



ODGOVORNA UREDNICA:  
Mojca Kerec Kos

GLAVNA UREDNICA:  
Dunja Urbančič

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

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

Prispevki v Farmacevtskem vestniku so odprto dostopni v skladu s licenco CC BY-NC 4.0.



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.

Leto 2025 se je komaj začelo, pa smo že v mesecu marcu in pred vami je prva letošnja številka Farmacevtskega vestnika.

V izvirnem znanstvenem članku so predstavljeni rezultati analize infuzijskih reakcij pri parenteralnem dajanju citostatikov pri bolnikih, zdravljenih na Onkološkem inštitutu Ljubljana med letoma 2019 in 2023. Kot boste lahko prebrali, se incidenca infuzijskih reakcij med različnimi skupinami citostatikov znatno razlikuje. Sledijo pregledni znanstveni članki. Prvi predstavlja bakterijske topoizomeraze tipa II predvsem z vidika njihove aktualnosti kot tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Naraščanje bakterijske odpornosti omejuje uporabnost kinolonov, najpogosteje uporabljenih zaviralcev topoizomeraz, zato so potrebne nove rešitve. Naslednji članek osvetljuje vlogo encimov sialil- in fukoziltransferaz pri rakavih obolenjih. Spremembe v izražanju teh encimov so prisotne pri številnih rakavih obolenjih in lahko vplivajo na celično adhezijo, proliferacijo, gijbljivost, ožiljenost tumorja in sposobnost rakavih celic, da se izognejo imunskemu sistemu, s čimer se krepi njihov metastatski potencial. Članek o novih pristopih k zdravljenju Alzheimerjeve bolezni predstavlja rezultate raziskav o vplivu polimernih nanodelcev, nanodelcev zlata in železovega oksida na tarče, povezane z razvojem bolezni, kot sta amiloid  $\beta$  in protein tau. Ti nanotehnološki pristopi ponujajo obetavne možnosti za prihodnji razvoj terapij. Sledi prispevek o induciranih pluripotentnih matičnih celicah, ki nastanejo z reprogramiranjem somatskih celic v pluripotentno stanje, kar omogoča njihovo diferenciacijo v različne tipe celic ob ohranjanju dedne informacije posameznika. Kljub omejitvam imajo te celice velik potencial za razvoj novih terapevtskih pristopov in personaliziranih oblik zdravljenja. Zadnji prispevek obravnava klinično biokemijo kot del usposabljanja farmacevtov, čeprav to področje v strokovni javnosti pogosto ni prepoznano kot kompetenca magistrov farmacije. Prispevek osvetljuje razvoj laboratorijske medicine v evropskem in slovenskem prostoru ter organiziranost njenega izobraževanja, ki se je pri nas začelo v okviru študija farmacije. Na koncu sledijo še novice iz sveta farmacije in društvene vesti.

Kmalu bomo vstopili v pomlad. Naj vas sončni dnevi, prvi pomladni cvetovi in petje ptic napolnijo z energijo za nove uspehe – tako na delovnem mestu kot med vašimi najbližjimi.

prof. dr. Mojca Kerec Kos, odgovorna urednica



## VSEBINA / CONTENT

### IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI / ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 3** Andreja Eberl, Lea Kadiš, Mojca Kerec Kos  
Infuzijske reakcije po parenteralni aplikaciji kemoterapevtikov na Onkološkem inštitutu Ljubljana med leti 2019 in 2023  
*Infusion reactions following parenteral administration of chemotherapeutic agents at the Institute of Oncology Ljubljana between 2019 and 2023*

### PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI / REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 10** Maša Zorman, Nikola Minovski, Marko Anderluh, Stanislav Gobec, Martina Hrast Rambaher  
Boj proti bakterijski odpornosti: ali so bakterijske topoizomeraze tipa II še zanimive tarče?  
*The fight against bacterial resistance: are bacterial type II topoisomerases still interesting targets?*
- 22** Tilen Čuš, Nina Kočevar Glavač, Janez Mravljak  
Vloga fukozil- in sialiltransferaz pri rakavih obolenjih in procesu metastaziranja  
*The role of fucosyl- and sialyltransferases in cancer and metastasis*
- 30** Sebastjan Nemeč, Damijan Knez, Petra Kocbek, Slavko Kralj  
Nanotehnološki pristopi za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni  
*Nanotechnology-based approaches for the treatment of Alzheimer's disease*
- 39** Jaka Rotman, Zala Krajšek, Dunja Urbančič  
Inducirane pluripotentne matične celice pri odkrivanju in vrednotenju zdravilnih učinkovin  
*Induced pluripotent stem cells in drug discovery*
- 49** Borut Božič, Tjaša Debelak  
Farmacevtske kompetence s področja laboratorijske medicine: razvoj, izobraževanje in pomen klinične biokemije  
*Pharmaceutical competencies in laboratory medicine: development, education, and the importance of clinical biochemistry*

### NOVICE IZ SVETA FARMACIJE IN DRUŠTVENE VESTI

# INFUZIJSKE REAKCIJE PO PARENTERALNI APLIKACIJI CITOSTATIKOV NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA MED LETI 2019 IN 2023

## INFUSION REACTIONS FOLLOWING PARENTERAL ADMINISTRATION OF CYTOSTATIC DRUGS AT THE INSTITUTE OF ONCOLOGY LJUBLJANA BETWEEN 2019 AND 2023

AVTORJI / AUTHORS:

Andreja Eberl, mag. farm., spec.<sup>1</sup>

Lea Kadiš, mag. farm.<sup>2</sup>

prof. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Onkološki inštitut Ljubljana,  
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: aeberl@onko-i.si



### POVZETEK

Nekatera protitumorna zdravila, ki jih apliciramo parenteralno, predstavljajo tveganje za pojav infuzijskih reakcij, ki so pogost vzrok prekinitve zdravljenja pri bolnikih z rakom. Izvedli smo retrospektivno analizo infuzijskih reakcij na Onkološkem inštitutu Ljubljana med leti 2019 in 2023. V raziskavo smo vključili vse bolnike, ki so v navedenem časovnem obdobju med parenteralno aplikacijo citostatikov doživeli infuzijsko reakcijo. Med bolniki, ki so prejeli 14 različnih citostatičnih učinkovin, je bila infuzijska reakcija poročana v 403 primerih. Najvišjo incidenco infuzijskih reakcij (7,42 %) smo zabeležili pri pegilirani liposomalni obliki doksorubicina, najnižjo pa pri ciklofosfamidu (0,06 %). Infuzijske reakcije so bile pri antraciklinih in taksanih najpogostejše v prvem oziroma drugem ciklu terapije, pri platinovih spojinah pa v poznejših ciklih. Pri večini zdravilnih učinkovin, razen pri platinovih spojinah, so bolniki po pojavu infuzijske reakcije še isti dan nadaljevali s kemoterapijo, pri čemer so se infuzijske reakcije redko ponovile.

### KLJUČNE BESEDE:

incidenca, infuzijska reakcija, neželeni učinek, parenteralna kemoterapija

### ABSTRACT

Several anticancer therapies administered by the parenteral route carry a risk for infusion reactions, which are common cause of treatment interruption for patients with cancer. The study included all patients who experienced an infusion reaction during parenteral administration of chemotherapy during this period. In patients who received 14 different cytostatic drugs, infusion reactions occurred in 403 cases. The highest incidence of infusion reactions (7.42%) was observed with pegylated liposomal doxorubicin, and the lowest with cyclophosphamide (0.06%). Infusion reactions occurred most frequently during the first or second cycle of therapy with anthracyclines and taxanes and in later cycles with platinum compounds. For most therapeutic agents, except for platinum compounds, patients were able to continue chemotherapy on the same day after the



onset of an infusion reaction, with recurrence being rare.

**KEY WORDS:**

adverse drug reaction, incidence, infusion reactions, parenteral chemotherapy

# 1 UVOD

Za rakavimi obolenji v Sloveniji letno zbolijo približno 17.000 ljudi (1). So drugi najpogostejši vzrok smrti v zadnjih letih (1, 2). Pri zdravljenju pri mnogih bolnikih uporabljajo parenteralne citostatike, ki lahko ob aplikaciji povzročijo infuzijske reakcije (IR). To so nepričakovane reakcije, ki jih ne moremo razložiti s pomočjo znanega mehanizma delovanja zdravilne učinkovine (3). Po mehanizmu nastanka ločimo imunsko in ne-imunsko posredovane. Do pojava IR lahko pride po parenteralni aplikaciji kateregakoli systemskega zdravila za zdravljenje raka, se pa glede na literaturne podatke pogostost tovrstnih reakcij med posameznimi zdravilnimi učinkovinami precej razlikuje. Znaki IR se lahko različno izrazijo in jih po kriteriju Skupnih terminoloških meril za neželene dogodke (angl. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, CTCAE) verzije 5.0 delimo glede na resnost na pet stopenj (preglednica 1) (3–5).

Ob pojavu IR so lahko prizadeti različni organski sistemi. Izraženi so lahko npr. kardiovaskularni učinki (hipotenzija, tahikardija), učinki na kožo (rdečica, urtikarija), gastrointestinalni učinki (slabost, bruhanje), respiratorni učinki (dispneja, bronhospazem) ali nevrološki učinki (omedlevica, glavobol) (3, 6). Najbolj resna oblika IR je anafilaksija, ki se

razvije zelo hitro in brez takojšnjega ustreznega ukrepanja vodi do življenjsko ogrožajočih stanj. Nekateri citostatiki povzročajo anafilaksijo pogosteje, to so predvsem platinove spojine in taksani (6). Hitreje kot se izrazijo kakršnikoli znaki preobčutljivosti, intenzivnejša je po navadi reakcija. Če se znaki pokažejo že v prvih minutah, je možnost, da se razvije anafilaksija, največja (7). Čeprav so simptomi infuzijskih reakcij podobni, je pomembno, da prepoznamo kritične znake, ki nakazujejo na anafilaksijo, da lahko pravočasno ukrepamo (7, 8). Mehanizma infuzijske reakcije zgolj na podlagi klinične slike pogosto ni mogoče razbrati, vendar so nekateri simptomi (npr. vročina, mrzlica, glavobol) za anafilaksijo manj značilni (6).

V sklopu citostatične terapije se srečujemo tudi s premedikacijo in desenzibilizacijo. Premedikacija je proces, ki ga rutinsko izvajamo pred samo kemoterapijo, z namenom znižanja tveganja za pojav IR. V sklopu premedikacije z namenom preprečevanja IR bolniki najpogosteje prejmejo antihistaminike, glukokortikoide in antipiretike, ki jih apliciramo peroralno ali parenteralno v različnih časovnih obdobjih pred začetkom cikla kemoterapije (3). Z desenzibilizacijo običajno poskušamo preprečiti ponovni pojav IR in tako vzpostaviti začasno toleranco na citostatično učinkovino. Sam postopek je dolgotrajen, saj pričnemo z aplikacijo zelo majhnega deleža odmerka, ki ga preko več ur povečujemo do končnega odmerka zdravila. Nujna je prisotnost usposobljenega osebja, ki hitro prepozna IR, saj se moramo zavedati, da vseeno bolniku apliciramo snov, na katero je že izrazil preobčutljivost (9).

Ker takoj ob pojavu IR ne moremo napovedati njene stopnje, je pomembno, da ob pojavu kateregakoli simptoma ali znaka z infuzijo citostatika takoj prekinemo. Pri tem ohranimo možnost intravenskega dostopa, saj je v večini primerov potrebna intravenska aplikacija zdravil za lajšanje simptomov IR. Infuzijske reakcije stopnje 1 ali 2 po CTCAE 5.0 po prekinitvi blažimo simptomatsko. Pri tem najpogo-

*Preglednica 1: Klasifikacija infuzijskih reakcij po kriteriju CTCAE 5.0; povzeto po (5).*

*Table 1: Classification of infusion reactions according to CTCAE 5.0; adapted from (5).*

STOPNJA INFUZIJSKE REAKCIJE	OPIS INFUZIJSKE REAKCIJE
Stopnja 1	Blaga reakcija, ki ne zahteva prekinitve infuzije ali drugega ukrepanja
Stopnja 2	Prekinitiv infuzije, bolnik se dobro odziva na simptomatsko zdravljenje
Stopnja 3	Odziv na simptomatsko zdravljenje ni takojšen, simptomi se po začetnem izboljšanju poslabšajo, potrebna je hospitalizacija
Stopnja 4	Življenje ogrožajoče posledice, nujno takojšnje ukrepanje
Stopnja 5	Smrt

CTCAE – Skupna terminološka merila za neželene dogodke (angl. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*)



steje uporabimo antihistaminike in kortikosteroide, z infuzijo pa nadaljujemo, ko izzvenijo vsi znaki reakcije. Nadaljevanje infuzije poteka pod še strožjim nadzorom, z manjšo hitrostjo in eventualno dodatno premedikacijo (3, 6, 10, 11). V primeru IR višje stopnje v večini primerov z infundiranjem ne nadaljujemo več, saj je tveganje za ponovni pojav IR preveliko (3).

Infuzijske reakcije med aplikacijo parenteralnega citostatika ne predstavljajo le za bolnika zelo neprijetnega zapleta zdravljenja, temveč njihovo obvladovanje podaljšuje hospitalizacije, povečuje stroške in povzroča večjo delovno obremenitev osebja. Z namenom potencialne optimizacije postopkov obvladovanja in dokumentiranja IR ob parenteralni aplikaciji citostatikov smo se na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OI) odločili analizirati incidenco IR in njihovo obvladovanje.

## 2 MATERIALI IN METODE

Na OI smo izvedli retrospektivno raziskavo, v katero smo vključili 403 bolnike, ki so med leti 2019 in 2023 med aplikacijo parenteralnega citostatika doživeli IR, o kateri je bilo poročilo v skladu z internim standardnim operativnim postopkom posredovano na Javno agencijo Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP). Protokol raziskave je bil odobren na Komisiji za strokovno oceno protokolov raziskav na OI (ERID-KSOPR-0028/2024) in Etični komisiji OI (ERID-EK-0034/2024). Nabor bolnikov smo pridobili iz aplikacije [www.nuz.si](http://www.nuz.si), s pomočjo katere na OI poročamo neželene učinke zdravil JAZMP. Za vsako IR pri posameznem bolniku smo iz bolnišnične medicinske dokumentacije pridobili naslednje podatke:

- shema zdravljenja ter pripadajoča premedikacija,
- opis in stopnja IR, ki smo jo določili glede na kriterij CTCAE 5.0 oziroma ob poročanju neželenega učinka JAZMP (preglednica 1),
- cikel systemskega zdravljenja, v katerem se je pojavila IR,
- nadaljevanje terapije še isti dan ali v naslednjih ciklih ter ponoven pojav IR.

Za izračun incidence IR smo iz bolnišničnega informacijskega sistema za vsako učinkovino pridobili podatek, koliko bolnikov jo je prejelo med leti 2019 in 2023. Izrazili smo jo kot delež bolnikov, pri katerih pride do pojava IR.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Na OI Ljubljana je bilo med leti 2019 in 2023 poročanih 403 primerov IR, do katerih je prišlo ob aplikaciji 14 različnih citostatičnih učinkovin pri skupno 25.085 bolnikih. Nekatero zdravilno učinkovino se uporabljajo veliko pogosteje kot druge, npr. ciklofosamid, karboplatin in paklitaksel so bili uporabljeni pri desetkrat več bolnikih kot vinorelbin (preglednica 2). Med zdravilnimi učinkovinami se precej razlikuje tudi število in incidenca IR. Incidenca IR je bila najnižja pri ciklofosamidu (0,06 %) ter najvišja pri pegiliranem liposomalnem doksorubicinu (7,42 %). Incidenco IR višjo od 5 % sta imela le pegiliran liposomalni doksorubicin in oksaliplatin. Kar 8 od 14 učinkovin je imelo incidenco nižjo od 1 % in za te zdravilne učinkovine zasledimo podoben trend tudi v literaturi, kjer je manj podatkov o njihovih incidencah IR, bodisi zaradi manj pogoste uporabe ali pa zaradi manjšega tveganja za IR (3).

Glede na resnost smo IR po kriteriju CTCAE 5.0 razvrstili v različne stopnje, kar je prikazano v preglednici 3. Od 403 bolnikov, ki so doživeli IR, je prišlo pri 357 bolnikih (88,59 %) do pojava IR stopnje 2 po CTCAE 5.0. Veliko manj bolnikov, in sicer 46 (11,41 %) je doživelo IR višje stopnje. Infuzijske reakcije stopnje 5 po CTCAE 5.0, ki predstavljajo smrt bolnika, in stopnje 1, pri katerih z infundiranjem ob pojavu IR ne prekinemo, niso bile poročane. Pri nekaj bolnikih se je IR ponovila med nadaljevanjem infundiranja zdravila znotraj istega dneva ali v naslednjem ciklu zdravljenja, kot je razvidno iz preglednice 4. Z namenom prikaza porazdelitve resnosti IR smo v preglednici 3 upoštevali najvišjo poročano stopnjo IR.

Če se osredotočimo zgolj na zdravilne učinkovine, kjer so bile IR pogostejše, jih lahko v splošnem razdelimo na tri farmakološke skupine – taksane, platinove spojine in antracikline. Podrobnejši prikaz podatkov o IR pri teh treh farmakoloških skupinah citostatikov je predstavljen v preglednici 4.

Po literaturnih podatkih naj bi bila incidenca IR ob aplikaciji taksanov tudi do 50 %, pri čemer se najpogosteje navaja incidenca med 5–10 % (12–14). V naši raziskavi je incidenca IR na docetaksel znašala 1,20 % in na paklitaksel 3,10 %, kar je nižje od zgoraj navedenih literaturnih podatkov. Do IR je pri teh zdravilnih učinkovinah prihajalo v prvem ciklu terapije, kar sovпада z že znanimi podatki (12–14). Več kot 70 % bolnikov je lahko terapijo nadaljevalo že isti dan, še višji je delež bolnikov, ki so nadaljevali s te-



**Preglednica 2:** Incidenca infuzijskih reakcij med aplikacijo parenteralnega citostatika na Onkološkem inštitutu Ljubljana med leti 2019 in 2023.

**Table 2:** The incidence of infusion reactions during parenteral administration of chemotherapy at the Institute of Oncology Ljubljana between 2019 and 2023.

Zdravilna učinkovina	Število bolnikov	Število infuzijskih reakcij	Incidenca
Pegilirani liposomalni doksorubicin	512	38	7,42 %
Oksaliplatin	2084	144	6,91 %
Paklitaksel	3127	97	3,10 %
Karboplatin	3330	65	1,95 %
Irinotekan	865	11	1,27 %
Docetaksel	1166	14	1,20 %
Vinorelbin	311	3	0,96 %
Etopozid	1416	6	0,42 %
Cisplatin	2603	10	0,38 %
Epirubicin	709	2	0,28 %
Doksorubicin	2582	6	0,23 %
Vinkristin	1554	3	0,19 %
Fluorouracil	1534	2	0,13 %
Ciklofosamid	3292	2	0,06 %

rapijo s taksani tudi v naslednjih ciklih (> 80 %). Ob naslednjih ciklih se je IR ponovno pojavila redkeje, saj bolniki prejmejo intenzivirano premedikacijo z antagonisti H<sub>1</sub> in H<sub>2</sub> ter kortikosteroidi in/ali nižjo hitrostjo infundiranja taksana.

Pri pregledu rezultatov za platinove spojine že na prvi pogled izstopa oksaliplatin, pri katerem je incidenca IR 6,91 %, sledi karboplatin z incidenco 1,95 %, medtem ko je ob aplikaciji cisplatina prišlo do IR le v 0,38 %. Ti rezultati so bistveno nižji glede na podatke v literaturi, kjer je incidenca na platinove spojine približno 19 % (12). Vseeno vidimo podoben trend, kot je izpostavljen v literaturi, in sicer, da so IR najpogostejše pri oksaliplatinu, sledi karboplatin, najnižjo incidenco pa ima cisplatin (3). V literaturi zasledimo, da ob uporabi platinovih spojin pride do IR najpogosteje okoli 7. cikla terapije (15), kar je bilo primerljivo z

rezultati v naši raziskavi, kjer je bila mediana cikla terapije ob pojavu IR pri oksaliplatinu v 6. ciklu, pri karboplatinu pa v 8. ciklu. Odstopal je le cisplatin, kjer so se IR pojavljale v 4. ciklu (mediana), a je treba izpostaviti, da je bilo število IR pri cisplatinu veliko manjše kot pri ostalih dveh platinovih spojinah in je posledično rezultat manj reprezentativen. Nadaljevanje s terapijo je pri platinovih spojinah bistveno manj pogosto kot pri taksanih in antraciklinih, saj je s terapijo še isti dan nadaljevalo največ 20 % bolnikov, največ 40 % bolnikov pa jih je vstopilo v naslednje cikle terapije. Podatki iz literature sicer navajajo, da se po pojavu resnih IR izogibajo ponovni uporabi platinovih spojin, predvsem zaradi dejstva, da naj bi prišlo do ponovne IR ob uporabi teh zdravilnih učinkovin pri okoli 50 % bolnikov, kljub dodatni premedikaciji (10). Ustrenejši pristop predstavlja napotitev bolnika na postopek desenzibilizacije (6). V naši

**Preglednica 3:** Porazdelitev resnosti infuzijskih reakcij po kriteriju CTCAE 5.0.

**Table 3:** Distribution of infusion reactions by severity grades based on CTCAE 5.0 criteria.

Stopnja infuzijske reakcije	Stopnja 1	Stopnja 2	Stopnja 3	Stopnja 4	Stopnja 5
Število bolnikov	0	357	43	3	0
Delež bolnikov	0,0 %	88,6 %	10,7 %	0,7 %	0,0 %

CTCAE – Skupna terminološka merila za neželene dogodke (angl. Common Terminology Criteria for Adverse Events)

Preglednica 4: Podrobnejši prikaz podatkov o infuzijskih reakcijah (IR) po farmakoloških skupinah citostatikov.

Figure 4: Detailed overview of infusion reaction data by pharmacological groups of cytostatics.

Farmakološka skupina	Zdravilna učinkovina	Število IR	Incidenca IR	Cikel terapije, ko se pojavi IR; mediana (razpon)	Nadaljevanje infundiranja citostatika isti dan; N (%)	IR se ponovi; N (%)	Infundiranje citostatika v naslednjem ciklu; N (%)	IR se ponovi; N (%)
<b>Taksani</b>	Docetaksel	14	1,20 %	1 (1–2)	13/14 (93 %)	0/13 (0 %)	12/14 (86 %)	2/12 (17 %)
	Paklitaksel	97	3,10 %	1 (1–12)	71/97 (73 %)	3/71 (4 %)	79/97 (81 %)	13/79 (16 %)
<b>Antraciklini</b>	Doksorubicin	6	0,23 %	2 (1–4)	4/6 (67 %)	1/4 (25 %)	4/6 (67 %)	0/4 (0 %)
	PEG doksorubicin	38	7,42 %	1 (1–2)	36/38 (95 %)	4/36 (11 %)	32/38 (84 %)	2/32 (6 %)
	Epirubicin	2	0,28 %	1,5 (1–2)	1/2 (50 %)	0/1 (0 %)	1/2 (50 %)	0/1 (0 %)
<b>Platinove spojine</b>	Cisplatin	10	0,38 %	4 (1–12)	2/10 (20 %)	0/2 (0 %)	4/10 (40 %)	3/4 (75 %)
	Karboplatin	65	1,95 %	8 (2–19)	4/65 (6 %)	0/4 (0 %)	14/65 (22 %)	2/14 (14 %)
	Oksaliplatin	144	6,91 %	6 (1–28)	10/144 (7 %)	1/10 (10 %)	56/144 (39 %)	12/56 (21 %)

PEG – pegilirana liposomalna oblika

raziskavi je bila incidenca IR ob ponovni izpostavitvi platinovim spojinam večinoma nekoliko nižja, in sicer 14 % pri karboplatinu in 21 % pri oksaliplatinu.

Med antraciklini smo obravnavali epirubicin in doksorubicin, slednjega v standardni in pegilirani liposomalni obliki. Do razvoja pegilirane oblike je prišlo, ker ima prosta oblika doksorubicina kratek razpolovni čas, po infuziji pa doseže visoko plazemsko koncentracijo in se posledično hitro porazdeli tako v tumorsko tkivo kot tudi v ostala tkiva. Pri tem se lahko pojavi resna kardiotoksičnost, ki je posledica delovanja reaktivnih kisikovih spojin na celice srčne mišice. Z razvojem pegilirane liposomalne oblike se je bistveno podaljšal razpolovni čas zdravilne učinkovine, hkrati je prisotnega manj prostega doksorubicina. Liposomalna oblika

v manjši meri prehaja v ostala tkiva, kar vpliva na pojavnost neželenih učinkov, še vedno pa dobro prehaja do tumorskih tkiv, kjer medcelični stiki niso tako tesni. Težava te oblike pa je, da pogosto povzroča IR, medtem ko jih standardna prosta oblika doksorubicina povzroča zelo redko (16, 17). Sklepamo, da do pogostejšega pojava IR pride zaradi formulacije doksorubicina in ne zaradi zdravilne učinkovine same, saj bi bila v tem primeru incidenca IR primerljiva za obe obliki. Sam mehanizem IR na pegilirano liposomalno obliko sicer ni znan, sklepajo pa, da je za višjo incidenco IR odgovoren polietilen glikol, ki lahko povzroči preobčutljivost preko aktivacije sistema komplementa (18). V skladu s temi podatki smo tudi v naši raziskavi najvišjo incidenco IR med antraciklini zabeležili pri pegiliranem liposomalnem



doktorubicinu, in sicer 7,42 %. Najpogosteje so se IR pojavljale v prvem ciklu terapije. V literaturi se incidenca IR na pegilirano liposomalno obliko doksorubicina giblje okoli 9–14 %, naši podatki pa se skladajo tudi s predhodnimi podatki o pojavu IR v prvem ciklu terapije (3). Velika večina bolnikov je terapijo z antraciklini nadaljevala tako isti dan kot tudi ob naslednjih ciklih terapije, aplikacije pa so potekale ob intenzivnejši premedikaciji in počasnejšem infundiranju zdravila. Ponovne IR za pegilirano liposomalno obliko doksorubicina niso značilne, tudi v našem vzorcu se je IR pojavila le pri 6 % bolnikov, ki so v predhodnih ciklih že doživeli IR.

Naša raziskava ima tudi nekaj omejitev. Ob primerjavi rezultatov s podatki iz literature smo opazili, da so podatki o IR le redko objavljeni, tisti, ki pa so na voljo, ne vključujejo vseh informacij, potrebnih za neposredno primerjavo, pri čemer manjkajo predvsem podatki o premedikaciji in izvedenih ukrepih ob pojavu IR. Pri zdravilnih učinkovinah z nizkim številom IR so razen izračuna incidence IR izračuni ostalih parametrov manj zanesljivi. Če pogledamo na primer statistiko o nadaljevanju terapije z neko zdravilno učinkovino v naslednjih ciklih, je zanesljivost izračunanih parametrov bistveno različna, če sta bili zaznani zgolj dve IR ali pa jih je bilo več kot sto. Če bi v raziskavo vključiti vse slovenske bolnišnice, ki izvajajo onkološko zdravljenje, bi na ta način dobili večji vzorec bolnikov in s tem tudi več zapisov o IR. Mediano cikla ob pojavu IR na platinove spojine smo pri naših bolnikih sprva določili okoli tretje aplikacije učinkovine, kar pa se ni skladalo s podatki iz literature, kjer je bilo navedeno, da do IR po navadi pride okoli sedmega cikla. Zaradi navedenega neskladja smo se odločili, da pregledamo tudi predhodno terapijo bolnikov pred letom 2019. Ugotovili smo, da je veliko bolnikov, ki so prejeli platinove spojine in so doživeli IR v prvem ali drugem ciklu terapije, v resnici to zdravilno učinkovino prejemale že v preteklosti. Ko smo upoštevali tudi te cikle terapije, smo prišli do bolj primerljivih rezultatov z literaturo. Prav tako ne moremo biti povsem prepričani, da so bile poročane vse IR po parenteralni aplikaciji citostatikov, saj tistih stopnje 1 po CTCAE 5.0 v naši raziskavi nismo zaznali. Opazili smo, da je ob IR stopnje 2 ali 3 bolnik večkrat naknadno omenil, da se je že ob predhodni aplikaciji zdravilne učinkovine počutil slabše oziroma je navedel kakšen simptom, ki bi lahko nakazoval na IR stopnje 1 že v prejšnjem ciklu terapije, vendar o tem takrat ni poročal. Čeprav protokol obravnave bolnika ob infuzijski reakciji predvideva obvezno izpolnjevanje poročila, na podlagi katerih smo ocenjevali incidenco IR, dopuščamo možnost, da je zaradi neporočanja dogodkov incidenca IR lažno nižja.

## 4 SKLEP

V retrospektivni analizi infuzijskih reakcij na OI med leti 2019 in 2023, v katero so bili vključeni 403 bolniki, smo največ IR zabeležili pri zdravljenju z oksaliplatinom (144), paklitakselom (97) in karboplatinom (65), ki jih v onkologiji uporabljamo pogosto, medtem ko je bila najvišja incidenca IR zabeležena pri pegilirani liposomalni obliki doksorubicina (7,42 %). Resnost večine IR je bila ocenjena kot stopnja 2 po CTCAE 5.0 (88,6 %), sledile so IR stopnje 3 (10,7 %), preostanek IR pa je bil stopnje 4 (0,7 %). Pri različnih zdravilnih učinkovinah v posamezni terapevtski skupini so si IR podobne glede na stopnjo IR, cikel pojava IR in nadaljevanja s terapijo. Za nekatere zdravilne učinkovine, kot so npr. doksorubicin, paklitaksel, docetaksel in epirubicin, lahko dokaj dobro predvidimo čas pojava IR, saj se pri njih skoraj vedno pojavijo v prvem ali drugem ciklu terapije. Malce težje je iz rezultatov sklepati na nastop IR pri platinovih spojinah, pri katerih se IR v splošnem pojavijo okoli sedmega cikla, a je razpon bistveno večji. Pri platinovih spojinah se lahko IR pojavi tudi ob ponovni infuziji učinkovine čez nekaj let.

## 5 LITERATURA

1. Rak v Sloveniji 2021. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2024. [Internet]. [cited 2024 Feb 25]. Available from: <https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/ras/lp/LetnoPorocilo2021.pdf>
2. Statistični urad Republike Slovenije. [Internet]. [cited 2024 Mar 20]. Available from: <https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/-/05L3016S.PX/>
3. Castells M, Matulonis U, Horton T. Infusion reactions to systemic chemotherapy [Internet]. UpToDate; 2023 [cited 2024 Mar 21]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/infusion-reactions-to-systemic-chemotherapy>
4. Jezeršek Novaković B, Pajk B: Sistemsko zdravljenje: Neželeni učinki. In: Onkologija: Učbenik za študente medicine. 1st ed. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2018. p. 293- 327.
5. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0 [Internet]. 2017 Nov 27 [cited 2024 Mar 27]. Available from: [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/CTCAE\\_v5\\_Quick\\_Reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf)

6. Barroso A, Estevinho F, Hespanhol V, Teixeira E, et al. Management of infusion-related reactions in cancer therapy: strategies and challenges [Internet]. *ESMO Open*. 2024 Mar [cited 2024 Apr 15];9(3). Available from: [https://www.esmooopen.com/article/S2059-7029\(24\)00690-2/fulltext](https://www.esmooopen.com/article/S2059-7029(24)00690-2/fulltext)
7. Lieberman P, Kemp SF, Oppenheimer J, Lang DM, Bernstein IL, Nicklas RA, et al. The diagnosis and management of anaphylaxis: An updated practice parameter, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 115, Issue 3, Supplement 2, 2005, S483-S523.
8. Kelso MJ. Patient education: Anaphylaxis symptoms and diagnosis (Beyond the basics) [Internet]. *UpToDate*. Last updated 2023 Mar 12 [cited 2024 Mar 28]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/anaphylaxis-symptoms-and-diagnosis-beyond-the-basics#topicContent>
9. Kopač P. Desenzibilizacija za zdravila. Zbornik sestanka Takojšnje reakcije med aplikacijo onkoloških in bioloških zdravil. Ljubljana: Alergološka in imunološka sekcija SZD; 2018. p. 54-57.
10. Lenz HJ. Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist*. 2007 May;12(5):601-9.
11. Roselló S, Blasco L, García Fabregat L, Cervantes A, Jordan K. Management of infusion reactions to systemic anticancer therapy: *ESMO Clinical Practice Guidelines*, *Annals of Oncology*, Volume 28, Supplement 4, 2017, iv100-iv118.
12. Boulanger J, Boursiquot JN, Cournoyer G, Lemieux J, Masse MS, Almanric K, et al. Comité de l'évolution des pratiques en oncologie. Management of hypersensitivity to platinum- and taxane-based chemotherapy: ceo review and clinical recommendations. *Curr Oncol*. 2014 Aug;21(4):e630-41.
13. Mendez S, Culmone K, Ramos R, Sweeney-Moore A. Hypersensitivity Reactions: Practice Recommendations for Paclitaxel Administration. *Clin J Oncol Nurs*. 2021 Dec 1;25(6):713-716.
14. Stehlin F, Sohi D, Gilbert L, Isabwe G. Hypersensitivity Reactions to Paclitaxel: Premedication Enhancement to Safely Achieve Treatment Completion, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 151, Issue 2, Supplement, 2023, AB334.
15. Pandey A, Bhosale B, Pandita V, Singh A, Ghosh J, Ghosh J, Bajpai J. Carboplatin hypersensitivity in relapsed ovarian carcinoma: A therapeutic challenge. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2014 Jan;35(1):17-20.
16. BC Cancer. Doxorubicin pegylated liposomal: Drug monograph [Internet]. [Cited 2024 Jun 25]. Available from: [http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Doxorubicin%20pegylated%20liposomal\\_monograph.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Doxorubicin%20pegylated%20liposomal_monograph.pdf)
17. Alhaja M, Chen S, Chin AC, et al. Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin after conventional doxorubicin exposure in patients with sarcoma and breast cancer. *Cureus*. 2023 Sep;15(9).
18. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*. 2003 Mar;14(9):1430-7.



# BOJ PROTI BAKTERIJSKI ODPORNOSTI: ALI SO BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE TIPA II ŠE ZANIMIVE TARČE?

## THE FIGHT AGAINST BACTERIAL RESISTANCE: ARE BACTERIAL TYPE II TOPOISOMERASES STILL INTERESTING TARGETS?

AVTORJI / AUTHORS:

Maša Zorman, mag. ind. farm.<sup>1,2</sup>

dr. Nikola Minovski, mag. farm.<sup>1</sup>

prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.<sup>2</sup>

prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.<sup>2</sup>

izr. prof. dr. Martina Hrast Rambaher, mag. farm.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Kemijski inštitut, Laboratorij za kemijsko informatiko,  
Teoretični odsek,  
Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana*

<sup>2</sup> *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: [martina.hrast-rambaher@ffa.uni-lj.si](mailto:martina.hrast-rambaher@ffa.uni-lj.si)



### POVZETEK

Topoizomeraze tipa II so pomembne tarče za protibakterijsko terapijo. Prvi zaviralci topoizomeraz tipa II, kinoloni in aminokumarini, so se na trgu pojavili že pred desetletji, vendar njihova uporabnost postopoma upada zaradi nizke učinkovitosti, neželenih učinkov in pojava bakterijske rezistence. Za premagovanje odpornosti in ohranjanje topoizomeraz kot zanimivih tarč, so ključne inovacije na tem področju – izboljšanje dosedanjih razredov učinkovin in odkrivanje novih tipov zaviralcev. V članku so predstavljeni različni razredi zaviralcev bakterijskih topoizomeraz, njihove prednosti in slabosti ter obeti za prihodnost.

### KLJUČNE BESEDE:

aminokumarini, kinoloni, novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz, protibakterijska terapija, zaviralci topoizomeraze tipa II

### ABSTRACT

Type II topoisomerases are important targets for antibacterial therapy. The first inhibitors of type II topoisomerases, quinolones and aminocoumarins, emerged more than half a century ago, but their use is now in slow decline due to toxic side effects, low effectiveness and emergence of bacterial resistance. Innovations in this field – improvement of already existing classes of antibacterials and discovery of novel classes of compounds, are essential for overcoming resistance and maintaining topoisomerases as viable targets. In this paper, we present various classes of bacterial topoisomerase inhibitors, their advantages and shortcomings, as well as future perspectives.

### KEY WORDS:

aminocoumarins, antibacterial therapy, novel bacterial topoisomerase inhibitors, quinolones, type II topoisomerase inhibitors

## 1 UVOD

Topoizomeraze so skupina esencialnih encimov, ki nadzirajo spremembo terciarne ali kvartarne strukture DNA in so pri-



sotni tako v evkariontskih kot v prokariontskih celicah (1). Udeležene so pri uravnavanju dodatnega zvijanja in razvijanja DNA med podvojevanjem in prepisovanjem DNA. Glede na prehodno stanje jih delimo v dve skupini – DNA-topoizomeraze tipa I, ki v prehodnem stanju cepijo eno samo verigo DNA, in DNA-topoizomeraze tipa II, ki naenkrat cepijo obe verigi dvovijačne DNA (2). Zaradi udeležnosti v osnovnih celičnih procesih so človeške topoizomeraze tipa II zanimive kot tarče za kemoterapijo rakavih obolenj, strukturne razlike med evkariontskimi in prokariontskimi topoizomerazami tipa II pa omogočajo selektivno ciljanje bakterij (2).

Prve protibakterijske učinkovine, usmerjene proti bakterijskim topoizomerazam tipa II, aminokumarini, so bile odkrite pred skoraj 75 leti (3). Tako kinoloni, najuspešnejši razred bakterijskih topoizomeraznih zaviralcev, kot aminokumarini so bili prvič registrirani v šestdesetih letih 20. stoletja. Ta dva razreda predstavljata doslej edina dva odobrena razreda zaviralcev bakterijskih topoizomeraz (4–6). Zaradi pomanjkljivosti učinkovin iz obeh razredov, kot so vprašljiv varnostni profil ter pojav odpornih bakterijskih sevov, se je njihova uporaba močno zmanjšala. Inovacije na področju zaviralcev tipa II so zato ključne za premagovanje bakterijske odpornosti in pri ohranjanju bakterijskih topoizomeraz kot zanimivih tarč v protibakterijski terapiji. V nadaljevanju bomo predstavili zgradbo in delovanje bakterijskih topoizomeraz ter obravnavali posamezne skupine zaviralcev, njihove prednosti, slabosti in obete pri razvoju novih učinkovin.

## 2 BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE TIPA II

Pri prokariontih poznamo dva podtipa topoizomeraze tipa II – DNA-girazo in topoizomerazo IV (topoIV); in čeprav sta si encima po strukturi zelo podobna, opravljata v celici nekoliko drugačne vloge (2, 6). Oba encima sta sposobna sproščati dodatno zvitje, vendar DNA-giraza poleg tega uvaja tudi negativno dodatno zvitje, kar je ključno za shranjevanje DNA v bakterijski celici. Po drugi strani je topoIV ključna za razvijanje sestrskih kromatid med podvojevanjem DNA (7). Oba encima imata heterotetramerno strukturo in sta si topološko zelo podobna. DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB, topoIV pa iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE, ki sta po strukturi analogni GyrA in GyrB (slika 1). Katalitski mesti encima,

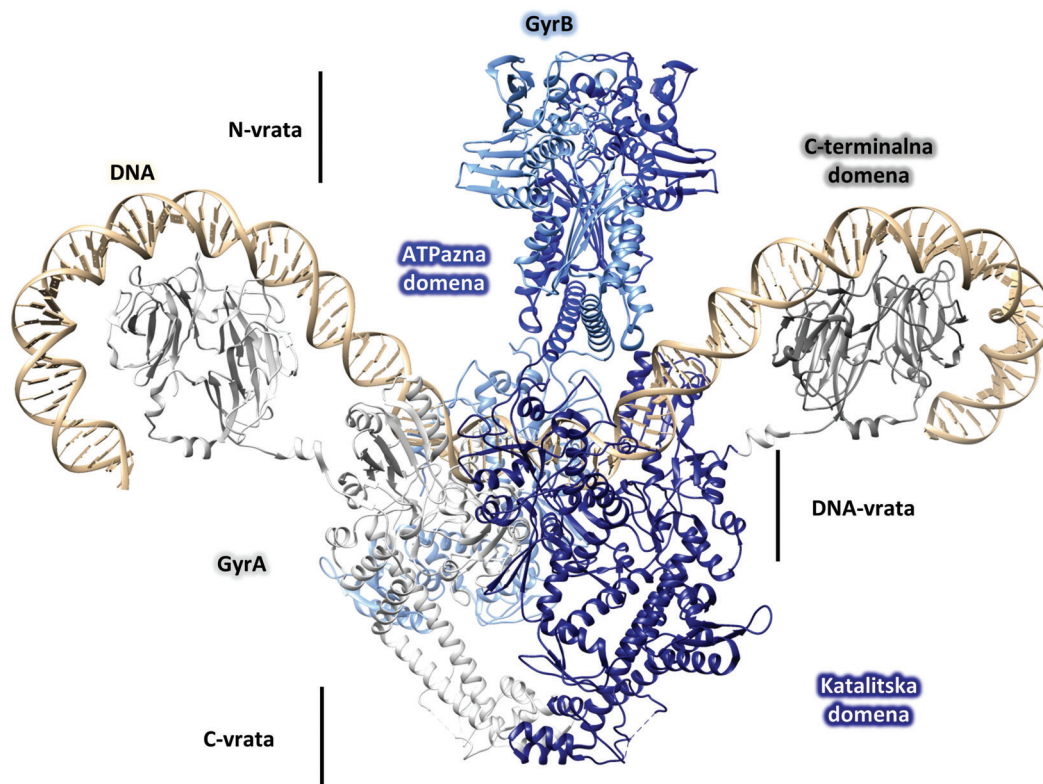
ki omogočata cepitev in ponovno združitev dvovijačne DNA, se nahajata na podenoti GyrA/ParC, delno pa ju sestavlja tudi C-terminalni konec GyrB/ParE. Cepitev adenozin trifosfata (ATP) in s tem zagotavljanje energije za encimsko reakcijo izvajata ATPazni domeni, ki se nahajata na N-terminalnem koncu podenot GyrB/ParE. C-terminalni domeni encima, ki sta odgovorni za zvijanje DNA, se nahajata na C-terminalnem koncu GyrA/ParC. Heterotetramerni encim oblikuje troje “vrat”, ki nadzirajo katalitski cikel encima preko vezave DNA in uravnavajo prehajanje posameznih verig (8). N-vrata se nahajajo na N-terminalnem koncu encima, na stičišču dveh podenot GyrB/ParE v ATPazni domeni encima. DNA-vrata so v bližini katalitskega mesta, na stičišču obeh podenot GyrA/ParC in obeh podenot GyrB/ParE. C-vrata pa se nahajajo na distalnem koncu encima, na ponovnem stičišču dveh podenot GyrA/ParC (slika 1).

Katalitski cikel encima poteka v več korakih (slika 2). G-segment dvovijačne DNA se najprej veže na DNA-vrata, medtem ko se drugi segment dvovijačne DNA, t. i. T-segment, veže na odprta N-vrata. Ob vezavi dveh molekul GyrB/ParE dimerizira in N-vrata se zaprejo, ob enem pa se G-segment cepi. Hidroliza prve molekule ATP povzroči razprtje DNA-vrat in prečkanje T-segmenta skozi razcepljeno DNA. Ligacija G-segmenta poteče ob sprostitvi adenozin difosfata (ADP) iz ATPazne domene, T-segment pa lahko zapusti encim skozi C-vrata. Ob hidrolizi druge molekule ATP nazadnje pride do sprostitve G-segmenta iz encima (2, 5, 8). Posamezni tipi topoizomeraznih zaviralcev delujejo na različne korake v katalitskem ciklu in s tem prekinajo delovanje encima v enem izmed vmesnih stanj. Zaviranje delovanja encima in s tem ključnih celičnih procesov, kot je npr. prepisovanje DNA, v bakterijskih celicah sproži signal za celično smrt.

## 3 ZAVIRALCI TOPOIZOMERAZ TIPA II

Zaviralce bakterijskih topoizomeraz delimo v več skupin, ki se med seboj razlikujejo po mehanizmu delovanja in mestu vezave na encim. V grobem delimo zaviralce v dve skupini: topoizomerazne strupe in katalitske zaviralce topoizomeraz (6). Topoizomerazni strupi interagirajo tako z encimom kot z DNA in stabilizirajo vmesno razcepljeno stanje DNA. Delujejo kot fizična prepreka, ki onemogoča ponovno povezavo (re-ligacijo) DNA. To v bakterijah sproži





**Slika 1:** Prikaz strukture heterotetramera DNA-giraze iz *Escherichia coli* z vezanim fragmentom DNA (PDB ID: 6RKW) (8). Monomer GyrA je prikazan v svetlo sivi barvi, monomer GyrB pa v svetlo modri barvi. Posamezne domene encima so označene z različnimi barvami – ATPazna domena (modro), ki jo sestavlja N-terminalni del GyrB, in katalitska domena (temno modro), ki jo sestavljata C-terminalni del GyrB in N-terminalni del GyrA, ter C-terminalna domena (temno sivo). ATP – adenozin trifosfat

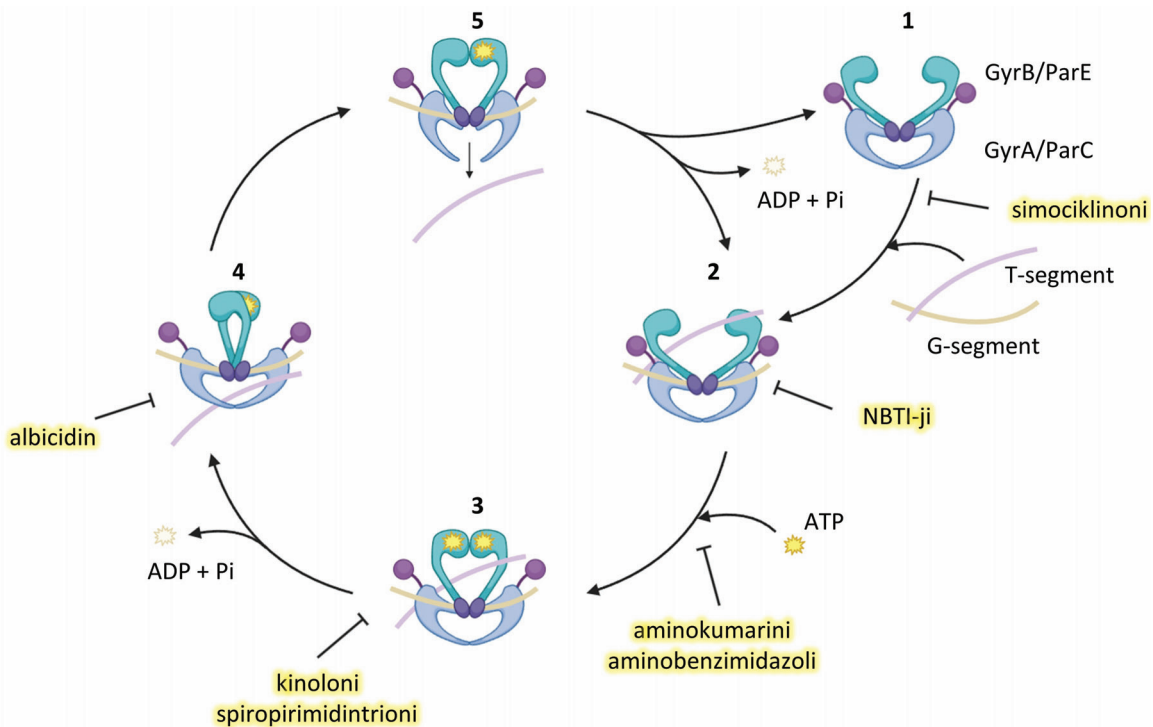
**Figure 1:** Heterotetrameric structure of *Escherichia coli* DNA gyrase with bound DNA fragment (PDB ID: 6RKW) (8). A GyrA monomer is shown in light grey and a GyrB monomer in light blue. Individual domains are labeled with different colors – ATPase domain (blue), catalytic domain (dark blue), and C-terminal domain (dark grey). ATP – adenosine triphosphate

obrambni odziv, inducira nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti, povzroči razgradnjo DNA in vodi v celično smrt (6). Katalitski zaviralci topoizomeraz so učinkovine, ki zavirajo delovanje encima, ne da bi poveševale koncentracijo encimskih kompleksov s cepljeno DNA (5). Delujejo v različnih stopnjah katalitskega cikla topoizomeraz, npr. pri vezavi DNA, vezavi ATP ali cepitvi DNA (5).

### 3.1 KINOLONI

Nalidiksna kislina, ki je predhodnica kinolonskih protibakterijskih učinkovin, je bila leta 1962 naključno odkrita pri proizvodnji kinina in le nekaj let kasneje odobrena za zdravljenje bakterijskih okužb (slika 3A) (5, 10). Sprva so imeli kinoloni zelo omejeno terapevtsko uporabnost, predvsem so se uporabljali za zdravljenje okužb urinarnega trakta, ki so jih povzročale *Escherichia coli* in nekaj drugih gramne-

gativnih bakterij. Z uvedbo fluora na mesto 6 v osrednjem kinolonskem skeletu in bazičnega dušikovega heterocikla na mesto 7 (slika 3B), se je njihova terapevtska uporabnost močno povečala. Nova generacija kinolonskih protimikrobnih učinkovin, katere prvi predstavnik, norfloksacin, ki je leta 1983 pridobil dovoljenje za promet, je tako dobila ime fluorokinoloni. Strukturne spremembe fluorokinolonov so privedle do izboljšanja njihovih farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti, biološke uporabnosti, znatnega povečanja protimikrobnega učinka in razširile spekter delovanja spojin tudi na nekatere grampozitivne bakterije in mikobakterije (4, 10, 11). Ciprofloksacin je bil prvi predstavnik skupine, ki je izkazoval dobro sistemsko uporabnost in je spodbudil razvoj še naprednejših in široko uporabnih kinolonov (slika 3C). Predstavniki tretje in četrte generacije kinolonskih antibiotikov (npr. levofloksacin in moksifloksacin) vsebujejo še dodatne spremembe na mestih 7 in 8, ki



**Slika 2:** Katalitski cikel bakterijskih topoizomeraz tipa II s prikazanimi mesti delovanja posameznih skupin protibakterijskih učinkovin (2, 8). 1 – prost encim; 2 – vezava G-segmenta na DNA-vrata in T-segmenta na N-vrata; 3 – vezava adenozin trifostata (ATP), dimerizacija GyrB/ParE, cepitev G-segmenta; 4 – prehod T-segmenta skozi G-segment, cepitev ATP in nastanek adenozin difostata (ADP) in fosfata (Pi); 5 – sprostitve T-segmenta skozi N-vrata. NBTI – novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz

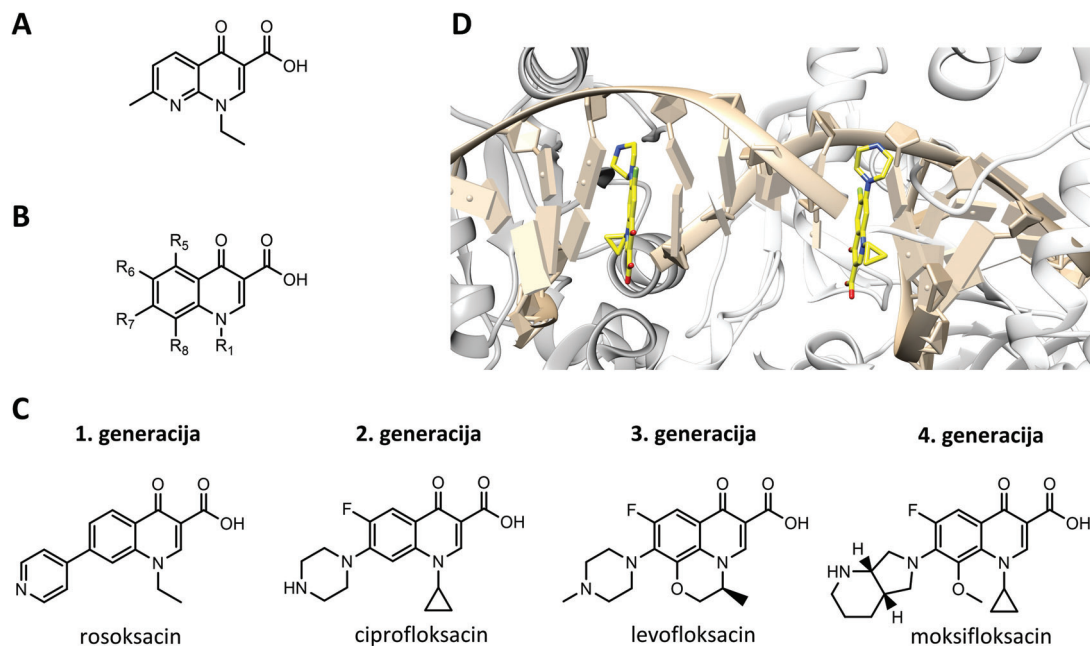
**Figure 2:** Catalytic cycle of bacterial type II topoisomerases with indicated sites of action for different groups of antibacterial agents (2, 8). 1 – free enzyme; 2 – binding of the G-segment to the DNA gate and the T-segment to the N-gate; 3 – binding of adenosine triphosphate (ATP), dimerization of GyrB/ParE, cleavage of the G-segment; 4 – passage of the T-segment through the G-segment, ATP hydrolysis, and formation of adenosine diphosphate (ADP) and phosphate (Pi); 5 – release of the T-segment through the N-gate. NBTI – novel bacterial topoisomerase inhibitor

omogočajo dodatno izboljšanje aktivnosti na grampozitivne bakterije in, v primeru spojin četrte generacije, tudi delovanje na anaerobne organizme (slika 3C) (11).

Kinoloni se vežejo na encim v bližini katalitskega mesta na vsako izmed dveh podenot GyrA/ParC na območju DNA-vrat in se hkrati umestijo med bazne pare DNA tik ob mestu cepitve DNA ter s tem stabilizirajo kompleks med cepljeno DNA in encimom (slika 3D) (12). Interakcija med kinoloni, DNA in proteinom prepreči nadaljnje delovanje encima, ustavi dodatno zvijanje ali sproščanje DNA ter zavre podvojevanje in prepisovanje DNA.

Fluorokinoloni so bili nekaj desetletji med najpogosteje predpisanimi antibiotiki. Med letoma 1995 in 2002 so bili celo najpogosteje predpisani antibiotiki v ZDA s kar 7 do 22 milijoni izdanih receptov (13). Nepravilno postavljene diagnoze in neustrezen izbor antibiotikov pri približno 42 % predpisanih receptov sta najverjetneje pomembno prispevala k pojavu

in širjenju na kinolone odpornih bakterijskih sevov. Najpogostejši in klinično najpomembnejši mehanizem odpornosti na kinolone je pojav specifičnih mutacij v tarčnem encimu, ki oslabijo vezavo učinkovin. Do odpornosti lahko pride tudi zaradi pridobitve genov, ki vplivajo na metabolizem kinolonov, povečajo izražanje izlivnih črpal ali porinov (14). Vedno več dokazov predvsem iz veterinarske in kmetijske stroke kaže na to, da kinoloni sami spodbujajo razvoj odpornosti na druge vrste protimikrobnih učinkovin, kar lahko vodi v razvoj multiple odpornosti (12). Indukcija mehanizma popraviljanja DNA pri subletalnih koncentracijah kinolonov naj bi povečala stopnjo mutageneze in rekombinacije ter povzročila nastanek odpornosti tudi proti drugim vrstam protimikrobnih učinkovin (15). Zaradi pojava hudih neželenih učinkov, kot so bolečine v sklepih, možnost rupture aorte in teratogenost, je predpisovanje kinolonov omejeno pri določenih skupinah bolnikov, otrocih, starejših in nosečnicah (11,16).



**Slika 3:** Kinoloni (11). A) Struktura naldiksne kisline. B) Splošna struktura kinolonskih antibiotikov. Spremembe na mestih R1, R5, R6, R7 in R8 omogočajo izboljšanje delovanja in fizikalno-kemijskih lastnosti spojin. C) Predstavniki različnih generacij kinolonov. D) Kokristaliziran ciprofloksacin (rumena) z DNA-girazo iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 2XCT), posamezni podenoti označeni s svetlo in temno sivo. Kinoloni stabilizirajo cepljeno DNA na obeh mestih cepitve in tvorijo interakcije z encimom v bližini katalitskega centra GyrA.

**Figure 3:** Quinolones (11). A) Structure of nalidixic acid. B) General structure of quinolone antibiotics. Modifications at positions R1, R5, R6, R7 and R8 allow for improved activity and physicochemical properties of the compounds. C) Representatives of different generations of quinolones. D) Cocrystallized ciprofloxacin (yellow) with DNA gyrase from *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 2XCT), with individual subunits marked in light and dark gray. Quinolones stabilize cleaved DNA at both cleavage sites and form interactions with the enzyme near the catalytic center of GyrA.

### 3.2 AMINOKUMARINI

Aminokumarini, kamor uvrščamo novobiocin (slika 4A), klorobiocin in kumermicin A1, so ATP-kompetitivni zaviralci topoizomeraz tipa II, ki jih proizvaja rod bakterij *Streptomyces*. Poleg kinolonov so aminokumarini edina skupina zaviralcev topoizomeraz tipa II, ki so bili kdaj odobreni za klinično uporabo. Čeprav v pogojih *in vitro* izkazujejo boljše zaviralno delovanje na aktivnost kot kinoloni, pa njihovo uporabo omejuje slaba topnost in toksičnost v evkariontskih celicah (2). Prvič so bili registrirani v šestdesetih letih 20. stoletja za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo grampozitivne bakterije (4). Njihovo delovanje na gramnegativne bakterije je omejeno, predvsem zaradi slabega prehajanja skozi zunanjo membrano ali delovanja izlivnih črpalk (17). Aminokumarinski antibiotiki delujejo kot katalitski zaviralci, ki z vezavo v ATP-vezavni žep v ATPazni domeni encima preprečujejo delovanje encima (slika 4C). V grampozitivnih bakterijah primarno delujejo na DNA-girazo, kjer izkazujejo

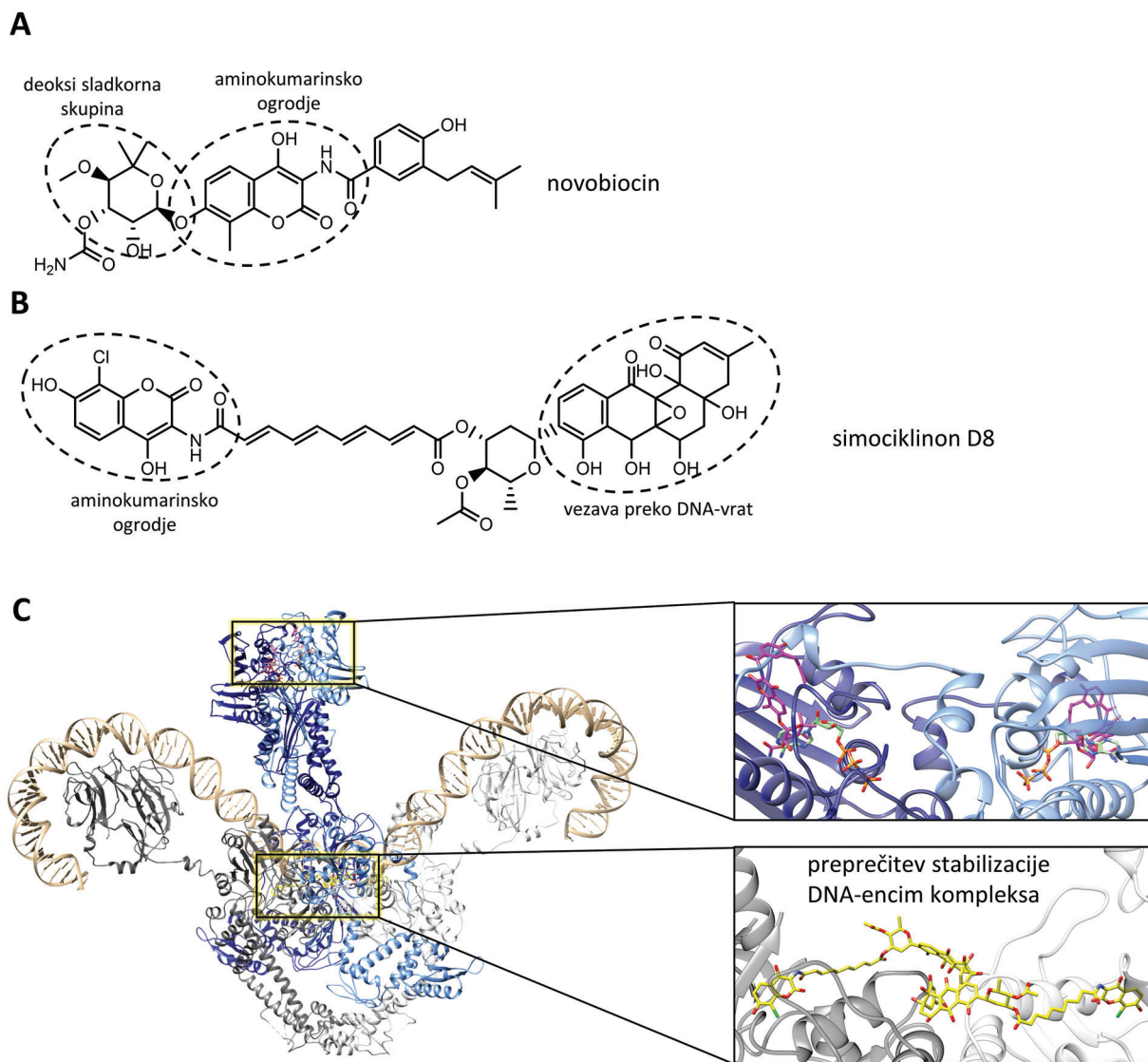
za nekaj velikostnih razredov močnejše zaviralno delovanje kot na topo IV (17).

DNA-giraza, glavna tarča aminokumarinov, spada v družino encimov GHKL, ki imajo podobno ATP-vezavno domeno. S tem lahko pojasnimo vezavo aminokumarinov na protein toplotnega šoka 90, encim iz družine GHKL, kar je lahko vzrok za pojav neželenih učinkov pri ljudeh (4). Tudi pri uporabi aminokumarinskih antibiotikov se je pojavila odpornost določenih bakterijskih sevov. Večinoma gre za pojav odpornosti zaradi specifičnih mutacij encima v ATP vezavnem mestu, kar pa privede tudi do znižanja katalitske aktivnosti mutiranega encima (6).

### 3.3 SIMOCIKLINONI

Podobno kot aminokumarini so tudi simociklinoni biosintezni produkti bakterij iz rodu *Streptomyces*. Simociklinoni strukturno spominjajo na aminokumarine, saj vsebujejo aminokumarinsko ogrodje, manjka pa jim deoksi-sladkorna





**Slika 4:** Aminokumarini in simociklinoni (2, 17). **A)** Strukturna predstavitev novobiocina z označimi pomembnimi strukturnimi deli. **B)** Strukturna reprezentacija simociklinona D8 z označenimi pomembnimi deli za interakcijo z encimom. **C)** Novobiocin (roza), adenosin trifosfat (ATP) (zelena) in SD8 (rumena) v DNA-girazi iz *Escherichia coli*, slika je bila narejena s prekrivanjem treh kristalnih struktur (PDB ID: 6RKW, 4URO in 4CKL). Posamezni podenoti sta prikazani s svetlo/temno sivo, podenoti pa s svetlo/temno modro. Novobiocin je vezan v podenoti GyrB, opazimo lahko prekrivanje z ATP, kar ilustrira ATP-kompetitivno zaviranje aminokumarinskih antibiotikov. SD8 interagira s prvo podenoto GyrA preko aminokumarinskega dela in preprečuje vezavo DNA ter stabilizacijo kompleksa DNA-encim, tetraciklični del SD8 se veže preko DNA-vrat in interagira z sosednjo podenoto GyrA.

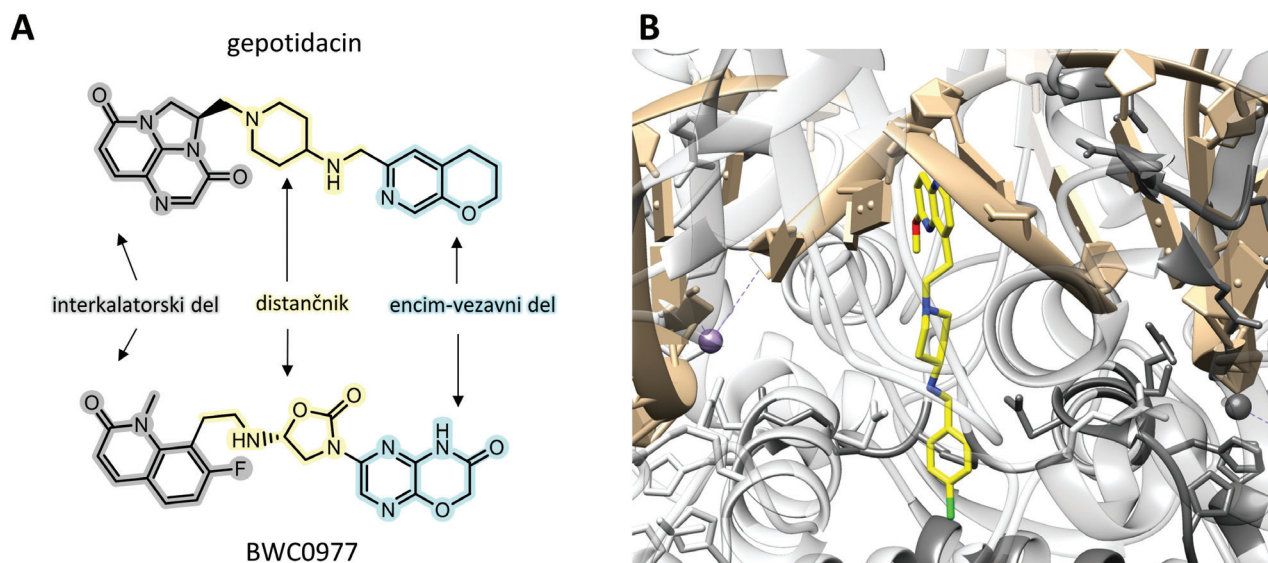
**Figure 4:** Aminocoumarins and Simocyclinones (2, 17). **A)** Structural representation of novobiocin with important structural parts labeled. **B)** Structural representation of simocyclinone D8 with labeled key regions for interaction with the enzyme. **C)** Novobiocin (pink), adenosine triphosphate (ATP) (green), and SD8 (yellow) in DNA gyrase from *Escherichia coli*; the image was created by overlaying three crystal structures (PDB ID: 6RKW, 4URO, and 4CKL). Individual subunits are shown in light/dark gray, while additional subunits are displayed in light/dark blue. Novobiocin is bound to the GyrB subunit, with observable overlap with ATP, illustrating the ATP-competitive inhibition of aminocoumarin antibiotics. SD8 interacts with the first GyrA subunit via its aminocoumarin portion, preventing DNA binding and stabilizing the DNA-enzyme complex, while the tetracyclic part of SD8 binds across the DNA gate and interacts with an adjacent GyrA subunit.

skupina (4). Kljub strukturni podobnosti med aminokumarini in simociklinoni je med njimi ključna razlika v mehanizmu delovanja (2, 3). Simociklinon D8 (SD8) (slika 4B), nedavno odkrit predstavnik skupine simociklinonov, izkazuje močno zaviranje dodatnega zvitja in relaksacije DNA s strani DNA-giraze *in vitro* (slika 4) (2, 17). Ne veže se na običajno vezavno mesto za aminokumarine in ne zavira ATPazne aktivnosti encima, ampak deluje kot zaviralec v zgodnji fazi katalitskega cikla s preprečitvijo vezave DNA na encim (18). Kristalna struktura SD8 z DNA-girazo je razkrila, da se spojina veže na N-terminalno domeno v obeh podenotah GyrA preko DNA-vrat in s tem prepreči vezavo DNA na encim (slika 4C) (19). Vezavno mesto za SD8 je sicer zelo blizu, ampak se ne prekriva z vezavnim mestom za kinolone, kar odpira možnosti za razvoj bifunkcionalnih spojin, ki bi se vezale na obe mesti hkrati (4, 18). Poleg vezave na N-terminalno domeno GyrA se SD8 delno veže tudi na C-terminalno domeno GyrB, vendar pomen te vezave še ni popolnoma razjasnjen (20). Težave pri razvoju

novih simociklinonskih antibiotikov so podobne kot pri aminokumarinih – zaradi slabega prehajanja ne delujejo na gramnegativne bakterije, slaba topnost in toksičnost, ki se izkazuje pri evkariontih, pa onemogočata klinično uporabo pri ljudeh (4).

### 3.4 NOVI ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH TOPOIZOMERAZ

Novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (angl. *novel bacterial topoisomerase inhibitor*; NBTI) so relativno nov razred zaviralcev, ki je zanimiv tako za farmacevtsko industrijo kot tudi za akademsko okolje. NBTI-ji se strukturno razlikujejo od prej omenjenih razredov spojin, saj se vežejo na drugo vezavno mesto in imajo drugačen mehanizem delovanja (21–23). Vezavno mesto za NBTI-je leži centralno med dvema podenotama GyrA/ParC in je ločeno od vezavnega mesta za kinolone. Zaviralci tvorijo interakcije tako z encimom kot tudi z DNA in stabilizirajo ternarni kompleks



**Slika 5:** Novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (NBTI) (24, 25, 31). A) Strukturi: Kemijski strukturi gepotidacina in BWC0977 z označenimi deli, ključnimi za interkalacijo in vezavo na encim. B) Struktura NBTI-ja AMK12, razvitega na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in Kemijskem Inštitutu, (rumena) v girazi iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 6Z1A). Interkalatorski levi del molekule, vezan med centralni bazni par v DNA (svetlo rjava), desni del, usidran med dve podenoti (prikazano s svetlo in temo sivo).

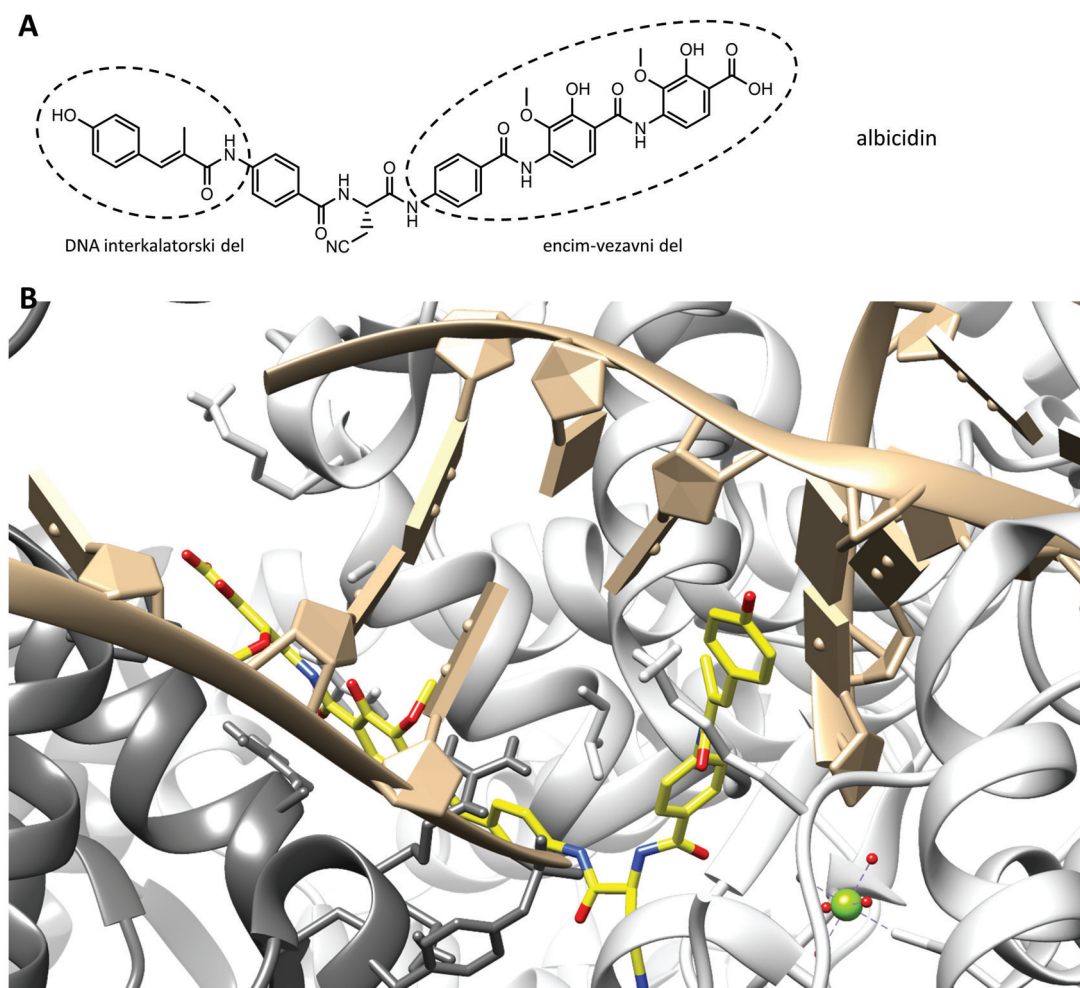
**Figure 5:** Novel bacterial topoisomerase inhibitors (NBTI) (24, 25, 31). A) Structures – Chemical structures of gepotidacin and BWC0977 with labeled regions crucial for intercalation and enzyme binding. B) Structure of the NBTI AMK12, developed at the Faculty of Pharmacy and the National Institute of Chemistry (yellow), in gyrase from *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 6Z1A). The intercalating left part of the molecule is bound between the central base pair in DNA (light brown), while the right part is anchored between two subunits (shown in light and dark gray).



(slika 5). Sestavljeni so iz treh delov: levega dela, osrednjega distančnika in desnega dela. Levi del spojin je ključen za interkalacijo DNA in se umesti med centralna bazna para molekule DNA. Desni del se veže v globok hidrofobni vezavni žep, ki ga tvorita obe podenoti encima, distančnik pa povezuje levi in desni del ter zagotavlja ustrezno prostorsko usmerjenost in fizikalno-kemijske lastnosti (23, 24). NBTI-ji imajo širokospektralno delovanje. V grampozitivnih bakterijah se primarno vežejo na DNA-girazo, v gramnegativnih bakterijah pa na topo IV. Z ustreznimi strukturnimi spremembami je mogoč tudi enakomeren učinek na obe

tarči, kar pripomore k zmanjševanju verjetnosti pojava bakterijske odpornosti.

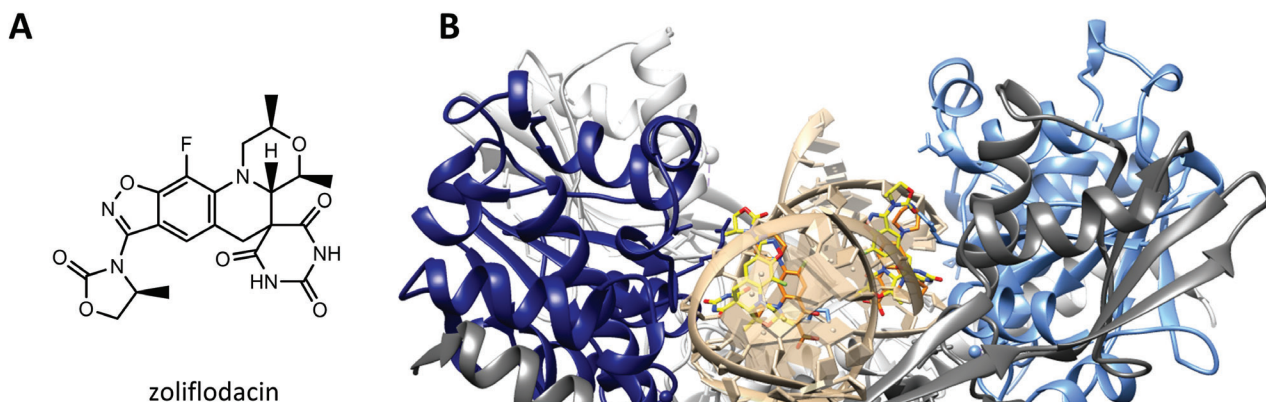
Kljub dokazanim močnim terapevtskim učinkom NBTI-jev trenutno na tržišču še ni nobene spojine iz tega razreda. Vikvidacin je bil prvi predstavnik razreda, ki je vstopil v prvo fazo kliničnih preskušanj, vendar so bila ta prekinjena zaradi kardiotsičnosti, ki je bila posledica vezave na hERG (kalijev ionski kanal, ki ga kodira človeški gen, povezan z Ether-a-go-go fenotipom) (26). Številna farmacevtska podjetja in akademske raziskovalne skupine so skušale zmanjšati kardiotsičnost teh spojin, kar pa je večinoma vodilo do



**Slika 6:** Albicidini (2, 32). **A)** Struktura: Kemijska struktura albicidina z označenimi pomembnimi deli za interakcijo z DNA in z encimom. **B)** Albicidin (rumena) v girazi iz *Escherichia coli* (PDB ID: 7z9c) (33). C-terminalni interkalatorski del zaviralca je vezan med fragmente DNA v eni izmed področji cepitev, N-terminalni del je usidran med dve podenoti (prikazano s svetlo in temo sivo).

**Figure 6:** Albicidins (2, 32). **A.** Structure: Chemical structure of albicidin with labeled key regions for interaction with DNA and the enzyme. **B.** Albicidin (yellow) in gyrase from *Escherichia coli* (PDB ID: 7Z9C) (33). The C-terminal intercalating part of the inhibitor is bound between DNA fragments at one of the cleavage sites, while the N-terminal part is anchored between two subunits (shown in light and dark gray).





**Slika 7:** Spiropirimidintrioni (35). A) Struktura: Kemijska struktura zoliflodacina. B) Prekrivanje zoliflodacina (rumena) in ciprofloksacina (oranžna) v girazi iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 8BP2, 2XCT). Posamezni podenoti sta prikazani v svetlo in temno sivi, dela podenot pa v svetlo in temno modri.

**Figure 7:** Spiropirimidintriones (35). A) Structure: Chemical structure of zoliflodacin. B) Overlay of zoliflodacin (yellow) and ciprofloxacin (orange) in gyrase from *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 8BP2, 2XCT). Individual subunits are shown in light and dark gray, with parts of the subunits displayed in light and dark blue.

šibkejšega protibakterijskega delovanja (27–29). Kljub temu je podjetju GSK uspelo razviti učinkovino gepotidacin s primernim varnostnim profilom in dobro protibakterijsko učinkovitostjo. Gepotidacin je uspešno zaključil tretjo fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje nezahtevnih okužb urinarnega trakta in gonoreje ter je na dobri poti, da postane prvi predstavnik razreda NBTI-jev na tržišču (30, 31). V prvi fazi kliničnega preskušanja je tudi spojina BWC0977, ki je namenjena zdravljenju resnejših bolnišničnih okužb, za katere trenutno ni primerne terapije.

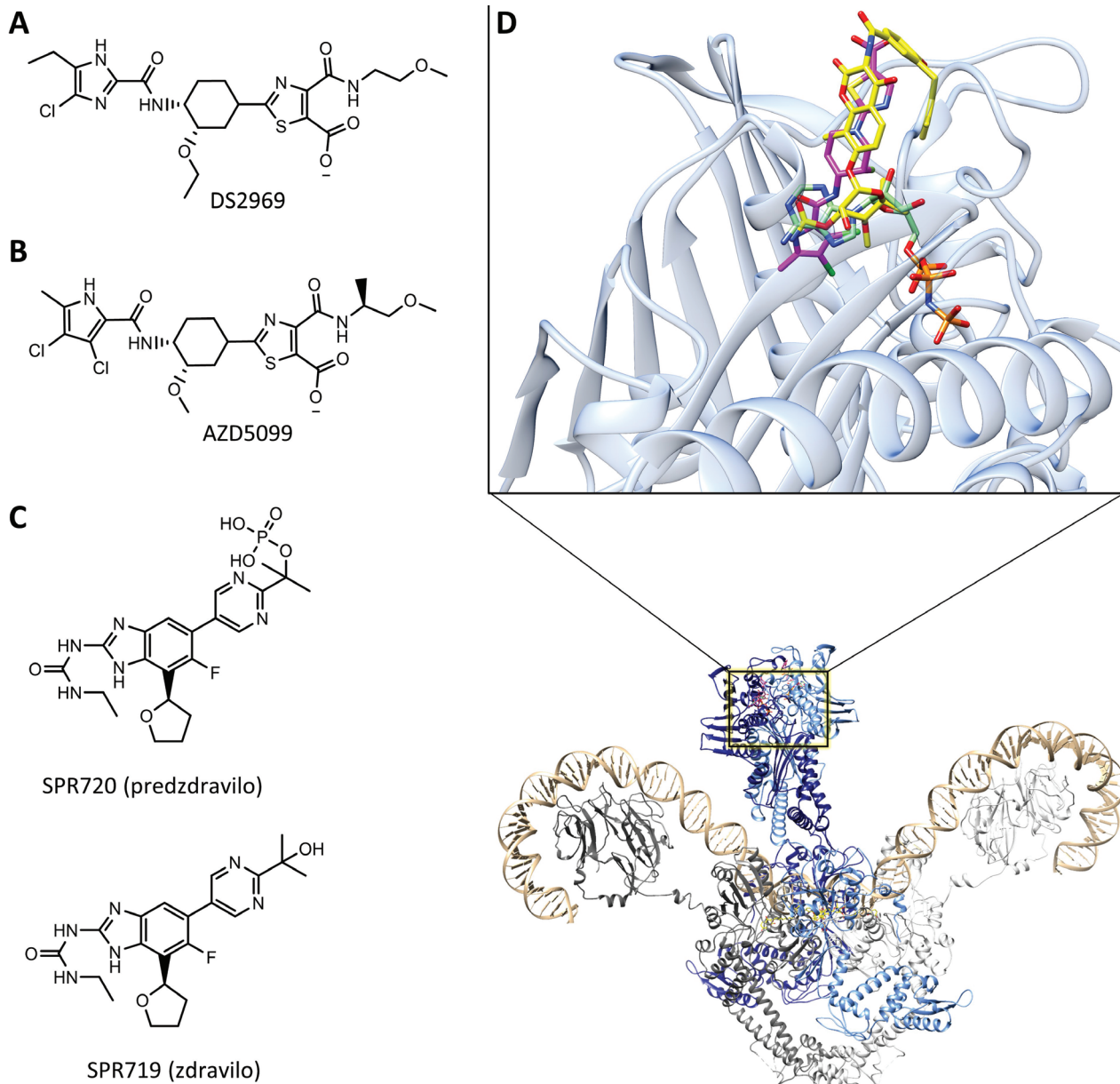
### 3.5 ALBICIDINI

Albicidin je peptidni fitotoksin, ki ga izločajo rastlinski patogeni *Xanthomonas albilineans* (2) (slika 6A). Albicidin deluje baktericidno na gramnegativne in grampozitivne bakterije v nizkih nanomolarnih koncentracijah in ne izkazuje toksičnosti na sesalskih celicah v koncentraciji pod 8 µg/mL (32). Albicidin se z enim delom molekule veže med fragmente razcepljene DNA, drugi del pa tvori interakcije z encimom na stičišču obeh podenot GyrA/ParC (slika 6B). Na ta način stabilizira razcepljeno intermediarno stanje DNA, prepreči njeno ponovno povezavo in sklenitev verig DNA ter sproži bakterijsko smrt. Albicidin tvori kompleks z DNA in encimom ob prisotnosti ATP, kar je tudi ena izmed razlik med delovanjem albicidinov in kinolonov (2). Za razliko od kinolonov, ki se vežejo na kompleks simetrično ob cepit-

venem mestu DNA in tvorijo interakcije z eno izmed podenot GyrA/ParC, se albicidin prednostno veže v eno izmed mest cepitve in tvori interakcije z obema podenotama GyrA/ParC. Albicidin se najverjetneje veže na encim v trenutku, ko je T-segment DNA že prešel skozi G-segment, a se ta še ni sklenil (33). Ob spremembi enega izmed aminokislinskih ostankov, ki povzročata rezistenco na kinolone, so že opazili navzkrižno odpornost s kinoloni (32). Sintetični derivati albicidina s krajšo strukturo se lahko simetrično vežejo v vezavna žepa v obeh podenotah in so manj občutljivi na spremembe v regiji proteina, ki so povezane z odpornostjo na kinolone. Nekateri sintetični derivati albicidina so bili dokazano varni in učinkoviti v živalskih modelih *in vivo* ter so izkazovali celo boljšo protibakterijsko učinkovitost kot NBTI-ji (34).

### 3.6 SPIROPIRIMIDINTRIONI

Spiropirimidintrioni podobno kot kinoloni stabilizirajo kompleks med DNA in tarčo ter se vežejo med cepljene bazne pare DNA. Za razliko od kinolonov, ki tvorijo interakcije z podenoto GyrA/ParC, se spiropirimidintrioni vežejo na podenoto GyrB/ParE (slika 7B) (35). Znano je, da mutacije, ki privedejo do odpornosti bakterij na kinolone, ne vplivajo na učinkovitost delovanja spiropirimidintrionov, kar potrjuje drugačen mehanizem delovanja kljub podobnemu vezavnemu mestu. Spiropirimidintrioni so učinkoviti tako proti



**Slika 8:** Ne-aminokumarinski ATP-kompetitivni zaviralci bakterijskih topoizomeraz (3, 36, 37). A) Struktura imidazolamidne učinkovine DS2969. B) Struktura pirolamidne učinkovine AZN5099. C) Struktura predzdravila SPR720 in aktivnega metabolita SPR719. D) Prekrivanje pirolamidne spojine 07N (roza), novobiocina (rumena) ATP (zelena) v ATP-vezavnem DNA-giraze iz *Escherichia coli*, slika je bila narejena s prekrivanjem treh kristalnih struktur (PDB ID: 6RKW, 4URO in 3TTZ). ATP – adenzin trifosfat

**Figure 8:** Non-aminocoumarin ATP-competitive inhibitors of bacterial topoisomerases (3, 36, 37). A) Structure of the imidazolamide compound DS2969. B) Structure of the pyrrolamide compound AZN5099. C) Structure of the prodrug SPR720 and its active metabolite SPR719. D) Overlay of the pyrrolamide compound 07N (pink), novobiocin (yellow), and ATP (green) in the ATP-binding site of DNA gyrase from *Escherichia coli*. The image was created by overlaying three crystal structures (PDB ID: 6RKW, 4URO, and 3TTZ). ATP – adenosine triphosphate



grampozitivnim kot tudi gramnegativnim bakterijam. Zoliflodacin (slika 7A), ki je že uspešno zaključil tretjo fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje okužb z *Neisseria gonorrhoeae*, trenutno čaka na odobritev s strani ameriške uprave za hrano in zdravila (FDA) (35).

### 3.7 NE-AMINOKUMARINSKI ATP-KOMPETITIVNI ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH TOPOIZOMERAZ TIPA II

Ne-aminokumarinski ATP-kompetitivni zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II so heterogena skupina zaviralcev v katero uvrščamo spojine iz različnih strukturnih razredov. Skupno tovrstnemu tipu zaviralcev je, da tako kot aminokumarini ciljajo ATP-vezavno mesto encima, vendar so strukturno drugačni. V ta razred spojin spadajo med drugim tudi triazinski, azaindolni, arilaminopirimidinski, imidazolamidni, pirolamidni in aminobenzimidazolni zaviralci, izmed katerih so v klinične študije prišli samo predstavniki zadnjih treh strukturnih skupin (3). DS2969 je imidazolamidna učinkovina, ki je uspešno zaključila 1. fazo kliničnih preskušanj, vendar se njen razvoj ni nadaljeval (slika 8A) (3, 36). Pirolamidna učinkovina AZD5099 je prav tako zaključila 1. fazo kliničnih preskušanj, vendar je bil njen nadaljnji razvoj ustavljen zaradi težav z učinkovitostjo in varnostjo (slika 8B) (3). Ena izmed najbolj zanimivih učinkovin iz tega razreda spojin je zagotovo SPR720 oz. fobrepodacin (slika 8C), aminobenzimidazolno predzdravilo, ki je trenutno v drugi fazi kliničnih preskušanj za zdravljenje pljučnih obolenj, ki jih povzroča *Mycobacterium avium*. Status zdravila sirote za SPR720 je FDA dodelil za zdravljenje netuberkuloznih okužb z mikobakterijami (37).

## 4 SKLEP

Iz števila različnih skupin zaviralcev bakterijskih topoizomeraz, raznolikih vezavnih mest in unikatnih mehanizmov delovanje je razvidno, da so topoizomeraze tipa II resnično ustrezne tarče za razvoj novih protibakterijskih zdravilnih učinkovin, kljub vedno manjši klinični uporabi trenutno dostopnih zaviralcev. V članku smo se osredotočili samo na nizkomolekularne zaviralce topoizomeraz. Poleg njih so v različnih stopnjah razvoja tudi nekateri peptidni in proteinski

zaviralci. S poglobljanjem znanja o topoizomerazah kot tarčah se možnosti za njihovo raziskovanje širijo. Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani se z razvojem zaviralcev bakterijskih topoizomeraz ukvarjata kar dve raziskovalni skupini – ena svoj čas posveča zaviralcem GyrA/ParC, druga pa raziskuje zaviralce GyrB/ParE (38, 39). Glede na velikost in kompleksnost bakterijskih topoizomeraz kot tarč smo verjetno šele na začetku odkrivanja vseh potencialnih načinov, kako jih učinkovito izkoristiti pri ciljanju bakterij. S svojim lastnim doprinosom želimo tudi v bodoče širiti znanje na tem področju in pustiti pečat v svetovni znanstveni skupnosti.

## 5 LITERATURA

1. Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys.* 2008 Feb;41(1):41–101.
2. Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A, Lovett ST. DNA Topoisomerases. Lovett ST, editor. *EcoSal Plus.* 2015 Apr 17;6(2).
3. Bisacchi GS, Manchester JI. A New-Class Antibacterial-Almost. *Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV.* *ACS Infect Dis.* 2015 Jan 9;1(1):4–41.
4. Heide L. New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *International Journal of Medical Microbiology.* 2014 Jan 1;304(1):31–6.
5. Bisacchi GS. *Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story."* *J Med Chem.* 2015 Jun 25;58(12):4874–82.
6. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Nov;92(3):479.
7. Kato J ichi, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):393–404.
8. Vanden Broeck A, Lotz C, Ortiz J, Lamour V. Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex. *Nature Communications* 2019 10:1. 2019 Oct 30;10(1):1–12.
9. Basu A, Parente AC, Bryant Z. Structural dynamics and mechanochemical coupling in DNA gyrase. *J Mol Biol.* 2016 May 5;428(9 Pt B):1833.
10. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem.* 1962 Sep 1;5(5):1063–5.
11. Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm.* 2019 Oct 10;10(10):1719.
12. Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules* 2020, Vol 25, Page 5662. 2020 Dec 1;25(23):5662.

13. Linder JA, Huang ES, Steinman MA, Gonzales R, Stafford RS. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *Am J Med.* 2005 Mar 1;118(3):259–68.
14. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014 Mar 18;53(10):1565–74.
15. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell.* 2010 Feb 12;37(3):311–20.
16. Fluoroquinolone antibiotics: reminder of measures to reduce the risk of long-lasting, disabling and potentially irreversible side effects | European Medicines Agency. [cited 2024 Jul 2]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/fluoroquinolone-antibiotics-reminder-measures-reduce-risk-long-lasting-disabling-potentially-irreversible-side-effects>
17. Alt S, Mitchenall LA, Maxwell A, Heide L. Inhibition of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by aminocoumarin antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011 Sep 1;66(9):2061–9.
18. Flatman RH, Howells AJ, Heide L, Fiedler HP, Maxwell A. Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar;49(3):1093–100.
19. Hearnshaw SJ, Edwards MJ, Stevenson CE, Lawson DM, Maxwell A. A new crystal structure of the bifunctional antibiotic simocyclinone D8 bound to DNA gyrase gives fresh insight into the mechanism of inhibition. *J Mol Biol.* 2014 May 15;426(10):2023–33.
20. Sissi C, Vazquez E, Chemello A, Mitchenall LA, Maxwell A, Palumbo M. Mapping simocyclinone D8 interaction with DNA gyrase: Evidence for a new binding site on GyrB. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):213–20.
21. Bax BD, Chan PF, Eggleston DS, Fosberry A, Gentry DR, Gorrec F, et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature.* 2010 Aug 19;466(7309):935–40.
22. Tse-Dinh YC. Targeting bacterial topoisomerases: how to counter mechanisms of resistance. *Future Med Chem.* 2016 Jun 1;8(10):1085–100.
23. Charrier C, Salisbury AM, Savage VJ, Duffy T, Moyo E, Chaffer-Malam N, et al. Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Potent Broad-Spectrum Activity against Drug-Resistant Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 May 1;61(5).
24. Kolarič A, Anderluh M, Minovski N. Two Decades of Successful SAR-Grounded Stories of the Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors (NBTIs). *J Med Chem.* 2020 Jun 11;63(11):5664–74.
25. Kokot M, Anderluh M, Hrast M, Minovski N. The Structural Features of Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors That Define Their Activity on Topoisomerase IV. *J Med Chem.* 2022 May 5;65(9):6431.
26. Black MT, Coleman K. New inhibitors of bacterial topoisomerase GyrA/ParC subunits. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Aug 1;10(8):804–10.
27. Reck F, Alm RA, Brassil P, Newman J V., Ciaccio P, McNulty J, et al. Novel N-linked aminopiperidine inhibitors of bacterial topoisomerase type II with reduced p K a: Antibacterial agents with an improved safety profile. *J Med Chem.* 2012 Aug 9;55(15):6916–33.
28. Li L, Okumu AA, Nolan S, English A, Vibhute S, Lu Y, et al. 1,3-Dioxane-Linked Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Enhanced Antibacterial Activity and Reduced hERG Inhibition. *ACS Infect Dis.* 2019 Jul 12;5(7):1115–28.
29. Kokot M, Weiss M, Zdovc I, Anderluh M, Hrast M, Minovski N. Diminishing hERG inhibitory activity of aminopiperidine-naphthyridine linked NBTI antibacterials by structural and physicochemical optimizations. *Bioorg Chem.* 2022 Nov 1;128.
30. Scangarella-Oman NE, Hossain M, Hoover JL, Perry CR, Tiffany C, Barth A, et al. Dose Selection for Phase III Clinical Evaluation of Gepotidacin (GSK2140944) in the Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Mar 1;66(3).
31. Ali ASM, Anderson CS. Gepotidacin, a new first-in-class antibiotic for treating uncomplicated urinary tract infection. *The Lancet.* 2024 Feb 24;403(10428):702–3.
32. Hashimi SM. Albicidin, a potent DNA gyrase inhibitor with clinical potential. *The Journal of Antibiotics* 2019 72:11. 2019 Aug 26;72(11):785–92.
33. Michalczyk E, Hommernick K, Behroz I, Kulike M, Pakosz-Stepień Z, Mazurek L, et al. Molecular mechanism of topoisomerase poisoning by the peptide antibiotic albicidin. *Nature Catalysis* 2023 6:1. 2023 Jan 23;6(1):52–67.
34. Zborovsky L, Kleebauer L, Seidel M, Kostenko A, von Eckardstein L, Gombert FO, et al. Improvement of the antimicrobial potency, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of albicidin by incorporation of nitrogen atoms. *Chem Sci.* 2021 Nov 10;12(43):14606–17.
35. Morgan H, Lipka-Lloyd M, Warren AJ, Hughes N, Holmes J, Burton NP, et al. A 2.8 Å Structure of Zoliflodacin in a DNA Cleavage Complex with *Staphylococcus aureus* DNA Gyrase. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 1;24(2):24.
36. Dennie J, Vandell AG, Inoue S, Gajee R, Pav J, Zhang G, et al. A Phase I, Single-Ascending-Dose Study in Healthy Subjects to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of DS-2969b, a Novel GyrB Inhibitor. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2018 Dec 1;58(12):1557–65.
37. Stokes SS, Vemula R, Pucci MJ. Advancement of GyrB Inhibitors for Treatment of Infections Caused by *Mycobacterium tuberculosis* and Non-tuberculous *Mycobacteria*. *ACS Infect Dis.* 2020 Jun 12;6(6):1323–31.
38. Durcik M, Tomašič T, Zidar N, Zega A, Kikelj D, Mašič LP, et al. ATP-competitive DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitors as antibacterial agents. *Expert Opin Ther Pat.* 2019 Mar 4;29(3):171–80.
39. Zorman M, Hrast Rambauer M, Kokot M, Minovski N, Anderluh M. The overview of development of novel bacterial topoisomerase inhibitors effective against multidrug-resistant bacteria in an academic environment: From early hits to in vivo active antibacterials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2024 Jan 1;192:106632.



# VLOGA FUKOZIL- IN SIALILTRANSFERAZ PRI RAKAVIH OBOLENJIH IN PROCESU METASTAZIRANJA

## THE ROLE OF FUCOSYL- AND SIALYLTRANSFERASES IN CANCER AND METASTASIS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Tilen Čuš, mag. farm.

izr. prof. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: [tilen.cus@ffa.uni-lj.si](mailto:tilen.cus@ffa.uni-lj.si)



### POVZETEK

Rakave bolezni so eden izmed vodilnih vzrokov umrljivosti v razvitem svetu, pri čemer je 90 % smrti bolnikov z rakom povezanih z metastaziranjem. Gre za zapleten proces, ki vključuje številne biokemične spremembe, med katerimi so pogoste tudi spremembe v celični glikozilaciji, zlasti sializaciji ter fukozilaciji. Ključno vlogo pri tem igrajo encimi sialil- in fukoziltransferaze, ki katalizirajo vezavo sialične kisline in fukoze na ustrezne substrate. Spremembe v njihovem izražanju opazimo pri številnih rakih, kjer lahko pripeljejo do sprememb v adheziji celic, proliferaciji, gibljivosti, ožiljenosti tumorja in izogibanju rakavih celic pred imunskim sistemom, kar lahko pomembno ojača metastatski potencial rakavih celic. Hkrati je povišana aktivnost sialil- in fukoziltransferaz povezana s številnimi rakavimi boleznimi, kot so rak dojke, debelega črevesja in pankreasa. Razumevanje njihove vloge v fizioloških in patofizioloških stanjih tako ponuja nove možnosti v zdravljenju in diagnostiki.

### KLJUČNE BESEDE:

fukoziltransferaze, glikozilacija, metastaziranje, rak, sialiltransferaze

### ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of mortality in the developed world, with 90% of cancer-related deaths being associated with metastasis. This is a complex process involving numerous biochemical changes, including alterations in cellular glycosylation – particularly sialylation and fucosylation. In this process, sialyl- and fucosyltransferases are central enzymes that catalyze the attachment of sialic acid and fucose to their corresponding substrates. Changes in their expression can be observed in various cancers, where they may lead to alterations in cell adhesion, proliferation, motility, tumor angiogenesis, and immune system evasion, significantly enhancing the metastatic potential of cancer cells. Additionally, their increased activity is linked to various types of cancer, such as breast, colon, and pancreatic cancers. Understanding their role in both physiological and pathological conditions offers new possibilities for innovative approaches in cancer treatment and diagnosis.

### KEY WORDS:

cancer, fucosyltransferases, glycosylation, metastasis, sialyltransferases

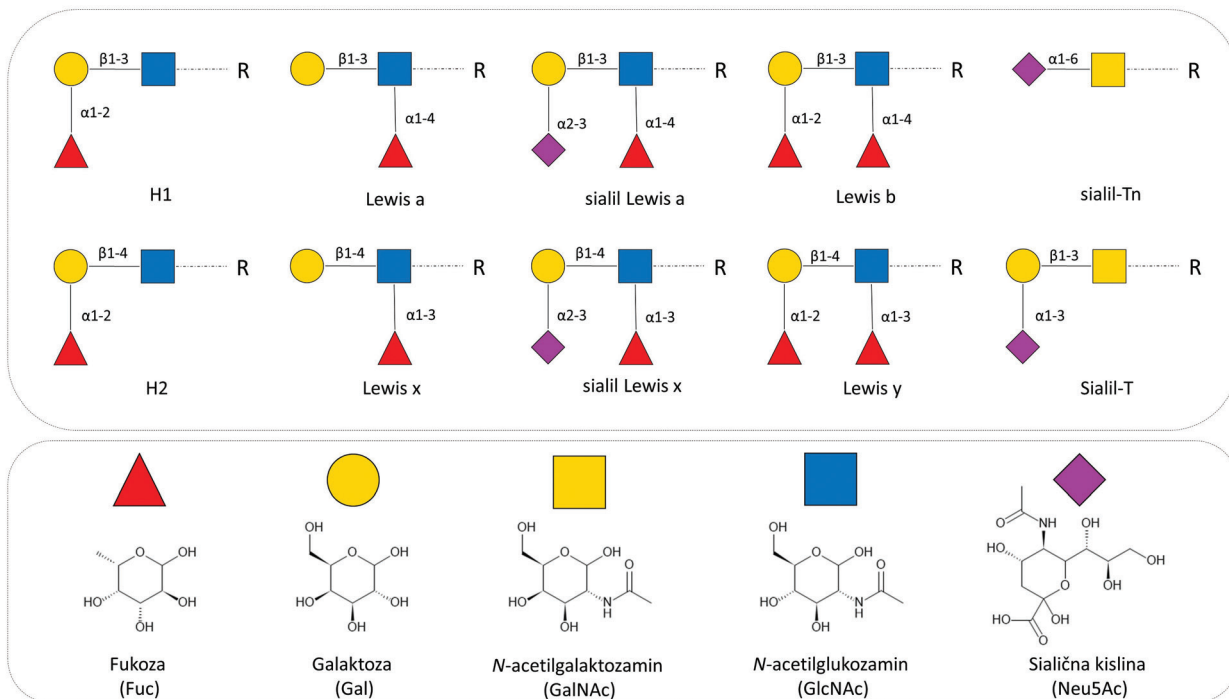


# 1 UVOD

Po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije je leta 2020 zaradi rakavih obolenj umrlo 10 milijonov ljudi, kar uvršča rakava obolenja med vodilne vzroke smrtnosti po svetu, delež smrti zaradi njih pa bo v prihodnosti le še naraščal (1). Preživetje bolnikov z rakom je odvisno od številnih dejavnikov. Eden izmed ključnih je metastaziranje, ki je povezano z 90 % smrti pri bolnikih z rakavimi obolenji (2). Metastaziranje je zapleten večfazni proces, pri katerem se rakave celice odcepijo od primarnega tumorja, potujejo po telesu in tvorijo sekundarne zasevke (3). Zanj so potrebne številne biokemične spremembe, ki se odražajo kot spremembe v celični proliferaciji, adheziji, gibljivosti, ožiljenosti tumorja in interakcijah tumorskih celic z imunskim sistemom (3). Ena izmed sprememb, ki spremlja našete procese, je patološka glikozilacija, ki lahko vpliva na številne lastnosti rakavih celic hkrati, in je kot taka zanimiva tarča za razvoj novih terapevtskih pristopov za obvladovanje metastaziranja in rakavih obolenj (4).

# 2 GLIKOZILACIJA

Glikozilacija je kompleksen encimski posttranslacijski proces, pri katerem pride do dodajanja monosaharidov na druge saharide, proteine ali lipide. V procesu nastanejo glikokonjugati, ki jih delimo glede na aglikonski del (glikoproteine, proteoglikane in glikosfingolipide), strukturo glikana (razvejani in nerazvejani) ter vrsto vezi (5). Glede na vrsto vezi med aglikonom in glikanom ločimo N-glikane, kjer sta molekuli povezani z dušikom, O-glikane, kjer sta povezani s kisikom, fosfoglikane, kjer povezavo tvori fosfatna skupina, in C-glikane, kjer sta molekuli povezani z ogljikom. Vezi med saharidnimi enotami so zelo raznolike in se ločijo glede na konfiguracijo v anomernem centru ( $\alpha$ - in  $\beta$ -konfiguracija) in glede na mesto funkcionalne skupine, ki sodeluje v tvorbi vezi (6). V nasprotju s proteini in DNA struktura glikanov ni odvisna od zaporedja baz v genetskem zapisu, temveč na njo vplivata predvsem izražanje encimov iz skupine glikoziltransferaz in prisotnost ustreznih substratov (7).



Slika 1: Zgradba nekaterih fukoziliranih in sialiranih antigenov; R – molekula proteina ali lipida (povzeto po (13)).  
Figure 1: Structure of some fucosylated and sialylated antigens; R – protein or lipid moiety (adapted by (13)).

Glikozilacija ima pomembno vlogo v številnih fizioloških procesih, kot so pravilno delovanje proteinov, medcelično signaliziranje, celična adhezija in proliferacija ter interakcije celic z imunskim sistemom (8). Tako ni presenetljivo, da lahko spremembe v glikozilaciji pripomorejo k nastanku številnih patoloških stanj, med drugim tudi k rakavim obolenjem (6). Pri tem so še posebej zanimive spremembe v celični sializaciji in fukozilaciji (9).

### 3 FUKOZILTRANSFERAZE

Fukoziltransferaze so encimi, ki katalizirajo pripenjanje fukoze na akceptorske substrate. Poznamo 13 fukoziltransferaz, ki jih glede na vrsto akceptorske molekule in nastale vezi razdelimo v štiri podskupine, kar prikazuje preglednica 1 (10). So pretežno transmembranski proteini, sestavljeni iz kratke N-končne domene, transmembranske domene in katalitične C-domene (11). Večinoma

se nahajajo v Golgijevem aparatu (GA), kjer njihova katalitična domena sega v lumen GA, N-končni del pa v citoplazmo. Izjema sta fukoziltransferazi POFUT1 in POFUT2, ki se prosto plavajoči nahajata v endoplazemskem retikulumu (12).

Fukoziltransferaze so pomembne za nastanek strukturno podobnih končno fukoziliranih Lewisovih antigenov, sestavljenih iz N-acetilgalaktozamina, galaktoze in fukoze (13). Skupaj tvorijo naslednje antigene: H1, H2, Lewis<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>), Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>), Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>) in Lewis<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>), kar prikazuje slika 1 (14).

Lewisovi antigeni sodelujejo pri številnih fizioloških procesih, kot so organogeneza med razvojem zarodka, interakcije z imunskim sistemom in pravilno zvitje ter delovanje proteinov (15). Primer fukoziltransferaz, ki pripenjajo fukoze neposredno na aglikonske substrate, sta POFUT1 in POFUT2, ki s fukozilacijo skrbita za pravilno delovanje številnih proteinov, kot so proteini NOTCH, ki igrajo pomembno vlogo v celični diferenciaciji, in proteini z motivom trombospondina tipa I, ki delujejo antiangiogeno (16, 17). Glede na širok spekter funkcij in tesno sodelovanje z imunskim sistemom ni presenetljivo, da so fuko-

**Preglednica 1:** Razdelitev fukoziltransferaz (FUT). CAZy – encimi aktivni na ogljikovih hidrati, GT – glikoziltransferaza, GDP – gvanozindifosfat (11).

**Table 1:** Fucosyltransferase subgroups (FUT). CAZy – Carbohydrate-Active Enzymes, GT – glycosyltransferase, GDP – guanosine diphosphate (11).

Skupina	Encim	CAZy družina	Donorski substrat	Vrsta vezi
α1,2 FUT	FUT1	GT11	GDP-Fukoza	α1,2
	FUT2			
α1,3 in α1,4 FUT	FUT3	GT10		α1,3 in α1,4
	FUT4			
	FUT5			α1,3
	FUT6			
	FUT7			
	FUT9			
	FUT10			
	FUT11			
	α1,6 FUT		FUT8	
O-FUT	POFUT1	GT65	α1,0	
	POFUT2	GT68		

ziltransferaze pridobile pozornost tudi zaradi svoje vloge pri rakavih obolenjih, kjer bi lahko predstavljale novo tarčo za razvoj zdravil (18).

## 4 SIALILTRANSFERAZE

Sialiltransferaze so encimi, ki katalizirajo prenos sialične kisline na končno akceptorsko skupino glikoproteina ali

glikolipida. Poznamo 20 sialiltransferaz, ki jih glede na regioselektivnost akceptorskega substrata in vrsto tvorjene vezi razdelimo v štiri skupine, kar prikazuje preglednica 2 (19). So transmembranski proteini v GA, sestavljeni iz N-končne domene, usmerjene v citoplazmo, transmembranske regije in katalitične C-končne domene, ki sega v lumen GA (19).

Sialiltransferaze sodelujejo v številnih bioloških procesih. Vezava sialične kisline je pomembna za pravilno delovanje proteinov, hkrati pa zagotavlja negativen naboj na površini celic in tako vpliva na njihove adhezijske lastnosti (20).

*Preglednica 2: Razdelitev sialiltransferaz (ST3GAL); CAZy – encimi aktivni na ogljikovih hidratih, GT – glikoziltransferaza, CMP – citidinmonofosfat (11).*

*Table 2: Sialyltransferase subgroups (ST3GAL); CAZy – Carbohydrate-Active Enzymes, GT – glycosyltransferase, CMP – cytidine monophosphate (11).*

Skupina	Encim	CAZy družina	Donorski substrat	Akceptorski substrat
ST3GAL	ST3GAL1	GT29	CMP-sialična kislina	hidroksilna skupina na 3. mestu galaktoze N-, O-povezanih glikanov in glikolipidov
	ST3GAL2			
	ST3GAL3			
	ST3GAL4			
	ST3GAL5			
	ST3GAL6			
ST6GAL	ST6GAL1			hidroksilna skupina na 6. mestu galaktoze N-glikanov
	ST6GAL2			
STG6ALNAC	STGALNAC1			hidroksilna skupina na 6. mestu N-acetilgalaktozamina O-glikanov in glikolipidov
	STGALNAC2			
	STGALNAC3			
	STGALNAC4			
	STGALNAC5			
	STGALNAC6			
ST8SIA	ST8SIA1			hidroksilna skupina na 8. mestu sialične kisline N- in O-glikanov ter glikolipidov
	ST8SIA2			
	ST8SIA3			
	ST8SIA4			
	ST8SIA5			
	ST8SIA6			



Prav tako je pomembna pri tvorbi sializiranih antigenov, kot so polimeri sialične kisline in sialirani Lewisovi antigeni, preko katerih celice komunicirajo z imunskim sistemom. Sialiltransferaze sodelujejo tudi pri normalnem delovanju živčevja. Njihova zmanjšana aktivnost ali pomanjkanje se lahko izrazi kot epilepsija, vedenjske, intelektualne ali motorične motnje (21). Zaradi vpliva na imunski sistem, pravilno delovanje proteinov in adhezijo celic imajo sialiltransferaze pomembno vlogo tudi pri patogenezi rakavih bolezni in so kot takšne zanimiva tarča za razvoj novih zdravil (22).

## 5 FUKOZIL- IN SIALILTRANSFERAZE TER RAK

Povečano izražanje sialil- in fukoziltransferaz ali z njimi povezanih antigenov je povezano s slabo prognozo številnih rakavih bolezni (6). Na primer, povečano izražanje fukoziltransferaze FUT8 je povezano s slabo prognozo bolezni pri raku črevesa in danke ter nedrobnoceličnem raku pljuč (13). Z rakom dojke in njegovim metastaziranjem je povezano izražanje številnih sialiranih antigenov in sialiltransferaz (23, 24). Sialil- in fukoziltransferaze so v patogenezo rakavih bolezni vključene na številne načine, ki se skupaj kažejo kot ojačana angiogeneza in proliferacija, odpornost na celično smrt, spremenjena celična adhezija in gibljivost, epiteljsko-mezenhimska transdiferenciacija in izogibanje rakavih celic imunskemu sistemu (13).

### 5.1 ANGIOGENEZA

Tumorji so zaradi spremenjenega celičnega metabolizma izjemno energijsko potratni, posledično je za njihovo oskrbo nujno potreben nastanek novih žil. Gonilo angiogeneze je znotrajtumorna hipoksija, ki stabilizira s hipoksijo inducirani dejavnik 1 alfa, ki se nato veže na ustrezne promotorske regije in vzpodbudi nastanek žilnega rastnega dejavnika (25). Pomembno vlogo ima tudi sialiltransferaza ST3GAL1, ki sializira vazorin, kar zmanjša njegovo afiniteto do transformirajočega rastnega dejavnika  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Posledično je na voljo več prostega TGF $\beta$ , ki ojača vaskularizacijo tumorja. Izbitje gena za ST3GAL1 zmanjša rast in ožiljenost tumorja iz celic celične linije raka dojke MCF7 v mišjih ksenograftih. Prav tako lahko ST3GAL1 sializira angiogenin, ki se nato bolje prilega TGF $\beta$ , kar ojača vaskularizacijo tumorja (26).

### 5.2 ODPORNOST NA CELIČNO SMRT IN PROLIFERACIJA

Za rast tumorja in njegovo preživetje so nujne spremembe, ki stimulirajo celično proliferacijo in zaščitijo celice pred smrtjo. Povišano izražanje fukoziltransferaz in z njimi povezanih antigenov močno korelira s povečano proliferativno kapaciteto rakavih celic (13). Yan in sod. so opazili, da transfekcija ovarijskih celic z genom *Fut1* povzroči visoko stopnjo izražanja fukoziliranih epitopov na površini celic in bolj invaziven fenotip rakavih celic. Uporaba anti-Le<sup>x</sup> protiteles pa zmanjša celično proliferacijo in invazivnost (27, 28). Podobno so opazili tudi pri indukciji izražanja fukoziltransferaze FUT7 v celicah karcinoma pljuč A549, kjer je njeno povečano izražanje vodilo v ojačano celično proliferacijo (29). Hipersializacija receptorjev 1 za dejavnik tumorske nekroze (TNFR1) zniža njihovo afiniteto za dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), s čimer prepreči tvorbo interakcij med TNF $\alpha$  in TNFR1 ter kasnejšo internalizacijo receptorja in aktivacijo apoptoze (30). Hkrati lahko ST6GAL1 sializira receptor za epidermalni rastni dejavnik, kar ojača njegovo delovanje in vzpodbudi celično rast, izbitje gena za ST6GAL1 pa zmanjša invazivnost tumorja, kot je bilo pokazano na celicah raka jajčnikov (24).

### 5.3 ADHEZIJSKI PROCESI IN GIBLJIVOST

Spremenjene celične adhezijske lastnosti in gibljivost so pomemben dejavnik, ki omogoča rakavim celicam, da preidejo iz mikrookolja tumorja in se razširijo po drugih tkivih (23). Hipersializacija poveča negativen naboj na površini celic, s čimer se povešajo odbojne sile med posameznimi celicami, kar olajša odcepitev rakavih celic iz tumorja (20). V celicah raka dojke hipersializacija integrinov  $\beta$ 1 zmanjša celično adhezijo na zunajcelično ogrodje, sializacija integrinov  $\beta$ 1 v celicah raka kolona pa ojača adhezijo celic do kolagena in s tem poveča celično migracijo (31). Odstranitev sialične kisline z nevraminidazami po drugi strani zmanjša metastatski potencial celic (32). Pomembno vlogo pri celični migraciji igrajo tudi sialirani Lewisovi antigeni, ki tvorijo močne interakcije z E-selektini na površini endoteljskih celic žil. Sialirani Lewisovi antigeni tako omogočijo kotaljenje tumorskih celic vzdolž endotelija in njihovo kasnejšo ekstravazacijo ter metastaziranje (33). Vloga fukoziltransferaz pri spremenjeni celični adheziji je manj jasna (34). *Liu in sod.* so pokazali, da FUT4 preko fukozilacije celične adhezijske molekule L1 zmanjša medcelično adhezijo, s čimer je povezana višja invazivnost melanoma (35).

## 5.4 EPITELIJSKO MEZENHIMSKA TRANSDIFERENCIACIJA

Gre za proces, kjer iz epitelnih celic nastanejo celice mezenhimskega tipa. Nastale celice imajo spremenjene adhezijske lastnosti in so bistveno bolj gibljive, zaradi česar se predvideva, da igrajo pomembno vlogo v metastaziranju (23). Za njihov nastanek so nujne spremembe v izražanju transkripcijskih dejavnikov in medceličnemu komuniciranju, v kar so vpletene tudi spremembe v glikozilaciji (36). Sakuma *in sod.* so pokazali, da povišano izražanje ST6GAL in ST3GAL lahko preko povišanja sializacije TGF $\beta$  pospeši epitelijsko-mezenhimsko transdiferenciacijo (37). Podobno je moč opaziti tudi pri nekaterih fukoziltransferazah, kjer je povišano izražanje FUT4 v celicah celičnih linij A549, H1299 in H358 povezano s povišano tkivno invazivnostjo ter indukcijo epitelijsko-mezenhimske transdiferenciacije, uporaba inhibitorjev FUT4 pa povrne mezenhimski fenotip celic nazaj v epitelnega (38).

## 5.5 IZOGIBANJE IMUNSKEMU SISTEMU

Da lahko rakave celice preživijo, se morajo izogniti imunskemu sistemu (6). Ogljikovi hidrati na celični površini so eni izmed prvih in ključnih antigenov, ki sodelujejo v imunskem odzivu (39). Pomembno vlogo pri prepoznavanju rakavih celic igrajo dendritične celice, ki so sposobne prepoznavanja tumorskih antigenov ter njihove predstavitve T-celicam, ki jih lahko nato uničijo. Ključno vlogo pri specifičnem prepoznavanju Lewisovih antigenov rakavih celic ima površinska molekula CD209 na dendritičnih celicah, aktivacija katere privede do izražanja interleukinov IL-10 in IL-27 ter posledične imunosupresije (39). Pomembno vlogo pri imunosupresiji igra tudi FUT8, ki je odgovorna za fukozilacijo receptorjev PD-1. Preprečevanje njihove fukozilacije pa izboljša imunski odziv (40).

Eden izmed prvih dokazov, da lahko sializacija pomembno vpliva na imunski sistem, prihaja iz študij na miših s fibrosarkomom, kjer so pokazali, da so visoko sialirane rakave celice manj imunogene kot nizko sialirane (41). Predvidevajo, da imajo pomembno vlogo pri tem sialično kisline vezoči imunoglobulini lektinskega tipa (Siglec), ki se nahajajo na celicah imunskega sistema in sodelujejo pri njegovem uravnavanju. Študije so pokazale, da so interakcije med tumorskimi sialoglikani in Siglec povezane z imunosupresijo, spremembo fenotipa makrofagov in negativno regulacijo T-limfocitov (42). Tako so Siglec-5, -7, -9, -10 in -15 povezani z imunosupresijo T-limfocitnega odgovora,

Siglec-7 in -9 pa z imunosupresijo makrofagov in celic naravnih ubijalk. Pri tem ima pomembno vlogo ST3GAL1, ki tvori ligande za Siglec-7, in ST3GAL4, ki tvori ligande za Siglec-9, povišano izražanje obeh encimov pa je močno povezano s slabšim preživetjem bolnikov z rakom trebušne slinavke (43, 44).

## 6 SKLEP

Večina smrti med bolniki z rakom je posledica procesa metastaziranja. Zanj je značilno, da rakave celice pridobijo lastnosti, ki jim omogočijo, da se odcepijo iz primarnega tumorja, potujejo po telesu in nato prodrejo v novo tkivo, kjer tvorijo sekundarne zasevke. Da metastaziranje lahko poteče, mora v rakavih celicah priti do številnih biokemičnih sprememb. Pogoste med njimi so spremembe v celični glikozilaciji, še posebej fukozilaciji in sializaciji. Sializacija in fukozilacija sta povezani s povišano celično proliferacijo, odpornostjo na celično smrt, spremenjenimi adhezivnimi lastnostmi celic in gibljivostjo, epitelijsko-mezenhimsko transdiferenciacijo ter zaščito pred imunskim sistemom. Sializacija je povezana tudi z ojačano angiogenezo, vendar vloga fukozilacije pri tem še ni popolnoma jasna. Glede na višanje števila smrti zaradi rakavih obolenj ter ključno vlogo metastaziranja pri tem procesu bi razvoj dodatnih zdravil, ki bi ciljala metastaziranje, lahko pomembno izboljšal preživetje onkoloških bolnikov. Sialil- in fukoziltransferaze so vpletene v številne patološke procese povezane z metastaziranjem in kot takšne predstavljajo zanimivo tarčo za razvoj novih zdravil.

## 7 LITERATURA

1. World health organization. *Global cancer observatory*. 2024.
2. Chaffer CL, Weinberg RA. *A perspective on cancer cell metastasis*. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.
3. Fidler IJ. *The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nature Reviews Cancer*. 2003 Jun;3(6):453-8.
4. Vajaria BN, Patel PS. *Glycosylation: a hallmark of cancer?* *Glycoconjugate Journal*. 2017 Apr;34(2):147-156.
5. Fuster MM, Esko JD. *The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets*. *Nature Reviews Cancer*. 2005 Jul;5(7):526-42.





6. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*. 2015 Sep;15(9):540-55.
7. Freeze HH. Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews Genetics*. 2006 Jul;7(7):537-51.
8. Möckl L. The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020 Apr 15;8:253.
9. Kannagi R, Yin J, Miyazaki K, Izawa M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants-Hakomori's concepts revisited. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2008 Mar;1780(3):525-31.
10. Grewal RK, Shaikh AR, Gorle S, Kaur M, Videira PA, Cavallo L, et al. Structural insights in mammalian sialyltransferases and fucosyltransferases: We have come a long way, but it is still a long way down. *Molecules*. 2021 Aug 27;26(17):5203.
11. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, et al. Crystal structure of mammalian  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology*. 2007 May;17(5):455-66.
12. Hart GW, Akimoto Y. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. *Essentials of Glycobiology* 2nd edition. 2009 Jul-Sep;17(7-9):531-41
13. Blanas A, Sahasrabudhe NM, Rodríguez E, van Kooyk Y, van Vliet SJ. Fucosylated antigens in cancer: An alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Frontiers in Oncology*. 2018 Feb 23;8:39.
14. Lloyd KO. The chemistry and immunochemistry of blood group A, B, H, and Lewis antigens: Past, present and future. *Glycoconjugate Journal*. 2000 Jul-Sep;17(7-9):531-41.
15. Liu S, Liu H, Tang S, Pan Y, Ji K, Ning H, et al. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 expression during early stages of human embryogenesis. *Oncol Rep*. 2004 Dec;12(6):1251-6.
16. Chen CI, Keusch JJ, Klein D, Hess D, Hofsteenge J, Gut H. Structure of human POFUT2: Insights into thrombospondin type 1 repeat fold and O-fucosylation. *EMBO Journal*. 2012 Jul 18;31(14):3183-97.
17. McMillan BJ, Zimmerman B, Egan ED, Lofgren M, Xu X, Hesser A, et al. Structure of human POFUT1, its requirement in ligand-independent oncogenic Notch signaling, and functional effects of Dowling-Degos mutations. *Glycobiology*. 2017 Aug 1;27(8):777-786.
18. Lv Y, Zhang Z, Tian S, Wang W, Li H. Therapeutic potential of fucosyltransferases in cancer and recent development of targeted inhibitors. *Drug Discovery Today*. 2023 Jan;28(1):103394.
19. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyng-Petit B, Julien S, Delanny P. The human sialyltransferase family. *Biochimie*. 2001 Aug;83(8):727-37.
20. Daly J, Sarkar S, Natoni A, Henderson R, Swan D, Carlsten M, et al. Hypersialylation Protects Multiple Myeloma Cells from NK Cell-Mediated Immunosurveillance and This Can be Overcome By Targeted Desialylation Using a Sialyltransferase Inhibitor. *Blood*. 2019 October;19(10):159-160.
21. Khamirani HJ, Zoghi S, Faghihi F, Dastgheib SA, Hassanipour H, Bagher Tabei SM, et al. Phenotype of ST3GAL3 deficient patients: A case and review of the literature. *Eur J Med Genet*. 2021 Aug;64(8):104250.
22. Al Saoud R, Hamrouni A, Idris A, Mousa WK, Abu Izneid T. Recent advances in the development of sialyltransferase inhibitors to control cancer metastasis: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023 Sep;165:115091.
23. Munkley J. Aberrant Sialylation in Cancer: Therapeutic Opportunities. *Cancers*. 2022 Aug 31;14(17):4248.
24. Cheng J, Wang R, Zhong Y, Chen X, Cheng Y, Li W, et al. ST6GAL2 downregulation inhibits cell adhesion and invasion and is associated with improved patient survival in breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2020 Jan 29;13:903-914.
25. Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Keio Journal of Medicine*. 2012;61(2):47-56.
26. Yeo HL, Fan TC, Lin RJ, Yu JC, Liao GS, Chen ESW, et al. Sialylation of vasorin by ST3Gal1 facilitates TGF- $\beta$ 1-mediated tumor angiogenesis and progression. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1996-2007.
27. Yan LM, Lin B, Zhu LC, Hao YY, Qi Y, Wang CZ, et al. Enhancement of the adhesive and spreading potentials of ovarian carcinoma RMG-1 cells due to increased expression of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 with the Lewis Y-structure on transfection of the  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase gene. *Biochimie*. 2010 Jul;92(7):852-7.
28. Li F fei, Lin B, Hao Y ying, Liu J juan, Zhang F, Zhang S lan. Inhibitory effect of anti-Lewis y antibody on alpha1,2-fucosyltransferase gene transfected human ovarian cancer cells in vitro. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2008 Mar;24(3):267-9.
29. Liang J xiao, Gao W, Cai L. Fucosyltransferase VII promotes proliferation via the EGFR/AKT/mTOR pathway in A549 cells. *Onco Targets Ther*. 2017 Aug 7;10:3971-3978.
30. Holdbrooks AT, Britain CM, Bellis SL. ST6Gal-I sialyltransferase promotes tumor necrosis factor (TNF)-mediated cancer cell survival via sialylation of the TNF receptor 1 (TNFR1) death receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Feb 2;293(5):1610-1622.
31. Yuan Y, Wu L, Shen S, Wu S, Burdick MM. Effect of alpha 2,6 sialylation on integrin-mediated adhesion of breast cancer cells to fibronectin and collagen IV. *Life Sci*. 2016 Mar 15;149:138-45.
32. Uemura T, Shiozaki K, Yamaguchi K, Miyazaki S, Satomi S, Kato K, et al. Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin  $\beta$ 4. *Oncogene*. 2009 Mar 5;28(9):1218-29.
33. Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2010 Jun;20(3):169-77.
34. Li J, Hsu HC, Mountz JD, Allen JG. Unmasking Fucosylation: from Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases. *Cell Chemical Biology*. 2018 May 17;25(5):499-512.
35. Liu Q, Adhikari E, Lester DK, Fang B, Johnson JO, Tian Y, et al. Androgen drives melanoma invasiveness and metastatic spread by inducing tumorigenic fucosylation. *Nat Commun*. 2024 Feb 7;15(1):1148.
36. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014 Mar;15(3):178-96.
37. Sakuma K, Aoki M, Kannagi R. Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 15;109(20):7776-81.
38. Tian L, Shen D, Li X, Shan X, Wang X, Yan Q, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4. *Oncotarget*. 2016 Jan 12;7(2):1619-32.
39. Rodríguez E, Schettters STT, Van Kooyk Y. The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2018 Mar;18(3):204-211.
40. Okada M, Chikuma S, Kondo T, Hibino S, Machiyama H, Yokosuka T, et al. Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-



- Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. Cell Rep. 2017 Aug 1;20(5):1017-1028.*
41. Cohen M, Elkabets M, Perlmutter M, Porgador A, Voronov E, Apte RN, et al. Sialylation of 3-Methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma Determines Antitumor Immune Responses during Immunoediting. *The Journal of Immunology.* 2010 Nov 15;185(10):5869-78.
42. MacAuley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nature Reviews Immunology.* 2014 Oct;14(10):653-66.
43. Rodriguez E, Boelaars K, Brown K, Eveline Li RJ, Kruijssen L, Bruijns SCM, et al. Sialic acids in pancreatic cancer cells drive tumour-associated macrophage differentiation via the Siglec receptors Siglec-7 and Siglec-9. *Nat Commun.* 2021 Feb 24;12(1):1270.
44. Ikehara Y, Ikehara SK, Paulson JC. Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Oct 8;279(41):43117-25.



# NANOTEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA ZDRAVLJENJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

## NANOTECHNOLOGY- BASED APPROACHES FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

AVTORJI / AUTHORS:

dr. Sebastjan Nemeč, mag. farm.<sup>1</sup>  
doc. dr. Damijan Knez, mag. farm.<sup>2</sup>  
izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.<sup>2</sup>  
doc. dr. Slavko Kralj, mag. farm.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institut Jožef Stefan, Odsek za sintezo materialov,  
Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija*

<sup>2</sup> *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: [sebastjan.nemec@ijs.si](mailto:sebastjan.nemec@ijs.si)



### POVZETEK

Alzheimerjeva bolezen je neozdravljiva neurodegenerativna bolezen, za katero je značilno propadanje živčnih celic in izguba kognitivnih funkcij. Trenutno odobrena zdravila naslavljajo predvsem simptome bolezni. Številne nove potencialne zdravilne učinkovine, ki vplivajo tudi na potek bolezni, pa so se v kliničnih raziskavah izkazale kot sorazmerno neuspešne. S tem razlogom v središče raziskav prihajajo novi pristopi zdravljenja Alzheimerjeve bolezni, ki temeljijo na uporabi nanotehnologije. Izvedena je bila že vrsta raziskav, v katerih so proučevali vplive različnih nanodelcev na tarče, povezane z nastankom in razvojem te bolezni. Proučevali so učinke polimernih nanodelcev, nanodelcev zlata ter železovega oksida na samozdruževanje monomerov amiloida  $\beta$  in proteina tau v agregate, kot tudi uporabo omenjenih nanodelcev za razgradnjo že nastalih agregatov proteinov. Izsledki teh raziskav predstavljajo pomembno izhodišče za nadaljnje raziskave in razvoj nanotehnoških pristopov za razgradnjo agregiranih proteinskih struktur in razvoj novih možnosti zdravljenja različnih bolezni, ki jih povezujemo s patološkim nastajanjem proteinskih agregatov.

### KLJUČNE BESEDE:

Alzheimerjeva bolezen, amiloid  $\beta$ , nanodelci, nanotehnologija, protein tau

### ABSTRACT

Alzheimer's disease is an incurable neurodegenerative disease characterized by the degeneration of neurons and the deterioration of cognitive functions. The currently approved drugs primarily address the symptoms of the disease and potential new drugs have been relatively unsuccessful in clinical trials. Due to the failure of these new agents, new approaches to treating Alzheimer's disease have come to the forefront of research, including approaches from the field of nanotechnology. There is already a number of studies where the effect of mainly polymer, gold, and iron oxide nanoparticles in preventing the self-aggregation of amyloid  $\beta$  monomers and tau protein is investigated. In addition, these nanoparticles are also being investigated for their ability to disaggregate already formed aggregates of amyloid  $\beta$  and tau protein. The available research

provides a baseline for further investigation of nanotechnological processes for the development of new treatment options for various diseases, in addition to Alzheimer's, that are associated with pathological protein aggregation.

#### KEY WORDS:

Alzheimer's disease, amyloid  $\beta$ , nanoparticles, nanotechnology, tau protein

## 1 UVOD

Kopičenje netopnih agregatov proteinov v tkivih povezuje mo z različnimi bolezenskimi stanji (1). Takšni netopni agregati so značilno prisotni tudi v različnih tkivih pri številnih neurodegenerativnih boleznih (2). Kljub intenzivnemu raziskovanju in iskanju novih potencialnih zdravilnih učinkovin v zadnjih desetletjih, trenutno razpoložljive terapevtske možnosti le omilijo simptome neurodegenerativnih bolezni in do določene mere upočasnijo njihovo napredovanje, medtem ko ne vplivajo na njihove vzroke ali razvoj bolezni. Vzrokov za nastanek agregatov, ki so lahko v tkivih tudi normalno prisotni, je več. Njihovo nastajanje je kompleksen proces, na katerega vpliva preplet različnih celičnih, (pato) fizioloških in okoljskih dejavnikov. Le-ti povzročijo nepravilnosti v konformaciji proteinov, kar vodi v njihovo agregiranje in kopičenje (3). Tak primer je Alzheimerjeva bolezen (AB), ki je neozdravljiva neurodegenerativna bolezen. Povezana je s poškodbami možganskega tkiva kot posledica počasi napredujočega propadanja nevronov ter porušenega ravnovesja izločanja živčnih prenašalcev. Eden izmed najzgodnejših znakov AB je izguba kratkoročnega spomina, nadaljnje propadanje živčnih celic pa poleg napredujočega upada kognitivnih sposobnosti privede tudi do zmanjšanja sposobnosti opravljanja najbolj osnovnih telesnih in življenjskih funkcij (3).

## 2 DIAGNOSTIKA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Diagnostika AB je kompleksna in temelji na več metodah. Običajno se postavljanje diagnoze prične s temeljitim zdrav-

niškim pregledom, kjer se za oceno stanja motenj v kognitivnih sposobnostih uporabljajo standardizirani testi, kot je kratek preizkus spoznavnih sposobnosti (angl. *Mini-Mental Status Examination*, MMSE) in lestvica za oceno kognitivnih sposobnosti bolnikov z AB (angl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive*, ADAS-Cog) (4–7). Poleg tega se za diagnostiko uporabljajo laboratorijske preiskave, ki temeljijo na določanju koncentracije amiloida  $\beta$  in proteina tau v cerebrospinalni tekočini (angl. *cerebrospinal fluid*, CSF), ter slikanje možganskega tkiva z magnetno resonanco in s pozitronsko emisijsko tomografijo z uporabo radioaktivnega označevalca  $^{18}\text{F}$ fluorodeoksiglukoza (8). Pri bolnikih z AB je koncentracija amiloida  $\beta$  v CSF običajno nižja za približno polovico v primerjavi z osebami enake starosti brez znakov AB (9, 10). Koncentracija amiloida  $\beta$  v CSF se s staranjem fiziološko znižuje, kar naj bi bilo povezano z odlaganjem amiloida  $\beta$  v obliki netopnih amiloidnih plakov v možganskem tkivu. Koncentracija proteina tau v CSF je pri bolnikih z AB v večini primerov približno trikrat višja kot pri osebah enake starosti brez AB (9, 10).

## 3 HIPOTEZE O NASTANKU ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Uveljavljenih je več hipotez, ki opisujejo nastanek AB, med katerimi sta najširše sprejeti amiloidna hipoteza in hipoteza proteina tau. Amiloidna hipoteza predpostavlja, da nastanek in kopičenje agregatov amiloida  $\beta$  v možganskem tkivu povzroči napredujoč propad živčnih celic in razvoj značilne klinične slike AB (11, 12). Kopičenje agregatov amiloida  $\beta$  se pojavi zaradi prekomernega nastajanja monomerov amiloida  $\beta$  in zaradi motenj v odstranjevanju nastalih amiloidnih struktur. Monomeri amiloida  $\beta$  so neke vrste nukleacijska jedra, na katera se z nadaljnjim samozdruževanjem odloži še več monomerov. To vodi v nastanek kratkih topnih oligomerov, ki nadalje spontano rastejo v daljše fibrile amiloida  $\beta$ . Te zrele fibrile amiloida  $\beta$  so netopne frakcije, ki se odlagajo v možganskem tkivu v obliki večjih agregatov, t. i. amiloidnih plakov (13). Amiloidno hipotezo potrjujejo določene dedne mutacije genov, ki pri nosilcih teh mutacij povzročijo motnje v metabolizmu amiloida  $\beta$  in vodijo v pojav t. i. družinske oblike AB (14). Amiloidni plaki so značilno prisotni v možganskem tkivu pri večini bolnikov z AB (15). Ugotovili so, da ima tudi sicer skoraj polovica zdravih ljudi, starejših od 70 let, ki nimajo težav s spominom, v možganskem tkivu prisotne netopne amiloidne plake (15). Te

ugotovitve torej nakazujejo, da amiloidna hipoteza ne pojasni nastanka AB v celoti in da so verjetno še drugi mehanizmi vpleteni v nastanek te bolezni. Od svoje uveljavitve je bila amiloidna hipoteza glavno vodilo pri načrtovanju in usmerjanju raziskav na področju AB (16).

Zaradi neuspeha številnih kliničnih študij z učinkovinami, ki ciljajo različne terapevtske tarče v kaskadi reakcij nastanka in odlaganja amiloida  $\beta$  (17), so se amiloidni hipotezi pridružile še druge hipoteze nastanka AB (18). Ob bok amiloidni hipotezi so v zadnjih 20 letih postavili hipotezo proteina tau (19, 20). Tau je znotrajcelični protein, ki stabilizira strukturo mikrotubulov v citoskeletu živčnih celic. Vežavo proteina tau na mikrotubule nadzoruje stopnja fosforilacije tirozinskih aminokislinskih ostankov v strukturi tega proteina. Hiperfosforilacija proteina tau vodi v disociacijo letga z mikrotubulov. To zmanjša stabilnost mikrotubulov in povzroči njihovo razgradnjo ter posledično privede do okvar v aksonskem transportu. Hiperfosforiliran protein tau agregira in tvori netopne znotrajcelične pentlje, kar okvari znotrajcelični transport snovi in vodi v propad živčnih celic. Znotrajcelične pentlje proteina tau v možganskem tkivu so poleg agregatov amiloida  $\beta$  značilno prisotne pri AB. Količina prisotnih pentelj proteina tau sovпада s stopnjo napredovanja AB in stopnjo upada kognitivnih funkcij. Glede na obseg izvedenih raziskav in zbranih ugotovitev je danes hipoteza proteina tau sprejeta kot osnova mehanizma nastanka AB v enaki meri kot amiloidna hipoteza (21). Številne raziskave nakazujejo na povezave med amiloidnim prekursorjskim proteinom (angl. *Amyloid Precursor Protein*, APP), agregati amiloida  $\beta$  in nastankom pentelj proteina tau. Povečana količina APP in agregatov amiloida  $\beta$  lahko pospeši fosforilacijo in samozdruževanje proteina tau ter nastanek znotrajceličnih pentelj proteina tau in posledično vodi v hitrejši propad živčnih celic (21).

## 4 ZDRAVILNE UČINKOVINE ZA ZDRAVLJENJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Odobrena in najbolj široko uporabljana zdravila, ki so na voljo za zdravljenje AB, vsebujejo zdravilne učinkovine, ki zgolj upočasnijo njeno napredovanje in izboljšajo kognitivne sposobnosti bolnikov predvsem v začetnih stadijih bolezni (22). Delujejo na podlagi povečanja prenosa signala med še delujočimi živčnimi celicami in zmanjševanja neravnovesja med živčnimi prenašalci, ki je posledica napredujočega propadanja nevronov. V klinični uporabi sta dve sku-

pini zdravilnih učinkovin, in sicer zaviralci holin esteraz in antagonisti receptorjev za prenašalec *N*-metil-D-aspartat (NMDA) (23). Zaviralci holin esteraz, kot so rivastigmin, donepezil in galantamin, zmanjšajo razgradnjo acetilholina in posledično povečajo njegovo koncentracijo v sinapsah ter tako ojačajo prenos signalov med še delujočimi živčnimi celicami, kar nekoliko izboljša umske sposobnosti bolnikov v zgodnjih stadijih AB. Druga skupina učinkovin, primer je memantin, zavira delovanje receptorjev NMDA. V možganskem tkivu bolnikov z AB je lahko prisotna višja koncentracija živčnega prenašalca glutamata kot pri ljudeh brez AB, kar je posledica okvarjenih mehanizmov odstranjevanja glutamata iz sinaps živčnih celic (24). Zadrževanje glutamata v sinapsah povzroči stalno aktivacijo receptorjev NMDA, kar privede do t. i. ekscitotoksičnosti in propada nevronov zaradi prekomerno povišane koncentracije kalcija v sinapsah živčnih celic. Učinkovina memantin zavira prekomerno aktivacijo receptorjev NMDA in tako upočasnjuje propad nevronov zaradi ekscitotoksičnosti. Omejitev pri uporabi obeh razredov zdravilnih učinkovin, ki sta danes v uporabi, so številni neželeni učinki (23, 24).

V kliničnih preskušanjih so številne nove potencialne zdravilne učinkovine, ki so bodisi male molekule, kratki peptidi ali specifična protitelesa, ki ciljajo različne stopnje v kaskadi reakcij nastanka in kopičenja amiloida  $\beta$ . Takšni primeri so (i) zaviralci sekretaz  $\beta$  in  $\gamma$  ter modulatorji sekretaz  $\alpha$  in  $\gamma$  za zmanjšanje nastanka monomerov amiloida  $\beta$ , (ii) zaviranje agregiranja monomerov amiloida  $\beta$  s sciloinozitolom in (iii) specifični kratki peptidi za zaviranje agregacije amiloida  $\beta$  in razgradnjo amiloidnih plakov (25–31). V predkliničnih in kliničnih raziskavah so tudi številna monoklonska protitelesa, ki ciljajo in pospešijo odstranjevanje amiloida  $\beta$  iz možganskega tkiva bolnikov z AB (32). Dvema protitelesoma, adukanumab in lekanemab, je Ameriški urad za zdravila in prehrano (FDA) odobril uporabo za zdravljenje AB (33), medtem ko Evropska agencija za zdravila klinične uporabe ni odobrila (34). Zaradi slabe učinkovitosti zdravljenja AB in neželenih učinkov se je adukanumab leta 2024 umaknil s trga (35). Julija 2024 je FDA za zdravljenje AB odobril monoklonsko protitelo donanemab, ki je v kliničnih študijah učinkovito zavrlo napredovanje AB ter statistično pomembno izboljšalo kognitivne sposobnosti bolnikov (36).

Poleg učinkovin, ki vplivajo na amiloid  $\beta$ , so v različnih fazah kliničnih preskušanj tudi učinkovine z (i) delovanjem na hiperfosforilacijo proteina tau in nastanek znotrajceličnih pentelj proteina tau, (ii) kelatorji kovinskih ionov, (iii) protivnetne učinkovine in (iv) različne snovi z antioksidativnim delovanjem (37–40). Raziskave *in vitro* so pokazale tudi nevroprotektivno delovanje snovi, ki jih vnašamo s hrano,

kot so različni polifenoli, kvercetin, resveratrol in kurkumin (38–40). Kljub obetavnim rezultatom raziskav *in vitro* je pomembna pomanjkljivost navedenih snovi njihova nizka biološka uporabnost in omejeno prehajanje krvno-možganske pregrade (37–40).

## 5 IZBRANI NANOTEHNOLOŠKI PRISTOPI DELOVANJA NA AGREGATE PROTEINOV

Zaradi številnih neuspehov učinkovin v kliničnih preskušanjih, kljub njihovim vzpodbudnim rezultatom *in vitro*, prihajajo v ospredje raziskav alternativni pristopi zdravljenja AB. Del raziskav se je tako usmeril v razvoj nanotehnoloških pristopov za zaviranje samozdruževanja monomerov amiloida  $\beta$  in proteina tau v večje strukture in razgradnjo netopnih agregatov amiloida  $\beta$  na manjše strukture, kar bi lahko pospešilo njihovo izločanje iz možganskega tkiva (41, 42). V nadaljevanju so predstavljeni izbrani primeri nanotehnoloških pristopov, kjer izzive, povezane z zdravljenjem AB, naslavlja uporaba različnih vrst nanodelcev.

### 5.1 POLIMERNI NANODELCI

Uporaba polimernih nanodelcev je v biomedicinskih aplikacijah že dobro uveljavljena. Njihova priprava je natančno raziskana in se uspešno izvaja v industrijskem merilu. Primarno se polimerni nanodelci uporabljajo kot nanodostavni sistem zdravilnih učinkovin. V današnjem času se polimerni nanodelci proučujejo tudi za razvoj novih pristopov zdravljenja bolezni, kot je AB. Cabaleiro-Lago in sodelavci so v raziskavi *in vitro* dokazali, da polimerni nanodelci na osnovi zmesi poliakrilamidov zakasnjajo ter upočasnijo samozdruževanje monomerov amiloida  $\beta$  v kratke oligomere, pri čemer na nadaljnje podaljševanje že nastalih kratkih oligomerov v daljše oligomere in fibrile niso imeli vpliva (43). Ta fenomen so raziskovalci pripisali vezavi monomerov in oligomerov amiloida  $\beta$  na površino nanodelcev, kar je zmanjšalo možnosti samozdruževanja monomerov. S spreminjanjem razmerja med različnimi poliakrilamidi, iz katerih so pripravljali nanodelce, so vplivali na lastnosti površine nanodelcev, zlasti na njeno hidrofobnost. Dokazali so, da je zaviranje nastanka kratkih oligomerov učinkovitejše z nanodelci z manj hidrofobno površino zaradi več vodikovih vezi, ki se vzpostavijo med monomeri in kratkimi oligomeri amiloida  $\beta$  in površino nanodelcev. Jha in sodelavci so v podobni raziskavi *in vitro* uporabili nanodelce hitosana in

nanodelce na osnovi zmesi hitosana in kopolimera mlečne ter glikolne kisline (PLGA) (44). Nanodelci hitosana so upočasnili samozdruževanje monomerov amiloida  $\beta$  v oligomere amiloida  $\beta$  in inducirali segmentacijo že prisotnih fibril amiloida  $\beta$ . Nanodelci, pripravljani iz zmesi hitosana in PLGA, pa so v primerjavi z nanodelci hitosana šibkeje zavirali agregiranje monomerov amiloida  $\beta$  in razgradnjo fibril amiloida  $\beta$ , kar nakazuje na pomemben vpliv sestave in posledično lastnosti površine nanodelcev na učinkovitost razgradnje agregatov amiloida  $\beta$  (44).

Gao in sodelavci so v raziskavah *in vitro* ter *in vivo* na transgenih miših proučevali delovanje polimernih nanodelcev PLGA z oblogo na osnovi celične membrane eritrocitov (45). Na površino nanodelcev so vezali molekulo T807, ki je označevalec za slikanje s pozitronsko emisijsko tomografijo in selektivno cilja hiperfosforilirane proteine tau, v oblogo nanodelcev pa so vgradili kurkumin, ki ima antioksidativno in nevroprotektivno delovanje. V raziskavi *in vitro* na nevronih so pokazali selektivno vezavo hiperfosforiliranega proteina tau na nanodelce in zmanjšanje stopnje fosforilacije proteina. V nadaljevanju so proučevali porazdeljevanje nanodelcev pri miših kot tudi njihovo prehajanje skozi krvno-možgansko pregrado ter sočasno vrednotili sproščanje vgrajenega kurkumina. V možganskem tkivu miši so opazili zmanjšanje koncentracije hiperfosforiliranega proteina tau in zmanjšanje propada živčnih celic ter izboljšanje kognitivnih sposobnosti miši (45).

Saleem in sodelavci so proučevali nevroprotektivni učinek nanodelcev hitosana z vgrajenim krisinom na modelu AB z zarodki rib cebric (46). Krisin je flavon z antioksidativnim in nevroprotektivnim delovanjem, njegovo učinkovitost pa omejuje predvsem slabo prehajanje krvno-možganske pregrade. V raziskavi so krisin vgradili v nanodelce hitosana in tako povečali koncentracijo le-tega v možganskem tkivu zarodkov rib cebric. Dokazali so zaščitno delovanje krisina na nevrone pred nevrotoksičnimi učinki agregatov amiloida  $\beta$ , manjšo prisotnost agregatov amiloida  $\beta$  v možganskem tkivu, izboljšanje kognitivnih sposobnosti in spomina ter sinaptične funkcije na modelu AB (46).

Raziskave dokazujejo, da polimerni nanodelci vplivajo na procese fibrilacije in tvorbe agregatov amiloida  $\beta$ . Poleg tega lahko polimerni nanodelci razgrajujejo tudi že nastale agregate amiloida  $\beta$  v manjše topne frakcije. Učinkovitost zaviranja fibrilacije in razgradnje amiloida  $\beta$  je odvisna od interakcij med polimernimi nanodelci in strukturami amiloida  $\beta$ , pri čemer so te interakcije odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev. Te lastnosti lahko uravnavamo s kemijsko sestavo nanodelcev in funkcionalizacijo njihove površine. Nadalje, z vezavo ustreznih specifičnih afinitetnih li-





gandov na površino nanodelcev lahko dosežemo njihovo ciljno vezavo in tarčno učinkovanje na strukture amiloida  $\beta$ . Polimerni nanodelci so lahko tudi nanodostavni sistem za učinkovine z nevroprotektivnim delovanjem, ki sicer izkazujejo slabo biološko uporabnost (43–46).

## 5.2 NANODELCI IN NANOPALČKE ZLATA

Poleg polimernih nanodelcev se za preprečevanje agregacije amiloida  $\beta$  in proteina tau ter razgradnje fibril amiloida  $\beta$  proučujejo tudi anorganske nanodelce, kot so nanodelci zlata in železovega oksida. Nanodelci zlata, kot tudi nanopalčke zlata, se na področju AB proučujejo za razgradnjo agregatov amiloida  $\beta$ . Kogan in sodelavci so dosegli razgradnjo fibril amiloida  $\beta$  s fototermičnim učinkom nanopalčk zlata v raziskavi *in vitro* (47). Pri obsevanju nanopalčk zlata s svetlobo v bližnjem infrardečem območju le-te sproščajo toploto. Graf na sliki 1A prikazuje fluorescenco ThT amiloida  $\beta$  in nanopalčk zlata po osvetlitvi s svetlobo valovne dolžine 808 nm. Osvetlitev fibril amiloida  $\beta$  s svetlobo valovne dolžine 808 nm v prisotnosti nanopalčk zlata povzroči zmanjšanje intenzitete fluorescenc ThT, kar nakazuje razgrajevanje fibril amiloida  $\beta$ . Posnetka presečne elektronske mikroskopije (TEM) na sliki 1A prikazujeta fibrile amiloida  $\beta$  z adsorbiranimi nanopalčkami zlata. V nadaljnjih poskusih na nevronih *in vitro* so proučevali vpliv fibril amiloida  $\beta$  in vpliv fragmentov agregatov amiloida  $\beta$  na živost nevronov, pri čemer so ugotovili, da nanopalčke zlata niso zmanjšale živosti celic, fragmenti agregatov amiloida  $\beta$  pa so bili v primerjavi s zreliimi fibrilami amiloida  $\beta$  manj toksični. Poskusi so pokazali tudi, da razgradnja agregatov amiloida  $\beta$ , ki so jo dosegli z nanopalčkami zlata in osvetlitvijo z bližnjo infrardečo svetlobo, ni imela vpliva na živost celic (47). V podobni raziskavi so Lin in sodelavci dosegli toplotno razgradnjo fibril amiloida  $\beta$  z uporabo nanopalčk zlata z na površini vezanimi molekulami polietilenglikola in osvetlitvijo s pulzno lasersko svetlobo z valovno dolžino 800 nm (48). Graf na sliki 1B prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida  $\beta$  in nanopalčk zlata po izpostavitvi laserski svetlobi. Izpostavitvev fibril amiloida  $\beta$  laserski svetlobi v prisotnosti nanopalčk zlata povzroči zmanjšanje fluorescenc ThT, kar nakazuje razgradnjo fibril amiloida  $\beta$ . Uporaba pulznega načina osvetlitve za razgradnjo fibril amiloida  $\beta$  je bila učinkovitejša od stalne osvetlitve. Avtorji raziskave so razgradnjo fibril amiloida  $\beta$  potrdili tudi z mikroskopijo na atomsko silo (slika 1B). Z raziskavami *in vitro* na nevronih so pokazali, da toksičnost nastalih fragmentov agregatov amiloida  $\beta$  ni večja od toksičnosti zrelih fibril amiloida  $\beta$ , hkrati pa je tok-

sičnost nastalih fragmentov agregatov bistveno manjša od toksičnosti topnih frakcij, t.i. oligomerov amiloida  $\beta$ . Rezultati raziskave dokazujejo, da toplotna razgradnja fibril amiloida  $\beta$  z nanopalčkami zlata ne privede do nastanka oligomerov amiloida  $\beta$ , ki izkazujejo večjo toksičnost na živčne celice v primerjavi s fragmenti agregatov amiloida  $\beta$  (48).

## 5.3 NANODELCI ŽELEZOVEGA OKSIDA

Nanodelci železovega oksida so se že uveljavili v klinični uporabi kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco in kot zdravilna učinkovina za zdravljenje določenih vrst anemij. Nanodelce železovega oksida odlikujejo nizka toksičnost, biokompatibilnost, dobra magnetna odzivnost in možnost raznolike funkcionalizacije njihove površine. Loynachan in sodelavci so v raziskavi dosegli toplotno razgradnjo fibril amiloida  $\beta$  na manjše koščke z uporabo magnetnih nanodelcev železovega oksida in uporabo magnetne hipertermije (49). Nanodelci železovega oksida se v izmeničnem magnetnem polju pri visoki frekvenci (> 100 kHz) segrejejo in posledično oddajajo toploto v bližnjo okolico. Selektivno ciljanje fibril amiloida  $\beta$  so raziskovalci v raziskavi dosegli z vezavo specifičnega kratkega peptida LPFFD na površino magnetnih nanodelcev. Dodatno so sterično stabilizacijo nanodelcev železovega oksida v disperziji dosegli z vezavo molekul polietilenglikola. Graf na sliki 1C prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida  $\beta$  in nanodelcev železovega oksida po izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju (oranžni stolpci). Zeleni stolpci prikazujejo fluorescenco ThT kontrolnih vzorcev z enako sestavo in brez izpostavitve izmeničnemu magnetnemu polju. Izpostavitvev fibril amiloida  $\beta$  izmeničnemu magnetnemu polju v prisotnosti nanodelcev železovega oksida privede do zmanjšanja intenzitete fluorescenc ThT zaradi razgrajevanja fibril amiloida  $\beta$ . Avtorji raziskave so razgrajevanje amiloida  $\beta$  z nanodelci železovega oksida dodatno pokazali s TEM (slika 1C). V nadaljevanju raziskave *in vitro* so na nevronih proučevali nevrotoksičnost fibril v prisotnosti nanodelcev železovega oksida in izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju. Raziskave so pokazale, da razgradnja fibril amiloida  $\beta$  z magnetnimi nanodelci zmanjša celično smrt nevronov (49).

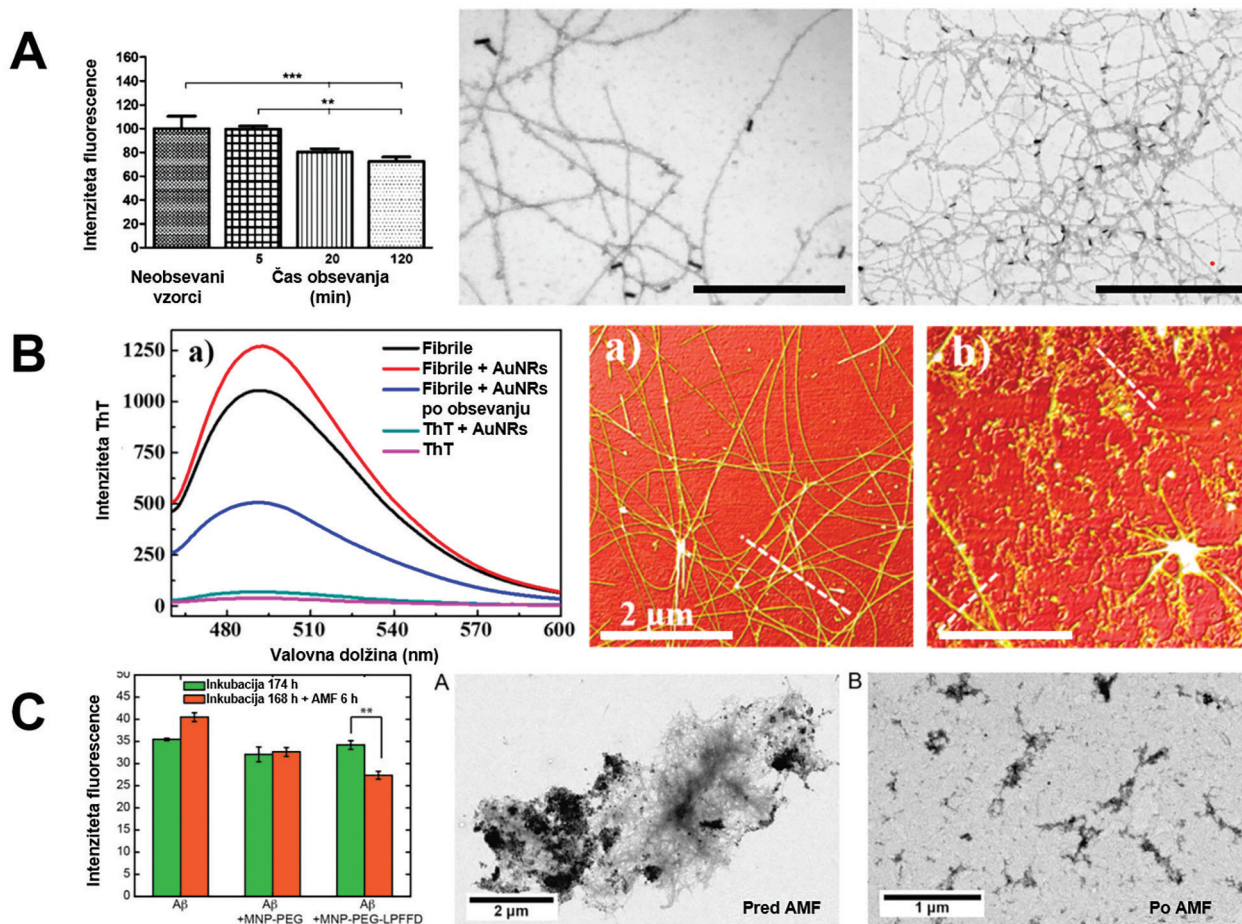
## 5.4 NANODELCI GRAFENA

Nanodelce grafena intenzivno proučujejo za uporabo v biomedicini zaradi njihovih številnih uporabnih lastnosti, kot so biokompatibilnost, kemijska stabilnost, protimikrobno in antioksidativno delovanje ter možnost enostavne



funkcionalizacije njihove površine (50). Prav tako se na področju AB proučuje učinek nanodelcev grafena na nastanek agregatov amiloida  $\beta$  in pentelj proteina tau. Zhu in sode-

lavci so pokazali zaviralni učinek nanodelcev grafena na nastanek pentelj proteina tau (51). Nanodelci grafena so prehajali krvno-možgansko pregrado in so preprečili sa-



**Slika 1:** Prikaz izbranih primerov intaktnih in razgrajenih struktur amiloida  $\beta$  z različnimi nanotehnološkimi pristopi. A) Graf prikazuje fluorescenco tioflavin T (ThT) amiloida  $\beta$  in nanopalčk zlata (AuNRs) po osvetlitvi s svetlobo pri 808 nm. Na posnetkih s presevnega elektronskega mikroskopa (TEM) so fibrile amiloida  $\beta$  z adsorbiranimi nanopalčkami zlata. Merilo: 500 nm. Prirjeno po (47). B) Graf prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida  $\beta$  in nanopalčk zlata po izpostavitvi laserski svetlobi. Posnetka z mikroskopom na atomsko silo (AFM) prikazujeta fibrile amiloida  $\beta$  pred izpostavitvijo laserski svetlobi (sredina) in ostanke fibril amiloida  $\beta$  po izpostavitvi laserski svetlobi (desno). Merilo: 2  $\mu$ m. Prirjeno po (48). C) Graf prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida  $\beta$  in nanodelcev železovega oksida z vezanim peptidom LPFFD (MNP-PEG-LPFFD) in brez (MNP-PEG) po izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju (AMF). Posnetka TEM prikazujeta fibrile amiloida  $\beta$  z adsorbiranimi nanodelci železovega oksida pred in po izpostavitvi AMF. Merilo: 2  $\mu$ m (sredina) in 1  $\mu$ m (desno). Prirjeno po (49). **Figure 1:** Overview of selected examples of intact and disrupted amyloid  $\beta$  structures using various nanotechnological approaches. A) The chart shows thioflavin T (ThT) fluorescence of amyloid  $\beta$  and gold nanorods (AuNRs) samples after irradiation with light at 808 nm. The transmission electron microscope (TEM) images show amyloid  $\beta$  fibrils with attached gold nanorods. Scale bars: 500 nm. Adopted from (47). B) The chart shows ThT fluorescence of amyloid  $\beta$  fibrils after laser treatment in the presence of gold nanorods. The atomic force microscope (AFM) images show amyloid  $\beta$  fibrils before (middle) and after laser irradiation (right). Scale bars: 2  $\mu$ m. Adopted from (48). C) The chart shows the ThT fluorescence of amyloid  $\beta$  and iron oxide nanoparticles with (MNP-PEG-LPFFD) and without (MNP-PEG) surface-attached targeting peptides before and after exposure to an alternating magnetic field (AMF). The TEM images show amyloid  $\beta$  fibrils with attached iron oxide nanoparticles before and after exposure to AMF. Scale bars: 2  $\mu$ m (middle) and 1  $\mu$ m (left). Adopted from (49).



mozduževanje monomerov proteina tau in posledično nastanek pentelj proteina tau. Avtorji so tudi pokazali, da lahko nanodelci grafena razgradijo že nastale pentlje proteina tau s tvorbo interakcij  $\pi$ - $\pi$ , ki se vzpostavijo med nanodelci grafena in proteinom tau v pentljah (51).

## 6 PREDNOSTI IN SLABOSTI UPORABE NANODELCEV NA PODROČJU ZDRAVLJENJA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Dostava zdravilnih učinkovin in vstop nanodelcev v možgansko tkivo je svojevrsten izziv, saj možgansko tkivo obdaja krvno-možganska pregrada, ki jo lahko prehajajo plini, majhne in relativno lipofilne organske molekule in molekule, kot so na primer glukoza, peptidi in proteini, ki se preko pregrade prenašajo s specifičnimi prenašalci (52). Za potencialno uporabo nanodelcev pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni je pomemben njihov učinkovit prehod iz krvnega obtoka v centralni živčni sistem, kar pa krvno-možganska pregrada otežuje ali celo preprečuje (52). Na prehod nanodelcev preko krvno-možganske pregrade vpliva več dejavnikov, kot so njihova velikost in oblika ter lastnosti njihove površine (52, 53). Njihov prehod lahko izboljšamo z vezavo specifičnih molekul na površino nanodelcev, kot so različne površinsko aktivne snovi, apolipoproteini, transferin in specifični peptidi, ki omogočijo prehajanje pregrade s pomočjo specifičnih prenašalcev, ki so tam naravno prisotni (53). Druga možnost za doseganje terapevtske koncentracije nanodelcev v možganskem tkivu je njihova neposredna intrakranialna aplikacija, kar pa je zelo invaziven pristop (54). Prednosti polimernih nanodelcev so dobro raziskane metode njihove priprave in enostavne funkcionalizacije, medtem ko so zlasti nanopalčke zlata zanimive zaradi zmožnosti sproščanja toplote ob osvetlitvi z bližnjo infrardečo svetlobo, ki prodira globoko v človeško tkivo. Tako s polimernimi nanodelci kot tudi z nanopalčkami zlata so raziskovalci uspešno dosegli razgradnjo fibril in agregatov amiloida  $\beta$  oziroma preprečili združevanje monomerov amiloida  $\beta$  v fibrile in agregate. Magnetne nanodelce železovega oksida pa lahko brezstično usmerjamo na daljavo z zunanjim magnetnim poljem.

Kljub obetavnim rezultatom raziskav *in vitro* je uporaba nanodelcev v razvoju novih načinov zdravljenja AB še v začetni fazi. Glavni izzivi, ki jih bo potrebno nasloviti pred uporabo nanodelcev za zdravljenje AB, so: (i) izboljšanje dostave nanodelcev v možgansko tkivo, (ii) zagotavljanje varnosti

uporabe nanodelcev, (iii) ugotavljanje njihovega (dolgoročnega) vpliva na zdravje bolnikov, (iv) ugotavljanje prisotnosti morebitnih neželenih učinkov nanodelcev v netarčnih tkivih ter (iv) raziskave absorpcije, porazdeljevanja, metabolizma in izločanja nanodelcev iz telesa (določitev farmakokinetičnih lastnosti nanodelcev). Poleg tega bo potrebno vzpostaviti ustrezno regulativo, ki bo definirala fizikalno-kemijske parametre nanodelcev za uporabo pri zdravljenju AB in tudi drugih bolezni.

## 7 SKLEP

Uporaba nanodelcev se v zadnjih letih raziskuje kot perspektivni pristop zdravljenja AB. Dosedanje raziskave so pokazale, da lahko različni nanodelci zavirajo agregiranje amiloida  $\beta$  oziroma povzročijo razgradnjo že nastalih amiloidnih plakov v manjše fragmente. Trenutno so za namen razvoja novih terapij zdravljenja AB v središču raziskav polimerni nanodelci in nanodelci oziroma nanopalčke zlata. V številnih predkliničnih raziskavah so potrdili uspešno razgradnjo fibril amiloida  $\beta$  v manjše fragmente in pokazali, da so manjši fragmenti amiloida manj citotoksični za nevronske celice v primerjavi z zreliimi fibrilami amiloida  $\beta$ . Preostale vrste anorganskih nanodelcev so trenutno v raziskavah novih terapevtskih pristopov AB precej redko zastopane.

Kljub številnim odprtim izzivom je potencial uporabe nanodelcev za zdravljenje AB velik. Nadaljnje raziskave bodo verjetno usmerjene v razvoj novih vrst nanodelcev z ustrežno velikostjo, obliko, koloidno stabilnostjo in ustreznimi fizikalnimi lastnostmi za učinkovito preprečevanje agregacije amiloida  $\beta$  ali proteina tau in za doseganje učinkovite razgradnje plakov amiloida  $\beta$  ali pentelj proteina tau. Potrebne bodo nadaljnje poglobljene raziskave za boljše in celovitejše razumevanje interakcij med nanodelci in amiloidom  $\beta$  ali proteinom tau, kar bo osnova za doseganje večje učinkovitosti in varnosti uporabe nanodelcev za zdravljenje AB.

## 8 IZJAVA

Delo je nastalo s financiranjem s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike

Slovenije (ARIS) v okviru raziskovalnih programov P2-0089, P1-0208 in P1-0420, projektov ARIS J2-60047, J2-3043, J3-3079, J7-4420, L2-60141 in bilateralnih projektov ARIS BI-FR/23-24-PROTEUS-005 (PR-12039) in BI-RS/23-25-030 (PR-12782).

## 9 LITERATURA

1. Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci.* 1995;20(11):456–9.
2. Koo EH, Lansbury J, Kelly JW. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(18):9989–90.
3. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2021;7(1):1–21.
4. Clinic M. Learn how Alzheimer's is diagnosed [Internet]. Mayo Clinic. 2019. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>
5. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2021;8(3):371–86.
6. Arevalo-Rodriguez I, Smalagic N, Roqué-Figuls M, Ciapponi A, Sanchez-Perez E, Giannakou A, et al. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the early detection of dementia in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Jul 27;2021(7).
7. Kueper JK, Speechley M, Montero-Odasso M. The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review. *J Alzheimer's Dis.* 2018;63(2):423–44.
8. Ferreira LK, Busatto GF. Neuroimaging in Alzheimer's disease: Current role in clinical practice and potential future applications. *Clinics.* 2011;66:19–24.
9. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003 Oct;2(10):605–13.
10. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, Yamaguchi H, Urakami K, Park JM, et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1999;270(2):91–4.
11. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's Disease: The Amyloid Alzheimer's disease. *Science.* 1992;256(5054):184–5.
12. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry.* 2021;26(10):5481–503.
13. Ullah R, Park TJ, Huang X, Kim MO. Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery. *Ageing Res Rev.* 2021;71:101451.
14. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(1):1–21.
15. Kirkitadze MD, Bitan G, Teplow DB. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: The emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res.* 2002;69(5):567–77.
16. Karran E, Mercken M, Strooper B De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9).
17. Asher S, Priefer R. Alzheimer's disease failed clinical trials. *Life Sci.* 2022;306(March):120861.
18. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018;7(1):1–7.
19. Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem.* 2017;139:153–67.
20. Bejanin A, Schonhaut DR, La Joie R, Kramer JH, Baker SL, Sosa N, et al. Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain.* 2017;140(12):3286–300.
21. Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):505–8.
22. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis.* 2020;12:117957352090739.
23. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain.* 2018;141(7):1917–33.
24. Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's Disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(4):1–16.
25. Cummings J, Lee G, Nahed P, Kamar MEZN, Zhong K, Fonseca J, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* 2022;8(1).
26. Kumar D, Ganeshpurkar A, Kumar D, Modi G, Gupta SK, Singh SK. Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead. *Eur J Med Chem.* 2018;148:436–52.
27. Panza F, Lozupone M, Solfrizzi V, Sardone R, Piccinini C, Dibello V, et al. BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(11):847–57.
28. F. Lichtenthaler S. Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(2):165–77.
29. Salloway S, Sperling R, Keren R, Porsteinsson AP, van Dyck CH, Tariot PN, et al. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology.* 2011 Sep 27;77(13):1253–62.
30. Neddenriep B, Calciano A, Conti D, Sauve E, Paterson M, Bruno E, et al. Short Peptides as Inhibitors of Amyloid Aggregation. *Open Biotechnol J.* 2012;5(1):39–46.
31. Stark T, Lieblein T, Pohland M, Kalden E, Freund P, Zangl R, et al. Peptidomimetics That Inhibit and Partially Reverse the Aggregation of A $\beta$ 1–42. *Biochemistry.* 2017;56(36):4840–9.
32. Lacorte E, Ancidoni A, Zaccaria V, Remoli G, Taricotti L, Bellomo G, et al. Safety and Efficacy of Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Published and Unpublished Clinical Trials. *Journal of Alzheimer's Disease [Internet].* 2022 Mar 5;87(1):101–29.
33. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016;537(7618):50–6.





34. Aduhelm | European Medicines Agency [Internet]. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu). 2024 Jul 2; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/aduhelm>
35. Development and sale of Alzheimer's drug, aducanumab, ceased - Alzheimer's Research UK [Internet]. Alzheimer's Research UK. 2024. Available from: <https://www.alzheimersresearchuk.org/news/development-and-sale-of-alzheimers-drug-aducanumab-ceased/>
36. 4.Research C for DE and. FDA approves treatment for adults with Alzheimer's disease. FDA [Internet]. 2024 Jul 2; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-adults-alzheimers-disease>
37. Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(7):399–415.
38. Voulgaropoulou SD, van Amelsvoort TAMJ, Prickaerts J, Vingerhoets C. The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: A systematic review of pre-clinical and clinical studies. *Brain Res*. 2019;1725(June):146476.
39. Komorowska J, Wątroba M, Szukiewicz D. Review of beneficial effects of resveratrol in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *Adv Med Sci*. 2020;65(2):415–23.
40. Khan H, Ullah H, Aschner M, Cheang WS, Akkol EK. Neuroprotective effects of quercetin in alzheimer's disease. *Biomolecules*. 2020;10(1).
41. Gupta J, Fatima MT, Islam Z, Khan RH, Uversky VN, Salahuddin P. Nanoparticle formulations in the diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. *Int J Biol Macromol*. 2019;130:515–26.
42. Huang Y, Chang Y, Liu L, Wang J. Nanomaterials for modulating the aggregation of  $\beta$ -amyloid peptides. Vol. 26, *Molecules*. 2021.
43. Cabaleiro-Lago C, Quinlan-Pluck F, Lynch I, Lindman S, Minogue AM, Thulin E, et al. Inhibition of amyloid  $\beta$  protein fibrillation by polymeric nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2008;130(46):15437–43.
44. Jha A, Ghormade V, Kolge H, Paknikar KM. Dual effect of chitosan-based nanoparticles on the inhibition of  $\beta$ -amyloid peptide aggregation and disintegration of the preformed fibrils. *J Mater Chem B*. 2019;7(21):3362–73.
45. Gao C, Chu X, Gong W, Zheng J, Xie X, Wang Y, et al. Neuron tau-targeting biomimetic nanoparticles for curcumin delivery to delay progression of Alzheimer's disease. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):1–23.
46. Saleem S, Banerjee R, Rajesh Kannan R. Chrysin-Loaded Chitosan Nanoparticle-Mediated Neuroprotection in  $A\beta$  1–42 - Induced Neurodegenerative Conditions in Zebrafish. *ACS Chem Neurosci*. 2022 Jul 6;13(13):2017–34.
47. Adura C, Guerrero S, Salas E, Medel L, Riveros A, Mena J, et al. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(10):4076–85.
48. Lin D, He R, Li S, Xu Y, Wang J, Wei G, et al. Highly Efficient Destruction of Amyloid- $\beta$  Fibrils by Femtosecond Laser-Induced Nanoexplosion of Gold Nanorods. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7(12):1728–36.
49. Loynachan CN, Romero G, Christiansen MG, Chen R, Ellison R, O'Malley TT, et al. Targeted Magnetic Nanoparticles for Remote Magnetothermal Disruption of Amyloid- $\beta$  Aggregates. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(14):2100–9.
50. Li J, Zeng H, Zeng Z, Zeng Y, Xie T. Promising Graphene-Based Nanomaterials and Their Biomedical Applications and Potential Risks: A Comprehensive Review. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021 Nov 8;7(12):5363–96.
51. Zhu R, Makwana KM, Zhang Y, Rajewski BH, Del Valle JR, Wang Y. Blocking tau transmission by biomimetic graphene nanoparticles. *J Mater Chem B*. 2023;11(31):7378–88.
52. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated Brain Drug delivery: Overcoming Blood–brain Barrier to Treat Neurodegenerative Diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016 Aug;235:34–47.
53. Lombardo SM, Schneider M, Türeli AE, Türeli NG. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2020 Jun 4;11(1):866–83.
54. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2007;81(1):53–60.

# INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE PRI ODKRIVANJU IN VREDNOTENJU ZDRAVILNIH UČINKOVIN

## INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN DRUG DISCOVERY

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Jaka Rotman Primec, mag. farm.  
Zala Krajšek

asist. dr. Dunja Urbančič, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: dunja.urbancic@ffa.uni-lj.si



### POVZETEK

Inducirane pluripotentne matične celice so v zadnjih letih postale pomembno orodje za odkrivanje zdravilnih učinkovin, saj ponujajo bistvene prednosti pred tradicionalnimi modeli, kot so primarne celice, rakave celične linije in živalski modeli. Pridobimo jih z reprogramiranjem somatskih celic v pluripotentno stanje, kar omogoča njihovo diferenciacijo v različne tipe celic ob ohranjanju dedne informacije posameznika. Pri uporabi induciranih pluripotentnih matičnih celic za odkrivanje zdravilnih učinkovin je na voljo več modelov, vključno z dvodimenzionalnimi kulturami, enostavnejšimi tridimenzionalnimi modeli in naprednejšimi modeli – organi na čipu. Tovrstni modeli omogočajo natančnejšo oceno toksičnosti in učinkovitosti zdravilnih učinkovin, njihovih medsebojnih interakcij ter proučevanje mehanizmov bolezni. Izzivi, s katerimi se soočamo ob uporabi induciranih pluripotentnih matičnih celic, so: njihova nezadostna zrelost, variabilnost med pridobljenimi celičnimi linijami in visoki stroški, kar trenutno omejuje njihovo širšo uporabo v farmaciji. Kljub tem omejitvam imajo inducirane pluripotentne matične celice velik potencial za razvoj personaliziranih oblik zdravljenja in odkrivanje novih terapevtskih pristopov.

### KLJUČNE BESEDE:

celični modeli *in vitro*, inducirane pluripotentne matične celice, odkrivanje novih zdravilnih učinkovin, predklinične študije

### ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells have become an important tool for drug discovery in recent years, offering significant advantages over traditional models, such as primary cells, cancer cell lines, and animal models. These cells are derived by reprogramming somatic cells into a pluripotent state, allowing differentiation into various cell types while retaining the genetic information of the individual. In drug discovery, models from induced pluripotent stem cells encompass two-dimensional cultures, three-dimensional models, and more sophisticated organs-on-a-chip. These advanced models enable more accurate assessment of drug toxicity and efficacy, compound interactions, as well as detailed studies of disease mechanisms. However, challenges in application of induced pluripotent



stem cells remain, including limited cellular maturity, variability across obtained cell lines, and high costs, which currently restrict their broader use in the pharmaceutical field. Despite these limitations, induced pluripotent stem cells hold great promise for the development of personalised therapies and the discovery of novel therapeutic approaches.

#### KEY WORDS:

drug discovery, induced pluripotent stem cells, *in vitro* cell models, preclinical studies

## 1 UVOD

Pot odkrivanja novih zdravilnih učinkovin od optimizacije spojine vodnice do pridobivanja dovoljenja za promet je dolga in kompleksna. Že v fazi predkliničnega preskušanja od 1.000 testiranih spojin le ena vstopi v klinične študije. Od tistih, ki pridejo v fazo I kliničnih preskušanj, jih manj kot 10 % zaključi celoten proces (1). Glavni razlogi za neuspeh v kliničnih študijah so nezadostna učinkovitost (40–50 %), visoka toksičnost (30 %) in slabe fizikalno-kemijske lastnosti spojin (10–15 %) ter preslabo poznavanje potreb na trgu (10 %) (2). Predvsem prva dva vzroka sta v veliki meri posledica bodisi neuporabe ali nedostopnosti ustreznih celičnih ali živalskih modelov v predkliničnih preskušanjih oziroma izbire takih, ki ne posnemajo dovolj natančno (pato)fizioloških procesov v človeškem telesu (3).

Predklinični celični in živalski modeli so namenjeni določanju molekularnih mehanizmov bolezni, odkrivanju tarč zdravilnih učinkovin in razvoju novih terapevtskih pristopov (4). V ta namen se največ uporabljajo živalski modeli, kulture primarnih celic in celične linije, ki so bodisi imortalizirane ali pridobljene iz tumorjev. Vsak izmed teh modelov ima svoje prednosti in slabosti:

- Živalski modeli predstavljajo mnogocelični, kompleksen organizem, na katerem lahko v pogojih *in vivo* proučujemo sistemski odziv na spojino. Predstavljajo sicer zlati standard za izvajanje testiranj, vendar lahko, v primerjavi s človeškim telesom, modelne živali izkazujejo velike razlike v fiziologiji (npr. imunski odziv), metabolizmu, signalnih poteh in genetiki. Te razlike lahko vodijo v zmotno sklepanje o varnosti in učinkovitosti proučevanih spojin v človeškem organizmu, kar je lahko vzrok za nadaljnja neuspešna klinična preskušanja. Poleg tega v prizadevanjih

po zmanjšanju števila poskusnih živali stremimo k uveljavljanju načela 3R (angl. *replacement, reduction, refinement*), s katerim želimo v predkliničnih študijah nadomestiti živalske modele, zmanjšati število poskusnih živali in/ali izboljšati eksperimentalne pogoje za živali (4–6).

- Primarne celice, ki jih uporabljamo za testiranje potencialnih novih učinkovin, predstavljajo dober model v smislu opazovanja inter-individualnih razlik v odzivu na učinkovino med bolniki. Te celice namreč lahko pridobimo neposredno od različnih bolnikov, pri čemer niso podvržene transformacijam ali genskim modifikacijam. Slaba stran tovrstnih modelov je predvsem oteženo vzdrževanje celičnih kultur, saj imajo primarne celice omejeno število delitev preden senescirajo. Poleg tega je številne med njimi, npr. nevrone in kardiomiocyte, težko pridobiti oz. izolirati v za raziskavo relevantnem stadiju bolezni (4–6).
- Celične kulture rakavih celic se v monokulturah tradicionalno uporabljajo bodisi za določanje toksičnosti spojin ali učinkovitosti citostatikov pri rakavih obolenjih. Ker so naravno ali spodbujeno imortalizirane, se lahko v pogojih *in vitro* neomejeno delijo. Čeprav so pomembne za določanje osnovnih značilnosti odziva patološko spremenjenega biološkega sistema na učinkovine, številne tumorske celične linije vsebujejo neželene genetske in kromosomske spremembe, ki lahko močno vplivajo na predvidljivost odziva preskušanih učinkovin v pogojih *in vivo* (4–6).

V zadnjih 15 letih so se razmahnile tehnologije, ki so spodbudile razvoj in povečale kompleksnost sistemov za testiranje potencialnih zdravilnih učinkovin. Eno od pomembnejših odkritij je nedvomno reprogramiranje somatskih celic v pluripotentne matične celice, ki jih nato lahko s pomočjo ustreznih protokolov *in vitro* diferenciramo v skoraj vse vrste celic odraslega organizma. Tovrstne celice imenujemo inducirane pluripotentne matične celice (angl. *induced pluripotent stem cells*; iPSC). Z njihovo uporabo presežemo marsikatero težavo drugih testnih modelov, saj iPSC ohranjajo genetske značilnosti posameznika, se v nediferencirani obliki lahko neomejeno delijo, lahko jih diferenciramo v različne vrste celic in oblikujemo v organoidne sisteme, izkazujejo pa tudi zelo podobne odzive na zdravilne učinkovine, kot jih celice v pogojih *in vivo* (7).

## 2 MATIČNE CELICE IN INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE

Matične celice so celice, ki imajo edinstveno zmožnost, da se delijo in diferencirajo v različne tipe somatskih celic.



Preglednica 1: Osnovna delitev matičnih celic glede na zmožnosti njihove diferenciacije (9).

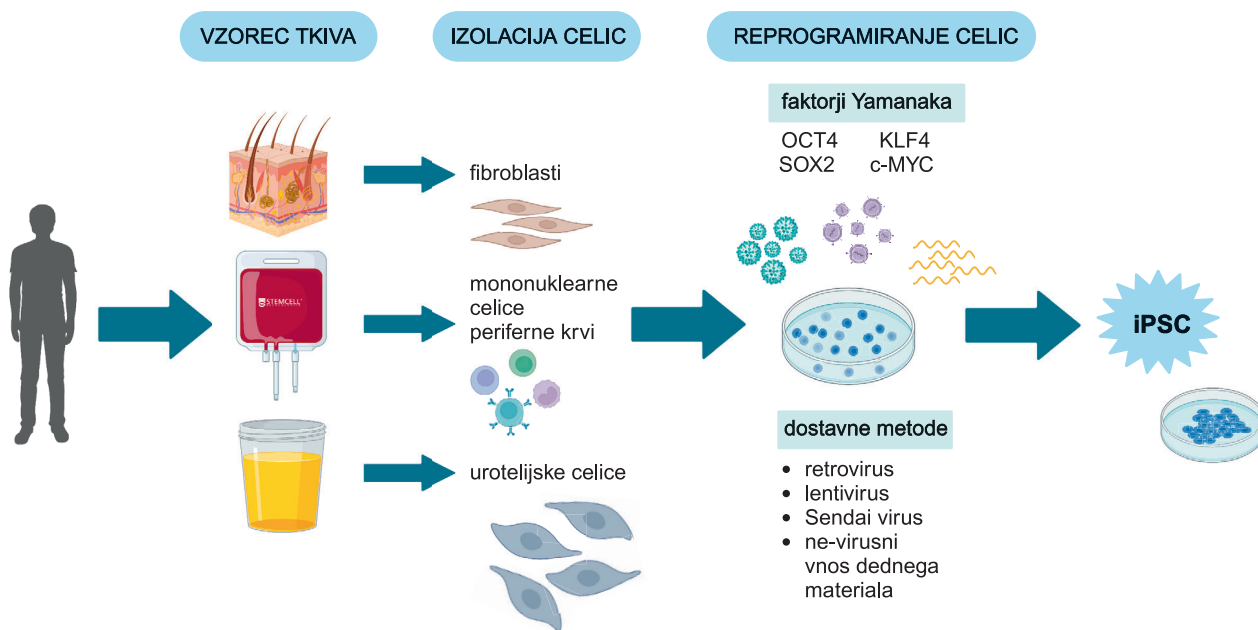
Table 1: Basic classification of stem cells according to their differentiation potential (9).

<b>Totipotentne celice:</b>	imajo največji potencial za diferenciacijo, iz njih lahko nastane nov organizem v celoti.
<b>Pluripotentne celice:</b>	se lahko diferencirajo do skoraj vseh vrst somatskih celic razen embrionalnih in tako tvorijo vse tri tipe tkiv (ektoderm, mezoderm in endoderm).
<b>Multipotentne celice:</b>	imajo omejeno zmožnost diferenciacije in se lahko razvijejo le do specifičnih vrst celic (npr. krvotvorne matične celice).

Slednjo sposobnost imenujemo potentnost oz. plastičnost (preglednica 1). Verjetno najbolj znane matične celice so embrionalne matične celice (angl. *embryonic stem cells*; ESC), ki izvirajo iz zgodnjih faz razvoja zarodka in so bodisi toti- (vsaka od celic po delitvah zigote do morule) ali pluripotentne (notranja celična masa blastociste), torej se lahko razvijejo v vse vrste celic, tkiv in organov. Nekatere celice tekom nadaljnjega razvoja organizma ostanejo ves čas multipotentne zaradi posebnih okoliških signalov in regulacije genov, ki preprečujejo njihovo dokončno specializacijo. Te somatske matične celice so v telesu odgovorne za

obnavljanje in popravilo celic in tkiv tako v otroštvu kot tudi v odrasli dobi, saj se lahko ob določenih okoliščinah diferencirajo v zrele somatske celice določenega tkiva ali organa (krvne celice, kožne epiteljske celice, mišične celice itn.). Potentnost matične celice ohranjajo z aktivacijo specifičnih signalnih poti in z izražanjem transkripcijskih dejavnikov, ki omogočajo, da celice obdržijo nezrelo stanje in sposobnost diferenciacije (8).

Leta 2006 je japonski znanstvenik Shinya Yamanaka odkril, da lahko iz zrelih, dokončno diferenciranih somatskih celic, pridobimo pluripotentne celice, ki jih lahko nadalje pretvo-



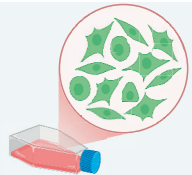
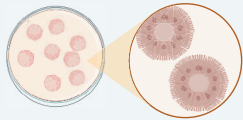

Slika 1: Shematska predstavitev poteka pridobivanja iPSC (iPSC - inducirane pluripotentne matične celice, OCT4 – oktamer vezoči transkripcijski dejavnik 4, SOX2 – z zaporedjem SRY povezan transkripcijski dejavnik, KLF4 – Krüppel podoben dejavnik 4, c-MYC – protoonkogen transkripcijski dejavnik s strukturnim motivom bazična vijačnica-zanka-vijačnica). Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/r86y164>) (12).

Figure 1: Schematic presentation of the iPSCs generation process (iPSCs – induced pluripotent stem cells, OCT4 – octamer-binding transcription factor 4, SOX2 – sex determining region Y-box2 transcription factor, KLF4 – Krüppel-like factor 4, c-MYC – proto-oncogene basic helix-loop-helix transcription factor). Created in Biorender (<https://BioRender.com/r86y164>) (12).

rino oz. diferenciramo v katerokoli drugo vrsto celic (10). Dokazal je, da lahko to storimo z reaktivacijo 4 specifičnih genov, in sicer *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* in *c-MYC*, ki jih danes poznamo pod imenom faktorji Yamanaka (angl. *Yamanaka factors*) oz. faktorji OSKM. Yamanaka je faktorje OSKM z retrovirusno transdukcijo najprej dostavil v mišje fibroblaste, leto kasneje pa je z enako metodo uspešno pretvoril oz. reprogramiral tudi človeške fibroblaste in tako pridobil prve človeške iPSC (10, 11). Danes poznamo številne metode, s katerimi lahko pridobivamo iPSC (slika 1). Poleg retrovirusov, se kot vektorji za vnos transkripcijskih dejavnikov uporabljajo še lenti in sendai virusi. Za reprogramiranje z nevirusnim vnosom pa so v uporabi episomalni vektorji ali molekule mRNA, ki kodirajo faktorje OSKM in jih v somatske celice vnesemo z elektroporacijo, nukleofekcijo ali lipofekcijo (12). V zadnjem času razvijajo tudi postopke reprogramiranja z malimi molekulami, proteini in nekodirajočimi RNA (12, 13). Za reprogramiranje v iPSC lahko uporabimo katerekoli somatske celice, a se zaradi enostavnega pridobivanja najpogosteje odločamo za kožne fibroblaste, mononuklearne

celice periferne krvi ali urotelijske celice iz urina (12). Za ohranjanje pluripotentnosti gojimo iPSC v prisotnosti t. i. hranilnih celic (angl. *feeder cells*), ki to omogočajo z izločanjem ključnih signalnih molekul in vzpostavijo ustreznega zunajceličnega mikrookolja, lahko pa uporabimo tudi posebna gojišča za iPSC z dodanimi zaviralci diferenciacije in aktivatorji celičnih samo-obnovitvenih poti (14).

Po reprogramiranju imajo iPSC sposobnost diferenciacije v katerokoli vrsto celic, ki v telesu sestavljajo ektoderm, mezoderm ali endoderm. Da se diferencirajo v želene tip celic, je ključno, da jim zagotovimo ustrezno mikrookolje *in vitro*, ki posnema tistega, ki so mu celice izpostavljene v organizmu *in vivo*. Prilagajamo ga glede na različne faze diferenciacije in na želeno vrsto končno diferenciranih celic. Za uspešno diferenciacijo moramo iPSC gojiti na ustreznem zunajceličnem matriksu ter jim dodajati indukcijske ali rastne dejavnike, ki so specifični za želeno vrsto diferenciranih celic. Rast in diferenciacijo iPSC danes usmerjamo predvsem z dodajanjem malih molekul, rastnih dejavnikov ali z gensko manipulacijo (15–17).

	2D	3D	
		sferoidi in organoidi 	organi na čipu 
PREDNOSTI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• preprostejši modeli</li> <li>• nižja cena izvedbe</li> <li>• možna uporaba visoko zmogljivega testiranja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• izboljšano zorenje celic</li> <li>• več interakcij med celicami</li> <li>• primerljivejša struktura</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vzpostavljena perfuzija, ki oponaša vaskularizacijo</li> <li>• natančnejši nadzor pogojev</li> </ul>
SLABOSTI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• slabša primerljivost fiziološkimi tkivom</li> <li>• slabše posnemanje medceličnih povezav</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• variabilnost med organoidi</li> <li>• slaba perfuzija gojišča</li> <li>• počasnejša proizvodnja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• visoka cena izvedbe</li> <li>• težko tehnično dostopni</li> </ul>

Slika 2: Prednosti in slabosti 2D- in 3D-modelov *in vitro*, izdelanih iz induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC). Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/a65g304>) (19, 20).

Figure 2: Advantages and disadvantages of 2D- and 3D- *in vitro* models made from induced pluripotent stem cells (iPSCs). Created in Biorender (<https://BioRender.com/a65g304>) (19, 20).

Uporaba iPSC ima številne prednosti pred drugimi matičnimi celicami. Tako v nasprotju z ESC iPSC ne sprožajo resnih etičnih vprašanj, saj so pridobljene iz odraslih somatskih tkiv. Za razliko od drugih matičnih celic, ki jih lahko izoliramo iz človeškega telesa, količine iPSC niso tako omejene. V primerjavi s homolognimi oz. alogenskimi presaditvami tkiv, predstavlja uporaba iPSC v regenerativni medicini minimalno tveganje za zavrnitev presadka, saj izvirajo iz samega bolnika in so zato popolnoma histokompatibilne. Tovrstne celice so tudi primernejše za modeliranje monogenetskih bolezni, ker omogočajo njihovo proučevanje na celicah oz. tkivih, ki imajo enak genetski profil kot bolnik, iz katerega izvirajo, obenem pa tudi primerjavo z ustreznim kontrolnim vzorcem, pripravljenim z gensko manipulacijo (npr. CRISPR-Cas9) bolnikovih iPSC. V tem smislu so uporabne tudi pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin in napovedovanju njihove toksičnosti, še posebej v kombinaciji z visoko zmogljivimi metodami rešetanja (5, 18). Največ raziskav so doslej opravili z iPSC, diferenciranimi v nevroblaste in nevrone, kardiomiocite, hepatocite, celice trebušne slinavke in epiteljske celice.

### 3 TESTNI SISTEMI, IZDELANI IZ iPSC, ZA VREDNOTENJE UČINKOVIN

Modelni sistemi v razvoju zdravilnih učinkovin zapolnjujejo vrzel med bazičnimi raziskavami in kliničnim preskušanjem, raziskovalcem pa omogočajo proučevanje kompleksnih bioloških procesov v nadzorovanem okolju *in vitro*. Iz iPSC lahko izdelamo različne vrste testnih sistemov, pri čemer želimo čim natančneje posnemati proučevano tkivo. Tako lahko iz iPSC pripravimo preprostejše dvodimenzionalne (2D) celične kulture, naprednejše tridimenzionalne (3D) modele ter najkompleksnejše organe na čipu, ki pomembno izboljšujejo naše zmožnosti posnemanja delovanja človeških tkiv in organov v pogojih *in vitro*, s tem pa zagotavljajo uspešnost terapevtskih pristopov v nadaljnjih kliničnih raziskavah (slika 2) (19, 20).

#### 3.1 DVODIMENZIONALNE KULTURE iPSC

Diferencirane celice, pridobljene iz iPSC, lahko najenostavneje gojimo v dvodimenzionalnih (2D) celičnih kulturah. Najpreprostejše so monocelične, ki vsebujejo eno samo vrsto diferenciranih celic. Tradicionalni 2D-modeli so kljub možnosti izdelave naprednejših še vedno prva izbira in naj-

pogosteje v uporabi predvsem zaradi enostavne priprave in rokovanja, lažjega nadzorovanja pogojev, razmeroma stroškovno ugodne izvedbe ter možnosti uporabe visoko zmogljivih metod testiranja učinkovin, npr. vsegenomskih, transkriptomskih, metabolomskih in naprednih slikovnih tehnik (19).

Naprednejšo obliko 2D-modelov predstavljajo ko-kulture več vrst celic, ki jih pridobimo z dodajanjem ostalih celic k že diferenciranim celicam iPSC. Tovrstni večcelični testni sistemi omogočajo natančnejše proučevanje interakcij med različnimi vrstami celic ter hkrati spodbujajo zorenje celic (19, 20). Z dodatkom mezenhimskih matičnih/stromalnih celic, ki izločajo topne rastne dejavnike za spodbujanje zorenja celic, so izboljšali zrelost in funkcijo kardiomiocitov, pridobljenih iz iPSC, povečali količino njihovih zalog energije ter zmanjšali nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (21). Poleg tega so s sočasnim gojenjem nevroblastov iz iPSC z astrociti izboljšali uspešnost njihove diferenciacije, vzpostavljanje nevronske povezave in farmakološki odziv celic na antagonist receptorjev GABA<sub>A</sub>, npr. bikukulina (22, 23).

Kljub številnim prednostim 2D-modelov, so ti premalo kompleksni, predvsem v kontekstu medceličnih povezav ter interakcij med celicami in zunajceličnim ogrodjem (20, 24, 25). Prav zaradi pomanjkanja teh interakcij so celice v 2D-modelih, pripravljenih iz iPSC, pogosto manj zrele, saj so vzorci njihovega izražanja genov in njihov metabolom v določeni meri še vedno podobni tistim, ki so značilni za ESC (24).

#### 3.2 SFEROIDI IN ORGANOIDI KOT OSNOVNI 3D-CELIČNI MODELI

Celice v 3D-modelih so prostorsko razporejene, kar omogoča enakomernjšo porazdelitev receptorjev na njihovih površinah in s tem kompleksnejše interakcije med njimi samimi, kakor tudi med celicami in zunajceličnim ogrodjem (26, 27). Ker so določene strukturne značilnosti tkiv ključne za proučevanje bolezni (npr. mikroencefalija, elektrofiziologija srca), je glavna prednost 3D- pred 2D-modeli natančnejše posnemanje dejanskih človeških tkiv. Modele 3D lahko izdelamo s pomočjo biokompatibilnega ogrodja ali brez njega. V slednjem primeru celice rastejo združene v 3D-skupkih in same proizvedejo zunajcelično ogrodje. Kadar pa pripravljamo 3D-celične modele s pomočjo naravnih ali sintetičnih trdnih ali tekočih ogrodij, pa celice nasadimo vanje. Pogosto v ta namen uporabljamo hidrogel (npr. iz kolagena ali fibrina) ali pa ekstrakte iz celic in tkiv (npr. Matrigel®) (24, 25, 28, 29). V zadnjem času 3D-celične modele

izdelujejo tudi s pomočjo biološkega tiskanja, kjer z injiciranjem, laserskimi pulzi ali mehanično silo npr. iz hidrogela oblikujejo zeleno 3D-strukturo, v katero nasadijo celice (30). V skupino 3D-celičnih modelov uvrščamo sferoide in organoide, inženirsko pripravljena tkiva in tudi organe na čipu. Sferoidi so tipično sestavljeni iz ene vrste celic, ki samostojno tvorijo 3D-skupke, medtem ko so organoidi kompleksnejši, saj so zgrajeni iz več tipov celic, značilnih za določen organ, ki skupaj tvorijo zanj specifične strukture (24, 28, 29).

Uporabo 3D-modelov, izdelanih s pomočjo iPSC, omejujejo številni izzivi. V primerjavi z 2D-testnimi sistemi je zaradi zahtevnejših postopkov njihovega vzdrževanja *in vitro* ponovljivost rezultatov v 3D okolju slabša (25). Izziv predstavlja predvsem nekonsistentna diferenciacija iPSC, do katere pride zaradi samoorganizacije celic, in je vzrok za variabilnost med posameznimi organoidi. Če pogoji *in vitro* niso dovolj podobni tistim *in vivo*, lahko pride do nepopolnega zorenja iPSC ali do nastajanja neželenih tipov celic v kulturi. Pogosta težava je vaskularizacija, ki v organoidih ni ustrezno vzpostavljena, zato prihaja do neenakomerne porazdelitve hranil in kisika med celicami, kar lahko posledično vodi do celične nekroze predvsem v notranosti sferoidov ali organoidov (prevelike difuzijske razdalje) (20, 24).

### 3.3 ORGANI NA ČIPU KOT NAJNAPREDNEJŠI TESTNI MODELI 3D

Razvoj biološkega sistema in napredovanje bolezni sta dinamična procesa, tekom katerih se aktivnosti na celični in tkivni ravni spreminjajo tako prostorsko kot časovno. S trenutnimi 3D-sistemi dosegamo predvsem prostorsko modeliranje, ne omogočajo pa časovnega obravnavanja dogodkov in ne upoštevajo nekaterih ključnih biofizikalnih procesov, kot so strižne sile in pretoki. Tako prostorska kot časovna komponenta sta pomembni za procese razvoja in staranja organizma, celjenje in regeneracijo tkiv ter izmenjavo metabolitov (31). Tehnologija, ki ji uspeva vzpostavljati tako prostorsko kot časovno dinamiko v modelu *in vitro*, je tehnologija izdelave organov na čipu.

Organi na čipu so mikrofluidni sistemi v obliki majhne 3D-naprave, ki omogoča natančen nadzor nad sestavo in delovanjem tkiva *in vitro*. So edini modeli do sedaj vzpostavljeno perfuzijo, ki oponaša vaskularizacijo. To jim omogoča boljšo in enakomernjšo porazdelitev kisika, hranil in drugih nujnih komponent za vzdrževanje celic v delujočem stanju *in vitro* (24, 31, 32). Leta 2010 so izdelali pljuča na čipu z namenom rekonstrukcije funkcionalnega alveolarno-kapilarnega vmesnika. Temu je sledil hiter nadaljnji razvoj,

pri čemer so s tehnologijo organov na čipu pripravili še ledvice, jetra, možgane, srce in številne druge organe (32). V dinamičen sistem organa na čipu lahko vključimo različne 3D-konstrukte, izdelane iz iPSC, ki so tako izpostavljeni stalnemu pretoku gojišča, kar posnema systemske interakcije (24). Danes te visoko tehnološke izdelke uporabljamo za modeliranje bolezni ter iskanje in preskušanje novih zdravilnih učinkovin (32). V kolikor vanje vključimo več organskih sistemov, jih lahko uporabimo celo za proučevanje procesov absorpcije, porazdelitve, metabolizma in eliminacije zdravilnih učinkovin (32).

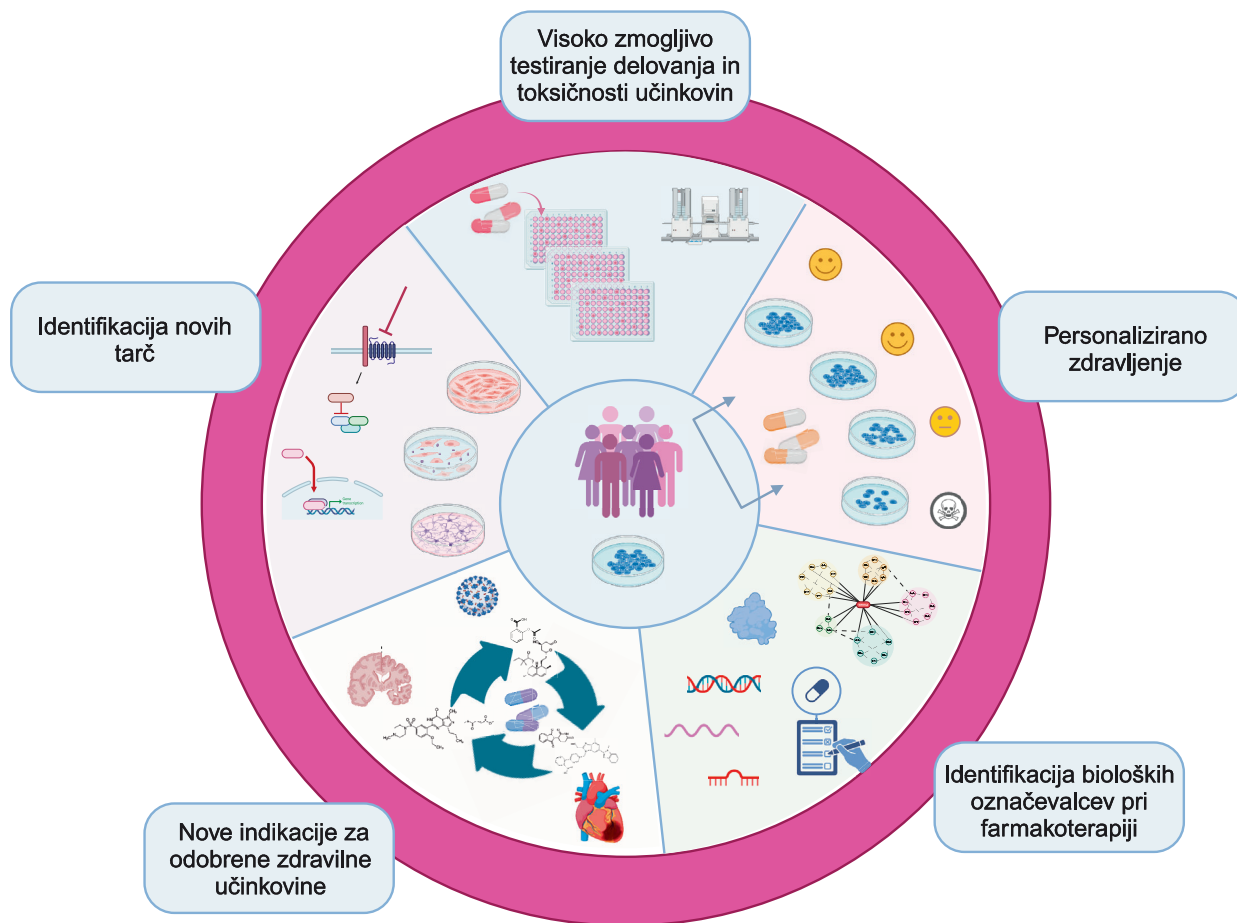
Kljub večji dozorelosti celic v modelih organov na čipu in njihovi kompleksnosti se pri uporabi teh sistemov ravno zaradi slednjega soočamo z veliko variabilnostjo pridobljenih podatkov in slabo ponovljivostjo poskusov ter tudi z njihovo oteženo dostopnostjo zaradi tehnološke zahtevnosti njihove priprave (24).

## 4 UPORABA iPSC ZA VREDNOTENJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Celični modeli, izdelani s pomočjo iPSC, se najpogosteje uporabljajo za proučevanje bolezni in pri testiranju učinkovin na področjih kardiovaskularnega sistema, živčevja in jeter. To potrjujejo klinične študije na portalu [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), kjer je trenutno prijavljenih več kot 30 študij z uporabo iPSC, v okviru katerih raziskujejo delovanje učinkovin (33). Uporaba iPSC pri odkrivanju zdravilnih učinkovin in razvoju farmakoloških pristopov vključuje več ključnih področij (slika 3) (33):

- testiranje novih malih molekul za zdravljenje tarčnih bolezni z uporabo visoko zmogljivih metod rešetanja;
- testiranje že odobrenih zdravilnih učinkovin za odkrivanje novih indikacij (angl. *drug repurposing*);
- proučevanje toksičnih odzivov posameznikov na zdravilne učinkovine z namenom razvoja personaliziranega zdravljenja;
- identifikacija farmakogenetskih in drugih bioloških označevalcev, pomembnih za farmakoterapijo;
- modeliranje razvoja bolezni, specifičnih za posameznike, ter iskanje novih tarč za načrtovanje novih učinkovin.

Testni modeli na osnovi iPSC omogočajo torej inovativne rešitve, ki bi lahko prispevale k posamezniku usmerjenem in učinkovitejšem zdravljenju. V nadaljevanju opisujemo nekaj primerov raziskav zdravilnih učinkovin z uporabo iPSC.



Slika 3: Možnosti uporabe induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC) za odkrivanje in vrednotenje zdravilnih učinkovin in vitro. Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/q98z512>).

Figure 3: Possible applications of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for in vitro discovery and evaluation of drugs. Created in Biorender (<https://BioRender.com/q98z512>).

#### 4.1 PROUČEVANJE KARDIOTOKSIČNOSTI ZDRAVILNIH UČINKOVIN IN NJIHOVEGA VPLIVA NA KONTRAKTILNOST SRČNE MIŠICE

Bolnikove iPSC z genetskimi predispozicijami za določeno patologijo lahko diferenciramo v kardiomiocite, celice srčne mišice, in jih nato uporabimo za testiranje kardiotoksičnosti. Slednje pogosto povzročajo protirakave učinkovine, vključno z zaviralci tirozin kinaz. Rezultati so že v 2D-celičnih modelih, izdelanih iz iPSC, pokazali dobro ujemanje s kliničnimi patološkimi fenotipi (34). Na področju kardiova-

skularnih raziskav so nato razvili različne 3D-modele od preprostejših sferoidov do kompleksnejših inženirsko ustvarjenih srčnih tkiv in organoidov. Vse tri vrste modelov danes uporabljajo za proučevanje kardiotoksičnih učinkov protirakavih in drugih zdravilnih učinkovin ter okoljskih toksinov, kar omogoča boljše razumevanje mehanizmov njihovega delovanja in posledično personalizirano napovedovanje kardiotoksičnih zapletov (35). Zlasti kompleksnejši 3D-modeli omogočajo celo modeliranje aritmij, srčnega popuščanja in celjenja srčnega tkiva po ishemični poškodbi (10). Tovrstni sistemi zagotavljajo natančnejše funkcijsko testiranje učinkovin glede njihovega vpliva na kontraktibilnost miokarda, kar lahko dolgoročno zmanjša potrebe po upo-





rabi živalskih modelov. Vpliv zdravilnih učinkovin na srčne kontrakcije namreč pogosto merijo s spremljanjem tlaka v levem ventriklu pri zavestnih živalih (36, 37).

## 4.2 NEVROLOŠKE IN NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI

V številnih študijah so iPSC uporabili za vzpostavitev 2D-modela, namenjenega identifikaciji novih učinkovin za zdravljenje Alzheimerjeve in drugih neurodegenerativnih bolezni (38). Celice iPSC bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo so npr. izpostavili različnim spojinam in tako identificirali zaviralce sekretaze  $\gamma$ , ki je kandidatna proteinska molekula za razvoj učinkovin za zdravljenje tega patološkega stanja (39). Podobno so z uporabo iPSC bolnikov z amiotrofično lateralno sklerozo (ALS), ki so jih diferencirali v motorične nevrone, dokazali *in vitro*, da digoksin in nekatere druge majhne molekule modulirajo nastanek za ALS značilnih agregatov (40). Na ta način so identificirali tudi nove genske dejavnike, kar je spodbudilo razvoj genskih terapij za to bolezen (41).

Nevralni 3D-modeli iz iPSC se pogosto uporabljajo kot sistemi *in vitro* za odkrivanje zdravilnih učinkovin. Tako so npr. s pomočjo nevronskih 3D-modelov, ki so jih pripravili z iPSC bolnikov z DiGeorge-ovim sindromom (delecija 22q11.2), identificirali antipsihotike, ki preprečujejo spontano aktivacijo nevronov in izboljšujejo njihovo funkcijo z uravnavanjem nivoja kalcija (42). V času epidemije virusa Zika pa so z uporabo nevronskih organoidov testirali preko 1000 že odobrenih zdravilnih učinkovin in odkrili, da hi-peastrinjev bromid učinkovito preprečuje okužbo ter popravi poškodbe v rasti in diferenciaciji nevronov (43).

## 5 OMEJITVE PRI UPORABI iPSC

Celični modeli *in vitro*, izdelani iz iPSC, torej nudijo velike možnosti pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin, vendar pa imajo tudi določene omejitve, ki ovirajo njihovo širšo uporabo. Kljub temu, da pogosto bolje oponašajo fiziološke pogoje od ostalih predkliničnih modelov, vseeno ne omogočajo posnemanja kompleksnih medceličnih in znotraj-celičnih interakcij, ki so značilne za različne bolezni. Pomankljivi so tudi pri modeliranju bolezni, katerih patofiziologija vključuje več genov in signalnih poti. Določen delež celic, diferenciranih iz iPSC, pogosto ostane nezrel,

kar seveda omejuje njihovo funkcionalnost. S tovrstnimi modeli tudi težje posnemamo bolezni, ki se pojavijo v kasnejšem življenjskem obdobju posameznika. Poleg tega pa tem testnim modelom manjkata robustnost in ponovljivost. Variabilnosti v protokolih reprogramiranja somatskih celic v iPSC in njihove nadaljnje diferenciacije povzročajo fenotipsko heterogenost med različnimi posamezniki. Zato je za potrjevanje testnih ugotovitev potreben večji nabor linij iPSC, to pa povečuje kompleksnost in stroške raziskav. Tudi uporaba visoko zmogljivih metod testiranja učinkovin je pri testiranju v celičnih modelih iz iPSC lahko omejena, in sicer zaradi razmeroma dolgotrajnega in dragega procesa priprave iPSC. Pri klinični uporabi iPSC v regenerativni medicini pa ostajajo nerešeni pomisleki povezani s tumorogenezo in imunskimi zavrnitvami. Trenutno so v teku pobude za vzpostavitev nadzora linij iPSC ter postavitve smernic za standardizacijo postopkov njihovega pridobivanja in diferenciacije, v kar smo vključeni tudi raziskovalci Fakultete za farmacijo (COST, Haplo-iPS). To bi omogočilo, da bi tekom testiranja lahko ločili normalno celično fenotipsko variabilnost od fenotipov, specifičnih za bolezni, s tem pa premagali marsikatero oviro pri uporabi iPSC (3, 5, 44).

## 6 SKLEP

Odkritje iPSC je omogočilo velik napredek ne samo v regenerativni medicini, ampak tudi pri razvoju zdravilnih učinkovin, saj v primerjavi z obstoječimi celičnimi in živalskimi sistemi testni modeli, izdelani iz iPSC, natančneje posnemajo (pato)fiziološko stanje človeških tkiv in organov ter omogočajo varnejše testiranje z manj etičnih zadržkov. Celice iPSC trenutno predstavljajo ključno orodje za modeliranje bolezni in razvoj personalizirane medicine, s čimer lahko terapije prilagodimo posameznim bolnikom. Kljub temu, da iPSC ponujajo realno možnost za nadomestitev živalskih modelov v predkliničnih študijah, pa se pri njihovi uporabi srečujemo s pomembnimi izzivi, kot so: nezadostna zrelost celic, variabilnost celičnih linij, kompleksnost diferenciranja ter visoki stroški proizvodnje, gojenja in diferenciacije. Za širšo uporabo iPSC v farmaciji bi bilo zato potrebno optimizirati predvsem postopke njihove diferenciacije, izboljšati ponovljivost testnih rezultatov ter vpeljati visokozmogljive sisteme za povečanje uporabnosti teh modelov pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin. Kljub temu pa se z nenehnim napredkom na tem področju bližamo

času, ko bodo iPSC postali nepogrešljivi v farmaciji in omogočili hitrejšje in natančnejše razvijanje učinkovitejših in varnejših farmakoterapevtskih pristopov za širok spekter bolezni.

## 7 LITERATURA

1. *Clinical Development Success Rates and Contributing Factors 2011-2020* | BIO [Internet]. [cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://www.bio.org/clinical-development-success-rates-and-contributing-factors-2011-2020>
2. Sun D, Gao W, Hu H, Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharm Sin B*. 2022 Jul;12(7):3049–62.
3. Doss MX, Sachinidis A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*. 2019 Apr 30;8(5):403.
4. Loewa A, Feng JJ, Hedtrich S. Human disease models in drug development. *Nat Rev Bioeng*. 2023 Aug;1(8):545–59.
5. Nicholson MW, Ting CY, Chan DZH, Cheng YC, Lee YC, Hsu CC, et al. Utility of iPSC-Derived Cells for Disease Modeling, Drug Development, and Cell Therapy. *Cells*. 2022 Jun 6;11(11):1853.
6. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Research*. 2014 Apr 30;74(9):2377–84.
7. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Feb;16(2):115–30.
8. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019 Feb 26;10(1):68.
9. Singh VK, Saini A, Kalsan M, Kumar N, Chandra R. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol*. 2016 Nov; 134(4):1–18.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
11. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
12. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Feb;16(1):3–32.
13. Qin H, Zhao A, Fu X. Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2017 Jul 11;74(19):3553.
14. Yu G, Kamano Y, Wang F, Okawa H, Yatani H, Egusa H. Feeder Cell Sources and Feeder-Free Methods for Human iPS Cell Culture. In: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N, editors. *Interface Oral Health Science 2014*. Tokyo: Springer Japan; 2015. p. 145–59.
15. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):855–60.
16. Yasui R, Sekine K, Taniguchi H. Clever Experimental Designs: Shortcuts for Better iPSC Differentiation. *Cells*. 2021 Dec;10(12):3540.
17. Li Y, Li L, Chen ZN, Gao G, Yao R, Sun W. Engineering-derived approaches for iPSC preparation, expansion, differentiation and applications. *Biofabrication*. 2017 Jul 31;9(3):032001.
18. Omole AE, Fakoya AOJ. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ*. 2018 May 11;6:e4370.
19. Cerneckis J, Cai H, Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Sig Transduct Target Ther*. 2024 Apr 26;9(1):1–26.
20. Sharma A, Sances S, Workman MJ, Svendsen CN. Multi-lineage Human iPSC-Derived Platforms for Disease Modeling and Drug Discovery. *Cell Stem Cell*. 2020 Mar 5;26(3):309–29.
21. Yoshida S, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kashiyama N, Ohashi F, et al. Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Soluble Factors from Human Mesenchymal Stem Cells. *Mol Ther*. 2018 Nov 7;26(11):2681–95.
22. Fernandopulle MS, Prestil R, Grunseich C, Wang C, Gan L, Ward ME. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr Protoc Cell Biol*. 2018 Jun;79(1):e51.
23. Odawara A, Saitoh Y, Alhebshi AH, Gotoh M, Suzuki I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014 Jan 24;443(4):1176–81.
24. Liu C, Oikonomopoulos A, Sayed N, Wu JC. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development*. 2018 Mar 8;145(5):dev156166.
25. Centeno EGZ, Cimarosti H, Bithell A. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration*. 2018 May 22;13(1):27.
26. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013 Sep;501(7467):373–9.
27. Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, et al. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Jul 31;109(31):12770–5.
28. Qian L, Tcw J. Human iPSC-Based Modeling of Central Nerve System Disorders for Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(3):1203.
29. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013 Mar;18(5–6):240–9.
30. Ma X, Qu X, Zhu W, Li YS, Yuan S, Zhang H, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Feb 23;113(8):2206–11.
31. Ingber DE. *Developmentally inspired human 'organs on chips.'* Development (Cambridge, England). 2018 May 18;145(16):dev156125.
32. Low LA, Sutherland M, Lumelsky N, Selimovic S, Lundberg MS, Tagle DA. *Organs-on-a-Chip (2020)*. In: Oliveira JM, Reis RL, editors. *Biomaterials- and Microfluidics-Based Tissue Engineered 3D Models* [Internet]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1230. Springer, Cham.



33. Home | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 Dec 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
34. Sharma A, BurrIDGE PW, McKeithan WL, Serrano R, Shukla P, Sayed N, et al. High-Throughput Screening of Tyrosine Kinase Inhibitor Cardiotoxicity with Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Science translational medicine*. 2017 Feb 15;9(377):eaaf2584.
35. Lyra-Leite DM, BurrIDGE PW. Pluripotent Stem Cell Modeling of Anticancer Therapy–Induced Cardiotoxicity. *Curr Cardiol Rep*. 2020 Jun 19;22(8):56.
36. Mills RJ, Parker BL, QuaiFe-Ryan GA, Voges HK, Needham EJ, Bornot A, et al. Drug Screening in Human PSC–Cardiac Organoids Identifies Pro-proliferative Compounds Acting via the Mevalonate Pathway. *Cell Stem Cell*. 2019 Jun 6;24(6):895–907.e6.
37. Neves LAA, Šarenac O, Gralinski MR. In Vivo Methods in Cardiovascular Safety Pharmacology (2022). In: Hock FJ, Gralinski MR, Pugsley MK, editors. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays Cham: Springer International Publishing*; 2022. p. 1–26.
38. Beghini DG, Kasai-Brunswick TH, Henriques-Pons A. Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Discovery and Neurodegenerative Disease Modelling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Jan;25(4):2392.
39. Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4530–9.
40. Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, et al. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Sep;56:355–64.
41. Meijboom KE, Abdallah A, Fordham NP, Nagase H, Rodriguez T, Kraus C, et al. CRISPR/Cas9-mediated excision of ALS/FTD-causing hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 rescues major disease mechanisms in vivo and in vitro. *Nat Commun*. 2022 Oct 21;13(1):6286.
42. Khan TA, Revah O, Gordon A, Yoon SJ, Krawisz AK, Goold C, et al. Neuronal defects in a human cellular model of 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Med*. 2020 Dec;26(12):1888–98.
43. Zhou T, Tan L, Cederquist GY, Fan Y, Hartley BJ, Mukherjee S, et al. High-Content Screening in hPSC–Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell*. 2017 Aug 3;21(2):274–283.e5.
44. Paik DT, Chandy M, Wu JC. Patient and Disease–Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Discovery of Personalized Cardiovascular Drugs and Therapeutics. *Pharmacological Reviews*. 2020 Jan;72(1):320.

# FARMACEVTSKE KOMPETENCE S PODROČJA LABORATORIJSKE MEDICINE: RAZVOJ, IZOBRAŽEVANJE IN POMEN KLINIČNE BIOKEMIJE

## PHARMACEUTICAL COMPETENCIES IN LABORATORY MEDICINE: DEVELOPMENT, EDUCATION, AND THE IMPORTANCE OF CLINICAL BIOCHEMISTRY

AVTORJA / AUTHORS:

prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.<sup>1</sup>  
Tjaša Debelak, mag. farm.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene  
kulture Slovenije, Zaloška cesta 7a, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: borut.bozic@ffa.uni-lj.si



### POVZETEK

Reguliranost farmacevtskega poklica izhaja iz leta 2024 posodobljene Direktive 2005/36/EC o priznavanju poklicnih kvalifikacij. V programu usposabljanja farmacevtov je navedena tudi »Splošna in uporabna biokemija (medicinska)«, poznana pod izrazom klinična biokemija. Slednja je največja veja laboratorijske medicine, ki z analizo bioloških vzorcev pacienta prispeva k ugotavljanju zdravstvenega stanja preiskovanca v preventivi, diagnostiki, spremljanju zdravljenja in napovedovanju poteka bolezni. To področje pa ostaja kot kompetenca farmacevtov slabo poznano v strokovni javnosti. V prispevku so prikazane značilnosti razvoja laboratorijske medicine v evropskem in slovenskem prostoru z mejniki v razvoju klinične kemije in organiziranost njenega izobraževanja pri nas, ki se je začelo kot del študija farmacije. Posebej so izpostavljeni kompetenčni vidiki farmacevtov na področju laboratorijske diagnostike.

### KLJUČNE BESEDE:

diagnostika, farmacija, izobraževanje, klinična biokemija, kompetence/kompetenčni modeli, laboratorijska medicina

### ABSTRACT

The regulation of the pharmaceutical profession derives from Directive 2005/36/EC on the recognition of professional qualifications, which was updated in 2024. The training program for pharmacists also includes 'General and Applied Biochemistry (Medical)', which is known as clinical biochemistry. The latter is the largest branch of laboratory medicine – the activity of analyzing human biological samples to determine the health status of an individual in prevention, diagnosis, treatment monitoring, and disease prognosis. This area is still not well known in the professional community as a competence of pharmacists. The article describes the characteristics of the development of laboratory medicine in the European and Slovenian context with the milestones in the development of clinical chemistry and the organization of its education in Slovenia, which began as part of pharmacy studies. The competency aspects of pharmacists in the



field of laboratory diagnostics are particularly emphasized.

**KEY WORDS:**

clinical biochemistry, competencies/competency models, diagnostics, education, pharmacy, laboratory medicine

# 1 UVOD

Laboratorijska diagnostika oziroma laboratorijska medicina v širši javnosti ni prepoznana kot kompetenca farmacevtov. Rezultati mednarodne študije o zagotavljanju kakovosti v izobraževanju in usposabljanju evropskih farmacevtov (PHAR QA) kažejo, da podobno velja tudi v precejšnjem delu stroke (1). To je nekoliko presenetljivo, saj je poklic farmacevta visoko reguliran na evropski ravni, tako da je torej vsebina izobraževanja in dela transparentna in vseevropska. Reguliranost poklica izhaja iz Direktive 2005/36/EC o priznavanju poklicnih kvalifikacij in vpliva na izobraževanje, saj predpisuje nabor obveznih vsebin študijskega programa (2). V Prilogi Direktive je med programom usposabljanja farmacevtov navedena tudi »Splošna in uporabna biokemija (medicinska)«. Poznamo jo tudi pod imenom klinična biokemija in je največja veja laboratorijske medicine, ki analizira biološke vzorce z namenom ugotavljanja zdravstvenega stanja preiskovanca v preventivi, diagnostiki, spremljanju zdravljenja in napovedovanju poteka bolezni (3).

Marca 2024 sprejeti amandmaji Direktive 2005/36/EC (4) in amandmaji Priloge V (5) so nastali po poglobljeni analizi zaradi razvoja farmacevtskega področja (6). Slednji je bil zaznan tako z vidika tehničnega kot tudi znanstvenega razvoja (slika 1). V študijo razvoja farmacevtskega področja je umeščena tudi laboratorijska medicina. Srečamo jo v poglavjih »Uporaba zdravil in pacientova varnost«, »Promocija zdravja in preventiva bolezni«, »Diagnostično testiranje«. Vsebinsko se navezuje na klinične študije in mikrobiologijo v področju »Raziskave in razvoj zdravil«, na imunologijo, genetiko in farmakogenetiko, pa tudi na področje »Biotehnologija z biološkimi zdravili«. Posredno je povezana s klinično farmacijo v področju »Na pacienta osredotočena skrb«. Klinična biokemija torej tudi v prenovljeni Direktivi ostaja ena osnovnih sestavin izobraževanja in usposabljanja farmacevtov, ki se z njo lahko srečajo v različnih poklicnih okoljih (7).

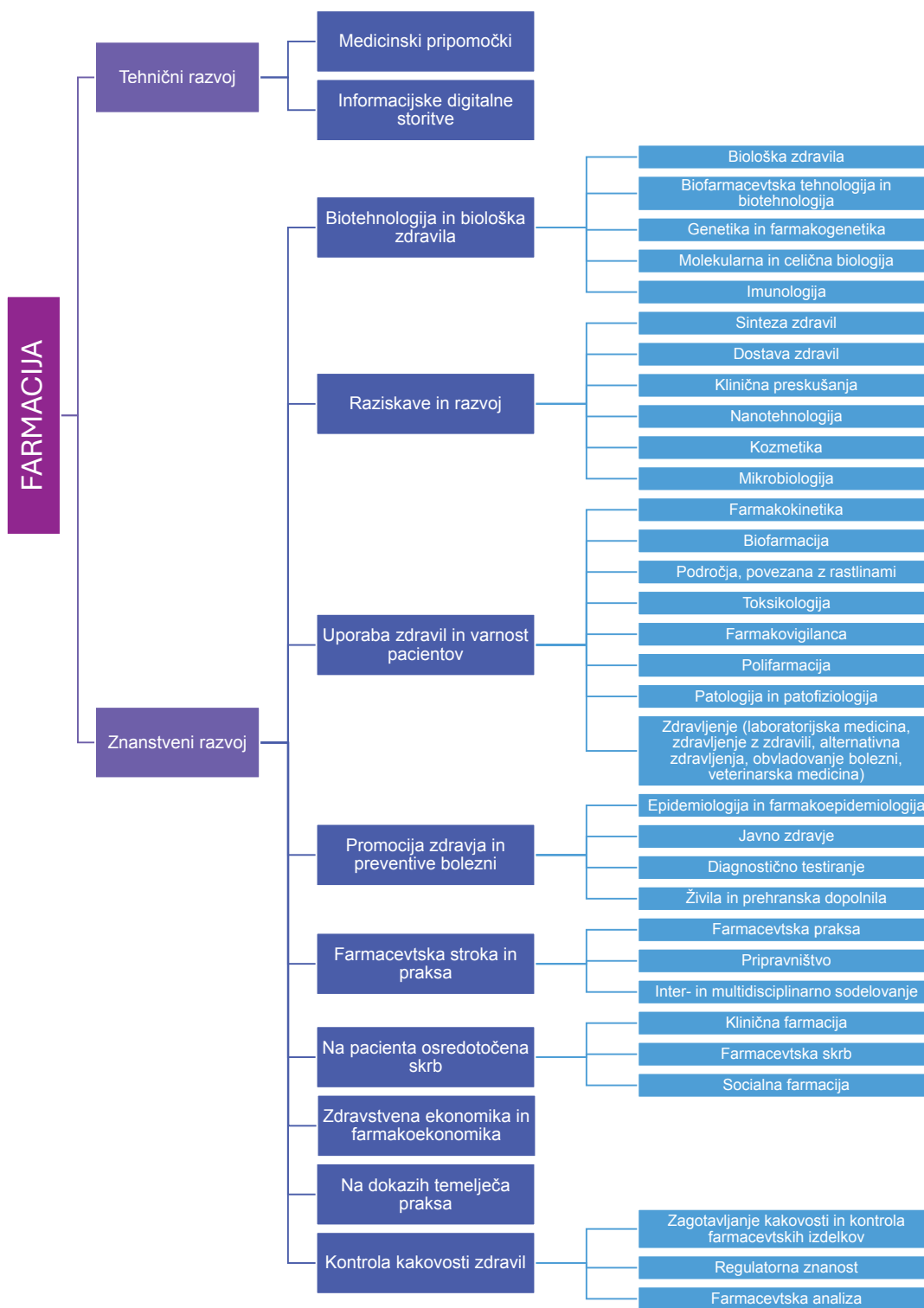
## 2 ZNAČILNOSTI RAZVOJA LABORATORIJSKE DIAGNOSTIČNE DEJAVNOSTI V ŠIRŠEM EVROPSKEM PROSTORU

Področje laboratorijske diagnostike ni novo, je pa dobilo poenoteno ime laboratorijska medicina šele konec 20. stoletja (8). Pregledovanje telesnih izločkov z namenom ugotavljanja zdravstvenega stanja posameznika spremlja človeka že od vekomaj. Bizantinski pisni viri kažejo na sistematičen pristop glede prostorov, opreme, postopkov in osebja. Uporabljeni izraz »inšpektor narave/urinski inšpektor« kaže, da niso bili samo zdravniki vključeni v laboratorijske preiskave (9). V srednjem veku ni bilo veliko diagnostičnih laboratorijskih preiskav. Šele dela Pasteurja in Kocha ter delovanje prvih kliničnih laboratorijev kažejo na bolj znanstveni pristop (10).

V času 1. svetovne vojne in po njej se je ob organiziranosti bolnišničnih laboratorijev povečala klinična uporabnost laboratorijskih preiskav. Trend zaposlovanja naravoslovcev v laboratorijski diagnostiki se je stopnjeval tudi po 2. svetovni vojni. Pomanjkanje kadra in uvedba novih kompleksnejših analiznih metod sta privedla do specializacij v posamičnih vejah kliničnih laboratorijev. Na dokaj ločen razvoj s posamičnimi prekrivanji so vplivale tudi nacionalne značilnosti in posebnosti okolja, kar se kaže v heterogenosti področja še danes. Od tod tudi več pojmov za označevanje dejavnosti kliničnih ali medicinskih laboratorijev, ki so pokrivali dele ali celotno dejavnost: *klinische chemie*, *biopathology*, *analisi clinicos*, *biologie clinique*, *medical biopathology* idr. (8).

Ob koncu 20. stoletja je prevladalo zavedanje, da v klinično-laboratorijskih praksah kljub posamičnim posebnostim obstajajo primerljiva izhodišča, problemi in orodja. Po večletnih razpravah v stroki se je uveljavil pojem **laboratorijska medicina** za vse oblike dela in storitev vseh tipov kliničnih laboratorijev. Sodobna definicija jo opredeljuje kot vejo medicine, ki zalaga zdravstveni sistem z laboratorijskimi rezultati in sorodnimi informacijami ter nasveti, vezanimi na klinično stanje in obravnavo prejemnika storitev zdravstvenega sistema (bolnika). Laboratorijska medicina je pomemben del zdravstvenega sistema, vključena v preko 70 % medicinskih odločitev v diagnostiki, spremljanju razvoja bolezni, odziva na terapijo, spremljanju epidemiološkega stanja ali preventivi (11).





Slika 1: Znanstveni in tehnični razvoj farmacevtskega področja po uvedbi področne Direktive (povzeto po 6).

Figure 1: Scientific and technical development of the pharmaceutical field after the implementation of the sectoral Directive (adapted from 6).

### 3 ZNAČILNOSTI RAZVOJA LABORATORIJSKE DIAGNOSTIČNE DEJAVNOSTI NA SLOVENSLEM

Podobno kot v Evropi imajo tudi v Sloveniji strokovnjaki laboratorijske medicine različna poklicna oziroma izobrazbena ozadja medicinske ali naravoslovne usmeritve. Prepoznavnost laboratorijske diagnostike je bila v drugi polovici 20. stoletja v Sloveniji slaba, njena umeščenost v zakonodajo zdravstvenega sistema pa pomanjkljiva, nedosledna in razdrobljena:

- Leta 1977 je strokovni kolegij kliničnih in biokemičnih laboratorijev postavil sistem kategorizacije laboratorijev za področje klinične biokemije v 5 tipov (npr. tip 0 – orientacijske preiskave ob pacientu v izvedbi medicinske sestre, usposobljene v laboratoriju višjega tipa; tip II – laboratorijska služba zdravstvenega doma, ki jo vodi specialist medicinske biokemije) (12). Toda strokovne smernice niso našle poti v zakonodajo.
- Zakon o zdravstveni dejavnosti je 1992. leta omenjal dejavnost klinično-kemičnih laboratorijev le v okviru zdravstvenih domov in bolnišnic, ločeno pa patoanatomsko dejavnost (znotraj katere je tudi del laboratorijske medicine), preskrbo s krvjo (transfuzijska medicina) in epidemiološko dejavnost (mikrobiologija) inštituta za varovanje zdravja (13). Žal tudi tri desetletja kasneje današnje stanje ni kaj dosti drugačno.
- Področni dogovori z Zavodom za zdravstveno zavarovanje Slovenije so ob koncu 20. stoletja kot kadrovski normativ navajali kar laboratorij, čeprav je v stroki že takrat veljala osnovna ekipa v sestavi: specialist, dva inženirja in dva tehnika.
- Plan zdravstvenega varstva Slovenije iz leta 2000 je imel v prilogi predvideno mrežo laboratorijske dejavnosti na primarni ravni po regijah, vendar priloga ni bila sprejeta kot del Plana (14).

Povezanost laboratorijskega strokovnjaka in kliničnega zdravnika je nujna na vseh področjih laboratorijske medicine, marsikje pa sta laboratorijska diagnostika in klinično delo neločljiva. Po anketi Evropskega združenja za klinično kemijo, izvedeni konec 20. stoletja med 30.000 člani, je na področju klinične kemije in sorodnih področij delovalo 40 % zdravnikov, 27 % (bio)kemikov in 21 % farmacevtov, in sicer so: v Franciji, Španiji in Sloveniji prevladovali farmacevti, v Združenem kraljestvu, Romuniji, Grčiji, na Švedskem in Nizozemskem biokemiki, v Avstriji, Italiji, Švici na Norveškem, Portugalskem pa zdravniki (11). Leta 2012 je

bilo med 222 vpisanimi v register laboratorijskih strokovnjakov v Sloveniji (druga bolonjska stopnja ali univerzitetna izobrazba po starem zakonu) 50 (23 %) farmacevtov. Med 84 specialisti medicinske biokemije je bilo prav tako največ farmacevtov, 32 (38 %) (15).

#### 3.1 MEJNIKI V RAZVOJU KLINIČNE (BIO)KEMIJE

Zametki klinične kemije v Sloveniji segajo v obdobje med obema vojnama, ko so se začeli pojavljati prvi priročni laboratoriji za preiskave seča, krvi in želodčnega soka ter laboratoriji v zdravstvenih institucijah. Leta 1923 je bil ustanovljen Higienški zavod v Ljubljani z biokemičnim laboratorijem. V njem so opravljali tudi kvantitativne biokemične preiskave bioloških vzorcev bolnikov ljubljanske splošne bolnišnice. V tridesetih letih 20. stoletja so na fiziološkem inštitutu Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (UL MF) začeli s predavanji in vajami fiziološke kemije. Leta 1941 je bil urejen prvi bolnišnični biokemični laboratorij v bolnišnici na interni kliniki Obče državne bolnice v Ljubljani. Vodil ga je diplomirani inženir kemije; hematološki in urinski laboratorij, ki sta delovala ločeno, sta vodila zdravnik. Leta 1945 je biokemični laboratorij postal del Inštituta za kemijo UL MF, 1952. pa je prešel pod Interno kliniko. Sredi sedemdesetih let so se povezali medicinski laboratoriji kirurgije in interne klinike Kliničnega centra Ljubljana ter Zdravstvenega doma Ljubljana v Centralni laboratorij. Prvi strokovni kolegij kliničnih in biokemičnih laboratorijev republike Slovenije je bil imenovan 1977, vodil ga je dr. Niko Jesenovec, člani pa so bili iz vse Slovenije. V naslednjih letih je kolegij postavil kriterije glede prostorov, zaposlitvene strukture, postopkov in opreme, izpeljal kategorizacijo izvajalcev laboratorijskih storitev na področju medicinske biokemije, v praksi organiziral zunanjo kontrolo kakovosti rezultatov in izvedel obvezno vključitev vanjo. Ker zakonodaja ni sledila strokovnim zahtevam področja, je ob koncu osemdesetih let aktivnost zamrla. Leta 1978 so se Centralnemu laboratoriju pridružili še laboratoriji ginekološke, infekcijske, gastroenterološke in otorinolaringološke klinike; 1979. se je preimenoval v Inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Takrat je imel 200 zaposlenih, od tega 17 z univerzitetno izobrazbo, opravil je 4,4 milijona preiskav letno. S povečanjem raziskovalnega dela je v devetdesetih letih inštitut pridobil naziv klinični inštitut, nato pa se tudi preimenoval v Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) (16–19).

Leta 1992 je bil imenovan Razširjeni strokovni kolegij za laboratorijsko diagnostiko, kot eden od posvetovalnih or-

ganov zdravstvenega ministra. V treh desetletjih je neposredno ali skozi različne delovne skupine s strokovnimi združenji opravil pomembno vlogo pri povezovanju stroke, standardizaciji, smernicah za delo, pripravi strokovnih izhodišč, priporočil in vodil za delo (20).

Na področju klinične biokemije so v osrednji Sloveniji v obdobju do leta 1990 pionirsko delo za razvoj stroke, institucij in organiziranega izobraževanja s področja širše klinične biokemije opravili prvi štirje specialisti: kemik dr. Pavle Dolar, zdravnik dr. Miha Žemva in farmacevt mag. Marija Žemva in prof. dr. Niko Jesenovec (21). Slednji je bil prvi predstojnik Katedre za klinično biokemijo Oddelka za farmacijo Fakultete za naravoslovje in tehnologijo Univerze v Ljubljani (UL) (22). V letih 1988 in 1990 je izdal dva dela knjige „Izabrani postopci analiza u kliničko biokemijskim laboratorijima“.

Ledino slovenske klinične biokemije so orali tudi kemičarka Alenka Žakelj (Interna klinika ljubljanske bolnišnice 1943–1958), farmacevt Bogdan Šavnik (vodja laboratorija na Ginekološko porodniški kliniki kliničnih bolnic 1951–1963), kemičarka Zora Pretnar (vodja laboratorija na pediatrični kliniki Kliničnega centra Ljubljana 1956–1973) in zdravnik prim. Stanislav Štraus (vodja laboratorija in transfuzijske postaje v celjski bolnišnici 1949–1962).

Za laboratorijsko medicino je bilo pomembno sprejetje Kodeksa deontologije v laboratorijski medicini leta 1992, namenjenega strokovnjakom in javnosti, ki dopolnjuje splošne zdravstvene kodekse s posebnostmi dela z biološkim materialom bolnikov (23), in Pravilnika o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine, leta 2004 (24). Slednji predstavlja soglasje različnih področij klinično-laboratorijskega dela o skupnih minimalnih kriterijih za zagotavljanje kakovosti postopkov, varnosti pacientov in doseganja zanesljivosti izvidov (25). Osnovan je bil na istih izhodiščih kot mednarodni standard ISO 15.189:2007 Medicinski laboratoriji – posebne zahteve za kakovost in pristojnost z namenom postopnega prehoda na akreditacije medicinskih laboratorijev v Sloveniji (26).

Pomembni pokazatelji razvoja področja v samostojni Sloveniji so tudi ustanovitev Zbornice laboratorijske medicine Slovenije in pridobitev javnih pooblastil na področju samoregulacije področja, krepitev mednarodne prepoznavnosti z intenzivnim sodelovanjem nacionalnih strokovnih združenj in z vodilnimi položaji slovenskih strokovnjakov v njih in vzpostavitev nacionalne sheme zagotavljanja kakovosti medicinskih laboratorijev. Tudi raziskovalno delo se je vzpostavilo v samostojnih registriranih raziskovalnih skupinah z nacionalnimi in mednarodnimi projekti, oblikovano je bilo izobraževanje s področja laboratorijske medicine na vseh

treh ravneh bolonjskih študijev. Slednje je pomemben temelj razvoja vsake celovite stroke.

### 3.2 ORGANIZIRANO IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE NA PODROČJU KLINIČNE BIOKEMIJE IN LABORATORIJSKE MEDICINE

Pionirsko delo v stroki v Sloveniji in veliki razvojni premiki laboratorijske medicine v mednarodnem prostoru so povečali potrebno po samostojnem izobraževanju, usmerjenem v področje medicinske biokemije oz. širše v področje laboratorijske medicine.

V izobraževalni sferi že desetletja skrbi za umestitev in didaktični razvoj stroke UL, Fakulteta za farmacijo (UL FFA) (oziroma njene predhodnice) skupaj z UL MF (hematološki del) in s KIKKB Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana (velik del vaj in specialističnega usposabljanja). Kot glavne mejnike v razvoju izobraževanja na področju klinične biokemije/laboratorijske (bio)medicine lahko štejemo dogodke, predstavljene v preglednici 1 (27–30).

Specializacija iz klinične biokemije, oziroma medicinske biokemije, kot jo poimenujemo za razlikovanje s kliničnimi specializacijami zdravnikov, poteka v Sloveniji od leta 1970. Je posebna oblika podiplomskega izpopolnjevanja in usposabljanja, ki je potrebno za opravljanje zahtevnejših del na področju medicinske biokemije. Obsega pridobivanje teoretičnih znanj in štiriletno praktično usposabljanje v skladu s programom specializacije. Specialistično usposabljanje iz medicinske biokemije je potekalo kot temeljna zdravstvena specializacija do leta 2003 pod okriljem Ministrstva za zdravje, od leta 2004 pa Zbornice laboratorijske medicine Slovenije (31). Program je bil usklajen s programom za evropskega kliničnega kemika in je pridobil standard ekvivalentnosti za evropskega specialista iz laboratorijske medicine (32).

## 4 FARMACEVTI IN KOMPETENČNI VIDIKI KLINIČNE BIOKEMIJE / LABORATORIJSKE MEDICINE

Področje laboratorijske medicine v okviru predmetov klinične kemije, pa tudi mikrobiologije, imunologije, kliničnih študij idr. je v enovitem magistrskem študiju Farmacije glede na dopolnjeno Direktivo še vedno pomemben



*Preglednica 1: Glavni mejniki v razvoju izobraževanja na področju klinične kemije/laboratorijske medicine na Slovenskem.*

*Table 1: Main milestones in the development of clinical chemistry/laboratory medicine education in Slovenia.*

Leto	Dogodki
1953–1957	Prvi učbenik s področja klinične kemije v slovenščini »Biokemične preiskave v medicini s tolmačenjem rezultatov« (Marija Žemva, mag. farm., in Miha Žemva, dr. med.)
1960	V okviru predmeta Biokemija za študente farmacije obravnavana tematika biokemičnih dogajanj v človeškem telesu kot osnova klinične kemije.
1977	Uvedba predmeta Analizna farmacevtska biokemija na programu Farmacija (vaje v laboratorijih UKC Ljubljana).
	Začetek dveletnega višješolskega študija Farmacija – smer medicinska biokemija (izredni študij do leta 1990, nato redni do 1995).
1978	Uvedba podiplomskega (znanstveni magisterij, doktorat) študija Farmacije, smer Klinična biokemija.
1986	Ustanovitev Katedre za klinično biokemijo na UL FFA.
1987	Preimenovanje predmeta Analizna farmacevtska biokemija v Klinično biokemijo.
1995	Preoblikovanje dveletnega višješolskega študija Farmacija – smer medicinska biokemija v triletni visokošolski strokovni študijski program Laboratorijske biomedicine na UL FFA.
1999	Na UL uveden štiriletni podiplomski študij smeri Klinična biokemija v okviru podiplomskega študija Biomedicine kot prvi podiplomski študij na ravni univerze.
2007	Akreditiran bolonjski študij Laboratorijske biomedicine 1. stopnje; vpis študentov 2008.
	Akreditiran bolonjski doktorski program Biomedicina s smerni, vezanimi na laboratorijsko medicino: Klinična biokemija in laboratorijska biomedicina, Biokemija in molekularna biologija, Mikrobiologija, Genetika, Toksikologija.
	Ustanovitev Katedre za klinično biokemijo na Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru.
2008	Vpis v bolonjski program Farmacija s predmetom klinična kemija, ki gradi na povezljivosti s kemijskimi, biološko-medicinskimi in instrumentalnimi predmeti.
	Akreditiran bolonjski študij Laboratorijske biomedicine 2. stopnje; vpis študentov 2009. S tem je dosežena celotna tristopenjska vertikala samostojnega študija laboratorijske medicine.
2021	Uvedba predmetov Medicinska biokemija, Klinična biokemija in laboratorijska diagnostika in Izbrane teme iz diagnostike v prenovljen študijski program Medicina na UL MF.
2023	Prenova študijskega programa Laboratorijska biomedicina 2. stopnje s prvim vpisom v študijskem letu 2024/2025.

FFA – Fakulteta za farmacijo; MF – Medicinska fakulteta; UKC -Univerzitetni klinični center; UL – Univerza v Ljubljani.

(obvezni) sestavni del študijskih programov farmacije in poklicnih kompetenc farmacevtov (4, 5).

Seznami pričakovanih, zelenih ali nujnih kompetenc (znanj, veščin in sposobnosti oz. hotenj) se razlikujejo tudi znotraj enega poklica glede na različna delovna mesta. Za poklic farmacevta je to še posebej izraženo zaradi širine zaposlitvenih možnosti znotraj poklica: javne in bolnišnične lekarne, klinična farmacija, raziskave in razvoj, izdelava zdravil, zagotavljanje kakovosti izdelkov in storitev v celotni verigi izdelave in dobave zdravil, trženje in prodaja, regulativa, izobraževanje, laboratorijska medicina ... To je razvidno iz sistematizacije delovnih mest, opisov poklicev v zdravstveni dejavnosti in iz kompetenčnih modelov poklicnih in strokovnih združenj (33–35). Seznami kompetenc običajno obsegajo celoten karierni spekter posameznikov: od novince in izkušenega začetnika preko strokovnjaka do eksperta (36, 37). V tem kontekstu se Direktiva navezuje na enotno ali vsaj primerljivo izobraževanje: torej na maksimum kompetenc, ki jih je možno pridobiti tekom študija, oziroma na minimum kompetenc, ki so skupne vsem farmacevtom po različnih področjih dela v državah znotraj EU. Iz izobraževalnega sistema lahko ne glede na oblikovanje programa izstopi samo novinec ali začetnik z omejenimi izkušnjami. Kurikulumi obsegajo pridobivanje znanj (predpisanih, kulturno pogojenih in praktičnih), veščin in tudi razvijanje posameznikovega odnosa, ki je vezan na profesionalizem. Kodificirana (predpisana) znanja je tradicionalno prenašala univerza, preostala znanja (kulturno pogojena in praktična) pa delovno okolje. Čeprav je bilo v zadnji tretjini dvajsetega stoletja mnogo pripomb na neprilagodljivost visokošolskega izobraževalnega sistema in njegovo zaprtost, se je vse več praktičnih veščin potiskalo s strani delodajalcev v visokošolske kurikulume. Sodoben zdravstveni sistem naj bi bil po Wrightu nekoliko drugačen: predpisana znanja, kulturno pogojena znanja in posameznikov profesionalni odnos ustvarjata in posredujeta tako univerza kot delodajalci, praktična znanja, ki so vezana na neposredno delovno okolje, pa delodajalci. Šele v poklicnem okolju se lahko novinec razvije v izkušenega začetnika, strokovnjaka in morda eksperta (38).

Kompetenčni model Evropskega združenja farmacevtskih fakultet (EAFP) je nastal z vidika kompetenc farmacevta prvega zaposlitvenega dne, torej kompetenc, ki naj bi jih študent pridobil med študijem. Pri tem so bili upoštevani kompetenčni sezname mednarodnih in nacionalnih združenj ter področne direktive, ki je vsebinsko obvezujoča za izvajalce izobraževanj. V domeni »Kompetence, vezane na skrb za pacienta« sta navedeni tudi sposobnost interpretacije osnovnih medicinskih laboratorijskih testov in

sposobnost izvajanja ustreznih diagnostičnih testov, ki so drita med kompetence s področja laboratorijske medicine (35). Da nam tak pristop v Sloveniji ni tuj, kažejo tako poročila o situaciji v Sloveniji iz preteklega desetletja, analiza študijskega programa Farmacije, pa tudi dolgoletna praksa, saj so kompetence farmacevtov na področju klinične biokemije pomemben steber zdravstvenega varstva (39, 40). Študija z začetka tisočletja je pokazala, da je v Sloveniji sicer komaj odstotek farmacevtov zaposlen v medicinskih laboratorijih s področja klinične (bio)kemije vendar predstavljajo kar 40 % vseh specialistov medicinske biokemije kot nosilcev dejavnosti (15). Da to ni bilo samo trenutno stanje, kažejo zgodovinski popisi, kot je obsežna in enciklopedično utemeljena monografija »Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem«, kjer se farmacevtske, medicinske in tudi laboratorijske stroke prepletajo skozi več poglavij in več knjig (41–45). Sodobno stanje pa je razvidno tudi iz Pravidnika o pripravnosti in strokovnih izpitih zdravstvenih delavcev in zdravstvenih sodelavcev na področju zdravstvene dejavnosti, ki predpisuje za farmacevte tudi strokovne vsebine s področja klinične biokemije in širše laboratorijske medicine (46). Slednje namreč niso vezane samo na neposredno zaposlitev na področju laboratorijske medicine, ampak so nujne in uporabne tudi na drugih farmacevtskih področjih.

## 5 SKLEP

Področje farmacije se je v zadnjih letih opazno razvilo. Razvoju stroke sledijo tudi posodobitve evropske zakonodaje, ki vpliva na nabor potrebnih znanj in kompetenc za opravljanje poklica farmacevta. Široke zaposlitvene možnosti magistrstrov farmacije zahtevajo širok nabor kompetenc, med katerimi ostajajo pomembne tudi kompetence na področju laboratorijske medicine.

## 6 LITERATURA

1. Atkinson J, Sánchez Pozo A, Rekkas D, Volmer D, Hirvonen J, Bozic B, et al. Hospital and Community Pharmacists' Perceptions of Which Competences Are Important for Their Practice. *Pharmacy* 2016;4:21. <https://doi.org/10.3390/pharmacy4020021>.





2. Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta 2005/36/ES z dne 7. septembra 2005 o priznavanju poklicnih kvalifikacij.
3. Guder WG, Büttner. *Clinical chemistry in laboratory medicine in Europe-past, present and future challenges*. J. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997 Jul;35(7):487-94.
4. Council EU. *Commission delegated directive (EU) of 4.3.2024 amending Directive 2005/36/EC of the European Parliament and the council as regards the minimum training requirements for the professions of nurse responsible for general care, dental practitioner and pharmacist C(2024) 1319 final*.
5. *Annex to the Commission delegated directive (EU) of 4.3.2024 amending Directive 2005/36/EC of the European Parliament and the council as regards the minimum training requirements for the professions of nurse responsible for general care, dental practitioner and pharmacist*.
6. *Mapping and assessment of developments for sectoral professions under Directive 2005/36/EC – The profession of pharmacist*, Publications Office of the European Union, 2022, <https://data.europa.eu/doi/10.2873/077373>.
7. Božič B. Trg in regulativa medicinskih pripomočkov, namenjenih samotestiranju in testiranju ob preiskovanju. V: Omersel J (ur), Naberger Makovec U (ur). *Samotestiranje, hitro testiranje ali testiranje ob preiskovanju?* UL FFA 2021, p. 19-32.
8. Dybkaer R. *Clinical laboratory work – Concept and terms*. Eu J Clin Chem Clin Biochem. 1978;35/7:495-9.
9. Božič B. *Laboratorijske preiskave v lekarni in doma*. V: Mrhar A (ur) Božič B (ur), Marc J (ur), Obreza A (ur). *Vloga farmacevta pri samokontroli in samozdravljenju*. UL FFA 2006 Ljubljana, p. 7-14.
10. Kotlarz VR. *Tracing our roots: the first clinical laboratory scientist*. Clin Lab Sci. 1998;11(2):97-100.
11. de Kieviet W, Blaton V, Kovacs GL, Palicka V, Pulki K. *The management of clinical laboratories in Europe: a FESCC survey*. Forum of the European Societies of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med. 2002 Mar;40(3):312-9.
12. Jesenovec N. *Novis 1978*;5(6):4-8.
13. *Zakon o zdravstveni dejavnosti*. Uradni list RS 9-460/1992, str. 590; 21.2.1992.
14. *Resolucija o nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025 »Skupaj za družbo zdravja«* (ReNPZV16–25), Uradni list RS, št.25/16
15. Božič B. *Pharmacist' competencies in laboratory medicine: situation in Slovenia*. EAAP 2013, European Association of Faculties of Pharmacy Annual Conference, May 16-18, 2013 Ankara/Turkey: Curriculum optimization, towards learning outcomes: practical experiences: proceedings and abstracts. p 113-4.
16. Majhen J. *Strokovne naloge zdravstvenih organizacij*. *Novis*. 1977;IV(2):9-11.
17. Jesenovec N. *Klinični in biokemični laboratoriji v SR Sloveniji*. *Drugi posvet medicinskih biokemikov Jugoslavije v Banja Luki*. *Novis*. 1982;IX(10):20-2
18. Lukač-Bajalo J, Kramberger M. *Razvoj klinične kemije*. V: Kristl J (ur), Štrukelj B (ur), Štiri desetletja študija farmacije in klinične biokemije, UL FFA, Ljubljana 2000, 29-34.
19. Osredkar J, Kobe M. *Pred 30 leti in danes*. V: Skitek M (ur). *Zbornik predavanj celostna avtomatizacija in procesno vodenje medicinskega laboratorija*. *Strokovno srečanje z mednarodno udeležbo ob 30. obletnici naziva Inštituta za klinično kemijo in biokemijo*. Klinični center Ljubljana KIKKB, Ljubljana 2010, 13-34.
20. Meško Brguljan P, Možina B, Gorenjak M, Božič B. *Strokovna izhodišča za oblikovanje mreže laboratorijske dejavnosti s področja medicinske biokemije – nastala 2017, aktualna tudi v 2023*. *Lab Med* 2023;5:37-44.
21. Kramberger M. *Prispevek Miha Žemve, dr. med., spec. med. biok., pri nastajanju in razvijanju klinične biokemije v Sloveniji po drugi svetovni vojni*. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo; 2011.
22. *Spomini na pokojne učitelje: Profesor Niko Jesenovec, spec.med.biokem*. V: Krbavčič A (ur), Gobec S (ur) *Zbornik ob 50-letnici celovitega študija farmacije na Slovenskem*. UL FFA, Ljubljana 2010, 137-8.
23. Lukač J, Prevorčnik A. *Kodeks deontologije v laboratorijski medicini* Ljubljana: Zbornica laboratorijske medicine Slovenije; 2000.
24. *Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine NPB3*. Uradni list RS 64/04, 1/16, 56/19, 131/20 in 152/20 – ZZUOOP
25. Božič B. *Laboratorijska medicina skozi oči strokovnjaka in univerzitetnega profesorja za področje klinične biokemije in laboratorijske biomedicine*. *Lab Med* 2021;3:8-10.
26. *ISO 15.189:2007 Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence*. Available from: <https://www.iso.org/standard/42641.html>.
27. Karba D. *30 let popolnega študija farmacije v Ljubljani*. *Farm Vestn* 1990;41:55-9.
28. Krbavčič A. *Razvoj farmacevtskega izobraževanja na Univerzi v Ljubljani*. V: Kristl J (ur), Štrukelj B (ur), Štiri desetletja študija farmacije in klinične biokemije, UL FFA, Ljubljana 2000, 9-28.
29. Lukač Bajalo J, Marc J. *Fakulteta za farmacijo. Katedra za klinično biokemijo*. V: Ciperle J (ur) *90 let Univerze v Ljubljani: med tradicijo in izzivi časa*. rektorat Univerze v Ljubljani, Ljubljana 2009, 303-5.
30. Božič B. *Izobraževalna dejavnost*. V: Krbavčič A (ur), Gobec S (ur) *Zbornik ob 50-letnici celovitega študija farmacije na Slovenskem*. UL FFA, Ljubljana 2010, 7-20.
31. *Specializacije in specialistični izpiti* [internet]. Zbornica laboratorijske medicine Slovenije [citirano 2024 Sept 1]. Dosegljivo na: <https://www.zlms.si/si/page/dejavnosti/specializacije-in-specialisticni-izpiti>
32. Wieringa G, Queralto J, Homšak E, Jassam N, Cavalier E, Svinarov D, et. al. *A proposed Common Training Framework for Specialists in Laboratory Medicine under EU Directive 2013/55/EC (The Recognition of Professional Qualifications)*. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59(3):505:12.
33. *FIP Global competency framework*. Executive summary. Version 2, 2020, Available from: <https://www.fip.org/file/5127>.
34. Bernik Golubič Š. *Katalog kompetenc magistra farmacije v lekarniški dejavnosti: opis kompetenc in stopenj razvitosti*. Ljubljana: Lekarniška zbornica Slovenije, 2012.
35. Atkinson J, De Paepe K, Sánchez Pozo A, Rekkas D, Volmer D, Hirvonen J, Bozic B, et al. *The Second Round of the PHAR-QA Survey of Competences for Pharmacy Practice*. *Pharmacy* 2016; 4, 27. doi:10.3390/pharmacy4030027.
36. Božič B. *Competencies of the "first day of job" pharmacist*. V: *Zbornik sažetaka*. 2. kongres farmacevta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, 28-31 maj 2015, Bečići, Podgorica: Prisma, 2015.
37. Dreyfus SE, Dreyfus HL. *A five-stage model of the mental activities involved in directed skill acquisition*. California University Berkeley Operations Research Center [monograph on the Internet]; 1980. Available from: <http://www.dtic.mil/dtic/index.html>

38. Wright D. Making Pharmacy Education Relevant, EAFP Annual Conference 2024 Bergen.
39. Božič B, Obreza A, Atkinson J. Pharmacy practice and education in Slovenia. *Pharmacy* 2018;7/4. <https://doi.org/10.3390/pharmacy7010004>.
40. Gmeiner T, Horvat N, Kos M, Obreza A, Vovk T, Grabnar I, Božič B. Curriculum mapping of the master's program in pharmacy in Slovenia with the PHAR-QA competency framework. *Pharmacy* 2017;5:24. <https://doi.org/10.3390/pharmacy5020024>.
41. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Medicina skozi čas, javno zdravstvo, farmacija. Ljubljana: Slovenska matica; Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2017.
42. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Kirurške stroke, ginekologija in porodništvo. Ljubljana: Slovenska matica; Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2018.
43. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Infektologija, nevrologija, onkologija, dermatovenerologija, zobozdravstvo, strokovno-zdravstvene vede, predklinika, zdravstveno šolstvo. Celje; Ljubljana: Celjska Mohorjeva družba; Društvo Mohorjeva družba; Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2022.
44. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Interna medicina, urgentna medicina, paliativna oskrba in medicina. Ljubljana: Celjska Mohorjeva družba, Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije 2024.
45. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Pediatrija, psihiatrija, zdravliliška medicina, duhovna oskrba bolnikov, zdravstvene organizacije. Ljubljana, Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije [v tisku 2025].
46. Pravilnik o pripravi in izvedbi strokovnih izpitih zdravstvenih delavcev in zdravstvenih sodelavcev na področju zdravstvene dejavnosti. Uradni list RS, št. 76/22, 58/23, 97/23 in 88/24



# NOVICE IZ SVETA FARMACIJE

## OB MEDNARODNEM DNEVU ŽENSK IN DEKLET V ZNANOSTI: ZGODBA ROSALIND E. FRANKLIN

Nataša Karas Kuželički

Enajstega februarja smo praznovali Mednarodni dan žensk in deklet v znanosti. Ena izmed znanstvenic, ki v času življenja niso dobile zasluženega priznanja za njihov prispevek znanosti, je zagotovo Rosalind Elsie Franklin (25. 7. 1920 – 16. 4. 1958), ki je s svojim delom prispevala k razkritju strukture molekule življenja – dvojne vijačnice DNA.

Rosalind Franklin se je rodila v vplivni britanski družini judovskega rodu in je že v otroštvu kazala izjemno bistrost. Leta 1941 je diplomirala iz kemije, leta 1945 pa doktorirala na Univerzi v Cambridgeu. Leta 1947 se je preselila v Pariz, kjer je kot podoktorska raziskovalka delala v Laboratoire Central des Services Chimiques de l'État (Centralni laboratorij državnih kemičnih služb). Tam se je specializirala za rentgensko kristalografijo. Leta 1951 se je kot znanstvena sodelavka zaposlila na King's Collegeu v Londonu, kjer so jo kot strokovnjakinjo za rentgensko kristalografijo razporedili v raziskovalno skupino biofizika Mauricea Wilkinsa. Ta se je ukvarjal z raziskovanjem strukture molekule DNA. Rosalind je z asistentom, študentom Raymondom Goslingom, posnela vrsto rentgenskih slik DNA pri različnih stopnjah vlažnosti. Wilkins, ki se s Franklinovo ni razumel, je te slike brez njene vednosti in dovoljenja pokazal Jamesu Watsonu in Francisu Cricku, kar je pripeljalo do revolucionarnega odkritja, razkritja strukture dvovijačne DNA, za katerega sta Watson in Crick skupaj z Wilkinsom leta 1962 prejela Nobelovo nagrado. V času življenja Rosalind Franklin sta si vse zasluge za odkritje strukture DNA lastila Watson in Crick; šele kasneje sta priznala, da brez dela Franklinove

ne bi uspela priti do omenjenega odkritja. Vse to kaže na to, kako malo so Rosalind cenili njeni moški kolegi in je niso obravnavali kot sebi enake. Nekateri viri so trdili, da Rosalind ni razumela pomena svojih lastnih rezultatov, kar pa ne drži, saj zapiski v njenih laboratorijskih dnevnikih kažejo, da je iz slik sklepala, da ima DNA strukturo vijačnice. Izsledke je predstavila tudi v svojem predavanju novembra 1951 ter v članku, ki je izšel v isti številki revije Nature kot članek Watsona in Cricka o strukturi DNA leta 1953. Zanimivo je, da sta Watson in Crick soavtorstvo na svojem članku ponudila Wilkinsu (ki ga je sicer zavrnil), ne pa tudi Franklinovi, ki je bila najbolj zaslužna za eksperimentalne podatke, na katerih je temeljil njen model DNA. Zaradi nesoglasij z Wilkinsom je Rosalind še pred objavo člankov zapustila King's College in se zaposlila na Birkbeck College, kjer so bili po njenih besedah pogoji za delo slabši, vendar je bilo vodstvo veliko bolj naklonjeno znanstvenicam. Tam je nadaljevala z raziskovalnim delom na področju virusov in molekul RNA. Na žalost so Rosalind Franklin leta 1956 diagnosticirali raka na jajčnikih, zaradi katerega je umrla dve leti kasneje, stara komaj 37 let.

Prezgodnja smrt je verjetno glavni razlog, da Rosalind Franklin ni prejela Nobelove nagrade skupaj z Watsonom in Crickom. Watson in Crick sta namreč prejela Nobelovo nagrado 4 leta po njeni smrti, pravila pa niso dopuščala posmrtnih nominacij. Kljub temu dediščina Rosalind Franklin danes živi naprej, šele mnogo let po smrti je dobila priznanje za svoj prispevek k odkritju strukture DNA.

Viri:

1. Maddox, B. *The double helix and the 'wronged heroine'*. *Nature* 421, 407–408 (2003).

## AMERIŠKI URAD ZA ZDRAVILA IN PREHRANO JE ODOBRL NOV NEOPIOIDNI ANALGETIK

Nataša Karas Kuželički

Ameriški urad za zdravila in prehrano (FDA) je prvič po več kot dveh desetletjih odobril neopioidni analgetik. Suzetrigin (zaščiteno ime Journavx®), ki se uvršča v nov razred protibolečinskih zdravil, je razvilo podjetje Vertex Pharmaceuticals (Boston, Massachusetts, ZDA). Svojo pot je začel kot spojina VX-548, ki se je izkazala kot zelo močan in selektiven zaviralec natrijevih kanalčkov Nav1.8 v perifernem živčevju.

Suzetrigin je po jakosti protibolečinskega delovanja primerljiv z opioidi, vendar za razliko od le-teh ne povzroča odvisnosti in drugih neprijetnih neželenih učinkov opioidnih analgetikov. Suzetrigin ni prva učinkovina, ki deluje protibolečinsko z zaviranjem natrijevih kanalčkov. Spojini, kot sta prokain in lidokain, se uporabljata za ta namen že več kot stoletje, vendar sta za razliko od suzetrigina neselektivna zaviralca natrijevih kanalčkov, zato ju lahko uporabljamo zgolj lokalno, da se izognemo sistemskim neželenim učinkom. V devetdesetih letih 20. stoletja so odkrili, da se trije od devetih podtipov natrijevih kanalčkov izražajo izključno v bolečinskih nevronih; to so kanalčki Nav1.7, Nav1.8 in Nav1.9. Ker se ne izražajo v možganih in srcu, bi imela zdravila, ki delujejo na njih, veliko manj neželenih učinkov. Zato se je veliko farmacevtskih podjetij lotilo iskanja selektivnih zaviralcev Nav1.7, Nav1.8 in Nav1.9. Genetske študije v prvem desetletju 21. stoletja na osebah s kroničnim bolečinskim sindromom in posameznikih, ki so neobčutljivi na bolečino, so identificirale kanalček Nav1.7 kot glavni regulator percepcije bolečine, vendar so bili rezultati iskanja njegovih zaviralcev nezadovoljivi. Ravno tako so se študije kanalčka Nav1.9 v laboratoriju izkazale za težavne. Zato se je pozornost raziskovalcev usmerila v Nav1.8, kar je privedlo do odkritja suzetrigina. Le-ta za razliko od opioidov, ki zmanjšajo prenos bolečinskega signala v možganih, zavira natrijeve kanalčke v perifernih živcih in tako prepreči prenos bolečinskih signalov iz le-teh v možgane. Na ta način se izognemo učinkom v centralnem živčnem sistemu, ki povzročajo odvisnost.

V tretji fazi kliničnih preskušanj je 80 % preiskovancev ocenilo, da je suzetrigin učinkovito odpravil po-operativno bolečino ali bolečino zaradi poškodbe. Izkazalo se je, da je zdravilo izredno varno, z nizko incidenco neželenih učinkov. Najpogostejši neželeni učinki so bili slabost, glavobol, omotica in zaprtost. Pri večini preiskovancev so bili omenjeni neželeni učinki blagi, edini neželeni učinek, ki se je pojavil pri več kot 5 % preiskovancev, je bil glavobol.

Kljub obetavnim rezultatom še ni jasno, ali bo suzetrigin v prihodnosti lahko nadomestil opioide za zdravljenje kronične bolečine, saj je bil zaenkrat registriran za zdravljenje akutne bolečine. Za odgovor na to vprašanje bodo potrebna nadaljnja klinična preskušanja na bolnikih s kronično bolečino. Ali se bo suzetrigin lahko uporabljal za zdravljenje kronične bolečine, je odvisno tudi od njegove cene, ki trenutno znaša 15,5 \$ na tableto. Ta je sicer večja kot je cena generičnih opioidov, ampak še vedno dovolj nizka, da v zdravstvenem sistemu odtehta stroške, ki nastanejo zaradi morebitne odvisnosti od opioidov.

Nekatera farmacevtska podjetja že razvijajo zaviralce Nav1.8 naslednje generacije, kot je na primer spojina LTG-001 (Latigo Biotherapeutics, Thousand Oaks, California, ZDA), ki se hitreje absorbira v kri kot suzetrigin in zato doseže hitrejši protibolečinski učinek. Odkritje novega razreda selektivnih zaviralcev Nav1.8 predstavlja revolucijo v zdravljenju bolečine, saj bo zagotovilo učinkovito, a varnejšo protibolečinsko terapijo.

Viri:

1. Dolgin E. US drug agency approves potent painkiller - the first non-opioid in decades. *Nature*. 2025 Feb;638(8050):304-305
2. Osteen, J.D., Immani, S., Tapley, T.L. et al. *Pharmacology and Mechanism of Action of Suzetrigine, a Potent and Selective Nav1.8 Pain Signal Inhibitor for the Treatment of Moderate to Severe Pain*. *Pain Ther* (2025). <https://doi.org/10.1007/s40122-024-00697-0>

## VPLIV KAVE NA SESTAVO ČREVESNE FLORE PRI ČLOVEKU

Nataša Karas Kuželički

V zadnjem desetletju se je povečalo število študij, ki proučujejo povezavo sestave črevesne flore oziroma mikrobioma na pojavnost različnih bolezni pri človeku. Hkrati pa zelo malo vemo o tem, kaj vse vpliva na sestavo črevesne flore. Eden najbolj očitnih vplivov je vrsta prehrane pri posamezniku, saj naj bi določena živila pospeševala ali zavirala rast določenih vrst bakterij v prebavnem traktu. Z vplivom prehrane na človekov mikrobiom se ukvarja tudi članek, ki so ga objavili v reviji *Nature Microbiology*. Avtorji članka so preverjali vpliv uživanja kave na človeški mikrobiom in odkrili, da je uživanje kave močno povezano z vrsto črevesne bakterije *Lawsonibacter (L.) asaccharolyticus*, ki so jo prvič odkrili v človeškem mikrobiomu šele leta 2018. Metagenomska študija črevesne flore je bila največja doslej in je zajemala 22.867 posameznikov iz ZDA in Velike Britanije. Od preiskovancev so pridobili tudi podrobne informacije o uživanju kave skozi daljše časovno obdobje. Raziskovalci so preiskovance razdelili v tri skupine glede na količino zaužite kave: na tiste, ki kave ne uživajo (manj kot 3 skodelice na mesec), na tiste, ki jo uživajo zmerno (več kot 3 skodelice na mesec in manj kot 3 na dan), in na tiste, ki jo uživajo v velikih količinah (več kot 3 skodelice na dan). Z uporabo metod, kot so metagenomika, metatranskripto-



mika in metabolomika, so raziskali biokemijske interakcije med uživanjem kave in mikrobiomom posameznikov, pri čemer so upoštevali vpliv tako kofeinske kot brezkofeinske kave.

Študija je ugotovila, da je mikrobiom oseb, ki pijejo kavo, izrazito drugačen od mikrobioma tistih, ki je ne uživajo. Največje razlike so ugotovili v zastopanosti bakterije *L. asaccharolyticus*, saj je bila njena prisotnost v prebavnem traktu pri pivcih kave v povprečju 4,5- do 8-krat večja, kot pri posameznikih, ki kave ne uživajo. Potrebno je poudariti, da so bile razlike v količini *L. asaccharolyticus* največje med osebami, ki niso uživale kave, in tistimi, ki so jo uživale v velikih količinah, razlike med zmernimi in pogostimi pivci kave pa so bile statistično neznačilne. Omenjena povezava ni bila odvisna od geografske lokacije ali vrste kave (kofeinska ali brezkofeinska).

Vpliv kave na rast *L. asaccharolyticus* so raziskovalci potrdili tudi z eksperimenti v laboratoriju. Eksperimenti *in vitro* so pokazali, da kava neposredno spodbuja rast *L. asaccharolyticus*. Raziskava je pokazala, da so učinki kave na mikrobiom večinoma neodvisni od kofeina. Tudi brezkofeinska kava je spodbujala rast *L. asaccharolyticus*, kar kaže na vpliv drugih komponent v kavi, kot so polifenoli (npr. klorogenska kislina).

Na splošno je bila prevalenca *L. asaccharolyticus* višja v državah z večjo porabo kave na prebivalca. Analiza sestave

mikrobioma in povprečne porabe kave na prebivalca v 43 državah je pokazala, da je *L. asaccharolyticus* bolj razširjen (prevalenca 75 %) v zahodnih urbanih populacijah, kjer je uživanje kave zelo razširjeno. V podeželskem okolju v manj razvitih državah, kjer je tudi dostop do kave omejen, je ta bakterija redka (prevalenca 2,4 %), kar nakazuje, da ima kava ključno vlogo pri njeni zastopanosti v človeškem mikrobiomu. Zanimivo je, da omenjene bakterije niso našli v mikrobiomu dojenčkov in majhnih otrok, zelo redko pa je bila prisotna pri višjih primatih. Vse to podpira hipotezo o vplivu kave na rast *L. asaccharolyticus*.

Znanstveniki domnevajo, da bi *L. asaccharolyticus* lahko imel vlogo pri posredovanju nekaterih že predhodno ugotovljenih pozitivnih učinkov kave, kot so zmanjšanje tveganja za kardiovaskularne bolezni, sladkorno bolezen tipa 2 in rakava obolenja. Pomembno pa je, da rezultati študije nakazujejo, da bi lahko bili omenjeni pozitivni učinki kave neodvisni od kofeina.

Viri:

1. Manghi, P., Bhosle, A., Wang, K. et al. Coffee consumption is associated with intestinal *Lawsonibacter asaccharolyticus* abundance and prevalence across multiple cohorts. *Nat Microbiol* 9, 3120–3134 (2024).



# DRUŠTVENE VESTI

ACTIVITIES

FROM THE SOCIETY

IN MEMORIAM

## BREDA DRENEK SOTOŠEK (1947–2024)

Jelka Dolinar, Martina Klanjšček

Konec novembra lanskega leta nas je pretresla vest, da se je za vedno poslovila magistra Breda Drenek Sotošek, izjemna oseba, ki je na družbeno-političnem področju in na področju filantropije zaznamovala Posavsko regijo, predvsem Sevnico, sled pa je pustila tudi v slovenski farmaciji. Lekarniško službo je opravljala od leta 1973 dalje, sprva v Javnem zavodu Lekarne Sevnica, ki ga je 18 let vodila kot direktorica, od leta 1994 dalje pa je bila koncesionarka zasebne lekarnje Pod Sv. Rokom.

Aktivno je sodelovala v Sekciji koncesionarjev pri Lekarniški zbornici Slovenije (LZS), ki je v devetdesetih letih šele postavljala temelje in organizacijo dela v tej novi obliki izvajanja lekarniške dejavnosti v Sloveniji. Predanost ciljem in izkušnje magistre Brede so bile pri tem nepogrešljive. Kar nekaj let je zastopala koncesionarje tudi v uredništvu Lekarništva, glasilu LZS.

Bila je med prvimi lekarniški farmaceuti, ki je leta 1991 končala specializacijo iz farmacevtske informatike, leta 1997 je postala magistra ekonomskih ved. V letih 1993 do 1995 je kot članica organizacijskega odbora pomagala oblikovati programe simpozijev Slovensko farmacevtsko društvo (SFD) ob letni skupščini, ki so bili namenjeni farmakoinformatiki, zdravstveni ekonomiki in zakonodaji. Društvene aktivnosti magistre Drenek Sotošek so bile povezane predvsem s podružničnim delovanjem. Več mandatov je bila članica izvršnega odbora SFD, kjer je zastopala Celjsko podružnico, leta 1991 pa je dala pobudo za ustanovitev Posavske podružnice, ki jo je dva mandata tudi vodila. Poleg dela v lekarni je v osemdesetih poučevala strokovne predmete na Srednji tekstilni šoli v Sevnici, med leti 2010 in 2018 pa na Šolskem centru Novo mesto, na Srednji zdravstveni in kemijski šoli, na programih Farmaceutski in Kozmetični tehnik. Bila je soav-



torica dveh delovnih zvezkov in učbenika za interno uporabo za dijake teh šol. Pisala je strokovne prispevke za obiskovalce lekarnje Pod Sv. Rokom in za slušatelje Fakultete za organizacijske študije v Novem mestu, sodelovala je kot soavtorica s prispevki v Lekarništvo. Ob delu je dodatno zaključila šolanje s področja kozmetike in homeopatije.

Delo v zasebni lekarni ji ni puščalo veliko prostega časa, kar pa ji ga je ostalo, ga je namenila svojim hobijem, s katerimi je bogatila sebe, svojo družino in okolje, v katerem je živel. Prodnost, pogum in vztrajnost so bile odlike magistre Drenek Sotošek. Bila je navdih svojim otrokom, ki nadaljujejo njeno delo in vsem nam, ki smo jo poznali.



DRUŠTVENE VESTI

# POROČILO O SKUPŠČINI EVROPSKEGA ZDRUŽENJA BOLNIŠNIČNIH FARMACEVTOV (EAHP)

Vesna Bizjak

Generalna skupščina Evropskega združenja bolnišničnih farmacevtov (EAHP) je najvišji organ združenja, katerega članica je tudi Sekcija bolnišničnih farmacevtov Slovenskega farmacevtskega društva (SBF SFD). 54. redna letna skupščina EAHP je potekala v Valenciji (Španija) od 6. do 8. junija 2024. Slovenska delegata sta bila dr. Aljaž Sočan, predsednik SBF SFD, in podpredsednica sekcije Vesna Bizjak. Po pandemiji covid-19 je EAHP preživel kar nekaj sprememb in novosti:

- Prvič smo na skupščini uporabili elektronski način glasovanja, kar je kljub začetnim težavam odločno skrajšalo proces glasovanja.
- Upokojila se je dolgoletna računovodja, zato je EAHP poiskal novo moč, marca 2025 pa odhaja dolgoletna direktorica, njeno pozicijo bo prevzel Gonzalo Marzal López.
- Razširil se je nabor zaposlenih v pisarni, in sicer smo imeli priložnost spoznati štiri novo zaposlene.
- Od jeseni 2024 je prenovljena spletna stran z uporabnikom prijaznimi rešitvami.
- Nenad Miljković je predstavil filmski projekt bolnišnične farmacije, katerega namen je povečati prepoznavnost poklica. Projekt obsega 10-minutni film in 3–4 spremljajoče posnetke, ki bodo objavljeni na YouTube.

V nadaljevanju navajamo kratko predstavitev tem, ki so bile obravnavane na skupščini:

## EAHP BOOST

Gre za nov »vikend dogodek« s številnimi delavnicami, ki se bo odvijal na letni ravni, predvidoma jeseni. Prvi Boost je potekal v Firencah (Italija) od 27. do 28. septembra 2024 z naslovom *Humanizacija visokotehnološke lekarne* in je vključeval dve vzporedni delavnici. Več na: <https://www.eahp.eu/content/eahp-boost>.

## SYNERGY MASTERCLASS

Za zagotavljanje kontinuiranega izobraževanja in nadaljnega napredka stroke bolnišnične farmacije po svetu EAHP organizira enodnevno ali dvodnevno izobraževanje, na katerega so vabljeni tako člani kot nečlani EAHP (za člane je kotizacija nižja), ki jih zanima predstavljeno

področje. Obenem gre za priložnost izmenjave mnenj in spoznavanja. Naslednje srečanje bo 16. in 17. maja 2025 v Bruslju z naslovom *Strategija in perspektive vodenja digitalne transformacije bolnišničnih lekarn*. Več na: <https://eahp.eu/education/synergy-masterclass/synergy-masterclass-2025/>.

## MLADA MOČ

Sodelovanje z Evropskim združenjem študentov farmacije (angl. *European Pharmaceutical Students' Association*) je bolj aktualno kot kadarkoli. Pomanjkanje kadra v lekarnah, ker se študentje farmacije raje odločijo za industrijo, pesti vse vrste lekarn, ne le bolnišničnih. EAHP še naprej raziskuje, kam gredo farmacevti po končanem študiju. Poklic bolnišnične farmacije promovira na dnevu lekarn in novi mreži bolnišničnih lekarn za zgodnjo kariero (angl. *Early Career Hospital Pharmacy Network*), katere cilj je izmenjava najboljših praks in izkušenj med bolnišničnimi farmacevti. Poudarjen je bil pomen te mreže kot podpora državam brez programa specializacije in za razvoj platforme za lažjo izmenjavo in pripravištvo za študente v bolnišnicah po vsej Evropi. Delegati so dodali, da bo potrebno spodbujati tudi zaposlovanje farmacevtskih tehnikov.

## PROJEKT ISKANJA DELOVNE SILE

Bivši predsednik EAHP, Petr Horák, je predstavil koncept prihodnosti kadrovskega projekta: (i) opis trenutnega stanja, (ii) iskanje glavnih dejavnikov, ki vplivajo na razpoložljivost in zmogljivost delovne sile, (iii) predlog priporočila za zagotavljanje zadostne delovne sile v bolnišničnih lekarnah. Projekt se je začel julija 2024 z anketiranjem članov EAHP in iskanjem interesa za sodelovanje z drugimi združenji, cilj je dokončati priporočila do junija 2026. Delegati EAHP bodo obveščeni o naslednjih korakih projekta v sklopu rednih spletnih sestankov (angl. *on-line catch-up meetings*).

## DOSTOP DO ZDRAVIL

Evropska komisija je 13. 12. 2023 v Bruslju organizirala 7. dogodek zainteresiranih deležnikov o podobnih bioloških

zdravilih (angl. 7<sup>th</sup> Biosimilar Multistakeholder Event). Razprava je zajemala vpliv konkurence bioloških podobnih zdravil, prihajajoče izgube ekskluzivnosti, razlike v odobritvi in dostopu podobnih bioloških zdravil ter posledice farmacevtskih oblik in načina uporabe zdravila za bolnike, zdravstvene delavce in zdravstvene sisteme.

EU je sprejela novo uredbo o snoveh človeškega izvora in EAHP je so-podpisal skupno izjavo o bolnišničnih izjemah pri razvoju zdravil za napredno zdravljenje (angl. *hospital exemption or non-routinely prepared medicines for advanced therapy*), ki poudarja ključno vlogo bolnišničnih farmacevtov pri ravnanju z njimi.

Predstavljen je bil predlog o spremembi Uredbe o medicinskih pripomočkih (Uredbe MDR) in Uredbe o *in vitro* diagnostičnih medicinskih pripomočkih (Uredbe IVDR). EAHP še naprej aktivno sodeluje v koordinacijski skupini za medicinske pripomočke (angl. *Medical Device Coordination Group*, MDCG).

## PROTIMIKROBNA ODPORNOST

Od poletja 2023 je EAHP član večstranske partnerske platforme proti protimikrobni odpornosti, katere cilj je zagotoviti priporočila za ukrepe glede protimikrobne odpornosti, ki jih bodo obravnavali Združeni narodi. EAHP je kot del Evropske mreže proti protimikrobni odpornosti (angl. *EU AMR One Health Network*) prisostvoval številnim sestankom o protimikrobni odpornosti z različnimi zainteresiranimi stranmi, kot so npr. združenja bolnikov FIP AMR (angl. *AntiMicrobial Resistance*). Združenje EAHP uspešno sodeluje tudi z Evropskim združenjem za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni (ESCMID), kar je privedlo do povabilak sodelovanju EAHP kongresu ESCMID leta 2025.

## POMANJKANJE ZDRAVIL

Združenje EAHP je sodelovalo pri zagonu Zveze za kritična zdravila (angl. *Critical Medicines Alliance*, CMA), ki naj bi do konca leta 2024 objavila prvi sklop priporočil kot del svojega strateškega akcijskega načrta. Področje uporabe CMA je omejeno na določeno število ključnih zdravil, s poudarkom na izboljšanju dobave kritičnih zdravil, da bi preprečili in obravnavali pomanjkanje. EAHP se bo pridružil obema delovnim skupinama, da bi zastopal bolnišnične farmacevte in zdravstvene delavce, medtem ko zastopnost industrije ostaja močna.

Izvršna usmerjevalna skupina za pomanjkanje in varnost zdravil (angl. *Executive Steering Group on Shortages and*

*Safety of Medicinal Products*, MSSG) je pripravila pomembne dokumente o dobavnih verigah s poudarkom na kratkoročnih in srednjeročnih ukrepih, CMA pa se bo osredotočil na dolgoročne ukrepe. Koordinacijo in harmonizacijo obstoječih sistemov proti pomanjkanju zdravil v evropski mreži (t. i. projekt Chessmen) vodijo nacionalne regulatorne agencije, sestavlja pa ga osem delovnih projektov, katerih cilj je uskladiti delo na področju pomanjkanja in imeti skupne ukrepe proti pomanjkanju zdravil. Sodelovanje EAHP z Evropsko agencijo za zdravila (EMA) je ključno, saj zagotavlja neposredno priložnost za vplivanje na delo EMA, kar neposredno vpliva na vsakodnevno delo bolnišničnih farmacevtov.

## VOLITVE V ODBOR EAHP

Letos so bile volitve v odbor EAHP bolj pestre kot ostala leta. Zanimivost iz naše regije je, da je bil Nenad Miljković (Srbija) izvoljen za predsednika EAHP, Darija Kuruc Poje (Hrvaška) pa za podpredsednico.

Naslednja skupščina bo v Solunu v Grčiji, 6. in 7. junija 2025.

Delo delegata EAHP vzame dosti časa in energije. Neredko zahteva stalno pripravljenost priskočiti nekemu na pomoč, lahko le s poslušanjem in podajanjem osebnega mnenja. Še največ časa namenimo povezovanju z ekipo EAHP ter našo sekcijo. V zameno za čas in energijo smo poplačani z najnovejšimi informacijami o dogajanju v bolnišnični farmaciji po Evropi, nova poznanstva med kolegi pa nam omogočajo spletnje profesionalnih, kolegialnih in prijateljskih vezi.







# Prinašamo zdravje

Zdravje in dobro počutje ljudi sta za nas na prvem mestu. Kot vodilna slovenska veletrgovina z zdravili, ki zagotavlja široko ponudbo izdelkov, smo zavezani, da svoje delo opravljamo zanesljivo, varno in učinkovito.

V vse, kar počnemo, vlagamo srčnost in predanost. Z nenehnim razvojem naših storitev gradimo zaupanje ter trdne partnerske odnose za bolj zdravo prihodnost.

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

 **KEMOFARMACIJA**  
a PHOENIX company

