

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1





STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 1 | marec 2026 | letnik 77

ODGOVORNA UREDNICA:
Mojca Kerec Kos

GLAVNA UREDNICA:
Dunja Urbančič

GOSTUJOČI UREDNIK:
Aleš Obreza

UREDNIŠKI ODBOR:

Žiga Jakopin
Maja Jošt
Marjetka Korpar
Mitja Kos
Anja Pišlar
Andrea Šetina
Matjaž Tuš
Tomaž Vovk
Alenka Zvonar Pobirk

IZDAJATELJSKI SVET:

Miroslava Abazović
Matejka Cvirn Novak
Sara Kenda
Smiljana Milošev Tuševljak
Janez Mravljak
Helena Pavšar
Aljaž Sočan

NASLOV UREDNIŠTVA /

ADDRESS OF THE EDITORIAL OFFICE:

Slovensko farmacevtsko društvo,
Dunajska cesta 184a, 1000 Ljubljana
T.: +386 (01) 569 26 01
Transakcijski račun pri NLB d.d. Ljubljana:
SI56 0201 0001 6686 585.

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



Izhaja petkrat letno.
Letna naročnina je 70 EUR.
Za tuje naročnike 100 USD.

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 is 70 EUR inland and 100 USD in other countries.

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.

Spoštovani bralci,

pred vami je prva letošnja številka Farmacevtskega vestnika, ki prinaša prispevke z različnih področij farmacije – od zgodovine, farmacevtske kemije in tehnologije do toksikologije ter naprednih metod zdravljenja in diagnostike.

Avtorici izvirnega znanstvenega članka predstavljata podatke o pojavnosti novih benzodiazepinskih analogov in njihovi uporabi v Evropi med letoma 2008 in 2024. Gre za nove psihoaktivne snovi, ki zaradi hitro spreminjajoče se sestave pogosto ostajajo nenadzorovane in so zato povezane z zdravstvenimi tveganji. Sledi pregledni članek, ki prikazuje uporabo zlata v medicini in farmaciji od starega Egipta do razsvetljenstva. Zlato namreč v preteklosti ni bilo le simbol bogastva in božanskosti, temveč tudi domnevna zdravilna učinkovina. Od najstarejših civilizacij se ljudje soočamo tudi z vprašanjem staranja. V enem izmed prispevkov lahko preberete, kako kozmetični izdelki in t. i. »pro-age« pristop prispevajo k upočasnitvi vidnih znakov staranja kože. Sledi prispevek o mehanizmi delovanja novih protituberkuloznih učinkovin, ki dopolnjujejo obstoječe terapije. Pojav odpornosti poudarja pomen kombiniranega zdravljenja in nadaljnega razvoja zdravil. V nadaljevanju so obravnavane učinkovine, ki s tarčami tvorijo kovalentne vezi, kar omogoča močnejše in dolgotrajnejše učinke, vendar njihova uporaba prinaša tudi določene izzive. V tokratni številki se boste seznanili še z mitohondrijsko transplantacijo, perspektivnim pristopom za zdravljenje mitohondrijsko pogojenih bolezni, pri katerem nefunkcionalne mitohondrije nadomestimo z zdravimi, kar zmanjša nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti. Sledi prispevek o limfoblastoidnih celičnih linijah, celičnih modelih, ki ohranijo ključne značilnosti donorja in omogočajo odkrivanje interindividualnih razlik v molekularnih mehanizmi bolezni ter odzivu na učinkovine v predkliničnih raziskavah. Sodoben pristop k diagnostiki in zdravljenju predstavljajo tudi nanotelesa, ki jih v primerjavi s konvencionalnimi protitelesi odlikujejo manjša molekulska masa, večja stabilnost, dobra topnost in enostavna priprava. Številko zaključuje klinični primer bolnika, ki je po zdravljenju z nirmatrelvirjem in ritonavirjem razvil fiksni medikamentozni eksantem.

Tokratno številko Farmacevtskega vestnika posvečamo zaslužnemu profesorju Univerze v Ljubljani dr. Alešu Krbavčiču, ki je v začetku letošnjega leta praznoval častitljiv življenjski jubilej, 90 let. Številni se ga spominjamo kot profesorja z enciklopedičnim poznavanjem materije medike in zgodovine farmacije, ki nas je spodbudil k študiju in kasnejšemu poklicnemu delu. Daljši pogovor z njim je na voljo na spletni strani Slovenskega farmacevtskega društva.

prof. dr. Aleš Obreza, gostujoči urednik
prof. dr. Mojca Kerec Kos, odgovorna urednica



VSEBINA / CONTENT

IZVIRNI ZNANSTVENI ČLANKI / ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES

- 3 Katja Majar, Marija Sollner Dolenc
Pojavnost benzodiazepinov v skupini novih psihoaktivnih snovi v Evropi med leti 2008 in 2024
The prevalence of benzodiazepines in the group of new psychoactive substances in Europe between 2008 and 2024

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI / REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 13 Aleš Obreza
Zgodovinski pregled uporabe zlata v farmaciji na ozemlju Evrope in Sredozemlja
A historical overview of the use of gold in pharmacy in Europe and the Mediterranean region
- 21 Mirjana Gašperlin
Zrcalce, zrcalce na steni povej...
Magic mirror on the wall...
- 30 Nina Gradišek, Stane Pajk, Martina Hrast Rambaher
Pregled zdravilnih učinkovin za zdravljenje tuberkuloze
Overview of active pharmaceutical ingredients for the treatment of tuberculosis
- 39 Nika Strašek Benedik, Vid Kavaš, Anže Meden
Kovalentna vezava pri zdravilnih učinkovinah – naj jo iščemo ali se ji izogibamo?
Covalent binding drugs – something to be sought or shunned?
- 46 Natalija Trunkelj, Lucija Peterlin Mašič
Mitohondrijska transplantacija: nova možnost terapije
Mitochondrial transplantation: a new therapeutic approach
- 54 Maša Kandušer, Tijana Markovič, Irena Mlinarič-Raščan
Limfoblastoidne celične linije kot model *in vitro* za predklinično vrednotenje zdravilnih učinkovin
Lymphoblastoid cell lines as an in vitro model for preclinical drug evaluation
- 63 Davor Babič, Vladka Čurin Šerbec, Ivana Jovčevska
Nanotelesa: alternativa klasičnim monoklonskim protitelesom
Nanobodies: an alternative to conventional monoclonal antibodies

KRATKI STROKOVNI ČLANKI – PRIMERI IZ KLINIČNE PRAKSE / SHORT PROFESSIONAL ARTICLES – CLINICAL CASES

- 74 Aleksander Stepanović
Primer bolnika s fiksno medikamentozno ekzantomom po zdravljenju z nirmatrelvirjem/ritonavirjem
A case report: fixed drug eruption after nirmatrelvir/ritonavir treatment

DRUŠTVENE VESTI

POJAVNOST BENZODIAZEPINOV V SKUPINI NOVIH PSIHOAKTIVNIH SNOVI V EVROPI MED LETI 2008 IN 2024

THE PREVALENCE OF BENZODIAZEPINES IN THE GROUP OF NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES IN EUROPE BETWEEN 2008 AND 2024

AVTORICI / AUTHORS:

Katja Majar, mag. lab. biomed.
prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: marija.sollner@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Nove psihoaktivne snovi so sintetične ali naravne snovi, ki posnemajo učinke prepovedanih drog, a zaradi hitro spreminjajoče se sestave ostajajo nenadzorovane. Mednje sodijo tudi benzodiazepini, pomembna skupina zdravil, ki se v obliki novih analogov pojavljajo kot nove psihoaktivne snovi. Članek prikazuje pojavnost, uporabo in zdravstvena tveganja benzodiazepinov kot psihoaktivne nove snovi v Evropi med 2008 in 2024 na podlagi Evropske zbirke podatkov o novih drogah. Identificiranih je bilo 38 novih benzodiazepinov, največ (24) med leti 2014 in 2018, nato je število upadlo. Največ prijav prihaja iz Švedske, sledijo Nemčija in druge skandinavske države. Slovenija je med vodilnimi: zaznani so bili trije novi benzodiazepini in skupaj 14 različnih (37 % vseh), od katerih jih je osem v skupini I prepovedanih snovi. Večina zasnov vključuje tablete in praške, pogosto v kombinacijah, kar povečuje tveganje smrti. Leta 2020 so bili prisotni v polovici smrtnih primerov zaradi drog v Sloveniji, delež pa upada. Zloraba njihovih analogov kot novih psihoaktivnih snovi povzroča resne posledice, zato je spremljanje nujno.

KLJUČNE BESEDE:

Agencija Evropske unije za droge, benzodiazepini, nove psihoaktivne snovi, zloraba

ABSTRACT

New psychoactive substances are synthetic or natural substances that mimic the effects of illicit drugs but remain uncontrolled due to rapidly changing composition. These include benzodiazepines, an important group of medicines that appear as new psychoactive substances in the form of new analogues. This article presents the prevalence, use, and health risks of benzodiazepines as new psychoactive substances in Europe between 2008 and 2024, based on the European Database on New Drugs. In total, 38 new benzodiazepines were identified, most (24) between 2014 and 2018, followed by a decline. Most reports originate from Sweden, followed by Germany and other Scandinavian countries. Slovenia is among the leading countries: three new benzodiazepines were detected and 14 different ones in total (37% of all), eight of which are



classified in Group I of prohibited substances. Most seizures involve tablets and powders, often in combinations, increasing the risk of death. In 2020, they were present in half of Slovenia's drug-related deaths, though the proportion is decreasing. Monitoring remains essential.

KEY WORDS:

abuse, benzodiazepines, European Union Drugs Agency, new psychoactive substances

1 UVOD

Benzodiazepini so razred sedativnih psihoaktivnih učinkovin, ki so bile vpeljene v terapijo anksioznih motenj kot anksiolitiki v šestdesetih letih prejšnjega stoletja (1). Kmalu so se njihova indikacijska področja razširila na terapijo nespečnosti (hipnotiki), antiepileptično zdravljenje (antikonvulzivi), mišično relaksacijo, predmedikacijo v anesteziji. Kljub temu se v zadnjem desetletju vse pogostejše pojavljajo kot »novi« oziroma »dizajnerski« benzodiazepini, ki sodijo med nove psihoaktivne snovi (NPS). Ti se na nezakonitem trgu distribuirajo brez regulatornega nadzora, pogosto v kombinaciji z drugimi psihoaktivnimi snovmi, kar bistveno povečuje tveganje za zlorabo, akutne zastrupitve in smrtnost (2). Pomemben javnozdravstveni problem je postala tudi zloraba benzodiazepinov na recept, saj statistični podatki kažejo porast primerov odvisnosti, zastrupitev in smrti, povezanih z njihovo nepravilno uporabo (3).

Novi benzodiazepini so sintetične spojine, strukturno sorodne klasičnim benzodiazepinom (npr. diazepam, alprazolam, lorazepam), vendar so se na trgu pojavile šele v zadnjih letih. Večina teh spojin izvira iz farmacevtskih raziskav, usmerjenih v razvoj analogov klasičnih benzodiazepinov z izboljšanim terapevtskim profilom, a so hitro našle pot na črni trg in v rekreativno uporabo (4). Zanje je značilno, da so sintezno pridobljeni, različni po kemijskih lastnostih, vsi pa obdržijo osnovno benzodiazepinsko strukturo in podobne farmakodinamične učinke. Strukturne modifikacije novih benzodiazepinov tako vključujejo dodajanje ali odstranjevanje substituentov na osnovnem benzodiazepinskem obroču za povečanje afinitete do receptorjev A za gama-aminomasleno kislino (receptorjev GABA_A) ali optimizacijo farmakokinetike, npr. hitrost nastopa učinka, trajanje delovanja (5).

Distribucija novih benzodiazepinov poteka predvsem iz kemijskih podjetij na Kitajskem, ki izdelke pošiljajo v obliki praškov po pošti ali kurirskih storitvah trgovcem in posameznikom v Evropi. Pošiljke so pogosto napačno deklarirane, podobno kot pri drugih NPS. Končni izdelki se pogosto naročajo tudi iz neregistriranih spletnih lekarn s sedežem v Indiji (3). Sprva so se te spojine oglaševale kot »raziskovalne kemikalije« (angl. *research chemicals*), danes pa se vse pogostejše uporabljajo tudi pri proizvodnji ponarejenih zdravil, zlasti tablet diazepam in alprazolama, ki se prodajajo na nezakonitem trgu. Ponarejeni izdelki so pogosto pakirani v pretisne omote, ki popolnoma posnemajo registrirana zdravila (6).

Zaradi lege na stičišču srednje, vzhodne in jugovzhodne Evrope Slovenija predstavlja pomembno tranzitno območje za nezakonite droge. Članstvo v schengenskem območju ter prometna povezanost med Jadranom, Alpami in Panonsko nižino omogočata hiter dostop do Italije, Avstrije, Nemčije in Madžarske. Luka Koper kot največje slovensko pristanišče deluje kot ključna vstopna točka za droge iz Južne Amerike, ki se nato prek cestnih in železniških koridorjev distribuirajo v Evropo. Nizka stopnja nadzora ter ugled varne države omogočata skladiščenje in organizacijo tihotapskih mrež (7). Slovenija leži tudi na križišču prometnih koridorjev V in X, kar jo uvršča med osrednja vozlišča severnega Jadrana ter srednje in vzhodne Evrope; te geografske značilnosti kriminalne združbe izkoriščajo za tihotapljenje (7).

V članku je prikazana pojavnost benzodiazepinov kot NPS v Evropi in Sloveniji med letoma 2008–2024 na podlagi podatkov Evropske zbirke podatkov o novih drogah (EDND II) in druge literature, s poudarkom na trendih in

KLJUČNI POUDARKI

- V Evropi je bilo med letoma 2011 in 2024 identificiranih 38 novih benzodiazepinov.
- Najpogostejše se novi benzodiazepini pojavljajo v obliki tablet in praškov, pogosto se kombinirajo z drugimi drogami, predvsem s kokainom.
- Slovenija izstopa po velikem številu zaznanih benzodiazepinov glede na velikost države, saj je bilo do leta 2024 identificiranih 14 različnih analogov; pri treh je bila Slovenija med prvimi državami, ki so jih prijavile.
- Leta 2020 so bili benzodiazepini prisotni v polovici smrtnih primerov zaradi drog v Sloveniji, nato pa delež upada, vendar ostajajo pomemben dejavnik smrtnosti.

število novo zaznanih benzodiazepinov v državah EU ter posebej v Sloveniji. Osredotočili smo se na njihovo prisotnost na trgu prepovedanih drog, število in oblikah zaseženih ali zbranih vzorcev novih benzodiazepinov ter možne posledice za javno zdravje.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 VIRI IN NABOR PODATKOV

Pri zbiranju podatkov smo uporabljali predvsem podatkovno bazo EDND II (8), ki deluje v okviru Agencije Evropske unije za droge (EUDA) in vključuje številne osnovne podatke in poročila o različnih NPS. V podatkovni bazi so zbrani podatki o benzodiazepinih od leta 2011 do danes in se aktualno posodablja, pri čemer na novo vključujejo novo odkrite benzodiazepine na področju članic EU. Na osnovni strani te baze smo pod zavihkom profili snovi (angl. *substance profiles*) filtrirali snovi na način, da smo dobili profile izključno NPS, ki so novi benzodiazepini. Nato smo dobljene rezultate razvrstili po datumu: od tistega, ki je bil najprej odkrit pa do najkasnejše odkritega novega benzodiazepina. Na omenjeni strani smo dobili tudi podatek o statusu spremljanja (angl. *monitoring status*) in farmakološki klasifikaciji (angl. *pharmacological classification*). V poglavju poročila o primerih (angl. *case reports*) smo pridobili potrebne podatke o poročanju agenciji EUDA, kot so: država in leto poročanja, tip vzorca, oblika snovi, kombinacije z drugimi psihoaktivnimi snovi (pri čemer smo analizirali podatke samo za benzodiazepine s statusom kontrolirane droge), institucija, ki je poročala v bazo EDND II (pri čemer smo v analizo vključili samo benzodiazepine, o katerih smo poročali v Sloveniji), datum zadnjega poročanja za posamezni benzodiazepin. Poleg podatkovne baze EDND II smo podatke pridobivali tudi iz drugih spletnih virov, pri čemer smo si pomagali s spletnim iskalnikom Google in GoogleScholar, kjer smo kot ključne besede uporabili »benzodiazepines«, »new benzodiazepines« ali ime analoga določenega benzodiazepina. Znanstvene članke in literaturo smo črpali predvsem iz podatkovnih baz, kot sta PubMed in National Library of Medicine ter iz drugih strokovnih in znanstvenih spletnih strani, pri čemer smo iskanje omejili na obdobje 2010–2025. Podatke o smrtnih primerih, povezanih z uporabo benzodiazepinov, smo pridobili s spletne strani EUDA, medtem ko smo informacije o letih vključitve

posameznih snovi na Seznam prepovedanih drog v Sloveniji poiskali v Uredbi o spremembah in dopolnitvah Uredbe o razvrstitvi prepovedanih drog, dostopni na uradnih spletnih straneh Vlade Republike Slovenije (9).

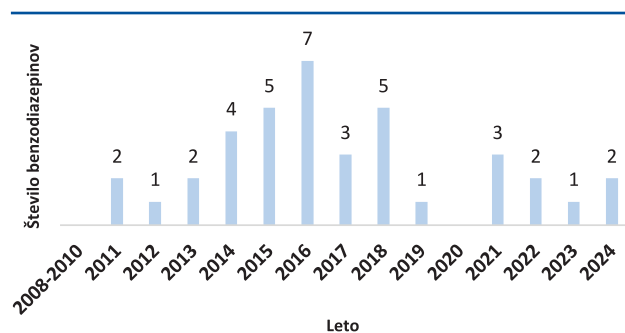
2.2 PRIKAZ IN VREDNOTENJE PODATKOV

Pridobljene podatke iz baze EDND II ter iz poročil o pojavnosti NPS v Sloveniji (10) in iz evropskih poročil EUDA (11) smo analizirali z uporabo metod opisne statistike, za kar smo uporabili programa Microsoft Word in Microsoft Excel, s pomočjo katerih smo oblikovali preglednice in grafe, ki ponazarjajo razširjenost benzodiazepinov v Evropi in Sloveniji v obdobju med letoma 2008 in 2024 in so del magistrske naloge K. Majar (12).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 POJAVNOST NOVIH BENZODIAZEPINOV V EVROPI

Med letoma 2011 in 2024 je bilo v Evropski sistem zgodnjega opozarjanja prijavljenih 38 različnih novih benzodiazepinov (slika 1). Največ novih prijav je bilo med 2015 in 2018, vrh je bil leta 2016 s sedmimi na novo identificiranimi snovmi. Leta 2020 ni bilo prijavljenih novih benzodiazepinov, kar je verjetno povezano s pandemijo covid-19, ko so bili regulacijski oz.

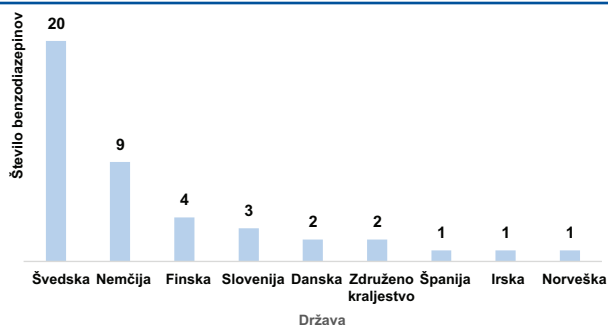


Slika 1: Število na novo odkritih benzodiazepinov med leti 2008 in 2024 na področju Evropske unije (8).

Figure 1: Number of newly identified benzodiazepines between 2008 and 2024 in the European Union (8).

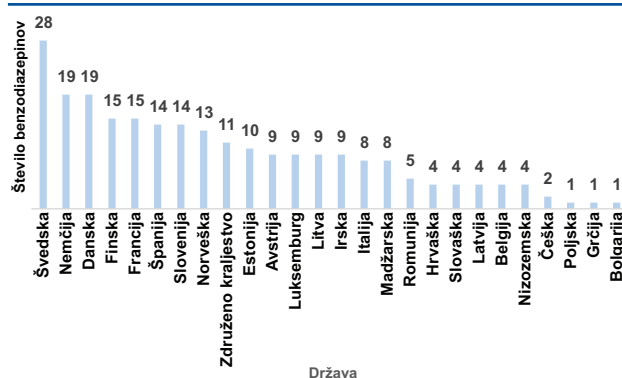


nadzorni postopki okrnjeni. Leta 2021 se ponovno pojavijo, vendar v precej manjšem obsegu kot pred pandemijo. Med letoma 2008 in 2010 v podatkovni bazi EDND II ni bilo prijav novih benzodiazepinov, kar pa ne pomeni, da se kot NPS niso pojavljali. Kasnejša zaznavnost je lahko posledica spremenjene regulacije in nadzora nad njimi. Fenazepam je bil na evropskem trgu zaznan že leta 2007 in se sprva zaradi pomanjkljive regulacije prodajal kot »legalna droga« prek spleta. Med letoma 2008 in 2011 so ga nekatere države, npr. Švedska, Finska, Norveška, začele nacionalno regulirati. Od leta 2011 je Evropski center za spremljanje drog in odvisnosti od drog (EMCDDA) zaznal tudi druge podobne snovi, kot je etizolam, kar je povečalo pozornost EU do celotne skupine novih benzodiazepinov. Fenazepam, ki je bil leta 1975 v Rusiji razvit kot zdravilo, se še danes v nekaterih državah nekdanje Sovjetske zveze trži kot zdravilo (3, 11, 13). Švedska je država z največ prijavljenimi novimi benzodiazepini v Evropi med leti 2008 in 2024 – kar 20. Sledijo Nemčija (9), Finska (4) in Slovenija (3). Iz slike 2 je razvidno, da so se nekateri novi benzodiazepini prvič pojavili še na Danskem, v Združenem kraljestvu, Španiji, Irski in Norveški, a v precej manjšem obsegu. Veliko število prijav na Švedskem je verjetno posledica učinkovitega nadzornega sistema za spremljanje NPS ter hitrega poročanja EUDA. Vzrok za strogo zakonodajo je lahko nizka toleranca do nelegalnih snovi, kar vodi do več zaznav. V Sloveniji so se med 2008 in 2024 prvič pojavili trije novi benzodiazepini, kar je glede na velikost države oz. število prebivalcev visoka številka. Število držav, kjer so prvič zabeležili uporabo, je večje od števila novo odkritih snovi, saj se zasegi iste snovi pogosto zgodijo v več državah hkrati ali v kratkem razmiku, zato EUDA težko določi prvo državo. V analizo so vključene vse države, navedene kot prve prijaviteljice.



Slika 2: Število prvič prijavljenih novih benzodiazepinov v različnih državah med leti 2008 in 2024 (8).

Figure 2: Number of first-time registrations of new benzodiazepines in different countries between 2008 and 2024 (8).



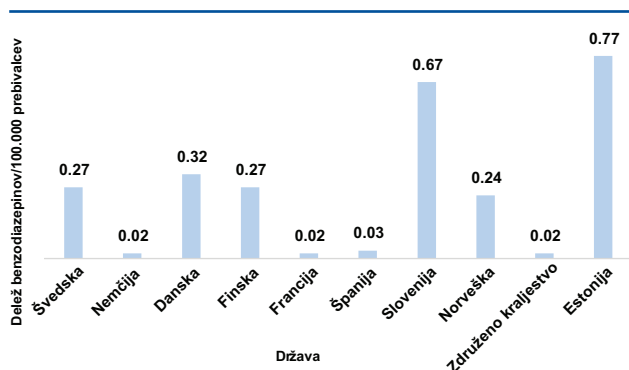
Slika 3: Število prijavljenih različnih novih benzodiazepinov po državah (8).

Figure 3: Number of different new benzodiazepines reported by country (8).

Največ novih benzodiazepinov je bilo prijavljenih med letoma 2010 in 2024 na Švedskem – 28. Nemčija in Danska imata po 19 prijav, Finska in Francija 15, Španija in Slovenija 14, Norveška 13, Združeno kraljestvo 11, Estonija 10, Avstrija, Luksemburg, Litva in Irska po 9, Italija in Madžarska 8, manj pa Romunija, Hrvaška, Slovaška, Latvija, Belgija in Nizozemska. Pojavili so se tudi na Češkem, Poljskem, v Grčiji in Bolgariji (slika 3). Podatki ne odražajo le uporabe, temveč tudi razlike v zaznavanju in poročanju, ki so posledica različnih forenzičnih pristopov, infrastrukture za spremljanje NPS ter zakonodajnih prioritiet v različnih državah (11). Dejanska prisotnost snovi je lahko višja, saj nekatere države zaradi omejenih zmogljivosti ne zaznajo vseh primerov. Zato visoko število na Švedskem ne pomeni nujno večje uporabe, temveč učinkovitejši nadzorni sistem. V Sloveniji smo zabeležili 14 primerov, kar je glede na majhno število prebivalcev visoka vrednost. Primerjava novih benzodiazepinov med državami glede na število prebivalstva (število prijav novih benzodiazepinov na 100.000 prebivalcev) je prikazana na sliki 4. Iz nje lahko sklepamo, da je število prijavljenih novih benzodiazepinov v Sloveniji zaskrbljujoče, saj je med vodilnimi državami po prijavah NPS. Čeprav absolutno število v Estoniji ni večje kot v Sloveniji, relativna primerjava kaže, da je Estonija na vrhu lestvice. Na sliki 4 so vključene le države z najmanj 10 prijavljenimi novimi benzodiazepini.

3.2 PREGLED PRIJAV UPORABE NOVIH BENZODIAZEPINOV V OBDOBJU 2008–2024 V EVROPI

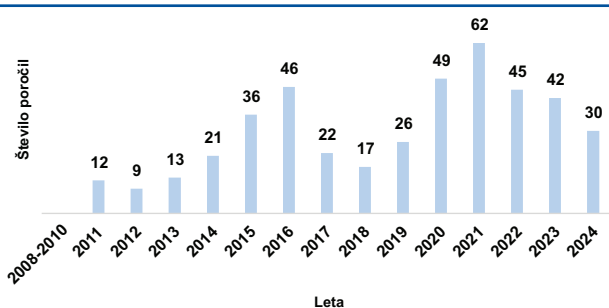
Slika 5 prikazuje dinamiko števila poročil, posredovanih sistemu EDND II med letoma 2008 in 2024 o uporabi novih



Slika 4: Pogostost prijavljenih benzodiazepinov na 100.000 prebivalcev v različnih državah (8).

Figure 4: Frequency of reported benzodiazepines per 100,000 inhabitants in different countries (8).

benzodiazepinov. Do leta 2011 v Evropi ni bilo prijav benzodiazepinskih NPS. Čeprav se je fenazepam pojavil že leta 2007 (o njegovem pojavu je prva poročala Finska), je bila uradna identifikacija zabeležena šele leta 2011, ko je bilo prijavljenih še enajst drugih analogov. Leta 2012 je število prijav uporabe upadlo na devet, nato pa je sledilo postopno naraščanje, ki je doseglo prvi vrh leta 2016 s 46 evidentiranimi primeri. V obdobju 2017–2019 je bil zaznan zmeren upad, a se je s pričetkom pandemije covida-19 leta 2020 trend znova obrnil navzgor. Čeprav leta 2020 ni bil identificiran noben nov predstavnik skupine novih benzodiazepinov, je leto 2021 rekordno z 62 prijavi oz. poročili o uporabi novih benzodiazepinov, kar potrjuje učinkovitost nadzora nad NPS tudi v kriznih razmerah. Po letu 2021 je število prijav ponovno upadalo, tako da je EUDA leta 2024 zabeležila 30 prijav. V celotnem obdobju je bilo v državah članicah EU evidentiranih 430 poročil o uporabi



Slika 5: Število poročil o odkritju novih benzodiazepinov med letoma 2008 in 2024 v Evropi (8).

Figure 5: Number of reports on the detection of new benzodiazepines between 2008 and 2024 in Europe (8).

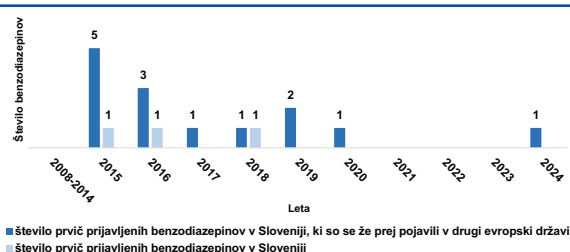
novih benzodiazepinov, kar kaže na potrebo po stalnem regulatornem spremljanju.

Podatkovna baza EDND II zajema tri tipe vzorcev, ki so ključni za spremljanje širjenja prepovedanih substanc v evropskih regijah: zaseženi, zbrani ali biološki. Zaseženi vzorci izvirajo iz policijskih ali carinskih postopkov. Zbrani vzorci so pridobljeni prostovoljno, najdeni v okolju ali posredovani s strani zdravstvenih ustanov. Biološki vzorci, pod katere sodijo npr. urin, kri, slina, se zbirajo od posameznikov, pri katerih obstaja sum uživanja drog ali predoziranja. Vrsta vzorca je odvisna od vrste droge, časovnega okna zaznavanja in razpoložljivosti vzorca (6, 14).

Med letoma 2008–2024 je zabeleženih 433 primerov različnih tipov vzorcev, kar je nekoliko več od skupnega števila poročil, saj se lahko pojavi več oblik vzorcev novih benzodiazepinov v enem poročilu. Najmanj je bioloških vzorcev (17), sledijo zbrani (104), največ pa je zaseženih (312). Najvišje skupno število je bilo leta 2021, ko je EU zabeležila največ poročil (62): 43 zaseženih, 14 zbranih in 5 bioloških vzorcev. Analiza potrjuje prevlado zaseženih vzorcev na ravni EU, kar kaže na visoko stopnjo nadzora in učinkovitost ukrepov za prepoznavanje nezakonitih snovi.

3.3 POJAVNOST NOVIH BENZODIAZEPINOV V SLOVENIJI

V obdobju 2008–2014 v Sloveniji ni bilo evidentiranih primerov nelegalne uporabe benzodiazepinov, kar nakazuje na njihovo omejeno rabo izključno v terapevtske namene ali na odsotnost sistematičnega spremljanja teh substanc v kontekstu prepovedanih drog. Posledično jih podatkovna baza EDND II v tem obdobju še ni zajemala. Analiza trendov (slika 6) kaže, da se je porast nelegalne uporabe začel šele leta 2015, ko je bilo zabeleženih pet prijav, med njimi



Slika 6: Število prvič prijavljenih benzodiazepinov v Sloveniji in število prijavljenih benzodiazepinov, ki so bili že prej zaznani v drugi evropski državi (8, 10).

Figure 6: Number of first reports of benzodiazepines in Slovenia and number of reports of benzodiazepines that had already been detected in another European country (8, 10).



prva zaznava novega benzodiazepinskega analoga v EU. Nadaljnje prve prijave novih analogov v Sloveniji so sledile v letih 2016 in 2018, kar potrjuje pojav farmakoloških derivatov, ki do tedaj v evropskem prostoru niso bili identificirani. V naslednjih letih je število prijav upadalo, vendar občasna zaznava potrjuje trajno prisotnost tveganja, kar utemeljuje potrebo po kontinuiranem regulatornem nadzoru in epidemiološkem spremljanju.

Med letoma 2021–2023 novih analogov benzodiazepinov ni bilo prijavljenih, kar lahko odraža spremembe v metodologiji monitoringa ali poročanja. Pandemija covid-19 je povečala psihosocialni stres, kar bi teoretično lahko povzročilo večjo incidenco uporabe benzodiazepinov, saj delujejo kot sedativi in se uporabljajo pri zdravljenju anksioznih motenj ter depresije. Verjetno je bila v tem obdobju dostopnost zdravil na recept večja, kar je zmanjšalo potrebo po nelegalni sintezi, a bolj verjeten dejavnik je okrnjen nadzor zaradi zmanjšanega terenskega dela in laboratorijskih analiz, kar je vplivalo na zaznavo. Ponovna prijava leta 2024 potrjuje, da benzodiazepini ostajajo prisotni na slovenskem trgu prepovedanih drog.

Komunikacija med forenzičnimi službami v Sloveniji in evropskim sistemom za spremljanje drog poteka prek nacionalne kontaktne točke Reitox, ki deluje v okviru Informacijske enote za prepovedane droge na Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) (15). Prvi prijavljen benzodiazepinski analog v Sloveniji je bil adinazolam leta 2015, sledila sta

4-klorodiazepam (2016) in flualprazolam (2018). Vsi vzorci so bili v obliki prahu (dva rumena, eden bel) ter zbrani za analizo, ne nujno zaseženi v policijskih ali carinskih postopkih. Podatkovna baza EDND II ob prvi pojavitvi snovi v Sloveniji navaja tudi druge države, kar otežuje določitev dejanske prve zaznave. Zaradi ozkega časovnega okna se pogosto pojavi več prijav iste spojine v različnih državah na isti dan. Tako je bil adinazolam leta 2015 prijavljen v Nemčiji, na Švedskem in v Sloveniji, flualprazolam pa leta 2018 poleg Slovenije tudi na Švedskem. Glede na geografsko lego Slovenije je verjetno, da so bile snovi v tranzitu, namenjene uporabi v drugih državah.

V Sloveniji se je od leta 2008 do 2024 pojavilo kar 14 različnih analogov benzodiazepinov (preglednica I). Večina teh je bila v Evropi odkritih po letu 2013, razen flubromazepam, etizolam in diklazepam. Prve države, kjer so se pojavili benzodiazepini, so bile Švedska, Nemčija in Združeno kraljestvo, vendar to še ne pomeni, da so ti analogi nujno prišli v Slovenijo iz teh držav. To le kaže, da so bile te države med prvimi, ki so zaznale prisotnost teh snovi, medtem ko so poti distribucije in pojavnosti v Sloveniji lahko drugačne. Vse te snovi imajo v okviru evropske baze EDND II status spremljanja, kar pomeni, da se njihova prisotnost in uporaba beležita ter dokumentirata, vendar brez aktivnega nadzora, intervencije ali dodatnega ukrepanja s strani pristojnih organov (8). Razlika s statusom intenzivnega spremljanja je v tem, da nadzor teh snovi zahteva

Preglednica I: Analogi benzodiazepinov, ki so se pojavili v Sloveniji med leti 2008 in 2024, in njihovo prvo poročanje (8, 10).

Table I: Benzodiazepine analogues that appeared in Slovenia between 2008 and 2024 and their first reporting (8, 10).

Leto prve uradne pojavitve v Sloveniji	Država in uradno leto prvega poročanja	Ime benzodiazepina
2015	Nemčija (2013)	flubromazepam
2015	Švedska (2014)	flubromazolam
2015	Švedska (2015)	klonazolam
2015	Švedska (2015)	nifoksipam
2015	Nemčija, Švedska, Slovenija (2015)	adinazolam
2016	Švedska (2014)	meklonazepam
2016	Nemčija (2015)	metizolam
2016	Slovenija (2016)	4-klorodiazepam
2017	Združeno kraljestvo (2011)	etizolam
2018	Švedska (2016)	bromazolam
2019	Nemčija (2013)	diklazepam
2019	Švedska, Slovenija (2018)	flualprazolam
2020	Švedska (2017)	norfludiazepam
2024	Nemčija (2016)	flunitrazolam

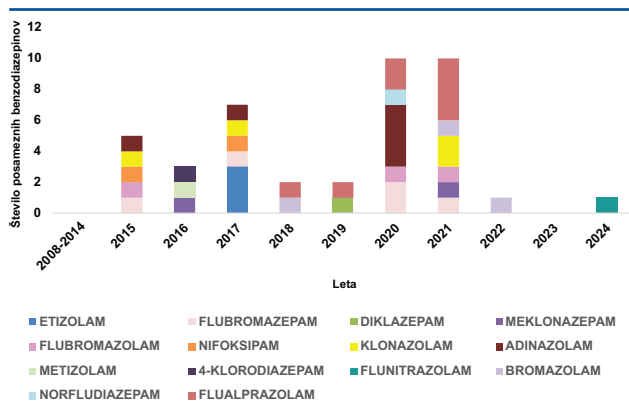
manj pozornosti in ukrepov, ki bi bili potrebni za varovanje javnega zdravja (8).

3.3.1 Pregled prijav uporabe novih benzodiazepinov v obdobju 2008–2024 v Sloveniji

Med letoma 2008–2024 je bilo v Sloveniji evidentiranih 41 prijav benzodiazepinskih analogov. Najpogostejši je bil flualprazolam (8 prijav), sledila sta adinazolam (6 prijav) in flubromazepam (5 prijav). V manjšem obsegu so bili zaznani tudi: etizolam, diklazepam, meklonazepam, flubromazolam, nifoksipam, klonazolam, metizolam, 4-klorodiazepam, flunitrazolam, bromazolam in norfludiazepam.

Analiza časovne distribucije (slika 7) kaže, da med letoma 2008–2014 prijav ni bilo, kar sovпада z zamikom širše evropske pojavnosti benzodiazepinov kot novih psihoaktivnih snovi (NPS). Ker so glavni distributerji locirani izven Slovenije, je verjetno, da je snov potrebovala čas, da se je uveljavila na lokalnem trgu. V Sloveniji prevladujejo predvsem zbrani vzorci, večinoma pridobljeni prek organizacij Stigma in DrogArt. Analize teh vzorcev so pogosto pokazale prisotnost novih benzodiazepinov, kar je zahtevalo nujno prijavo v sistem EDND II.

Flualprazolam se je prvič pojavil leta 2018 (vzorec 1 g rumenega prahu, zbran v Nacionalnem forenzičnem laboratoriju (NFL)), nato leta 2019 (1 prijava), 2020 (2 prijavi) in dosegel vrh leta 2021 (4 prijave), kar predstavlja polovico vseh primerov od 2008 dalje. V kasnejših letih se flualprazolam ter ostala dva najpogostejša analoga niso več pojavili. Adinazolam je bil prijavljen leta 2015 in 2017 ter štirikrat leta 2020. Flubromazepam se je pojavil leta 2015 in 2017,



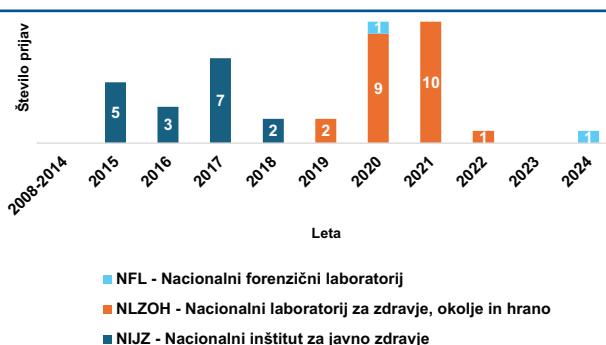
Slika 7: Število prijav novih benzodiazepinov v Sloveniji od leta 2008 do 2024 (8, 10).

Figure 7: Number of reports of new benzodiazepines in Slovenia from 2008 to 2024 (8, 10).

nato dvakrat leta 2020 ter enkrat leta 2021. Ti podatki potrjujejo epidemiološki trend, ki nakazuje kratkotrajno intenzivno pojavnost posameznih analogov, kar zahteva stalno farmakološko in regulatorno spremljanje. Leta 2020 in 2021 smo zabeležili največje število prijav, kar pa nismo pričakovali, saj slika 6 prikazuje, da v tem obdobju v Sloveniji ni bilo zaznanih novih analogov benzodiazepinov.

Ti podatki kljub prisotnosti pandemije covid-19 potrjujejo, da je nadzor nad NPS v teh letih potekal aktivno in učinkovito. V primerih flualprazolama in adinazolama je bila Slovenija prva država v EU, ki je poročala o pojavu teh benzodiazepinov, kot je bilo že omenjeno. Od leta 2021 sta se v Sloveniji pojavila le dva različna analoga benzodiazepinov: bromazolam (leta 2022) in flunitrazolam (leta 2024), pri čemer je slednji bil zasežen s strani Slovenske policije v obliki 11 tablet. Leta 2023 v Sloveniji nismo zabeležili nobene prijave benzodiazepinov. V Sloveniji ima vsaka institucija svojo specifično vlogo pri spremljanju NPS in s tem tudi novih benzodiazepinov. NIJZ se osredotoča predvsem na zabeležene zastrupitve, NFL na zasege, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) pa na spremljanje prisotnosti in razširjenosti novih benzodiazepinov na trgu.

Iz slike 8 je razvidno, da so do leta 2019 večino poročil o pojavu novih benzodiazepinov v okviru Evropskega sistema za zgodnje obveščanje prispevali na NIJZ, po tem letu pa je to vlogo v večji meri prevzel Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano. Nacionalni forenzični laboratorij je o pojavu novih benzodiazepinov Agenciji Evropske unije za droge poročal leta 2020 (enkrat) in 2024 (enkrat), kar nakazuje na to, da je v teh primerih šlo najverjetneje za za-



Slika 8: Poročevalci prijav uporabe novih psihoaktivnih snovi Evropskemu sistemu za zgodnje obveščanje od leta 2008 do 2024 v Sloveniji (8, 10).

Figure 8: Reporters of new psychoactive substances use to the European Early Warning System from 2008 to 2024 in Slovenia (8, 10).

seg. Skupaj ti podatki poudarjajo vloge posameznih institucij pri spremljanju benzodiazepinov kot NPS.

3.4 OBLIKE ZASEŽENIH ALI ZBRANIH VZORCEV

Podatkovna baza EDND II omogoča tudi vpogled v obliko vzorca, ki je bodisi zasežen ali zbran (slika 9). Med zbranimi in zaseženimi vzorci so prevladovale tablete (65 %) različnih velikosti, oblik in barv, nekoliko manj pogosto so bili prisotni v obliki praškov (19 %). Redkeje so se pojavljale tudi druge oblike, kot so impregniran papir (6 %), tekočine (2 %), rastlinski material (1 %) in kapsule (1 %). V primeru benzodiazepinov je bilo največ tako zaseženih kot tudi zbranih vzorcev v obliki tablet. Te so bile različnih barv (npr. modra, bela), velikosti in oblik. Pogosto so se vzorci pojavljali v obliki praškov, ki so se prav tako razlikovali po barvi – od bele in rumene do modre ter rožnate. Skupno je bilo zabeleženih tudi 22 zaseženih vzorcev v obliki impregniranega papirja, pri čemer gre za papir, ki je prepojen s psihoaktivno snovjo. Vzorcev v obliki tekočine ali rastlinskega materiala ni bilo med zbranimi, temveč le med zaseženimi. Skupno število vseh oblik vzorcev presega število poročil, saj je bil v nekaterih primerih posamezen vzorec prisoten v več oblikah hkrati.

Prevlado tablet kot najpogostejše oblike vzorca lahko pripišemo njihovi enostavni in stroškovno ugodni proizvodnji, ki omogoča izdelavo velikih količin. Zaradi stabilne oblike imajo daljši rok uporabe ter so lažje za shranjevanje in distribucijo. Oblika tablete ima tudi psihološki učinek, saj njen videz deluje kot pravo zdravilo, kar povečuje privlačnost med uporabniki. Nelegalni proizvajalci pogosto pos-

nemajo videz znanih zdravil ter prilagajajo barvo, obliko in oznake na tabletah (3, 6, 11).

3.5 POJAVNOST KOMBINACIJ NOVIH BENZODIAZEPINOV Z DRUGIMI PSIHOAKTIVNIMI SNOVI

V večini primerov smo v bazi EDND II med zaseženimi in zbranimi vzorci, ki so poleg novega benzodiazepina vsebovali še neko drugo psihoaktivno snov, zasledili kombinacijo benzodiazepinov in kokaina. Kokain je stimulativna droga, ki jo uporabnik zaužije v kombinaciji z benzodiazepini z namenom ublažitve pomirjevalnih učinkov benzodiazepinov, kar osebi omogoči, da ostane dlje časa budna in ima več energije. Kombinacija stimulansov in zaviralcev centralno-živčnega sistema je zelo nevarna, saj lahko vpliva na nevrokemično ravnoesje v možganih, kar povzroči številne akutne in kronične posledice. Stimulansi, kot je kokain, lahko prekrijejo učinke zaviralcev centralno-živčnega sistema, kot so benzodiazepini, kar zmanjša subjektivno zaznavanje njihove sedacije. Posledično lahko posameznik nenamerno zaužije višji odmerek zaviralca centralno-živčnega sistema, kar bistveno poveča tveganje za predoziranje in z njim povezane življenjsko ogrožajoče zaplete (16). Veliko pregledanih primerov zaseženih in zbranih vzorcev novih benzodiazepinov v bazi EDND II in podatkov o zastrupitvah z novimi benzodiazepini v raziskovalnih člankih kaže, da se novi benzodiazepini nahajajo predvsem v kombinaciji z drugimi psihoaktivnimi snovmi, zlasti s kokainom, 3,4-metilendioksimetamfetaminom (MDMA), metamfetaminom, marihuano, ketaminom in alkoholom (16–19).

3.6 SMRTNI PRIMERI, POVEZANI Z UPORABO NOVIH BENZODIAZEPINOV

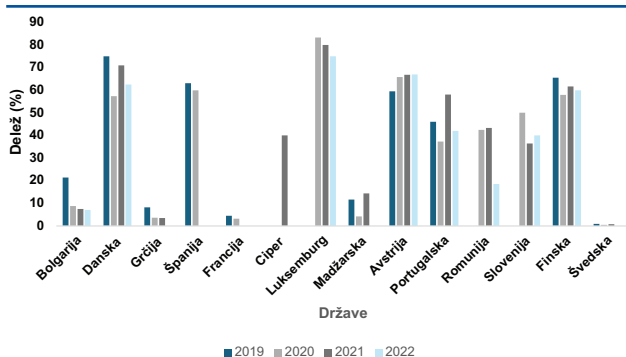
Znaki predoziranja z benzodiazepini vključujejo zmedenost, nejasen govor, upočasnjeno gibanje, težave pri hoji, nenormalne gibe oči, depresijo dihanja, hladno kožo in modrikast odtenek ustnic, težave pri ohranjanju budnosti ter izgubo zavesti. V hujših primerih lahko pride do kome ali smrti, še posebej pri kombinacijah z drugimi zaviralci centralno-živčnega sistema, kot so že omenjeni alkohol ali opiodi, ki še dodatno povečajo tveganje za smrtni izid (17).

Na sliki 10 so zbrani podatki o deležu smrti zaradi drog, pri katerih so bili prisotni benzodiazepini, med leti 2019 in 2022 v izbranih evropskih državah. V nekaterih državah je delež smrti, pri katerih so bili prisotni benzodiazepini, zelo visok in kaže na stalno prisotnost le-teh v smrtnih primerih,



Slika 9: Število različnih oblik zbranih in zaseženih vzorcev med leti 2008 in 2024 (8).

Figure 9: Number of different types of samples collected and seized between 2008 and 2024 (8).



Slika 10: Delež smrti zaradi drog, pri katerih so bili prisotni benzodiazepini, med leti 2019 in 2022 v izbranih evropskih državah (8).
Figure 10: Proportion of drug-related deaths involving benzodiazepines between 2019 and 2022 in selected European countries (8).

povezanih z drogami. Z najvišjimi deleži v vseh štirih letih izstopajo Danska, Avstrija in Finska. Na Danskem je bil delež najvišji leta 2019, ko je bil delež smrti zaradi drog, povezanih z benzodiazepini, večji kot polovica vseh smrti zaradi drog, in sicer kar 75 %. Nato je leta 2020 nekoliko upadel, leta 2021 pa znova narasel na 71 %. Avstrija in Finska kažeta stabilno visok delež, ki je v obeh primerih skozi vsa štiri opazovana leta večji od 50 % smrti. Luksemburg izstopa z nenadnim skokom iz 0 % v letu 2019 na 83,3 % v letu 2020, kar kaže na močno spremembo bodisi v vzorcih uporabe, bodisi v metodologiji zbiranja podatkov. Podoben vzorec je zaznati tudi pri Cipru, ki je imel v prvih dveh opazovanih letih 0%, nato pa leta 2021 40% delež smrti. Grčija, Francija, Švedska in Madžarska poročajo o precej nižjih deležih, čeprav ima Madžarska v letu 2021 porast na 14,3 % po upadu v letu 2020. Slovenija ima podatke le za leta 2020, 2021 in 2022 z opaznim padcem s 50 % na 36,5 %, kar lahko kaže na rahlo zniževanje v deležu uporabe novih benzodiazepinov. Nekatere države, kot sta Španija in Romunija, nimata podatkov za vsa štiri leta, a kljub temu kažejo visoke vrednosti (18).

Ti podatki dodatno potrjujejo, da se benzodiazepini pogosto uporabljajo v kombinaciji z drugimi psihoaktivnimi snovmi, kar bistveno poveča verjetnost smrtnega izida v primerjavi z uporabo benzodiazepinov kot edine substance. Takšni vzorci uporabe predstavljajo dodatne izzive tako pri preprečevanju kot tudi pri obravnavi posledic zlorabe drog. Zaradi tega narašča potreba po poglobljenem razumevanju, kako spremembe v vzorcih sočasne uporabe več substanc vplivajo na umrljivost, zlasti ob upoštevanju vse večje prisotnosti nevarnih kombinacij, kot so benzodiazepini z opiodi ali drugimi zaviralci centralno-živčnega sistema (11, 19).

Kljub pomanjkanju podatkov ostaja ocenjevanje smrti, povezanih z uporabo drog, ključen kazalnik za razumevanje škodljivih posledic uporabe.

3.7 UVRSTITEV NOVIH BENZODIAZEPINOV NA SEZNAM PREPOVEDANIH DROG V SLOVENIJI

Prepovedane droge so v Sloveniji razvrščene v tri skupine glede na stopnjo tveganja za zdravje, možnost zlorabe in medicinsko uporabnost. V Skupino I spadajo snovi brez priznane medicinske uporabe, z visokim potencialom za zlorabo in posledično najvišjo stopnjo nadzora. Skupina II vključuje snovi z omejeno medicinsko uporabo in visokim tveganjem za zlorabo, a manjšo stopnjo nadzora, v Skupino III pa spadajo snovi z nižjim tveganjem, a so kljub temu predmet nadzora (20). Čeprav je Uredba o razvrstitvi prepovedanih drog v Sloveniji stopila v veljavo že leta 2000, so se benzodiazepini na seznamu začeli pojavljati šele več let kasneje. Prvi izmed njih, flualprazolam, je bil v Skupino I uvrščen šele leta 2020, in je bil tisto leto tudi edini benzodiazepin na tem seznamu. V letu 2021 so sledili trije dodatni benzodiazepini – flubromazolam, diklazepam in klonazolam, kar odraža naraščajočo prisotnost in zlorabo teh snovi na slovenskem trgu. Med zadnjimi dodanimi snovmi na seznamu leta 2023 so adinazolam, bromazolam in flunitrazolam ter v letu 2025 desalkilgidazepam, kar potrjuje nadaljevanje trenda pojavljanja benzodiazepinov kot NPS v Sloveniji. Tako je v Sloveniji na Seznam prepovedanih drog v Skupino I uvrščenih 8 od 14 različnih novih benzodiazepinov, ki so se do sedaj pojavili v državi (21). Ti se tudi najpogosteje pojavljajo v skupini novih benzodiazepinov na trgu in zaradi svojih učinkov ter potentnosti predstavljajo največje tveganje za uporabnike.

4 SKLEP

Zaradi svoje visoke jakosti pri nizkih odmerkih, ki povzročajo močno sedacijo, predstavljajo benzodiazepini iz skupine NPS resno tveganje za javno zdravje. Med neželenimi učinki so izguba koordinacije, zaspanost, omotica, zamegljen vid, nejasen govor, depresija dihanja in v nekaterih primerih tudi smrt. Benzodiazepini s statusom kontrolirane droge se pogosto kombinirajo z drugimi drogami, predvsem ko-



kainom, MDMA, metamfetaminom, marihuano, ketaminom in alkoholom, kar še poveča tveganje in pogosto vodi v smrtne izide. Zato je zelo pomembno, da se pojavnost in razširjenost teh snovi dosledno spremljata na evropskem trgu, tako z vidika toksikološkega nadzora kot tudi zakonodajnih ukrepov. Pravočasno zaznavanje novih spojin omogoča ustrezno obveščanje strokovne in splošne javnosti, razvoj analitskih metod za njihovo identifikacijo ter sprejetje potrebnih ukrepov za zmanjšanje tveganj povezanih z njihovo uporabo.

5 LITERATURA

1. Wick J Y. The history of benzodiazepines. *Consult Pharm.* 2013, 28:538-548; <https://doi.org/10.4140/TCPn.2013.538>
2. Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2020, 10:2045125320967197; <https://doi.org/10.1177/2045125320967197>
3. New benzodiazepines in Europe – a review, *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, 2021; https://www.euda.europa.eu/publications/rapid-communications/new-benzodiazepines-europe-review_en (dostop 10.11.2025)
4. Sanabria E, Cuenca RE, Esteso MÁ, Maldonado M. Benzodiazepines: Their Use either as Essential Medicines or as Toxics Substances. *Toxics.* 2021, 9(2):25; <https://doi.org/10.3390/toxics9020025>
5. Battle S, Lizano E, Viñas M, Dolores Pujol M: 1,4-Benzodiazepines and New Derived: Description, Analysis, and Organic Synthesis v Medicinal chemistry, Eds Janka Vašková and Ladislav Vaško; *IntechOpen*, 2018; <https://doi.org/10.5772/intechopen.79879>
6. New psychoactive substances: global markets, global threats and the COVID-19 pandemic, *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, 2021; https://www.euda.europa.eu/publications/rapid-communication/new-psychoactive-substances-global-markets-glocal-threats-and-covid-19-pandemic_en (dostop 10.11.2025)
7. Slovenija je križišče kriminala med Balkanom in srednjo Evropo. *Observatorij za sivo ekonomijo v jugovzhodni Evropi. Bilten o tveganjih* #13, 2022 Dostopno na: <https://riskbulletins.globalinitiative.net/see-obs-013/05-slovenia-crossroads-for-criminality-balkans-and-central-europe.html?> (dostop 10.11.2025)
8. *Evropska podatkovna baza o novih drogah (EDND II)*; <https://ednd2.emcdda.europa.eu/ednd/login> (dostop 10.11.2025)
9. *Uredba o spremembah in dopolnitvah Uredbe o razvrstitvi prepovedanih drog*, dostopni na uradnih spletnih straneh Vlade Republike Slovenije; <https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=URED7970> (dostop 10. 11. 2025)
10. *Nacionalna poročila o stanju na področju prepovedanih drog v Republiki Sloveniji*; <https://nijz.si/zivljenjski-slog/prepovedane-droge/prepovedane-droge-slovenija/> (dostop 10. 11. 2025)
11. *European Drug Report*; https://www.euda.europa.eu/publications-seriestype/european-drug-report_en (dostop 10. 11. 2025)
12. K. Majar. *Analiza pojavnosti benzodiazepinov v skupini novih psihoaktivnih snovi med leti 2008 in 2024 v Evropi*, magistrska naloga, Fakultata za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2025
13. Schmitz A. Benzodiazepine use, misuse, and abuse: A review. *Ment Health Clin.* 2016, 6(3): 120–126; doi: 10.9740/mhc.2016.05.120
14. *Forensic Drugs Analyses - European project RESPONSE*. Dostopno na: <https://www.policija.si/eng/about-the-police/organization/general-police-directorate/national-forensic-laboratory/project-response> (dostop 10.11.2025)
15. *Slovenian national focal point*. https://www.euda.europa.eu/about/partners/reitox/slovenia_en?utm_ (dostop 15.11.2025)
16. Manjon-Prado, H.; Serrano Santos, E.; Osuna, E. Patterns of Polydrug Use in Patients Presenting at the Emergency Department with Acute Intoxication. *Toxics.* 2025, 13, 380; <https://doi.org/10.3390/toxics13050380>
17. Day C. Benzodiazepines in Combination with Opioid Pain Relievers or Alcohol: Greater Risk of More Serious ED Visit Outcomes. In: *The CBHSQ Report*. Rockville (MD): Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US); 2013; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK384672/>
18. *Drug-induced deaths – the current situation in Europe (European Drug Report 2024)*. *European drug agency*, 2024; https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024/drug-induced-deaths_en (dostop 10.11.2025)
19. Vadieli N, Bhattacharjee S. Concurrent Opioid and Benzodiazepine Utilization Patterns and Predictors Among Community-Dwelling Adults in the United States. *Psychiatric Services* 2020; 71:1011–1019; <https://doi.org/10.1176/appi.ps.201900446>
20. *Prepovedane droge*, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke; <https://www.jazmp.si/humana-zdravila/prepovedane-droge/> (dostop 12.11.2025)
21. *Seznam skupin prepovedanih drog*; <https://pisrs.si/api/datoteke/integracije/403462486> (dostop 12.11.2025)

ZGODOVINSKI PREGLED UPORABE ZLATA V FARMACIJI NA OZEMLJU EVROPE IN SREDOZEMLJA

A HISTORICAL OVERVIEW OF THE USE OF GOLD IN PHARMACY IN EUROPE AND THE MEDITERRANEAN REGION

AVTOR / AUTHOR:

prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

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



POVZETEK

Zlato je imelo v preteklosti edinstveno vlogo, ne le kot simbol bogastva in božanskosti, temveč tudi kot domnevna zdravilna učinkovina. Razširjenost zdravil na osnovi zlata skozi tisočletja odraža kombinacijo empiričnega opazovanja, filozofskih in verskih razmišljanj ter nespremenljivosti, nepokvarljivosti in popolnosti, ki jih je zlato simboliziralo. Pred letom 1800 so zdravniki in alkimisti v različnih kulturah dojemali zlato kot panacejo v oblikah od eliksirjev dolgoživosti do zdravil za zdravljenje najrazličnejših bolezni. Ta pregledni članek sledi zgodovini medicinske uporabe zlata od starega Egipta, grško-rimskega sveta, preko srednjeveške in renesančne alkimije do obdobja razsvetljenstva.

KLJUČNE BESEDE:

alkimija, Paracelsus, pitno zlato, zgodovina farmacije

ABSTRACT

Gold has held a unique role in the past not only as a symbol of wealth and divinity but also as a purported active ingredient. The prevalence of gold-based remedies over the millennia reflects a combination of empirical observation, philosophical and religious considerations, the immutability, incorruptibility and perfection that gold symbolized. Before 1800 CE, physicians and alchemists in various cultures regarded gold as panacea in forms from elixirs of longevity to medicines for different diseases. This review paper follows the medicinal applications of gold from ancient Egypt, the Greco-Roman world through the alchemy of Middle Ages and Renaissance to the Age of Enlightenment.

KEY WORDS:

alchemy, history of pharmacy, Paracelsus, potable gold

1 UVOD

Obiskovalci nekdanjega samostana pavlincev v Olimju, ki ga danes upravljajo redovniki minoriti, lahko v prostoru, ki je služil za zdravljenje bolnih bratov, infirmariju, občudujejo freske Antona Jožefa Lerchingerja (1720–1787). Za far-



macevte je posebej pomembna upodobitev mlajšega moškega (slika 1), ki v desnici drži stekleničko z rumeno vsebino in signaturo z alkimističnim simbolom za sonce in zlato ter latinsko besedo *potabile*. Napis se torej glasi *aurum potabile*, oziroma prevedeno v slovenščino, pitno zlato (1). Pod njim je napis Theophrastus, kar bi nakazovalo na helenističnega očeta botanike in mineralogije, Aristotelovega učenca Teofrasta iz Ereza (4.–3. stoletje pr. Kr.), ki je v svojem delu *Περὶ λίθων* (*Peri lithon*, O kamninah) opisal tudi zlato. Ker slika sledi upodobitvam preostalih petih oseb, Asklepiju, Hipokratu, Dioskoridu, Galenu in Aviceni, ki so razporejene kronološko, bi Teofrasta pričakovali med Hipokratom in Dioskoridom. Zato lahko sklepamo, da na sliki ni upodobljen Teofrast, ampak zdravnik in lekarnar Paracelsus (*Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim*; 1493–1541).

Izbor upodobljenega zdravila potrjuje pomen, ki ga je imelo zlato do 19. stoletja ne le kot simbol sonca, svetlobe, ki daje življenje, bogastva, božanskosti, nespremenljivosti, nepokvarljivosti in popolnosti, temveč tudi na področju lekarništva. Kot zdravilno učinkovino so ga alkimisti in lekarnarji vključevali v napoje dolgoživosti, za pomlajevanje in



Slika 1: Lerchingerjeva freska Paracelsusa v samostanu Olimje (foto: Lovro Dermota).

Figure 1: Lerchinger's fresco of Paracelsus from Olimje monastery (photo: Lovro Dermota).

KLJUČNI POUDARKI

- Zlato je imelo tisočletja status zdravilne snovi, povezane z božanskostjo, popolnostjo in dolgoživostjo.
- Medicinska uporaba zlata je bila dolgo prežeta s filozofijo, religijo in alkimijo, saj so kulture verjele, da zlato uravnava telesne tekočine, očiščuje „življenjsko silo“ in deluje kot panaceja.
- Preboj je prineslo odkritje zlatotopke (*aqua regia*), ki je omogočilo pripravo t. i. „pitnega zlata“ (*aurum potabile*), eliksirjev in tinktur, ki so jih alkimisti – zlasti Paracelsus – razglašali za univerzalno zdravilo.

panacejo, univerzalno zdravilo za zdravljenje vseh bolezni. Pri tem so se srečali s težavo, kako ga spremeniti v (farmaceutsko) obliko, ki bi jo ljudje lahko zaužili (2).

Namen preglednega članka je predstaviti kratko zgodovino uporabe zlata pri izdelavi zdravil od najstarejših časov do začetka 19. stoletja na ozemlju Evrope in Sredozemlja. Posebej bomo obravnavali pitno zlato in zlato življenja, *aurum vitae*. Pri tem se moramo zavedati, da zlato ni bilo pomembno zgolj v Evropi, ampak je imelo poseben status v skoraj vseh nekdanjih civilizacijah, zlasti v Indiji in na Kitajskem, kjer je bilo sestavina eliksirjev za podaljšanje življenja in panaceja. Chang Yin-Chu je v 8. stoletju zapisal, da zlato, ko je segreto, ne počí ali se zmehta, ko je zakopano, ne rjavi, ko je postavljeno v ogenj, ne gori. Po zaužitju zlata se koža ne bo nagubala, lasje ne bodo postali beli in človek ne bo prizadet zaradi staranja ali moten zaradi duhov (3).

2 OBDOBJE DO VISOKEGA SREDNJEGA VEKA

Najzgodnejše ohranjene omembe medicinske uporabe zlata najdemo v besedilih starega Egipta, ki so nastajala od sredine 2. tisočletja pr. Kr., med katerimi je najpomembnejši *papyrus Ebers*. Zlato je bilo, navadno v obliki tankih lističev, pogosta sestavina različnih zdravil, njegova vloga pa je bila podobno kot kasneje pri Grkih in Rimljanih bolj religiozna ali filozofska kot farmakološka. Zlato so povezovali s sončnimi božanstvi, npr. Rajem in Atonom, zato so ga interpretirali kot simbol božanske popolnosti. Egiptovski zdravniki, pogosto tudi duhovniki, so verjeli, da lahko uživanje ali nanašanje zlata na površino kože očisti telo in ži-

vljenjsko silo, duha, ki so ga imenovali Ka. Tudi uprašeno zlato so vključevali v zdravila, kozmetične izdelke in obredne pijače, za katere so verjeli, da ohranjajo mladost (4).

Zanimivo je, da je zdravljenje z zlatom (avroterapija oziroma hrizoterapija, iz lat. *aurum* in gr. χρυσός (*hrisós*), zlato) v grško-rimskih virih antičnega obdobja relativno redko omenjeno. Pomembnejšo vlogo ima pri že omenjenem Teofrastu, ki je zlato opisal kot kovino, ki jo je mogoče zmleti v fin prah in zmešati z medom ali vinom za zdravljenje raznih kožnih bolezni. V platonski in aristotelški filozofiji je zlato veljalo za najpopolnejšo snov, ki predstavlja ravnovesje in harmonijo. Ta metafizična povezava je okrepila terapevtski sloves zlata, zato so ga priporočali za zdravljenje »melanholijske« (depresije), kar odraža prepričanje, da lahko njegov sijaj poživi dušo. Vključitev zlata v mazila in balzame je temeljila na prepričanju, da lahko iz organizma izvele nečistoče, hkrati pa skladno s humoralno teorijo ponovno vzpostavi ravnovesje štirih telesnih tekočin. V primeru »melanholijske« gre torej za presežek črnega žolča (gr. μέλας (*mélas*), črn + χολή (*holé*), žolč) (5). Zlata žica in lističi so se uporabljali v stomatologiji za niti in zobne zalivke, cenjeni so bili zaradi svoje prožnosti in odpornosti proti koroziji. Zanimivo je, da zlato nima posebne monografije v Dioskoridovem delu *De Materia Medica* (*O zdravilnih snoveh*), kljub večkratni omembi njegovih lastnosti pri rastlinah z rumenimi cvetovi in mineralih rumene barve (6). Drugače je pri Pliniju Starejšem (23–79), ki v monumentalnem delu *Naturalis Historia* (*Naravoslovje*) poda obsežen komentar o zlatu, ki mu je namenjen velik del 33. knjige. V 25. poglavju navaja zdravila, ki vsebujejo zlato. Prevod poglavja navajam v celoti, ker lepo predstavi antično vedenje o medicini, ki se pogosto prepleta z magično-religioznimi idejami tedanjega časa. Ohranjeno je Plinijevo poimenovanje snovi, v oklepajih pa so moji komentarji (7):

„Zlato je učinkovito zdravilo na več načinov, saj se uporablja pri poškodovancih in dojenčkih, da se morebitni uroki, usmerjeni proti njim, oslabijo. Vendar pa je zlato samo po sebi škodljivo, če se ga nosi nad glavo (se ga položi na osebo ali žival), še posebej pri piščancih in jagnjetih (Običaj izhaja iz prepričanja, da lahko zaščitimo ljudi in tudi živali z amuleti ali ploščicami iz zlata, ki se jih položi nanje ali drži nad njimi, navadno v kombinaciji z zaščitnimi izreki). Pravilno zdravilo v takem primeru je, da zlato speremo in z vodo nato poškopimo osebe ali živali, ki jih želimo zaščititi. Zlato se stali z zmesjo dvakratne mase soli in trikratne mase minerala *misy* (železov(III) sulfat ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)); nato se ponovno stali z dvema deloma soli in enim delom kamna, imenovane *schistos* (železov(III) oksid (Fe_2O_3)). Na ta način se odstrani naravno trpkost snovi, ki se z njim žgejo v lončku, hkrati pa ostane čisto in nepokvarjeno. Ostanek tvori pepel,

ki se shrani v lončeni posodi in se z vodo nanese za zdravljenje lišajev na obrazu. Ta pepel ima tudi sposobnost zdravljenja fistul in hemoroidov, z dodatkom zmletga plovca je tudi zdravilo za gnojne razjede in rane, ki oddajajo neprijeten vonj. Zlato, kuhano v medu z *melanthium* (verjetno črna kumina, *Nigella sativa*) in naneseno kot liniment na popek, deluje na črevesje kot blago odvajalo. M. Varro (*Marcus Terentius Varro*; 116–27 pr. Kr.) zagotavlja, da je zlato zdravilo za bradavice.“

Opazimo lahko, da so bili postopki za izdelavo zdravil z zlatom zapleteni, saj v antiki še niso poznali načina, kako bi ga raztopili, kar bi teoretično omogočilo lažjo aplikacijo. Tudi ko so ga segreli z različnimi snovmi, je ostalo nespremenjeno. Prav fizikalno-kemijske lastnosti, zaradi katerih je bilo zlato posebno, so torej oteževale njegovo medicinsko uporabo.

3 OBDOBJE ALKIMIJE IN PITNEGA ZLATA

Stanje se ni bistveno spremenilo niti v islamskem svetu v besedilih Al-Kindija (9. stoletje), Avicene (980–1037) in Averroesa (1126–1198), ki so prav tako uporabljali stranske produkte čiščenja zlata, z zlatimi lističi pa so oblagali farmacevtske oblike, da bi s tem prikrili neprijeten okus zdravila, verjeli pa so tudi, da na ta način povečajo učinkovitost zdravljenja. Največji napredek poleg prenosa antičnega znanja v srednjeveško Evropo je bilo odkritje zlatotopke, ki se pripisuje alkimistu Geberju (morda 9. ali 10. stoletje). V ohranjenem rokopisu iz 14. stoletja sta opisana postopka za pripravo koncentriranih klorovodikove in dušikove kisline. Njuna zmes v razmerju 3:1 se je imenovala kraljevska voda, *aqua regia*. S pomočjo zlatotopke so želeli odkriti skrivnosti v *najimennitnejši zemeljski snovi* (zlatu) in morda iz nje izluščili eliksir, ki bi lahko katero koli kovino spremenil v zlato ali pa bi ostarelemu moškemu povrnil izgubljeno mladost (8).

Z Geberjem se lahko vrnemo v Evropo visokega srednjega veka, ko je alkimija dosegla največji razcvet. Alkimisti so iskali povezave z antičnim obdobjem, zlasti preko legendarnega Hermesa Trismegista, helenistične kombinacije bogov Tota in Hermesa, po drugi strani pa so iskali povezave z Biblijo, kjer so številnim osebnostim pripisali dela, ki jih povezujejo z alkimijo (9). Mojzes je bil omenjen največkrat, najpomembnejša pa je zgodba o zlatem teletu, ki se zaključuje z besedami: „Ko se je približal taboru in zagledal tele in kólo, se je v Mojzesu vnela jeza: vrgel je plošči iz rok in ju razbil pod goro. Zgrabil je tele, ki so ga naredili, in ga

sežgal v ognju. Potem ga je zmlel v prah, ga stresel v vodo in to dal piti Izraelovim sinovom (10).” Alkimisti so sklepali, da je Mojzes na nek način pripravil zlato v obliki, ki je bila primerna za pitje, vse do 20. stoletja pa so kemiki skušali ugotoviti, kako je to naredil (11). Najpogostejša razlaga so bile različne zlitine, zgodbo pa si lahko preprosteje razložimo s tem, da so zlate plošče zgolj obdajale leseno ogrodje in jih je Mojzes pred sežigom odstranil.

Drugo pomembno odkritje, ki se pogosto pozablja, a je za razvoj alkimije in priprave zdravil prav tako zelo pomembno, je destilacija alkohola/etanola. Znanje o tem je iz severne Afrike prišlo v južno Italijo že v 12. stoletju, stoletje kasneje pa se je koncentrirani etanol pod imenom *aqua ardens*, žgoča voda, že predpisoval za zdravljenje različnih bolezni (12). Za dezinfekcijo ga je priporočal tudi teolog, zdravnik in lekarnar Arnaldus de Villanova (1235/1240–1311), ki ga je inkvizicija preganjala zaradi njegovih teoloških in magijskih spisov in je hkrati verjetno avtor prvega ohranjenega opisa pitnega zlata (13). Predpis za njegovo pripravo je zelo enostaven in nakazuje, da verjetno ni poznal zlatotopke. Zlato ploščo je segrel v ognju in jo nato ohladil v posodi z vinom. Postopek je trikrat do štirikrat ponovil. Pripravek seveda ni vseboval zlata, zapisal pa je, da izboljšuje vid, očisti srce in dušo ter predstavlja vodnjak življenja. Podobno kot drugi alkimisti tega obdobja je tudi Arnald planete povezoval s kovinami, lastnostmi in deli telesa (14). Saturn (♄) je po naravi hladen in suh, ustreza svincu in vlada želodcu. Jupiter (♃) vlada jetrom, je topel in vlažen, povezuje se s kositrom. Mars (♂) je vroč in suh, ustreza železu in ledvicam. Tudi Sonce (☉ ali ☼) je vroče in suho, vlada srcu in ustreza zlatu, Luna (☾ ali ☾) je hladna in vlažna, ustreza možganom in srebru. Ostaneta še Venera (♀), vroča in vlažna, ki jo predstavljajo moda in baker, Merkur (☿), hladen in vlažen, pa se povezuje z živim srebrom in sečnim mehurjem (2).

Ohranilo se je še več preprostih receptov iz istega obdobja, pri katerih se zlato kemijsko ne spremeni. Kuhali so ga z medom in ga nato destilirali, ali pa so lističe zlata namakali v limoninem soku, destilirali in nato mešali s kretskim vinom in jabolčnim sokom. Pogosto so zlato dajali v obliki drobnih zlatih lističev, suspendiranih v vinu, *Spiritusu* (etanolu) in sadnem ali rastlinskem soku. Pri Arnaldovem sodobniku, najbolj znanem angleškem alkimistu Rogerju Baconu (1220–1292) zasledimo pripravo pitnega zlata z zlatotopko. Zanimiv ni samo opis postopka, ampak tudi njegovo natančno opazovanje eksperimenta. Zapisal je, da se med namakanjem in rahlim segrevanjem zlata v kraljevski vodi pogosto spremeni barva. Pri reakciji, Bacon uporabi izraz gnitje, postane raztopina rdeča, pogosto je tudi citronske barve (12). Danes vemo, da lahko med raztapljanjem zlata

v zlatotopki nastanejo rdeče obarvani zlatov(III) klorid (Au_2Cl_6), zlatov(I) klorid (AuCl) je rumen, tetraklorozlatova(III) kislina (HAuCl_4) pa ima lahko različne odtenke od rubinsko rdeče do zlato rumene barve.

To zdravilo za lajšanje bolezni in podaljševanje življenja so si lahko privoščili le bogati uporabniki. Italijanski filozof in duhovnik Marsilio Ficino (1433–1499) ga je priporočil ogrskemu kralju Matiji Korvinu (1443–1490), da bi mu podaljšal življenje. Naveden je tudi režim jemanja zdravila, en do dva požirka na dan pred obroki, štiri dni (15). Že v tem obdobju so se pojavljali kritiki uporabe pitnega zlata, na primer sienski metalurg Vannoccio Biringuccio (1475/1480–1535/1539), ki je zapisal, da zlato ogreje srce tistih, ki imajo polne mošnjičke in skrinje, alkimisti, ki so tako slavili svoje pitno zlato, pa so vsi umrli in nihče si niti enkrat ni uspel povrniti mladosti, kaj šele dvakrat ali trikrat (16).

4 PARACELSUS IN NJEGOVI NASLEDNIKI

Paracelsusa zelo pogosto omenjamo kot začetnika sodobne medicine in farmacije, saj je s svojimi, za tisti čas večinoma zelo naprednimi idejami, močno prispeval k razvoju obeh ved v pozni renesansi in obdobju razsvetljenstva (17). Manj je znano, da se je ukvarjal tudi z alkimijo, med drugim je opisal pripravo in uporabo pitnega zlata. Uživanje zlata je priporočal za zdravljenje različnih bolezni, kot so protin, revma, za krepitev kosti in srca, pri težavah z želodcem, pomanjkanju ali presežku želodčne kisline, pri vnetjih in različnih infekcijah (18). Po teoriji *arcana* (duha, imenovanega tudi peti element, *quinta essentia*, ki je poleg štirih elementov: zemlje, zraka, ognja in vode v snovi in določa njene lastnosti) je razlikoval različne stopnje čistosti pripravka. Najčistejša oblika je bila najbolj dodelana in po njegovem mnenju tudi najučinkovitejša. Pri zlatu je bila najpreprostejša oblika pitno zlato, *aurum potabile*, imenovana tudi tinktura zlata, *tinctura aurii*, ali zlato življenja, *aurum vitae*, za katero je bila značilna intenzivna rumena barva in jo je bilo mogoče jemati peroralno. Druga stopnja, intenzivno rdeče obarvana, se je imenovala olje zlata, *oleum aurii*, pridobljena s koncentriranjem tinkture zlata in se je nanašala lokalno po kapljicah. Rubinasto rdeča esenca zlata, *quinta essentia aurii*, je bila najvišja stopnja, ki jo je zlato lahko doseglo. Paracelsus jo je imel za neposrednega predhodnika kamna modrosti, *lapis philosophi-*

horum, kjer naj bi bila esenca zlata v visoki koncentraciji ločena od same kovine (19).

V naslednjih stoletjih so številni zdravniki in lekarnarji sledili Paracelsusu tudi v njegovem razumevanju in pripravi pitnega zlata. Zaradi omejitev prispevka bom navedel le nekaj primerov. Za bralce bo morda zanimivo prebiranje dela o pitnem zlatu, posvečenega angleški kraljici Elizabeti I. v angleškem jeziku tistega časa, ki je dostopno na spletu (20). Londonski zdravnik Francis Anthony je večkrat prišel v spor s Kraljevim kolegijem zdravnikov (*Royal College of Physicians*) zaradi zdravljenja brez licence in prodaje zdravil, ki niso bila odobrena, med njimi pitnega zlata. Na zagovoru se je pokazalo, da nima skoraj nič medicinskega znanja, imel pa je številne podpornike na visokih položajih, med njimi visokega komornika sir Johna Spencerja, ki so njegove zvarke, zlasti pitno zlato, zelo hvalili. Zbrana pričevanja predstavljajo znaten del njegove apologije iz leta 1616 (21), v kateri opisuje in zagovarja pitno zlato kot univerzalno zdravilo za vse bolezni. Ozdravil naj bi dvajset ali več ljudi, ki so trpeli za različnimi boleznimi. Poleg pitnega zlata jim je dal še emetike in odvajala, zaradi katerih naj bi se njihovo stanje izboljšalo, ali pa so povsem ozdraveli. Med zaslišanjem je priznal, da nima dovoljenja in pooblastila za opravljanje zdravniškega dela, vendar so njegovi zagovorniki dosigli, da so ga po kratki zaporni kazni oprostili (22).

Znanemu angleškemu zdravniku in botaniku Nicholasu Culpeperju (1610–1654) se je pogosto pripisovalo avtorstvo knjige o uporabi pitnega zlata, izdane leta 1656, v kateri avtor povezuje pripravek z dušo zlata, *anima aurii*. Avtor opisuje zlato kot koristno pri vsaki bolezni, ki jo povzroči zmanjšanje vitalnih ali živalskih duhov v srcu. Mednje so spadale melanholija, omedlevica, vročina, epilepsija in povišana telesna temperatura. Nenavadno je, da Culpeper v nobenem drugem delu ni omenil predpisov za pripravo pitnega zlata, zato se v zadnjih dveh desetletjih domneva, da on ni avtor omenjenega dela (23).

Recept za *aurum vitae* je objavil tudi nürnberški alkimist in astrolog Johann Hiskias Cardilucius (1630–1697). Zlato je pustil v »zadostni« količini zlatotopke in ga zmešal z deževnico. Po njegovem mnenju je bilo nastalo zdravilo koristno pri neozdravljivih boleznih. Recept iz leta 1684 opisuje pripravo *aurum vitae*: »Naberite cvetove šmarnice (*Convallaria majalis*), shranite jih v steklenici, dodajte močno vino, zlatenec (*Erysimum cheiri*), navadni rožmarin (*Rosmarinus officinalis*), žajbelj (*Salvia officinalis*) in navadno sivko (*Lavandula officinalis*). Postavite v senco in vsak dan mešajte. Tri dni pred destilacijo dodajte mleti cimet (*Cinnamomum sp.*), muškatni orešček (*Myristica fragrans semen*), cvetove kamilice (*Matricariae chamomillae flos*) in

3 zlatnike, nato destilirajte.« Zelo podoben je tudi zapis postopka Bartholomeusa Kretschmarja (17. stoletje), ki je pripravek oglaševal kot panacejo, učinkovito zdravilo proti sifilisu, vodenici, norosti, epilepsiji, malariji, zlatenici, gobavosti, raku (razjedam), kožnim izpuščajem, fistulam in cistam. Menil je, da tudi štiti uporabnika pred zastrupitvami, magijo in kugo (24).

Leta 1676 je nemški kemik Johann Kunckel von Löwenstern (1630–1703), eden izmed možnih odkriteljev elementarnega fosforja, objavil knjigo (25), v kateri je celo poglavje posvečeno pitnemu zlatu. Poudarja, da je izraz zavajajoč, ker kovinskega zlata ni mogoče raztopiti, razen če ga obdelamo s kislinami in teh pripravkov ni mogoče uporabljati kot pitna zdravila. Ker pa je ugotovil, da pripravki pitnega zlata, ki so jih izdelali drugi, dejansko vsebujejo kovinsko zlato »v nevtralni, bistri, rahlo rožnati raztopini«, je sklepal, da mora biti zlato prisotno v takšni stopnji zdrobitve, da ni vidno človeškemu očesu (26).

V besedilih 16. do 18. stoletja je pogosto omenjeno fulminantno (bliskajoče, eksplozivno) zlato, *aurum fulminatum*, ki je zaradi svojih lastnosti pritegnilo alkimiste, pa tudi znane kemike, kot so Scheele (1742–1786), Lavoisier (1743–1794) in Berzelius (1779–1848). Slednji se je zaradi eksplozije med pripravo 9 g produkta močno poškodoval. Po njihovem mnenju je bila priprava fulminantnega zlata tesno povezana s procesi izdelave hlapnega, *Aurum volatile*, in pitnega zlata, potrebnih za pridobitev kamna modrosti in priprave zdravil za zdravljenje vseh bolezni. V ta namen so zlato najprej raztopili v zlatotopki, kjer so poleg dušikove(V) kisline, *aqua fortis*, uporabili klorovodikovo kislino in salmiak (amonijev klorid). Sledili so postopki obarjanja, destilacije (pri destilaciji nastanejo rdeče vijolični hlapi Au_2Cl_6) in sušenja. Nastal je produkt, ki strukturno ne ustreza zlatovemu(I) fulminatu ($\text{Au}^+ \text{O}^- \text{N}^+ \equiv \text{C}^-$), strukturnemu izomeru zlatovega(I) cianata ($\text{Au}^+ \text{O}^- \text{C} \equiv \text{N}$). Dobljeni produkt je amorfen, polimerni kondenzacijski produkt zlatovih(III) amonijevih soli, ki vsebujejo $[\text{Au}(\text{NH}_3)_4]^{3+}$ in različno število Cl^- , OH^- in O_2^- kot protiionov (27).

5 KONEC UPORABE PITNEGA ZLATA

Uporaba zlata v medicinske namene se je v 18., zlasti pa v 19. stoletju močno zmanjšala. Nizozemski zdravnik in botanik Hermann Boerhaave (1668–1738) je o njem zapisal (28): »Zlato je v svetu dobro znano, a v medicini se

le malo uporablja, razen za bahaštvo. Zlati lističi naj bi nekoč imeli koristne učinke, vendar na želodec ne delujejo (zlato se ne raztaplja). Prašek, imenovan *Pulvis fulminans*, je le kemijska zanimivost. Tudi pripravek, imenovan pitno zlato, živo zlato ali tinktura zlata se le površno imenuje zdravilo. Sedanja medicinska praksa modro zavrača oboje." Čedalje pogostejše so se pojavljali satirični zapisi o zaslužkarstvu in šarlatanstvu, da zlato pomaga le pri srbečih prstih. S pripravi zlata se je zgodilo podobno kot stoletje kasneje z arzenovimi spojinami, počasi so se nehali uporabljati, tako da jih v farmakopejah 19. stoletja ne zasledimo več. Vseeno so se še pojavili posamezni primeri, ko se je za krajši čas nakazala vrnitev zlata na pota stare slave. Zlasti spojine Au(III) imajo zaradi adstringentnega delovanja izražen protimikrobni učinek, zato so se nekoč uporabljale za zdravljenje sifilisa in tuberkuloze. Slednje je na začetku priporočal tudi nemški mikrobiolog Robert Koch (1843–1910), vendar je opazil resne neželene učinke, do katerih pride pri uporabi soli in koordinacijskih spojin zlata, med katerimi so najpomembnejši nefrotoksičnost, spremembe v krvni sliki, eritrodermija (29). V preteklosti teh primerov niso pogosto beležili, znan pa je primer Diane de Poitiers (1500–1566), dvorjanke, svetovalke in kasneje ljubice francoskega kralja Henrika II. (1519–1559). Čeprav je bila skoraj dvajset let starejša od kralja, je po opisih imela lepo, porcelanasto obarvano kožo. Njena skrivnost je bil zlati eliksir, ki ga je pila večkrat na dan, da bi ohranila mladost. Po analizi njenih las pred dvajsetimi leti so ugotovili, da je v vzorcu precej povišana količina zlata. Ali je dvorjanka umrla zaradi zastrupitve z zlatom, pa je nemoogoče ugotoviti (30).

6 SKLEP

Zlato je kot najdragocenejša, popolna in nespremenljiva kovina, simbol sonca in raznih božanstev, imelo edinstven položaj na stičišču medicine, alkimije, filozofije in lekarništva. Statusu panaceje se je približalo po odkritju zlato-topke, kar je omogočilo pripravo pitnega zlata, za katerega so zlasti od Paracelsusa dalje iskali ali si izmišljali primerne indikacije za njegovo uporabo. Kljub kasnejšemu zatonu pa zgodovina uporabe zlata pred letom 1800 ostaja dokaz prepletanja znanosti, simbolike in iskanja večnega zdravja ter življenja. Edino področje, kjer danes še srečamo učinkovine zlata je terapija revmatoidnega

artritisa, vendar tudi v tem primeru kompleksi zlata niso učinkovine prve izbire.

7 LITERATURA

1. Minařík F. Freske v nekdanji samostanski lekarni v Olimju (1780). v: Predin Š. Minaříkova zbrana dela I. Maribor, Mariborske lekarnice. 2000; 443–453.
2. Higby GJ. Gold in Medicine. A review of its use in the west before 1900. *Gold Bull.* 1982;15(4):130–140.
3. Huaizhi Z, Yuantao N. China's ancient gold drugs. *Gold Bull.* 2001;34(1):24–29.
4. Todd TW. Egyptian medicine: A critical study of recent claims. *Am Anthropol.* 1921;23(4):460–470.
5. Edelstein L. Greek medicine in its relation to religion and magic. *Bull Inst Hist Med.* 1937;5(3):201–246.
6. Obreza A. Na kratko o mineralih v Dioskoridovem delu *Materia medica*. *Farm Vestn.* 2019;70(2):93–97.
7. Plinius Secundus G. *Naturalis Historia*. XXXIII;25.
8. Newman W. New light on the identity of "Geber". *Sudhoffs Arch.* 1985;69(1):76–90.
9. Clericuzio A. The white beard of chemistry». *Alchemy, paracelsianism and the "Prisca sapientia"*. *Bruniana Campanelliana.* 2008;14(1):107–116.
10. 2 Mz 32, 19–20. Dostop npr. preko strani: <https://www.biblija.net/biblija.cgi?l=sl>
11. Patai R. Biblical Figures as Alchemists. *Hebrew Union Coll Ann.* 1983;54:195–229.
12. Stillman JM. *The Story of Alchemy and Early Chemistry*. New York, Dover publications. 1960; 266.
13. McVaugh MR. Quantified Medical Theory and Practice at Fourteenth-Century Montpellier. *Bull Hist Med.* 1969;43:397–413.
14. Diepgen P. Studien zu Arnald von Villanova. III. Arnald und die Alchemie. *Arch Gesch Med* 1910;3(6):369–396.
15. Forshaw PJ. Marsilio Ficino and the chemical art. v: Clucas S, Forshaw PJ, Rees V. *Laus Platonici Philosophi: Marsilio Ficino and his influence*. Brill, Leiden. 2011;249–271.
16. Zietz RJ. "The pirotechnia" of Vannoccio Biringuccio. *J Chem Educ.* 1952;29(10):507–510.
17. Stillman JM. Paracelsus as a reformer in medicine. *Monist.* 1919;526–546.
18. Papanikolaou E. Theophrastus Paracelsus von Hohenheim: His corpuscular theory and the spread of paracelsianism. *Athens J Hist.* 2022;8(1):59–80.
19. Multhauf R. Medical chemistry and the Paracelsians. *Bull Hist. Med.* 1954;28(2):101–126.
20. Ripley G. *The compovnd of alchymy. or The ancient hidden art of archemie: conteining the right & perfectest meanes to make the philosophers stone, Aurum potable, with other excellent Experiments. Diuided into twelue gates*. London, Thomas Orwin. 1591; 104 str.
21. Anthony F. *The apologie, or defence of a verity heretofore published concerning a medicine called Aurum potable, that is, the pure substance of gold, prepared, and made potable and medicinable without corrosives, helpfully given for the health of man in most diseases*. John Legatt, London. 1616:146 str.

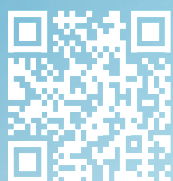
22. Dawbarn F. Patronage and power: The College of physicians and the Jacobean court. *Brit J Hist Sci.* 1998;31(1):1–19.
23. Poynter FNL. Nicholas Culpeper and his books. *J Hist Med All Sci.* 1962;17(1):152–167.
24. Rubbiani R, Wahrig B. Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe. *J Biol Inorg Chem.* 2014;19:961–965.
25. Kunckel, J. *Nützliche Observationes Oder Anmerckungen, Von den Fixen und flüchtigen Saltzen, Auro und Argento potabili, Spiritu Mundi und dergleichen: wie auch von den Farben und Geruch der Metallen, Mineralien und andern Erdgewächsen.* Schultze, Hamburg. 1676:102 str.
26. Hauser EA. Aurum potabile. *J Chem Educ* 1952;29:456–458.
27. Wentrup C. Fulminating Gold and Silver. *Angew Chem Int Ed.* 2019;58:14800 – 14808.
28. Guerrini A. Herman Boerhaave (1668-1738): Calvinist chemist and physician. *Bull Hist Med.* 2003;77(4):949–950.
29. Benedek TG. The history of gold therapy for tuberculosis. *J Hist Med All Sci.* 2004;59(1):50–89.
30. Charlier P, Poupon J, Huynh-Charlier I, Saliège J, Favier D, Keyser C, et al. Fatal alchemy. *Brit Med J.* 2009;339(7735):1402–1403.

Opomba: Za dela, objavljena pred letom 1900, predlagam iskanje po naslovu dela v zbirki Google učenjak, kar hkrati omogoča dostop do besedil.



Prevzemite nadzor nad svojim *zdravjem*

www.resnicaodebelosti.si



Debelost.
Bolj zapleteno
kot štetje kalorij.



Slika je simbolična in ne predstavlja dejanskega bolnika.

Novo Nordisk d.o.o., Ameriška ulica 2, Ljubljana
01 810 8700, info@novonordisk.si, www.novonordisk.si ali www.novonordisk.com
© 2025 Novo Nordisk Slovenija, SK26OB00019, februar 2026

Vsebina je namenjena samo ozaveščanju o bolezni. O morebitnih vprašanjih se obrnite na zdravnika.

Spodbujamo spremembe | pri
debelosti

Spodbujanje dolgoročnega zdravja je naša strast
in obveza, ki jo uresničujemo že več kot 100 let.

ZRCALCE, ZRCALCE NA STENI POVEJ...

MAGIC MIRROR ON THE WALL...

AVTORICA / AUTHOR:

Prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: mirjana.gasperlin@ffa.uni-lj.si



1 UVOD

Živimo v času dolgožive družbe, kjer sta dobro počutje in celostna skrb za potrebe starejših ključnega pomena za ohranjanje kakovosti življenja. Po napovedih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) se bo delež ljudi, starejših od 60 let, povečal iz 1,1 milijarde leta 2023 na 1,4 milijarde do leta 2030. Takšen trend je zlasti opazen v razvijajočih se državah (1). Ta demografski premik se odraža na številnih področjih javnega življenja, ključno pa je ohranjanje dobrega zdravja, ki starejšim omogoča, da ostanejo samostojni in aktivni člani družbe. Po definiciji SZO zdravo staranje ne pomeni le odsotnosti bolezni, temveč tudi ohranjanje funkcionalne sposobnosti, ki posamezniku omogoča dobro počutje v svojem okolju (2). Posledično je velik po-

POVZETEK

Staranje je kompleksen proces, ki vključuje notranje in zunanje dejavnike ter se odraža v vseh plasteh kože. Kozmetični izdelki lahko pomembno prispevajo k upočasnitvi vidnih znakov staranja kože, saj vplivajo na njeno strukturo, funkcijo in zaščitno vlogo. V prispevku je predstavljena učinkovitost retinoidov, hialuronske kisline, antioksidantov in peptidov ter sodobni »pro-age« pristop, ki podpira biološko vitalnost kože in optimizacijo celičnih funkcij preko regeneracije celičnih signalnih poti, zmanjševanja kroničnega vnetja in epigenetske modulacije genov. Kombinacija teh strategij omogoča dolgoročno zdravje kože in ne le mladosten videz.

KLJUČNE BESEDE:

antioksidanti, hialuronska kislina, kozmetični izdelki, peptidi, pro-age, retinoidi, staranje kože

ABSTRACT

Skin aging is a complex process involving both intrinsic and extrinsic factors and affects all skin layers. Cosmetic products can play an important role in slowing the visible signs of skin aging by influencing skin structure, function, and protection. This paper presents the effectiveness of retinoids, hyaluronic acid, antioxidants, and peptides, as well as the modern "pro-age" approach, which supports the biological vitality of the skin and optimizes cellular functions through signal pathway regeneration, reduction of chronic inflammation, and epigenetic modulation. The combination of these strategies provides long-term support for skin health, not just a youthful appearance.

KEY WORDS:

antioxidants, hyaluronic acid, cosmetics, peptides, pro-age, retinoids, skin aging

udarek na razvoju vseh tistih področij, ki povečujejo kakovost tega življenjskega obdobja.

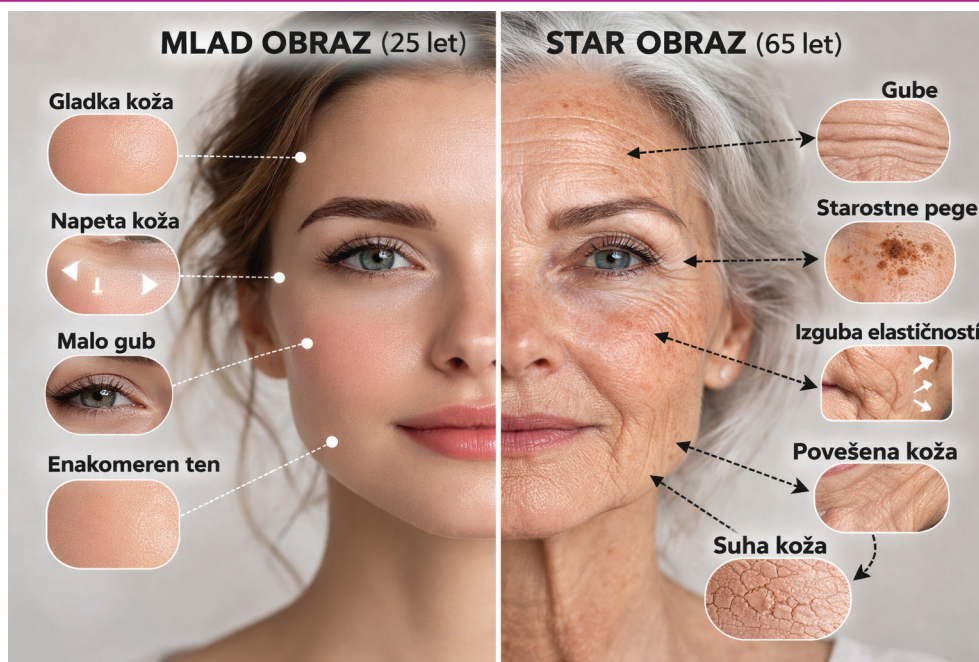
Starejši si želijo ostati čim dlje fizično in mentalno aktivni in si prizadevajo ohraniti mladosten videz. Ohranjanju vitalnosti je namenjen širok nabor izdelkov, pri čemer imajo kozmetični izdelki pomembno vlogo. Koža je navsezadnje naš največji organ, edini, ki je viden od zunaj, zato posledice staranja lahko opazujemo tudi vizualno. Ker je koža stalno izpostavljena tudi vplivom iz okolja in ne le notranjim dejavnikom, je



njen videz rezultat prepletanja obeh vrst vplivov. Čeprav posledic posameznih dejavnikov navadno ni mogoče ločiti, raziskovalci pripisujejo zunanjim dejavnikom veliko večji vpliv (3), kar pomeni, da z ustrezno nego in/ali različnimi pomlajevalnimi pristopi znake staranja kože lahko upočasnimo; z nekaterimi estetsko kirurškimi posegi celo drastično. Kljub dolgoživi družbi pa današnji čas bolj kot kdaj koli prej povečuje mladost in lepoto. Družbena omrežja nam narekujejo, kakšni moramo biti in ponujajo številna orodja za doseganje teh idealov. Pa je to res nujno? Koža namreč ni samo površina ali estetski element. Nosimo jo vse življenje, a se hkrati neprestano spreminja. Vsaka njena sprememba je tih opomnik, da staranje ni samo biološki proces, temveč del naše človeške zgodbe. Na koži se zrcali minevanje časa, hkrati pa tudi neizmerna sposobnost prilagajanja in obnavljanja. Morda zato pravimo, da se na njej odraža naše življenje, saj nosi sledi tega, kdo smo, kaj čutimo in kako živimo. Mar ni obraz starejše osebe, zaznamovan z gubami, v katerih se zrcalijo prehojena pot, spomini, izkušnje in zgodbe življenja, dragocenost, ki je gladka koža nima? Ni zaman rek, da je obraz zrcalo duše, morda pa je še več – zrcalo življenja. Edinstveno, kot je edinstveno vsako življenje.

2 STARANJE KOŽE

Kot vsi organi se tudi naša koža stara, saj je izpostavljena dejavnikom, ki povzročajo staranje od znotraj – notranje, biološko ali intrinzično staranje, kot tudi tistim od zunaj – zunanje, ekstrinzično staranje, pogosto imenovano fotostarjanje (ang. *photoageing*). Biološko staranje je kontinuiran proces, ki ga ne moremo preprečiti niti zaustaviti. Je odraz nesposobnosti organizma oz. njegovih struktur, da se prilagodijo na spremembe v notranjem okolju. Povedano z drugimi besedami je to stanje, v katerem degenerativni procesi prevladajo nad regenerativnimi. Določajo ga genetski dejavniki, hormonske spremembe itd. Znanih je veliko različnih pristopov, ki skušajo proces staranja pojasniti na molekularni ravni, na primer teorija celičnega staranja, zmanjšanje sposobnosti celične DNA za popravila, krajšanje telomer, mutacije mitohondrijske DNA, oksidativni stres in nepravilnosti na kromosomih, mutacije posameznih genov, kronično vnetje idr. (4). Na kožo škodljivo vplivajo tudi zunanji dejavniki, med katerimi je najpomembnejša ultravijolična (UV) svetloba, pa



Slika 1: Primerjava mlade in starejše kože - vidne spremembe na obrazu. Slika je bila ustvarjena z uporabo ChatGPT (OpenAI, San Francisco, CA, ZDA) z umetno inteligenco podprtim generiranjem slik. Avtorji so rezultat pregledali in uredili za zagotavljanje točnosti.

Figure 2: Comparison of young and aged skin – visible face changes. Figure was created using ChatGPT (OpenAI, San Francisco, CA, USA) with AI-assisted image generation. The authors reviewed and edited the output for accuracy.

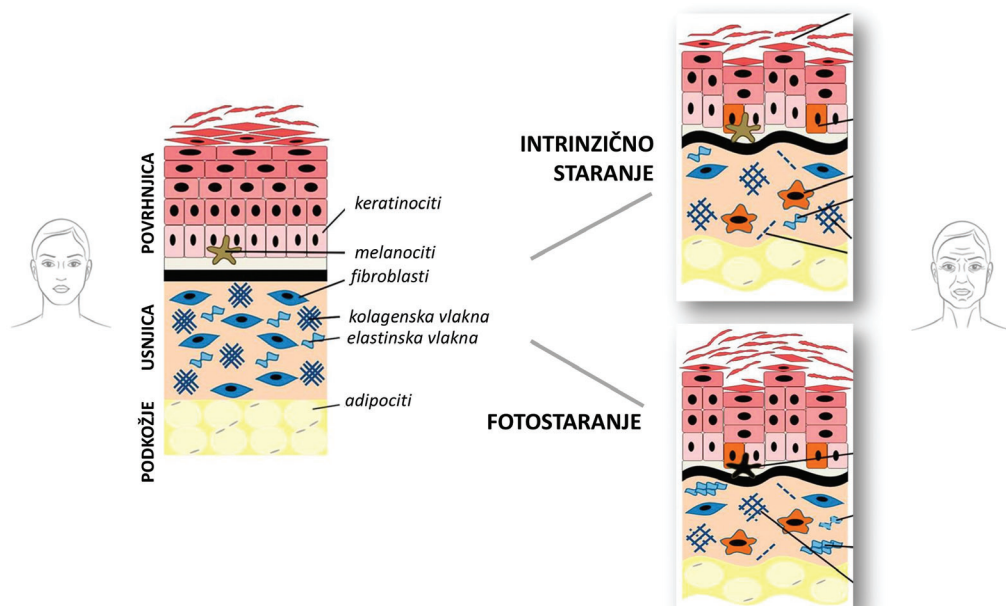
KLJUČNI POUDARKI

- Staranje kože povzročajo notranji in zunanji dejavniki, med katerimi je najbolj škodljiva UV svetloba.
- Spremembe na celičnem in strukturnem nivoju se začnejo veliko prej, preden znaki staranja postanejo vidni.
- Staranje prizadene vse plasti kože in se odraža v zmanjšani sintezi kolagena, elastina in glukozaminoglikanov, tanjšanju kože in slabši barierni funkciji.
- Retinoidi, hialuronska kislina, antioksidanti in peptidi so kozmetično aktivne spojine izbora za zmanjševanje znakov staranja kože z znanstveno potrjeno učinkovitostjo.
- Sodobni pristop »pro-age« se odmika od boja proti staranju (»anti-age«) in poudarja pomen regeneracije signalnih poti, zmanjšanje kroničnega vnetja in epigenetsko modulacijo.

tudi onesnaževala v okolju, cigaretni dim, neustrezna prehrana in slabe življenjske navade. V zadnjem času je vse več dokazov, da za kožo ni škodljiva le UV svetloba, ampak tudi vidna in celo infrardeča svetloba (5), ki naj bi sprožali

nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS). V spektru vidne svetlobe je za fotostarjanja pomembna predvsem visoko energijska vidna svetloba (ang. *high-energy visible light*, HEV ali HEVIS) valovnih dolžin med 400 in 500 nm. Odkrite so bile ključne signalne poti, povezane s poškodbami fibroblastov, ki jih povzroča HEV (6, 7). To spoznanje je pomembno predvsem z vidika zaščite kože pred soncem; klasični kozmetični izdelki, ki vsebujejo UV filtre, namreč kože pred HEV ne ščitijo, uspešno obrambo pa predstavljajo antioksidanti.

Spremembe, ki jih povzroči staranje, se odražajo v vseh plasteh kože, pri čemer pa vidni znaki biološkega in fotostarjanja niso vedno enaki. Staranje se začne že veliko prej, preden spremembe postanejo klinično opazne, saj se procesi začnejo najprej na biokemijski in celični ravni. Ko te spremembe postanejo dovolj obsežne, se to odraža v njeni strukturi in šele nato se pojavijo klinično vidne spremembe na koži. Tako npr. sinteza kolagena v fibroblastih začne upadati že po 25. letu s hitrostjo 1 % na leto, vrhnjica se stanjša za 50 % med 50. in 80. letom, aktivnost melanocitov pa upade za 8 do 20 % vsakih 10 let (8). Pri ženskah upad spolnih hormonov v menopavzi močno pospeši navedene spremembe kože.



Slika 2: Spremembe v strukturi kože, povzročene z biološkim staranjem (zgoraj desno) in fotostaranjem (spodaj desno). Pripravljeno z orodjem BioRender: <https://BioRender.com/l6j55yo>

Figure 2: Changes in skin structure caused by intrinsic ageing (top right) and photoageing (bottom right). Created in BioRender: <https://BioRender.com/l6j55yo>

Intrinzično staranje vpliva na vse plasti kože. Povrhnjica s časom atrofira. Število celic se zmanjša, senescentni keratinociti proizvajajo manj keratina in vseh snovi, ki tvorijo t. i. naravni vlažilni dejavnik. Epidermalno-dermalni stiki, ki so pri mladi koži nagubani, se izravnavajo, zaradi česar se zmanjša oskrba povrhnjice iz kapilarne mreže v spodaj ležeči usnjici. Še izrazitejše so spremembe v usnjici. Zaradi senescence fibroblastov se zmanjša sinteza kolagena, elastina in hialuronske kisline, kar vpliva na debelino, trdnost in elastičnost kože ter povzroča nastanek gub. Zmanjšata se tako število lojnic kot njihovo izločanje, kar vpliva na debelino lipidnega plašča na površini, ki kožo ščiti pred izgubo vlage. Zaradi zmanjšanja števila živčnih končičev upade senzorična funkcija. Zmanjšanje gostote žilja in slabša prekrvavitev omejujeta sposobnost kože za učinkovit vnetni in imunski odziv, kar povečuje njeno občutljivost za okužbe in vnetja (9–11). Zaradi vseh teh procesov je starejša koža suha, tanka, rumenkasta, ohlapna, nagubana in občutljiva na zunanja dražila. Za fotostarano kožo so dodatno značilne hiperplazija rožene plasti, ki predstavlja mehansko zaščito pred UV svetlobo, hiperpigmentacije zaradi fotopoškodb melanocitov in teleangiektazije (12, 13). Spremembe videza kože med staranjem prikazuje slika 1, shematske spremembe v strukturi posameznih plasti kože pa slika 2.

3 KAJ RESNIČNO DELUJE?

Kozmetični izdelki lahko pomembno prispevajo k upočasnitvi vidnih znakov staranja kože, saj vplivajo na njeno strukturo, funkcijo in zaščitno vlogo. Številne sestavine, med njimi retinoidi, antioksidanti in signalni peptidi, dokazano učinkujejo, saj vplivajo na celično obnovo, sintezo kolagena in/ali zmanjšujejo oksidativni stres (14). Z dosledno in pravilno uporabo lahko takšni kozmetični izdelki podpirajo fiziološke regenerativne procese, vendar pa naravnega biološkega staranja kože ne morejo preprečiti ali zaustaviti.

3.1 RETINOIDI

Retinoidi, skupno ime za naravne oblike vitamina A, njegove derivate in prekursorje ter provitamine, so še vedno prva izbira za nego starejše kože. V telesu se le majhen delež vitamina A pretvori v biološko aktivno obliko, to je trans retinojska kislina, z drugim imenom tretinoin, ki z vezavo na

receptorje vpliva na celično diferenciacijo (15). V kozmetičnih izdelkih je zaradi možnega draženja ta oblika prepovedana (16), dovoljena pa je uporaba derivatov, med katerimi so najpogostejši retinol, retinal in retinilestri. V losjonih za telo je največja dovoljena vsebnost retinoidov 0,05 %, v kremah za obraz in roke pa 0,3 %, oboje preračunano na ekvivalent retinola (17).

Pomlajevalni učinek retinoidov temelji na proliferaciji keratinocitov, spodbujanju sinteze kolagena, izboljšanju epidermalne bariere, zmanjšanju transepidermalne izgube vode in zaviranju encimov metaloproteaz, med katere sodijo tudi kolagenaze (18). Retinojska kislina se veže na dve skupini jedrnih receptorjev: na receptorje za retinojsko kislino (RAR- α , - β , - γ) in retinoidne receptorje (RXR- α , - β , - γ). Nastali kompleksi se nato vežejo na specifična zaporedja DNA, imenovana odzivni elementi za retinojsko kislino, in aktivirajo transkripcijo tarčnega gena. Ker je torej učinek pogojen z vezavo retinojske kisline na receptorje, se morajo ostali derivati v koži najprej encimsko pretvoriti v retinojsko kislino, kar pojasnjuje njihovo manjšo učinkovitost, hkrati pa boljše prenašanje na koži zaradi manjšega potenciala draženja. Ker klinične študije za kozmetične izdelke niso obvezne, je učinkovitost derivatov težko ovrednotiti. Največ podatkov je na voljo za retinol, ki naj bi bil približno 20-krat manj učinkovit od tretinoina (19), so pa v večini študij učinke retinola proti staranju kože potrdili. Omejitev objavljenih kliničnih študij pa je predvsem ta, da niso bile dvojno slepe in nadzorovane s placebom (20).

3.2 HIALURONSKA KISLINA

Hialuronska kislina (HA), tudi hialuronan, spada med naravne anionske glikozaminoglikane. Je polisaharid z visoko molekulsko maso, sestavljen iz D-glukuronske kisline in N-acetil glukozamina. Kar 50 % celotne količine HA v telesu se nahaja v koži, prisotna pa je tudi v hrustancu, živčnem tkivu, sinovialni tekočini in v očeh. Sodeluje v številnih fizioloških procesih, kot so celjenje ran, regeneracija tkiv, vnetni odgovori, imunomodulacija, embrionalni razvoj in progresija tumorjev (21). Izkazuje odlične vlažilne učinke, saj se zaradi vezave vode njena masa tudi do 1000-krat poveča, zaradi česar ima koža napet, gladek videz (22). Fiziološka vloga HA v koži pa ni zgolj pasivna, to je, da zaradi izjemne sposobnosti vezave vode deluje kot ogrodje za kolagenska in elastinska vlakna, ampak regulira tudi aktivnost akvaporina 3, stimulira endotelijske celice, sintezo kolagena in celično signalizacijo (23). Ta biopolimer se veliko raziskuje za uporabo v biomedicini za zdravljenje raka, celjenje ran, nadzor vnetja, protibakterijsko in antiok-

sidativno delovanje (24). V estetski medicini se pogosto uporablja kot dermalno polnilo (25).

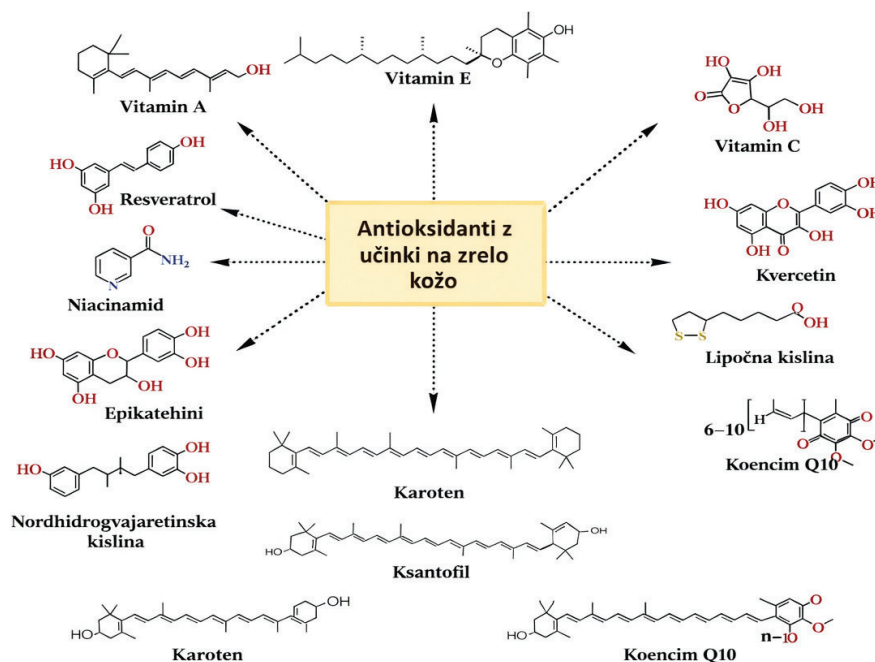
V kozmetičnih izdelkih proti staranju se HA čedalje bolj uveljavlja kot ena ključnih sestavin zaradi svoje biokompatibilnosti, hidrofilnosti in številnih pozitivnih učinkov. Na njeno učinkovitost odločilno vpliva molekulska masa. HA z visoko molekulsko maso (več kot 1000 kDa) ne prodira v kožo, zato omogoča zgolj površinsko hidratacijo kože, medtem ko lahko HA z nizko molekulsko maso (manj kot 250 kDa) prodre do usnjice, kjer stimulira sintezo kolagena v fibroblastih in regeneracijo tkiva. Učinki so posledica vezave na receptorje za HA, in sicer na transmembranske receptorje CD44 in znotrajcelične receptorje RHAMM. Z vezavo na Tollu podobne receptorje 2 in 4 HA dodatno sodeluje pri regulaciji imunskega odziva. Z receptorji posredovan učinek poveča elastičnost kože, pospeši celjenje ran in blaži posledice oksidativnega stresa. V kombinaciji z vitamini, peptidi in retinoidi deluje HA sinergistično (27).

3.3 ANTIOKSIDANTI

Radikalna teorija poudarja, da so ROS in intenzivni nastanek radikalov pomembno vključeni v proces staranja kože,

nastanek kožnih nepravilnosti in kožnih bolezni (28). Posledično je utemeljena uporaba antioksidantov kot kozmetično aktivnih sestavin, ki se vključijo v oksidacijske procese in s tem zaščitijo biološko pomembne molekule v koži. V kozmetične izdelke lahko dodajamo bodisi antioksidante, ki so v koži fiziološko prisotni bodisi spojine rastlinskega izvora. V prvo skupino sodijo vitamini E in C, koencim Q in lipoična kislina, ki delujejo sinergistično, saj regenerirajo drug drugega, zato je njihovo sočasno vgrajevanje v kozmetične izdelke zelo smiselno (29, 30). Vitamin C je skoraj idealna kozmetično aktivna sestavina za nego (foto)starane kože, saj poleg antioksidativnega delovanja stimulira sintezo kolagena, zavira tirozinazo, kar posvetli pigmentne madeže na koži, in deluje protivnetno (31). Njegova pomanjkljivost je nestabilnost v vodi, kar rešujemo z uporabo derivatov (estri z maščobnimi kislinami in soli fosfatnih estrov) in/ali vgradnjo v sodobne dostavne sisteme (32).

Zelo pomembna skupina antioksidantov izvira iz rastlin, ker so morale med evolucijo razviti obrambo pred UV svetlobo v okolju, kjer rastejo. Tako so nastale številne kemijsko različne spojine (polifenoli, katehini, flavonoidi), ki jih uporabljamo kot antioksidante v prehrani ali v kozmetičnih izdelkih. Mednje sodijo resveratrol, katehini iz zelenega čaja, silimarin, piknogenol, abigenol, astaksantin, lutein, likopen,



Slika 3: Kemijske strukture pogostih antioksidantov v kozmetičnih izdelkih.

Figure 3: Chemical structures of frequently used antioxidants in anti-ageing cosmetic products.

rutin, kvercetin, hesperidin, gliciretinska kislina, kurkumin in drugi. Raziskave potrjujejo učinkovitost antioksidantov v kozmetičnih izdelkih za nego starejše kože, z razvojem in uporabo naprednih dostavnih sistemov v kozmetičnih izdelkih pa bo njihovo učinkovitost in stabilnost mogoče še izboljšati (33). Nekaj pogosto uporabljenih antioksidantov v kozmetiki je prikazanih na sliki 3.

3.4 PEPTIDI

Peptidi so ena najpomembnejših bioaktivnih sestavin kozmetičnih izdelkov, ki je v zadnjem času predmet številnih raziskav (34). V izdelkih za nego zrele kože so priljubljeni zaradi svoje široke funkcionalnosti, in sicer izkazujejo protimikrobno in protivnetno delovanje, hkrati pa lahko delujejo antioksidativno in vlažilno. Stimulirajo sintezo kolagena in pospešujejo celično proliferacijo. Glede na funkcijo jih delimo na signalne, prenašalne in zaviralne peptide. Signalni peptidi spodbujajo aktivnost fibroblastov in tako stimulirajo sintezo kolagena, elastina in glikoproteinov, kot so fibronektin, proteoglikani in glukozaminoglikani. Prenašalni peptidi stimulirajo transport oligoelementov, npr. mangana in bakra, v celice. Inhibitorni peptidi pa zavirajo delovanje encimov, kot so kolagenaze, elastaze in tirozinaze. Tirozinaza je ključni encim v sintezi melanina, ki katalizira pret-

vorbo tirozina v L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) in nato naprej v dopakinon. Z zaviranjem tega encima se zmanjšuje nastanek melanina in posledično hiperpigmentacija, ki je v obliki pigmentnih madežev eden od najbolj značilnih znakov fotostaranja kože. Druga vrsta zaviralnih peptidov posnema delovanje botoksa, ker deluje na živčne prenašalce, s čimer se zgladijo gube (35, 36). Pregled nekaterih najpogostejših peptidov v kozmetiki je podan v preglednici 1.

4 NOV PRISTOP: OD »ANTI-AGE« K »PRO-AGE«

V zadnjem času se filozofija izdelkov za nego starejše kože spreminja – prehaja od pristopa *ANTI* k pristopu *PRO*. Predpona *anti* (gr. ávri) pomeni proti. V kontekstu izdelkov za nego starejše kože to pomeni boj proti staranju, proti nečemu torej, kar je neizbežno. Nov pristop pa temelji na podpori biološke vitalnosti kože, ne da bi jo silili v umetno mladost. Usmerjen je v optimizacijo celičnih funkcij in pomoč koži, da čim dlje ohranja svoje naravne funkcije. Temelji na pristopu vzpostavljanja homeostaze kože, ravnotežja med vnetnimi

Preglednica 1: Pregled nekaterih komercialno dostopnih kozmetično aktivnih peptidov in njihovih mehanizmov delovanja (povzeto po 37).
Table 1: Overview of some commercially available cosmetically active peptides and their mechanism of action (adopted from 37).

Peptid	Mehanizem delovanja
Tripeptid-2	stimulacija zunajceličnega ogrodja preko zaviranja metaloproteaz
Tripeptid-1	stimulacija proizvodnje kolagena in aminoglikanov
Nonapeptid-1	zaviranje tirozinaze
Palmitoil heksapeptid-6	stimulacija obnove kožne strukture
Oligopeptid-10	zaščita strukturne integritete kože
Tripeptid-10 citrulin	stimulacija tvorbe kolagena in zunajceličnega ogrodja
Acetil tetrapeptid-5	zmanjšanje edema kože z zaviranjem encima angiotenzin konvertaze
Heksapeptid-10	stimulacija proliferacije celic
Palmitoil tripeptid-5	stimulacija sinteze kolagena
Oligopeptid-20	zaviranje metaloproteaz
Bakrov tripeptid (GHK-baker)	stimulacija celjenja ran, stimulacija fibroblastov, protivnetno delovanje
Palmitoil oligopeptid	stimulacija sinteze kolagena in hialuronske kisline
Palmitoil tetrapeptid-7	zaviranje delovanja interleukina-6, stimulacija sinteze kolagena in elastina
Palmitoil pentapeptid-.3	stimulacija sinteze kolagena

in oksidativnimi procesi, regeneracijo in zaščito. Glavni cilj tako ni več samo mladosten videz, temveč biološka vitalnost kože in ohranjanje funkcionalnega ravnotežja (38). Bistvo tega pristopa je regeneracija signalnih poti z aktivacijo komunikacije med celicami preko peptidov in rastnih dejavnikov, zmanjševanje kroničnega vnetja in epigenetska aktivacija, ki vključuje izražanja genov, ki nadzorujejo sintezo kolagena, elastina in antioksidativnih encimov (39).

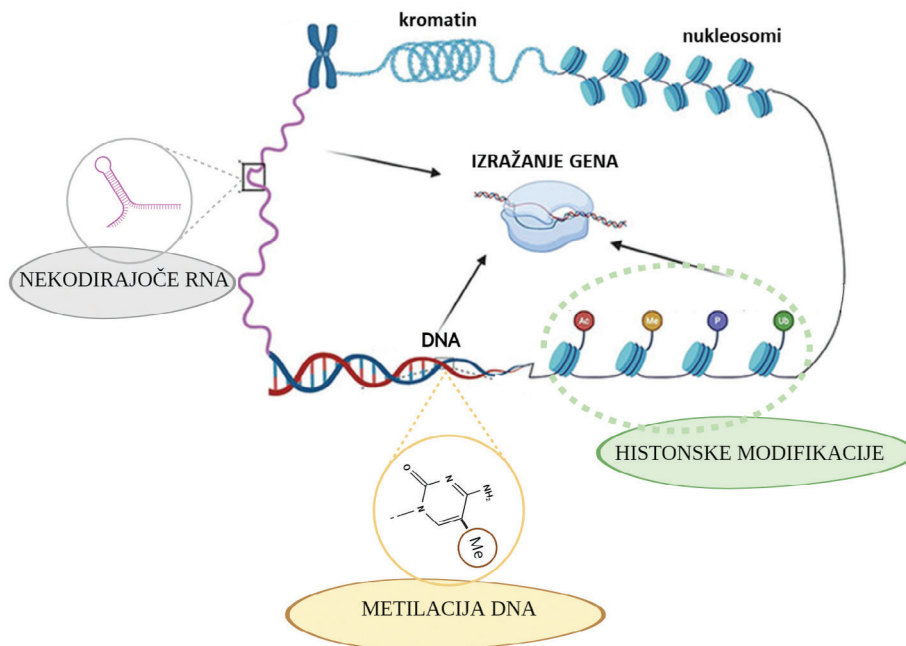
4.1 REGENERACIJA SIGNALNIH POTI

Regeneracija signalnih poti predstavlja sodoben in znanstveno utemeljen pristop, ki se osredotoča na obnovo porušjenih mehanizmov celične komunikacije, značilnih za starajočo se kožo. S staranjem se učinkovitost ključnih signalnih poti zmanjšuje, kar vodi v upočasnjeno celično proliferacijo, zmanjšano sintezo kolagena, slabšo regeneracijo in porušeno homeostazo kožnega tkiva. Ciljno moduliranje teh poti z bioaktivnimi molekulami, peptidi, rastlinskimi izvlečki in s podporo naprednih dostavnih sistemov omogoča ponovno aktivacijo regenerativnih procesov, izboljšanje funkcije fibroblastov ter podporo obnovi zunajceličnega ogrodja. Takšen pristop presega klasično simptomatsko delovanje izdelkov

»anti-age« in se usmerja v vzročne mehanizme staranja na celični in molekularni ravni (40).

4.2 KRONIČNO VNETHJE – TIHI POSPEŠEVALEC STARANJA

Pomen kroničnega vnetja pri staranju odraža termin »*inflammaging*«, ki je nastal z združitvijo dveh angleških besed »*inflammation*« (vnetje) in »*aging*« (staranje). Izraz pomeni kronično vnetno stanje kože, ki ni posledica okužbe, temveč nakopičenih poškodb, neučinkovitosti imunskega sistema, nagnjenosti starajočih se celic k sproščanju pro-vnetnih citokinov, kot sta interleukin 6 (IL-6) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) ter kopičenja ROS, kar poškoduje kolagenska vlakna, zmanjša regeneracijo celic in oslabi zaščitno bariero kože. Poudarek pristopa je na uravnavanju vnetnih poti (i), kar pomeni podporo mikrobiomu, ki modulira imunske signale in zmanjšuje stres; epigenetski regulaciji (ii), s katero se utišajo geni, povezani z vnetjem in aktivirajo tisti, ki spodbujajo obnovo; in dostavi protivnetnih kozmetično aktivnih sestavin (iii), kot so niacinamid, kurkumin, omega-3-maščobne kisline, probiotiki, vitamina C in E ter druge (41).



Slika 4: Glavni epigenetski regulatorni mehanizmi, ki upočasnijo staranje kože. Pripravljeno z orodjem BioRender:

<https://BioRender.com/lrl5aw>

Figure 4: The main mechanisms of epigenetic regulation of skin ageing Created in BioRender: <https://BioRender.com/lrl5aw>



4.3 EPIGENETSKA AKTIVACIJA

Epigenetska aktivacija temelji na spremembah v izražanju genov, vendar ne spreminjamo zaporedja DNA, temveč s kozmetično aktivnimi sestavinami vplivamo na to, kateri geni se izražajo ali so utišani. Cilj je spodbuditi izražanje genov, povezanih z obnovo kože, sintezo kolagena, zaščito pred oksidativnim stresom in celično regeneracijo, ali zmanjšati izražanje genov, povezanih z vnetji, oksidativnim stresom ali razgradnjo kolagena (42).

Glavni epigenetski mehanizmi vključujejo (slika 4): metilacijo DNA (pripenjanje metilnih skupin na citozin v DNA, kar zmanjšuje možno prepisovanje in izražanja genov), modifikacijo histonov (spremembe v strukturi histonov, okoli katerih je ovita DNA, kar vpliva na dostopnost genov za transkripcijske dejavnike) in izražanje nekodirajočih RNA (ki modulirajo sintezo proteinov). Kot epigenetski aktivatorji, prisotni v kozmetičnih izdelkih, delujejo niacinamid, resveratrol, karnozin in luteolin (43).

5 SKLEP

Staranje kože je kompleksen proces, na katerega vplivajo tako notranji kot zunanji dejavniki. Pregled delovanja kozmetično aktivnih sestavin v kozmetičnih izdelkih za nego starejše kože, ki temeljijo na znanstvenih dokazih, kaže, da imajo nekatere uveljavljene sestavine še vedno ključno vlogo pri ohranjanju zdravja kože. Hkrati pa sodobni pristopi vse bolj presegajo zgolj prekrivanje vidnih znakov staranja kože in se usmerjajo v podporo naravnim regeneracijskim mehanizmom. V prihodnosti lahko pričakujemo še večji poudarek na individualiziranih, celostnih in trajnostnih strategijah, ki združujejo znanost, preventivo in pristop »pro-age«, s ciljem dolgoročno ohraniti funkcionalno in zdravo kožo, na kateri se bodo tudi vidni znaki staranja pokazali bistveno kasneje.

6 ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Maji Bjelošević Žiberna za pomoč pri risanju slik.

7 LITERATURA

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>; dostopano 15.1.2026
2. <https://www.who.int/about/governance/constitution>; dostopano 22.01.2026
3. Chang S, Duan E. Fighting against skin ageing: the way from bench to bedside. *Cell Transplant*. 2018; 27(5):729-38.
4. Chaudhary M, Khan A, Gupta M. Skin Ageing. *Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches*. *Curr Aging Sci*. 2020; 13(1): 22-30.
5. Huang A., Chien, AL. Photoaging: a Review of Current Literature. *Curr Derm Rep*. 2020; 9: 22-29.
6. Pourang A et al. Effects of visible light on mechanisms of skin photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2022; 38(3): 191-196.
7. Ge Ge et al. Induced skin aging by blue-light irradiation in human skin fibroblasts via TGF- β , JNK and EGFR pathways. *J Dermatol Sci*. 2023; 111(2):52-29
8. Bouchelkia I, Sadacharan C. Comprehensive Quantification of Collagen, Elastin, and Glycosaminoglycans in the Human Facial Dermis: Insights From a Pilot Study. *Cureus*. 2025; 17(3).
9. Lee H, Hong Y, Kim M. Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. *Int J Mol Sci*. 2021; 22, 12489.
10. Wahhab R, Sanders M, Kokikian N, Ni C, Vandiver AR. Clinical consequences of age-related skin barrier dysfunction-Part I: Structural, molecular, and physiologic changes with cutaneous aging. *J Am Acad Dermatol*. 2025; 93(4): 905-914.
11. Naharro-Rodriguez H, Bacci S, Hernandez-Bule ML, Perez-Gonzalez A, Fernandez-Guarino M. Decoding Skin Aging: A Review of Mechanisms, Markers, and Modern Therapies. *Cosmetics*. 2025; 12: 144
12. Kaltchenko MV, Chien, AL. Photoaging: Current Concepts on Molecular Mechanisms, Prevention, and Treatment. *Am J Clin Dermatol* 2025; 26: 321-344).
13. Toutfair M, Bauwens E, Debacq-Chainiaux F. The impact of cellular senescence in skin ageing: A notion of mosaic and therapeutic strategies. *Biocem:Pharmacol*. 142;2017:1-12.
14. Crespi O et al: Cosmeceuticals for anti-aging: Mechanism, Clinical Evidence and Regulatory Insights- A comprehensive review. *Cosmetics*. 2025;12,209.
15. Turk N. Vitamin A. V: Minerali, vitamini in druge izbrane snovi. Peterlin Mašič L, Obreza A. Vovk T (UR). Slovensko farmacevtsko društvo 2020:263-174.
16. Uredba o kozmetičnih izdelkih. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance)<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32009R1223>
17. SCCS Opinion on vitamin A (retinol retinylacetat, retinilpalmitat, December 2016
18. Zasada M, Budzisz E. Retinoids active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postepy Dermatol Alergol*. 2019; 36(4): 292-7.
19. Swaraj R, Ranher R, Girbane Y. A Review on Retinoids as Anti-Aging and Dermatologically Active Cosmetic Ingredients. *JAAFR*, 2026; 4(1): 227-239.
20. Milosheska D, Roškar R. Use of Retinoids in Topical Antiaging Treatments: A Focused Review of Clinical Evidence for

- Conventional and Nanoformulations. *Adv Ther.* 2022; 39(12): 5351-5375.
21. Bukhari NA et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biolog Macromol.* 2018; 120:1682-1695
 22. Kravos K, Gašperlin M. Hialuronska kislina - naravna učinkovina za vlaženje in zaviranje znakov staranja kože. *Farm Vestn* 2015; 66 (4): 318-325.
 23. Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: a review on its biology, aspects of drug delivery, route of administration and a special emphasis on its improved marketed products and recent clinical studies. *Int J Bio Macromol.* 2020; 151: 1012-1029.
 24. Wang L, Zhou F, Xie W. Advances in hyaluronic acid-based biomaterials: applications in cancer therapy, wound healing, and disease management. *J Mater Sci: Mater Med* 2025; 36:91.
 25. Safia A, Abd Elhadi U, Merchavy S, Batheesh R, Bathish N. Efficacy and Safety of Hyaluronic Acid Fillers for Midface Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicina* 2025, 61(10), 1823.
 26. Bravo B, Correia P, Gonçalves Junior JE, Sant'Anna B, Kerob D. Benefits of topical hyaluronic acid for skin quality and signs of skin aging: From literature review to clinical evidence. *Dermatol Ther.* 2022; 35(12):15903
 27. Gosiya, Giri N, Rouman A, et al. Hyaluronic acid in modern Cosmeceuticals: a review of skin health and anti-aging innovations. *J Dermat Cosmetol.* 2025; 9(3):60-69.
 28. Tu Y, Quan T. Oxidative Stress and Human Skin Connective Tissue aging. *Cosmetics* 2016, 3, 28.
 29. Rozman B, Gašperlin M. Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. *Drug delivery.* 2007; 14 (4): 235-245.
 30. Hama amin Hussien H et al. Role of antioxidants in skin aging and the molecular mechanism of ROS: A comprehensive review. *Aspects of Molecular Medicine* 2025; 5.
 31. Jaros-Sajda A, Budzisz E, Erkiert-Polgaj A. Ascorbic Acid Treatments as Effective and Safe Anti-Aging Therapies for Sensitive Skin. *Antioxidants.* 2024; 13(2):174.
 32. Gašperlin M, Gosenca Matjaž M. Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Exp Opin Drug delivery.* 2011; 8 (7): 905-919.
 33. Budzianowska A, Banaś K, Budzianowski J, Kikowska M. Antioxidants to Defend Healthy and Youthful Skin-Current Trends and Future Directions in Cosmetology. *Appl. Sci.* 2025, 15, 2571.
 34. Pintea A, Manea A, Pintea C, Vlad RA, Bîrsan M, Antonoaea P, Rédei EM, Ciurba A.. Peptides: Emerging Candidates for the Prevention and Treatment of Skin Senescence: A Review. *Biomolecules* 2025; 15, 88.
 35. Lupo MP, Cole AL. Cosmeceutical peptides. *Dermatol. Ther.* 2007;20(5):343–349. doi: 10.1111/j.1529-8019.2007.00148.x. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
 36. Griffiths TW, Watson REB, Lanton AK). Skin ageing and topical rejuvenation strategies, *Br J Dermat.* 2023: 189:17-23
 37. Bjelošević Žiberna M, Gašperlin M, Gosenca Matjaž M. Peptidi v kozmetiki - smotrnost njihove uporabe. *Farm Vestn.* 2019; 70 (5):361-369.
 38. Fabbri S, Fabbri M. Pro-Aging: A New Approach to Beauty and Aesthetic Medicine. *J Cosmet Dermatol.* 2025: 24(6):e70277.
 39. Tauser RG et al. A State-of-the-Art Overview on (Epi)Genomics and Personalized Skin Rejuvenating Strategies. *Pharmaceutics.* 2025 Dec 9;17(12):1585.
 40. Ren Q, Qu L, Yuan Y, Wang F. Natural Modulators of Key Signaling Pathways in Skin Inflammageing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2024;8;17:2967-2988.
 41. Pilkington SM, Bulfone-Paus S, Griffiths CEM, Watson RE, Inflammaging and the Skin. *JInvest Dermatol.* 2021; 141(4) Supplement,2021,
 42. Pozzo LD et al. Role of epigenetics in the regulation of skin aging and geroprotective intervention: A new sight. *Biomed Pharmacother.* 2024; May;174.
 43. Izadi M, Sadri N, Abdi A, Serajian S, Jalalei D, Tahmasebi S. Epigenetic biomarkers in aging and longevity: Current and future application. *Life Sci.* 2024 Aug 15;351.



PREGLED ZDRAVILNIH UČINKOVIN ZA ZDRAVLJENJE TUBERKULOZE

OVERVIEW OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS FOR THE TREATMENT OF TUBERCULOSIS

AVTORJI / AUTHORS:

asist-razisk. Nina Gradišek, mag. farm.

izr. prof. dr. Stane Pajk, mag. farm.

izr. prof. dr. Martina Hrast Rambaher, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: martina.hrast-rambaher@ffa.uni-lj.si



1 UVOD

Naraščajoča odpornost bakterij proti kemoterapevtikom predstavlja vedno večji svetovni zdravstveni problem in se vse pogosteje pojavlja tudi pri boleznih, ki smo jih nekoč z

POVZETEK

Tuberkuloza, ki jo povzroča mikobakterija *Mycobacterium tuberculosis*, ostaja vodilni vzrok smrti zaradi nalezljivih bolezni kljub številnim protituberkuloznim učinkovinam, ki so danes na trgu. Pojav večkratno odpornih in izredno odpornih sevov je močno zmanjšal učinkovitost standardnih režimov zdravljenja prvega izbora, ki temeljijo na izoniazidu, rifampicinu, pirazinamidu in etambutolu. V tem preglednem članku so povzeti mehanizmi delovanja obstoječih in novih protituberkuloznih zdravilnih učinkovin ter poudarjen pomen razvoja odpornosti in potrebe po novih terapijah. Nove učinkovine – bedakilin, delamanid in pretomanid – predstavljajo pomemben napredek, saj z novimi mehanizmi delovanja ciljajo energijski metabolizem in delujejo komplementarno že obstoječi terapiji, hkrati pa s ciljanjem novih tarč še dodatno vplivajo na sintezo mikobakterijske celične stene. Kljub temu se že pojavljajo primeri odpornosti, kar poudarja nujnost ustrezne kombinirane terapije, spremljanja bolnikov in nadaljnega razvoja učinkovin. Kljub navedenim izzivom trenutne raziskave ponujajo nove možnosti za krajše zdravljenje, boljše izide in približevanje ciljem Svetovne zdravstvene organizacije glede zmanjševanja incidence in števila smrtnih izidov.

KLJUČNE BESEDE:

Mycobacterium tuberculosis, novi antibiotiki, odpornost na antibiotike, tuberkuloza

ABSTRACT

Tuberculosis, caused by mycobacteria *Mycobacterium tuberculosis*, remains the world's leading cause of death from infectious disease despite the availability of effective chemotherapy. The emergence and spread of multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains have severely compromised the efficacy of conventional first-line regimens based on isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, and ethambutol. This review summarizes the mechanisms of action of current and newly approved anti-tuberculosis agents highlighting the evolution of resistance and the urgent need for novel therapeutic options. Newly introduced agents – bedaquiline, delamanid and pretomanid – represent significant progress. They target energy metabolism with new

mechanisms of action and act complementary to existing therapies, while also targeting new targets to further affect mycobacterial cell wall synthesis. However, emerging resistance to these novel compounds underscores the necessity for optimized combination regimens, adherence monitoring, and continuous drug development. Despite these challenges, current research offers promising strategies to shorten treatment duration, improve outcomes, and move closer to the goals of World Health Organization for reducing incidence and mortality rates.

KEY WORDS:

antibiotic resistance, *M. tuberculosis*, new antibiotics, tuberculosis

zdravili v določenih delih sveta že uspeli obvladati (1, 2). Najbolj opazna med temi je tuberkuloza, ki jo povzroča mikobakterija *Mycobacterium tuberculosis* in s katero je po poročanju Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) okužena približno četrtina svetovnega prebivalstva. Samo v letu 2023 so namreč zabeležili 10,8 milijonov novih primerov, s čimer je prehitela celo covid-19 in postala najpogostejši vzrok smrti zaradi okužbe na svetu. Letno zaradi nje namreč umre približno 1,25 milijona ljudi, najbolj pa so ogroženi bolniki z oslabljenim imunskim sistemom, zaradi česar je med umrlimi velik del okuženih z virusom humane imunске pomanjkljivosti (HIV) (3).

2 INCIDENCA TUBERKULOZE IN POJAV ODPORNOSTI

Tuberkuloza je izjemno nalezljiva bolezen, zato je za njeno obvladovanje zelo pomembno, da pri vsaki potrjeni okužbi poskušamo izslediti njen vir in hkrati obvestimo ljudi, s katerimi je bil okuženi v stiku, saj jih tako lahko testiramo in ob morebitni potrditvi okužbe ustavimo njeno nadaljnje širjenje. Poznamo namreč tako aktivno kot latentno obliko okužbe, pri čemer slednja nima simptomov in ni nalezljiva. Le približno 5–10 % okuženih razvije aktivno obliko bolezni. Latentna oblika se v aktivno še zlasti v primeru oslabljenega imunskega sistema najpogosteje razvije v dveh letih od okužbe. Da bi ta razvoj preprečili, obstajajo različne preventivne terapije, ki trajajo od enega do šestih mesecev in zajemajo zdravilne učinkovine prvega izbora, tako samo-

stojno kot v kombinaciji. Preventivna terapija je namenjena ljudem z latentno okužbo ter ljudem, pri katerih okužbe še niso zaznali, a so bili potrjeno v bližnjem stiku z bolnikom z aktivno okužbo (4–6).

V svetu je najvišja incidenca tuberkuloze v Severovzhodni Aziji in Afriki, in sicer pretežno v osmih državah (Indija, Indonezija, Pakistan, Filipini, Bangladeš, Kitajska, Nigerija in Demokratična republika Kongo), v katerih se po poročilih SZO iz leta 2024 letno pojavita kar dve tretjini vseh novih okužb. V Evropi je incidenca vsaj desetkrat, v Sloveniji pa skoraj stokrat manjša kot v navedenih državah. V Sloveniji smo tako v letu 2025 zabeležili 60 novih primerov, kar je 2,8 primera na 100.000 prebivalcev (7, 8).

V večjem delu Evrope smo tuberkulozo dolga leta obvladali do te mere, da so države ukinile obvezno cepljenje novorojenčkov – v Sloveniji smo ga ukinili leta 2005. To pa ne velja v Vzhodni Evropi, kjer velik delež okužb predstavljajo odporne oblike tuberkuloze, ki se v zadnjih letih zaradi vojne v Ukrajini pospešeno širijo tudi izven njenih meja (9, 10). Letno po vsem svetu poročajo o kar 400.000 primerih odpornih oblik tuberkuloze, kar zahteva zelo dolgotrajno zdravljenje, ki pogosto ni uspešno. Odporne oblike tuberkuloze predstavljajo veliko finančno breme za zdravstvene sisteme in so odgovorne za tretjino vseh smrti zaradi bakterijskih okužb letno, kar jasno kaže potrebo po novih zdravilih (11).

Uveljavljen režim zdravljenja tuberkuloze, ki je občutljiva na zdravila prve linije, je sestavljen iz kombinacije štirih zdravilnih

KLJUČNI POUDARKI

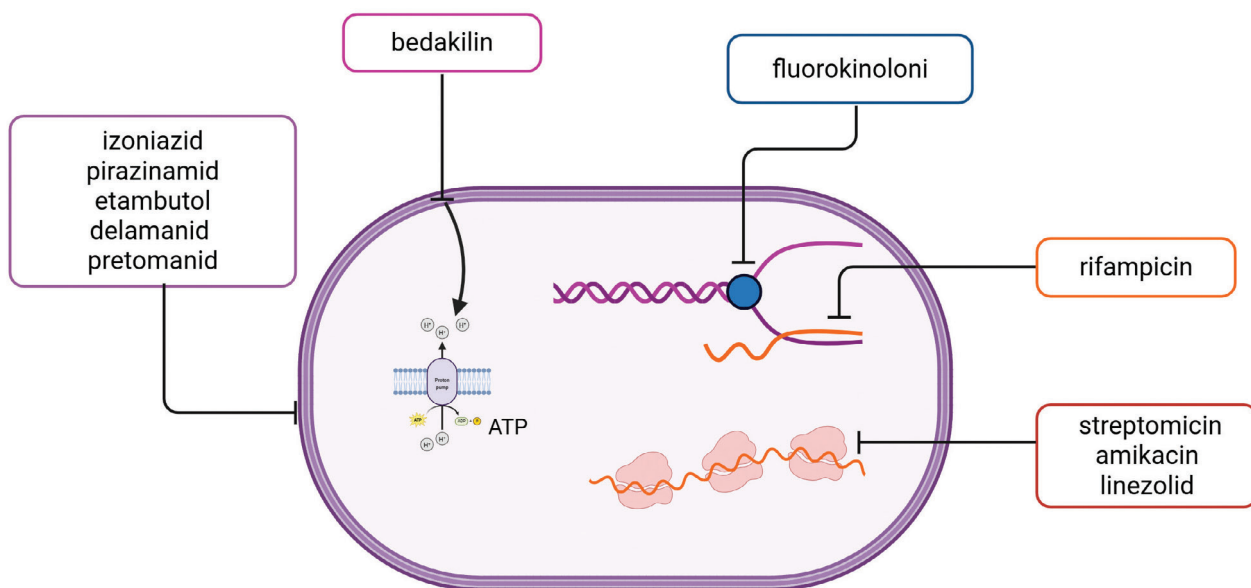
- Tuberkuloza ostaja vodilni vzrok smrti zaradi nalezljivih bolezni, tudi zaradi hitrega širjenja večkratno in izredno odpornih sevov.
- Prvo linijo zdravljenja predstavljajo izoniazid, rifampicin, pirazinamid in etambutol, ki ciljajo predvsem sintezo celične stene, presnovo energije in sintezo proteinov; njihovo delovanje pa vse bolj omejuje naraščajoča odpornost.
- Nove učinkovine – bedakilin, delamanid in pretomanid – ciljajo energijski metabolizem in nove tarče v *M. tuberculosis*, a se kljub temu že pojavljajo primeri odpornosti.
- V kliničnih preskušanjih je več kot 20 novih učinkovin in novih kombinacij učinkovin, ki obetajo krajše terapije, boljšo učinkovitost in korak bližje ciljem Svetovne zdravstvene organizacije glede zmanjševanja incidence in smrtnosti.



učinkovin, ki so jih odkrili že v 50-ih in 60-ih letih prejšnjega stoletja. Osnovno zdravljenje z antibiotiki prvega izbora običajno traja najmanj šest mesecev. Začne se z dvomesečnim intenzivnim obdobjem, v katerem pacienti prejemajo izoniazid, rifampicin, pirazinamid in etambutol, in se nadaljuje z vsaj štirimi meseci jemanja kombinacije dveh antibiotikov, navadno izoniazida in rifampicina, če izolat *in vitro* pokaže občutljivost bakterij na ti dve učinkovini (12). Uveljavljen režim zdravljenja temelji na standardih Evropske unije pri obravnavi tuberkuloze, ki so bili nazadnje posodobljeni leta 2017, in na združenih smernicah SZO za zdravljenje tuberkuloze. Oba dokumenta obravnavata celoten proces diagnoze in zdravljenja kot tudi ukrepanje v primeru pridruženih bolezni (13, 14). Prav dolgotrajno zdravljenje, tako v primeru aktivne kot latentne oblike bolezni, predstavlja dodaten problem z vidika sodelovanja pacientov pri zdravljenju, saj ti pogosto ne dokončajo predpisanega režima jemanja zdravil. Delež pacientov, ki uspešno zaključijo zdravljenje, je okoli 85 % pri aktivni okužbi in od 20–70 % pri latentni okužbi (12). To privede do nepopolnega zdravljenja okužbe, ki se nato ponovno pojavi, hkrati pa se ob tem razvija odpornost bakterij proti antibiotikom. Zaradi vse pogostejšega pojava odpornosti se danes pred začetkom zdravljenja vedno izvede test odpornosti kliničnega izolata mikobakterije (spu-

tum) proti posameznemu antibiotiku in se glede na rezultate testov zdravljenje prilagodi. Poznamo namreč večkratno odporno (angl. *multiple drug-resistant tuberculosis*, MDR-TB) kot tudi izredno odporno obliko (angl. *extensively drug-resistant tuberculosis*, XDR-TB) tuberkuloze, zabeležili pa so tudi že primere povsem odporne oblike (angl. *totally drug-resistant tuberculosis*, TDR-TB). Oblika MDR-TB je odporna najmanj proti izoniazidu in rifampicinu, XDR-TB je dodatno odporna še proti fluorokinolonom in pa vsaj še eni učinkovini druge izbire (14–16), pojav TDR-TB pa pomeni odpornost proti vsem učinkovinom, ki se uporabljajo za zdravljenje te bolezni (preglednica 1) (17).

Bakterijska odpornost je močno spodbudila razvoj novih učinkovin. Trenutne možnosti zdravljenja namreč v najboljšem primeru trajajo 9–11 mesecev, lahko pa tudi več let. Kljub navedenim dejstvom je trajalo kar 40 let, da so na trg prišle nove zdravile učinkovine za zdravljenje tuberkuloze (12). To so pretomanid, bedakilin in delamanid, ki se uporabljajo le kot dodatna komponenta kompleksnih in dolgotrajnih režimov zdravljenja, s katerimi poskušamo delovati na oblike MDR-TB in XDR-TB (slika 1) (14, 18). Kljub njihovem odkritju smernice kot standardni pristop pri oblikah MDR-TB in XDR-TB še vedno priporočajo vsaj 20-mesečno zdravljenje s kombinacijo eksperimentalno



Slika 1: Shematičen prikaz mehanizma delovanja nekaterih protituberkuloznih kemoterapevtikov. ATP – adenzin trifosfat. Ustvarjeno s programom Biorender. Gradišek N. (2026) <https://BioRender.com/ya768r7> (13, 19–35).

Figure 1: Schematic illustration of the mechanisms of action of selected antituberculous agents. ATP – adenosine triphosphate. Created in Biorender. Gradišek N. (2026) <https://BioRender.com/ya768r7> (13, 19–35).

Preglednica 1: Pregled protituberkuloznih zdravilnih učinkovin, razdeljenih v skupine glede na izbor, z označenimi učinkovinami, na katere sta odporni obliki MDR-TB in XDR-TB (13, 19–35).

Table 1: Overview of antituberculous drugs grouped by treatment category, with highlighted resistance to MDR-TB and XDR-TB (13, 19–35).

	Zdravilna učinkovina	Mehanizem delovanja
Zdravilne učinkovine prvega izbora	izoniazid*	zaviranje sinteze mikolnih kislin, ki tvorijo celično steno (zaviranje encima InhA)
	rifampicin*	zaviranje sinteze proteinov (zaviranje od DNA-odvisne polimeraze RNA)
	pirazinamid	različni mehanizmi delovanja; zaviranje sinteze proteinov, zniževanje nivoja ATP in pH
	etambutol	zaviranje sinteze arabinogalaktana, ključnega gradnika celične stene (zaviranje arabinozil transferaz)
Zdravilne učinkovine drugega izbora	fluorokinoloni**	zaviranje podvajanja DNA (zaviranje DNA-giraze)
	linezolid	zaviranje sinteze proteinov (zaviranje tvorbe kompleksa 70S in translacijo)
	klofazimin	vpliv na dihalno verigo in tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti
	streptomycin (inj.)**	zaviranje sinteze proteinov (vezava na podenoto ribosoma 30S)
	amikacin (inj.)**	zaviranje sinteze proteinov (vezava na podenoto ribosoma 30S)
Dopolnilne protituberkulozne učinkovine	bedakilin	zaviranje ATP-sintaze
	delamanid	zaviranje sinteze mikolnih kislin in dodaten vpliv na integriteto celične membrane
	pretomanid	zaviranje sinteze mikolnih kislin in dodaten vpliv na celično membrano

*MDR-TB – večkratno odporna oblika tuberkuloze; **XDR-TB – izredno odporna oblika tuberkuloze; ATP – adenozin trifosfat; InhA – reduktaza enoil acilnega prenašalnega proteina.

izbranih petih protituberkuloznih učinkovin, na katere so izolirane bakterije občutljive (13).

3 UVELJAVLJENA TERAPIJA IN MEHANIZMI DELOVANJA

Kemoterapevtiki, ki jih uporabljamo za zdravljenje tuberkuloze, delujejo na različne tarče (slika 1), pri čemer jih naj-

več cilja mikobakterijsko celično steno oziroma sintezne poti njenih komponent. Kar tri od štirih učinkovin prvega izbora tako vplivajo na integriteto celične stene, prav tako pa jo ciljata tudi dve izmed novih učinkovin (preglednica 1) (13, 19–35). Encim reduktaza enoil acilnega prenašalnega proteina (InhA) je uveljavljena tarča za zdravljenje tuberkuloze. Encim InhA sodeluje pri sintezi maščobnih kislin, ki jih mikobakterije potrebujejo za tvorbo celične stene. Zaviranje tega procesa privede do morfoloških sprememb v bakterijski celici in posledično njene smrti ob porušenju integritete

Preglednica 2: Pregled novih protituberkuloznih učinkovin v kliničnih preskušanjih v letu 2025 . Povzeto po (37)
Table 2: Overview of new antituberculous agents in clinical trials in 2025. Adapted from (37).

Mehanizem delovanja	Učinkovina	Faza kliničnega preskušanja
Zaviranje mikobakterijske ATP-sintaze	sudapiridin	3
Zaviralno delovanje na dihalno verigo; analog bedakilina	TBAJ-876	2
Zaviralno delovanje na dihalno verigo	telakebek	2
Zaviranje DprE1 (sinteza celične stene)	BTZ-043	2
Zaviralec DprE1 (sinteza celične stene)	kvabodepistat	2
Zaviralec DprE1 (sinteza celične stene)	TBA-7371	2
Zaviralec DprE1 (sinteza celične stene)	makozinon	1/2
Zaviranje sinteze proteinov	sutezolid	2/3
Zaviranje sinteze proteinov	delpazolid	2
Zaviranje sinteze proteinov	TBI-223	2
Zaviralec LeuRs (zaviralec sinteze proteinov)	genfeborol, GSK3036656	2
Zaviralno delovanje na mikolne kisline (komponente celične stene)	SQ109	2
Analog klofazimina	pirafizimin	2
Triciklični β-laktam (zaviranje transpeptidaze)	sanfetrinem cileksetil	2
Zaviralno delovanje na dihalno verigo; analog bedakilina	TBAJ-587	1
Zaviranje sinteze proteinov	TBD09	1
Zaviranje razgradnje mikobakterijskega holesterola	GSK2556286	1
Zaviranje mikobakterijskega holesterola	TBD11	1
Inaktivacija TetR-podobnega represorja EthR2; ojača delovanje etionamida	alpipektir * etionamid	2
Zaviranje PDE4 – imunskega odziva gostitelja	dovramilast*	2

*primer netradicionalnih protituberkuloznih učinkovin; ATP – adenzin trifosfat; PDE4 – fosfodiesteraza-4; DprE1 – dekaprenilfosforil-β-D-riboza 2'-epimeraza; LeuRs – levcil-tRNA sintetaza; TetR – transkripcijski represor odpornosti proti tetraciklinu; EthR2 – transkripcijski represor iz družine TetR, ki uravnava odpornost proti etionamidu.

membrane. Indirektni zaviralec InhA, **izoniazid**, ki je še danes del kombinacije učinkovin prvega izbora, je v uporabi že od leta 1952. Ob odkritju je predstavljal velik preboj kot najmočnejši kemoterapevtik za tuberkulozo na tržišču, ki je bil hkrati tudi cenovno dostopen in varen. Isoniazid je predzdravilo, ki se v organizmu aktivira in tvori adukt z nikotinamid adenin dinukleotidom (NAD⁺), ki nato zavira InhA. Prav stopnja aktivacije je glavni razlog za razvoj odpornosti, saj je genetski zapis za enega od encimov, udeleženih pri aktivaciji izoniazida – oksidaza-peroksidaza KatG, močno podvržen mutacijam, ki zmanjšajo delež pretvorbe izoniazida v aktiven adukt in s tem njegovo zaviralno delovanje. Ker je sam InhA manj nagnjen k spremembam, direktni zaviralci tega encima predstavljajo možno rešitev, s katero bi zaobšli odpornost proti izoniazidu in ohranili baktericidno delovanje na *M. tuberculosis* (19–21). Isoniazid se uporablja tako samostojno za preventivno zdravljenje latentne okužbe, kot v kombinaciji z ostalimi kemoterapevtiki prvega izbora za zdravljenje aktivne okužbe v primeru občutljivih oblik tuberkuloze (4–6).

Druga učinkovina prvega izbora je **rifampicin**, ki se podobno kot izoniazid uporablja samostojno za preventivno zdravljenje latentne okužbe. V primeru aktivnih okužb pa je nujna uporaba v kombinaciji, saj se ob samostojni uporabi odpornost proti rifampicinu razvije hitreje kot proti drugim učinkovinam. Za razliko od izoniazida, katerega delovanje je omejeno na mikobakterije, je rifampicin bolj širokospektralen in deluje tudi na druge bakterijske vrste. Oba sta tudi na Seznamu esencialnih zdravil SZO in na Seznamu esencialnih zdravil za uporabo v humani medicini pri Javni agenciji Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP). Rifampicin zavira od DNA odvisno RNA-polimerazo in posledično sintezo bakterijskih proteinov. Poznamo tri načine razvoja odpornosti na rifampicin, vsi pa so bili identificirani tudi pri *M. tuberculosis*. Lahko pride do strukturnih sprememb v vezavnem mestu tarče, ADP-ribozilacije rifampicina ali do povečanega delovanja izlivnih črpalk. Razen ADP-ribozilacije, o kateri do zdaj poročajo zgolj pri mikobakterijah, sta ostala mehanizma razvoja odpornosti prisotna tudi pri drugih bakterijah, na katere deluje rifampicin (22, 23).

Tretji antibiotik prvega izbora, odkrit leta 1952, je **pirazinamid**. Je edini antibiotik prvega izbora, ki deluje tudi na bakterije, ki niso v fazi replikacije in je nepogrešljiva komponenta režimov zdravljenja na zdravila občutljive oblike tuberkuloze. Selektivno deluje le na *M. tuberculosis*. Pirazinamid je predzdravilo, ki se v telesu pretvori do aktivne pirazinojske kisline. Ta je aktivna samo v kislem mediju in neaktivna v nevtralnih pogojih, kar omogoča selektivno de-

lovanje v kisli notranjosti makrofagov. Samo protonirana pirazinojska kislina namreč lahko prehaja bakterijsko celično steno in se tam ob deprotonaciji akumulira. Ker kislost okolja upada z zmanjšanjem vnetja, se hkrati z napredkom zdravljenja zmanjšuje tudi baktericidnost pirazinamida. To pojasni, zakaj se ga uporablja zgolj v prvi fazi zdravljenja in v kombinaciji z drugimi antibiotiki prvega reda. Pirazinamid deluje prek različnih mehanizmov: vpliva na membranski potencial in posledično na nivo adenozin trifosfata (ATP), niža pH v bakterijah, ustavlja *trans*-translacijo na ribosomih in zelo verjetno vpliva na sintezno pot koencima A, ki ima med drugim pomembno vlogo v sintezi maščobnih kislin, ki tvorijo celično steno. Zaradi vpliva na nivo ATP, je še posebej učinkovit v kombinaciji z drugimi učinkovinami, ki prav tako znižujejo nivo ATP (24).

Zadnjo učinkovino prvega izbora predstavlja **etambutol**, ki ga prav tako poznamo že več kot 60 let. Uporablja se v kombinaciji z ostalimi antibiotiki prvega izbora, in je tudi del terapije netuberkuloznih mikobakterijskih okužb. Etambutol je bakteriostatik, ki vpliva na sintezo arabinogalaktana, ki skupaj z mikolnimi kislinami in peptidoglikanom predstavlja ključno komponento celične stene. Mehanizem delovanja naj bi bil posledica zaviranja arabinozil transferaz in sinergističnega delovanja z izoniazidom (25).

Kot kemoterapevtiki druge linije se že več desetletij uporabljajo **fluorokinoloni**, kot sta moksifloksacin in levofloksacin. Gre za širokospektralne protibakterijske učinkovine, ki ciljajo bakterijsko DNA-girazo in s tem vplivajo na podvajanje DNA. Kljub selektivnemu delovanju na bakterijske celice, pa je njihova pretirana uporaba zaradi mutacij privedla do strukturnih sprememb v vezavnem mestu encima, kar povzroči odpornost proti tej skupini učinkovin (26, 27).

Linezolid je prav tako širokospektralen kemoterapevtik in predstavlja primer prenamembe zdravilne učinkovine, saj je bil ta antibiotik prvotno namenjen kot rezervni antibiotik za zdravljenje okužb z grampozitivnimi bakterijami. Linezolid zavira sintezo bakterijskih proteinov prek vezave na podenoto ribosoma 50S, s čimer prepreči tvorbo iniciacijskega kompleksa 70S in s tem translacijo. Poleg samega delovanja na bakterije ima tudi močno neselektivno zaviralno delovanje na monoamin oksidazo, kar lahko privede do številnih neželenih učinkov (28–30).

Naslednja učinkovina druge linije je baktericidni **klofazimin**, ki so ga prav tako odkrili v petdesetih letih prejšnjega stoletja, hkrati pa predstavlja še en primer prenamembe učinkovin. Na začetku, ko je bil namenjen zdravljenju tuberkuloze, so ga zaradi učinkovitosti ostalih antibiotikov (izoniazida in kasneje rifampicina ter etambutola) začeli uporabljati za zdravljenje gobavosti. Šele kasneje so ga

ponovno uvedli v zdravljenje tuberkuloze, saj je izkazoval učinkovitost na MDR-TB. Danes ga prav tako raziskujejo z vidika protirakavega delovanja. Čeprav so nekoč mislili, da se veže na DNA, se današnje razlage bolj nagibajo k temu, da zaradi lipofilnosti vpliva neposredno na fosfolipidno membrano in dihalno verigo, hkrati pa se ob njegovem metabolizmu v celici sproščajo reaktivne kisikove zvrsti, ki membrano dodatno poškodujejo. Ker pa med neželene učinke spada tudi reverzibilna obarvanost kože, je sodelovanje bolnikov pri zdravljenju s tem antibiotikom zelo slabo (30–32).

Zadnji sklop antibiotikov za zdravljenje MDR-TB predstavljajo tako imenovana Zdravila za injiciranje druge izbire. V ta sklop spadata tudi antibiotika **streptomycin** in **amikacin**, odpornost nanju pa zaznamuje prehod MDR-TB v XDR-TB. Tako streptomycin kot amikacin sta baktericidna aminoglikozidna antibiotika, ki se vežeta na podenoto ribosoma 30S in s tem preprečita tvorbo iniciacijskega kompleksa in nadaljnjo sintezo bakterijskih proteinov. Oba se uporabljata kot dopolnilno zdravljenje pri MDR-TB, njuno uporabo pa močno omejujeta nefrotoksičnost in ototoksičnost, zaradi katerih je treba bolnike tekom terapije skrbno spremljati (33, 34).

4 NOVE UČINKOVINE

Uveljavljena terapija s porastom odpornosti ni več zadoščala za obvladovanje bolezni, kar je spodbudilo odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin. Kljub številnim raziskavam je minilo kar 40 let do odkritja prve nove učinkovine, razvite posebej za tuberkulozo, ki je izkazovala nov mehanizem delovanja (12).

Prvo od učinkovin z alternativnim delovanjem predstavlja **bedakilin**, ki je prvi predstavnik novega strukturnega razreda, diarilkinolinonov. Bedakilin cilja v terapevtske namene predhodno neizkoriščen metabolni proces v mikobakterijski celici, in sicer pridobivanje energije, saj se selektivno veže na ATP-sintazo in zavira delovanje protonske črpalke. Učinkovina je dobila dovoljenje za promet leta 2012, ko jo je Ameriška uprava za hrano in zdravila (FDA) odobrila za zdravljenje MDR-TB v kombinaciji z drugimi učinkovinami, danes pa predstavlja ključno komponento režimov za zdravljenje MDR-TB in tudi XDR-TB. Kljub uspehom, ki jih je bedakilin dosegel v kliničnem preskušanju in kasneje v klinični rabi, pa se tudi pri bedakilinu vse hitreje pojavlja

težava odpornosti zaradi mutacij, ki privedejo do strukturnih sprememb v vezavnem mestu encima in povečanega izražanja izlivnih črpalk, dodatno pa je potrebno tudi skrbno spremljanje pacientov, saj je med neželenimi učinki tudi podaljšanje intervala QT (12, 18, 30).

Naslednji predstavnik novih učinkovin na trgu je **delamanid**, ki ga je leta 2014 odobrila Evropska agencija za zdravila (EMA). Delamanid spada v nov strukturni razred nitroimidazooksozazolov in je predzdravilo, ki deluje tudi na bakterijske celice, ki niso v fazi delitve. Delamanid zavira sintezo mikolnih kislin in vpliva na celično dihanje, pri čemer sam mehanizem še ni povsem pojasnjen. K baktericidnemu delovanju dodatno pripomore tvorba reaktivnih dušikovih zvrsti, ki se tvorijo ob njegovem metabolizmu. Ker je bil do sedaj v klinični rabi v primeru MDR-TB uporabljen le v redkih primerih, še ni dovolj podatkov, da bi povsem razumeli njegovo delovanje in razvoj odpornosti, ki se lahko zaradi večtarčnega mehanizma delovanja izrazi na različne načine, najpogostejše pri encimih, potrebnih za aktivacijo (18, 30). Najnovejša protituberkulozna učinkovina na trgu je **pretomanid**, ki ga je FDA odobrila leta 2019, EMA pa eno leto kasneje. Gre za nitroimidazooksozazol, ki deluje tudi na bakterije, ki niso v fazi podvojevanja. To je povezano z metabolizmom učinkovine in tvorbo reaktivnih dušikovih zvrsti. Sam pretomanid tako kot delamanid zavira tudi sintezo mikolnih kislin in s tem vpliva na integriteto celične stene. Pretomanid dodatno predstavlja odlično alternativo dolгим režimom zdravljenja MDR-TB, saj je v kliničnih preskušanjih izkazoval bistveno krajši čas zdravljenja ob sočasnem jemanju bedakilina, linezolida in moksifloksacina, prav tako je bil uspešen v kombinaciji z bedakilinom in linezolidom. Kljub omenjeni učinkovitosti so že zabeležili pojav bakterijske odpornosti, ki je povezana z mutacijo petih genov, prav tako so opazili odpornost v bakterijah, odpornih na delamanid (30, 35, 36).

V 2025 je bilo v procesu kliničnih preskušanj kar 20 novih učinkovin za zdravljenje tuberkuloze, pri čemer je bila ena v tretji, petnajst v drugi in štiri v prvi fazi kliničnega preskušanja (preglednica 2). Osemnajst spojin s seznama predstavljajo različne protimikrobne učinkovine, dve spojini pa delujeta nekoliko drugače; 1) alipibektir je predstavljen kot podporna učinkovina etionamidu za zdravljenje MDR-TB, 2) dovramilast pa cilja naš imunski sistem in zavira vnetni odziv. Med novimi antibiotičnimi spojinami je največ takih, ki delujejo na celično steno, pri čemer ciljajo nove tarče, ki so udeležene v sintezo arabinogalaktana in transport mikolnih kislin do celične stene. Hkrati je v testiranju več zaviralcev sinteze bakterijskih proteinov in spojin z delovanjem na dihalno verigo, med njimi tudi analog bedakilina. Pri tu-

berkulozi poleg kliničnih preskušanj novih učinkovin raziskujejo tudi nove kombinacije učinkovin ter stremijo predvsem k skrajšanju režimov zdravljenja. V letu 2024 je tako potekalo več študij učinkovitosti in varnosti skrajšanih režimov zdravljenja, dodatno je v kliničnem preskušanju tudi petnajst novih cepiv (7, 37).

5 SKLEP

Novoodkrite protibakterijske učinkovine predstavljajo pomemben korak v boju proti odpornim oblikam *M. tuberculosis*, a žal niso brez neželenih učinkov, kar predstavlja dodaten izziv z vidika sodelovanja bolnikov pri zdravljenju. V ta namen trenutne raziskave potekajo predvsem v smer skrajšanja terapij, v kliničnih preskušanjih pa niso le nove učinkovine, ampak tudi novi, krajši terapevtski režimi. Hkrati se pojavljajo primeri odpornosti proti novim učinkovinom, zaradi česar je ključna previdnost pri predpisovanju le-teh in spremljanju poteka zdravljenja (38). Kljub pojavi odpornosti, s katero se danes srečujemo in predstavlja glavni problem v razvitih državah, pa je tuberkuloza v večini primerov s pravim pristopom vseeno ozdravljiva. Po drugi strani se slabše razvite države, kjer je incidenca tuberkuloze največja, spopadajo z omejenim dostopom do protituberkuloznih učinkovin, kar onemogoča obvladovanje bolezni. Čeprav si SZO prizadeva, da bi do leta 2030 zmanjšali število novih primerov za 80 % in smrtne izide za 90 %, je ta cilj trenutno kljub napredku v razvoju novih zdravilnih učinkovin še daleč, bolezen pa bo zelo težko izkoreniniti, dokler vsem ne omogočimo dostopa do zdravil (7, 39, 40).

6 LITERATURA

1. Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, et al. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare* 2023; 11(13):1946.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance. [Internet]. Geneva: WHO; [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023. 1st ed. Geneva: WHO; 2023 [citirano 22. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>.
4. Molhave M, Wejse C. Historical review of studies on the effect of treating latent tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 2020; 92(Suppl 1):S31-S36.
5. Huaman MA, Sterling TR. Treatment of latent tuberculosis infection: an update. *Clin Chest Med.* 2019; 40(4):839-848.
6. World Health Organization. Identifying populations for TB preventive treatment | TB Knowledge Sharing. [Internet]. Geneva: WHO; [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://tbksp.who.int/en/node/1990>
7. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024. 1st ed. Geneva: WHO; 2024 [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>.
8. National Institute of Public Health (Slovenia). Aktualni podatki o tuberkulozi v Sloveniji [Internet]. 2025 Sep 30 [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://niz.si>
9. National Institute of Public Health (Slovenia). Tuberkuloza | CEPLJENJE.info [Internet]. [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.cepljenje.info/tuberkuloza>
10. Dahl V, Migliori GB, Lange C, Wejse C. War in Ukraine: an immense threat to the fight against tuberculosis. *Eur Respir J.* 2022; 59(4):2200123.
11. TB Alliance. Antimicrobial resistance [Internet]. [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.tballiance.org/antimicrobial-resistance>
12. van Heeswijk RPG, Dannemann B, Hoetelmans RMW. Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug-drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(9):2310-2318.
13. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment and care. Geneva: World Health Organization; 2025. ISBN 978-92-4-010724-3
14. Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5(9):a017863.
15. MedicineNet. What is the difference between multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB)? [Internet]. [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: https://www.medicinenet.com/multidrug-resistant_vs_extensively_drug-resistant_tb/article.htm
16. European Centre for Disease Prevention and Control; World Health Organization Regional Office for Europe. European Union standards for tuberculosis care. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2018.
17. Ignatius EH, Dooley KE. New drugs for the treatment of tuberculosis. *Clin Chest Med.* 2019; 40(4):811-828.
18. Zhu H, Zhou X, Zhuang Z, Li L, Bi J, Mi K. Advances of new drugs bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis in children. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13:1183597.
19. Pajk S, Živec M, Šink R, Sosič I, Neu M, Chung C, et al. New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold. *Eur J Med Chem.* 2016; 112:252-257.
20. Wahan SK, Bhargava G, Chawla V, Chawla PA. Unlocking InhA: novel approaches to inhibit Mycobacterium tuberculosis. *Bioorg Chem.* 2024; 146:107250.
21. Prasad MS, Bhole RP, Khedekar PB, Chikhale RV. Mycobacterium enoyl acyl carrier protein reductase (InhA): a key target for antitubercular drug discovery. *Bioorg Chem.* 2021; 115:105242.



22. Hardie KR, Fenn SJ. JMM profile: rifampicin: a broad-spectrum antibiotic. *J Med Microbiol*. 2022; 71(8):001566.
23. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 2001; 104(6):901-912.
24. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol Spectr*. 2013; 2(4):1-12.
25. Lee N, Patel P, Nguyen H. Ethambutol. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan
26. Aldred KJ, Blower TR, Kerns RJ, Berger JM, Osheroff N. Fluoroquinolone interactions with *Mycobacterium tuberculosis* gyrase: enhancing drug activity against wild-type and resistant gyrase. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2016; 113(7):E839-E846.
27. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Fluoroquinolones. In: *LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury* [Internet]. Bethesda (MD): NIDDK; 2012 [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>
28. Azzouz A, Preuss CV. Linezolid. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539793/>
29. Zahedi Bialvaei A, Rahbar M, Yousefi M, Asgharzadeh M, Samadi Kafil H. Linezolid: a promising option in the treatment of Gram-positives. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(2):354-364.
30. Aguilar Diaz JM, Abulfathi AA, te Brake LH, van Ingen J, Kuipers S, Magis-Escurra C, et al. New and repurposed drugs for the treatment of active tuberculosis: an update for clinicians. *Respiration* 2023; 102(2):83-100.
31. Nugraha RV, Yunivita V, Santoso P, Aarnoutse RE, Ruslami R. Clofazimine as a treatment for multidrug-resistant tuberculosis: a review. *Sci Pharm*. 2021; 89(2):19.
32. Silva DR, Dalcolmo M, Tiberi S, Arbex MA, Munoz-Torrico M, Duarte R, et al. New and repurposed drugs to treat multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2018; 44(2):153-160.
33. Waters M, Tadi P. Streptomycin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025
34. Sizar O, Rahman S, Sundareshan V. Amikacin. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023
35. Deb U, Biswas S. Pretomanid: the latest US FDA-approved anti-tuberculosis drug. *Indian J Tuberc*. 2021; 68(2):287-291.
36. TB Alliance. Pretomanid and the BPaL regimen [Internet]. [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.tballiance.org/pretomanid>
37. World Health Organization. Analysis of antibacterial agents in clinical and preclinical development: overview and analysis 2025. Geneva: WHO; 2025 [Internet]. [citirano 22. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240113091>
38. Negi A, Perveen S, Gupta R, Singh PP, Sharma R. Unraveling dilemmas and lacunae in the escalating drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline, delamanid, and pretomanid. *J Med Chem*. 2024; 67(4):2264-2286.
39. World Health Organization. TB-Trials [Internet]. Geneva: WHO; [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.who.int/trialsearch/tb-trials>
40. Working Group for New TB Drugs. Pipeline [Internet]. [citirano 23. oktober 2025]. Dostopano na: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline>

KOVALENTNA VEZAVA PRI ZDRAVILNIH UČINKOVINAH – NAJ JO IŠČEMO ALI SE JI IZOGIBAMO?

COVALENT BINDING DRUGS – SOMETHING TO BE SOUGHT OR SHUNNED?

AVTORJI / AUTHORS:

asist. dr. Nika Strašek Benedik, mag. biokem.

asist. Vid Kavaš, mag. farm.

doc. dr. Anže Meden, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: anze.meden@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Kovalentne zdravilne učinkovine imajo pomembno vlogo v humani medicini. S tvorbo stabilnih kovalentnih vezi s specifičnimi aminokislinskimi ostanki v svojih makromolekularnih tarčah dosežejo močnejše in dolgotrajnejše terapevtske učinke kot klasične učinkovine, ki izkoriščajo le reverzibilne interakcije. Njihovo dolgo zadrževanje na tarči omogoča redkejšo odmerjanje, kar lahko zmanjša pojav neželenih učinkov. Vseeno pa razvoj kovalentnih zdravilnih učinkovin ni brez izzivov, saj pomisleki glede izventarčne vezave in potencialne imunogenosti zahtevajo skrbno načrtovanje in optimizacijo za zagotavljanje varnosti in učinkovitosti. V zadnjem desetletju je prišlo do bistvenega napredka na področju načrtovanja, selektivnosti in razumevanja mehanizmov delovanja kovalentnih zdravilnih učinkovin, kar je omogočilo razvoj novih zdravil, zlasti v onkologiji, infektologiji in nevrologiji. Sodobne kovalentne zdravilne učinkovine dokazujejo, da je s premišljenim pristopom mogoče oblikovati učinkovite, selektivne in varne kovalentne učinkovine z velikim terapevtskim potencialom.

KLJUČNE BESEDE:

bojna glava, ireverzibilni zaviralci, kovalentne zdravilne učinkovine, načrtovanje zdravilnih učinkovin

ABSTRACT

Covalent drugs play an important role in human medicine. By forming stable covalent bonds with specific amino acid residues of their macromolecular targets, they can achieve stronger and longer-lasting therapeutic effects than conventional drugs, which form reversible interactions. Their prolonged target residence allows for less frequent dosing, which can reduce the incidence of adverse effects. However, the development of covalent drugs is not without challenges, as concerns about off-target binding and potential immunogenicity require careful design and optimization to ensure safety and efficacy. Over the past decade, significant progress has been made in the design, selectivity, and mechanistic understanding of covalent drugs, enabling the development of new therapeutics, especially in oncology, infectious diseases, and neurology. Modern covalent drugs demonstrate that with careful consideration and design effective, selective, and



safe covalent drugs with high therapeutic potential can be developed.

KEY WORDS:

covalent drugs, drug design, irreversible inhibitors, warhead

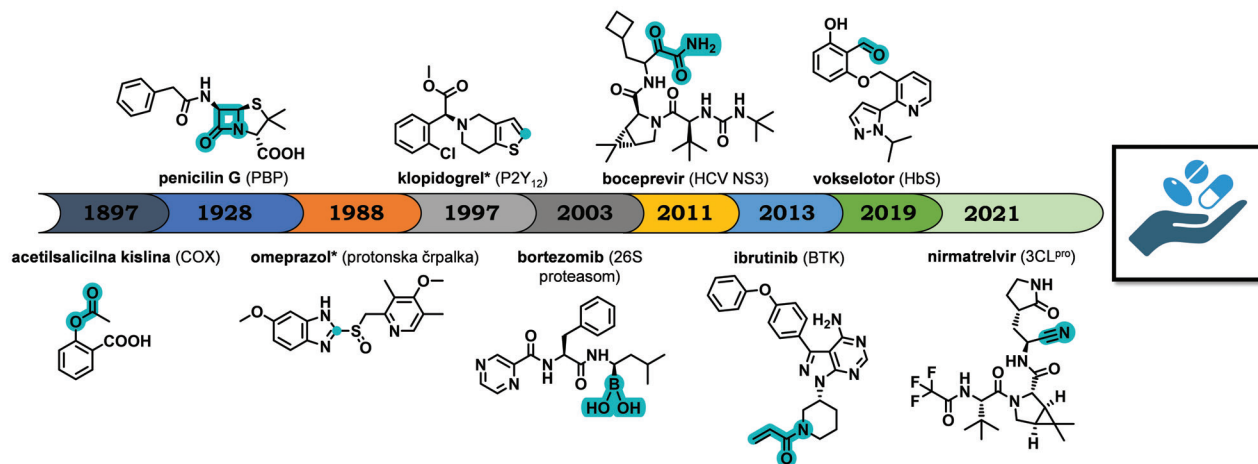
1 UVOD

V zadnjih dveh stoletjih je odkrivanje novih zdravilnih učinkovin (ZU) bistveno prispevalo k napredku medicine in omogočilo obvladovanje bolezni, ki so bile v preteklosti neozdravljive. Pomemben razred ZU so t. i. kovalentne zdravilne učinkovine (kZU), katerih delovanje temelji na tvorbi kovalentne vezi z njihovo makromolekularno tarčo. Čeprav je v preteklosti kemijska reaktivnost ZU pogosto vzbujala zadržke, danes razvoj kZU doživlja preporod. To je predvsem posledica boljšega razumevanja njihovega delovanja, večje selektivnosti in naraščajočega števila uspešnih primerov iz klinične prakse (1–3).

2 ZGODOVINSKI RAZVOJ KOVALENTNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN TER UPORABA V KLINIČNI PRAKSI

Prve kZU, ki delujejo na osnovi kovalentne vezave, so bile odkrite že na koncu 19. in v začetku 20. stoletja, na primer β -laktamski antibiotiki (penicilini) in acetilsalicilna kislina. Vendar pa so v drugi polovici 20. stoletja zaradi zavedanja o nespecifični vezavi, imunogenosti in toksičnosti reaktivnih spojin tovrstne učinkovine postale nezaželene in so jih začeli izločevati že v zgodnjih fazah razvoja zdravil. Veliko kZU se je dolgo uporabljalo, ne da bi poznali njihov kovalenten mehanizem delovanja: najširše uporabljana ZU, acetilsalicilna kislina, je kovalenten zaviralec ciklooksigenaze, vendar so njen mehanizem delovanja odkrili šele leta 1971, 72 let po njenem prihodu na trg (1, 3).

Ponovni zagon načrtnega razvoja kZU se je zgodil po letu 2013 z uspešno registracijo ibrutiniba (slika 1), zaviralca Brutonove tirozin kinaze. Od takrat kZU predstavljajo pomemben del razvojnih programov tudi v velikih farmacevtskih podjetjih, kar se odraža v vse večjem številu znan-



Slika 1: Pregled razvoja kovalentnih zdravilnih učinkovin v zadnjih dveh stoletjih. V oklepajih so navedene njihove tarčne makromolekule, letnica označuje čas odkritja ali prihoda na trg. Z zeleno so označene elektrofilne funkcionalne skupine (bojne glave), z zvezdico pa tiste učinkovine, ki postanejo reaktivne šele po biološki aktivaciji. Prirejeno po (1). COX – ciklooksigenaza, PBP – peniciline vezoči proteini, P2Y₁₂ – purinergični receptor P2Y₁₂, HCV NS3 – nestrukturni protein 3 virusa hepatitisa C, BTK – Brutonova tirozin kinaza, HbS – hemoglobin S, 3CL^{pro} – 3C-podobna proteaza.

Figure 1: An overview of the development of covalent drugs over the past two centuries. Their macromolecular targets are listed in parentheses, the years indicate either the discovery or market entry year. Electrophilic functional groups (warheads) are highlighted in green, and an asterisk marks compounds in which the reactive site becomes exposed only after biological activation. Adapted from (1). COX – cyclooxygenase, PBP – penicillin-binding proteins, P2Y₁₂ – purinergic receptor P2Y₁₂, HCV NS3 – hepatitis C virus nonstructural protein 3, BTK – Bruton tyrosine kinase, HbS – haemoglobin S, 3CL^{pro} – 3C-like protease.

KLJUČNI POUDARKI

- Kovalentne zdravilne učinkovine tvorijo (stabilne) kovalentne vezi s tarčami, kar omogoča močnejše, dolgotrajnejše delovanje in redkeje odmerjanje.
- Tovrstne učinkovine imajo pomembno vlogo predvsem v onkologiji, infektologiji in nevrologiji – na primer ibrutinib, amoksicilin, nirmatrelvir, rivastigmin.
- Napredek v zadnjih desetletjih je zmanjšal pomisleke o nespecifični reaktivnosti, saj je z optimizacijo reaktivnosti »bojnih glav« možno doseči visoko selektivnost in zmanjšati neželene učinke.
- Reverzibilni kovalentni zaviralci združujejo prednosti kovalentne vezave z boljšo varnostjo zaradi nadzorovanega razpada kovalentnega kompleksa.
- Na UL FFA razvijajo nove kovalentne zaviralce za proteaze, MurA, imunoproteasom, transpeptidaze in tarče, udeležene v nevrodegenerativnih boleznih.

stvenih objav in novih kZU, ki so prišle na trg. Lani je bilo na trgu že več kot 55 kZU, katerih letna tržna vrednost presega 50 milijard ameriških dolarjev (1, 4).

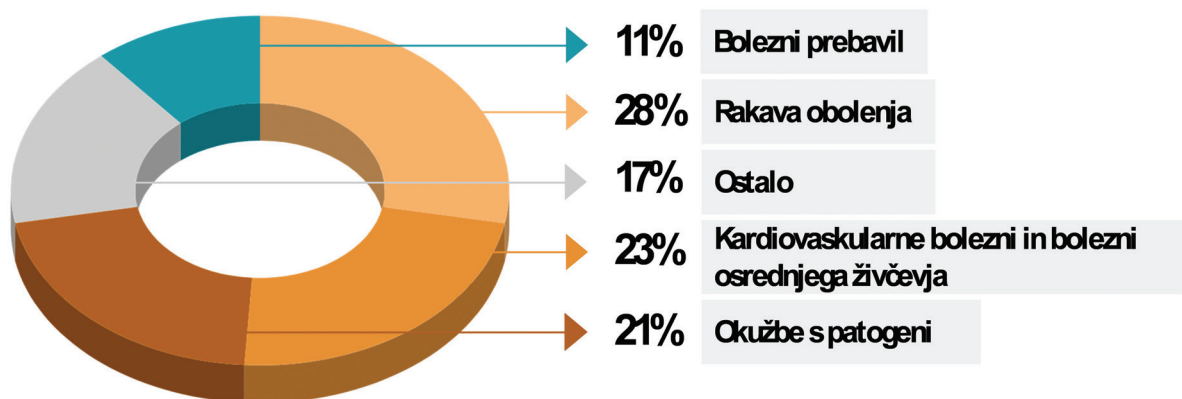
Največji delež kZU se uporablja v onkologiji (28 %), kamor spadajo afatinib, ibrutinib, osimertinib, adagrazib, dacomitinib in akalabrutinib. Sledijo zdravila za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni in bolezni osrednjega živčevja (23 %), kot so saksagliptin, klopido­gre­l, vokselotor, rivastigmin in razagilin. Približno 21 % kZU se uporablja za zdravljenje okužb s patogeni, kamor uvrščamo peniciline, cefalosporine, fosfomicin, nirmatrelvir, telaprevir in boceprevir. Manjši,

a klinično pomemben delež (11 %) kZU, predstavljajo ZU za bolezni prebavil, predvsem zaviralci protonske črpalke (slika 2) (5).

V zadnjih letih se raziskave intenzivno usmerjajo v razvoj reverzibilnih kovalentnih zaviralcev, ki združujejo prednosti kovalentne vezave in prilagajanje trajanja učinka (moduliranje hitrosti razpada kZU-tarča), s čimer se zmanjša tveganje za neželene učinke (6). Veliko pozornosti se namenja tudi selektivnemu ciljanju proteinov, ki so težko dostopni za modulacijo z malimi molekulami (angl. *undruggable*), kot so transkripcijski faktorji in regulatorji signalnih poti, in razvoju kovalentnih himernih razgrajevalcev (molekul PRO-TAC) (7–9).

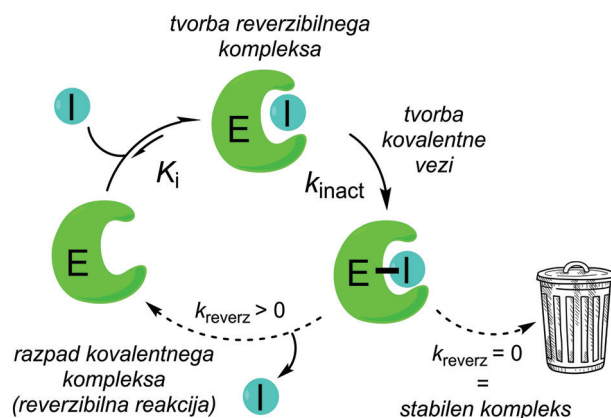
3 MEHANIZEM DELOVANJA

Večina kZU v svoji strukturi vsebuje reaktivno funkcionalno skupino, t. i. bojno glavo, ki je najpogostejše elektrofilne narave. Ta se kovalentno veže na nukleofilni aminokislinski ostanek v tarčnem proteinu, kot so cistein, serin, histidin ali lizin. V primeru encimov gre pogosto za katalitične ostanke, ki imajo povečano reaktivnost. Izbira bojne glave ima ključen vpliv na selektivnost, jakost delovanja in varnostni profil kZU. Med najpogostejše uporabljenimi so akrilamidi, kloroacetamidi in nitrili, saj omogočajo natančno modulacijo reaktivnosti in so hkrati dovolj varni (5, 10–11).



Slika 2: Razporeditev registriranih kZU po področjih uporabe. Povzeto po (5).

Figure 2: Distribution of therapeutic areas of covalent drugs. Adapted from (5).



Slika 3: Dvostopenjski proces vezave kovalentnega zaviralca (I) na encim (E). Povzeto po (3).

Figure 3: The covalent inhibitor (I) binds to the enzyme (E) in a two-step process. Adapted from (3).

Poseben razred predstavljajo tarčni kovalentni zaviralci (angl. *targeted covalent inhibitor*, TCI), ki najprej prepoznajo tarčo preko specifičnih nekovalentnih interakcij, nato pa ob ugodni orientaciji tvorijo kovalentno vez z bližnjim nekatalitičnim aminokislinskim ostankom, običajno cisteinom. Primer takšne učinkovine je sotorasib, ki selektivno cilja onkogeno mutacijo Gly12Cys v proteinu K-Ras, pri čemer izkorišča mutirani ostanek za selektivno tvorbo kovalentne vezi. Ta strategija omogoča visoko specifičnost znotraj družine sorodnih proteinov, medtem ko uporaba nizko reaktivnih bojnih glav, kot so na primer akrilamidi, zmanjšuje tveganje neselektivne vezave na izventarčne proteine (12, 13).

Še en pomemben razred so t. i. »samomorilski zaviralci« (angl. *mechanism-based oz. suicide inhibitors*), ki sami po sebi niso reaktivni, njihova bojna glava se namreč razkrije šele med encimsko katalizirano pretvorbo, ki hkrati vodi do trajne inaktivacije encima. Primeri teh so klavulanska kislina (β -laktamazni zaviralec), eflornitin (zaviralec ornitin dekarboksilaze), selegilin (zaviralec monoamin oksidaze) in vigabatrin (zaviralec γ -aminobutanojska kislina aminotransferaze) (14, 15).

Vezava kZU običajno poteka v dveh korakih. Prvi je nekovalentno prepoznavanje tarče, ki temelji na klasičnih interakcijah (vodikove vezi, ionske interakcije, van der Waalove sile, interakcije π - π in kation- π) in je opisan z vezavno konstanto K_i . V drugem koraku, ko sta bojna glava in tarča ustrezno orientirani in v bližini, sledi kovalentna reakcija, katere hitrost določa konstanta k_{inact} (slika 3). Za primerjavo učinkovitosti kZU se pogosto uporablja razmerje k_{inact}/K_i , ki povezuje obe fazi vezave.

Srednje inhibitorne koncentracije (IC_{50}) so za katakterizacijo kZU neustrezne, saj se z daljšo predinkubacijo liganda z encimom vrednost IC_{50} znižuje. Vseeno so lahko uporabne kot presejalni test za identifikacijo potencialnih kovalentnih zaviralcev (16, 17).

Kovalentna interakcija med kZU in tarčo je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. Za ireverzibilne zaviralce velja, da je razpad kovalentnega kompleksa počasnejši od sinteze tarče *de novo* ($k_{reverz} = 0$ ali $k_{reverz} < k_{de novo}$ sinteza, slika 3). Pri reverzibilnih kZU pa kompleks razpade hitreje, kar omogoča natančnejšo regulacijo aktivnosti in manjšo verjetnost haptentizacije, torej nastanka imunogenih produktov. Znani primeri reverzibilnih kZU so vildagliptin in saksagliptin (zaviralca dipeptidil peptidaze 4; tvorba iminoetra), boceprevir (zaviralec nestrukturnega proteina 3 virusa hepatitisa C; tvorba hemiketala), bortezomib (proteasomski zaviralec; tvorba boronatega estera), rivastigmin (zaviralec holin esteraze; tvorba karbamata) (18, 19).

V primerjavi s klasičnimi ZU, ki delujejo izključno prek reverzibilnih interakcij, imajo kZU več prednosti (slika 4). Z ustreznim načrtovanjem, ki vključuje zmanjšanje reaktivnosti bojne glave ter optimizacijo nekovalentnih interakcij v začetnem kompleksu EI (slika 3), je mogoče doseči boljšo jakost delovanja. Zaradi nižjih odmerkov se zmanjšuje tveganje za nespecifične učinke in toksičnost, saj afiniteta do tarče ni več odvisna le od klasičnih interakcij, temveč jo dodatno okrepi kovalentna vez. Kljub skrbnemu načrtovanju vseeno ne moremo predvideti ali preprečiti vseh možnih nezaželenih učinkov, ki vključujejo tudi preobčutljivostne reakcije in haptentizacijo, zato je potrebno temeljito testiranje v predklinični in klinični fazah razvoja novih kZU (2–5, 20).

4 NAČRTOVANJE IN RAZVOJ NOVIH KOVALENTNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Načrtovanje novih kZU lahko v grobem razdelimo na dva glavna pristopa. Prvi temelji na izhodiščnem nekovalentnem ligandu, kjer v strukturo liganda načrtno vgradimo elektrofilno bojno glavo, ki je sposobna reagirati s točno določenim aminokislinskim ostankom v tarči. Za ta pristop običajno potrebujemo kristalno strukturo kompleksa ligand-tarča, pri načrtovanju pa si pomagamo s številnimi računalniškimi metodami. Z uporabo tega principa sta bila razvita zaviralca tirozin kinaz: ib Brutinib in afatinib. Drugi pristop temelji na rešetanju knjižnic elektrofilnih spojin, kjer najprej identificiramo kovalentne ligande, nato pa z nadaljnjo optimizacijo in struk-

PREDNOSTI

- večja jakost delovanja
- večja učinkovitost ligandov (angl. *ligand efficiency*)
- dolgo zadrževanje na tarči in daljši učinek
- uporaba nižjih odmerkov
- manj verjeten pojav odpornosti pri onkoloških in protimikrobnih kZU
- možno je ciljanje proteinov, ki so težko dostopni za modulacijo z malimi molekulami
- selektivnost pri TCI
- učinek traja tudi po izločitvi proste kZU iz telesa
- po tvorbi kovalentne vezi ni več substratne kompeticije pri encimskih tarčah
- tipično ugodnejše ADME lastnosti, manjša molekulska masa

SLABOSTI

- neselektivna vezava na izventarčne makromolekule in posledično neželeni učinki (hepatotoksičnost, mutagenost, kancerogenost ...)
- možna haptizacija, alergijski odziv, preobčutljivostne reakcije
- zahtevnejše načrtovanje, razvoj in vrednotenje

Slika 4: Prednosti in slabosti kovalentnih zaviralcev (3, 5, 16). ADME – absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje, kZU – kovalentna zdravilna učinkovina, TCI – tarčni kovalentni zaviralci.

Figure 4: Advantages and disadvantages of covalent inhibitors (3, 5, 16). ADME – absorption, distribution, metabolism, elimination, kZU – covalent binding drug, TCI – targeted covalent inhibitors.

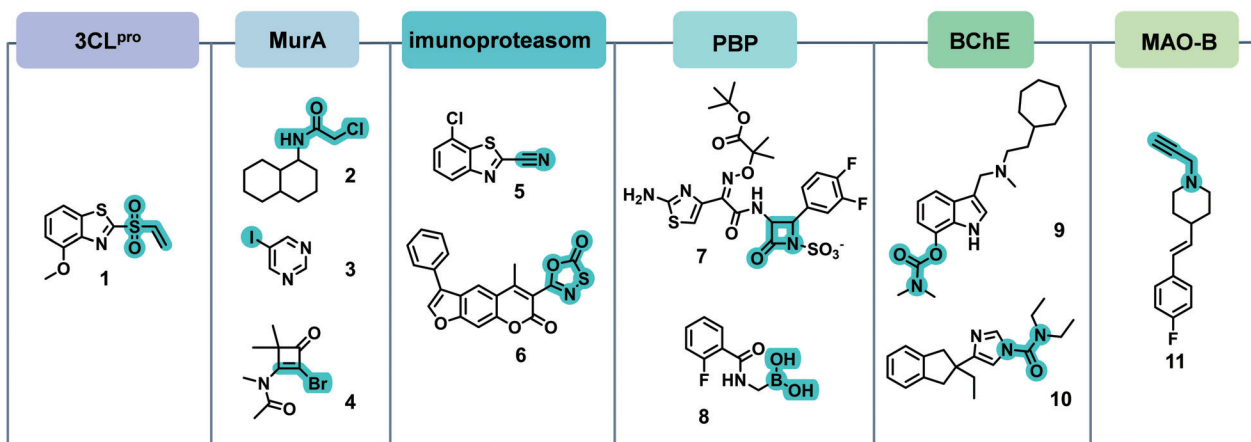
turno podprtim načrtovanjem izboljšamo njihove nekovalentne interakcije z izbrano tarčo. K temu pristopu sodi tudi t. i. »*fragment growing*«, kjer identificiramo reaktivni fragment z elektrofilno bojno glavo, ki mu nato postopoma dodajamo substituentne ter s tem povečujemo afiniteto do izbrane tarče prek nekovalentnih interakcij. Ta metoda omogoča širše preiskovanje kemijskega prostora in je posebej uporabna v zgodnjih fazah odkrivanja zdravilnih učinkovin (1, 10).

Za identifikacijo zadetkov pri obeh pristopih se poleg encimske kinetike pogosto uporabljajo še masna spektrometrija in kemoproteomske metode. Med slednjimi izstopa profiliranje proteinov na osnovi aktivnosti (angl. *activity-based protein profiling*, ABPP), ki omogoča neposredno oceno encimske aktivnosti s pomočjo kemično reaktivnih sond. Te poleg bojne glave vključujejo še poročevalni element, ki omogoča zaznavo vezave, denimo fluorofor ali biotin (21).

4.1 RAZVOJ NOVIH KOVALENTNIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN NA FAKULTETI ZA FARMACIJO

Na Katedri za farmacevtsko kemijo, na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, se že dalj časa ukvarjamo z načrto-

vanjem, sintezo in vrednotenjem novih kovalentnih zaviralcev različnih encimskih tarč. Na sliki 5 je predstavljenih nekaj primerov iz raziskovalnih projektov naše raziskovalne skupine v zadnjih desetih letih. Vinil sulfon (slika 5-1) je bil v času covid-19 identificiran kot kovalenten zaviralec glavne proteaze (3CL^{pro}) virusa SARS-CoV-2 (22). Kloroacetamid (slika 5-2) je bil znotraj serije najmočnejši kovalentni zaviralec UDP-*N*-acetilglukozamin enolpiruvil transferaze MurA, ki je udeležena v sintezi bakterijske celične stene (23). Kovalentna zaviralca MurA sta tudi 5-iodopirimidin (slika 5-3) in bromo-ciklobutenaminon (slika 5-4) (24, 25). 2-cianobenzotiazol (slika 5-5) in psoralenski derivat (slika 5-6) sta bila razvita kot zaviralca podenote β 5i človeške imunoproteasoma (26, 27). Kot zaviralci transpeptidaze penicilin vezočega proteina 1b (PBP1b) iz *Streptococcus pneumoniae* so bili razviti monobaktami, kot je spojina (slika 5-7) (28), in boronska kislina (slika 5-8), ki reagira z lizinom v PBP1b (29). Na področju nevrodegenerativnih bolezni smo odkrili *O*-aril karbamat (slika 5-9) kot psevdoirverzibilen zaviralec človeške butirilholin esteraze ter spojino na sliki 5-10. Slednja je plejotropno predzdravilo, ki karbamoilira in hkrati zavre butirilholin esterazo, ob tem se sprosti druga ZU, α_2 antagonist atipamezol, ki zavre hiperfosforilacijo proteina tau (30, 31). *Trans*-izomer 1-pro-



Slika 5: Nekaj primerov kovalentnih zaviralcev, ki so bili v zadnjih 10 letih razviti v raziskovalni skupini na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. 3CL^{pro} – 3C-podobna proteaza, MurA – UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvil transferaza, PBP – peniciline vezoči proteini, BChE – butirilholin esteraza, MAO-B – monoamin oksidaza B.

Figure 5: Selected examples of covalent inhibitors developed in the past 10 years by our research group at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana. 3CL^{pro} – 3C-like protease, MurA – UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, PBP – penicillin-binding proteins, BChE – butyrylcholinesterase, MAO-B – monoamine oxidase B.

pargil-4-stirilpiperidina (slika 5-**11**) je selektiven zaviralec monoamin oksidaze B (MAO-B), medtem ko njegov *cis*-izomer selektivno zavira izoformo A. Spojini sta primerni kot vodnici za razvoj novih ZU za zdravljenje depresije in Parkinsonove bolezni (32).

5 SKLEP

Kovalentne zdravilne učinkovine predstavljajo sodoben in racionalen pristop k razvoju ZU. Njihova sposobnost tvorbe stabilnih vezi s tarčo omogoča dolgotrajno in močnejše delovanje, redkejšo odmerjanje ter potencialno manj neželenih učinkov, kar jih postavlja v ospredje predvsem pri zdravljenju onkoloških, infekcijskih in nevroloških bolezni. Čeprav je njihov razvoj povezan z izzivi, kot sta netarčna vezava in morebitna imunogenost, napredek na področju načrtovanja, profiliranja in optimizacije omogoča zasnovo učinkovitih, selektivnih in varnih kovalentnih učinkovin. Z uravnoteženjem reaktivnosti in selektivnosti se kZU uveljavljajo kot pomembno orodje sodobne farmacije pri reševanju kompleksnih terapevtskih izzivov.

6 LITERATURA

- Boike L, Henning NJ, Nomura DK. Advances in covalent drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 Dec;21(12):881–98.
- Kim H, Hwang YS, Kim M, Park SB. Recent advances in the development of covalent inhibitors. *RSC Med Chem.* 2021 May 4;12(7):1037.
- Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Apr;10(4):307–17.
- Raouf YS. Covalent Inhibitors: To Infinity and Beyond. *J Med Chem.* 2024 July 11;67(13):10513–6.
- Sutanto F, Konstantinidou M, Dömling A. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC Med Chem.* 2020 Aug 19;11(8):876–84.
- Faridoun, Ng R, Zhang G, Li JJ. An update on the discovery and development of reversible covalent inhibitors. *Med Chem Res.* 2023 June 1;32(6):1039–62.
- Schiemer J, Maxwell A, Horst R, Liu S, Uccello DP, Borzilleri K, et al. A covalent BTK ternary complex compatible with targeted protein degradation. *Nat Commun.* 2023 Mar 2;14(1):1189.
- Bond MJ, Chu L, Nalawansa DA, Li K, Crews CM. Targeted Degradation of Oncogenic KRASG12C by VHL-Recruiting PROTACs. *ACS Cent Sci.* 2020 Aug 26;6(8):1367–75.
- Fu MJ, Jin H, Wang SP, Shen L, Liu HM, Liu Y, et al. Unleashing the Power of Covalent Drugs for Protein Degradation. *Med Res Rev.* 2025;45(4):1045–76.

10. Mehta NV, Degani MS. The expanding repertoire of covalent warheads for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2023 Dec 1;28(12):103799.
11. Huang F, Han X, Xiao X, Zhou J. Covalent Warheads Targeting Cysteine Residue: The Promising Approach in Drug Development. *Molecules*. 2022 Nov 10;27(22):7728.
12. Gehring M, Laufer SA. Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J Med Chem*. 2019 June 27;62(12):5673–724.
13. Hillebrand L, Liang XJ, Serafim RAM, Gehring M. Emerging and Re-emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: An Update. *J Med Chem*. 2024 May 23;67(10):7668–758.
14. Pratt RF. On the definition and classification of mechanism-based Enzyme Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 1992;2(11):1323–6.
15. Copeland RA. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists* [Internet]. Wiley; 2013. Available from: <https://books.google.si/books?id=.5yubYumdqwC>
16. De Cesco S, Kurian J, Dufresne C, Mittermaier AK, Moitessier N. Covalent inhibitors design and discovery. *Eur J Med Chem*. 2017 Sept;138:96–114.
17. Strelow JM. A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov*. 2017 Jan 1;22(1):3–20.
18. Patel D, Huma ZE, Duncan D. Reversible Covalent Inhibition—Desired Covalent Adduct Formation by Mass Action. *ACS Chem Biol*. 2024 Apr 19;19(4):824–38.
19. Gao J, Nobile V. Chapter Three - Chemistry perspectives of reversible covalent drugs. In: Ward RA, Grimster NP, editors. *The Design of Covalent-Based Inhibitors* [Internet]. Academic Press; 2021. p. 75–94. (Annual Reports in Medicinal Chemistry; vol. 56). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065774320300671>
20. Baillie TA. Targeted Covalent Inhibitors for Drug Design. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(43):13408–21.
21. Chan WC, Sharifzadeh S, Buhrlage SJ, Marto JA. Chemoproteomic methods for covalent drug discovery. *Chem Soc Rev*. 2021 Aug 2;50(15):8361.
22. Mihalovits LM, Kollár L, Bajusz D, Knez D, Bozovičar K, Imre T, et al. Molecular Mechanism of Labelling Functional Cysteines by Heterocyclic Thiones. *ChemPhysChem*. 2024;25(1):e202300596.
23. Grabrijan K, Hrast M, Proj M, Dolšak A, Zdovc I, Imre T, et al. Covalent inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzyme MurA with chloroacetamide warhead. *Eur J Med Chem*. 2022;243:114752.
24. Keeley A, Ábrányi-Balogh P, Hrast M, Imre T, Ilaš J, Gobec S, et al. Heterocyclic electrophiles as new MurA inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2018;351(12):1800184.
25. Hamilton DJ, Ábrányi-Balogh P, Keeley A, Petri L, Hrast M, Imre T, et al. Bromo-Cyclobutenaminones as New Covalent UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) Inhibitors. *Pharmaceuticals*. 2020 Nov;13(11):362.
26. Kollár L, Gobec M, Szilágyi B, Proj M, Knez D, Ábrányi-Balogh P, et al. Discovery of selective fragment-sized immunoproteasome inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2021;219:113455.
27. Sosič I, Gobec M, Brus B, Knez D, Živec M, Konc J, et al. Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like ($\beta 5$) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(19):5745–8.
28. Grabrijan K, Benedik NS, Krajnc A, Bozovičar K, Knez D, Proj M, et al. Synthesis and biochemical evaluation of new 3-amido-4-substituted monocyclic β -lactams as inhibitors of penicillin-binding protein(s). *Acta Pharm*. 2024 Sept 14;74(3):423–40.
29. Kollár L, Grabrijan K, Hrast Rambaher M, Bozovičar K, Imre T, Ferenczy GG, et al. Boronic acid inhibitors of penicillin-binding protein 1b: serine and lysine labelling agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2024 Dec 31;39(1):2305833.
30. Meden A, Knez D, Brazzolotto X, Modeste F, Perdih A, Pišlar A, et al. Pseudo-irreversible butyrylcholinesterase inhibitors: Structure–activity relationships, computational and crystallographic study of the N-dialkyl O-arylcarbamate warhead. *Eur J Med Chem*. 2023 Feb 5;247:115048.
31. Meden A, Žnidaršič N, Knez D, Wang Y, Xu Z, Yang H, et al. Pleiotropic prodrugs for both symptomatic and disease-modifying treatment of Alzheimer's disease. *Acta Pharm Sin B*. 2025 Sept 1;15(9):4807–28.
32. Knez D, Colettis N, Iacovino LG, Sova M, Pišlar A, Konc J, et al. Stereoselective Activity of 1-Propargyl-4-styrylpiperidine-like Analogues That Can Discriminate between Monoamine Oxidase Isoforms A and B. *J Med Chem*. 2020 Feb 13;63(3):1361–87.

MITOHONDRIJSKA TRANSPLANTACIJA: NOVA MOŽNOST TERAPIJE

MITOCHONDRIAL TRANSPLANTATION: A NEW THERAPEUTIC APPROACH

AVTORICI / AUTHORS:

asist. Natalija Trunkelj, mag. farm.
prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: lucija.peterlinmasic@ffa.uni-lj.si



1 UVOD

Mitochondriji so organeli v evkariontskih celicah, obdani z dvojno membrano (zunanja in notranja membrana) (slika 1). Po endosimbiotski teoriji so mitochondriji nastali iz predmitohondrijske proteobakterije. Filogenetske analize pogosto kažejo sorodnost z redom *Rickettsiales*, ki zajema znotrajcelične parazitske/endosimbiotske bakterije (1, 2). Mitochondriji imajo svojo mitohondrijsko DNA (mtDNA), ki je odgovorna za kodiranje mitohondrijskih podenot v procesu

POVZETEK

Mitohondrijska transplantacija je inovativen pristop, ki ga intenzivno proučujejo kot obetavno možnost zdravljenja mitohondrijskih bolezni. Postopek vključuje nadomeščanje nefunkcionalnih mitohondrijev z zdravimi, kar poveča proizvodnjo adenozin trifosfata in zmanjša nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti. V pričujočem prispevku predstavlja mitohondrijsko transplantacijo kot terapevtski pristop in izpostavlja njeno potencialno klinično uporabo pri zdravljenju številnih bolezni. Poudarek namenjava trenutnemu napredku na tem področju in izpostavlja ključne izzive, s katerimi se bo treba v prihodnje še soočiti, da bo terapija lahko uporabna v klinični praksi.

KLJUČNE BESEDE:

kardiovaskularne bolezni, mitochondriji, mitohondrijske bolezni, mitohondrijska disfunkcija, mitohondrijska transplantacija

ABSTRACT

Mitochondrial transplantation is an innovative approach currently being intensively investigated as a promising therapeutic option for mitochondrial diseases. This procedure involves replacing dysfunctional mitochondria with healthy ones, thereby increasing cellular production of adenosine triphosphate and reducing the generation of reactive oxygen species. In this paper, we present mitochondrial transplantation as a therapeutic strategy and highlight its potential clinical applications in the treatment of various diseases. We focus on recent advancements in the field and outline the key challenges that must still be addressed for this therapy to become applicable in clinical practice.

KEY WORDS:

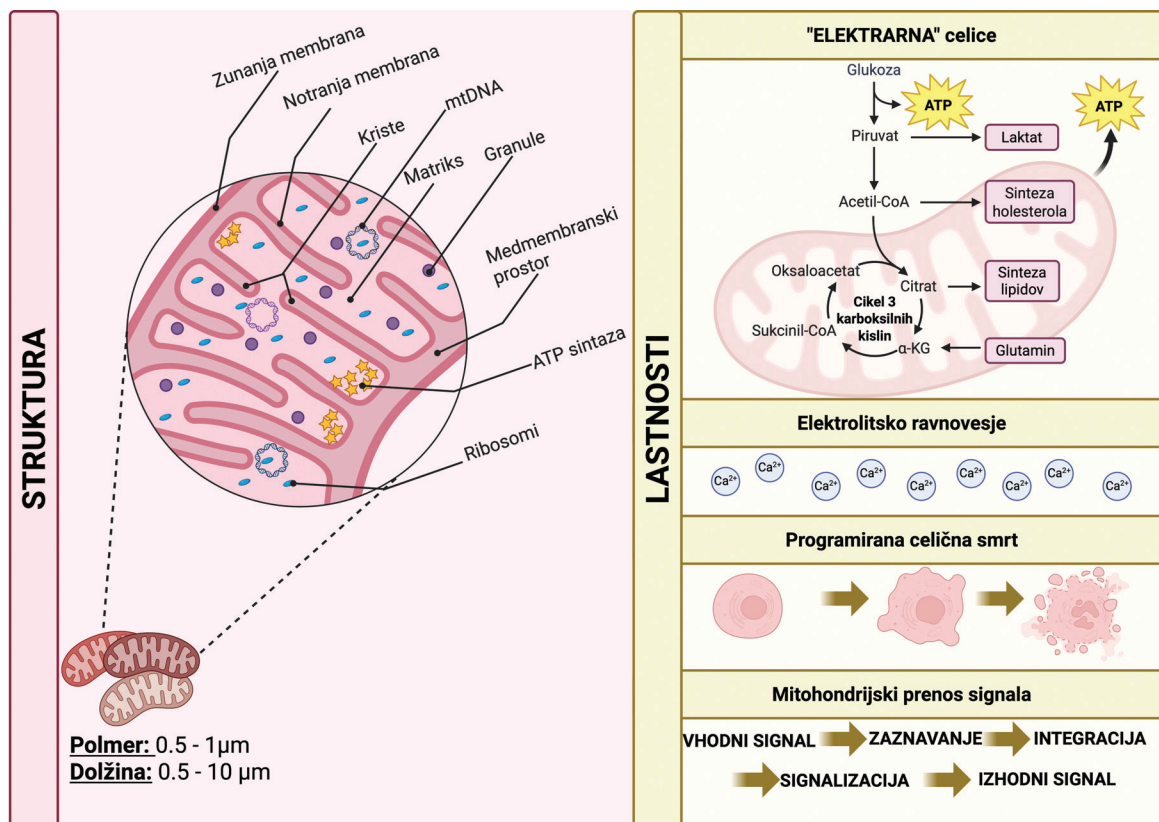
cardiovascular diseases, mitochondria, mitochondrial diseases, mitochondrial dysfunction, mitochondrial transplantation

oksidativne fosforilacije (3, 4). Mitochondriji skupaj z jedrom in drugimi organeli tvorijo integriran informacijski sistem, ki prek signalnih poti in povratnih zank usklajuje izražanje genov ter uravnava presnovne procese v celici (5). Poleg glavnih funkcij proizvodnje energije so mitochondriji vključeni v številne druge ključne celične procese, med drugim v

presnovo lipidov, uravnavanje znotrajcelične homeostaze kalcija, tvorbo signalnih molekul, ter s tem povezano uravnavanje celičnega signaliziranja, vnetnega odziva, diferenciacije, celične delitve, avtofagije in programirane celične smrti (slika 1) (6).

Funkcija mitohondrijev je ključna za številne procese, zato lahko njihova disfunkcija vodi v razvoj mitohondrijskih bolezni, ki se lahko pojavijo kadarkoli v življenju. Mitohondrijske bolezni so skupina presnovnih motenj, ki nastanejo zaradi okvare energetske funkcije celice (7). Pri primarnih mitohondrijskih boleznih so prizadeti geni, odgovorni za kodiranje aparata oksidativne fosforilacije (OXPHOS), ki je odgovoren za proizvodnjo adenozin trifosfata (ATP) (8). Pri sekundarnih mitohondrijskih boleznih pride do okvare genov, ki niso povezani s procesom OXPHOS. Sekundarne mitohondrijske bolezni so lahko prirojene ali pridobljene, medtem ko so primarne izključno prirojene. Razlikovanje, ali je mitohondrijska bolezen prirojena ali pridobljena, je ključnega pomena (9). Mitohondrijske bolezni se lahko izrazijo v katerem koli organu ali tkivu, najpogosteje pa prizadenejo organe z velikimi energijskimi potrebami, kot so možgani, skeletne mišice, srce in jetra (10). Klinična slika mitohondrijskih obolenj je zato zelo pestra. Med pogostejšimi in bolj značilnimi znaki so razvojni zaostanek, encefalopatije, hipotonija (miopatija) ter motnje vida (retinopatije) (11, 12). Prav ta raznolikost otežuje diagnostiko in razvoj učinkovitih terapij, zato so mitohondriji postali pomembna tarča raziskav v akademskih ustanovah in industriji (7, 13).

V pričujočem članku predstavlja najnovejši napredek in ključne dosežke na področju mitohondrijske transplantacije ter njen potencial za zdravljenje mitohondrijskih bolezni.



Slika 1. Struktura mitohondrijev in njihove ključne lastnosti (5). (α -KG – alfa-ketoglutarat; acetil-CoA – acetil koencim A; ATP – adenozin trifosfat; Ca^{2+} – kalcijevi ioni; mtDNA – mitohondrijska DNA; sukcinil-CoA –sukcinil koencim A). Ustvarjeno s programom Biorender: <https://BioRender.com/03c18wd>

Figure 1. Mitochondrial structure and properties (5). (α -KG – alpha-ketoglutarate; acetyl-CoA – acetyl coenzyme A; ATP – adenosine triphosphate; Ca^{2+} – calcium ions; succinyl -CoA – succinyl coenzyme A). Created in Biorender: <https://BioRender.com/03c18wd>

2 TRENUTNI KONCEPTI ZDRAVLJENJA MITOHONDRIJSKE DISFUNKCIJE

Mitohondrijske bolezni so heterogena skupina genetsko prenosljivih večsistemskih motenj, ki jih prepoznamo po primarni ali sekundarni okvari mitohondrijske funkcije in strukture (10, 14). Mitohondrijski proteini so kodirani tako v jedrni DNA (nDNA) kot tudi v mtDNA (7); večina patogenih genov je kodirana v nDNA, manjši delež pa v mtDNA (14). Posebnost mtDNA je heteroplazmija, tj. prisotnost različnih kopij mtDNA v različnih mitohondrijih, ki je prisotna tudi pri zdravih posameznikih, klinični znaki pa se običajno razvijejo šele, ko delež mutirane mtDNA preseže določen prag, ki se razlikuje med tkivi in posamezniki (7, 14). Zaradi izrazite genetske in klinične heterogenosti lahko mitohondrijske bolezni prizadenejo enega ali več organskih sistemov, kar vodi v zelo različne klinične slike. Najpogostejše so prizadeta tkiva z velikimi energijskimi potrebami. Starost ob pojavu simptomov in resnost bolezni se lahko izrazito razlikujeta glede na stopnjo heteroplazmije in druge individualne dejavnike (14). Za učinkovito zdravljenje mitohondrijskih obolenj ni treba zamenjati prav vseh mitohondrijev v celici, saj lahko že vnos zadostnega števila zdravih mitohondrijev obnovi normalno delovanje tkiva. Mitohondrijsko disfunkcijo lahko obravnavamo z različnimi terapevtskimi pristopi:

- a) spodbujanje mitohondrijske biogeneze,
- b) zmanjšanje števila nefunkcionalnih mitohondrijev in zamenjava z aktivnimi,
- c) nadomestitev okvarjenih komponent,
- č) tarčno zdravljenje posledic mitohondrijske disfunkcije,
- d) preusmeritev celičnega metabolizma, pri čemer celica zmanjša odvisnost od oksidativne fosforilacije in preusmeri energijsko presnovo na alternativne poti (15–17).

Do danes Ameriški urad za zdravila in prehrano (FDA) in drugi nacionalni regulatorni organi še niso odobrili zdravila za tarčno zdravljenje mitohondrijskih obolenj. Vse doslej raziskane možnosti so namenjene le lažšanju simptomov ali upočasnjevanju napredovanja bolezni. To vključuje tudi spremembo življenjskega sloga, potencialno uporabo prehranskih dopolnil, kot so koencim Q10, riboflavin, vitamina C in E ter številne druge načine (7, 13). Pomembno vlogo ima tudi individualno prilagojena telesna dejavnost, saj velja za enega redkih ukrepov, ki lahko dokazano izboljšajo mitohondrijsko funkcijo (18). Zaradi omejene učinkovitosti podpornih ukrepov se kot ključna nadaljnja usmeritev kaže razvoj bolj specifičnih

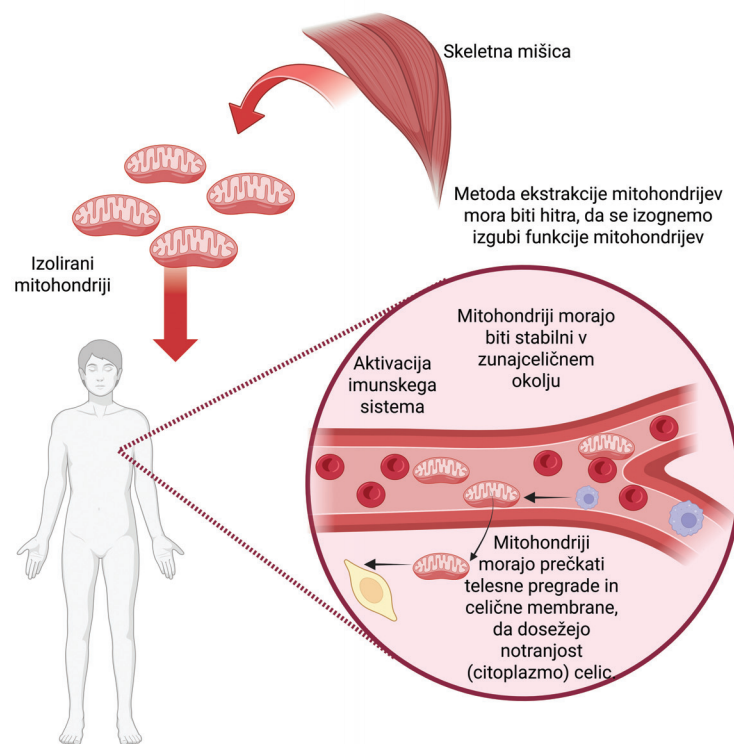
KLJUČNI POUDARKI

- Mitohondrijska transplantacija nadomešča nefunkcionalne mitohondrije z zdravimi ter izboljša produkcijo ATP in zmanjša oksidativni stres.
- Je obetavna, vendar še vedno eksperimentalna terapija, podprta s predkliničnimi dokazi, ki kažejo potencial za zdravljenje bolezni, povezanih z mitohondrijsko disfunkcijo.
- Poznamo več vrst mitohondrijskih transplantatov (avtologi, alogeni in ksenografski), pri katerih so ključni izzivi varnost, imunogenost in stabilnost.
- Ključne ovire tega pristopa so ohranjanje funkcionalnih mitohondrijev, njihova tarčna dostava ter potencialni imunski zapleti po aplikaciji.

terapevtskih pristopov, kot sta gensko zdravljenje in mitohondrijska transplantacija, ki sta za zdaj tehnično zelo zahtevni in še nista rutinsko uveljavljeni v klinični praksi (16, 19, 20).

3 MITOHONDRIJSKA TRANSPLANTACIJA

Zgodovina mitohondrijske transplantacije, imenovane tudi mitoterapija, sega v prejšnje stoletje. Znanstvenika Clark in Shay sta leta 1982 med prvimi pokazala, da lahko izolirani mitohondriji iz donorskih celic vstopijo v prejemne celice ter prenesejo lastnosti, kodirane v mtDNA, npr. odpornost na antibiotike, kar je potrdilo funkcionalen prenos mitohondrijev med celicami (21, 22). Danes se mitoterapija razvija kot obetaven, vendar še vedno pretežno eksperimentalni terapevtski pristop, čigar učinkovitost je bila že dokazana na predkliničnih živalskih modelih (16). Temelji na vnosu zdravih mitohondrijev, izoliranih iz zdravih celic ali tkiv, s čimer se poveča delež funkcionalnih mitohondrijev v tarčnih celicah in izboljša njihovo delovanje (23). Postopek vključuje zaporedje medsebojno odvisnih korakov: izolacijo, dostavo in internalizacijo eksogenih mitohondrijev v tarčne celice oziroma tkivo (slika 2) (7). Izolirani mitohondriji iz donorskega tkiva, npr. skeletne mišice, morajo ohraniti svojo integriteto in funkcionalnost skozi celoten postopek priprave. Po vnosu v organizem se mitohondriji soočijo s številnimi ovirami: lahko sprožijo imunski odziv, v zunajceličnem okolju lahko hitro izgubijo stabilnost, poleg tega pa morajo prečkati biološke pregrade, npr. vaskularni endotelij in ce-



Slika 2. Pregled strategij in ključnih izzivov pri izolaciji ter dostavi mitohondrijev za terapevtsko uporabo (24). Ustvarjeno s programom Biorender: <https://BioRender.com/0m5xd88>

Figure 2. Overview of strategies and key challenges in mitochondrial isolation and delivery for therapeutic use (24). Created with Biorender: <https://BioRender.com/0m5xd88>

lično membrano, kar je ključno za uspešno doseganje tarčnega mesta delovanja (24).

3.1 VRSTE MITOHONDRIJSKIH TRANSPLANTATOV

Mitohondrijska transplantacija je postopek, pri katerem izolirane mitohondrije pridobimo iz ustreznega celičnega vira in jih po rojstvu apliciramo pacientu z namenom doseganja terapevtskega učinka (3). V primerjavi z mitohondrijsko nadomestno terapijo, ki se izvaja v okviru postopkov oploditve z biomedicinsko pomočjo in je namenjena zmanjšanju prenosa patogenih mutacij mtDNA na potomce, je mitohondrijska transplantacija namenjena zdravljenju po rojstvu in ne posega v zarodno linijo (25). Mitohondrijska nadomestna terapija je trenutno klinično dovoljena le v omejenem številu držav; v Združenem kraljestvu se izvaja pod strogim nadzorom britanskega regulatornega organa za oploditev in embriologijo na podlagi zakonodaje iz leta 2015 (26). Pri mitohondrijski transplantaciji mitohondriji

niso neposredno mikroinjicirani v celice, temveč se po aplikaciji v tkivo ali po sistemske dostavi v krvni obtok internalizirajo v tarčne celice prek mehanizmov, ki so zelo podobni naravnemu prenosu mitohondrijev (27). Poznamo več različnih vrst mitohondrijskih transplantatov:

- **Avtologni mitohondrijski transplantati:** Mitohondrije izolirajo iz istega posameznika, ki jih pozneje tudi prejme. Takšen pristop mitohondrijske transplantacije predstavlja najmanjše tveganje, saj so vsi antigeni in mtDNA v transplantatu lastni prejemniku, zato je verjetnost sprožitve imunskega odziva manjša, varnost postopka pa večja (27).
- **Alogeni mitohondrijski transplantati:** Mitohondrije izolirajo iz drugega posameznika ali celične linije in jih nato neposredno vnesejo v prejemnika. Trenutno poteka klinična študija uporabe teh transplantatov pri terapiji refraktarnega polimiozitisa ali dermatomiozitisa (27, 28).
- **Ksenografski mitohondrijski transplantati:** Mitohondrije izolirajo iz organizma ene vrste (npr. človeka) in jih vnesejo v prejemnika druge vrste (npr. miši). Ta oblika mitohondrijske transplantacije je omejena na

eksperimentalne namene, saj lahko zaradi medvrstnih razlik sproži imunski odziv, usmerjen proti tujim antigenom (27).

3.2 KLINIČNE ŠTUDIJE MITOHONDRIJSKE TRANSPLANTACIJE

Mitohondrijsko transplantacijo raziskujejo kot možen terapevtski pristop za zdravljenje različnih bolezni, kot so nevrodegenerativne bolezni, možganska in srčna ishemija, debelost, diabetes ter nealkoholna bolezen jeter (16).

Pomemben mejnik na tem področju predstavlja delo McCullyja in sodelavcev iz bostonske pediatrične bolnišnice, ki so prvi poročali o klinični uporabi mitohondrijske transplantacije (29). Izvedli so avtologno mitohondrijsko transplantacijo pri pediatričnih bolnikih z ishemično-reperfuzijsko poškodbo miokarda, ki je pomemben dejavnik neugodnih izidov po epizodah ishemije, srčnih operacijah ali začasni prekinitvi prekrvavitve. Mitohondrije so izolirali iz preme trebušne mišice (lat. *musculus rectus abdominis*) bolnikov in jih neposredno vbrizgali v ishemično-reperfuzijsko poškodovano področje miokarda. Poročali so o izboljšanju prekatne funkcije v nekaj dneh po posegu pri vseh bolnikih. Neželenih učinkov niso zaznali, vključno z znaki sistemskega vnetnega ali imunskega odziva, spremembami ledvične funkcije ali zapleti, kot so aritmije oziroma intramiokardni hematomi, kar podpira kratkoročno varnost pristopa (7, 16, 30-32). Kljub obetavnim predkliničnim rezultatom in prvim kliničnim poročilom do danes še ni odobrenega zdravljenja na osnovi mitohondrijske transplantacije; izvajanje je trenutno omejeno na klinične študije (33). Nadaljnje raziskave mitohondrijske transplantacije so ključne za premagovanje obstoječih omejitev in njen prehod v širšo klinično rabo (34). Doslej izvedene študije predstavljajo trdne temelje za razvoj inovativnih terapij, ki bi lahko bistveno izboljšale izide zdravljenja številnih obolenj (31).

3.3 IZZIVI MITOHONDRIJSKE TRANSPLANTACIJE

Za širšo klinično uporabo mitohondrijske transplantacije je treba najprej nasloviti več pomembnih izzivov, povezanih z izolacijo, dostavo, stabilnostjo in varnostjo postopka (slika 3) (24).

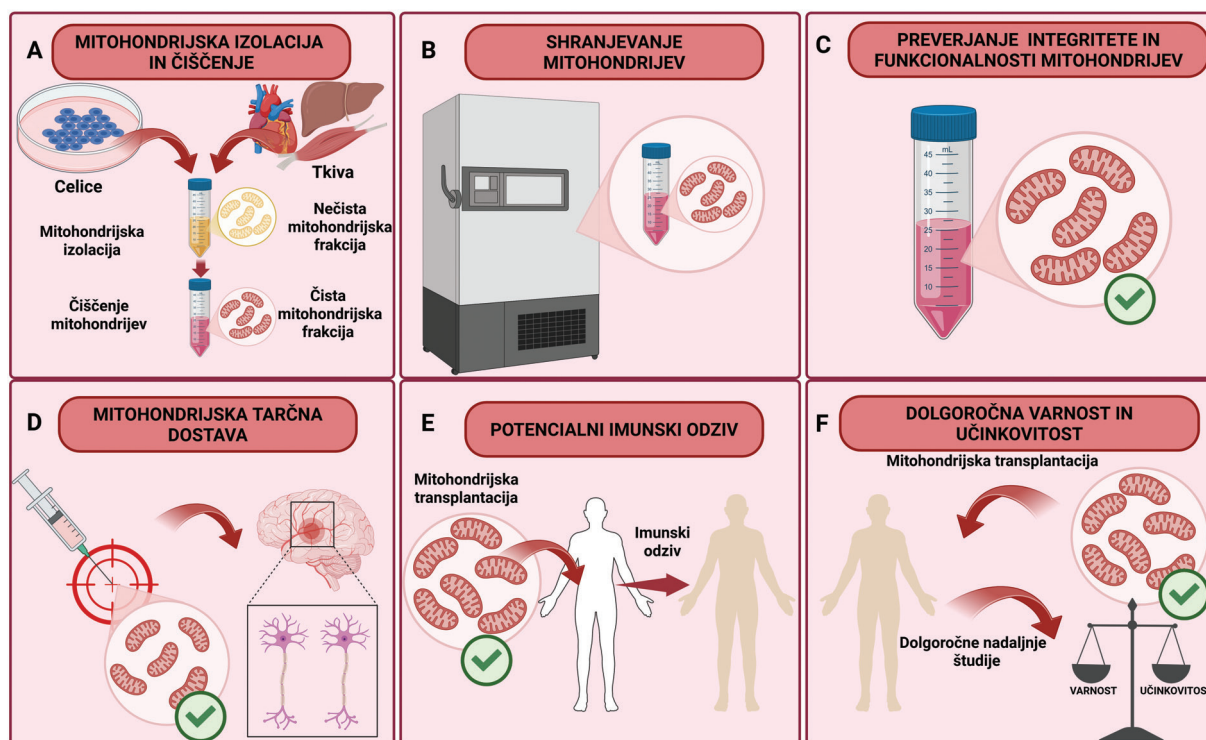
Izolacija mitohondrijev predstavlja stres za mitohondrije in spodbuja nastanek reaktivnih kisikovih vrst (slika 3A) (35). Za izolacijo mitohondrijev lahko uporabimo različne metode, na primer diferencialno centrifugiranje, mehansko homogenizacijo ali diferencialno filtracijo, ki pa so pogosto precej

nespecifične za mitohondrije. Poleg mitohondrijev lahko izoliramo tudi druge celične komponente, kar lahko poveča tveganje za neželene učinke (32, 36, 37).

Pri izvedbi mitohondrijske transplantacije je ključno ohranjanje funkcije in strukture mitohondrijev (slika 3C) (38). Mitohondriji zaradi strukturnih sprememb v zunanjih in notranjih membranah po izolaciji zelo hitro razpadejo (7, 39, 40). Velik problem nastane pri shranjevanju mitohondrijev (slika 3B). McCully in sodelavci (40) so poročali o tem, da mitohondriji ohranjajo svojo aktivnost na ledu le približno eno uro, daljše shranjevanje pa lahko močno vpliva na učinkovitost mitohondrijske transplantacije (22, 41). Zato je nujno preveriti viabilnost mitohondrijev, kar lahko izvedemo bodisi s fluorescenčnimi sondami, ki označijo vse mitohondrije neodvisno od membranskega potenciala, ali s sondami za membranski potencial, ki omogoča razlikovanje med funkcionalnimi in depolariziranimi mitohondriji. Funkcionalnost dodatno preverjamo z merjenjem porabe kisika, npr. s Clarkovimi elektrodami, ter določitvijo vsebnosti ATP npr. z luminiscenčnimi testi. Enako pomembna je čistost mitohondrijske frakcije, saj morajo izolirani mitohondriji vsebovati čim manj citoplazemskih in jedrnih nečistoč. Čistost mitohondrijskih frakcij lahko preverjamo s prenosom po Westernu z uporabo označevalcev za posamezne organele (7, 31, 42). Slabosti teh metod sta metodološka kompleksnost in časovna potratnost, zato ostaja razvoj hitrih, zanesljivih in kvantitativnih metod za analizo mitohondrijske integritete in funkcionalnosti pomembna usmeritev nadaljnjih raziskav (31).

Velik izziv ostaja tarčna dostava funkcionalnih mitohondrijev v obolelo tkivo, zlasti v centralni živčni sistem, kjer morajo mitohondriji prečkati krvno-možgansko pregrado (slika 3D) (31). Dokazano je, da le majhen delež mitohondrijev doseže celice, prenos pa ni specifičen za tarčne celice. K temu lahko prispeva tudi površinski naboj izoliranih mitohondrijev, ki zmanjšuje interakcije s celično membrano in privzem v celico (24). Potrebe po mitohondrijih so v različnih regijah živčnega sistema različne, zato je za učinkovito dostavo in privzem v izbrana tkiva razvoj tkivno specifičnih dostavnih sistemov ključnega pomena (43). Prenos izoliranih mitohondrijev je poleg nespecifične dostave omejen tudi po internalizaciji. Večina internaliziranih mitohondrijev je podvržena endolizosomski poti. Le manjši delež (manj kot 10 %) uspe uiti endosomom in doseči citosol, kjer se lahko vključi v mitohondrijsko mrežo prejemne celice (24, 44).

Študije poročajo o različnih odzivih organizma na vnos alogeničnih mitohondrijev. Nekateri znanstveniki so dokazali, da se alogena mitohondrijska transplantacija dobro prenaša



Slika 3. Glavni izzivi mitohondrijske transplantacije za klinično uporabo (31). Ustvarjeno s programom Biorender (<https://BioRender.com/03c18wd>).

Figure 3. Key challenges in mitochondrial transplantation for clinical application (31). Created with Biorender (<https://BioRender.com/03c18wd>).

in ne sproži avtoimunskega odziva (45). V živalskih modelih po enkratni ali ponavljajoči aplikaciji niso opazili značilnih povišanj serumskih citokinov ali imunoglobulinov (46, 47). Nasprotno pa drugi poročajo, da lahko zunajcelični mitohondriji aktivirajo prirojeni imunski sistem, na primer prek aktivacije nevtrofilcev (48). Takšna nasprotujoča poročila na tem področju odpirajo vprašanja o varnosti mitohondrijske transplantacije, zlasti pri njihovi sistemski dostavi v tarčne organe (31).

Dodatno tveganje predstavlja vnos tuje mtDNA v prejemne celice. Interakcija med tujo mtDNA in jedrnim genom celice lahko vodi do mitohondrijske disfunkcije (49). Vsak poseg, ki vključuje manipulacijo ali vnos tujega genskega materiala, zahteva strogo upoštevanje etičnih smernic in temeljito presojo v okviru ustreznih etičnih komisij. Poleg tega lahko uporaba alogeničnih mitohondrijev poveča tveganje za vnetni odziv in oksidativni stres, kar dodatno omejuje varno klinično uporabo tega pristopa (50, 51). Posledično sta dolgoročna učinkovitost in varnost mitohondrijske transplantacije še vedno neznani (slika 3E). V prihodnje bodo potrebne podrobne raziskave vključevanja mitohondrijev v

obstoječe mitohondrijsko omrežje prejemnih celic ter ohranjanja njihove funkcije. Pred širšo uporabo v klinični praksi bo treba mitohondrijsko transplantacijo sistematično optimizirati in standardizirati glede na metodo, čas intervencije, pogostost in odmere ter z dolgoročnimi spremljevalnimi študijami potrditi njeno varnost in učinkovitost (31).

4 SKLEP

Mitohondrijska transplantacija je v zadnjih letih pritegnila veliko raziskovalnega zanimanja. Ker za mitohondrijske bolezni še vedno nimamo učinkovite terapije, so raziskave novih pristopov na tem področju ključne. V tem prispevku predstavlja mitoterapijo kot eno najsodobnejših in najobetavnejših potencialnih možnosti zdravljenja mitohondrijskih okvar. Čeprav so začetni dokazi o mitohondrijski transplantaciji znani že dlje časa, se je zanimanje za

mitohondrijsko transplantacijo kot terapevtski pristop izraziteje okrepilo v začetku 21. stoletja. To je pomenilo prelomnico in spodbudilo znanstveno skupnost k intenzivnejšemu raziskovanju tehnik mitohondrijske transplantacije za laboratorijsko in klinično uporabo. Za uspešen prenos v klinično prakso bodo ključni trije vidiki: (1) ohranjanje mitohondrijske integritete in funkcije med izolacijo, pripravo in dostavo; (2) razumevanje in obvladovanje imunskega odziva; (3) presnovne in genetske interakcije med eksogenimi mitohondriji in mitohondrijsko mrežo prejemnih celic. Le z izpolnitvijo teh pogojev lahko mitohondrijsko transplantacijo učinkovito uvedemo v klinično prakso in premagamo številne izzive pri zdravljenju mitohondrijskih bolezni.

5 LITERATURA

1. Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol*. 2017 Nov;27(21):R1177–92.
2. Wang Z, Wu M. An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci Rep*. 2015 Jan 22;5(1):7949.
3. McCully JD, Levitsky S, Del Nido PJ, Cowan DB. Mitochondrial transplantation for therapeutic use. *Clin Transl Med*. 2016 Dec;5(1):e16.
4. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1999 Feb;1410(2):103–23.
5. Zhao R, Dong C, Liang Q, Gao J, Sun C, Gu Z, et al. Engineered Mitochondrial Transplantation as An Anti-Aging Therapy. *Aging Dis*. 2024;
6. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*. 2012 Feb 15;125(4):807–15.
7. Zhang T guang, Miao C yu. Mitochondrial transplantation as a promising therapy for mitochondrial diseases. *Acta Pharm Sin B*. 2023 Mar;13(3):1028–35.
8. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primer*. 2016 Oct 20;2(1):16080.
9. Schmiedel J, Jackson S, Schäfer J, Reichmann H. Mitochondrial Cytopathies. *J Neurol*. 2003 Mar 1;250(3):267–77.
10. Valenti D, Vacca R. Primary and Secondary Mitochondrial Diseases: Etiologies and Therapeutic Strategies. *J Clin Med*. 2022 Jul 20;11(14):4209.
11. Klopstock T, Priglinger C, Yilmaz A, Kornblum C, Distelmaier F, Prokisch H. Mitochondrial disorders. *Dtsch Arztebl Int*. 2021 Nov 5;
12. McCormick E, Place E, Falk MJ. Molecular Genetic Testing for Mitochondrial Disease: From One Generation to the Next. *Neurotherapeutics*. 2013 Apr;10(2):251–61.
13. Weissig V. Drug Development for the Therapy of Mitochondrial Diseases. *Trends Mol Med*. 2020 Jan;26(1):40–57.
14. Wen H, Deng H, Li B, Chen J, Zhu J, Zhang X, et al. Mitochondrial diseases: from molecular mechanisms to therapeutic advances. *Signal Transduct Target Ther*. 2025 Jan 10;10(1):9.
15. Russell OM, Gorman GS, Lightowlers RN, Turnbull DM. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell*. 2020 Apr 2;181(1):168–88.
16. Kim JS, Lee S, Kim WK, Han BS. Mitochondrial transplantation: an overview of a promising therapeutic approach. *BMB Rep*. 2023 Sep 30;56(9):488–95.
17. Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Russell OM. Mitochondrial transplantation—a possible therapeutic for mitochondrial dysfunction?: Mitochondrial transfer is a potential cure for many diseases but proof of efficacy and safety is still lacking. *EMBO Rep*. 2020 Sep 3;21(9):e50964.
18. San-Millán I. The Key Role of Mitochondrial Function in Health and Disease. *Antioxidants*. 2023 Mar 23;12(4):782.
19. Jiao Q, Xiang L, Chen Y. Mitochondrial transplantation: A promising therapy for mitochondrial disorders. *Int J Pharm*. 2024 Jun;658:124194.
20. Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *The Lancet*. 2018 Jun;391(10139):2560–74.
21. Clark MA, Shay JW. Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature*. 1982 Feb;295(5850):605–7.
22. D'Amato M, Morra F, Di Meo I, Tiranti V. Mitochondrial Transplantation in Mitochondrial Medicine: Current Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 19;24(3):1969.
23. Amatya E, Blagg BSJ. Recent advances toward the development of Hsp90 C-terminal inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2023 Jan;80:129111.
24. Kubat GB, Picone P, Tuncay E, Aryan L, Girgenti A, Palumbo L, et al. Biotechnological approaches and therapeutic potential of mitochondria transfer and transplantation. *Nat Commun*. 2025 Jul 1;16(1):5709.
25. Herbert M, Turnbull D. Progress in mitochondrial replacement therapies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Feb;19(2):71–2.
26. Castro RJ. Mitochondrial replacement therapy: the UK and US regulatory landscapes. *J Law Biosci*. 2016 Dec 1;3(3):726–35.
27. Brestoff JR, Singh KK, Aquilano K, Becker LB, Berridge MV, Boilard E, et al. Recommendations for mitochondria transfer and transplantation nomenclature and characterization. *Nat Metab*. 2025 Jan 16;7(1):53–67.
28. Yu SH, Kim S, Kim Y, Lee SE, Park JH, Cho G, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived mitochondria (PN-101) attenuate LPS-induced inflammatory responses by inhibiting NFκB signaling pathway. *BMB Rep*. 2022 Mar 31;55(3):136–41.
29. McCully JD, Cowan DB, Pacak CA, Toumpoulis IK, Dayalan H, Levitsky S. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2009 Jan;296(1):H94–105.
30. Emani SM, Piekarski BL, Harild D, Del Nido PJ, McCully JD. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017 Jul;154(1):286–9.
31. Miao X, Jiang P, Wang Z, Kong W, Feng L. Mitochondrial Transplantation: A Novel Therapeutic Approach for Treating Diseases. *MedComm*. 2025 Jun;6(6):e70253.
32. McCully JD, Del Nido PJ, Emani SM. Mitochondrial transplantation for organ rescue. *Mitochondrion*. 2022 May;64:27–33.
33. Tripathi K, Ben-Shachar D. Mitochondria in the Central Nervous System in Health and Disease: The Puzzle of the Therapeutic Potential of Mitochondrial Transplantation. *Cells*. 2024 Feb 27;13(5):410.

34. Yamada Y, Ito M, Arai M, Hibino M, Tsujioka T, Harashima H. Challenges in Promoting Mitochondrial Transplantation Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 2;21(17):6365.
35. Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, et al. Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. Polymenis M, editor. *PLoS ONE.* 2011 Mar 28;6(3):e18317.
36. Hubbard WB, Harwood CL, Prajapati P, Springer JE, Saatman KE, Sullivan PG. Fractionated mitochondrial magnetic separation for isolation of synaptic mitochondria from brain tissue. *Sci Rep.* 2019 Jul 4;9(1):9656.
37. Huang Y, Jin X, Zhang Y, Li Y, Liu J, Li Y. Innovative methods for isolating highly purified mitochondria essential for biomedical studies. *Mitochondrial Commun.* 2024;2:90–9.
38. Acin-Perez R, Benincá C, Shabane B, Shirihaï OS, Stiles L. Utilization of Human Samples for Assessment of Mitochondrial Bioenergetics: Gold Standards, Limitations, and Future Perspectives. *Life.* 2021 Sep 10;11(9):949.
39. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Feb;21(2):85–100.
40. McCully JD, Cowan DB, Emani SM, Del Nido PJ. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion.* 2017 May;34:127–34.
41. Greiff D, Myers M. Effect of Dimethyl Sulphoxide on the Cryo-tolerance of Mitochondria. *Nature.* 1961 Jun;190(4782):1202–4.
42. Chang JC, Chang HS, Wu YC, Cheng WL, Lin TT, Chang HJ, et al. Mitochondrial transplantation regulates antitumour activity, chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Dec;38(1):30.
43. Borchertding N, Jia W, Giwa R, Field RL, Moley JR, Kopecky BJ, et al. Dietary lipids inhibit mitochondria transfer to macrophages to divert adipocyte-derived mitochondria into the blood. *Cell Metab.* 2022 Oct;34(10):1499–1513.e8.
44. Al Amir Dache Z, Chevé M, Dancourt J, Lavieu G. Quantitative cellular characterization of extracellular mitochondria uptake and delivery. *Nat Commun.* 2025 Oct 10;16(1):9053.
45. Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2013 Apr 1;304(7):H966–82.
46. Kaza AK, Wamala I, Friehs I, Kuebler JD, Rathod RH, Berra I, et al. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017 Apr;153(4):934–43.
47. Ramirez-Barbieri G, Moskowitsova K, Shin B, Blitzer D, Orfany A, Guariento A, et al. Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. *Mitochondrion.* 2019 May;46:103–15.
48. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010 Mar;464(7285):104–7.
49. Reinhardt K, Dowling DK, Morrow EH. Mitochondrial Replacement, Evolution, and the Clinic. *Science.* 2013 Sep 20;341(6152):1345–6.
50. Park JH, Tanaka M, Nakano T, Licastro E, Nakamura Y, Li W, et al. O-GlcNAcylation is essential for therapeutic mitochondrial transplantation. *Commun Med.* 2023 Nov 25;3(1):169.
51. Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, et al. Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition. *Cell.* 2012 Oct;151(2):333–43.



LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE KOT MODEL *IN VITRO* ZA PREDKLINIČNO VREDNOTENJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

LYMPHOBLASTOID CELL LINES AS AN *IN VITRO* MODEL FOR PRECLINICAL DRUG EVALUATION

AVTORJI / AUTHORS:

zn. sod. dr. Maša Kandušer, univ. dipl. biol.
asist. dr. Tijana Markovič, mag. farm.
prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: masa.kanduser@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Personalizirana medicina temelji na prilagajanju zdravljenja genotipu in fenotipu posameznika z namenom povečanja učinkovitosti terapije in zmanjšanja tveganja za neželene učinke. Pomembno vlogo pri njenem uveljavljanju imajo ustrezni predklinični modeli *in vitro*, ki omogočajo sistematično proučevanje interindividualnih razlik v odzivu na zdravilne učinkovine. Med pogosto uporabljenimi modeli so limfoblastoidne celične linije, pridobljene s transdukcijo človeških limfocitov B z virusom Epstein-Barr. Limfoblastoidne celične linije ohranjajo genetske značilnosti darovalca in predstavljajo uporaben model *in vitro* v genomskih, farmakogenomskih ter farmakoloških raziskavah. V članku so predstavljeni postopki priprave limfoblastoidnih celičnih linij, molekularni mehanizmi njihove imortalizacije ter njihova uporaba v predkliničnih študijah in personalizirani medicini. Obravnavane so tudi prednosti in omejitve uporabe limfoblastoidnih celičnih linij v predkliničnih študijah, zlasti vpliv transdukcije z virusom Epstein-Barr na celično fiziologijo, odzivnost na zdravila ter interpretacijo eksperimentalnih rezultatov. Limfoblastoidne celične linije predstavljajo pomemben podporni model *in vitro*, predvsem v zgodnjih fazah predkliničnih študij in kot dopolnilo naprednejšim celičnim sistemom v sodobni biomedicini.

KLJUČNE BESEDE:

celični modeli *in vitro*, limfoblastoidne celične linije, predklinične študije, personalizirana medicina

ABSTRACT

Personalised medicine involves tailoring treatment to an individual's genotype and phenotype, to increase therapeutic efficacy and reduce the risk of adverse effects. Its successful implementation depends on appropriate *in vitro* preclinical models that allow systematic investigation of interindividual differences in drug response. Among commonly used models are lymphoblastoid cell lines, generated by transforming of human B lymphocytes with Epstein-Barr virus. Lymphoblastoid cell lines retain the genetic characteristics of the donor and serve as a useful *in vitro* model in genomic, pharmacogenomic, and pharmacological research. This article presents

methods for establishing of lymphoblastoid cell lines, the molecular mechanisms underlying their immortalisation, and their use in preclinical research and personalised medicine. The advantages and limitations of this model are also discussed, particularly the impact of Epstein–Barr virus transformation on cellular physiology and drug responsiveness. Lymphoblastoid cell lines are an important supportive *in vitro* model, especially in early research stages and as a complement to more advanced cellular systems.

KEY WORDS:

in vitro cell models, lymphoblastoid cell lines, personalized medicine, preclinical studies

1 UVOD

Personalizirana medicina je sodoben pristop, ki z uporabo genetskih, molekularnih in kliničnih podatkov omogoča izbiro najučinkovitejšega in za posameznika najvarnejšega zdravljenja. Sekvenciranje človeškega genoma je omogočilo vpogled v genetsko variabilnost med posamezniki v določeni populaciji in pospešilo razvoj personaliziranega zdravljenja (1). Sodobni terapevtski pristopi vse pogostejše temeljijo na prilagajanju zdravljenja molekularnim in genomskim značilnostim bolnika ter upoštevajo njegove okoljske, vedenjske in demografske dejavnike (2, 3).

Z uporabo sekvenciranja genoma in uporabe naprednejših metod drugih "omik" pridobimo obsežne podatke. Za interpretacijo in obdelavo pridobljenih podatkov se uporabljajo napredna računalniška orodja, ki temeljijo na strojnem in globokem učenju in ki s pomočjo algoritmov nevronske mreže analizirajo podatke o funkcijskem vplivu, pogostosti in klinični pomembnosti posameznih sprememb. Takšni bioinformatični pristopi omogočajo pridobitev ključnih informacij iz velike količine podatkov, pomembnih za razumevanje bolezni in podporo pri izbiri najustreznejšega zdravljenja za posameznega bolnika. Za širšo uporabo personalizirane medicine v kliničnem okolju je ključno interdisciplinarno sodelovanje. Razvoj novih algoritmov in orodij umetne inteligence olajša interpretacijo kompleksnih podatkov, pri čemer je pomembno hkrati nasloviti etična vprašanja in zagotoviti ustrezno varovanje osebnih podatkov bolnikov (1, 4, 5).

V predkliničnih študijah se vrednoti učinkovitost in varnost zdravilnih učinkovin na celičnih modelih *in vitro* ter na živalskih modelih *in vivo* (6). Na področju personalizirane medicine so pomembni celični modeli, ki omogočajo proučevanje interindividualnih razlik v odzivu na zdravilno učinkovino, kar lahko prispeva k hitrejšemu uveljavljanju personaliziranega zdravljenja v kliničnem okolju (7). Med najboljše celične modele sodijo inducirane pluripotentne matične celice (angl. *induced pluripotent stem cells*; iPSCs), ki jih pridobivamo iz različnih tkiv z reprogramiranjem somatskih celic (8, 9). Kljub prednostim uporabe celičnih modelov iPSC je uspešnost transdukcije primarnih somatskih celic v iPSC nizka, postopek priprave pa dolgotrajen in ekonomsko zahteven, zato so v predkliničnih študijah nepogrešljivi enostavnejši in ekonomsko učinkovitejši celični modeli, med katere sodijo tudi LCL (3, 10–12). Poleg imortaliziranih celičnih linij se v sodobnih raziskavah in razvoju zdravil uporabljajo tudi primarne celice, naprednejši tridimenzionalni (3D) modeli ter kompleksni organi na čipu (13–16).

2 PRIPRAVA LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ

Celice LCL predstavljajo pomemben model *in vitro* v predkliničnem preskušanju zdravilnih učinkovin. Nastanejo z okužbo človeških limfocitov B z virusom Epstein-Barr (EBV), kar sproži njihovo nesmrtnost in omogoči proliferacijo v celični kulturi. Kljub transdukciji LCL ohranijo genetske značilnosti izvirnega darovalca. Relativno enostavno

KLJUČNI POUDARKI

- Limfoblastoidne celične linije (LCL) so pridobljene s transformacijo limfocitov B z virusom Epstein-Barr.
- LCL ohranjajo genetske značilnosti darovalca in so primeren model za analizo mehanizmov bolezni, identifikacijo biomarkerjev in proučevanje individualnih razlik v odzivu na zdravila.
- So cenovno dostopen, stabilen in neomejen vir celic, uporaben v farmakogenomiki, genomiki in raziskavah personalizirane medicine.
- Obsežne biobanke LCL (npr. HapMap, CEPH) omogočajo povezovanje genotipa s celičnim fenotipom ter napovedovanje odziva na zdravilne učinkovine



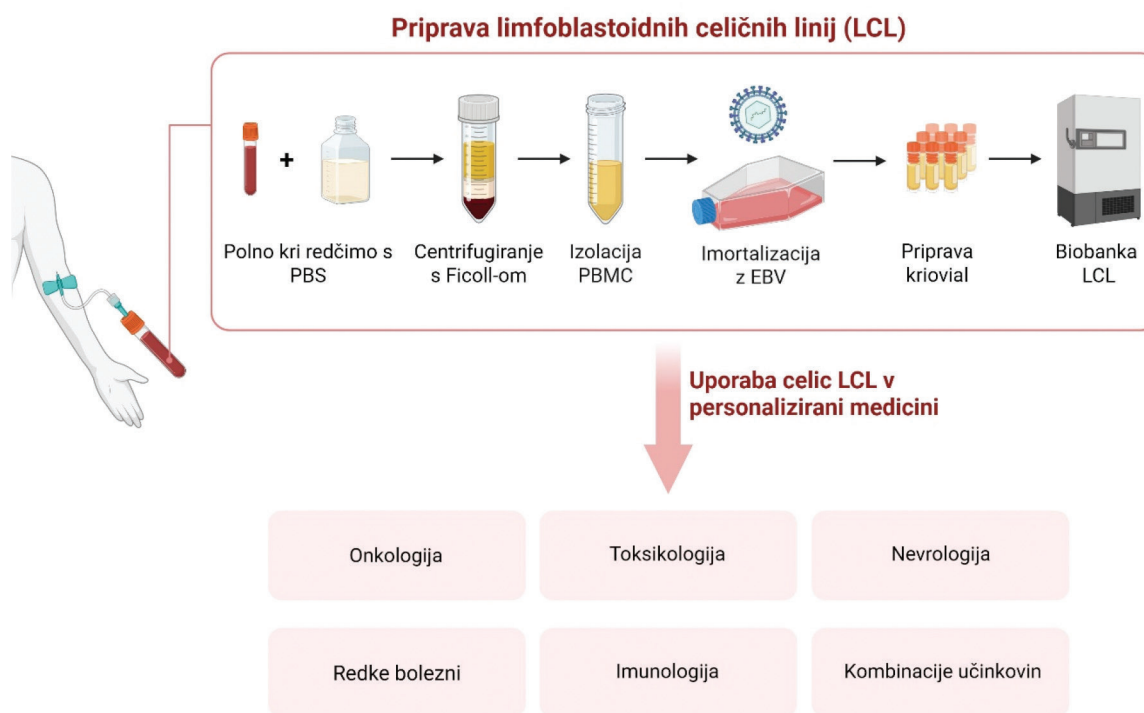
vzdrževanje LCL omogoča široko uporabo pri raziskavah odzivnosti LCL na zdravilne učinkovine ter vrednotenju genetske variabilnosti v človeški populaciji (slika 1).

2.1 BIOLOGIJA VIRUSA EPSTEIN-BARR

EBV je 150–200 nm velik DNA-virus iz družine herpesvirusov (*Herpesviridae*), poddružine gamaherpesvirusov (*Gammapherpesvirinae*) in rodu limfokriptovirusov. EBV je humani herpesvirus tipa 4 in je eden izmed osmih znanih človeških herpesvirusov, patogenih za človeka. Okuži predvsem limfocite B in epitelijske celice ter vzpostavi doživljenjsko latentno okužbo (17, 18). Večina človeške populacije se z EBV okuži že v otroštvu, pri čemer okužba ostane v latentni obliki, zato večina posameznikov ne razvije simptomov in okužbe ne zazna (18). Pri mladostnikih in odraslih lahko okužba z EBV povzroči infekcijsko mononukleozo. Onkološke raziskave so pokazale, da so z okužbo z EBV povezana

nekatera rakava obolenja kot so Burkittov limfom, Hodgkinova bolezen, karcinom nosnega žrela in rak želodca (19). Okužba z EBV se prenaša s slino, virus nato vstopi v telo skozi žrelo in v predelu mandljev pride v stik z limfociti B. V večini primerov se takoj po vstopu virusa v gostiteljske celice okuženi limfociti B aktivirajo. Limfociti B se nato diferencirajo v spominske limfocite B v katerih se EBV ohranja kot latentna okužba. V primeru reaktivacije virusa, se mirujoči okuženi spominski limfociti B diferencirajo v plazmatke. V teh celicah se virus razmnoži in v litičnem ciklu sprosti virusne delce, ki okužijo epitelijske celice. V okuženih epitelijskih celicah se litični cikel ponovi in sprostijo se virusni delci, ki ponovno okužijo limfocite B. Opisana reaktivacija virusa v gostiteljskem organizmu lahko povzroči nastanek rakavih obolenj (20).

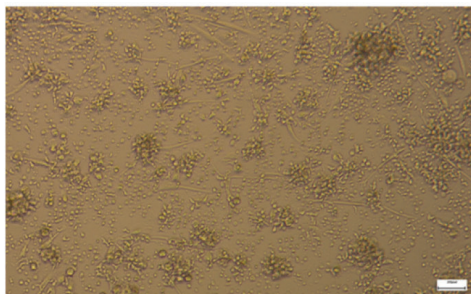
Nesmrtne celične linije lahko nastanejo s spontano transformacijo celic v tumorjih (21) ali pa jih vzpostavimo *in vitro* z uporabo specifičnih laboratorijskih postopkov. LCL vzpo-



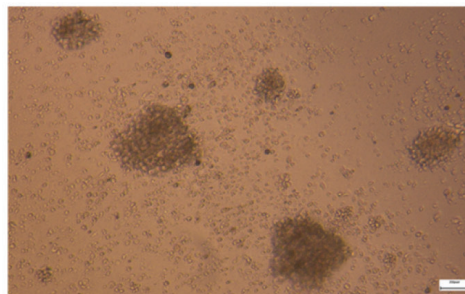
Slika 1: Shematski prikaz priprave limfoblastoidnih celičnih linij iz vzorca periferne krvi ter njihove uporabe v personalizirani medicini (PBMC – mononuklearne celice periferne krvi, EBV – virus Epstein Barr). Povzeto po (17, 18). Ustvarjeno s programom BioRender (<https://BioRender.com/e7deuvv>).

Figure 1: Schematic presentation of lymphoblastoid cell lines generation from peripheral blood samples and their application in personalized medicine (LCLs – lymphoblastoid cell lines, PBMCs – peripheral blood mononuclear cells, EBV – Epstein-Barr virus). Adapted from (17, 18). Created in BioRender (<https://BioRender.com/e7deuvv>).

Proces transformacije limfoblastoidnih celičnih linij (LCL)



Nastanek skupkov v celični kulturi
14 dni po okužbi z EBV



Značilna morfologija LCL 21 dni po
okužbi z EBV

Slika 2: Morfološke značilnosti celične kulture v procesu priprave limfoblastoidne celične linije (limfoblastoidne celične linije - LCL, virus Epstein Barr - EBV). Slike so zajete z invertnim mikroskopom Zeiss pri povečavi objektiva 10x. Slike so last avtorjev in so bile pridobljene v okviru raziskave COVID-19 (številka odločbe 0120-496/2022/6).

Figure 2: Morphological characteristics of cell cultures during the establishment of lymphoblastoid cell lines (lymphoblastoid cell lines - LCLs, Epstein-Barr virus - EBV). Images were acquired using a Zeiss inverted microscope with 10x objective magnification. The images are the property of the authors and were obtained within the framework of the COVID-19 study (Nr. 0120-496/2022/6).

stavimo tako, da iz vzorca periferne krvi izoliramo mononuklearne celice periferne krvi (angl. *peripheral blood mononuclear cells*; PBMC), ki jih v pogojih *in vitro* okužimo z EBV (12, 13). Za uspešno transdukcijo je pomembno, da iz PBMC odstranimo limfocite T, ki bi lahko prepoznali in uničili z EBV transducirane limfocite B, zato gojišču dodamo ciklosporin A ali drug ustrezen imunosupresiv.

2.2 PROCES TRANSFORMACIJE LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ

Pomembno je, da primarne limfocite B izpostavimo dovolj visokim koncentracijam EBV. Za pripravo kužnih delcev EBV se lahko uporabijo celične linije Burkittovega limfoma, Akata in P3HR1 ali celična linija opičjega izvora B95-8 (14). Celične linije za pripravo kužnih delcev gojimo pod stresnimi pogoji, kot so stradanje ali nižje temperature, s čimer sprožimo aktivacijo virusa, vstop v litični cikel in sproščanje virusnih delcev. Te nato prefiltriramo in uporabimo za transdukcijo limfocitov B (12, 13).

Že v prvih 24 urah po izpostavitvi virusu se začne postopek imortalizacije. Z EBV okuženi limfociti B so podvrženi hitrim in obsežnim spremembam v genski transkripciji, ki jim sledijo spremembe v celičnem metabolizmu, morfologiji in celičnem ciklu (17). V celični kulturi opazimo morfološke spremembe celic, ki se v zadnji fazi transdukcije združujejo

v skupke, značilne za LCL. Prvi majhni celični skupki postanejo vidni v obdobju 14 dni po okužbi z EBV, njihova velikost in prepoznavnost pa s časom naraščata. Transdukcija limfocitov B z EBV običajno poteka v obdobju 3 do 6 tednov (3, 18, 22). Če se z EBV okuženi limfociti B do osmega tedna ne povežejo v značilne celične skupke, se proces transdukcije šteje za neuspešen (21). Slika 2 prikazuje značilne celične skupke, ki nastanejo v procesu transdukcije LCL iz vzorcev periferne krvi darovalcev z dokumentirano anamnezo covid-19.

Transdukcija primarnih limfocitov B v LCL z EBV sproži kompleksno aktivacijo celičnih signalnih poti, ki omogočajo neomejeno proliferacijo, izogibanje apoptozi in imunskemu odzivu. Transdukcija limfocitov B v LCL je selektiven proces, za katerega je potreben receptor CD21, ki se izraža na površini mirujočih limfocitov B. Glikoprotein gp350 na površini virusne ovojnice se veže na receptor CD21 limfocitov B in omogoči vstop virusa v celico (8, 11, 12). Nekaj dni po okužbi se v gostiteljski celici izrazijo geni za virusne jedrne antigene (angl. *EBV nuclear antigen*; EBNA) in virusne membranske proteine latentne okužbe (angl. *latent membrane protein*; LMP). Proteini EBNA in LMP omogočajo preživetje, proliferacijo in vzdrževanje latence. Transformacija limfocitov B v LCL temelji na usklajenem delovanju latentnih proteinov EBV. EBNA2 in EBNA-LP sprožita transkripcijski program latence III z aktivacijo proliferacijskih poti, vključno z regu-

lacijo MYC, ter spodbujata izražanje ključnih onkoproteinov LMP1 in LMP2A. Ključni transdukcijski dejavnik je LMP1, ki s konstitutivno aktivacijo jedrnega dejavnika κB (NF- κB), c-Jun N-končne kinaze (JNK) in MAP-kinaze, spodbuja preživetje celic in odpornost proti apoptozi. LMP2A posnema signalizacijo B-celičnega receptorja in ohranja latentno okužbo. V transduciranih celicah LCL se s tem poveča število celičnih delitev in zmanjša indukcija apoptoze (16, 17). Modulacija omenjenih signalnih poti vodi v stabilen proliferativni fenotip, značilen za LCL ter ob hkratnem učinkovitem izmikanju imunskemu odzivu predstavlja temelj za imortalizacijo LCL in patogenezo okužbe z EBV (17, 18, 23–26).

3 UPORABA LCL KOT MODELA *IN VITRO*

Za proučevanje molekularnih mehanizmov patofiziologije in delovanja učinkovin v predkliničnih fazah razvoja raziskovalci pogosto uporabljajo LCL. LCL predstavljajo relevanten model za proučevanje onkogenega potenciala EBV (27), saj je transdukcija limfocitov B v pogojih *in vitro* podobna procesu onkogeneze *in vivo* (17). Ker LCL ohranjajo stabilen genetski zapis posameznika, so primeren model za genomske, transkriptomске in farmakogenomske raziskave. To je privedlo do vzpostavitve več obsežnih biobank, ki vključujejo celične linije dobro okarakteriziranih kohort ter omogočajo primerjavo podatkov o genotipu in fenotipu med populacijami (27).

Ena najpomembnejših biobank LCL je HapMap (angl. *Cell Repository of the Coriell Institute for Medical Research HapMap*), ki je nastala v okviru mednarodnega projekta HapMap z namenom popisa najpogostejših genetskih različic v človeškem genomu. Biobanka Centra za proučevanje genetskih polimorfizmov pri človeku (fr. *Fondation Jean Dausset – Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*, CEPH) vključuje približno 2.200 LCL. Nacionalna korejska biobanka (angl. *National Biobank of Korea*) hrani LCL azijske populacije, izraelska biobanka NLGIP (angl. *National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations*) pa vsebuje več kot 2.000 LCL posameznikov iz različnih etničnih skupin srednjega Vzhoda (3, 10, 12, 22).

Obsežne biobanke LCL omogočajo raziskave populacijske genetike, prispevajo k razumevanju mehanizmov nastanka in razvoja bolezni, omogočajo proučevanje medosebnih razlik v odzivu na zdravilne učinkovine ter

podpirajo razvoj novih diagnostičnih postopkov v okviru personalizirane medicine (3, 21, 27–29). Njihova prednost v farmakogenomskih raziskavah je predvsem dostop do celic kontroliranega porekla z različnimi genotipi, vrednotenje celičnih odzivov na zdravilno učinkovino ter povezovalje eksperimentalnih rezultatov z obstoječimi genetskimi podatkovnimi bazami različnih populacijskih kohort, kot je HapMap (1, 3, 21).

LCL so izjemno pomembno orodje *in vitro* saj predstavljajo praktično neomejen vir celic in omogočajo vpogled v genetske dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost in varnost zdravil. Kot model so jih uporabili pri identifikaciji gena *CHL1* kot označevalca za odziv posameznikov na paroksetin (30). Uporabili so ga tudi za proučevanje občutljivosti na 6-merkaptopurin in vloge encima tiopurin S-metiltransferaze (31). LCL omogočajo identifikacijo genetskih različic posameznika, povezanih s farmakološkimi fenotipi (32). V translacijskih raziskavah LCL uporabljajo tudi za validacijo kliničnih ugotovitev ter proučevanje kombinacij zdravil, zlasti na področju onkologije, kjer omogočajo analizo molekularnih mehanizmov sinergističnega delovanja zdravilnih učinkovin in dodatno razširjajo uporabnost tega modela v farmakogenetskih raziskavah (10, 31).

Raziskovalci uporabljajo LCL kot eksperimentalni model v predkliničnih študijah za povezovanje genotipa, transkripcijskega profila in celičnega odziva na zdravilne učinkovine. Tak pristop uporabljajo v onkologiji za analizo regulacije ekspresije genov družine SLC (angl. *solute carrier*). Ugotovili so, da različice genov *SLC* pomembno vplivajo na občutljivost celic na paklitaksel. S pomočjo LCL so vrednotili citotoksičnost protitumornih učinkovin, kot so karboplatin, gemcitabin, citarabin, arabinozid, tamoksifen in 5-fluorouracil, ter proučevali odziv celic z mutacijami genov *BRCA1* in *BRCA2* na radioterapijo, kar je prispevalo k boljšemu razumevanju interindividualnih razlik v odzivu na zdravljenje (10, 27, 32–35).

Uporabnost modela LCL potrjuje tudi študija, ki je proučevala genetsko pogojene razlike med posamezniki v odzivu na 29 protitumornih zdravilnih učinkovin v LCL 520 darovalcev (36). Ugotovili so, da lahko z uporabo LCL identificiramo genetske biološke označevalce občutljivosti in odpornosti na protitumorne učinkovine. V študiji so identificirali povezavo med občutljivostjo na temozolomid, DNA-alkilirajočo protitumorno učinkovino, in genetsko različico v genu *MGMT*, ki zapisuje metilgvanin metiltransferazo (MGMT). Ta povezava odraža dobro uveljavljeno vlogo encima MGMT pri popravljanju alkilacijskih poškodb DNA, ki jih povzroča temozolomid, in je skladna s kliničnimi opažanji (37).

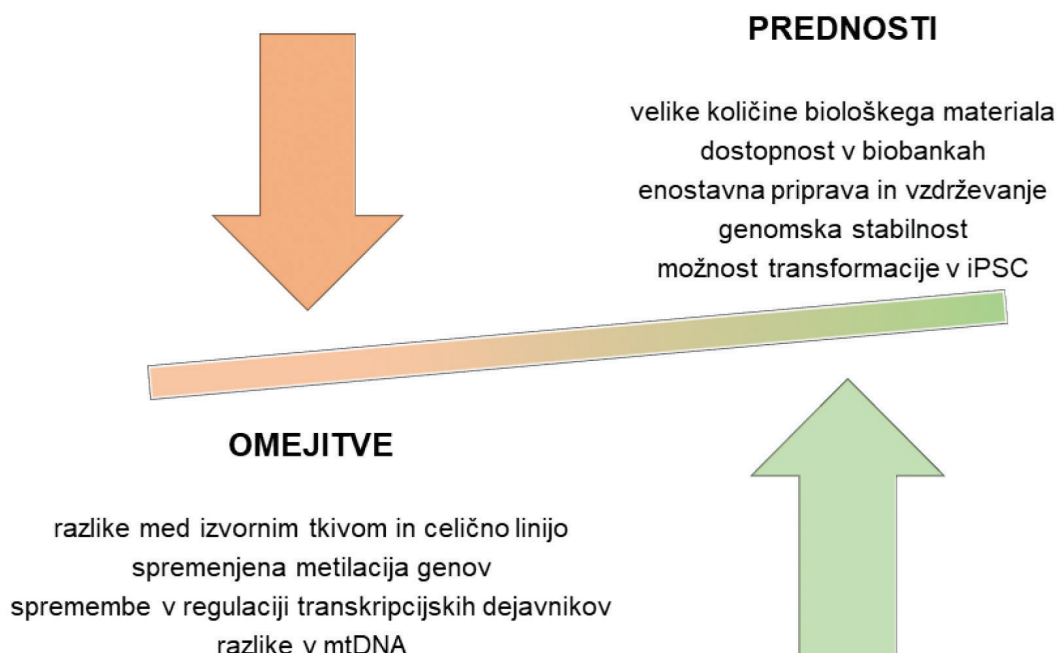
Uporabnost LCL sega tudi na področje raziskav srčno-žilnih bolezni, kjer so pri preučevanju statinov pokazali, da razlike med posamezniki v odzivu niso povezane z aktivnostjo encima HMG-CoA reduktaze, temveč predvsem s polimorfizmi v genu za receptor za lipoproteine nizke gostote (27, 38). LCL predstavljajo dragocen model tudi pri raziskavah nevroloških in nevrodegenerativnih bolezni, kjer omogočajo proučevanje epigenetskih sprememb, kot je hipermetilacija DNA, značilna za razvoj Alzheimerjeve bolezni in različnih oblik demence (39). Pri nevropsihiatričnih motnjah, zaznamovanih s heterogenostjo, oteženim diagnosticiranjem ter zapletenimi interakcijami med genetskimi lokusi in vplivi okolja, LCL omogočajo neposredno analizo celičnih mehanizmov bolezni in služijo kot izhodni material za reprogramiranje v iPSC (40–41). Z reprogramiranjem LCL v iPSC so proučevali tudi vpliv genetskih polimorfizmov v genih *FUS* in *ANXA11* na mehanizme bolezni amiotrofične lateralne skleroze (ALS), ki prizadene možgane in hrbtenjačo (42).

Pri redkih boleznih LCL omogočajo vpogled v molekularne mehanizme patogeneze in analizo genetskih polimorfizmov, značilnih za posamezno bolezen, kot so polimorfizmi v ge-

nih *TREM2* in *DAP12* pri bolezni Nasu–Hakola (43), v genu *MeCP2* pri Rettovem sindromu (44) ter v genu *LAMP-2* pri Danonovi bolezni (45).

LCL so omogočili neposredno proučevanje vloge EBV pri multipli sklerozi. Nedavne raziskave spontano nastalih LCL bolnikov z aktivno multiplo sklerozo so identificirale značilne spremembe v izražanju virusnih in gostiteljskih genov ter povečano vnetno aktivnost (22, 46, 47). Zaviralci EBNA1 so selektivno zavri proliferacijo EBV-pozitivnih LCL bolnikov z multiplo sklerozo, kar bi lahko prispevalo k razvoju novih tarčnih terapevtskih pristopov (4).

Celice LCL izkazujejo potencial tudi v toksikoloških študijah (48, 49). Predstavljajo zanesljiv testni sistem *in vitro* za vrednotenje imunomodulatornih lastnosti spojin ter omogočajo vpogled v interindividualno variabilnost odziva na določeno spojino (50, 51). LCL imajo pomembno vlogo tudi pri ocenjevanju genotoksičnosti spojin, pri čemer je celična linija TK6 uveljavljena kot zanesljiv model za proučevanje poškodb DNA, mutagenosti in celičnih odzivov na genotoksične zdravilne učinkovine *in vitro*. LCL TK6 in MCL-5 so uporabili tudi v integriranem pristopu *in vitro*, ki omogoča zanesljivejšo razlikovanje med



Slika 3: Shematski prikaz prednosti in omejitev uporabe limfoblastoidnih celičnih linij v predkliničnih študijah (limfoblastoidne celične linije – LCL, inducirane pluripotentne matične celice – iPSC, mitohondrijska DNA – mtDNA). Povzeto po (52–56).

Figure 3: Schematic presentation of the advantages and limitations of lymphoblastoid cell lines utilization in preclinical studies (lymphoblastoid cell lines – LCLs, induced pluripotent stem cells – iPSC, mitochondrial DNA – mtDNA). Adapted by (52–56).

genotoksičnimi in negenotoksičnimi karcinogeni ter nekarcinogeni (48).

4 PREDNOSTI IN OMEJITVE LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ

Tako kot vsi celični modeli imajo tudi LCL svoje prednosti in pomanjkljivosti (slika 3). Prednosti LCL so relativno enostavna vzpostavitev iz periferne krvi darovalcev ali iz krio-prezerviranih PBMC ter visoka uspešnost transdukcije. LCL rastejo v suspenziji in so preproste za vzdrževanje. Predstavljajo neomejen vir celic, DNA, RNA in proteinov darovalcev ter so primerne za dolgoročno shranjevanje v obsežnih biobankah, kar omogoča nadaljnje raziskave (52). Poleg prednosti ima uporaba LCL v predkliničnih študijah tudi določene omejitve. Postopek transdukcije privede do sprememb v celičnem ciklu, regulaciji transkripcijskih dejavnikov, sprememb metilacije določenih genov in mitohondrijske DNA (52–54). LCL niso primeren celični model za proučevanje fiziološkega delovanja limfocitov B, saj ne zajamejo vseh podskupin limfocitov B (54). Prav tako LCL niso primeren celični model za proučevanje presnove zdravih učinkovin zaradi odsotnosti ali nizkega izražanja encimov družine CYP450. Med pomembne omejitve sodijo tudi variabilnost v hitrosti rasti celic, število kopij EBV v celici ter bazalne ravni ATP; ti dejavniki lahko vplivajo na odziv na zdravilne učinkovine in dodatno otežijo interpretacijo rezultatov. Nedavne raziskave so pokazale, da moramo biti pozorni pri interpretaciji rezultatov analiz mitohondrijske DNA, izolirane iz LCL (55). Primerjalne raziskave metilacije DNA med vzorci krvi in LCL so ugotovile, da LCL niso primerni za proučevanje metilacije genov (56). Izkazalo se je tudi, da se transkripcijski dejavniki in nekatere regulatorne poti med LCL in polno krvjo razlikujejo, zato je pri interpretaciji podatkov, pridobljenih na celičnih linijah LCL, potrebna previdnost (52).

5 SKLEP

LCL so uveljavljen in metodološko dostopen model *in vitro*, ki pomembno prispeva k razumevanju genetsko pogojenih razlik v odzivu na zdravilne učinkovine ter podpira temeljna

načela personalizirane medicine. Njihove ključne prednosti so relativno preprosta vzpostavitev iz periferne krvi, visoka uspešnost transdukcije, enostavno vzdrževanje ter ohranjanje genetskih značilnosti darovalca. V povezavi z obsežnimi biobankami LCL omogočajo sistematične farmakogenomske, genomske in transkriptomске raziskave ter povezovanje genotipa s celičnim fenotipom in odzivom na zdravilne učinkovine.

Kljub široki uporabnosti imajo LCL pomembne omejitve, povezane predvsem z vplivom transdukcije z EBV na celični cikel, regulacijo transkripcije, epigenetske vzorce in presnovne poti. Zaradi odsotnosti ali nizkega izražanja encimov družine CYP450 LCL niso primeren model za proučevanje presnove zdravih učinkovin, dodatno pa interpretacijo rezultatov otežujejo variabilnost rasti, število kopij EBV in spremembe v mitohondrijski DNA. Zato je uporaba LCL najprimernejša kot del komplementarnega nabora celičnih modelov.

V prihodnosti bo vloga LCL v personalizirani medicini predvsem v integraciji farmakogenomskih podatkov z drugimi pristopi "omik", razvoju napovednih modelov na osnovi umetne inteligence ter pri identificiranju in funkcijski validaciji bioloških označevalcev učinkovitosti in toksičnosti zdravih učinkovin. Kot povezava med temeljnimi raziskavami in klinično prakso bodo LCL tudi v prihodnje pomemben podporni model *in vitro* pri razvoju varnejših in učinkovitejših terapevtskih pristopov, prilagojenih posamezniku.

6 LITERATURA

1. Brlek P, Bulić L, Bračić M, Projić P, Škaro V, Shah N, et al. Implementing Whole Genome Sequencing (WGS) in Clinical Practice: Advantages, Challenges, and Future Perspectives. *Cells*. 2024 Mar 13;13(6):504.
2. Manzari MT, Shamay Y, Kiguchi H, Rosen N, Scaltriti M, Heller DA. Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nat Rev Mater*. 2021 Feb 2;6(4):351–70.
3. Gurwitz D. Human lymphoblastoid cell lines: a valuable tool for personalized medicine research. *The Biochemist*. 2016 Feb 1;38(1):6–9.
4. Johnson KB, Wei W, Weeraratne D, Frisse ME, Misulis K, Rhee K, et al. Precision Medicine, AI, and the Future of Personalized Health Care. *Clinical Translational Sci*. 2021 Jan;14(1):86–93.
5. Primorac D, Bach-Rojecky L, Vadunec D, Juginović A, Žunić K, Matišić V, et al. Pharmacogenomics at the center of precision medicine: challenges and perspective in an era of Big Data. *Pharmacogenomics*. 2020 Jan 1;21(2):141–56.
6. Singh N, Vayer P, Tanwar S, Poyet JL, Tsaioun K, Villoutreix BO. Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Front Drug Discov*. 2023 May 24;3:1201419.

7. Yin X, Li Q, Shu Y, Wang H, Thomas B, Maxwell JT, et al. Exploiting urine-derived induced pluripotent stem cells for advancing precision medicine in cell therapy, disease modeling, and drug testing. *J Biomed Sci.* 2024 May 9;31(1):47.
8. 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;131(5):861–72.
9. Rotman Primec J, Krajšek Z, Urbančič D NZ. Inducirane pluripotentne matične celice pri odkrivanju in vrednotenju zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn.* 2025 maj;39(1): 39–48.
10. Jeon JP. Human Lymphoblastoid Cell Lines in Pharmacogenomics. In: *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2021 May 6]. p. 89–110. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123868824000062>
11. Kuang YL, Theusch E, M Krauss R, W Medina M. Identifying genetic modulators of statin response using subject-derived lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2021 May [cited 2024 Dec 5];22(7). Available from: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/summary/21250a4d-779d-47e7-8c00-62e0af3f1783-0132409796/relevance/1>
12. Gurwitz D, Steeg R. Enriching iPSC research diversity: Harnessing human biobank collections for improved ethnic representation. *Drug Development Research.* 2024 Aug;85(5):e22227.
13. Voloshin N, Tyurin-Kuzmin P, Karagyaur M, Akopyan Z, Kulebyakin K. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *IJMS.* 2023 Aug 12;24(16):12716.
14. Ding T, Du Y, Yang B, Tian W, Li J, Xie J. Comprehensive review of macrophage models: primary cells and immortalized lines across species. *Front Immunol.* 2025;16:1640935.
15. Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet.* 2022 Aug;23(8):467–91.
16. Zhai J, Liu Y, Ji W, Huang X, Wang P, Li Y, et al. Drug screening on digital microfluidics for cancer precision medicine. *Nat Commun.* 2024 May 22;15(1):4363.
17. Mrozek-Gorska P, Buschle A, Pich D, Schwarzmayer T, Fechtner R, Scialdone A, et al. Epstein–Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Aug 6;116(32):16046–55.
18. Miller G. Immortalization of Human Lymphocytes by Epstein-Barr Virus. *Yale J. Biol. Med.* 1982 May-Aug; 55(3-4): 305–3106.
19. Okugawa K, Itoh T, Kawashima I, Takesako K, Mazda O, Nukaya I, et al. Recognition of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma cells by cytotoxic T lymphocytes induced in vitro with autologous lymphoblastoid cell line and LMP2-derived, HLA-A24-restricted 9-mer peptide. *Oncol Rep.* 2004 Oct;12(4):725–31.
20. Bu GL, Xie C, Kang YF, Zeng MS, Sun C. How EBV Infects: The Tropism and Underlying Molecular Mechanism for Viral Infection. *Viruses.* 2022 Oct 27;14(11):2372.
21. Adeniran AA, Giovannoni G, Baker D, James LK. Epstein–Barr virus and spontaneous lymphoblastoid cell lines: establishment, molecular characteristics, immune modulation, and therapeutic insight. *Clin Exp Immunol.* 2025 Jan 1;219(1):uxaf061.
22. Nam HY, Shim SM, Han BG, Jeon JP. Human lymphoblastoid cell lines: a goldmine for the biobankomics era. *Pharmacogenomics.* 2011 June;12(6):907–17.
23. Adeniran AA, Giovannoni G, Baker D, James LK. Epstein–Barr virus and spontaneous lymphoblastoid cell lines: establishment, molecular characteristics, immune modulation, and therapeutic insight. *Clin Exp Immunol.* 2025 Jan 1;219(1):uxaf061.
24. Ikeda M, Hayes CK, Schaller SJ, Longnecker R. Latent membrane proteins from EBV differentially target cellular pathways to accelerate MYC-induced lymphomagenesis. *Blood Adv.* 2022 July 22;6(14):4283–96.
25. Dheekollu J, Wiedmer A, Ayyanathan K, Deakynne JS, Messick TE, Lieberman PM. Cell-cycle-dependent EBNA1-DNA crosslinking promotes replication termination at oriP and viral episome maintenance. *Cell.* 2021 Feb 4;184(3):643–654.e13.
26. Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T, et al. Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nature Communications.* 2011 Nov 22;2:548.
27. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kägi D, Ho A, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med.* 1999 June 21;189(12):1939–45.
28. Wheeler HE, and Dolan ME. Lymphoblastoid Cell Lines in Pharmacogenomic Discovery and Clinical Translation. *Pharmacogenomics.* 2012 Jan 1;13(1):55–70.
29. Stark AL, and Dolan ME. Lymphoblastoid Cell Lines in Pharmacogenomics: How Applicable are They to Clinical Outcomes? *Pharmacogenomics.* 2013 Apr 1;14(5):447–50.
30. Morag A, Pasmanik-Chor M, Oron-Karni V, Rehavi M, Stingl JC, Gurwitz D. Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker. *Pharmacogenomics.* 2011; 12(2):171–184.
31. Urbančič D, Šmid A, Alenka, Stocco G, Gabriele, Decorti G, Giuliana, Mlinarič-Rašcan J, Irena, and Karas Kuželčki N. Novel motif of variable number of tandem repeats in TPMT promoter region and evolutionary association of variable number of tandem repeats with TPMT*3 alleles. *Pharmacogenomics.* 2018 Nov 1;19(17):1311–22.
32. Green AJ, Anchang B, Akhtari FS, Reif DM, Motsinger-Reif A. Extending the lymphoblastoid cell line model for drug combination pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2021 June;22(9):543–51.
33. Ozgyin L, Horvath A, Hevessy Z, Balint BL. Extensive epigenetic and transcriptomic variability between genetically identical human B-lymphoblastoid cells with implications in pharmacogenomics research. *Sci Rep.* 2019 Mar 20;9(1):4889.
34. Morrison G, Lenkala D, LaCroix B, Ziliak D, Abramson V, Morrow PK, et al. Utility of patient-derived lymphoblastoid cell lines as an ex vivo capecitabine sensitivity prediction model for breast cancer patients. *Oncotarget.* 2016 June 21;7(25):38359–66.
35. Lovelock PK, Wong EM, Sprung CN, Marsh A, Hobson K, French JD, et al. Prediction of BRCA1 and BRCA2 mutation status using post-irradiation assays of lymphoblastoid cell lines is compromised by inter-cell-line phenotypic variability. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sept;104(3):257–66.
36. Brown CC, Havener TM, Medina MW, Jack JR, Krauss RM, McLeod HL, Motsinger-Reif AA. Genome-wide association and pharmacological profiling of 29 anticancer agents using lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics.* 2014 Feb;15(2):137–46.
37. Brown CC, Havener TM, Medina MW, Auman JT, Mangravite LM, Krauss RM, et al. A genome-wide association analysis of temozolomide response using lymphoblastoid cell lines shows a clinically relevant association with MGMT. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2012 Nov;22(11):796.

38. Zheng E, Madura P, Grandos J, Broncel M, Pawlos A, Woźniak E, et al. When the same treatment has different response: The role of pharmacogenomics in statin therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024 Jan 1;170:115966.
39. Ramos-Campoy O, Llado A, Bosch B, Ferrer M, Perez-Millan A, Vergara M, et al. Differential Gene Expression in Sporadic and Genetic Forms of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia in Brain Tissue and Lymphoblastoid Cell Lines. *Mol Neurobiol*. 2022 Oct;59(10):6411–28.
40. Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, et al. Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*. 2016 Oct 3;9:88.
41. Fries GR, Colpo GD, Monroy-Jaramillo N, Zhao J, Zhao Z, Arnold JG, et al. Distinct lithium-induced gene expression effects in lymphoblastoid cell lines from patients with bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017 Nov;27(11):1110–9.
42. Hedges EC, Topp S, Shaw CE, Nishimura AL. Generation of six induced pluripotent stem cell lines from patients with amyotrophic lateral sclerosis with associated genetic mutations in either FUS or ANXA11. *Stem Cell Res*. 2021 Apr;52:102246.
43. De Palma A, Agresta AM, Viglio S, Rossi R, D'Amato M, Di Silvestre D, et al. A Shotgun Proteomic Platform for a Global Mapping of Lymphoblastoid Cells to Gain Insight into Nasu-Hakola Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Sept;22(18):9959.
44. Battisti C, Formichi P, Tripodi SA, Meloni I, Mangiavacchi P, Zappella M, et al. Lymphoblastoid cell lines of Rett syndrome patients exposed to oxidative-stress-induced apoptosis. *Brain Dev*. 2004 Sept;26(6):384–8.
45. Sanchez-Lanzas R, Alvarez-Castelao B, Bermejo T, Ayuso T, Tunon T, Castano JG. Protein degradation in a LAMP-2-deficient B-lymphoblastoid cell line from a patient with Danon disease. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*. 2016 Aug;1862(8):1423–32.
46. Soldan SS, Su C, Monaco MC, Yoon L, Kannan T, Zankharia U, et al. Multiple sclerosis patient-derived spontaneous B cells have distinct EBV and host gene expression profiles in active disease. *Nat Microbiol*. 2024 June;9(6):1540–54.
47. Monaco MCG, Soldan SS, Su C, Clauze A, Cooper JF, Patel RJ, et al. EBNA1 Inhibitors Block Proliferation of Spontaneous Lymphoblastoid Cell Lines From Patients With Multiple Sclerosis and Healthy Controls. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2023 Aug 10;10(5):e200149.
48. Chapman KE, Shah UK, Fletcher JF, Johnson GE, Doak SH, Jenkins GJS. An integrated in vitro carcinogenicity test that distinguishes between genotoxic carcinogens, non-genotoxic carcinogens, and non-carcinogens. *Mutagenesis*. 2024 Mar 12;39(2):69–77.
49. Bolt AM, Douglas RM, Klimecki WT. Arsenite exposure in human lymphoblastoid cell lines induces autophagy and coordinated induction of lysosomal genes. *Toxicol Lett*. 2010 Nov 30;199(2):153–9.
50. Marković T, Gobec M, Gurwitz D, Mlinarič-Raščan I. Characterization of human lymphoblastoid cell lines as a novel in vitro test system to predict the immunotoxicity of xenobiotics. *Toxicol Lett*. 2015 Feb 17;233(1):8–15.
51. Klopčič I, Marković T, Mlinarič-Raščan I, Dolenc MS. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. *Toxicol Lett*. 2018 Sept 15;294:95–104.
52. Lopes-Ramos CM, Paulson JN, Chen CY, Kuijjer ML, Fagny M, Platig J, et al. Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin. *BMC Genomics*. 2017 Dec;18(1):723.
53. Joesch-Cohen LM, Glusman G. Differences between the genomes of lymphoblastoid cell lines and blood-derived samples. *Adv Genomics Genet*. 2017;7:1–9.
54. MacKinnon C, McLean R, Pritchard AL. Lymphoblastoid cell lines do not recapitulate physiological circulating B cell subtypes. *Curr Res Immunol*. 2024 June 8;5:100079.
55. Liu C, Fetterman JL, Sun X, Yan K, Liu P, Luo Y, et al. Comparison of mitochondrial DNA sequences from whole blood and lymphoblastoid cell lines. *Sci Rep*. 2022 Feb 2;12(1):1801.
56. Brennan EP, Ehrich M, Brazil DP, Crean JK, Murphy M, Sadlier DM, et al. Comparative analysis of DNA methylation profiles in peripheral blood leukocytes versus lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics*. 2009 Apr 30;4(3):159–64.

NANOTELESA: ALTERNATIVA KLASIČNIM MONOKLONSKIM PROTITELESOM

NANOBODIES: AN ALTERNATIVE TO CONVENTIONAL MONOCLONAL ANTIBODIES

AVTORJI / AUTHORS:

Davor Babič, mag. kem. inž.¹

prof. dr. Vladka Čurin Šerbec, univ. dipl. kem.²

viš. znan. sod., asist. dr. Ivana Jovčevska, inž. kem.¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,
Center za funkcijsko genomiko in biočipe,
Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko
medicino, Center za imunologijo in razvoj,
Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ivana.jovcevska@mf.uni-lj.si



POVZETEK

Težko verižna protitelesa, prvič odkrita pri kamelidih leta 1989, predstavljajo nekonvencionalno obliko protiteles, sestavljeno izključno iz težkih verig in brez lahkih verig, značilnih za klasična protitelesa. Njihova posamezna variabilna domena, imenovana nanotelo ima ključne prednosti pred konvencionalnimi protitelesi: stabilnost, manjša velikost, visoka topnost v vodi, boljše prehajanje v tkiva in enostavna proizvodnja v rekombinantnih sistemih. Nanotelesa raziskujejo predvsem na področju diagnostike, kjer se uporabljajo v tehnikah, kot so pozitronska emisijska tomografija s hkratno računalniško tomografijo, biosenzorji in imunokromatografski testi. V terapevtske namene jih razvijajo za zdravljenje raka ter infekcijskih in avtoimunskih bolezni. Od prve odobritve kaplacizumaba leta 2018 so bila odobrena še tri zdravila na osnovi nanoteles, kar potrjuje njihov vse večji pomen v translacijski in klinični medicini.

KLJUČNE BESEDE:

kaplacizumab, monoklonska protitelesa, nanotelesa, PET/CT, rak

ABSTRACT

Heavy-chain antibodies, first discovered in camelids in 1989, represent an unconventional form of antibodies composed solely of heavy chains and lacking the light chains that are characteristic for classical antibodies. Their single variable domain, known as a nanobody offers key advantages over conventional antibodies, such as stability, smaller size, high solubility in water, improved tissue penetration, and easy production in recombinant systems. Nanobodies are primarily explored in the field of diagnostics, where they are used in techniques such as positron emission tomography/computed tomography, biosensors, and immunochromatographic tests. For therapeutic purposes, they are being developed for the treatment of cancer as well as infectious and autoimmune diseases. Since the first approval of caplacizumab in 2018, three additional nanobody-based drugs have been approved, confirming their growing importance in translational and clinical medicine.

KEY WORDS:

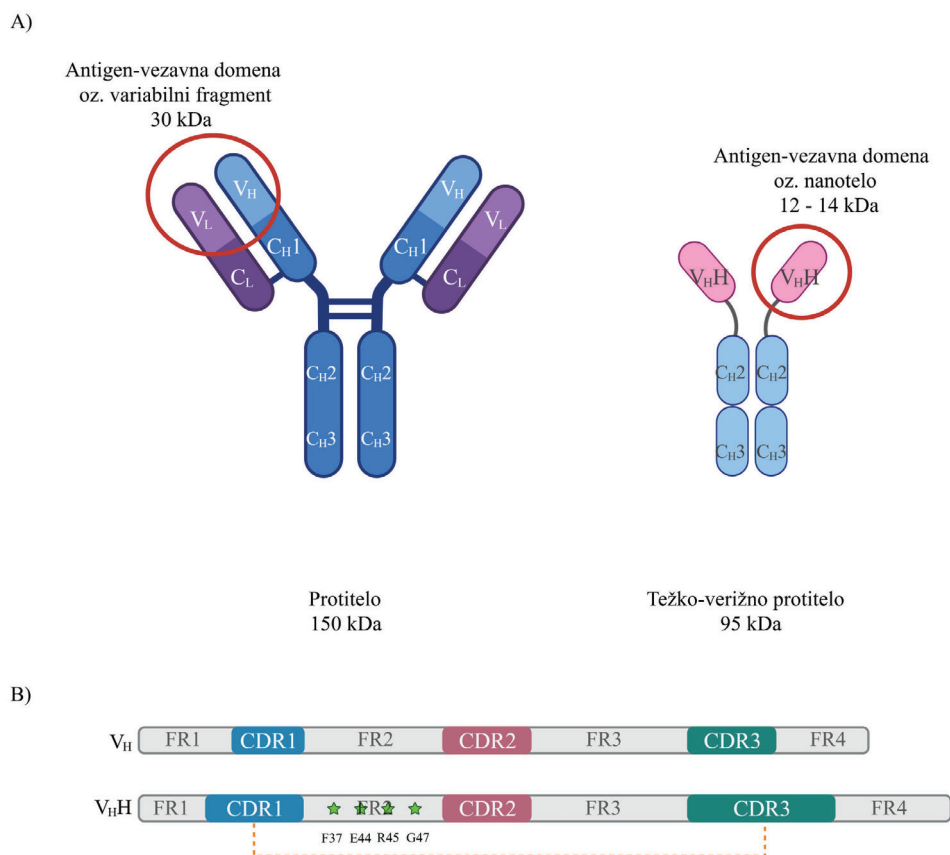
cancer, caplacizumab, monoclonal antibodies, nanobodies, PET/CT



1 UVOD

Protitelesa so ključni del imunskega sistema in eden najpomembnejših dejavnikov v boju proti različnim boleznim. Kot del pridobljenega imunskega sistema zagotavljajo specifično zaščito, kadar prirojeni imunski sistem ni dovolj učinkovit. Protitelesa omogočajo nevtralizacijo patogenov, aktivacijo komplementa in spodbujanje celi-

čnih imunskih odzivov, kar izboljša splošno obrambno vlogo organizma (1). Zaradi zaščitne vloge proti patogenom in toksinom so protitelesa postala pomembno orodje v medicini. Od proizvodnje prvega monoklonskega protitelesa, razvitega s hibridomsko tehnologijo, je minilo 50 let, od prvega odobrenega monoklonskega protitelesa, muromonaba – CD3, ki se je uporabljal za preprečevanje zavrnitve presajenih ledvic, pa malo manj kot 40 let (2). Polovica monoklonskih protiteles v kliničnem razvoju in tretjina odobrenih monoklonskih protiteles je namenjenih zdravljenju raka (3). Klasična protitelesa, imunoglobulini



Slika 1: Shematski prikaz protiteles, prisotnih v serumu kamel. A) Levo: Klasično protitelo ima variabilni domeni lahke (V_L) in težke (V_H) verige. Desno: Težko-verižno protitelo vsebuje samo eno variabilno domeno oziroma nanotelo (V_{HH}). B) Organizacija zaporedja domen V_H in V_{HH} . Ohranjene regije (FR)-siva regija CDR1-modra; CDR2-roza; CDR3-zelena. Spremenjene aminokisljine v regiji FR2 so označene z zelenimi zvezdicami. Črtkana črta je disulfidni mostiček. Privzeto po (8, 16). Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 1: Schematic representation of antibodies present in camel serum. A) Left: A conventional antibody contains the variable domains of the light (V_L) and heavy (V_H) chains. Right: A heavy-chain antibody contains only a single variable domain, known as a nanobody (V_{HH}). B) Organization of the V_H and V_{HH} domain sequences. Framework regions (FR)-gray; CDR1-blue; CDR2-pink; and CDR3-green. Modified amino acids in the FR2 region are indicated by green asterisks. The dashed line represents a disulfide bond. Adapted from (8, 16) Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

G (IgG), so sestavljena iz dveh težkih in dveh lahkih verig s skupno molsko maso 150 kDa. Težka veriga je sestavljena iz treh konstantnih domen (C_H1 , C_H2 in C_H3) in ene variabilne domene (V_H), lahka veriga pa iz ene konstantne domene (C_L) in ene variabilne domene (V_L), kar je prikazano na sliki 1 (4). Leta 1989 so pri kamelidih odkrili težkoverižna protitelesa, ki nimajo lahke verige (5). Variabilni del takega težkoverižnega protitelesa, imenovan nanotelo oziroma V_HH , se je izkazal kot zanimiva alternativa klasičnim monoklonskim protitelesom, predvsem zaradi približno desetkrat manjše velikosti in boljšega dostopa v tkiva. Kasneje so začeli razvijati nanotelesa za uporabo v diagnostiki in pri zdravljenju različnih bolezni. Nanotelesa danes tako raziskujejo na diagnostičnem področju, kot je pozitronska emisijska tomografija s hkratno računalniško tomografijo (angl. *positron emission tomography/computed tomography*; PET/CT) ter za zdravljenje raka, infekcijskih in avtoimunskih bolezni (4). Trenutno so za zdravljenje odobrena štiri nanotelesa (6). V tem članku bomo podrobneje opisali nanotelesa in njihovo pripravo, uporabo nanoteles za diagnostične in terapevtske namene ter zaključili z opisom nanoteles, ki so odobrena za klinično uporabo.

2 NANOTELESA

Težkoverižna protitelesa, ki se naravno pojavljajo v serumu kamel (dromedarji, kamele, lame, alpake, gvanaki in vikunje), so bila odkrita pred 30 leti (5). Kasneje so bila odkrita v ribah hrustančnicah, med drugim v morskih psih (7). Od takrat se intenzivno uporabljajo v poskusih *in vitro* in *in vivo* ter v predkliničnem in kliničnem preskušanju. Njihove rekombinantno pridobljene antigen-vezavne domene, tako imenovana nanotelesa, so sestavljena iz ene same domene z majhno molekulsko maso (14 kDa). Nanotelesa so ovalne oblike in z dimenzijami v območju nekaj nanometrov (7). Enako kot klasični imunoglobulini so nanotelesa sestavljena iz štirih ohranjenih regij (angl. *framework regions*; FR) in treh zank, ki določajo komplementarnost (angl. *complementarity determining regions*; CDR), kot je prikazano na sliki 1. Težkoverižna protitelesa nimajo lahkih verig in jim tudi manjka ena konstantna težka domena (C_H1). Zanki CDR1 in CDR3 sta pri težkoverižnih nanotelesih povečani (8–10). Večje število aminokislin, 18 aminokislin pri kamelah v primerjavi s 13 aminokislinami pri človeku, omogoča

KLJUČNI POUDARKI

- Nanotelesa so majhni, stabilni vezavni fragmenti težkoverižnih protiteles kamelidov, ki omogočajo boljše prodiranje v tkiva, visoko specifičnost in enostavno rekombinantno proizvodnjo.
- Zaradi boljše stabilnosti in topnosti ter odsotnosti učinkov, vezanih na regijo Fc, so primerna za hitre diganostične metode, kot so imunokromatografija, biosenzorji ter slikanje PET/CT.
- Raziskuje se uporaba nanoteles za zdravljenje raka, avtoimunskih in infekcijskih bolezni ter pri razvoju naprednih terapevtskih strategij, kot so sistemi TriKe, terapije s celicami CAR-T in konjugati nanotelo-zdravilo.
- Njihova specifičnost omogoča razvoj učinkovitih kandidatov bioloških zdravil za nevtralizacijo virusov, bakterijskih toksinov ter strupov kač in škorpionov.
- Od leta 2018 so odobrena štiri zdravila na osnovi nanoteles (npr. kaplacizumab, ozoralizumab, enavafolimab), število kliničnih preskušanj pa po letu 2018 hitro narašča.

večjo površino za interakcijo z antigenom (11, 12). Regije FR lahko pri nanotelesih sodelujejo pri vezavi, česar klasična protitelesa ne omogočajo (13). Izmed regij FR je FR2 običajno ohranjena in pri klasičnih protitelesih vsebuje hidrofobne aminokisline, ki interagirajo s hidrofobnimi regijami V_L . Pri težkoverižnih protitelesih pa regija FR2 vsebuje hidrofilne aminokisline, in sicer $V_H \rightarrow V_HH$: Val37Phe ali Tyr, Gly44Glu, Leu45Arg ali Cys, in Trp47Gly (11). Zaradi teh zamenjav so nanotelesa bolj topna v vodi in manj agregirajo. V nanotelesih se lahko pojavita še dva dodatna Cys, eden v zanki CDR1 ali regiji FR2 in drugi v zanki CDR3, ki tvorita disulfidni most in tako dodatno stabilizirata celotno strukturo (14). Zanka CDR3 je pri klasičnih in težkoverižnih protitelesih v največji meri odgovorna za prepoznavanje in vezavo z antigenom. Zanka CDR3 pri klasičnih protitelesih tvori votlino, žleb ali ravno površino, ki je ustrezna za prepoznavanje haptenov, peptidov ali epitopov na velikih proteinih. Pri težkoverižnih protitelesih pa je zanka CDR3 konveksne oblike, ki prodre v majhne votline na površini antigena oziroma interagira z antigenскими konkavnimi površinami. Tako lahko nanotelesa prepoznajo katalitska mesta encimov in modulirajo njihovo funkcijo (15). Protitelesa in nanotelesa se z antigen vezavno domeno (paratopom) vežejo na različne epitope istega antigena. Nanotelesa so najmanjši naravni antigen-vezavni fragmenti z edinstvenimi lastnostmi (16). V primerjavi s klasičnimi



protitelesi imajo nanotelesa številne prednosti kot tudi določene slabosti (17):

- majhna velikost, ki je prednost pri ciljanju slabo dostopnih tkiv,
- močna afiniteta za vezavo na antigen,
- konveksni paratop, primeren za prepoznavanje katalitičnih mest encimov,
- stabilnost pri nefizioloških vrednostih pH (pH v območju od 3 do 9) in pri daljši izpostavljenosti povišani temperaturi (60–80 °C, nekaj tednov pri 37 °C), kemičnim denaturantom (2–3 M gvanidiniem kloridu, 6–8 M urei) in proteolitičnim encimom,
- dobra topnost v vodi,
- stroškovno učinkovita proizvodnja v mikrobnih sistemih z nespremenljivimi lastnostmi,
- hitro izločanje iz ledvic,
- odsotnost s Fc posredovalnih učinkov.

Z več kot 80% podobnostjo nukleotidnega zaporedja veljajo nanotelesa za strukturno podobna klasičnim imunoglobulinom, zaradi česar niso imunogena in so primerna za uporabo pri ljudeh (14).

3 POSTOPEK PRIDOBIVANJA NANOTELES

Nanotelesa lahko pridobimo iz treh vrst knjižnic: imunske, naivne in sintetične (4). Imunske knjižnice se pridobijo z vsaj 4-kratno imunizacijo živali družine *Camelidae*, ki traja približno 2 meseca. Nato se iz odvzete periferne krvi izolirajo limfociti, iz katerih se ekstrahira informacijska RNA (mRNA), sintetizira komplementarna DNA (cDNA) in izvede dvostopenjska verižna reakcija s polimerazo (PCR) ter gelska elektroforeza. Z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za zaporedje nanoteles, se pomnožijo V_H H. Ti amplikoni se nato vstavijo v vektor, kot je pHEN4, in se vnesejo v kompetentne celice, kot so celice bakterije *Escherichia coli*, s čimer se pridobi imunska knjižnica nanoteles (slika 2A). Knjižnica se nato obogati s fagnim prikazom, ki omogoča selekcijo nanoteles z visoko afiniteto do ciljnega antigena. Fagi, ki prikazujejo želeno V_H H z visoko afiniteto, se izolirajo in pomnožijo, slabše vezani fagi pa se odstranijo. Ta postopek se ponovi večkrat, da se obogatijo kloni z najvišjo afiniteto in specifičnostjo (slika 2B). Izbrana nanotelesa se nato preveri z encimsko imunskim testom (ELISA), določi se njihovo nukleotidno zaporedje in se jih nato proizvede v večjih količinah v bakterijah. Končne produkte se očisti s kovinsko-

kelatno afinitetno imunokromatografijo (IMAC) in kromatografijo z ločevanjem po velikosti (SEC). Končno čistost in velikost proteina se preveri s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE), kar je prikazano na sliki 2C (4, 18).

4 NANOTELESA V DIAGNOSTIKI

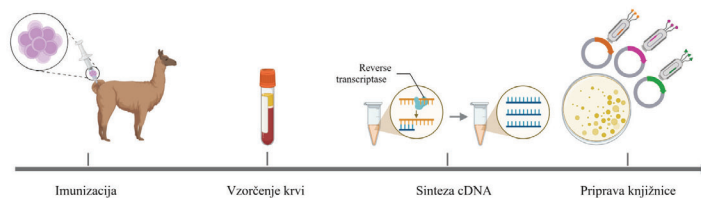
Raziskave o možni uporabi nanoteles potekajo na različnih področjih, vključno z diagnostiko. Na tem področju raziskovalci preučujejo različne metode, kot so imunokromatografija, biosenzorji in diagnostično slikanje (4).

4.1 IMUNOKROMATOGRAFIJA

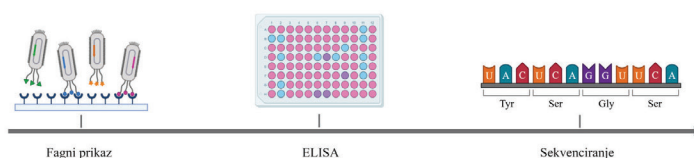
Imunokromatografija ali test s stranskim tokom je hiter diagnostični test, ki specifično zazna prisotnost antigena v vzorcu. Kot je prikazano na sliki 3, vzorec nanese na vzorčno blazinico. Vzorec potuje naprej na konjugirano blazinico, ki vsebuje za antigen specifično protitelo, konjugirano z obarvanim ali fluorescentnim označevalcem. Če je antigen v vzorcu prisoten, se veže na označeno protitelo in nastali kompleks potuje naprej po testnem traku. Nato vzorec preide na testno črto, na kateri so imobilizirana protitelesa, ki so zmožna vezati kompleks Ag-Ab. Nevezana označena protitelesa potujejo naprej na kontrolno črto, kjer se vežejo na druga imobilizirana protitelesa, ki potrjujejo pravilno delovanje testa. Na koncu presežek reagentov pripotuje na absorpcijsko blazinico. Rezultat testa se interpretira na podlagi prisotnosti obarvanih črt. Pri pozitivnem rezultatu sta vidni testna in kontrolna črta, pri negativnem rezultatu je vidna le kontrolna črta. V primeru odsotnosti kontrolne črte je test neveljaven ne glede na pojav testne črte. Spodnji del slike 3 prikazuje pozitivni, negativni in nepravilni rezultat testa (4).

Zaradi lastnosti nanoteles, kot so visoka stabilnost, afiniteta in odpornost na toploto, večji repertoar paratopov, odsotnost regije Fc, enostavna modifikacija v večvalentni konstrukt in enostavna adsorpcija na zlate nanodelce (4), bi lahko nanotelesa pri imunokromatografiji uporabljali namesto klasičnih protiteles. Z uporabo nanoteles so bili razviti različni imunokromatografski testi, na primer za detekcijo aflatoksina B1 (20) ter za potrjevanje okužbe s SARS-CoV-2 in s koronavirusom bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (MERS) (21).

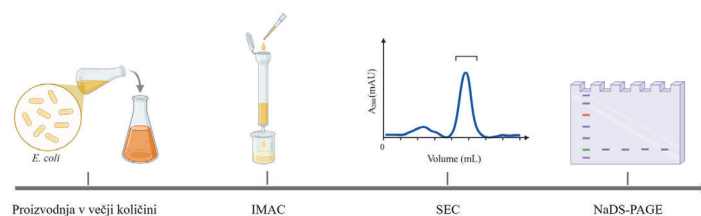
A) Imunizacija in priprava knjižnice



B) Izbor nanotelesa



C) Proizvodnja in čiščenje nanotelesa



Nanotelo

Slika 2: Shematski prikaz pridobivanja nanoteles iz imunske knjižnice. A) Imunizacija in priprava knjižnice. B) Izbor nanoteles s fagnim prikazom. C) Proizvodnja in čiščenje izbranih nanoteles. cDNA – komplementarna DNA, ELISA – encimskoimunski test, IMAC – kovinsko-kelatna afinitetna imunokromatografija, NaDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata, SEC – kromatografija z ločevanjem po velikosti. Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 2: Schematic representation of nanobody generation from an immune library. A) Immunization and library preparation; B) Nanobody selection by phage display; C) Production and purification of selected nanobodies. cDNA – complementary DNA, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, IMAC – immobilized metal affinity chromatography, NaDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, SEC – size exclusion chromatography. Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

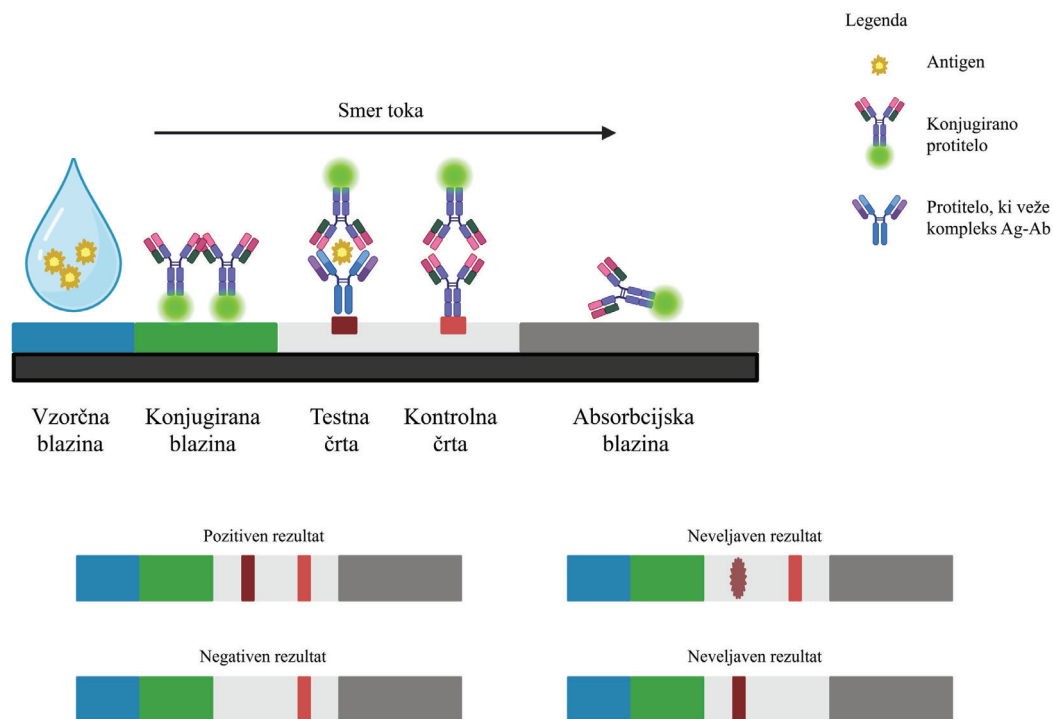
4.2 BIOSENZORJI

Biosenzorji so naprave, ki vsebujejo bioreceptor, specifičen za določen antigen, pritrjen na polprevodnik (slika 4). Po stiku med antigenom in bioreceptorjem pride do spremembe električnega potenciala, katerega signal se pomnoži in izmeri (22). Bioreceptor je na površini imobiliziran kovalentno s pomočjo sistema *SpyTag-SpyCatcher*, pri čemer je celoten proteinski kompleks dodatno sidran na funkcionalizirani heksanditiolni plasti, pritrjeni na elektrodo. Za zmanjšanje nespecifične vezave se površina po imobilizaciji blokira z govejim serumskim albuminom. Prednost

biosenzorjev je v njihovi hitrosti, če jih primerjamo z ELISA ali imunokromatografijo, saj je rezultat viden v nekaj sekundah. Nanotelesa so še posebej primerna kot idealni biosenzorji, saj lahko zdržijo visoke temperature in ekstremne vrednosti pH (23). Biosenzorji bazirani na nanotelesih so bili razviti za detekcijo SARS-CoV-2 in MERS (4).

4.3 DIAGNOSTIČNO SLIKANJE

Za diagnostično slikanje se med drugim uporabljajo optične in nuklearne metode, ki za vizualizacijo uporabljajo fluorescentno ali radioaktivno označene molekule. Za potrebe



Slika 3: Shematski prikaz imunokromatografskega testa. Vzorec potuje od vzorčne blazinice prek konjugirane blazinice do testne in kontrolne črte ter absorpcijske blazinice. Prikazani so pozitivni, negativni in neveljavni rezultati testa. Privzeto po (19). Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 3: Schematic representation of an immunochromatographic test. The sample migrates from the sample pad through the conjugate pad to the test and control lines and finally to the absorption pad. Positive, negative, and invalid test results are shown. Adapted from (19). Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

optičnega molekularnega slikanja so preskušali razliko med nanotelesom in konvencionalnim monoklonskim protitelesom cetuksimab, ki je usmerjeno proti receptorju za epidermalni rastni faktor (angl. *epidermal growth factor receptor*; EGFR). Nanotelo proti EGFR je omogočilo hitrejšo vizualizacijo tumorjev, saj se je signal pojavil že 30 minut po injiciranju, medtem ko pri cetuksimabu v tem času signal ni bil ločljiv od ozadja. Poleg tega je nanotelo učinkoviteje prodrlo v tumor in se po njem razporedilo (24).

Pri radiološkem slikanju, kot sta PET in enofotonska emisijska računalniška tomografija so izvedli več študij z radioaktivno označenim nanotelesom proti receptorju 2 za epidermalni rastni faktor (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*; HER2), ki so kazale na veliko razmerje tumor-kri/mišica, visok kontrast pri PET ter manjše obsevanje ostalih organov v primerjavi s konvencionalnimi monoklonskimi protitelesi (4).

Pomembna nadgradnja diagnostičnega slikanja, ki omogoča natančno spremljanje dinamike proteinov v živih

celicah, je bila objavljena v nedavni študiji. V njej je bil predstavljen inovativen primer sistema endogenega označevanja usmerjenega z nanotelesi, imenovan ALFA (angl. *ALFA Nb-guided endogenous labeling*; ANGEL). Pri tem pristopu se v genom s pomočjo gruč enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev s CRISPR povezanim proteinom 9 (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein 9*; CRISPR-cas9) vstavi majhna peptidna oznaka ALFA (ALFA-tag), ki jo specifično prepozna fluorescentno označeno nanotelo. Fluorescentni signal je prisoten le, kadar je ALFA-tag uspešno vgrajen, saj se nanotelo v odsotnosti tarče razgradi. To omogoča hitro prepoznavanje in izbor pravilno označenih celic ter natančno spremljanje proteinov v njihovem naravnem celičnem okolju. S tem je mogoče z enim samim nanotelesom specifično zaznati in spremljati endogene proteine, kar bistveno poveča uporabnost nanoteles v raziskavah in diagnostiki (25).

5 UPORABA NANOTELES PRI ZDRAVLJENJU

5.1 NANOTELESA PROTI RAKU

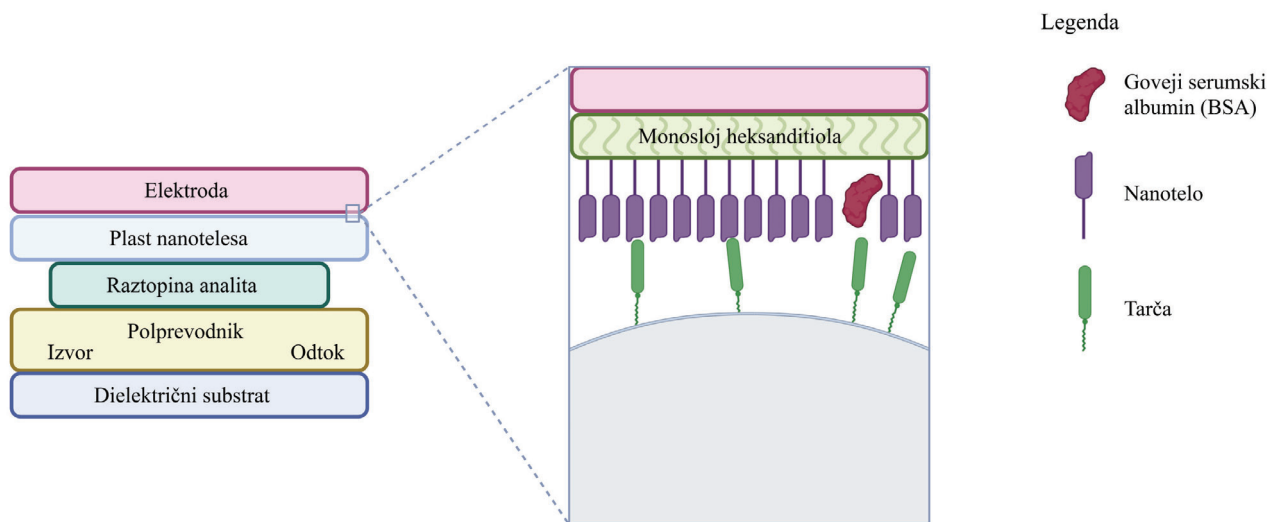
Poleg uporabe nanoteles pri diagnostičnem slikanju, raziskujejo možnost njihove uporabe tudi pri zdravljenju, predvsem v predkliničnih modelih in kliničnih raziskavah. Razvili so trispecifična nanotelesa tipa TriKe, ki aktivirajo naravne celice ubijalke in ciljajo receptor CLEC12a, značilen za akutno mieloično levkemijo. Pokazali so ozdravitev akutne mieloične levkemije *in vivo* z minimalnimi stranskimi imunskimi učinki, vendar se tovrstni terapevtski pristopi trenutno še ne uporabljajo v rutinski klinični praksi (26). Na področju TriKe je prvo klinično preskušanje faze 1/2 zaustavljeno (27), medtem ko drugo preskušanje faze 1/2 še pridobiva bolnike (28). Obstaja še veliko drugih multiparatopskih nanoteles, ki jih raziskujejo in so v kliničnih preskušanjih (18). Veliko se raziskuje tudi terapija na osnovi himernih anti-genjskih receptorjev T-celic (angl. *chimeric antigen receptor T-cells*; CAR-T), pri kateri se v T-celice vnese genski zapis

za himerni receptor, kjer nanotelo nadomešča klasični eno-verižni variabilni fragment (scFv) kot antigen vezavna do-mena. Trenutno so terapije CAR-T, ki uporabljajo nanotelesa kot vezavno domeno, še v fazi kliničnih preskušanj (29–31). Kljub temu predstavljajo nanotelesa obetavno al-ternativo, saj jih je v primerjavi z monoklonskimi protitelesi lažje genetsko spreminjati in proizvajati v različnih celičnih sistemih (18).

Poleg terapije CAR-T razvijajo konjugate protitelo-zdravilo, pri katerih je monoklonsko protitelo povezano s citotoksično učinkovino, delovanje pa je usmerjeno proti tarčnim celicam. V novejših pristopih monoklonska protitelesa nadomeščajo nanotelesa, kar tvori konjugat nanotelo-zdravilo. Zaradi svoje manjše velikosti imajo konjugati nanotelo-zdravilo potencial za lažji prehod skozi krvno-možgansko pregrado ter za učinkovitejše prodiranje v čvrste tumorje, kar je bilo že pokazano pri tarči HER-2 (32).

5.2 NANOTELESA PROTI AVTOIMUNSKIM BOLEZNIM

Luskavica je kronična vnetna avtoimunska bolezen, za ka-tero je značilno nenadzorovano razmnoževanje keratinoci-



Slika 4: Shematski prikaz biosenzorja: Biosenzor je sestavljen iz polimernega polprevodnika, elektrode in plasti imobiliziranih nanoteles, ki delujejo kot bioreceptorji. Analit je prisoten v raztopini nad senzorsko površino. Vezava tarče povzroči spremembo električnega potenciala na elektrodi, ki se zazna v obliki električnega toka preko polprevodnika. Povzeto po (22). Slika je narejena s pomočjo programa Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

Figure 4: The biosensor consists of a polymer semiconductor, an electrode, and a layer of immobilized nanobodies that function as bioreceptors. The analyte is present in a solution above the sensor surface. Target binding induces a change in the electrical potential at the electrode, which is detected as a change in electrical current through the semiconductor. Adapted from (22). Created in Biorender: <https://BioRender.com/nvscuu5>.

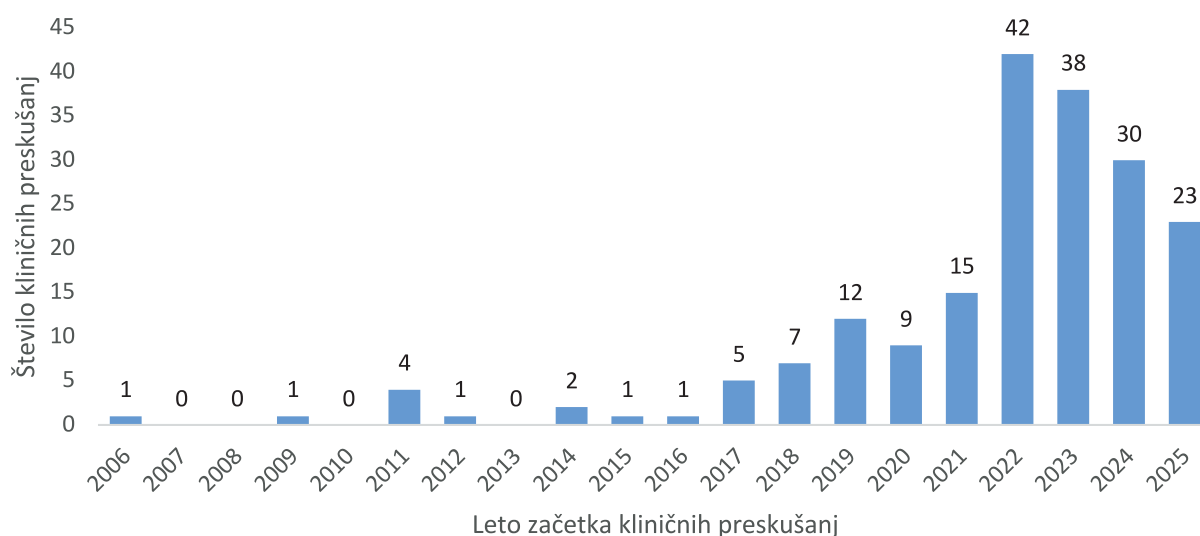
tov ter prekomerna aktivacija osi Th17/interlevkin 17 (IL-17), v kateri imata IL-17A in IL-17F osrednjo vlogo (33). Nanotelesa se lahko uporabijo za ciljanje različnih signalnih poti, med drugim imunskih signalnih poti. Sonelokimab je nanotelo, ki deluje proti IL17A, IL17F in človeškemu serumskim albuminom ter je uspešno prestalo fazo IIb kliničnih preskušanj za zdravljenje luskavice, pri čemer je pokazalo 76% odziv v primerjavi s skupino s placebom (33, 34). Trenutno poteka klinično preskušanje faze tri s sonelokimabom za zdravljenje hude oblike kronične vnetne kožne bolezni *hidradenitis suppurativa*, ki prizadane lasne mešičke (35). Poleg tega razvijajo druga nanotelesa, ki bi lahko zdravila druge avtoimunske bolezni (18). Raziskovalci so uspešno razvili nanotelo, usmerjeno proti IL23 in pokazali njegovo nevtralizacijsko aktivnost (36). To nanotelo bi lahko uporabili pri boleznih, kjer ima pomembno vlogo IL23, kot so revmatoidni artritis, Crohnova bolezen in psoriaza (37). Podobno razvijajo nanotelesa, ki ciljajo označevalce na monocitih in granulocitih (38). Poleg tega raziskujejo uporabo nanoteles na osnovi tehnologije mRNA. V tem pristopu lipidni nanodelci vsebujejo mRNA, ki kodira zapis za nanotelo proti citokinu, timusni stromalni limfopoetin (angl. *thymic stromal lymphopoietin*; TSLP), skupaj s sintetičnim glukokortikoidom budezonidom, kar predstavlja potencialno terapijo za astmo, odporno na klasično zdravljenje.

V mišjih modelih je ta terapija pokazala zmanjšano bronhialno hiperodzivnost in vnetje v dihalnih poteh (39).

5.3 NANOTELESA PROTI INFEKCIJSKIM BOLEZNIM

Trenutno je zdravljenje virusnih obolenj zelo omejeno v primerjavi z zdravljenjem bakterijskih okužb. Zato raziskujejo različne eksperimentalne načine zdravljenja, med drugim uporabo protiteles in nanoteles. Specifična nanotelesa so razvili proti respiratornemu sincicijskemu virusu (RSV), virusu SARS-CoV-2, citomegalovirusu, virusu človeške imunske pomanjkljivosti (HIV), virusu herpes simplex (HSV) ter virusu influence A (40). V drugi fazi kliničnih preskušanj so bila zaključena preskušanja uporabe nanoteles za zdravljenje okužb z RSV, *Campylobacter* in rotavirusu (40). Bakterije postajajo vse bolj odporne na antibiotike, zato potekajo raziskave tudi v tej smeri, saj je neučinkovitost nekaterih antibiotikov postala velik zdravstveni problem (18). Razvili so specifično nanotelo proti toksinu šiga in intiminu *E. coli Shiga*, ki sinergistično inhibira gastroenteritis z inhibicijo tako virulence kot adhezije (41). Razvili so tudi zunajcelične vezikle rdečih krvnih celic, ki izražajo nanotelo proti nevrotoksinu A in kažejo nevtralizacijsko aktivnost *in vivo* ter zagotavljajo zaščito proti 10.000×

Število kliničnih preskušanj o nanotelesih



Slika 5: Graf prikazuje število kliničnih preskušanj z nanotelesi v obdobju od 2006–2025, ki so razvrščene glede na leto začetka preskušanja. V analizo so bila vključena vsa registrirana preskušanja (zaključena, aktivna in načrtovana) (50).

Figure 5: The graph shows the number of clinical studies on nanobodies in the period from 2006 to 2025, classified according to the year when the study began. All registered studies (completed, active, and recruiting) were included in the analysis (50).

smrtni dozi nevrotoksina A iz bakterije *Clostridium botulinum* (42). Raziskovali so tudi uporabo nanotelesa kot diagnostičnega sredstva pri zaznavi stafilokoknega enterotoksina B (SEB), kjer so nanotelo konjugirali s *SpyTag*, tak konstrukt je lahko zaznal SEB z veliko analizo občutljivostjo (43).

5.4 NANOTELESA PROTI TOKSINOM IN STRUPOM

Nanotelesa kažejo potencial pri nevtralizaciji strupov kač in škorpionov. Razvili so več različnih nanoteles, ki nevtralizirajo toksine škorpionja *Androctonus australis hector* (Aah) ter kačje toksine α -kobratoksina kače *Naja kouthia*, kot tudi različna nanotelesa proti strupu kače *Bothrops atrox* (4). Nedavno so Ahmadi in sod. razvili rekombinantni protistrup na osnovi oligoklonalne mešanice nanoteles, ki omogoča širokospektralno nevtralizacijo strupov kober, mamb in rinkhalsov. Protistrup se je izkazal za učinkovitejšega od trenutno uporabljenih protistрупov iz plazme (44). Vsi opisani pristopi so bili do sedaj preučevani predvsem v predkliničnih modelih in še niso del standardnega zdravljenja zastrupitev pri ljudeh.

5.5 NANOTELESA, ODOBRENA ZA ZDRAVLJENJE

Prvo nanotelo, ki ga je leta 2018 odobrila Evropska agencija za zdravila (EMA), je bil kaplacizumab. To je bivalentno nanotelo proti von Willebrandovemu faktorju, ki se uporablja za zdravljenje pridobljene trombotične trombocitopenične purpure (angl. *thrombotic thrombocytopenic purpura*; TTP). Do leta 2024 so bila s strani regulatornih agencij odobrena štiri nanotelesa (6). Po uspehu kaplacizumaba je bil leta 2022 na Japonskem odobren ozoralizumab za zdravljenje revmatoidnega artritis. Ozoralizumab je trivalentno nanotelo, sestavljeno iz dveh humaniziranih nanoteles proti dejavniku tumorske nekroze alfa (TNF- α) in enega nanotelesa proti človeškemu serumskemu albuminu (45). V istem letu je bilo na Kitajskem odobreno nanotelo envafolimab, usmerjeno proti ligandu receptorja programirane celične smrti 1, ki se uporablja za zdravljenje različnih čvrstih tumorjev in kroničnega hepatitisa B, v ZDA tudi za sarkome mehkih tkiv in raka žolčevodov. Envafolimab je sestavljen iz nanotelesa proti receptorju programirane celične smrti 1, ki je z linkerjem povezan z regijo Fc IgG1 (46). Vsa tri omenjena nanotelesa se aplicirajo subkutano, kar omogoča lastnosti nanoteles, kot so majhna velikost in boljše

prehajanje v tkiva (47). Poleg njih je bilo leta 2022 odobren kiltakabtagen avtolevcel, zdravilo za napredno zdravljenje na osnovi celic CAR-T, ki temelji na nanotelesu proti antigenu B-celičnega dozorevanja (angl. *B-cell maturation antigen*; BCMA) in se uporablja za zdravljenje ponovnega ali refraktarnega multiplega mieloma (48).

Za že odobrena nanotelesa trenutno poteka več kliničnih preskušanj v fazah 1–3 (49). Kot prikazuje slika 5, se je število kliničnih preskušanj z nanotelesi začelo bistveno povečevati po letu 2018 z vrhom leta 2022, ko je bilo registriranih več kot 42 novih preskušanj. Po tem vrhu se je število novih preskušanj nekoliko zmanjšalo, kar je verjetno posledica zasičenosti določenih terapevtskih področij in časovnih zamikov pri registracijah. Kljub temu število novih kliničnih preskušanj ostaja bistveno višje kot pred letom 2018, kar potrjuje, da nanotelesa postajajo vse pomembnejše učinkovine (50).

6 SKLEP

Nanotelesa pridobivajo vse večjo vlogo v medicini, saj zaradi majhne velikosti, visoke specifičnosti in učinkovitega prehajanja v tkiva, predstavljajo obetavno alternativo monoklonskim protitelesom. Število kliničnih preskušanj narašča, predvsem za diagnostično slikanje s PET/CT ter za zdravljenje raka, avtoimunskih in infekcijskih bolezni. S strani regulatornih organov odobrena nanotelesa, kot so kaplacizumab, ozoralizumab in envafolimab, se uporabljajo kot subkutane injekcije, saj učinkoviteje prodirajo v tkiva. Zdravilo za napredno zdravljenje na osnovi celic CAR-T, ki temelji na nanotelesu, kiltakabtagen avtolevcel, pa se aplicira intravenozno. Nanotelesa dopolnjujejo obstoječe terapije in omogočajo razvoj bolj personaliziranih pristopov, kar se odraža v naraščajočem številu kliničnih preskušanj, ki kažejo na njihov velik potencial in vse večji interes v akademskem ter industrijskem prostoru.

7 IZJAVA

Delo je rezultat sodelovanja avtorjev v sklopu programa P1-0390, financiran s strani ARIS. Financer ni imel vloge



pri zasnovi preskušanja, zbiranju in analizi podatkov, odločitvi o objavi ali pripravi besedila.

8 LITERATURA

1. Aboul-Ella H, Gohar A, Ali AA, Ismail LM, Mahmoud AEE, Elkhatib WF, et al. Monoclonal antibodies: From magic bullet to precision weapon. *Mol Biomed*. 2024;5(1):47.
2. Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)*. 2014;3(4):113-6.
3. Kinch MS, Kraft Z, Schwartz T. Monoclonal antibodies: Trends in therapeutic success and commercial focus. *Drug Discov Today*. 2023;28(1):103415.
4. Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6).
5. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446-8.
6. Peng JY, Wang SY, Chen MQ, Liu CX, Zhao YT, Xu TS, et al. Efficacy and relative safety of caplacizumab in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review and meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2024;35(5):271-8.
7. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(6):1013-26.
8. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1-3):178-83.
9. Nguyen VK, Muyldermans S, Hamers R. The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J Mol Biol*. 1998;275(3):413-8.
10. Vincke C, Muyldermans S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. *Methods Mol Biol*. 2012;911:15-26.
11. Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit*. 1999;12(2):131-40.
12. Nanobodies - from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discov Today Technol*. 2010;7(2):e95-e146.
13. Zavrtanik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural Basis of Epitope Recognition by Heavy-Chain Camelid Antibodies. *J Mol Biol*. 2018;430(21):4369-86.
14. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(4):230-5.
15. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*. 2020;34(1):11-26.
16. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775-97.
17. De Vos J, Devoogdt N, Lahoutte T, Muyldermans S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(8):1149-60.
18. Yong Joon Kim J, Sang Z, Xiang Y, Shen Z, Shi Y. Nanobodies: Robust miniprotein binders in biomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2023;195:114726.
19. Hsiao WW, Le TN, Pham DM, Ko HH, Chang HC, Lee CC, et al. Recent Advances in Novel Lateral Flow Technologies for Detection of COVID-19. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(9).
20. Wang X, Sun T, Shen W, Liu M, Liu W, Zuo H, et al. A lateral flow immunochromatographic assay based on nanobody-oriented coupling strategy for aflatoxin B1 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023;394:134419.
21. Peng Y, Huang Y, Kiessling F, Renn D, Rueping M. Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for Rapid Antigen Detection of SARS-CoV-2 and MERS-CoV Proteins. *ACS Synthetic Biology*. 2025;14(2):420-30.
22. Katz HE. Antigen sensing via nanobody-coated transistors. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(7):639-40.
23. Fan R, Du J, Park KW, Chang LH, Strieter ER, Andrew TL. Immobilization of Nanobodies with Vapor-Deposited Polymer Encapsulation for Robust Biosensors. *ACS Appl Polym Mater*. 2021;3(5):2561-7.
24. Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging*. 2012;11(1):33-46.
25. Wang Z, Hu F, Xue F, He W, Yuan L, Xu P. ALFA nanobody-guided endogenous labeling. *Nat Chem Biol*. 2025.
26. Felices M, Warlick E, Juckett M, Weisdorf D, Valleria D, Miller S, et al. 444 GTB-3550 tri-specific killer engager TriKE™ drives NK cells expansion and cytotoxicity in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2021;9(Suppl 2):A473-A.
27. GTB-3550 (CD16/IL-15/CD33)Tri-Specific Killer Engager (TriKE®) for the Treatment of High Risk Myelodysplastic Syndromes, Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia and Advanced Systemic Mastocytosis [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03214666>.
28. HM2023-05: GTB-3650 (Anti-CD16/IL-15/Anti-CD33) Tri-Specific Killer Engager (TriKE®) for the Treatment of High Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML) [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06594445>.
29. A Multicenter Clinical Study on the Safety and Efficacy of Nanobody-based Biepitope CAR-T Cells Targeting BCMA in the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06503107>.
30. A Phase I Dose-Escalation and Phase II Study of Nanobody-Based CD19/CD22 Tandem Dual Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cell Therapy in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06880913>.
31. A Phase I Dose-Escalation and Phase II Study of Nanobody-Based CD5-Targeted CAR-T Cells for the Treatment of Relapsed or Refractory T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma (T-ALL/LBL) - The CONQUER Trial [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06874946>.
32. Wang Y, Liu L, Yang QY, Yu K. Novel anti-HER2 nanobody-drug conjugates with enhanced penetration of solid tumor and BBB, reduced systemic exposure and superior antitumor efficacy. *Acta Pharmacol Sin*. 2025.

33. Rubel D. Nanobody cytokine blockers in psoriasis. *Lancet*. 2021;397(10284):1523-4.
34. Papp KA, Weinberg MA, Morris A, Reich K. IL17A/F nanobody sonelokimab in patients with plaque psoriasis: a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2b study. *Lancet*. 2021;397(10284):1564-75.
35. A Phase 3, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Subcutaneous Sonelokimab in Adult Participants With Moderate to Severe Hidradenitis Suppurativa [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06411899>.
36. Desmyter A, Spinelli S, Boutton C, Saunders M, Blachetot C, de Haard H, et al. Neutralization of Human Interleukin 23 by Multivalent Nanobodies Explained by the Structure of Cytokine-Nanobody Complex. *Front Immunol*. 2017;8:884.
37. Gevenois PJY, De Pauw P, Schoonooghe S, Delporte C, Sebt T, Amighi K, et al. Development of Neutralizing Multimeric Nanobody Constructs Directed against IL-13: From Immunization to Lead Optimization. *J Immunol*. 2021;207(10):2608-20.
38. Bachran C, Schröder M, Conrad L, Cragnolini JJ, Tafesse FG, Helming L, et al. The activity of myeloid cell-specific VHH immunotoxins is target-, epitope-, subset- and organ dependent. *Sci Rep*. 2017;7(1):17916.
39. Huang J, Bai X, Stewart W, Xu X, Zhang XQ. Budesonide-incorporated inhalable lipid nanoparticles for antiTSLP nanobody mRNA delivery to treat steroid-resistant asthma. *Nat Commun*. 2025;16(1):6013.
40. Verma V, Sinha N, Raja A. Nanoscale warriors against viral invaders: a comprehensive review of Nanobodies as potential antiviral therapeutics. *MAbs*. 2025;17(1):2486390.
41. Lu Z, Liu Z, Li X, Qin X, Hong H, Zhou Z, et al. Nanobody-Based Bispecific Neutralizer for Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *ACS Infect Dis*. 2022;8(2):321-9.
42. Huang NJ, Pishesha N, Mukherjee J, Zhang S, Deshycka R, Sudaryo V, et al. Genetically engineered red cells expressing single domain camelid antibodies confer long-term protection against botulinum neurotoxin. *Nat Commun*. 2017;8(1):423.
43. Anderson GP, Liu JL, Shriver-Lake LC, Zabetakis D, Sugiharto VA, Chen HW, et al. Oriented Immobilization of Single-Domain Antibodies Using SpyTag/SpyCatcher Yields Improved Limits of Detection. *Anal Chem*. 2019;91(15):9424-9.
44. Ahmadi S, Burlet NJ, Benard-Valle M, Guadarrama-Martínez A, Kerwin S, Cardoso IA, et al. Nanobody-based recombinant antivenom for cobra, mamba and rinkhals bites. *Nature*. 2025;647(8090):716-25.
45. Keam SJ. Ozoralizumab: First Approval. *Drugs*. 2023;83(1):87-92.
46. Markham A. Envafolelimab: First Approval. *Drugs*. 2022;82(2):235-40.
47. Alexander E, Leong KW. Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years. *J Nanobiotechnology*. 2024;22(1):661.
48. Guo S, Xi X. Nanobody-enhanced chimeric antigen receptor T-cell therapy: overcoming barriers in solid tumors with VHH and VNAR-based constructs. *Biomark Res*. 2025;13(1):41.
49. Clinical trials [Internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=envalolimab&aggFilters=status:act%20rec%20not>.
50. Clinical trials. [internet]. [citirano 12.9.2025]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/expert-search?term=%22nanobody%22%20OR%20%22single%20domain%20antibody%22%20OR%20%22VHH%22%20OR%20%22single-domain%20antibodies%22%20OR%20%22heavy-chain%20antibodies%22%20OR%20%22camelid%20antibodies%22%20OR%20%22recombinant%20single-domain%20antibodies%22%20OR%20%22domain%20antibodies%22%20OR%20%22nanomed%22%20OR%20%22envafolimab%22%20OR%20%22caplacizumab%22%20OR%20%22XJ101%22%20OR%20%22LMN-101%22%20OR%20%22KN046%22%20NOT%20%22KN026%22%20NOT%20%22pulse%20nanoMED%22&page=1&viewType=Table>.



PRIMER BOLNIKA S FIKSNIM MEDIKAMENTOZNIM EKSAITEMOM PO ZDRAVLJENJU Z NIRMATRELVIRJEM/ RITONAVIRJEM A CASE REPORT: FIXED DRUG ERUPTION AFTER NIRMATRELVIR/ RITONAVIR TREATMENT

AVTOR / AUTHOR:

prim. asist. dr. Aleksander Stepanović, dr. med., spec.

Osnovno zdravstvo Gorenjske,
Zdravstveni dom Škofja Loka,
Stara cesta 10, 4220 Škofja Loka

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: aleksander.stepanovic1@guest.arnes.si



POVZETEK

Fiksni medikamentozni eksantern je preobčutljivo-stna reakcija tipa IV, ki se kaže kot rdeče lise ali plaki. Incidenca predstavlja 2–3 % vseh neželenih učinkov zdravil na koži. Najpogosteje se pojavlja pri odraslih okoli 30. leta starosti, sprožijo pa ga predvsem antibiotiki, nesteroidni antirevmatiki in paracetamol. Opisan je primer 55-letnega moškega s sladkorno boleznijo, ki je po okužbi s covidom-19 prejel zdravljenje z nirmatrelvirjem in ritonavirjem. Dvanajst dni po začetku zdravljenja se je v dimljah pojavil eritem. Histopatološki izvid je pokazal vnetni dermatitis in povnetno hiperpigmentacijo. Po zdravljenju z lokalnim kortikosteroidom je izpuščaj izzvenel, hiperpigmentacija pa je ostala. Med pogoste neželene učinke kombinacije nirmatrelvir/ritonavir sodijo disgeuzija (spremenjen okus), driska, glavobol in bruhanje, medtem ko so kožne reakcije redkejšje. Pri bolnikih z že dokumentiranim fiksnim medikamentoznim eksanternom je potrebno dosledno izogibanje ponovni izpostavitvi povzročitelju, saj lahko to vodi v ponovitev reakcije z možnostjo težjega poteka.

KLJUČNE BESEDE:

covid-19, fiksni medikamentozni eksantern, nirmatrelvir/ritonavir, preobčutljivost

ABSTRACT

Fixed drug eruption is a type IV hypersensitivity reaction that presents as red macules or plaques. It accounts for 2–3% of all cutaneous adverse drug reactions and most commonly occurs in adults around the age of 30. It is mainly triggered by antibiotics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and paracetamol. A case of a 55-year-old man with diabetes and covid-19, who was treated with nirmatrelvir/ritonavir is described. An erythematous lesion appeared in the groin twelve days after the start of treatment. Histopathological examination revealed inflammatory dermatitis and post-inflammatory hyperpigmentation. After topical corticosteroid therapy, the rash regressed, although hyperpigmentation remained. Common adverse effects of nirmatrelvir/ritonavir include dysgeusia, diarrhoea, headache, and vomiting, while cutaneous reactions are less frequently reported. In patients with docu-

mented fixed drug eruption, re-exposure to the causative agent should be strictly avoided due to the risk of recurrence and potentially more severe reactions.

KEY WORDS:

covid-19, fixed drug eruption, hypersensitivity, nirmatrelvir/ritonavir

lahko pa tudi po več tednih (6). Kožne spremembe lahko po prenehanju jemanja zdravila izzvenijo, vendar običajno ostane dolgotrajna ali celo trajna hiperpigmentacija (7, 8). Zaradi značilne klinične slike je možna že klinična diagnoza, ki jo načeloma potrdimo tudi histopatološko. Zdravljenje lokaliziranega FME vključuje ukinitvev vzročnega zdravila, lokalne kortikosteroide in lajšanje simptomov, med katerimi sta najpogostejša srbenje in pekoč občutek na obolelem mestu.



1 UVOD

Fiksni medikamentozni eksantern (FME) je preobčutljivo-stna reakcija tipa IV (po Coombsu in Gellu), ki je pogosta v klinični praksi. Običajno se kaže kot ena ali več dobro omejenih eritematoznih makul ali plakov, ki se ob ponovni izpostavljenosti povzročitelju ponovijo (1). Incidenca FME v Združenih državah Amerike in Združenem kraljestvu znaša 2–3 % vseh bolnikov s kožnimi neželenimi učinki zdravil (2). Število diagnosticiranih primerov FME se stalno povečuje, deloma zaradi večje ozaveščenosti zdravnikov in povečane uporabe zdravil. FME se pojavlja pri obeh spolih in v vseh starostnih skupinah, večinoma v starostnem razponu od 20 do 40 let. Najpogostejše se pojavi po antibiotikih, še posebej fluorokinolonih (3), nesteroidnih anti-revmatikih (4) in paracetamolu (5). Zunanji dejavniki so edini znani vzrok za FME; doslej ni bilo opisano, da bi se pojavil spontano ali po okužbi. Lahko se pojavi kjerkoli na koži in/ali sluznici, vključno z ustno votlino in genitalijami. FME se običajno pojavi 48 do 72 ur po izpostavljenosti antigenu,

2 PRIKAZ PRIMERA

55-letni moški s prekomerno telesno maso (ITM 28) in sladkorno boleznijo tipa 2 na dieti je zbolel z vročino in splošnim slabim počutjem. Razen sladkorne bolezni ni imel drugih bolezni, ki bi lahko pomembneje zmanjšale imunski odziv. Kljub temu so se simptomi okužbe poslabšali, opravljen je bil hitri antigenski test, ki je bil pozitiven na covid-19. Bolnik je začel zdravljenje z nirmatrelvirjem 300 mg in ritonavirjem 100 mg dvakrat na dan pet dni. Zdravilni učinkovini sodita med zaviralce proteaz za sistemsko zdravljenje virusnih infekcij. Že po prvem dnevu jemanja nirmatrelvirja/ritonavirja se je počutil bolje. Dvanajst dni po začetku zdravljenja, tj. en teden po prenehanju, je v desnih dimljah opazil obročasto rožnato rdečino. Ker je klinična slika spominjala na zgodnjo fazo lajmske boreliozе, je začel zdravljenje z azitromicinom, 1000 mg prvi dan, nato pet dni 500 mg na dan. Kljub temu se je rdečina razširila na 15 cm v premeru in postala temnejša (slika 1).

Kot diferencialna diagnoza je bila možna glivična okužba, zato je bilo predpisano lokalno zdravljenje s terbinafinom za 14 dni, vendar ni bilo učinkovito. Kompletna krvna slika in C-reaktivni protein sta bila znotraj referenčnih vrednosti, znakov sistemske prizadetosti ni bilo. Opravljen je bil dermatološki pregled in postavljen sum na FME. Pri bolniku je bil odvzet vzorec kože za histopatološki pregled, ki je pokazal intenziven vmesni dermatitis s posameznimi apoptotičnimi keratinociti v epidermisu, redkimi eozinofilnimi granulociti v vnetnem infiltratu ter spremljajočo povnetno hiperpigmentacijo. Te spremembe so bile skladne s klinično diagnozo FME. Predpisano je bilo lokalno kortikosteroidno mazilo z betametazonom dvakrat na dan. Po zdravljenju je izpuščaj v nekaj mesecih začel bledeti, hiperpigmentacije pa so še vedno prisotne.

KLJUČNI POUDARKI

- Fiksni medikamentozni eksantern (FME) je preobčutljivostna reakcija tipa IV, ki predstavlja 2–3 % kožnih neželenih učinkov zdravil; najpogostejše ga sprožijo antibiotiki, nesteroidni antirevmatik in paracetamol.
- Opisan je prvi primer FME po zdravljenju s kombinacijo nirmatrelvir/ritonavir, kjer je lezija nastopila 12 dni po terapiji; histologija je potrdila vnetni dermatitis s povnetno hiperpigmentacijo.
- Pravočasno prepoznavanje FME je ključno, saj ponovna izpostavitve povzroči ponovitev in lahko privede do težjih oblik.



Slika 1: Fiksni medikamentozni eksantern v dimljah (vir: osebni arhiv avtorja).

Figure 1: Fixed drug eruption in groin (source: personal author archive).

3 RAZPRAVA

Pandemija covid-19, ki jo je povzročil koronavirus SARS-CoV-2, se je začela z izbruhom na Kitajskem decembra 2019. Kmalu se je razširila na druga območja Azije in nato po vsem svetu. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je 11. marca 2020 izbruh razglasila za pandemijo. Posledice covida-19, zlasti za ljudi z določenimi zdravstvenimi stanji, kot je sladkorna bolezen, so lahko hude, vključno s smrtjo. V takih primerih je priporočeno zdravljenje z nirmatrelvirjem in ritonavirjem. Priporočeni odmerek je 300 mg nirmatrelvirja (dve tableti po 150 mg) in 100 mg ritonavirja (ena tableta po 100 mg), ki ju je treba vzeti skupaj peroralno vsakih 12 ur v obdobju pet dni. Zdravilo je treba uporabiti čim prej po postavitvi diagnoze covida-19 in najkasneje v petih dneh po pojavu simptomov. Priporočljivo je, da bolnik zaključi celoten 5-dnevni cikel zdravljenja, tudi če po začetku zdravljenja s tem zdravilom potrebuje hospitalizacijo zaradi hude ali kritične oblike covida-19. Do oddaje tega članka so bili kot najpogostejši neželeni učinki, o katerih so poročali med zdravljenjem z nirmatrelvirjem/ritonavirjem, spremenjen okus (4,6 %), dri-

ska (3,0 %), glavobol (1,2 %) in bruhanje (1,2 %). Kožni izpuščaj je naveden kot občasen (0,1–1 %), toksična epidermalna nekroliza, Stevens-Johnsonov sindrom in pruritus pa kot redki (0,01–0,1 %) neželeni učinki (9).

Klinična diagnoza FME ostaja zlati standard, vendar lahko nekatere diagnostične metode, npr. epikutano testiranje, pomagajo pri identifikaciji vzročnega zdravila, zlasti pri sočasni uvedbi več zdravil. Testiranje se priporoča najmanj 4–6 tednov po akutni reakciji zaradi tveganja lažno pozitivnih oziroma negativnih izidov in sprožitve sistemskih reakcij. Med državami in kliničnimi praksami obstajajo pomembne razlike glede dostopnosti, metodologije in indikacij za testiranje, pri čemer je testiranje z obližem na mestu predhodne lezije pozitivno v do 40 % primerov (10). Redkeje se odločamo za ekspozicijske teste. Ponovni izpostavitvi zdravilu, ki je sprožilo FME, se je treba izogibati, saj lahko pride do ponovitve, povezane s povečanim vnetjem, hiperpigmentacijo in tveganjem za potencialno smrtonosen generaliziran bulozni FME, ki je lahko podoben Stevens-Johnsonovemu sindromu ali toksični epidermalni nekrolizi (11). Primarni pristop in zdravljenje vseh vrst FME je zato identifikacija in odstranitev povzročitelja, kar se lahko doseže s temeljito anamnezo prejemanja zdravil, izpostavljenosti drugim kemičnim snovem ter morebitnimi predhodnimi epizodami.

4 SKLEP

Ta prikaz primera je prvi FME po nirmatrelvirju/ritonavirju, opisan v znanstveni literaturi. Trenutno je število primerov s covidom-19 relativno nizko, vendar ne moremo izključiti možnosti pojava novih variant. Virus bo še naprej krožil, zlasti v hladnejših mesecih. Cepljenje proti covidu-19 se trenutno izvaja v manjšem obsegu, imunost po prejšnjih cepljenjih pa je kratkotrajna. Zaradi velikega števila ljudi, ki so skeptični ali celo nasprotujejo cepljenju, bo zdravljenje z nirmatrelvirjem/ritonavirjem tudi v prihodnje smiselno v primeru hujšega poteka bolezni, zlasti pri starejših, prekomerno težkih in imunsko oslabljenih bolnikih. Opisan primer kaže, da je FME premalo poznan med družinskimi zdravniki, ki se ob taki klinični sliki odločajo za predpis antibiotika in/ali antimikotika. Zato je potrebno izobraževanje zdravnikov in farmacevtov, da hitreje in lažje prepoznajo možne neželene učinke zdravil, s čimer se izognemo morebitnim nevarnim zapletom.

5 LITERATURA

1. Lee AY. Fixed drug eruptions. Incidence, recognition, and avoidance. *Am J Clin Dermatol* 2000;1:277–85.
2. Jung JW, Cho SH, Kim KH, Min KU, Kang HR. Clinical features of fixed drug eruption at a tertiary hospital in Korea. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014;6:415–20. doi: 10.4168/aair.2014.6.5.415.
3. Jhaj R, Chaudhary D, Asati D, Sadasivam B. Fixed-drug Eruptions: What can we Learn from a Case Series? *Indian J Dermatol.* 2018 Jul-Aug;63(4):332-337. doi: 10.4103/ijd.IJD_481_17. PMID: 30078879; PMCID: PMC6052757.
4. Ben Fadhel N, Chaabane A, Ammar H, Ben Romdhane H, Soua Y, Chadli Z, et al. Clinical features, culprit drugs, and allergology workup in 41 cases of fixed drug eruption. *Contact Dermatitis.* 2019 Nov;81(5):336-340. doi: 10.1111/cod.13351. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31291002
5. Heng YK, Yew YW, Lim DS, Lim YL. An update of fixed drug eruptions in Singapore. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015 Aug;29(8):1539-44. doi: 10.1111/jdv.12919. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25491106.
6. Chou YJ, Chang HC. Fixed drug eruption. *CMAJ.* 2022 Aug 2;194(29):E1036.
7. Burgdorf WH, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, editors. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag; 2009. Braun Falco's Dermatology; pp. 460–2.
8. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. 8th ed. West Sussex (UK): Wiley-Blackwell; 2010. Rook's Textbook of Dermatology; pp. 75.28–30.
9. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Paxlovid. [cited 2025 Nov 7] Available from: https://www.ema.europa.eu/sl/documents/product-information/paxlovid-epar-product-information_sl.pdf
10. Phillips EJ, Bigliardi P, Bircher AJ, Broyles A, Chang YS, Chung WH, et al. Controversies in drug allergy: Testing for delayed reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jan;143(1):66-73. doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.030.
11. Patel S, John AM, Handler MZ, Schwartz RA. Fixed Drug Eruptions: An Update, Emphasizing the Potentially Lethal Generalized Bullous Fixed Drug Eruption. *Am J Clin Dermatol.* 2020 Jun;21(3):393-399.



DRUŠTVENE VESTI

ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

EVROPSKA NOČ RAZISKOVALCEV 2025 NA FAKULTETI ZA FARMACIJO

Alenka Zvonar Pobirk

Evropska noč raziskovalcev je vseevropski javni dogodek, ki na zabaven in navdihujoč način širši javnosti predstavlja raznolikost znanosti in njen vpliv na vsakdanje življenje vseh nas. Z vsakoletno izvedbo Evropske noči raziskovalcev na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo (UL FFA) želimo v skladu z vizijo projekta in UL FFA približati raziskovalce in njihovo raziskovalno delo javnosti ter povečati zanimanje mladih za znanstvene in raziskovalne poklice. Zadnji petek v septembru 2025 je Evropska noč raziskovalcev sočasno potekala v 23 državah. Deset članic Uni-

verze v Ljubljani, Pedagoški inštitut in ZRC SAZU so tudi tokrat združili moči v okviru projekta »Humanistika, to si ti!«, ki ga koordinira Filozofska fakulteta. Projekt je v letih 2024–2025 v ospredje postavil eno najbolj aktualnih tem sodobnega časa – umetno inteligenco (UI).

Na UL FFA smo Evropsko noč raziskovalcev 2025 odprli z obiskom učencev Osnovne šole Poljane, v popoldanskih urah pa smo gostili okoli 110 otrok s spremljevalci in druge vedoželjne obiskovalce, ki so do poznega večera imeli možnost obiska naših laboratorijev. Za okoli 200 udele-



Laboratorij v virtualni resničnosti.



Kakšna reakcija poteka v čaši?



Kaj se dogaja z zdravilom, ko ga zaužijemo?

žencev aktivnosti je poskrbela že dodobra uigrana ekipa 40 zaposlenih in študentov, ki je za obiskovalce skupno pripravila 14 raznolikih aktivnosti s področij farmacije, laboratorijske biomedicine in kozmetologije. Skozi slednje so udeleženci spoznavali znanstveno delo raziskovalcev in raziskovalcev ter izvedli, kako lahko UI in navidezna resničnost (VR) vplivata na razvoj in izdelavo (novih) zdravil ter kaj se s slednjimi zgodi v našem telesu. Številni so s pomočjo VR-očal vstopili v virtualni laboratorij za raziskovalce prihodnosti in v človeško telo. Nadalje so lahko preizkusili, kako nam UI pomaga pri prepoznavanju (zdravilnih) rastlin ter s pomočjo UI izbrali svojim potrebam prilagojen kozmetični izdelek, nakar so enega tudi sami izdelali. Obiskovalci so se poigrali z načrtovanjem in 3D-tiskanjem objektov, generiranih z UI, in spoznavali, kako nam bioinformatična orodja pomagajo pri razvozlanju skrivnosti molekule življenja – DNA (slednjo so udeleženci tudi sami izolirali iz banan). Izvedli so lahko testiranje za krvno skupino in celiakijo, najmlajši pa so z velikim veseljem izdelali slončkovno zobno pasto ter pokukali v svet kresničk. Najpogumnejši so se udeležili delavnice »Podpora zdravstvenemu sistemu z uporabo umetne inteligence: Chatboti in testi na mestu oskrbe v akciji«. Skupaj s strokovnjaki so spoznali računalniške pristope v toksikologiji kot alternativo testiranju na živalih in raziskovali prihodnosti lekarništva. Iskali so odgovor na vprašanje, ali bomo v prihodnosti (še) šli po nasvet k lekarniškemu farmacevtu ali k UI?

Vse delavnice, ki jih v okviru tega projekta izvajamo na UL FFA, prilagodimo različnemu predznanju in starosti obiskovalcev. Še zlasti pa želimo znanost in raziskovalno delo približati najmlajšim, ki se šele spoznavajo s celotnim spektrom poklicev in možnostmi, ki jih slednji ponujajo. Z obi-

skom 3 osnovnih šol in sprejemom 1 razreda osnovnošolcev na UL FFA smo v okviru projekta tako že med letom približali področje naravoslovja in farmacije okoli 180 osnovnošolcem. Aktivnosti Noči raziskovalcev smo izvedli tudi z 8 skupinami vrtčevskih otrok. Skupaj s partnerji projekta smo 26. septembra 2025 raznolike aktivnosti izvajali še na stojnici v Centru Rog, kjer je glavno dogajanje Evropske noči raziskovalcev potekalo v organizaciji Znanstvenoraziskovalnega inštituta Filozofske fakultete (več informacij na voljo na:

<https://www.ffa.uni-lj.si/obvestila-in-informacije/obvestila/evropska-noc-raziskovalcev-humanistika-to-si-ti!>).

Skozi vse delavnice se je ponovno potrdila velika interdisciplinarnost znanj, ki jih pokriva UL FFA, veliko zanimanje javnosti pa potrjuje, da so tovrstni dogodki izjemnega pomena tudi za farmacevtsko stroko in predstavljajo dragoceno priložnost seznaitve širše javnosti z našim delom in njihovim vplivom na vsakdanje življenje. Člani ekipe Evropske noči raziskovalcev 2025 ocenjujemo, da je slednja ponovno odlično uspela, in upamo, da se na UL FFA srečamo tudi na naslednji, ki bo potekala na zadnji petek v septembru 2026!



Zabavno spoznavanje farmacevtske stroke.



ŠTUDENTSKA SEKCIJA SLOVENSKEGA FARMACEVTSKEGA DRUŠTVA V FEBRUARJU IZDALA 100. ŠTEVILKO GLASILA SPATULA

Pia Planinšek in Eva Šelih

Februarja 2026 je izšla 100. številka Spatule. To je glasilo Študentske sekcije Slovenskega farmacevtskega društva, ki redno izhaja že od leta 1997. Čeprav so študenti farmacije glasila ustvarjali že pred Spatulo, nobeno od njih ni izhajalo tako dolgo kot Spatula. Ob koncu devetdesetih let je prof. dr. Mitja Kos, takrat študent in predstavnik za stike pri Mednarodni zvezi študentov farmacije (IPSF), predlagal, da sekcija začne izdajati svoje glasilo. Prvi uredniški odbor ga je poimenoval Spatula ter se domislil znamenitega stavka: »Bolje spatula v žepu kot terilnica na glavi.«

V 100. številki smo se ozrli nazaj in temeljito prebrskali zgodovino Spatule. Že v prvi rubriki smo predstavili zgodovino Društva študentov farmacije Slovenije s poudarkom na razvoju tiskanih publikacij, ki (ne)redno izhajajo že skoraj 50 let. V tokratni številki lahko preberete štiri strokovne članke ter štiri članke znotraj manjših rubrik, imenovanih kotički (farmacevtski kotiček, kotiček industrijske farmacije, kotiček laboratorijske medicine in kozmetološki kotiček). Ob pripravi jubilejne številke je uredništvo želelo raziskati tudi začetke glasila. Odločili smo se, da gremo neposredno do vira ideje. V rubriki »Na pogovoru« tako lahko preberete intervju s članicami prvega uredniškega odbora Spatule. V pogovoru so nam izr. prof. dr. Nataša Karas Kuželički, dr. Irena Prodan Žitnik (članici uredniškega odbora) in mag. Petra Šolar Bavdaž (glavna urednica) zaupale, kako so se lotile pisanja prvih števil, kako so zbirale prispevke ter od kod so črpale ideje za posamezne rubrike. Povedale so, da še vedno spremljajo Spatulo, da so ponosne in vesele, da glasilo še danes izhaja, ter da so zadovoljne, ker so jo današnji ustvarjalci vsebinsko in kakovostno še nadgradili. Kot Študentska sekcija smo želeli prisluhniti tudi pogledu predsednika Slovenskega farmacevtskega društva (SFD), prof. dr. Marka Anderluha. Njegovo mnenje o našem glasilu je potrdilo naša prizadevanja, s katerimi želimo, da je Spatula z vsako izdajo boljša. Veseli smo, da lahko ustvarjamo glasilo, ki odraža vlogo naše sekcije znotraj Slovenskega farmacevtskega društva.

Intervjujem sledi še vrsta krajših rubrik, med katerimi je treba posebej izpostaviti naš slaven horoskop. To je rubrika, ki je bila nepogrešljiv del prvih sedemnajstih izdaj, v kateri farmacevtom usodo napovedujejo laboratorijski pripomočki. Ker je od zadnje različice minilo že 25 let, smo la-

boratorijsko opremo nekoliko posodobili, zato nam danes poleg terilnic in grelnikov prerokujejo tudi analitske naprave, kot sta sistem za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in sistem za jedrsko magnetno resonanco (NMR). Morda se zdi, da takšna rubrika ne sodi v glasilo študentov farmacije, vendar se je tudi nam, tako kot prvemu uredniškemu odboru, zdela odlična priložnost, da z njo vključimo nekaj humora in prikažemo ustvarjalnost.

V skoraj tridesetih letih se je marsikaj spremenilo. Spatula je večkrat dobila novo podobo, članki so postali tudi strokovno recenzirani, nekatere rubrike so izginile, druge so nastale na novo. Kljub temu pa Spatula že skoraj tri desetletja ostaja prostor, kjer lahko študenti motivirano raziskujejo, pišejo in objavljajo. Vsak, ki je kdaj napisal prispevek za



Spatulo, ve, da je v to vložil veliko dela. Hkrati pa pisanje lastnega članka prinese posebno zadovoljstvo, ki ga je med študijem morda težko doseči na drugačen način. Navdaja nas s ponosom, da lahko tudi drugi preberejo tvoje delo, in daje občutek, da napisani stavki ne bodo ostali skriti v datotekah na računalniku ali med kupom seminarских nalog pri profesorjih. Ker je glasilo na neki točki postalo zelo dostopna možnost za vse, ki so se želeli nekoliko bolj strokovno poglobiti v različne teme, je leta 2021 izšla posebna številka Strokovne Spatule, namenjena izključno strokovnim člankom. Že naslednje leto smo kot sekcija začeli izdajati še Placebo, dvakrat slepo recenzirano strokovno revijo, ki izhaja enkrat letno. Spatula pa ni le prostor za strokovne prispevke. Študentom omogoča, da ustvarjajo, razvijajo ideje in se lotijo tematik, ki jih zanimajo, četudi niso neposredno del študijskega kurikulum. Prav tako ponuja prilžnost za raziskovanje širših interesov, ustvarjalnosti in hobijev ter spodbuja radovednost tudi zunaj ožjih okvirov farmacevtske stroke. Prav zaradi tega Spatula ni zgolj strokovna revija, temveč glasilo vseh študentov farmacije. Kot Študentska sekcija bi se radi zahvalili sedanjemu in vsem preteklim uredniškim odborom, ki so s svojo vizijo,

idejami in znanjem skrbeli, da se je Spatula razvijala in postala raznoliko glasilo, ki združuje strokovno ter nekoliko bolj sproščeno vsebino. Hvala tudi vsem avtoricam in avtorjem za njihove prispevke, ki jih niso delili le med študenti Fakultete za farmacijo, temveč tudi s širšo strokovno in laično skupnostjo. Zahvalo namenjamo tudi vsem recenzentom in drugim sodelavcem, ki skrbno pregledujejo strokovne in nestrokovne članke študentov. Njihovo znanje, natančnost in konstruktivni predlogi pomembno prispevajo h kakovosti ne le posameznih člankov, temveč celotnega glasila. Zahvaljujemo se tudi vsem sogovornicam in sogovornikom, ki so s svojimi zanimivimi intervjuji bogatili vsebino Spatule ter podjetjem, organizacijam in posameznikom, ki so skozi leta omogočali njen nastanek – tako s finančno podporo kot s sodelovanjem in zaupanjem v Društvo študentov farmacije Slovenije in Študentsko sekcijo SFD. Ne nazadnje se zahvaljujemo celotni stroki – profesorjem, raziskovalcem in vsem, ki jo oblikujete. Prav vi nas kot študente navdihujete, nam dajete motivacijo za znanje ter ideje za teme, o katerih lahko pišemo. Hvala tudi vsem, ki Spatulo kdaj vzamete v roke in jo prelistate. Brez vas Spatula danes ne bi bila takšna kot je.



IN MEMORIAM

PROF. DR. SLAVKO PEČAR, MAG. FARM.
(1948–2026)

Marko Anderluh

Konec življenja doleti slehernika, smrti ne moremo ubežati. Redkim pa uspe, da živijo skozi svojo zapuščino še generacije ali doživijo nesmrtnost. To ni posledica nečimrnosti posameznika po vzoru Dorian Graya, pač pa refleksija tega, kako intenzivno se nas dotakne taisti posameznik in kako globoko poseže v našo poklicno in življenjsko pot. Redke osebe v nas sprožijo iskrico ali šume življenja tako, kot je to v Stvarjenju Adama z božanskim dotikom uprizoril Michelangelo. Prof. dr. Slavko Pečar je bil taka oseba. O njem bom pisal v prvi osebi ednine, saj si štejem v čast, da sva bila več kot le bežna sodelavca in da sem ga lahko naslavljal s »ti«. Pri Slavku je »ti« pomenil preskok v še večjo intimo, nad katero je bila le družina, na katero je bil tiho, a vseskozi vidno zelo ponosen. Za širšo družino pa smo se šteli ožji sodelavci na Katedri za farmacevtsko kemijo in celotni Fakulteti za farmacijo. Obe omenjeni družini je imel izjemno rad.

Slavko je bil rojen marca 1948 v Ljubljani. Pot ga je po opravljeni gimnaziji Bežigrad popeljala na študij farmacije na takratnem Odseku za farmacijo Fakultete za naravoslovje in tehnologijo (FNT) v Ljubljani, kjer je junija 1972 diplomiral. Leta 1973 se je zaposlil kot asistent za farmacevtsko kemijo na Odseku za farmacijo in od tedaj je bila njegova poklicna pot nerazdružljivo povezana s študijem farmacije in farmacevtsko stroko. Poleg pedagoške in raziskovalne odličnosti je bil Slavko odličen vodja. V kar treh obdobjih je bil član vodstva Odseka za farmacijo in kasneje Fakultete za farmacijo (FFA), najprej kot namestnik predstojnika v obdobju 1980–1982, nato 1982–1984 predstojnik Oddelka za farmacijo FNT, v obdobju 1995–1999 pa je postal prvi dekan novo nastale FFA. Ravno v tem obdobju sem prve korake proti farmacevtski stroki stopal tudi jaz in sem iz prve roke opazoval gradnjo južnega prizidka, ki je po vseh zapletih zagledal luč sveta predvsem in ravno zaradi Slavka. Danes si delovanja Fakultete za farmacijo brez prizidka praktično ne moremo zamisliti, prav tako pa tudi ne naporov, ki so iz odseka in oddelka peljali do ustanovitve samostojne fakultete, ki danes sodi med večje fakultete Univerze v Ljubljani. Ko je leta 2012 Slavku tedanji rektor Univerze v Ljubljani, prof. dr. Radovan Stanislav Pejovnik, podelil naziv zaslužni profesor Univerze v Ljubljani, je ta naziv dobil novo dimenzijo in dvignil letvico na novo raven, ki jo bo težko preseči.



Slavko je bil pronicljiv kot malokdo. Generacije študentov, med katere sodim tudi sam, so bile počaščene z njegovimi predavanji. Med študenti je vzbujal strahospoštovanje, a ne zaradi morebitnega naporenega karakterja ali nepotrebnosti ostrine. Ravno nasprotno, bil je prijeten (so)govornik, s šarmantno blagohotnim in besedno bogatim iskrihim nastopom, s katerim je v občinstvu vzbujal razumevanje in radovednost. Strahospoštovanje je sledilo iz njegove izjemne znanstvene in strokovne podkovanosti, ki ji je redkokdo, če sploh, bil kos. Nehote je postavil mejo razumevanja tako visoko, da kaj drugega kot (straho)spoštovanje ni bilo mogoče. Kakor je Slavko omenil v knjigi Šumi življenja, predstavljajo radikalski procesi tisti del kemičnih procesov v celici, ki še ni dovolj prisoten v naši zavesti, čeprav postajajo ti procesi s staranjem vse izrazitejši in na koncu prevladajo. Medtem ko moderna medicina ubira pot razmišljanja od simptomov bolezni nazaj proti molekularnim dogajanjem, pa je Slavko razmišljal obratno. Ni iskal bližnjic, pač pa je dognanja o bioloških procesih iskal tam, kjer nastajajo. Malo mu je bilo mar, da je bil v tem početju rahlo osamljen in je ubiral drugačno pot. Morebiti se je ravno zato počutil domače v tem, za večino nerazumljenem okolju.

V zadnjih letih njegovo telo ni dohajalo njegovega bistrega duha. Kot bi vedel, da se bliža konec, se je poslavljal tako, da nam je vsem dal vedeti, kako ponosen je na svojo Katedro in Fakulteto. Z razlogom nas je imel za svoje. In mi smo vedeli, da smo njegovi.

Dragi Slavko, počivaj v zasluženem miru. Pogrešali bomo bistrost tvojega uma, pogrešali bomo tvoje modre nasvete v trenutkih, ko je težko videti in delati naprej. Pogrešali bomo tebe!

NAVODILA ZA AVTORJE

Farmacevtski vestnik je periodična znanstvena publikacija Slovenskega farmacevtskega društva, namenjena objavi izvirnih in preglednih znanstvenih člankov, strokovnih člankov ter kratkih strokovnih člankov (primerov iz klinične prakse) s področja farmacije in sorodnih ved. Revija objavlja tudi strokovne prispevke o aktualnih temah, novice iz sveta farmacije in društvene vesti. Poslanstvo revije je seznanjanje strokovne javnosti z najnovejšimi dognanji ter spodbujanje in ohranjanje slovenske strokovne terminologije.

Strokovne in znanstvene članke ter druge prispevke objavljamo v slovenskem jeziku, po dogovoru z uredništvom tudi v angleščini. Vsa besedila morajo biti jezikovno in slogovno brezhibna. Uporabljena terminologija mora biti ustrezna, s poslušom za uveljavljanje strokovnih izrazov v slovenskem jeziku. Navajanje zaščitene imen zdravil in drugih izdelkov ali imen proizvajalcev ni dovoljeno, razen če je to ključno za razumevanje vsebine članka.

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

SPREJEM PRISPEVKA V UREDNIŠTVO

Članke in druge prispevke sprejemamo v uredniški postopek preko spletnega obrazca na spletni strani <https://journals.sfd.si/fv/index>. V spletnem obrazcu je zahtevana oddaja članka ali drugega prispevka ter spremni dopis, ki mora vsebovati:

- naslov članka ali drugega prispevka,
- imena in priimke avtorjev z njihovimi nazivi,
- imena in naslove ustanov, v katerih so avtorji zaposleni,
- navedbo korespondenčnega avtorja,
- telefonsko številko in elektronski naslov korespondenčnega avtorja,
- izjavo o potencialnem navzkrižju interesov,
- izjavo o dostopnosti podatkov (pri izvirnih znanstvenih člankih; več informacij v nadaljevanju),
- izjavo, da članek oziroma prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo ter da se z vsebino strinjajo vsi soavtorji.

PRVA VERZIJA ČLANKA

V prvi verziji strokovnega ali znanstvenega članka, ki jo avtorji pošljejo uredništvu v recenzijo, avtorji niso navedeni. Celoten obseg članka ne sme presegati **25.000 znakov s presledki**, obseg kratkega strokovnega članka pa ne **10.000 znakov s presledki**, v obeh primerih brez upoštevane literature. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

1 Oblika

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

2 Vsebina članka

Članek mora biti ustrezno strukturiran na poglavja in podpoglavja, pri čemer so priporočeni največ trije nivoji razdelitve.

2.1 Izvirni znanstveni članek:

- povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed);
- ključne besede, urejene v abecednem vrstnem redu, v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5 ključnih besed, ločenih z vejico);
- ključna sporočila (3 do 5 alinej s ključnimi poudarki članka, celokupno dolgo največ 600 znakov s presledki);
- uvod;
- materiali in metode oz. metode (če materiali niso relevantni); kjer je to potrebno, mora biti v metodah navedeno ustrezno etično soglasje;
- rezultati;
- razprava (rezultati in razprava so lahko združeni);
- sklep;
- izjave (če je relevantno: o potencialnem navzkrižju interesov, virih financiranja);
- zahvala (če je relevantno);
- literatura.

2.2 Pregledni znanstveni članek ali strokovni članek:

- povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed);
- ključne besede, urejene v abecednem vrstnem redu, v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5 ključnih besed, ločenih z vejico);
- ključna sporočila (3 do 5 alinej s ključnimi poudarki članka, celokupno dolgo največ 600 znakov s presledki);
- poglavja in podpoglavja, ki si smiselno sledijo;
- sklep;
- izjave (če je relevantno: o potencialnem navzkrižju interesov, virih financiranja; prispevku posameznih avtorjev);
- zahvala (če je relevantno);
- literatura.

2.3 Kratki strokovni članek – primer iz klinične prakse:

- povzetek v slovenskem in angleškem jeziku (vsak po največ 150 besed);
- ključne besede, urejene v abecednem vrstnem redu, v slovenskem in angleškem jeziku (največ 5 ključnih besed, ločenih z vejico);
- ključna sporočila (3 do 5 alinej s ključnimi poudarki članka, celokupno dolgo največ 600 znakov s presledki);
- kratek uvod v primer (splošno o bolezni, epidemiologija, farmakoekonomika);
- prikaz primera (opis pacienta, dosedanje zdravljenje in pacientov odziv, obvezna anonimizacija vseh osebnih podatkov);
- razprava (povzeto po literaturi – opredelitev dokazov, ki vplivajo na obravnavo pacienta, npr. smernice, raziskave, obstoječe klinične prakse itd.);
- ukrepanje s svetovanjem (predstavitev ukrepov in svetovanja oz. vodenja pacienta na podlagi zbranih podatkov);
- sklep (pacientov odziv na predlagane ukrepe in klinična uporabnost zbranih podatkov);
- literatura.

Poudarek vsebine naj bo na razpravi, ukrepanju in sklepu. Za objavo kliničnega primera je treba pridobiti soglasje bolnika oz. skrbnika.

3 Slike in preglednice

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

članka oziroma prispevka tudi avtor slike ali preglednice. Slike, oblikovane s specifičnimi programskimi orodji (npr. Biorender), je treba citirati v skladu z navodili, ki jih zahteva posamezno programsko orodje.



Slika 1: Logotip Slovenskega farmacevtskega društva (1).
Figure 1: Logo of the Slovenian Pharmaceutical Society (1).

Preglednica 1: Število objav v Farmacevtskem vestniku v letu 2009 (1, 3).

Table 1: Number of publications in the Journal of Pharmaceutical Society in 2009 (1, 3).

Vrsta objave	Število objav
Pregledni članek	X
Izvirni znanstveni članek	X

Slike merijo v širino in višino največ 17 cm. Dimenzijsko se morajo čim bolj približati dejanski velikosti v tiskani verziji. Zaželena velikost besedila na sliki ali grafu je med 8 in 10 pt pri velikosti 1 : 1. Grafi in slike iz Excela so uvoženi v besedilo kot »enhanced metafile«. Slike mora avtor poslati skupaj s končno verzijo prispevka tudi neodvisno od besedila prispevka v ustreznem slikovnem zapisu:

- vektorski zapis (preferenčno pdf, lahko tudi svg),
- če vektorski zapis ni možen, dovoljen tudi bitni zapis (jpg, png ali tiff) z ločljivostjo najmanj 600 dpi.

4 Poimenovanja in okrajšave

Poimenovanja in okrajšave so navedeni skladno po IUPAC, IUBMB in HUGO. Avtorji morajo dosledno in pravilno uporabljati slovensko terminologijo širšega strokovnega in znanstvenega področja. Terminologija mora biti skladna s Farmacevtskim terminološkim slovarjem, *Formularium Slovenicum*, Slovenskim medicinskim slovarjem in terminološkim slovarjem Slovenskega biokemijskega društva.

5 Navajanje literature

Vsaka trditev je podprta z literaturnim virom, zaporedna številka vira pa je navedena na koncu trditve v oklepaju.

Če je virov več, so številke ločene z vejicami in presledki, na primer (1, 3, 8) ali (1–3, 5). Prispevek vsebuje največ 40 literaturnih virov, ki so navedeni v vrstnem redu, kot se pojavljajo v besedilu.

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

1. Hallal AH, Amortegui JD, Jeroukhimov IM, Casillas J, Schulman CI, Manning RJ, et al. Magnetic resonance cholangiopancreatography accurately detects common bile duct stones in resolving gallstone pancreatitis. *J Am Coll Surg*. 2005;200(6):869-75.
2. Stockhausen L, Turale S. An explorative study of Australian nursing scholars and contemporary scholarship. *J Nurs Scholarsh [Internet]*. 2011 Mar [cited 2013 Feb 19]; 43(1):89-96. Available from: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.monash.edu.au/docview/858241255?accountid=12528>
3. Carlson BM. *Human embryology and developmental biology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.
4. Shreeve DF. Reactive attachment disorder: a case-based approach [Internet]. New York: Springer; 2012 [cited 2012 Nov 2]. 85 p. Available from: <http://ezproxy.lib.monash.edu.au/login?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1647-0>
5. Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health*. 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.
6. Halpen-Felsner BL, Morrell HE. Preventing and reducing tobacco use. In: Berlan ED, Bravender T, editors. *Adolescent medicine today: a guide to caring for the adolescent patient* [Internet]. Singapore: World Scientific Publishing Co.; 2012 [cited 2012 Nov 3]. Chapter 18. Available from: http://www.worldscientific.com/doi/pdf/10.1142/9789814324496_0018
7. *Diabetes Australia*. *Diabetes globally* [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/Diabetes-Globally/>

KONČNA VERZIJA ČLANKA

Po opravljenem recenzijem postopku korespondenčni avtor prejme obvestilo o sprejemu ali zavrnitvi članka oziroma navodila glede potrebnih popravkov. Uredništvo pričakuje, da bo avtor dosledno upošteval pripombe recenzentov in uredništva ter **najpozneje dva tedna po prejetju recenzij** popravljeni prispevek oddal preko splet-

nega obrazca. Vse popravke mora vidno označiti. Poleg popravkov naj avtorji upoštevajo sledeče:

1 Naslovna stran (prva stran) vsebuje:

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

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

3 Slike: Avtor mora slike poslati tudi ločeno od besedila članka ali prispevka v ustreznem slikovnem zapisu. Velikost slik mora ustrezati prej navedenim zahtevam zaradi ohranjanja kakovosti in razmerij ob pripravi na tisk.

DRUGI PRISPEVKI

Prispevki za rubrike »Novice iz sveta farmacije«, »Društvene vesti«, »Predstavitev knjige« ipd. obsegajo praviloma največ **6.000 znakov s presledki**. Prispevki za rubriko »Osebnosti« ne smejo presegati **3.000 znakov s presledki**. Prispevke o osebnih vesteh uredništvo objavi ob jubileju, smrti ali posebnih dosežkih članov Slovenskega farmacevtskega društva v tekočem obdobju. Uredništvo si pridržuje pravico, da po strokovni presoji objavi tudi daljše prispevke.

KOREKTURE PRISPEVKA

Krtačne odtise oblikovanega prispevka morajo avtorji natančno pregledati in označiti nujne popravke, s katerimi ne smejo posegati v vsebino prispevka. Korespondenčni avtor vrne korekture uredništvu najkasneje v treh delovnih dneh.

ETIČNA NAČELA IN AVTORSTVO

Avtorji so dolžni zagotoviti, da je prispevek izvirno delo in da ni bil objavljen ali hkrati poslan v objavo drugam. V primeru uporabe slik, preglednic ali drugih vsebin, za katere avtorji nimajo avtorskih pravic, morajo pridobiti ustrezno dovoljenje za objavo. Plagiatorstvo pomeni nenavedeno prepisovanje ali poskus nepravilnega lastništva avtorstva v obliki idej, besedila ali rezultatov. Plagiatorstvo v Farmacevtskem vestniku ni dovoljeno. Če uredniki ali recenzenti zaznajo plagiatorstvo, je lahko rokopis zavrnjen, popravljen ali umaknjen v kateri koli fazi recenzentskega postopka, objave ali po objavi. Korespondenčni avtor je odgovoren za vso komunikacijo med avtorji in revijo ter za zagotovitev, da so se vsi avtorji

strinjali z objavo. Po sprejemu prispevka je korespondenčni avtor odgovoren za točnost vseh vsebin v korekturah, vključno z imeni soavtorjev, naslovi in institucionalnimi pripadnostmi. Po objavi je korespondenčni avtor kontaktna oseba za morebitna vprašanja glede objavljenega članka.

Avtorji morajo poročati o morebitnem navzkrižju interesov (tj. kakršno koli razmerje z industrijo ali drugimi relevantnimi subjekti – finančno ali drugačno – v zadnjih dveh letih, ki bi lahko predstavljalo navzkrižje interesov v povezavi z oddanim prispevkom), ki ga navedejo v izjavi ob oddaji rokopisa.

Uporaba orodij generativne umetne inteligence pri pisanju člankov ni dovoljena, razen za slogovno in slovnično urejanje. V primeru uporabe teh orodij morajo avtorji v rokopisu to zapisati.

DOSTOP DO RAZISKOVALNIH PODATKOV

Avtorji so dolžni zagotoviti transparentnost glede dostopnosti podatkov, ki podpirajo rezultate v izvirnih znanstvenih člankih. Ob oddaji članka morajo vključiti izjavo o dostopnosti podatkov, v kateri pojasnijo, kje in pod kakšnimi pogoji so podatki na voljo. Pri izvirnih znanstvenih člankih je treba opredeliti način dostopa do raziskovalnih podatkov:

- popoln odprt dostop (*open access*): avtorji navedejo, da so vsi podatki prosto dostopni v javnem repozitoriju, ter navedejo ime repozitorija in povezavo do podatkov,
- dostop na zahtevo (*available upon request*): avtorji podatkov ne objavijo javno, temveč jih korespondenčni avtor lahko posreduje zainteresiranim raziskovalcem na utemeljeno prošnjo,
- omejen dostop zaradi etičnih ali pravnih razlogov: v primeru občutljivih osebnih podatkov ali pogodbenih omejitev avtorji podatkov ne morejo deliti,
- vsi uporabljeni podatki so vključeni v besedilo članka.

ODPRTI DOSTOP

Članki, objavljeni v Farmacevtskem vestniku, so odprto dostopni na spletni strani Slovenskega farmacevtskega društva ter vključeni v Digitalno knjižnico Slovenije dLib.si in Digitalni repozitorij raziskovalnih organizacij Slovenije DiRROS. Dostopni so pod licenco CC BY-NC 4.0. S pošiljanjem prispevka v Farmacevtski vestnik se avtorji strinjajo, da bo njihov članek odprto dostopen v skladu z licenco CC BY-NC 4.0.

NAPOVEDNIK DOGODKOV



SIMPOZIJ ob 51. SKUPŠČINI SFD

14. do 16. maj 2026, Portorož

četrtek, 14. 5. 2026: ODMEVI FARMACEVTSKE STROKE DOMA IN V TUJINI

petek, 15. 5. 2026: IMUNOTERAPIJA KOT TEMELJ SODOBNEGA ZDRAVLJENJA RAKA

sobota, 16. 5. 2026: FARMACEVT V DIALOGU: MED LJUDMI IN ZDRAVILI



SIMPOZIJ SEKCIJE FARMACEVTSKIH TEHNIKOV PRI SFD

29. in 30. maj 2025, Rogla

ŽENSKA V VSEH ŽIVLJENJSKIH OBDOBJIH



1. SKUPNI SIMPOZIJ SEKCIJE FARMACEVTOV JAVNIH LEKARN IN SEKCIJE BOLNIŠNIČNIH FARMACEVTOV

13. oktober 2026 Ljubljana

SKUPAJ ZA ODGOVORNO ZDRAVLJENJE Z ANTIBIOTIKI



GMP SIMPOZIJ 2026

9. junij 2026, Terme Tuhelj, Hrvaška



NOVO: E-izobraževanje za licenčne točke na spletni strani SFD HOMEOPATIJA ZA TELEBANE – OSNOVNO RAZUMEVANJE HOMEOPATSKIH POJMOV



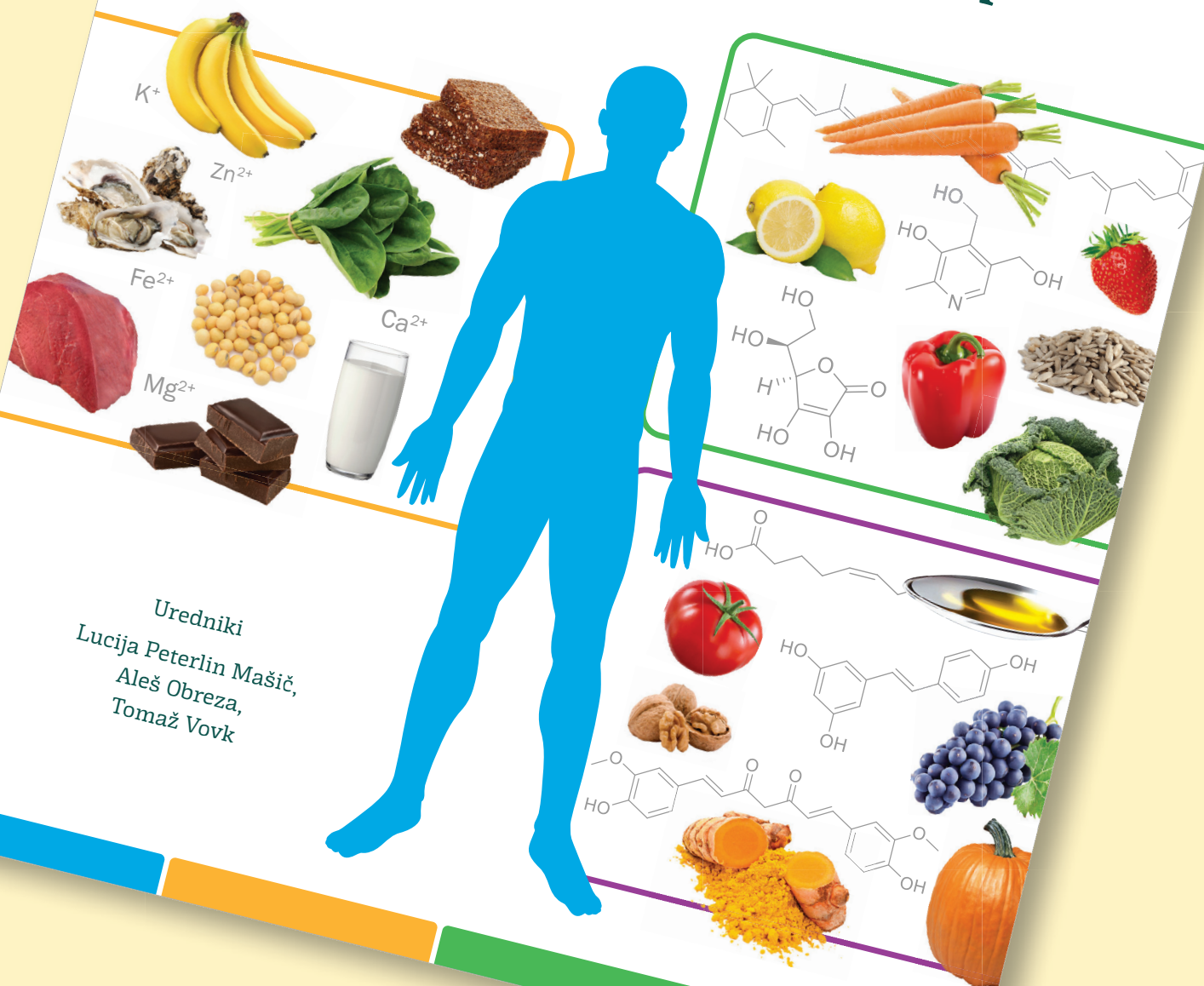
FARMAJESEN 2026 – PLESNI VEČER SFD

17. oktober 2026, Celje

Za več informacij in prijavo na dogodke spremljajte spletno stran **www.sfd.si**!



MINERALI, VITAMINI in druge izbrane snovi



Uredniki
Lucija Peterlin Mašič,
Aleš Obreza,
Tomaž Vovk



Prinašamo zdravje.

Zdravje in dobro počutje ljudi sta za nas na prvem mestu.

Naš cilj je pozitivno vplivati na življenja pacientov – z zagotavljanjem dostopa zdravil po vsej Sloveniji.

Z nenehnim razvojem naših storitev gradimo zaupanje in trdne partnerske odnose za bolj zdravo prihodnost.

Prinašamo zdravje. Vsak dan. Po vsej Sloveniji.

PHOENIX
Pharma Slovenija

 **KEMOFARMACIJA**

