje nevrotrifinčnih dejavnikov za obdobje več mesecev, predstavlja pomemben napredek dolgotrajne terapevtske učinkovitosti (70, 71). Uspeh te metode je omogočil prehod v fazo kliničnih prekušanj, kar predstavlja prelomnico v razvoju naprednih strategij za obravnavo nevrodegenerativnih bolezni in kognitivnih motenj (72).

Pristopi genske terapije, ki uporabljajo virusne vektorje, so prav tako izkazali učinkovito ciljano dostavo manjših količin nevrotrifinčnih dejavnikov. Ta metoda omogoča, da virusni vektor trajno spremeni genetski material nevrone, kar mu omogoča, da sam proizvaja nevrotrifinčne dejavnike. Poleg tega je za doseganje terapevtskega učinka potrebna samo ena injekcija na ciljnim mestu, kar zmanjša potrebo po večkratnih in invazivnih postopkih (60). Doslej so raziskave genske terapije nevrotrifinčnih vključevale uporabo lentivirusnih konstruktov, ki izražajo BDNF, pri modelih Alzheimerjeve bolezni glodavcev in primatov. Ugotovili so, da ta pristop izboljša celično signalizacijo in zmanjšuje izgubo nevronov (73). Genska terapija, ki uporablja lentivirusni konstrukto za izražanje NGF, je v modelu s podganami pokazala obetavne rezultate pri ohranjanju holineričnih nevronov (74). Preglednica 1 predstavlja pregled kliničnih prekušanj različnih terapevtskih pristopov, ki uporabljajo nevrotrifinčne dejavnike, natančneje nevrotrifine za zdravljenje nevroloških stanj.

Preglednica 1: Pregled kliničnih preskušanj nevrotrofičnih dejavnikov za zdravljenje nevroloških stanj.

Table 1: An overview of clinical trials of neurotrophic factors for the treatment of neurological conditions.

Nevrotrofični dejavnik	Nevrološko stanje	Terapevtski pristop	Cilj kliničnega preskušanja	Faza kliničnega preskušanja	Status
NGF	amiotrofična lateralna skleroza	genetsko modificirane mezenhimske matične celice	učinkovitost in varnost NurOwn®, ki dostavlja nevrotrofične dejavnike za izboljšanje preživetja nevronov in upočasnitev napredovanja bolezni	faza 3 (NCT03280056)	zaključena
BDNF	Alzheimerjeva bolezen in blaga kognitivna motnja	genska terapija	učinkovitost in varnost BDNF genske terapije pri upočasnjevanju ali preprečevanju izgube nevronov	faza 1 (NCT05040217)	v teku
NGF	Alzheimerjeva bolezen	genska terapija	proučiti CERE-110, eksperimentalno zdravilo, ki proizvaja NGF, za izboljšanje funkcij živčnih celic v možganih	faza 2 (NCT00876863)	zaključena

6 SKLEP

Vse več raziskav potrjuje, da je pomanjkanje nevrotrofične podpore pomemben dejavnik pri razvoju neurodegenerativnih bolezni, pri katerih pride do degeneracije osrednjega živčevja in propada nevronske povezave. Zaradi izgube motoričnih in kognitivnih sposobnosti so nevrotrofični dejavniki obetavni kandidati za zdravljenje tovrstnih bolezni, saj s svojim delovanjem spodbujajo preživetje, diferenciacijo, regeneracijo in ohranjanje nevronov ter njihovih povezav. Vrednotenje potencialnih terapevtskih učinkov nevrotrofičnih dejavnikov na živalskih modelih in v kliničnih fazah preskušanja je nakazalo obetavne rezultate, vendar zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti proteinov in težavnega prehajanja v centralni živčni sistem želeni rezultati niso bili doseženi. Za učinkovitejše zdravljenje neurodegenerativnih bolezni se usmerja razvoj v iskanje novih, manjših molekul, ki bi bile sposobne posnemati ali uravnati trofično delovanje nevrotrofičnih dejavnikov oz. molekul, ki izkazujejo nevrotrofično delovanje.

7 LITERATURA

- Albert K, Niskanen J, Kälvälä S, Lehtonen Š. Utilising Induced Pluripotent Stem Cells in Neurodegenerative Disease Research: Focus on Glia. *IJMS*. 2021 Apr 21;22(9):4334.
- Li L, Lu J, Tay SSW, Mochhala SM, He BP. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Research*. 2007 Jul;1159:8–17.
- Singh S, Swarnkar S, Goswami P, Nath C. Astrocytes and Microglia: Responses to Neuropathological Conditions. *International Journal of Neuroscience*. 2011 Oct 13;121(11):589–97.
- Harrington AW, Ginty DD. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013 Mar;14(3):177–87.
- Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Reviews*. 1998 Jun;27(1):1–39.
- Araujo DM, Chabot JG, Quirion R. Potential Neurotrophic Factors in the Mammalian Central Nervous System: Functional Significance in the Developing and Aging Brain. *International Review of Neurobiology*. Elsevier; 1990. p. 141–74.
- Nagtegaal ID, Lakke EAJF, Marani E. Trophic and Tropic Factors in the Development of the Central Nervous System. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 1998 Jan;106(3):161–202.

8. Hansen MR, Zha XM, Bok J, Green SH. Multiple Distinct Signal Pathways, Including an Autocrine Neurotrophic Mechanism, Contribute to the Survival-Promoting Effect of Depolarization on Spiral Ganglion Neurons *In Vitro*. *J Neurosci*. 2001 Apr 1;21(7):2256–67.
9. Kaplan DR, Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997 Apr;9(2):213–21.
10. Sampaio T, Savall A, Gutierrez MZ, Pinton S. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neural Regeneration Research*. 2017;12(4):549.
11. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. In: Lewin GR, Carter BD, editors. *Neurotrophic Factors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
12. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003 Apr;4(4):299–309.
13. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular Signaling Pathways Activated by Neuropathic Factors. *Annual Review of Neuroscience*. 1996 Mar;19(1):463–89.
14. Kim Y, Seger R, Suresh Babu CV, Hwang SY, Yoo YS. A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Molecules and Cells*. 2004 Dec 31;18(3):353–9.
15. Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR. Inhibition of MAP Kinase Kinase Blocks the Differentiation of PC-12 Cells Induced by Nerve Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Jun;270(23):13585–8.
16. Reffas S, Schlegel W. Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells. *Biochemical Journal*. 2000 Dec 15;352(3):701–8.
17. Jin E, Nosaka K, Sano M. NGF-dependent formation of ruffles in PC12D cells required a different pathway from that for neurite outgrowth. *Neurochemistry International*. 2007 Jul;51(2–4):216–26.
18. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002 Dec;420(6916):629–35.
19. Gentry JJ, Barker PA, Carter BD. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier; 2004. p. 25–39.
20. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1945–8.
21. Costantini C, Rossi F, Formaggio E, Bernardoni R, Cecconi D, Della-Bianca V. Characterization of the Signaling Pathway Downstream p75 Neurotrophin Receptor Involved in β -Amyloid Peptide-Dependent Cell Death. *JMN*. 2005;25(2):141–56.
22. Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neuroscience*. 2002 Nov;5(11):1131–6.
23. Yaar M, Zhai S, Panova I, Fine RE, Eisenhauer PB, Blusztajn JK, et al. A cyclic peptide that binds p75 NTR protects neurons from beta amyloid (1–40)-induced cell death. *Neuropathology Appl Neurobio*. 2007 Oct;33(5):533–43.
24. Bibel M. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors *trk* and p75NTR. *The EMBO Journal*. 1999 Feb 1;18(3):616–22.
25. Hattori T, Ohsawa K, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S. Synthetic Peptide Corresponding to 30 Amino Acids of the C-Terminal of Neuron-Specific Enolase Promotes Survival of Neocortical Neurons in Culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994 Jul;202(1):25–30.
26. Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S. Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neuroscience Research*. 1995 Jan;21(3):191–8.
27. Hafner A, Obermajer N, Kos J. Gamma-1-Syntrophin Mediates Trafficking of Gamma-Enolase towards the Plasma Membrane and Enhances Its Neurotrophic Activity. *Neurosignals*. 2010;18(4):246–58.
28. Hafner A, Obermajer N, Kos J. γ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochem J*. 2012 Apr 15;443(2):439–50.
29. Pišlar A, Kos J. γ -Enolase enhances *Trk* endosomal trafficking and promotes neurite outgrowth in differentiated SH-SY5Y cells. *Cell Commun Signal*. 2021 Dec;19(1):118.
30. Chaput M, Claes V, Portetelle D, Cludts I, Cravador A, Burny A, et al. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature*. 1988 Mar;332(6163):454–5.
31. Gurney ME, Heinrich SP, Lee MR, Yin HS. Molecular Cloning and Expression of Neuroleukin, a Neurotrophic Factor for Spinal and Sensory Neurons. *Science*. 1986 Oct 31;234(4776):566–74.
32. Yamamoto T, Iwasaki Y, Yamamoto H, Konno H, Isemura M. Intra-neuronal laminin-like molecule in the central nervous system: demonstration of its unique differential distribution. *Journal of the Neurological Sciences*. 1988 Mar;84(1):1–13.
33. Plantman S, Patarroyo M, Fried K, Domogatskaya A, Tryggvason K, Hammarberg H, et al. Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons *in vitro*. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2008 Sep;39(1):50–62.
34. Mruthyunjaya S, Manchanda R, Godbole R, Pujari R, Shiras A, Shastry P. Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK–MEK/ERK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010 Jan;391(1):43–8.
35. Winokur PN, Subramanian P, Bullock JL, Arocas V, Becerra SP. Comparison of two neurotrophic serpins reveals a small fragment with cell survival activity. *Molecular Vision*. 2017;23:372–84.
36. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. *Experimental Neurology*. 2015 Jan;263:235–43.
37. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*. 2020 Jul 2;11:694.
38. Iadecola C, Zhang F, Niwa K, Eckman C, Turner SK, Fischer E, et al. SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nature Neuroscience*. 1999 Feb;2(2):157–61.
39. De Haan JB, Newman JD, Kola I. Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Molecular Brain Research*. 1992 Apr;13(3):179–87.
40. Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, et al. SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase) Deficiency Drives Amyloid β Protein Oligomerization and Memory Loss in

- Mouse Model of Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Dec;286(52):44557–68.
41. Matsuda H, Seo Y, Takahama K. A novel method of species identification using human muscle-specific β -enolase. *Leg Med*. 2000 Mar;2(1):42–5.
 42. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *Journal of Neurochemistry*. 2019 Jan;148(2):168–87.
 43. Nishiyama H, Knöpfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Mar 19;99(6):4037–42.
 44. E. Clementi M, Sampaiolese B, Giardina B. S100b Induces Expression of Myoglobin in AP β Treated Neuronal Cells In Vitro: A Possible Neuroprotective Mechanism. *CAS*. 2016 Oct 14;9(4):279–83.
 45. Reali C, Scintu F, Pillai R, Donato R, Michetti F, Sogos V. S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *Journal of Neuroscience Research*. 2005 Sep;81(5):677–86.
 46. Koppal T, Lam AG, Guo L, Van Eldik LJ. S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochemistry International*. 2001;39(5–6):401–7.
 47. Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, et al. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiology of Aging*. 2001;22(5):765–72.
 48. Schmitt KRL, Kern C, Lange PE, Berger F, Abdul-Khaliq H, Hendrix S. S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. *Neuroscience Research*. 2007 Sep;59(1):68–73.
 49. Azman KF, Zakaria R. Recent Advances on the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neurodegenerative Diseases. *IJMS*. 2022 Jun 19;23(12):6827.
 50. Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Müller FJ, Loring JF, et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Aug 11;106(32):13594–9.
 51. Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, et al. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science*. 2018 Sep 7;361(6406).
 52. El Ouaamari Y, Van Den Bos J, Willekens B, Cools N, Wens I. Neurotrophic Factors as Regenerative Therapy for Neurodegenerative Diseases: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *IJMS*. 2023 Feb 15;24(4):3866.
 53. Karimi N, Ashourzadeh H, Akbarzadeh Pasha B, Haghshomar M, Jouzdani T, Shobeiri P, et al. Blood levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in people with multiple sclerosis (MS): A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2022 Sep;65:103984.
 54. Azoulay D, Urshansky N, Karni A. Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection. *Journal of Neuroimmunology*. 2008 Mar;195(1–2):186–93.
 55. Hernández-Vara J, Sáez-Francàs N, Lorenzo-Bosquet C, Corominas-Roso M, Cuberas-Borròs G, Lucas-Del Pozo S, et al. BDNF levels and nigrostriatal degeneration in "drug naïve" Parkinson's disease patients. An "in vivo" study using I-123-FP-CIT SPECT. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2020 Sep;78:31–5.
 56. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 1999 Jul;270(1):45–8.
 57. Huang Y, Huang C, Yun W. Peripheral BDNF/TrkB protein expression is decreased in Parkinson's disease but not in Essential tremor. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2019 May;63:176–81.
 58. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, et al. Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell*. 2004 Jul;118(1):127–38.
 59. Strand AD, Baquet ZC, Aragaki AK, Holmans P, Yang L, Cleren C, et al. Expression Profiling of Huntington's Disease Models Suggests That Brain-Derived Neurotrophic Factor Depletion Plays a Major Role in Striatal Degeneration. *The Journal of Neuroscience*. 2007 Oct 24;27(43):11758–68.
 60. Weissmiller AM, Wu C. Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener*. 2012 Dec;1(1):14.
 61. Nagatsu T, Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. In: Gerlach M, Deckert J, Double K, Koutsilieris E, editors. *Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach*. Vienna: Springer Vienna; 2007: p. 113–20.
 62. Marsh SE, Blurton-Jones M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. *Neurochemistry International*. 2017 Jun;106:94–100.
 63. Zhou L, Baumgartner BJ, Hill-Felberg SJ, McGowen LR, Shine HD. Neurotrophin-3 Expressed In Situ Induces Axonal Plasticity in the Adult Injured Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*. 2003 Feb 15;23(4):1424–31.
 64. Oudega M, Hao P, Shang J, Haggerty AE, Wang Z, Sun J, et al. Validation study of neurotrophin-3-releasing chitosan facilitation of neural tissue generation in the severely injured adult rat spinal cord. *Experimental Neurology*. 2019 Feb;312:51–62.
 65. Elliott Donaghue I, Tator CH, Shoichet MS. Sustained delivery of bioactive neurotrophin-3 to the injured spinal cord. *Biomaterials Science*. 2015;3(1):65–72.
 66. Bartus RT, Johnson EM. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? *Neurobiology of Disease*. 2017 Jan;97:156–68.
 67. Thorne RG, Frey WH. Delivery of Neurotrophic Factors to the Central Nervous System: Pharmacokinetic Considerations. *Clinical Pharmacokinetics*. 2001;40(12):907–46.
 68. Seiger Å, Nordberg A, Von Holst H, Bäckman L, Ebendal T, Alafuzoff I, et al. Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: The first attempt of a possible future treatment strategy. *Behavioural Brain Research*. 1993 Nov;57(2):255–61.
 69. Eriksdotter Jönhagen M, Nordberg A, Amberla K, Bäckman L, Ebendal T, Meyerson B, et al. Intracerebroventricular Infusion of Nerve Growth Factor in Three Patients with Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998;9(5):246–57.
 70. Chen KS, Masliah E, Mallory M, Gage FH. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience*. 1995 Sep;68(1):19–27.



71. Conner JM, Darracq MA, Roberts J, Tuszyński MH. Nontropic actions of neurotrophins: Subcortical nerve growth factor gene delivery reverses age-related degeneration of primate cortical cholinergic innervation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Feb 13;98(4):1941–6.
72. Berry JD, Cudkowicz ME, Windebank AJ, Staff NP, Owegi M, Nicholson K, et al. NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS: Safety, clinical, and biomarker results. *Neurology*. 2019 Dec 10;93(24).
73. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2009 Mar;15(3):331–7.
74. Blesch A, Conner J, Pfeifer A, Gasmi M, Ramirez A, Britton W, et al. Regulated lentiviral NGF gene transfer controls rescue of medial septal cholinergic neurons. *Molecular Therapy*. 2005 Jun;11(6):916–25.

NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

JAZMP PODELILA CERTIFIKAT DOBRE PROIZVODNE PRAKSE ZAVODU RS ZA TRANSFUZIJSKO MEDICINO NA PODROČJU ZDRAVIL ZA NAPREDNO ZDRAVLJENJE

Urban Švajger

Zdravila za napredno zdravljenje označujejo naslednjo generacijo zdravil, ki so osnovana na človeških celicah in/aligenih. Področje se je v zadnjih letih zelo hitro razvijalo in nekatere celične ter genske terapije, katerih pot do klinične rabe se je še pred nekaj leti zdela stvar daljne prihodnosti, so danes že del standardne oskrbe bolnikov, tudi v Sloveniji (npr. Kymriah® za zdravljenje B-celičnih limfomov ali Alofi-sel® za zdravljenje perianalnih fistul pri Crohnovi bolezni) (1, 2).

V nasprotju s »klasičnimi« zdravili (male molekule, biološka zdravila), katerih proizvodnja je v veliki meri vezana le na industrijo, se je proizvodnja zdravil za napredno zdravljenje zaradi številnih posebnosti (majhne serije, občutljivost surovin) razvila in tudi ohranila v številnih akademskih oz. bolnišničnih proizvodnih centrih. Pogosto so to zlasti institucije, katerih osebje vsakodnevno rokuje in poseduje ustrezno znanje o ključnih surovinah (celice, tkiva).

V Sloveniji je Zavod za transfuzijsko medicino osrednja ustanova za pridobivanje in procesiranje številnih krvotvornih in drugih celičnih vrst ter je igral ključno vlogo pri prvi »celični terapiji« pri nas, presaditvi krvotvornih matičnih celic leta 1989. Razvoj področja, ki je sledil, je v letu 2014 vodil do ustanovitve novega stebra dejavnosti – terapevtskih storitev, poleg že obstoječe preskrbe s krvjo in diagnostike.

Razvoj in proizvodnja zdravil za napredno zdravljenje je danes ena od osrednjih dejavnosti terapevtskih storitev na Zavodu za transfuzijsko medicino. V sodelovanju z UKC Ljubljana in drugimi ustanovami smo do danes v klinično prakso uspešno prenesli številne načine naprednih zdravljenj, kot sta zdravljenje ishemičnih kardiomiopatij s CD34+ krvotvornimi matičnimi celicami in zdravljenje poškodb hrbtenjače z mezenhimijskimi stromalnimi matičnimi celicami (3). Na osnovi bolnišničnih izjem smo uporabo mezenhimijskih stromalnih matičnih celic uspešno uvedli tudi za zdravljenje artroz kolen in kolkov ter celjenje brazgotinjenja (4). Na področju celičnih imunoterapij pa veliko obeta uporaba virusno specifičnih limfocitov T za zdravljenje različnih infekcijskih stanj, npr. okužb z virusom Epstein-Barr, adenovirusi in tudi Sars-CoV-2.

Napredna zdravljenja na osnovi bolnišničnih izjem so pomemben del Zakona o zdravilih (ZZdr-2), saj omogočajo hitro dostopnost pomembnih terapevtskih pristopov z dobrim varnostnim profilom bolnikom, ki imajo lahko od tega pomembne koristi. Istočasno pa razvoj novih optimiziranih zdravil oz. njihova uporaba za nove indikacije narekuje kakovostno oceno varnosti in učinkovitosti v kontekstu kliničnih preskušanj. V ta namen je Zavod za transfuzijsko medicino pri Javni agenciji za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) vložil prošnjo za opravljanje dejavnosti proizvodnje zdravil za namen kliničnega preskušanja. Po pregledu proizvodnih prostorov s strani farmacevtskih inšpektorjev in ustrezni odpravi pomanjkljivosti je JAZMP konec lanskega leta (20. 12. 2023) izdala odločbo o ustreznosti.

S tem je Zavod za transfuzijsko medicino postal prva javna institucija v Sloveniji, ki je pridobila certifikat dobre proizvodne prakse (GMP) na področju zdravil za napredno zdravljenje, natančneje zdravil za somatsko celično in gensko zdravljenje. V smislu zagotavljanja najvišjih standardov kakovosti predstavlja nadgradnjo in dopolnitev zahtevne mednarodne akreditacije JACIE (*The Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT*), ki jo ima Zavod za transfuzijsko medicino za področje afereznijskih celičnih odvzemov, obdelave in zamrzovanja krvotvornih matičnih celic.

Pridobitev certifikata predstavlja zelo pomemben korak za razvoj dejavnosti Zavoda za transfuzijsko medicino na področju razvoja in klinične translacije najsodobnejših celičnih in genskih terapij. Med tovrstna napredna zdravljenja spadajo številne terapije na področju regenerativne medicine in zdravljenja z matičnimi celicami (na področju ortopedije, travmatologije, kardiologije, celjenje po kirurških posegih itd.), celične imunoterapije (npr. zdravljenje infektoloških bolezni) ter imunoterapije na področju onkologije (terapija



CAR-T, cepiva na osnovi dendritičnih celic, terapija s celicami NK itd.).

Viri:

1. Ali S, Kjekten R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, Moltu K, Bremnes B, Grønevik E, Muusse M, Håkonsen GD, Skibeli V, Kalland ME, Wang I, Buajordet I, Urbaniak A, Johnston J, Rantell K, Kerwash E, Schuessler-Lenz M, Salmonson T, Bergh J, Gisselbrecht C, Tzogani K, Papadoulis I, Pignatti F. The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist*. 2020 Feb;25(2):e321-e327.
2. Bellino S, La Salvia A, Cometa MF, Botta R. Cell-based medicinal products approved in the European Union: current evidence and perspectives. *Front Pharmacol*. 2023 Jul 31;14:1200808.
3. Poglajen G, Sever M, Cukjati M, Cernelc P, Knezevic I, Zemljic G, Haddad F, Wu JC, Vrtovec B. Effects of transcatheter aortic valve replacement in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014 Aug;7(4):552-9.
4. Živec K, Veber M, Pizem J, Jez M, Božikov K, Svaiger U. Intraoperative Intraoperative Application of Stromal Vascular Fraction into the Abdominal Suture Line: Histological Analysis of Abdominal Scar Tissue. *Aesthetic Plast Surg*. 2022 Dec;46(6):2853-2862.

zročijo zapiranje vrzeli na mestih poškodbe. Te ugotovitve so še posebej obetavne za potencialno uporabo antrobotov v regenerativni medicini.

Raziskovalci raziskujejo tudi druge možnosti uporabe antrobotov, vključno s čiščenjem nastalih plakov v arterijah bolnikov z aterosklerozo, ciljano dostavo zdravil do želenih tkiv in odstranjevanjem odvečne sluzi pri bolnikih s cistično fibrozo.

Vir:

1. Hagan J. Developing biological robots to repair damaged neural tissue; www.regmednet.com/developing-biological-robots-to-repair-damaged-neural-tissue/ (dostop: 27. 2. 2024).

NATANČNO VSTAVLJANJE GENOV S TEHNIKO PRINT: NOVI KORAKI V GENSKI TERAPIJI

Leonora Prestrešič

Znanstveniki z Univerze v Kaliforniji, Berkeley (ZDA), so nedavno razvili metodo dostave genov na osnovi retrotranspozonov, ki bi lahko revolucionirala regenerativno medicino. Do sedaj je bilo dostavljanje celih genov brez povzročanja škodljivih posledic namreč izredno zahtevno, nedavni napredek z retrotranspozoni pa bi lahko to področje premaknil v novo smer.

Trenutne metode za integracijo genov v genom, kot sta CRISPR-Cas in sistem virusnih vektorjev, so premalo učinkovite in nosijo visoko tveganje za mutagenozo. Zato so raziskovalci obrnili pozornost k retrotranspozonom. Ti delujejo po mehanizmu kopiranja in lepljenja, pri čemer se najprej prepisujejo v RNA, ki se nato reverzno prepisuje v DNA, ta pa se nato integrira v genom na drugi lokaciji. Ko so raziskovalci razmišljali o oblikovanju metode vstavljanja genov na osnovi transpozonov, je literatura nakazovala, da bo dobro poznan retrotranspozon LINE-1, najden pri ljudeh, pretežno oblikovati v učinkovito in varno orodje za vstavljanje genov. Namesto tega so raziskave pokazale na potencial uporabe retrotranspozona R2, ki vstavlja gene v ponavljajoče se ribosomske RNA kodirajoče dele genoma (rDNA). Nekatera območja rDNA veljajo za »varna zatočišča«, saj vstavljanje genov v ta ciljna zaporedja, ki so v genu, prisotnem v genomu v stotinah kopij, ne ogroža celične funkcije. To tudi odpravlja težavo vstavljanja genov v druge dele genoma, ki lahko prekinejo in ovirajo normalno delo-

ROBOTI IZ ČLOVEŠKIH CELIC ODPIRAJO NOVA VRATA V MEDICINI

Manca Špegel

Nova raziskava je pokazala, da lahko miniaturni biološki robot, pridobljen iz človeškega pljučnega epitelija, popravlja poškodovano tkivo in celi rane. Raziskovalci z Univerze Tufts (Massachusetts, ZDA) in Inštituta Wyss na Univerzi Harvard (Massachusetts, ZDA) so ustvarili večcelične biološke robote oz. biobote sferoidne oblike, znane kot antroboti (*anthrobots*), ki bi lahko preoblikovali prihodnost personalizirane in regenerativne medicine.

Vsak samonastajajoči antrobot je nastal iz ene same celice, ki se je po 14 dnevih gojenja v zunajceličnem matriksu nato sama razmnožila v večcelične strukture organoide. Raziskovalci so inducirali rast migetalk navzven, kar je omogočilo antrobotom premikanje na različne načine.

Pri raziskovanju potencialne uporabe antrobotov kot terapevtskega orodja so raziskovalci vzgojili plast živčnega tkiva, pridobljenega iz živčnih matičnih celic. Ugotovili so, da lahko ti bioboti interagirajo s celicami in spodbujajo ponovno rast poškodovanega živčnega tkiva tako, da pov-



vanje drugih genov. Kot rezultat so raziskovalci uporabili protein R2 – retrotranspozonski protein, ki vstavlja genski material v območje rDNA. Kljub temu, da imajo sesalci evolucijsko izgubljen R2, so raziskovalci proučili mnoge živalske vrste, da bi našli protein R2 z največjo specifičnostjo za območja rDNA pri človeku, kar so našli v genomih ptic (belogri vrabec in zebrica).

V človeške celice hTERT RPE-1 so sočasno transficirali mRNA z zapisom za protein R2 in ekspresijsko kaseto za poročevalski zeleni fluorescenčni protein (GFP). S pomočjo pretočne citometrije so potrdili, da so se funkcionalne kopije poročevalskega proteina izrazile. Vstavljanje ciljnega gena v območje rDNA so potrdili tudi z metodami verižne reakcije s polimerazo.

Končna tehnika se imenuje PRINT (*precise RNA-mediated insertion of transgenes*), kar pomeni natančno, z RNA-posredovano vstavljanje transgenov. Sestavljena je iz sistema dveh RNA, pri čemer prva RNA kodira protein R2, druga pa kodira transgen. Protein R2 prepozna ciljno mesto, za-reže verigo DNA ter začne sintezo komplementarne DNA za stabilno vstavitvev transgena.

Čeprav avtorji menijo, da bi lahko uporaba PRINT v pristopu h genski terapiji dopolnila obstoječe metode, so potrebne nadaljnje raziskave, kot je razumevanje, koliko genov rDNA je mogoče prekiniti, preden celica postane disfunkcionalna, ali kako dolžina transgena vpliva na učinkovitost vstavljanja, preden PRINT uporabimo kot popolnoma razvit pristop v genski terapiji.

Vir:

1. F. Myhill. *Guiding genes to a "safe harbor" with retrotransposons.* <https://www.regmednet.com/guiding-genes-to-a-safe-harbor-with-retrotransposons/> (dostop: 27. 2. 2024).

RAZVOJ CIKLIČNIH PEPTIDOV ZA CILJANO PERORALNO ZDRAVLJENJE

Filip Jereb

Znanstveniki so razvili inovativno strategijo za iskanje novih cikličnih peptidov, ki bi jih kot zdravilne učinkovine za sistemsko zdravljenje lahko aplicirali peroralno. Prednost takih učinkovin v primerjavi z običajnimi molekulami je v boljši vezavi na proteinske tarče brez globokih vezavnih žepov. Zaradi velike molekulske mase, njihove polarnosti in dov-

zetnosti za razgradnjo s proteazami je takih učinkovin zaenkrat malo.

Pri novi metodi namesto disulfidne vezi za ciklizacijo uporabimo stabilnejšo tioetrsko vez. Za sintetiziranje velikega števila potencialnih učinkovin uporabimo m naključnih peptidov, n bis-elektrofilov za njihovo ciklizacijo in o karboksilnih kislin za aciliranje cikličnega produkta. Po sintezi produkta testiramo na proteinski tarči, nato pa na osnovi strukture najboljših kandidatov izvedemo nov sintezni cikel.

Pri testiranju metode so med produkti identificirali potencialne zaviralce trombina in po nadaljnjem testiranju izdelali peptide z nanomolarno afiniteto do tarče, visoko stabilnostjo in dobro biološko uporabnostjo (18 % v podganah). S tem so pokazali, da lahko peptidne učinkovine, ki so specifične za proteinske tarče in jih lahko apliciramo peroralno, razvijemo *de novo* iz knjižnic cikličnih peptidov.

Vir:

1. *Development of cyclic peptides that can be administered orally to inhibit disease targets.* *Nat Chem Biol.* 2023 Dec 28.

EMA ODOBRILA NOVO ZDRAVILO ZA ZDRAVLJENJE VROČINSKIH OBLIVOV MED MENOPAVZO

Ana Radić

Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini pri Evropski agenciji za zdravila (EMA) je odobril prvo nehormonsko zdravilo za zdravljenje vročinskih oblivov, povezanih z menopavzo. Gre za učinkovino fezolinetant s tržnim imenom VEOZA™ podjetja Astellas Pharma. Uporablja se peroralno v odmerku 45 mg dnevno. Ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) je pozitivno oceno podala maja 2023.

Fezolinetant je nehormonski selektivni antagonist receptorja NK3. Preprečuje vezavo nevrokinina B (NKB) na kispoptin, nevrokinin B oz. dinorfin (KNDy) in tako vpliva na modulacijo nevrnske aktivnosti v hipotalamusu. Posledično se zmanjša znojenje in število ter intenzivnost vročinskih oblivov, kar imenujemo tudi vazomotorni simptomi (VMS), povezani z menopavzo. Raziskave navajajo, da se ti simptomi pojavljajo pri kar 56 do 97 % žensk v menopavzi v Evropi in lahko trajajo več let ter vplivajo na splošno



kakovost življenja. Novo zdravilo predstavlja torej pomemben korak pri zdravljenju in nadzoru zmernih do resnih vazomotornih simptomov.

Fezolinetant je primeren tudi za ženske, ki imajo zgodovino vaginalnih krvavitev, krvnih strdkov, kapi ali bolezni jeter in tako niso primerne kandidatke za zdravljenje s hormonsko terapijo, ki sicer velja za zlati standard pri zdravljenju vazomotornih simptomov. Pri tem je pomembno poudariti, da hormonska terapija pomaga pri številnih simptomih menopavze, medtem ko so fezolinetantu dokazali učinkovitost le proti vročinskimi obliivom in znojenju.

Evropska komisija je odobrila zdravilo na podlagi pozitivnega mnenja, ki ga je podal Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini v oktobru 2023, na podlagi rezultatov treh kliničnih raziskav, imenovanih SKYLIGHT, ki so preverjale dolgoročno varnost in učinkovitost zdravila med 3000 bolnicami v Evropi, ZDA in Kanadi. Kot najpogostejši neželeni učinek se je pojavil glavobol. Vpliv zdravila na razpoloženje, srčno-žilno, metabolno, urinarno zdravje in kosti še ni popolnoma raziskan, zato bodo potrebne še nadaljnje raziskave.

Viri:

1. *European pharmaceutical review.*
<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/175159/astellas-reports-effectiveness-of-potential-treatment-for-vms/> (dostop: 29. 2. 2024).
2. *European Pharmaceutical Review.*
https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/190066/astellas-secures-ec-approval-for-vms-treatment-fezolinetant/?fbclid=IwAR1TmDuk6UDX3RpJU9Tp3T4wOqzPM8QIRj_hzD-t4WdhYCFnl6i7gA-YsLU (dostop: 29. 2. 2024).
3. *American Pharmacist Association.*
https://www.pharmacist.com/Publications/Pharmacy-Today/Article/first-in-class-fezolinetant-brings-women-a-new-nhormonal-therapy-for-hot-flashes?fbclid=IwAR1mL_kw936Wi2ik9-hdTqzOtmFNpsRydlwWIXuls2Gp_REbKzelcKmmazw (dostop: 29. 2. 2024).

CEFEPIM-TANIBORBAKTAM: POTENCIALNO NOVO ZDRAVILO ZA ZDRAVLJENJE TEŽJIH URINARNIH INFEKCIJ

Liza Gačević

Farmacevtska stroka je razvila že več zdravil za terapijo urinarnih infekcij, vendar bakterije vedno znova razvijajo rezistenco. Zato so se podali v reševanje te težave.

Nedavna raziskava, imenovana CERTAIN-1, je nakazala pozitivne rezultate za potencialno novo zdravilo z učinkovinama cefepimom in taniborbaktamom. Združili so beta laktam in beta laktamazni inhibitor ter učinkovitost primerjali z delovanjem meropenema.

Kombinacija cefepima in taniborbaktama je pokazala večjo učinkovitost – o uspešnem zdravljenju so poročali pri kar 70,6 % bolnikov, medtem ko je bila uspešnost v kontrolni skupini 58,0-odstotna. Pozornost je pritegnila večja učinkovitost proti bakterijam iz rodu *Enterobacterales* in vrsti *Pseudomonas aeruginosa*. Tako kot pri vseh zdravilih, so tudi v tej raziskavi poročali o neželenih učinkih, kot so glavobol, slabost, driska, zaprtje in hipertenzija.

Zdravilo je še vedno v preskušanju in potrebne so nadaljnje raziskave. Raziskovalci pa na tej stopnji zaključujejo, da zdravilo kaže veliki potencial in daje upanje za učinkovitejše zdravljenje zapletenih urinarnih infekcij.

Vir:

1. *Medriva.* <https://medriva.com/diseases/cefepime-taniborbactam-a-potential-game-changer-in-treating-complicated-utis/> (dostop: 29. 2. 2024).

24. FARMA-SKI 2024

Nataša Čater



Celjska podružnica Slovenskega farmacevtskega društva ima v svojem okrilju Organizacijski odbor za pripravo dogodka FarmaSki v sestavi Marina Urbanc, Simona Rajter Lipovšek, Dušan Hus in Nataša Čater, ki je predsednica odbora. Odbor je 27. januarja 2024 organiziral letos že 24. Farma-ski, strokovno-rekreativno prireditev, ki je namenjena članom Slovenskega farmacevtskega društva. Farma-ski se je začel v Mariborski podružnici, ki je na Pohorju izvedla deset dogodkov in nato predala organizacijo Celjski podružnici SFD, ki pa jih je organizirala sedaj že 14. Vsako leto prireditev privabi veliko udeležencev, ki se vključijo v dve ponujeni zimski aktivnosti: smučanje in zimski pohod.

Sneženo smučišče Rogle nam je v pravi zimski idili ponudilo lep zimski dogodek, pa še vreme nam je služilo in pripomoglo k popolnosti dogodka.

Organizirali smo smučarsko tekmovanje, ki se ga je udeležilo 110 članov na progi Jasa. Tekmovali smo v različnih starostnih kategorijah, ločeno po spolu, ter eni kategoriji deskarjev na snegu. Udeleženci zimskega pohoda, ki jih je bilo 50, pa so se vodeno namenili po gozdnih poteh Pohorja do Mašin žage in na dvournem pohodu doživeli zimске radosti Rogle.

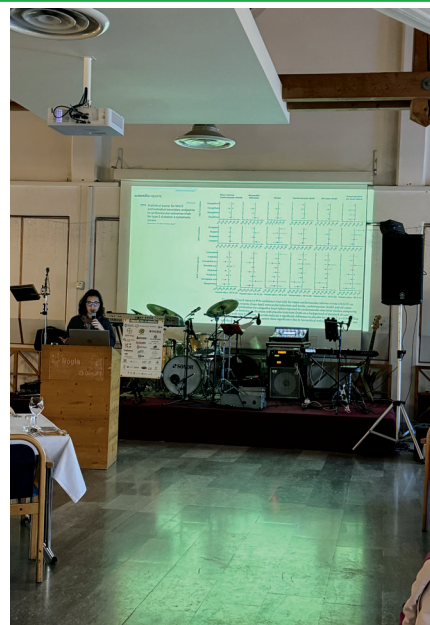
Farma-ski 2024 smo dopolnili s strokovnim delom. Predavanje »Sladkorna bolezen tipa 2 in debelost: kaj je kura in



kaj jajce? (dileme zdravljenja), je izvedla asist. dr. Jana Makuc, dr. med., univ. dipl. biol., spec. int., iz Bolnišnice Topolšica.

Z letošnjo udeležbo 160 članov smo zelo zadovoljni, saj je število udeležencev preseglo udeležbo prejšnjih let. Dogodek nas povezuje znotraj stroke in vsi smo se strinjali, da ohranimo tradicijo tudi v prihodnje.

Takšna druženja so nam vir energije za dobro počutje v lekarniški dejavnosti in prav je, da jih ohranjamo in s tem krepimo naše poslanstvo. Vsak zaključek pa je hkrati tudi nov začetek, kar pomeni, da smo že določili datum za naslednje leto, ko se zopet srečamo na 25. Farma-ski 2025 v soboto, 1. februarja 2025.



NAPOVEDNIK DOGODKOV SFD

- ☀ **Simpozij ob 49. skupščini SFD,**
Portorož, 16. do 18. maj 2024
IZBRANE NOVOSTI NA PODROČJU FARMACIJE, NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI:
ALZHEIMERJEVA BOLEZEN IN MULTIPLA SKLEROZA – KJE SMO DANES?,
OČESNE BOLEZNI
- ☀ **Simpozij Sekcije farmacevtskih tehnikov,**
Rogla, 14. in 15. junij 2024
SKRB ZA ZDRAVJE
- ☀ **Simpozij Sekcije za zgodovino farmacije pri SFD,**
Fakulteta za farmacijo, 19. september 2024
ZGODOVINSKE ZBIRKE, ARHIVSKO GRADIVO in AKTUALNA PROBLEMATIKA
NA PODROČJU ZGODOVINE FARMACIJE (delovni naslov)
- ☀ **Simpozij Sekcije farmacevtov javnih lekarn pri SFD,**
Ljubljana, 15. oktober 2024
PALIATIVA (delovni naslov)

- ☀ Na spletni strani **www.sfd.si** si lahko ogledate posnetek dogodka NA STIČIŠČU
DISCIPLIN (brez licenčnih točk) in 2 predavanji za licenčne točke: POMEMBNE NOVOSTI
NA PODROČJU MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV – OBVEZNOSTI GOSPODARSKIH
SUBJEKTOV ter POMEN POROČANJA O DOMNEVNIH NEŽELENIH UČINKIH ZDRAVIL
- ☀ Gorenjska podružnica bo v septembru 2024 za vse člane društva organizirala
tradicionalne FarmaHribe.
- ☀ Ne pozabite, da je 26. septembra 2024 že 20. dan slovenskih lekarn. Načrtujte aktivnosti
za promocijo poklica čez celo leto.
- ☀ Napovedujemo tudi mednarodno CESPT konferenco, ki jo bosta soorganizirala SFD in
FFA v septembru leta 2025.
- ☀ 10. BBBB konferenca pa bo letos od 12. do 14. septembra v Estoniji.





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 lekarne in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

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

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si



KEMOFARMACIJA
a PHOENIX company