

# FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 3







STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

# FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 3 | julij 2019 | letnik 70

ODGOVORNI UREDNIK:  
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:  
Nina Kočevar Glavač

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

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

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

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

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

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM  
Fotografija na naslovnicu: Shutterstock  
Naklada: 3.550 izvodov

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

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

Na vseh nivojih uporabe in upravljanja z znanjem pogosto slišimo oziroma beremo o pomenu dobre, kakovostne stroke. To prav gotovo velja posebej za farmacijo! In ko politične odločitve ne upoštevajo mnenja stroke, nastajajo posledice, ki jih potem rešujemo še leta, pri čemer škoda, ki je bila narejena, nikoli ni popolnoma odstranjena. Politični snovalci ne počivajo in poskušajo znova in znova, na tak ali drugačen način z namenom »koristiti bolnikom«, predvsem pa svojemu žepu, vplivati na odločitve strokovne javnosti, ki temeljijo na večletnemu trdemu delu. Tako je skupina poslancev v mesecu juniju vložila v obravnavo Predlog zakona o spremembah Zakona o lekarniški dejavnosti (ZLD-1B), ki naj bi bil sprejet po skrajšanem postopku. Strokovna javnost je kar nekaj let pripravljala Zakon o lekarniški dejavnosti, za katerega menimo, da je sodoben in ga velja resnično upoštevati v vseh njegovih členih. Ker pa določenim lobijem obstoječi zakon, ki preprečuje »kavbojsko« delovanje na področju oskrbe in trženja z zdravili ne odgovarja, poskušajo doseči spremembe. Kaj pomeni neurejen trg z zdravili, lahko vidimo v nekaterih državah v bližini Slovenije. Trdim, da je sistem trženja, povezav in mreženja v Sloveniji dober, transparenten in predvsem marketinško uravnovešen! Na poskus sprememb smo strokovni deležniki na različnih nivojih in področjih hitro odreagirali in nanizali vrsto strokovnih obrazložitev, zakaj ne kaže spreminjati obstoječega zakona. Ali bo politika zopet prevladala nad stroko, pa bomo videli kmalu. Upam, da tokrat ne!

Sicer pa je pred vami številka Farmacevtskega vestnika, ki je izjemno bogata z novostmi na področju zdravilnih učinkovin in sodobnega diagnosticiranja različnih bolezenskih stanj. Tako so kolegi z Onkološkega instituta pripravili pregled zdravljenja nekaterih rakavih obolenj z delovanjem na imunske kontrolne točke v organizmu. Bolj in bolj so namreč znane povezave med imunskega sistemom in rakavimi obolenji. Na področju zaviralcev imunskega kontrolnih točk so lani podelili tudi Nobelovo nagrado za medicino. Prebrali bomo lahko tudi novosti glede kemičnih motilcev endokričnega sistema in novih bioloških označevalcev oksidativnega stresa. Skupina raziskovalcev pod vodstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc nam bo predstavila učinkovine za zdravljenje Chagasove bolezni, kolegice s Katedre za klinično biokemijo pa nas seznanjajo s farmakogenomiko tiazipurinov. Prav tako boste izvedeli, kakšno vlogo lahko pričakujemo od esterola, naravnega selektivnega modulatorja estrogenskih receptorjev.

Skratka, v branje in izobraževanje vam ponujamo veliko strokovnih novosti in vam v imenu uredniškega odbora želimo prijetne počitnice, kjerkoli že boste.

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.  
Odgovorni urednik FV



# VSEBINA / CONTENT

## PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 187** Maša Bošnjak, Maja Čemažar, Gregor Serša  
Kombinacija zaviralcev imunskih kontrolnih točk z radioterapijo, kemoterapijo in tarčnim zdravljenjem  
*Combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy, radiotherapy and targeted therapy*
- 196** Darja Gramec Skledar, Lucija Peterlin Mašič  
Kemični motilci endokrinega sistema  
*Endocrine disrupting chemicals*
- 205** Tjaša Plesničar, Janez Mravljak  
Izoprostani in nevroprostani kot biološki označevalci oksidativnega stresa  
*Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress*
- 212** Nina Vokič, Gregor Gomišček, Marija Sollner Dolenc  
Chagasova bolezen in učinkovine za njeno zdravljenje  
*Chagas disease and drug substances for its treatment*
- 220** Dunja Urbančič, Alenka Šmid, Irena Mlinarič-Raščan  
Farmakogenomsko vrednotenje tiopurinov  
*Pharmacogenomic evaluation of thiopurines*
- 228** Tamara Knific, Maša Sinreich, Tea Lanišnik Rizner  
Estetrol – naravni selektivni modulator receptorjev za estrogene  
*Estetrol – natural selective estrogen receptor modulator*

## DRUŠTVENE VESTI – ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

- 236** Otvoritev lekarniškega in alkemističnega muzeja v Radovljici
- 237** Umetnostni zbirki dr. Franca Kozjeka na pot
- 238** 44. skupščina SFD in simpozij
- 240** Podelitev društvenih priznanj v letu 2019

# KOMBINACIJA ZAVIRALCEV IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK Z RADIOTERAPIJO, KEMOTERAPIJO IN TARČNIM ZDRAVLJENJEM

## COMBINING IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS WITH CHEMOTHERAPY, RADIOTHERAPY AND TARGETED THERAPY

AVTOR / AUTHOR:

Znan. sod. dr. Maša Bošnjak, mag. farm.

Prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

Prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.

*Onkološki inštitut Ljubljana,  
Oddelek za eksperimentalno onkologijo,  
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: mbosnjak@onko-i.si

### POVZETEK

V zadnjih letih je imunoterapija z razvojem zaviralcev imunskih kontrolnih točk postala eden izmed pomembnih načinov sistemskega zdravljenja različnih vrst raka. Kljub temu, da so zavirali imunskih kontrolnih točk izkazali znaten klinični učinek pri bolnikih z napredovalimi oblikami raka, delež bolnikov, ki se odzovejo na terapijo ostaja majhen, prav tako le določen delež bolnikov doseže dolgotrajen odgovor. Da bi zaobšli ti dve ključni omejitvi, poleg kombinacije različnih zaviralcev imunskih kontrolnih točk veliko raziskav proučuje kombinacijo le-teh s klasično kemoterapijo, radioterapijo in tarčnimi zdravili. Kot pri številnih drugih terapijah pa tudi pri imunoterapiji vse bolj postaja pomemben individualiziran pristop. V tem prispevku bomo predstavili izsledke raziskav kombinacije zaviralcev imunskih kontrolnih točk z radioterapijo, kemoterapijo in tarčnim zdravljenjem.

### KLJUČNE BESEDE:

kemoterapija, radioterapija, tarčno zdravljenje, zavirali imunskih kontrolnih točk

### ABSTRACT

Due to the development of immune checkpoint inhibitors in recent years, immunotherapy has become one of the important therapeutic strategies in the systemic treatment of various types of cancer. Although immune checkpoint inhibitors have shown significant clinical effects in patients with advanced cancer, the number of patients who respond to therapy remains low, and only a small proportion of patients achieve a long-term response. To overcome these two key limitations, in addition to immune checkpoint inhibitors combination, many studies focus on combination of immune checkpoint inhibitors with systemic chemotherapy, radiotherapy and target therapy. Like in many other therapeutic approaches, a personalized approach is becoming increasingly important also in immunotherapy. In this paper, the results of studies combining immune checkpoint inhibitors with radiotherapy, chemotherapy and targeted treatment will be presented.

### KEY WORDS:

chemotherapy, immune checkpoint inhibitors, radiotherapy, targeted therapy

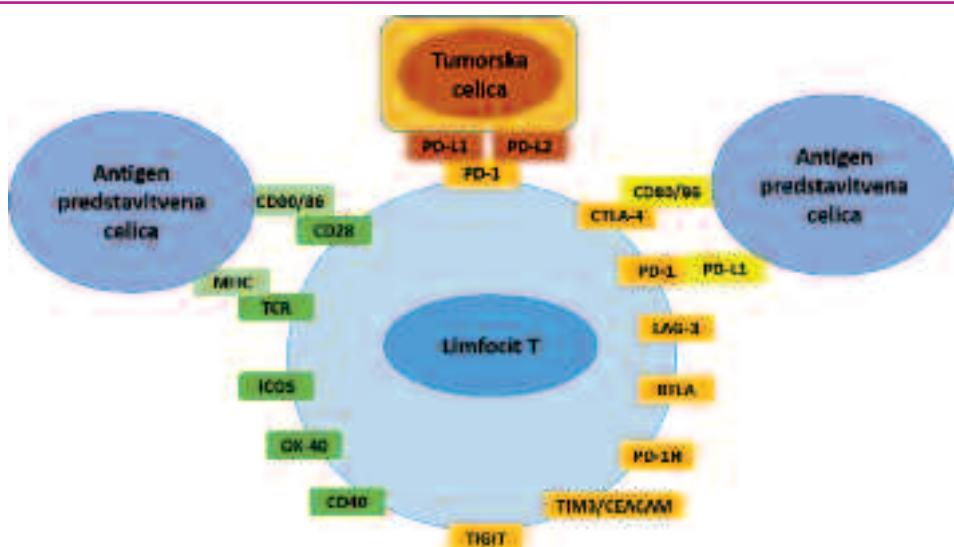


# 1 UVOD

V zadnjih letih je imunoterapija postala eden izmed pomembnih načinov sistemskega zdravljenja raka. **Zaviralcimunskih kontrolnih točk** (CPI, *immune checkpoint inhibitors*) so se izkazali za učinkovito obliko zdravljenja številnih vrst raka (1). To so prepoznali tudi na Karolinskem inštitutu in Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino za leto 2018 dodelili Jamesu P. Allisonu in Tasuku Honju. Allison iz Centra MD Anderson v Teksasu je preko proučevanja funkcij proteina CTLA-4, ki deluje kot zavora imunskega odziva, odkril potencial odstranitve te zavore, njegov kolega iz Japanske, Honjo, pa je proučeval drug protein na imunske celice, PD-1, ki ima enako funkcijo kot CTLA-4. Oba sta neodvisno pokazala, da zaviralc CTIA-4 in PD-1 odpravijo inhibicijo imunskega odziva.

V procesu nastanka in napredovanja raka ima imunski sistem ključno vlogo: tumorsko celico mora prepoznati in odstraniti. Celice, ki se jim uspe temu izogniti, se lahko zaradi velikega prilagoditvenega potenciala vseskozi spreminjajo ter vplivajo na delovanje imunskega sistema. Proces preuređenja delovanja imunskega sistema med razvojem tumorjev imenujemo imunsko preurejanje in ga v grobem delimo na tri faze: eliminacijo, ravnovesje in imunski pobeg (1).

V fazi eliminacije imunski odziv skrbi za uspešno prepoznavanje tumorskih celic in njihovo odstranitev. Vnetni citokini, ki se sprostijo iz tumorskih celic, makrofagov in celic strome, aktivirajo številne celice prirojenega imunskega sistema, kot so naravne celice ubijalke (NK, *natural killer cells*) in naravne celice ubijalke T (NKT, *natural killer T cells*). NK, NKT in makrofagi v tumorju začnejo proizvajati interferon (IFN) gama in interleukin 12, ki spodbujata določene celice imunskega sistema in ubijata tumorske celice (1). V fazi ravnovesja imunski sistem še vedno nadzira razraščanje tumorja, vendar ne zmore več zmanjševati tumorske mase.



**Slika 1:** Shematičen prikaz kostimulatornih (zelene) in koinhibitornih (oranžne) molekul, ki se izražajo na limfocitih T, ter prikaz nekaterih molekul na tumorskih oz. antigen predstavitevnih celicah, ki se na te molekule vežejo. CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; PD-1, programmed cell death protein-1; PD-L1/L2, programmed cell death-ligand 1/ligand 2; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; BTLA, B and T lymphocyte attenuator; PD-1H, programmed death-1 homolog; TIM-3, T-cell immunoglobulin; CEACAM1, carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1; TIGIT, T cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T cell receptor.

**Figure 1:** Schematic presentation of costimulatory (green) and coinhibitory (orange) molecules expressed on T cells, and of some molecules on tumor and antigen presenting cells that bind to costimulatory or coinhibitory molecules. CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; PD-1, programmed cell death protein-1; PD-L1/L2, programmed cell death-ligand 1/ligand 2; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; BTLA, B and T lymphocyte attenuator; PD-1H, programmed death-1 homolog; TIM-3, T-cell immunoglobulin; CEACAM1, carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1; TIGIT, T cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T cell receptor.



V fazi imunskega pobega pa imunski sistem ne zmore več nadzorovati razvoja tumorja, tumor lahko nemoteno raste in metastazira v druge dele telesa.

## 2 DELOVANJE ZAVIRALCEV IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK IN NJIHOVA UPORABA PRI ZDRAVLJENJU RAKA

Kontrolne točke imunskega sistema skrbijo za natančno uravnavanje spodbujanja in zaviranja imunskega sistema. Zaznava antigena še ne zadostuje za aktivacijo limfocitov T. Aktivacijo limfocitov T namreč uravnavajo številne molekule na njihovi površini, ki so kostimulatorne ali koinhibitorne. Prva tako opisana molekula je bil kostimulatorni receptor CD28 na površini naivnih limfocitov T, ki ob vezavi ligandov CD80/86, prisotnih na površini antigen predstavnih celic (APC), vodi v aktivacijo limfocitov T. Aktivirani limfociti T so CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> ter regulatorni limfociti T (Treg), ki poleg CD28 na svoji površini izražajo tudi koinhibitorni receptor CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), ki ima večjo afiniteto do proteinov CD80/86 kot CD28 in tako preprečuje preobsežno aktivacijo imunskega sistema. Na efektorskih limfocitih T, CD4<sup>+</sup> (celice T pomačalke) in CD8<sup>+</sup> (celice T ubijalke), vezava s CTLA-4 povzroči zaustavitev celičnega cikla, na Treg pa ojača njihovo imunospresivno delovanje (2).

Kljud temu, da so klinično raziskave faze I z agonistom CD28 (TGN1412) zaradi hudih neželenih učinkov predčasno prekinili, potekajo predklinične in klinične raziskave z učinkovinami, ki povečajo delovanje drugih kostimulatornih molekul, kot so OX-40, ICOS, CD137 idr. (2-4).

Druga pot ojačanja imunskega odziva je zaviranje koinhibitornih molekul, katerih število je pri mnogih vrstah raka povečano. Preboj v imunoterapiji raka je pomenil ipilimumab, humano monoklonsko protitelo, ki cilja CTLA-4. Sledila so protitelesa proti PD-1 (*programmed cell death protein 1*) in njegovemu ligandu PD-L1 (slika 1). Z inhibicijo teh molekul se znova poveča imunska aktivnost organizma proti rakavim celicam (2).

Allison in sodelavci so prvi dokazali, da blokada CTLA-4 z monoklonskimi protitelesi povzroči zmanjšanje mišjih tumorjev (5). Izsledki klinične raziskave so pokazali, da ipilimumab poveča delež preživelih bolnikov z metastatskim melanomom za približno 10 %. Tako je ipilimumab postal prva učinkovina iz skupine CPI z dovoljenjem za promet za zdravljenje metastatskega melanoma. Kljud doprinosu

k preživetju pa je zdravljenje z ipilimumabom povezano z močnim izražanjem neželenih učinkov. Kar 60 % bolnikov prizadene eden izmed imunske pogojenih neželenih učinkov, ki so najpogosteje gastrointestinalni, lahko pa se izražajo tudi na koži, jetrih, pljučih in še drugod.

Honjo s sodelavci je dokazal, da je izražanje PD-1 povečano na aktiviranih limfocitih T in B in makrofagih. Aktivirani PD-1 zavira delovanje limfocitov T in s tem imunskega sistema, saj spodbuja apoptozo antigen specifičnih celic T in zavira apoptozo Treg (1). PD-1 ima dva liganda, PD-L1 in PD-L2. Njuno izražanje je povečano na APC in tumorskih celicah. To še posebej velja za PD-L1, katerega izražanje je povečano na tumorskih celicah številnih vrst raka. Izražanje PD-L2 je bolj omejeno, predvsem na dendritične celice (DC) in le nekatere vrste raka (6). Klinične raziskave so potrdile učinkovitost terapije z zaviralci PD-1 za zdravljenje melanoma, karcinoma ledvic in nedrobnoceličnega pljučnega karcinoma (NSCLC). Neželeni učinki terapije so blagi, sistemsko toksičnost pa nizka, kar kaže na bolj specifično ciljanje tumorskih celic z zaviralci PD-1 in PD-L1 kot zaviralci CTLA-4.

CPI, ki imajo v Sloveniji dovoljenje za promet z zdravilom, in njihove odobrene indikacije so navedeni v preglednici 1.

## 3 ZAKAJ JE ZAVIRALCE IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK SMISELNO KOMBINIRATI Z DRUGIMI OBLIKAMI ZDRAVLJENJA?

Odgovor je preprost: ker je potrebno dodatno spodbuditi imunski sistem po odstranitvi zavor s CPI. S kombiniranjem terapij lahko povečamo imunogenost tumorja preko večje izpostavitve tumorskih (neo)antigenov, povečane kemotakse, lažjega dostopa imunskeih celic v sam tumor idr. (7, 8). Kljud temu, da so CPI izkazali znaten klinični učinek pri bolnikih z napredovalimi oblikami raka, delež bolnikov, ki se odzovejo na terapijo, ostaja majhen (9). Prav tako le določen delež bolnikov doseže dolgotrajen odgovor. Ta dva pojava lahko pripisemo **primarni** in **sekundarni** rezistenci, ki sta posledici zapletenih interakcij med imunskeimi celicami, celicami strome in tumorskimi celicami, ki skupaj tvorijo tumorsko mikrookolje (TMO) (10).

**Primarna rezistenca** na CPI nastane zaradi odsotnosti funkcionalnega imunskega sistema v tumorjih nizke imunogenosti. Ti imajo po navadi **nizko mutacijsko bremena**, v nasprotju z njimi pa se tumorji z visokim mutacijskim bre-

Preglednica 1: CPI z dovoljenjem za promet z zdravilom s pripadajočimi indikacijami.

Table 1: CPI with obtained marketing authorization and indications.

Imunske kontrolne točke	Prisotnost	Ime učinkovine in zdravila	Indikacije
<b>CTLA-4</b>	Aktivirani CD4 <sup>+</sup> T limfociti Aktivirani CD8 <sup>+</sup> T limfociti Treg	<b>ipilimumab</b> Yervoy®	mM
<b>PD-1</b>	Aktivirani limfociti T Tumor-infiltrirajoči limfociti Treg Limfociti B NK	<b>pembrolizumab</b> Keytruda®	<p>mM</p> <p>1. linija zdravljenja mNSCLC, z najmanj 50-odstotno izraženostjo PD-L1, a odsotnostjo tumorskih mutacij EGRF/ALK</p> <p>v kombinaciji s pemetreksedom in KT na osnovi platine indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega neploščatoceličnega NSCLC pri odraslih, z odsotnostjo tumorskih mutacij EGRF/ALK</p> <p>2. linija zdravljenja napredovalega ali metastatskega NSCLC, z najmanj 1-odstotno izraženostjo PD-L1, po predhodni KT</p> <p>ponovljeni ali neodzivni klasični Hodgkinov limfom, kjer avtologna presaditev matičnih celic in zdravljenje z brentuximabom vedotinom (BV) nista bila uspešna, oz. za zdravljenje odraslih bolnikov, ki za presaditev niso primerni, zdravljenje z BV pa pri njih ni bilo uspešno</p> <p>pri odraslih, predhodno zdravljenih s KT, ki je vključevala platino</p> <p>lokalno napredovali ali metastatski urotelijski karcinom pri odraslih, predhodno zdravljenih s KT, ki je vključevala platino</p> <p>lokalno napredovali ali metastatski urotelijski karcinom pri bolnikih, ki niso primerni za zdravljenje s KT, ki vsebuje cispaltin, in imajo tumorje z najmanj 10-odstotno izraženostjo PD-L1</p> <p>ponovljeni ali metastatski HNSCC, z najmanj 50-odstotno izraženostjo PD-L1, ko je bolezen napredovala med zdravljenjem ali po zdravljenju s KT, ki je vključevala platino</p>



		<b>nivolumab</b> Opdivo®	<p>mM</p> <p>adjuvantno zdravljenje odraslih z melanomom, ki se je razširil na bezgavke, ali z metastatsko boleznijo po popolni kirurški odstranitvi</p> <p>ledvični karcinom po predhodnem zdravljenju</p> <p>2. linija zdravljenja metastatskega ali napredovalga NSCLC po predhodni KT</p> <p>ponovljeni ali neodzivni klasični Hodgkinov limfom, kjer avtologna presaditev matičnih celic in zdravljenje z BV nista bila uspešna, in odraslih bolnikov, ki za presaditev niso primerni, zdravljenje z BV pa pri njih ni bilo uspešno</p> <p>ponovljeni ali metastatski HNSCC, pri katerih je bolezen napredovala med zdravljenjem ali po zdravljenju na osnovi platine lokalno napredovali, neoperabilni ali metastatski urotelijski karcinom, po neuspešnem predhodnem zdravljenju, ki je vključevalo platino</p>
<b>PD-L1PD-L2</b>	Tumorske celice APC Supresorske celice mieloidnega izvora (MDSC)	<b>atezolizumab</b> Tecentriq®	<p>2. linija zdravljenja metastatskega ali napredovalga NSCLC po predhodni KT.; bolniki, ki imajo EGFR/ALK tumorske mutacije morajo pred uvedbo atezolizumaba prejeti tudi tarčno zdravljenje</p> <p>napredovali ali metastatski urotelijski karcinom, po neuspešnem predhodnem zdravljenju, ki je vključevalo platino</p> <p>napredovali ali metastatski urotelijski karcinom, z več kot 5-odstotno izraženostjo PD-L1, ki ni primeren za zdravljenje s cisplatinom</p>
		<b>avelumab</b> Bavencio®	karcinom Merklovinih celic
		<b>durvalumab</b> Imfinzi®	napredovali NSCLC z najmanj 1-odstotno izraženostjo PD-L1, ki po KT na osnovi platine, ni napredoval
<b>CTLA-4 in PD-1</b>		<b>kombinacija ipilimumab in nivolumab</b>	mM

mM - metastatski melanom; mNSCLC – metastatski nedrobnocelični karcinom pljuč; KT – kemoterapija; HNSCC ploščatocelični karcinom glave in vrata

menom (melanom in NSCLC) načeloma dobro odzovejo na terapijo s CPI. Poleg tega je primarna rezistenca povezana z **nizko infiltracijo imunskih celic v tumorju**, zaradi oslabljenega privabljanja tumor infiltrirajočih limfocitov T ali zaradi fizikalne bariere, ki jo predstavlja TMO. DC so v tumorju nujno potrebne za zagotavljanje imunogenosti tumorja. Prav tako so za delovanje CPI v tumorju pomembni tudi **efektorski limfociti T**. Primarna rezistenca na CPI je pogojena tudi z **visoko zastopanostjo inhibitornih imunskih celic**, kot so Treg, TAM (*tumor associated macrophages*) in supresorske celice mieloidnega izvora, ki nadvlačajo protitumorsko delovanje limfocitov T v tumorju (10).

**Sekundarna rezistenca** je pojav, ki nastane po tem, ko se tumor prvotno odzove na terapijo s CPI. Najpogosteje nastane sekundarna rezistenca zaradi nezadostne **predstavitev antigena** na tumorskih celicah ob napredovanju bolezni ali pa zaradi mutacij v mehanizmih procesiranja in predstavitev tumorskega antigena CD8<sup>+</sup> T limfocitom. Dodatno se lahko pojavi tudi zaradi mutacije same oz. zaradi utišanja/prenehanja izražanja tumorskega antigena. Zaradi mutacij lahko pride tudi do **rezistence na imunske efektorske citokine**, do **prevlade protitumorskih signalov** nad protitumorskimi in izražanja dodatnih **koinhibitornih molekul PD-L1, LAG-3 in TIM-3**, ki dodatno prispevajo k inaktivaciji limfocitov T (10).

Da bi dosegli večji delež odgovorov na zdravljenje s CPI in prešli primarno ter sekundarno rezistenco, je smiselno CPI kombinirati s klasičnimi protitumorskimi terapijami in drugimi oblikami imunoterapije. Tako intenzivno proučujejo možnosti kombiniranja CPI med seboj (CTLA-4 in PD-1/PD-L1), s konvencionalnim zdravljenjem (kemoterapija, radioterapija), s kostimulatornimi molekulami (OX-40) (4), z različnimi tumorskimi vakcinami (DC vakcine), onkolitičnimi virusi idr.

DAMP uvrščamo površinsko izpostavljen kalretikulin, molekule ATP in protein HMGB1 (*high mobility group protein B1*) (11). DAMP privabijo in stimulirajo celice prirojenega imunskega sistema, ki fagocitirajo ostanke celic in predstavijo antigene tumor specifičnim limfocitom T.

### Kombinacija z radioterapijo

Radioterapija lahko preko različnih mehanizmov:

- poveča imunogenost tumorja (povečano izražanje tumorskih antigenov, procesiranje antigenov, ekspresija molekul MHC in kostimulatornih signalov),
- preide imunosupresivno delovanje TMO (poveča izražanje imunostimulatornih citokinov),
- v tumor privabi APC in efektorske celice (8).

Ena izmed najbolje proučenih signalnih poti je z radioterapijo inducirana signalna pot cGAS-STING, ki preko IFN tipa I aktivira imunski odziv. V tej kaskadni reakciji cGAS zazna prisotnost DNA v citosolu, kjer se ta normalno ne nahaja. Ob vezavi DNA cGAS katalizira reakcijo biosinteze 2'3'-cGAMP, ta pa se nato veže na STING in povzroči njegovo oligomerizacijo ter translokacijo z endoplazemskega retikuluma v okolico jedra. Tam forsirilira interferon regulirajoči faktor 3 (IRF3), ki se translocira v jedro in sproži nastajanje IFN tipa I (12). Številne predklinične raziskave so potrdile, da kombinacija radioterapije s CPI privede do specifičnega protitumorskega odziva. Večina prikazov primerov bolnikov in majhnih nerandomiziranih raziskav je pokazala varnost in učinkovitost kombinacije brez povečane sistemске toksičnosti. Pri napredovali in metastatski bolezni kombinacija lahko poveča protitumorski imunski odgovor, ki zdravi obstoječe metastaze in preprečuje nastanek novih (8). V primeru stadija III NSCLC so pokazali, da dodatek durvalumaba po radio-kemoterapiji podaljša preživetje brez ponovitve bolezni v primerjavi s placeboom za približno 11 mesecev (13). Nekatere raziskave pa so pokazale tudi negativne učinke obsevanja: povečalo se je število inhibitornih imunskih celic v TMO ali izražanje imunosupresivnih molekul, kot je transformirajoči rastni faktor beta (TGFβ). Neskladje izidov raziskav se da razložiti z različnimi režimi obsevanja. To je na predkliničnem modelu dokazala Demaria s sodelavci, ki je pokazala sinergistični učinek kombinacije zaviralca CTLA-4 s frakcioniranim obsevanjem z majhnim odmerkom, v nasprotju z enkratnim obsevanjem z velikim odmerkom. Majhni odmerki povzročijo lokalno izražanje IFN in posledično aktivirajo DC, medtem ko veliki odmerki sprožijo pot, ki razgrajuje DNA v citosolu in s tem prepreči aktivacijo imunskega sistema (10). Pomembno se je zavedati, da je kombinacija CPI in radioterapije lahko tudi dvorenzen meč, ko gre za uravnavanje

## 4 ZAVIRALCI IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK V KOMBINACIJI Z RADIOTERAPIJO, KEMOTERAPIJO IN TARČNIM ZDRAVLJENJEM

Tako radioterapija kot nekatere vrste kemoterapije lahko povzročijo **imunogeno celično smrt**. To je izraz za imunogeno obliko apoptoze rakavih celic, pri kateri umirajoče celice v okolico sprostijo molekule DAMP (*damage associated molecular pattern*). Med najpomembnejše molekule



tumorske imunosti; lahko deluje imunostimulatorno ali pa imunosupresivno (14). Zato je na podlagi dostopnih podatkov v klinični praksi potrebno dobro načrtovati kombinirano terapijo: (i) katere bolnike in s katero obliko bolezni je smiselno zdraviti s kombinirano terapijo, (ii) kakšen je režim radioterapije, (iii) kateri CPI izberemo in (iv) kakšno sosledje je najprimernejše za kombinirano terapijo. Za pridobitev bolj jasnih odgovorov je potrebno oblikovati izpopolnjen protokol randomizirane klinične raziskave kombinacije terapije CPI z radioterapijo in brez nje, ki bo pokazala, ali ima radioterapija klinično pomembno korist kot komplementarna terapija zdravljenju s CPI.

### Kombinacija s kemoterapijo

Določeni citostatiki lahko preko različnih mehanizmov spodbudijo delovanje imunskega sistema. Najbolje raziskan in opisan mehanizem je indukcija imunogene celične smrti (15), ki jo sprožijo **ciklofosfamid, antraciklini in oksaliplatin** (15, 16). **Cisplatin** in **karboplatin** lahko zmanjšata število PD-L2 na DC in tumorskih celicah in tako povečata aktivacijo limfocitov T. **Docetaksel** lahko privede do selektivnega zmanjšanja števila Treg (17).

Dve klinični raziskavi sta potrdili koristne učinke kombinacije dakarbazina, standardne kemoterapije za metastatski melanom, z **ipilimumabom**. Prva je dokazala, da več bolnikov odgovori na imunoterapijo v kombinaciji z dakarbazinom (14,3 %) kot na monoterapijo z ipilimumabom (5,4 %) (18). Druga klinična raziskava pa je proučevala celokupno preživetje, ki je bilo v prid kombinirane terapije (11,2 meseca) v primerjavi z dakarbazinom (9,1 mesec). Vendar pa je v drugi raziskavi močno poraslo število imunsko pogojenih neželenih učinkov (18).

Oktobra 2018 je FDA odobrila **pembrolizumab** v kombinaciji s karboplatinom in paklitakselom (ali nab-paklitakseлом) kot prvo linijo zdravljenja ploščatoceličnega NSCLC, neodvisno od izražanja PD-L1. Odobritev so podali na podlagi klinične raziskave faze III (KEYNOTE-407), ki je pokazala značilen učinek na celokupno preživetje bolnikov. V kliničnih raziskavah je tudi **nivolumab** (relativni celokupni odziv (ORR) 23 %) v kombinaciji gemcitabin-cisplatin (33 %), pemtreksat-cisplatin (47 %), paklitaksel-karboplatin (43 %) izkazal večji ORR. Prav tako je večji ORR v kombinaciji karboplatin-paklitaksel (36 %), karboplatin-pemetreksat (68 %), karboplatin-nab-paklitaksel (46 %) izkazal **ate-zolizumab** (ORR 26 %). V kombinaciji karboplatin-nab-paklitaksel so dosegli celo štiri popolne odgovore na zdravljenje. Žal pa je v vseh skupinah poraslo tudi število resnih neželenih učinkov, vključno s smrtnimi primeri (17).

Te ugotovitve kažejo na sinergijo med citotksično kemoterapijo in CPI (slika 2). Preliminarne klinične raziskave nakazujejo prednosti kombinirane terapije v primerjavi z monoterapijami. Kljub temu pa znanje o odmerkah, frekvenci in najbolj učinkovitem citostatiku ostaja pomanjkljivo in prav zato so potrebne nadaljnje raziskave.

### Kombinacija s tarčnim zdravljenjem

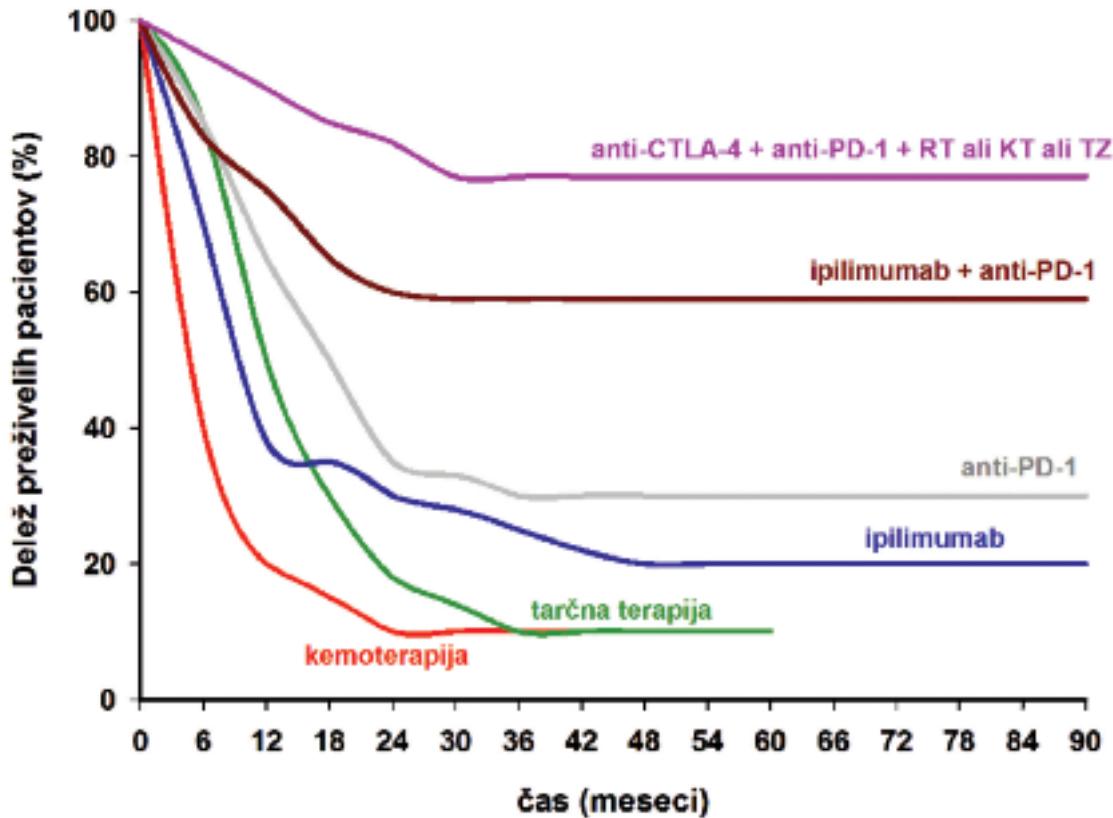
Klinični podatki kažejo, da se pri bolnikih z melanomom, ki so na terapiji z zaviralci BRAF, pojavi imunski pobeg v približno 14 dneh po začetku terapije. Tako so raziskovalci prišli na idejo, da bi kombinacija s CPI lahko delovala sinergistično (19).

Klinično raziskavo kombinacije **vemurafeniba** (zaviralec BRAF) in **ipilimumaba** so zaradi hude hepatotskičnosti prekinili, raziskava **dabrafeniba** (zaviralec BRAF) v kombinaciji z **ipilimumabom** pa še vedno poteka, vendar izsledki še niso znani. Po anti-BRAF terapiji je na tumorskih celicah število PD-L1 povečano, zato je zaviralce BRAF smiseln kombinirati z zaviralci PD-1/PD-L1. Predklinične raziskave so potrdile, da kombinirana terapija poveča protitumorski učinek na mišijih melanomskeh tumorjih.

Vendar pa zaviranje BRAF lahko vodi v aktivacijo signalne kaskade MAPK v limfocitih T, kjer BRAF ni inhibiran, in posledično v imunosupresijo. Predklinične raziskave zaviralcev signalne poti MAPK/ERK na mišijih tumorjih so pokazale sinergistični učinek trametiniba (zaviralec MEK) v kombinaciji z zaviralci PD-1, PD-L1 ali CTLA-4. Kombinacija trametiniba, dabrafeniba in ipilimumaba je pri bolnikih z metastatskim melanomom v raziskavi faze I/II povzročila hudo gastrointestinalno toksičnost (20). Nasprotno se je kombinacija trametiniba in dabrafeniba v klinični raziskavi izkazala kot varna (21). To nakazuje na varnost kombinacije zaviralcev MEK in BRAF z zaviralci PD-L1, vendar so raziskave o klinični učinkovitosti še v teku.

## 5 OBETI ZA PRIHODNOST

Imunoterapija raka obeta veliko, zato se veliko raziskovalcev ukvarja z raziskovanjem **novih CPI**. V kliničnih preskušanjih že testirajo zaviralce LAG3, PD-1H in BTLA, številni drugi pa so v predkliničnih raziskavah (2). Raziskave CPI so doprinesle znanje, da različne kontrolne točke uravnavajo različne stopnje in različne celice imunskega sistema, zato je smiseln **kombinirati različne CPI**. Kombiniranje zavi-



Slika 2: Shematičen prikaz učinkovitosti posameznih sistemskih terapij in pričakovana učinkovitost kombinirane terapije. KT = kemoterapija, RT = radioterapija, TZ = tarčno zdravljenje.

Figure 2: Schematic presentation of monotherapy effectiveness and anticipated effectiveness of combined therapy. KT = chemotherapy, RT = radiotherapy, TZ = targeted therapy.

ralcev CTLA-4 in PD-1 za zdravljenje melanoma je že izkazalo klinično pomembnost. CTLA-4 naj bi bil pomemben predvsem v zgodnji regulaciji aktivacije limfocitov T v bezgavkah, PD-1 pa pri uravnavanju aktivnosti efektorskih limfocitov T. Kombinacije CPI bodo tako doprinesle k boljši regulaciji imunskega sistema na različnih nivojih, k večji protitumorski učinkovitosti in manjšim imunsko pogojenim neželenim učinkom (2).

**Iskanje novih načinov in kombinacij zdravljenja**, ki bi s CPI delovali aditivno ali celo sinergistično, brez sočasnega povečanja sistemske toksičnosti, nam predstavlja velik izzik. Kljub temu, da je večina imunoterapij usmerjena na limfocite T in pridobljeni imunski sistem, se vedno več raziskovalcev ukvarja s proučevanjem prirojenega imunskega sistema (9).

Najnovejše raziskave izpostavljajo pomembnost posameznikove črevesne **mikrobiote** za odgovor na CPI. Bolnike lahko namreč na podlagi njihove črevesne mikrobiote razdelimo na tiste, ki odgovorijo na imunoterapijo z zaviralci

PD-1, in tiste, ki nanjo ne odgovorijo. Tisti, ki odgovorijo, imajo večje število bakterij iz rodov *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* in *Akkermansia*, medtem ko imajo tisti, ki ne odgovorijo, povečano število *Bacteroidales* (22). Raziskave na miših so dokazale, da je pri prvih v tumorju prisotno večje število CD8<sup>+</sup> T limfocitov, pri drugih pa CD4<sup>+</sup> Treg. Še več, pilotne študije so pokazale, da zdravljenje z antibiotiki negativno vpliva na odgovor na imunoterapijo (23). Tako se porajata vprašanji, ali je med imunoterapijo z zaviralci PD-1 smiseln uporabljati probiotike za namen dodajanja koristnih bakterij in ali bo uporaba antibiotikov kontraindicirana. Trenutno je najboljši biološki označevalec za napovedovanje odgovora na imunoterapijo določevanje izražanja PD-L1 v tumorju. Visoko izražanje sovpada z dobrim odgovorom na terapijo, vendar pa v neskladju s tem nekateri bolnički z nizkim izražanjem PD-L1 prav tako dobro odgovorijo na terapijo. Zato je veliko raziskav usmerjenih v iskanje novih **napovednih označevalcev**, kot so mutacijsko breme tumorja, neoantigeni odtis idr.

# 6 SKLEP

V zadnjih letih je imunoterapija doživela razcvet z uvedbo CPI. Žal se še vedno veliko bolnikov nezadostno odzove na terapijo, prav tako le pri določenem deležu opazimo dolgotrajni učinek. Da bi izboljšali učinkovitost imunoterapije, raziskujejo kombinacije CPI s kemoterapijo, radioterapijo in tarčnimi zdravili, ki kažejo doprinos k odgovoru na zdravljenje. Vendar pa tudi pri imunoterapiji vse bolj postaja pomemben individualiziran pristop, ki temelji na napovednih bioloških označevalcih. Zato je v prihodnjih raziskavah prednostna naloga vzpostavitev ustreznih bioloških označevalcev, še posebej za kombinirano terapijo.

# 7 LITERATURA

1. Hočvar M, Strojan P, editors. Onkologija učbenik za študente medicine [Internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, www.onko-i.si; 2018. Available from: [https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Dejavnosti/Raziskovalna\\_in\\_izobrazevalna\\_dejavnost/onkologija/Onkologija\\_ucbenik\\_april2018.pdf](https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Dejavnosti/Raziskovalna_in_izobrazevalna_dejavnost/onkologija/Onkologija_ucbenik_april2018.pdf)
2. Torphy RJ, Schulick RD, Zhu Y. Newly emerging immune checkpoints: Promises for future cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec;8(12).
3. Attarwala H. TGN1412: From Discovery to Disaster. *J Young Pharm.* 2010 Jul;2(3):332-6.
4. Davis RJ, Ferris RL, Schmitt NC. Costimulatory and coinhibitory immune checkpoint receptors in head and neck cancer: unleashing immune responses through therapeutic combinations. *Cancers Head Neck.* 2016 Dec;1:2.
5. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996 Mar;271(5256):1734-6.
6. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012 Mar 28;4(127):127ra37.
7. Yi M, Qin S, Zhao W, Yu S, Chu Q, Wu K. The role of neoantigen in immune checkpoint blockade therapy. *Exp Hematol Oncol [Internet].* 2018;7(1):1-11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0120-y>
8. Ko EC, Formenti SC. Radiotherapy and checkpoint inhibitors: a winning new combination? *Ther Adv Med Oncol [Internet].* 2018;10:175883591876824. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1758835918768240>
9. Jiang W, Chan CK, Weissman IL, Kim BYS, Hahn SM. Immune Priming of the Tumor Microenvironment by Radiation. *Trends Cancer.* 2016 Nov;2(11):638-645.
10. Dammeijer F, Lau SP, van Eijck CHJ, van der Burg SH, Aerts JGJV. Rationally combining immunotherapies to improve efficacy of immune checkpoint blockade in solid tumors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017 Aug;36:5-15.
11. Krysko D V, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandebaele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2012;12(12):860-75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3380%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151605>
12. Wang Y, Deng W, Li N, Neri S, Sharma A, Jiang W, et al. Combining immunotherapy and radiotherapy for cancer treatment: Current challenges and future directions. *Front Pharmacol.* 2018 Mar;9:185.
13. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med.* 2018 Dec;379(24):2342-2350.
14. Tang C, Jiang W, Yap TA. Efficacy and Toxic Effects of Cancer Immunotherapy Combinations—A Double-edged Sword. *JAMA Oncol [Internet].* 2018 Aug 1 [cited 2018 Aug 17];4(8):1116. Available from: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2017.4606>
15. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2017 May;17(5):286-301.
16. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell.* 2015 Dec 14;28(6):690-714.
17. Mathew M, Enzler T, Shu CA, Rizvi NA. Combining chemotherapy with PD-1 blockade in NSCLC. *Pharmacol Ther.* 2018 Jun;186:130-137.
18. Hersh EM, O'Day SJ, Powderly J, Khan KD, Pavlick AC, Cranner LD, et al. A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *Invest New Drugs.* 2011 Jun;29(3):489-98.
19. Edward B, Garon MD for the K-001 I. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:2018-28.
20. Minor DR, Puzanov I, Callahan MK, Hug BA, Hoos A. Severe gastrointestinal toxicity with administration of trametinib in combination with dabrafenib and ipilimumab. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Sep;28(5):611-2.
21. Ribas A, Butler M, Lutzky J, Lawrence D, Robert C, Miller W, et al. Phase I study combining anti-PD-L1 (MEDI4736) with BRAF (dabrafenib) and/or MEK (trametinib) inhibitors in advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(suppl):abstr 3003.
22. Jobin C. Precision medicine using microbiota. *Science.* 2018 Jan;359(6371):32-34.
23. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Dailière R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1 based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018 Jan;359(6371):91-97.



# KEMIČNI MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA

## ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Darja Gramec Skledar, mag. farm.  
Prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko kemijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: lucija.peterlin@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Spojine, ki delujejo na endokrini sistem, poznamo že dolgo. Že v antičnih časih so poznali zeliščne pripravke, ki so vplivali na delovanje endokrinega sistema. Stoletja nazaj so kmetje opazili težave z reprodukcijo pri ovcah in kravah, ki so se pasle na pašnikih, bogatih z deteljo, za katero so kasneje ugotovili, da vsebuje spojine z estrogenim delovanjem, kot je na primer kumestrol (1). Leta 1962 je Rachel Carlson objavila knjigo *Silent Spring*, v kateri je opozorila na škodljive učinke pesticida dikloro-difenil-trikloroetana (DDT) na okolje in ljudi. Šele kasneje se je izkazalo, da je DDT motilec endokrinskega sistema (2). Izraz kemični povzročitelj endokrinskih motenj ali kemični motilec endokrinskega

### POVZETEK

Za številne spojine tako naravnega kot sinteznega izvora je znano, da motijo delovanje endokrinskega sistema in imajo posledično škodljiv vpliv na zdravje posameznika. Izpostavljenost motilcem endokrinskega sistema je povezana s številnimi boleznimi sodobnega časa, kot so debelost, slatkorna bolezen, srčno-žilne bolezni, neplodnost pri ženskah in moških ter rakave bolezni. Motilci endokrinskega sistema delujejo po različnih mehanizmih: (i) motijo sintezo, metabolizem, transport ali izločanje endogenih hormonov, (ii) vežejo se na izbrane endokrine receptorje, na katerih so agonisti ali antagonisti, ali (iii) vežejo se na membranske receptorje in povzročijo negenomske učinke. V tem preglednem članku bomo predstavili delovanje motilcev endokrinskega sistema, zlasti učinkovin, v estrogenskem, androgenem, tiroidnem in glukokortikoidnem sistemu ter njihov vpliv na zdravje človeka.

### KLJUČNE BESEDE:

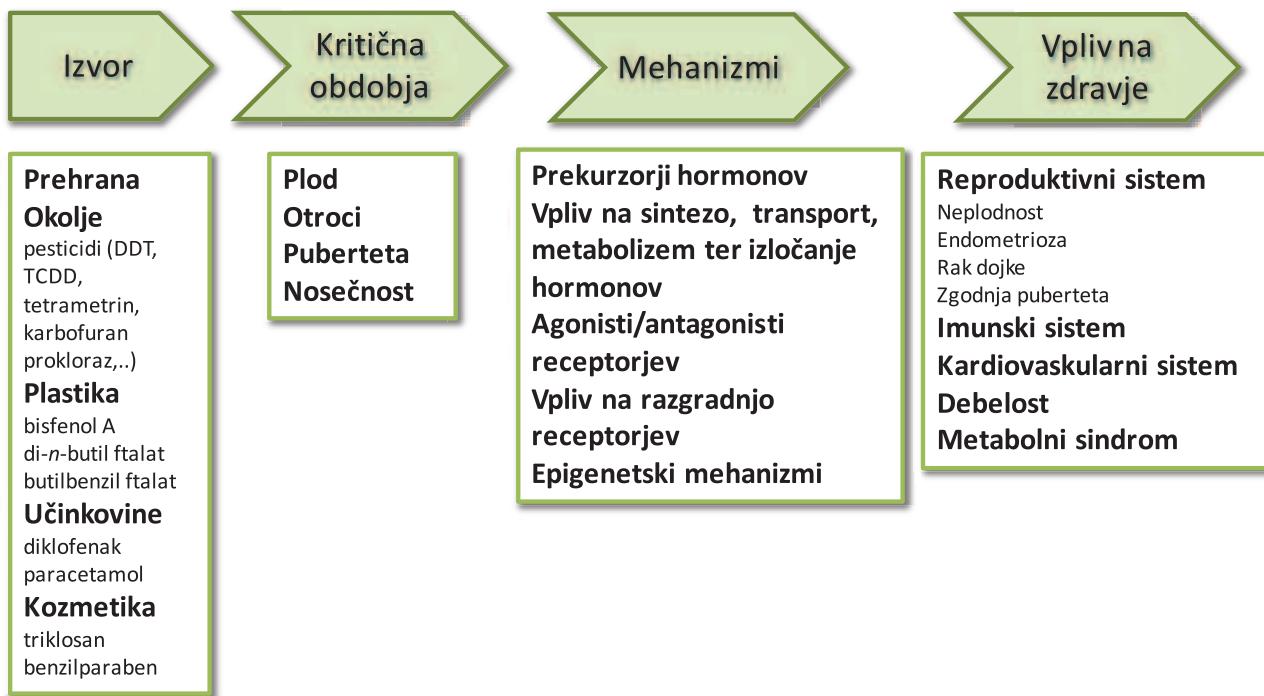
androgeni receptor, endokrini sistem, estrogenski receptor, motilci endokrinskega sistema, učinkovine

### ABSTRACT

Various compounds of both natural and synthetic origin can interfere with endocrine system and consequently adversely affect human health. Exposure to endocrine disruptors is associated with numerous common diseases, such as obesity, diabetes, cardiovascular diseases, infertility in women and men, and cancer. Endocrine disruptors can exert their effects through different mechanisms: (i) they interfere with synthesis, metabolism, transport or elimination of endogenous hormones; (ii) they are agonists or antagonists of selected endocrine receptors, or (iii) bind to membrane receptors and cause nongenomic effects. In this review article, influences of endocrine disruptors, predominantly active substances, on estrogen, androgen, thyroid and glucocorticoid systems will be presented together with their impact on human health.

### KEY WORDS:

androgen receptor, active substances, endocrine system, endocrine disruptors, estrogen receptor



Slika 1: Ključne lastnosti kemičnih motilcev endokrinega sistema (16, 17). DDT, dikloro-difenil-trikloroetan; TCDD, tetraklorodibenzo-p-dioksin.

Figure 1: Key characteristics of endocrine disruptors (16, 17). DDT, dichloro-diphenyl-trichloroethane; TCDD, tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

sistema (EDC, *endocrine disrupting chemical*) je bil vsespološno sprejet trideset let kasneje, leta 1991, na konferenci v Wingspreadu, kjer se je na pobudo Theo Colborn zbrala skupina strokovnjakov, zaskrbljenih zaradi vplivov industrijskih onesnažil na reproduktivni razvoj pri živalih (3). Svetovna zdravstvena organizacija je leta 2002 podala definicijo kemičnih motilcev endokrinega sistema, ki jih opredeljuje kot od zunaj vnesene kemične snovi oziroma mešanice snovi, ki preko sprememb v delovanju hormonov povzročajo neželene učinke na zdravje posameznega organizma ali njegovega potomstva oziroma (sub)populacije (4). V zadnjih dveh desetletjih je področje kemičnih motilcev endokrinega sistema pritegnilo zanimanje številnih znanstvenikov, ki so žeeli razjasniti mehanizem delovanja teh snovi in njihov vpliv na zdravje. Kemični motilci endokrinega sistema vzbujajo zaskrbljenost, saj so povezani z razvojem številnih bolezni sodobnega časa, kot so rak, srčno-žilne bolezni, metabolni sindrom in debelost. Vplivajo lahko na reproduktivno zdravje žensk in moških. Izpostavljenost kemičnim motilcem endokrinega sistema je povezana z večjo pojavnostjo raka dojke in testisov, prezgodnje pubertete, endometrioze, z zmanjšano kakovostjo in količino semena ter posledično z moško neplodnostjo (slika 1).

## IZPOSTAVLJENOST KEMIČNIM MOTILCEM ENDOKRINEGA SISTEMA

Ljudje smo hkrati izpostavljeni kompleksnim mešanicam snovi, ki lahko vplivajo na delovanje endokrinega sistema in posledično na zdravje posameznika (5, 6). Kemični motilci endokrinega sistema so vsespološno prisotni, najdemo jih v zraku, v vodi, v zemlji in se jim je nemogoče izogniti. Najdemo jih v izdelkih za vsakdanjo rabo, kot so na primer plastika (bisfenol A, dietil ftalat, dibutil ftalat, 4-nonifenol), kozmetični izdelki (triklosan, benzilparaben), zdravila (paracetamol), pesticidi (DDT, metoksiklor) in celo elektronske naprave (bromirani zaviralci gorenja) (7-10). V delovanje endokrinega sistema se lahko vpletajo tudi spojine naravnega izvora, kot so urolitini in flavonoidi, ki jih zaradi njihove estrogenske aktivnosti uvrščamo v skupino fitoestrogenov (11, 12).

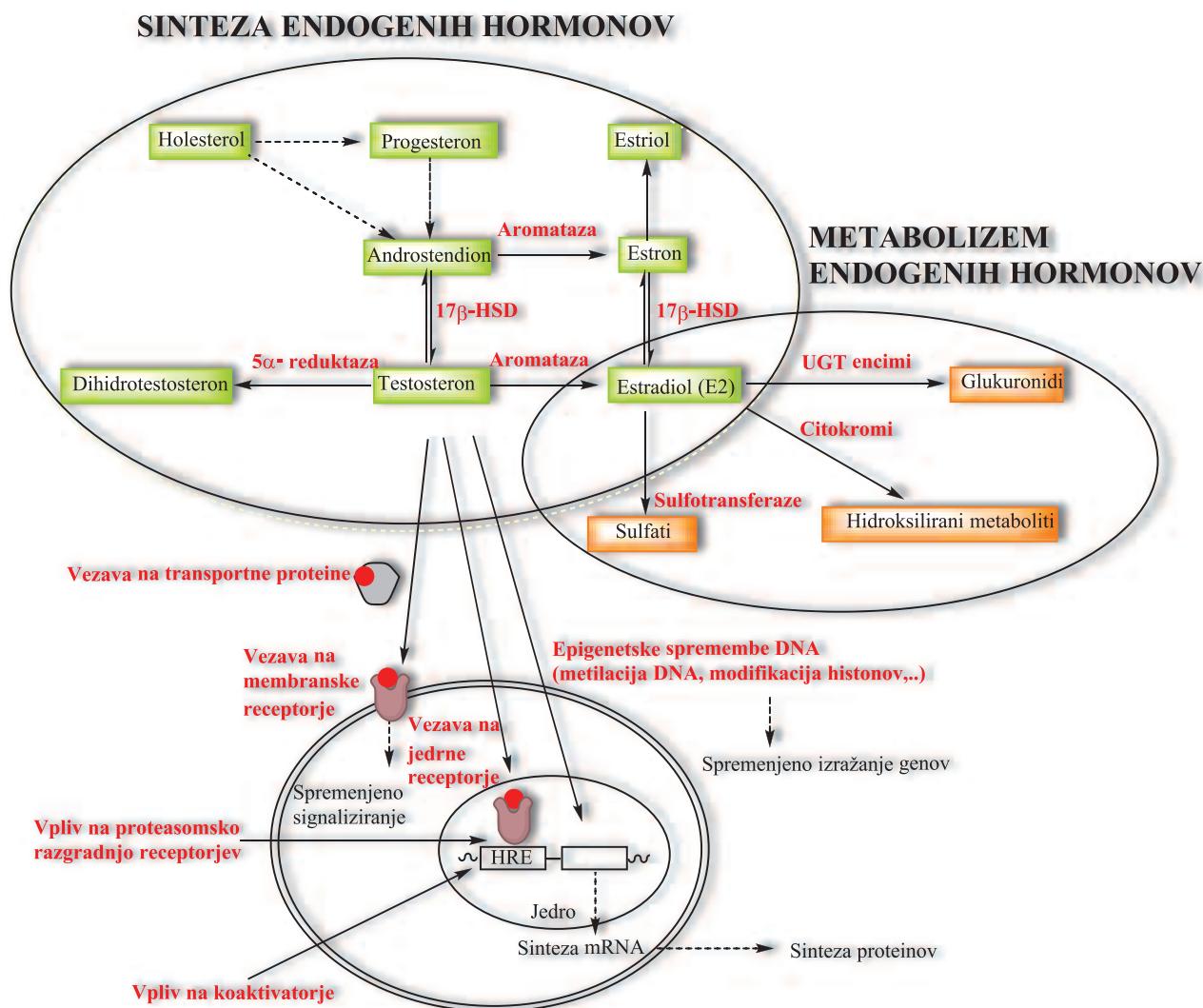
V telo kemične motilce endokrinega sistema najpogosteje vnašamo s hrano ali pičačo, kot na primer bisfenol A (BPA) in ftalate, ki prehajajo iz vsebnikov za shranjevanje hrane/pičače, ali pesticide, ki so prisotni v zaužitih hrani. Na tak način

naj bi dnevno zaužili od 25 do 50 ng BPA na kilogram telesne mase in okoli 3 µg di-2-etylheksil ftalata (DEHP) na kilogram telesne mase (13, 14). Določena živila, npr. soja, že sama po sebi vsebujejo spojine, ki lahko delujejo na endokrini sistem (izoflavoni, kot sta daidzein in genistein). Peroralni vnos je najpogosteji vnos v telo tudi za učinkovine, ki niso namenjene terapevtskemu delovanju v endokrinem sistemu, kot je na primer diklofenak. Možen pa je tudi vnos kemičnih motilcev endokrinega sistema preko kože (pesticidi, spojine v kozmetičnih izdelkih) in preko dihal (bromirani zaviralci gorenja). Posebej sta problematična prehod teh snovi preko placentne in prehod v materino

mleko ter posledično njihov vpliv v najbolj kritičnih obdobjih razvoja (15).

### 3 MEHANIZMI DELOVANJA KEMIČNIH MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA

Za kemične motilce endokrinega sistema je značilno, da se lahko vpletajo v številne procese v telesu (slika 2). Sprva so domnevali, da delujejo predvsem preko vezave na ustre-



Slika 2: Mehanizmi delovanja kemičnih motilcev endokrinega sistema (19, 23, 24).

Figure 2: Molecular mechanisms of endocrine disruptors (19, 23, 24).



zne jedrne receptorje, kot so estrogenski (ER), androgeni (AR), tiroïdni (TR) in glukokortikoidni (GR) receptor, ter posledično vplivajo na prepisovanje tarčnih genov (genomska pot) (18). Danes vemo, da je njihovo delovanje mnogo bolj kompleksno. Vežejo se tudi na receptorje v plazemski membrani in preko signalnih prenašalcev povzročijo hitre učinke (negenomska pot). Aktivacija membranskega ER povzroči sproščanje kalcijevih ionov, spremenjeno izločanje prolaktina, proliferacijo celic ter celični imunski odziv. Interakcija s citosolnim receptorjem aktivira molekule, vključene v prenos signala, npr. ciklični AMP, adenilat-ciklazo, kalcijske ione, fosfatičilinozitol-3-kinazo, protein-kinazo B in G-proteine (18). Preko epigenetskih mehanizmov, kot so metilacija DNA, modifikacije histonov ali majhne nekodirajoče RNA, lahko kemični motilci endokrinega sistema povzročajo spremembe v izražanju genov (19). Kemični motilci endokrinega sistema se lahko prav tako vpletajo v sintezo hormonov, vplivajo na njihov transport, metabolizem in izločanje (15). Encimi, ki so njihove pogoste tarče, so aromataza, 5-α-reduktaza ter 3- in 11-hidroksisteroid-dehidrogenaza (20). Delujejo lahko v zelo nizkih koncentracijah in pogosto imajo pleiotropne učinke (21, 22).

## 4 SPOJINE Z DELOVANJEM V ESTROGENSKEM SISTEMU

Estrogeni so ženski spolni hormoni, ki se v največji meri sintetizirajo v jajčnikih. Med endogene estrogene sodijo estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) in estetrol (E4). Estradiol je najpomembnejši naravni estrogen z največjo jakostjo delovanja, estetrol pa je naravni estrogen, ki nastaja le v jetrih ploda. Estrogeni svoje učinke izkazujejo preko vezave na dve izobliki jedrnega receptorja: ER $\alpha$  in ER $\beta$ . Izoblika ER $\alpha$  je prisotna predvsem v mlečnih žlezah, maternici, jajčnikih, kosteh, modih, prostatni, jetrih in maščobnem tkivu. ER $\beta$  pa se nahaja predvsem v prostati, mehurju, jajčnikih, debelem črevesju, maščobnem tkivu in celicah imunskega sistema. Oba receptorja imata pomembno vlogo pri razvoju in delovanju jajčnikov ter zaščiti srčno-žilnega sistema. ER $\alpha$  ima pomembnejšo vlogo pri razvoju in delovanju mlečnih žlez in maternice, pri uravnavanju presnove ter pri remodelaciji kosti. ER $\beta$  ima močnejši učinek na centralni živčni sistem in imunski sistem ter nasprotuje proliferativnim učinkom ER $\alpha$  v tkivih dojke in maternice (25).

Kemični motilci endokrinega sistema na različne načine motijo delovanje estrogenskega sistema. Vezava spojine

na ER povzroči prepisovanje tarčnih genov, spojine pa se lahko vežejo tudi na membranske ali citoplazemske receptorje in stimulirajo signalne proteine ter tako povzročijo hiter odziv (26). Spojine, ki delujejo na estrogenski sistem, najdemo v pesticidih (DDT), kozmetiki (določeni parabeni, npr. benzilparaben, propilparaben, butilparaben), plastiki (bisfenoli, di-n-butil ftalat, butilbenzil ftalat) in številnih drugih proizvodih za vsakdanjo rabo ter med zdravilnimi učinkovinami (diklofenak) (preglednica 1).

Endogeni estrogeni imajo ključno vlogo pri spolni differenciaciji in razvoju možganov, dojek, prostate ter drugih tkiv in organov. Kemični motilci endokrinega sistema lahko preko različnih mehanizmov motijo navedene procese. Najnevarnejša je izpostavitev v kritičnih obdobjih razvoja, ki je povezana tudi s povečanim tveganjem za bolezni kasneje v življenu. Motilci endokrinega sistema, ki so povezani s spremembami v differenciaciji in z razvojem celic, so genistein, medikarpin in resveratrol (estrogeno delovanje) ter androstenol in retinojska kislina (antiestrogeno delovanje) (26).

Endogeni estrogeni izkazujejo protivnetne in vazoprotektivne učinke z aktivacijo različnih signalnih poti, npr. preko dejavnika tumorske nekroze α (TNF-α), jedrnega faktorja kapa B (NF-κB) in c-Jun N-terminalne kinaze (JNK). Spojine, ki delujejo na estrogenski sistem, lahko povečajo vnetno reakcijo ali jo zmanjšajo (26).

Med spojine naravnega izvora sodijo fitoestrogeni, ki jih najdemo v številnih rastlinah, npr. v soji (daidzein, genistein), oreščkah, stročnicah ter jagodičevju. Poglavitven mehanizem delovanja fitoestrogenov je vezava na ER, večjo afiniteto izkazujejo do ER $\beta$ , vplivajo pa lahko tudi na steroidogenezo tako, da inhibirajo 7β- in 3β-hidroksisteroid-dehidrogenazo, aromatazo in 5α-reduktazo (27). Fitoestrogenom pripisujejo ugodne učinke pri osteoporosi, srčno-žilnih boleznih, raku dojek in menopavzalnih simptomih. Prisotni so v številnih prehranskih dopolnilih ter se globalno tržijo kot alternativa za hormonsko nadomestno terapijo. A vendar je potrebna pri njihovi uporabi previdnost, saj so to kljub vsemu motilci endokrinega sistema in imajo lahko tudi škodljive učinke na zdravje (28).

## 5 SPOJINE Z DELOVANJEM V ANDROGENEM SISTEMU

Androgeni (testosteron in aktivnejši presnovek dihidrotestosteron) so moški spolni hormoni, ki imajo androgene in

anabolne učinke. Med androgene učinke sodijo razvoj moških spolnih organov, razvoj sekundarnih spolnih znakov in vpliv na spermatogenezo, med anabolne učinke pa sodijo vpliv na organe, ki niso povezani z reprodukcijo, androgeni npr. vplivajo na eritropoezo, večajo mišično maso ter kostno gostoto.

Nekatere spojine izkazujejo zaviralne učinke v androgenem sistemu bodisi kot antagonisti AR bodisi in inhibicijo sinteze steroidov. Med antagoniste AR sodijo pesticidi (npr. DDT), fungicidi (npr. vinklozolin), sestavine plastike (npr. bisfenoli A, AF, F in S), zdravilne učinkovine (ketoprofen, dikklofenak) in mnogi drugi (29). V raziskavah *in vivo* so potrdili antiandrogeno delovanje dietilheksil ftalata in di-*n*-butil ftalata, ki zavirata 3 $\beta$ - in 17 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenazo 3 ter 17 $\alpha$ -hidroksilazo (CYP17A1), encime, vključene v sintezo spolnih hormonov, kar ima za posledico zmanjšano sintezo testosterona v Leydigovih celicah (24, 30). Določeni organotinski pesticidi, npr. trifeniltin, dibutiltin in tributyltin, zavirajo 5 $\alpha$ -reduktazo, encim, odgovoren za metabolizem testosterona do dihidrotestosterona (31). Glavni učinek, ki ga pripisujejo tem spojinam, je zmanjšana kakovost semenske tekočine ter posledično manjša plodnost, erektilna disfunkcija, manjši libido ter povečana pojavnost raka na testisih (24). Posebej nevarna je izpostavljenost v obdobju razvoja spolnih organov pri zarodku, saj so androgeni nujno potrebni za normalen razvoj spolnih organov in lahko njihovo pomanjkanje vodi do številnih nepravilnosti, npr. do hipospadije (32).

## 6 SPOJINE Z DELOVANJEM V TIROIDNEM SISTEMU

Tiroidni sistem vpliva na številne procese v telesu, kot so celična diferenciacija, energijski metabolizem, termoregulacija, remodelacija kosti, srčna funkcija, razvoj možganov ter reprodukcija (33). Motilci tiroidnega sistema lahko delujejo na sintezo, skladiščenje in sproščanje tiroidnih hormonov iz ščitnice, vezavo hormonov na transportne proteine, privzem ščitničnih hormonov v celice, metabolizem ščitničnih hormonov ali pa so agonisti oz. antagonisti na TR (34).

Med spojine, ki se vpletajo v delovanje tiroidnega sistema, sodijo poliklorirani bifenili, bromirani zavirci gorenja, BPA, ftalati ter polifluorirane površinsko aktivne snovi. Perklorati, tiocianati, fluoroborati in nitrati lahko vplivajo na encime in transporterje, ključne pri sintezi tiroidnih hormonov. Tran-

sport ščitničnih hormonov v plazmi poteka s tiroksin vezavnim globulinom in transtiretinom. Poliklorirani bifenili in njihovi hidroksilirani presnovki se vežejo na transportne proteine s celo večjo afiniteto kot tiroksin, kar vodi do spremenjenih koncentracij ščitničnih hormonov v plazmi. Spojine, ki vplivajo na metabolizem ščitničnih hormonov, so obstojna organska onesnažila (vpliv na deiodinazno aktivnost), polihalogenirani aromatski ogljikovodiki (vpliv na sulfatiranje) ter poliklorirani bifenili in bromirani zavirci gorenja (vpliv na glukuronidacijo) (33).

Motnje v ravnavesju ščitničnih hormonov lahko vodijo do sprememb v rasti, duševnih in presnovnih motenj ter do poškodb možganov (35). Motilce tiroidnega sistema so detektirali v amnijski tekočini in popkovnični krvi. Lahko prehajajo do ploda, kar lahko vodi do neželenih učinkov predvsem pri razvoju živčevja (34). Tiroidni hormoni so ključni pri razvoju možganov pri plodu in v zgodnjem otroštvu. V mnogih epidemioloških raziskavah so pokazali povezavo med izpostavljenostjo motilcem tiroidnega sistema in motnjami v razvoju možganov, pojavom avtizma in nižjim intlegenčnim kvocientom (36, 37).

## 7 SPOJINE Z DELOVANJEM V GLUKOKORTIKOIDNEM SISTEMU

Glukokortikoidi so steroidni hormoni, ki se sproščajo iz skorje nadledvične žleze. Glavni predstavnik je kortisol. Sproščanje glukokortikoidov je natančno nadzorovano preko osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza. Razpoložljivost glukokortikoidov v tkivih regulirata nivo kortikosteroide vezavnega globulina v serumu ter nivo lokalno izražene 11 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaze (38). Neravnavesje v serumskih koncentracijah glukokortikoidov lahko vodi do številnih bolezni, npr. do Cushingove ali Addisonove bolezni.

Spojine, ki modulirajo delovanje glukokortikoidnega sistema, so povezane z razvojem debelosti, sladkorne bolezni, osteoporoze in avtoimunskih bolezni. Eden izmed bolj raziskanih mehanizmov delovanja motilcev v glukokortikoidnem sistemu je inhibicija encima 11 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaze (11 $\beta$ HSD), odgovorne za vzdrževanje ravnotežja med aktivnimi (kortisol) in neaktivnimi (kortizon) glukokortikoidi (39). Zaviranje 11 $\beta$ HSD2 vodi do povečane serumske koncentracije glukokortikoidov ter do aterogeneze. Zaviranje 11 $\beta$ HSD v testisih vodi do zmanjšane koncentracije testosterona. 11 $\beta$ HSD v pla-



Preglednica 1: Izbrani kemični motilci endokrinskega sistema v estrogenskem, androgenem, tiroidnem in glukokortikoidnem sistemu.

Table 1: Selected EDCs in estrogen, androgen, thyroid and glucocorticoid systems.

Endokrini sistem	Najpomembnejši endogeni ligand	Motilci endokrinskega sistema	Reference
Estrogenksi	 estradiol	bisfenoli A, AF, F, S	(7, 40, 41)
		elagna kislina in urolitini A, B, D	(42)
		flavonoidi (genistein, daidzein, apigenin, naringenin, formononetin, kumestrol)	(43)
		učinkovine (paracetamol, acetilsalicilna kislina, fenofibrat, gemfibrozil, fluoksetin, ibuprofen)	(26)
		pesticidi (tributilin, glifosat, atrazin, metoksiklor ...)	(26)
		poliklorirani bifenili (PCB 104, 118, 126, 155)	(26)
		polibromiran difenil eter (BDE-47)	(26)
Androgeni	 testosteron	ftalati (dietetilheksil ftalat, dibutil ftalat, dietil ftalat)	(44, 45)
		učinkovine (paracetamol, diklofenak, 4-hidroksidiklofenak, ibuprofen, indometacin, acetilsalicilna kislina)	(10, 46-49)
		pesticidi (vinklozolin, prokloraz, procimidon)	(45)
		bisfenol A	(50)
		zaviralci gorenja(2-ethylheksil tetrabromobenzoat, bis(2-ethylheksil)tetrabromoftalat)	(51)
Tiroidni	 trijodтиронин	bisfenol A	(52, 53)
		polibromiran difenil eter (BDE-47)	(54)
		nonifenol etoksilat, 4-n-nonenol	(55)
		kadmij	(56)
		ftalati (monoetil ftalat, mono(2-ethylheksil) ftalat)	(57)
		poliklorirani bifenili: agonisti TRβ (PCB153, 101, 52, 110, 180, 44), antagonisti TRβ (PCB99, 118, 126, 128, 138, 153, 163, 180, 187, 194 in 199)	(58)
		pesticidi (alaklor, klorpirifos, endosulfan, lindan, DDT)	(59)
Glukokortikoidni	 kortizol	pesticidi (bifentrin, λ-cihalotrin, cipermetrin, resmetrin, DDT, DDT, metoksiklor, tolifluanid)	(60)
		učinkovine (paracetamol, diklofenak, 4-hidroksidiklofenak)	(46)
		kadmij	(61)
		bisfenol A, bisfenol F, tetrabromobisfenol A	(62)

## 8 KEMIČNI MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA V MEDICINI

### 8.1 ENDOKRINO DELOVANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Pri številnih zdravilnih učinkovinah, ki niso namenjene terapevtskemu delovanju v endokrinem sistemu, so v raziskavah dokazali njihovo endokrino delovanje. Isidori in so-delavci so z uporabo testov *in vitro* na kvasovkah ter testa proliferacije na celični liniji MCF-7 ugotovili estrogenško aktivnost fibratov (bezafibrat, fenofibrat, gemfibrozil), furosemida in paracetamola (63). Antidepresiv fluoksetin je deloval estrogenško tako v uterotropnem testu *in vivo*, kot v testu *in vitro* s poročevalskim genom na celični liniji MCF-7 (64). Nesteroidni vnetni učinkovini diklofenak in ibuprofen ter antiaritmik amiodaron pa so vsi antagonisti ER (65). Vrednost IC<sub>50</sub> diklofenaka, določena s testom *in vitro* na kvasovkah, je bila 9,45 µM, kar je v območju dejanskih koncentracij, ki jih dosežemo po zaužitju 50 mg diklofenaka (65). Metformin, široko predpisovana antidiabetična učinkovina je značilno povečal izražanje vitelogenina (biološki označevalec izpostavljenosti okoljskim estrogenom) pri ribjih samcih (*Pimephales promelas*) (66). V nedavni raziskavi so z uporabo testov *in vitro* s poročevalskim genom potrdili endokrino aktivnost diklofenaka, njegovega metabolita 4-hidroksidiklofenaka in paracetamola (46). Diklofenak in 4-hidroksidiklofenak sta antagonist AR, TR in GR, paracetamol pa je agonist GR (46). Ketoprofen je prav tako antagonist AR, z vrednostjo IC<sub>50</sub> 6,67 µM, določeno s testom *in vitro* na kvasovkah (65). Analgetiki paracetamol, acetilsalicilna kislina in indometacin so v območju terapevtskih koncentracij povzročili merljive spremembe v testisih, kot so značilno zmanjšano nastajanje testosterona in inzulinu podobnega faktorja 3 (10). V raziskavi, izvedeni leta 2017, pa so pokazali, da lahko ibuprofen zmanjša nastajanje testosterona in inzulinu podobnega faktorja 3 v fetalnih testisih. Izpostavljenost terapevtskim odmerkom ibuprofena med osmim in desetim gestacijskim tednom

lahko vpliva na razvoj Sertolijevih, Leydigovih in zarodnih celic in posledično na funkcijo testisov (47).

### 8.2 ENDOKRINO DELOVANJE NEKATERIH SESTAVIN MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV IN DRUGEGA MEDICINSKEGA MATERIALA

Polimerni materiali (plastika, zlasti polivinilklorid) so sestavni del medicinskih pripomočkov. BPA dodajamo kot aditiv plasti, ki je sestavni del katetrov ter hemodializatorjev. Ftalate pogosto uporabljamo kot mehčalce plastike in so sestavine cevk različnih aparativov, infuzijskih vrečk in rokavic za enkratno uporabo. Medicinske pripomočke, ki vsebujejo BPA, so dokazali kot možne vire izpostavljenosti BPA pri različnih bolnikih. Primer so dializni bolniki, pri katerih lahko BPA prehaja iz dializatorja, ki vsebuje polikarbonatne kartuše, prisoten pa je lahko tudi v vodi, namenjeni za dializo (67). Najvišjo sistemsko izpostavljenost dializnih bolnikov BPA so ocenili na 140 ng na kg telesne mase dnevno (67). Bolniki na intenzivni enoti so prav tako izpostavljeni povišanim koncentracijam BPA in ftalatov, predvsem DEHP (68). Pooperativni pacienti na hemofiltraciji so imeli od 100- do 1000-krat višje koncentracije DEHP kot splošna populacija (68).

## 9 ZAKLJUČKI

Učinki spojin na endokrini sistem so lahko želeni (terapevtski) ali neželeni (škodljivi za ljudi, živali in okolje). Kemični motilci endokrinskega sistema imajo neželene učinke in kljub številnim dosedanjim raziskavam še vedno predstavljajo tako raziskovalni kot regulatorni izliv. Glede endokrinskih motilcev je še veliko negotovosti, npr. prag učinka, učinki pri majhnih odmerkih, različni mehanizmi delovanja ter hormetični odnos (bifazni odnos, v obliki črke U ali obrnjene črke U) med odmerkom in učinkom. Poleg tega je njihove učinke težko celovito ovrednotiti, saj smo ljudje vsakodnevno izpostavljeni kompleksnim mešanicam spojin, ki delujejo v endokrinem sistemu. Posebej je nevarno, če smo motilcem endokrinskega sistema izpostavljeni v kritičnih obdobjih razvoja (razvijajoči se plod, otroštvo in puberteta), saj imajo lahko v teh obdobjih že majhne spremembe v ravni hormonov hude posledice v kasnejših življenjskih obdobjih.

# 10 LITERATURA

1. Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci.* 2011;120:93-108.
2. Epstein L. Fifty years since Silent Spring. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:377-402.
3. Kwiatkowski CF, Bolden AL, Liroff RA, Rochester JR, Vandenberg JG. Twenty-five years of endocrine disruption science: Remembering Theo Colborn. *Environ Health Perspect.* 2016;124:151-4.
4. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva: World Health Organisation; 2002. p. 1-180.
5. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2010;118(8):1055-70.
6. Asimakopoulos AG, Thomaidis NS, Kannan K. Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece. *Sci Total Environ.* 2014;470-471:1243-9.
7. Gramec Skledar D, Peterlin Mašić L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;47:182-99.
8. Gramec Skledar D, Tomašić T, Carino A, Distrutti E, Fiorucci S, Peterlin Mašić L. New brominated flame retardants and their metabolites as activators of the pregnane X receptor. *Toxicol Lett.* 2016;259:116-23.
9. Golden R, Gandy J, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit Rev Toxicol.* 2005;35(5):435-58.
10. Albert O, Desdouits-Lethimonier C, Lesn   L, Legrand A, Guill   F, Bensalah K, et al. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis *in vitro*. *Hum Reprod.* 2013;28(7):1890-8.
11. Larrosa M, Gonz  lez-Sarr  as A, Garc  a-Conesa MT, Tom  s-Barber  n FA, Esp  n JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1611-20.
12. Nordean SK, Bona BJ, Jones DN, Lambert JR, Jackson TA. Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercetin. *Horm Cancer.* 2013;4(5):293-300.
13. Lakind JS, Naiman DQ. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2011;21(3):272-9.
14. Fromme H, Gruber L, Schlummer M, Wolz G, B  hmer S, Angerer J, et al. Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environ Int.* 2007;33(8):1012-20.
15. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40(1):241-58.
16. Oliveira E, Barata C, Pi  a B. Endocrine disruption in the omics era: New views, new hazards, new approaches. *2016;10:20-35.*
17. Mnif W, Hassine Al, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(6):2265-303.
18. Annamalai J, Namasivayam V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ Int.* 2015;76:78-97.
19. Rosenfeld CS, Cooke PS. Endocrine disruption through membrane estrogen receptors and novel pathways leading to rapid toxicological and epigenetic effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;187:106-17.
20. Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barcel   D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res.* 2016;151:251-64.
21. Accocia F, Pallottini V, Marino M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose Response.* 2015;13(4):1559325815610582.
22. Usman A, Ahmad M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere.* 2016;158:131-42.
23. Sharma RP, Schuhmacher M, Kumar V. Review on crosstalk and common mechanisms of endocrine disruptors: Scaffolding to improve PBPK/PD model of EDC mixture. *Environ Int.* 2017;99:1-14.
24. Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017;51:56-70.
25. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014;90:13-29.
26. Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int.* 2015;83:11-40.
27. Sirotnik AV, Harrath AH. Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:230-6.
28. Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(4):400-19.
29. Sidorkiewicz I, Zar  ba K, Wo  czy  ski S, Czerniecki J. Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system. *Toxicol Ind Health.* 2017;33(7):601-9.
30. Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules.* 2011;16(12):9983-10001.
31. Lo S, King I, All  ra A, Klingm  ller D. Effects of various pesticides on human 5alpha-reductase activity in prostate and LNCaP cells. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(3):502-8.
32. Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction.* 2004;127(3):305-15.
33. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Main KM. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;355(2):240-8.
34. Gutleb AC, Cambier S, Serchi T. Impact of Endocrine disruptors on the thyroid hormone system. *Horm Res Paediatr.* 2016;86(4):271-8.
35. Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H, Abdollahi M. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci.* 2016;145:265-73.
36. Mughal BB, Fini JB, Demeneix BA. Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update. *Endocr Connect.* 2018;7(4):R160-R86.
37. Ghassabian A, Trasande L. Disruption in Thyroid Signaling Pathway: A mechanism for the effect of endocrine-disrupting chemicals on child neurodevelopment. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:204.



38. Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):518-30.
39. Vitku J, Starka L, Bicikova M, Hill M, Heracek J, Sosvorova L, et al. Endocrine disruptors and other inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2: Tissue-specific consequences of enzyme inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;155(Pt B):207-16.
40. Skledar DG, Schmidt J, Fic A, Klopčić I, Trontelj J, Dolenc MS, et al. Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere.* 2016;157:152-9.
41. Skledar DG, Carrino A, Trontelj J, Troberg J, Distrutti E, Marchianò S, et al. Endocrine activities and adipogenic effects of bisphenol AF and its main metabolite. *Chemosphere.* 2019;215:870-80.
42. Gramec Skledar D, Tomašič T, Sollner Dolenc M, Peterlin Mašič L, Zega A. Evaluation of endocrine activities of ellagic acid and urolithins using reporter gene assays. *Chemosphere.* 2018;220:706-13.
43. Onoda A, Ueno T, Uchiyama S, Hayashi S, Kato K, Wake N. Effects of S-equol and natural S-equol supplement (SE5-OH) on the growth of MCF-7 in vitro and as tumors implanted into ovariectomized athymic mice. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2279-84.
44. Bissegger S, Pineda Castro MA, Yargeau V, Langlois VS. Phthalates modulate steroid 5-reductase transcripts in the Western clawed frog embryo. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2018;213:39-46.
45. Albert O, Jégou B. A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. *Hum Reprod Update.* 2014;20(2):231-49.
46. Klopčić I, Marković T, Mlinarić-Raščan I, Sollner Dolenc M. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. *Toxicol Lett.* 2018;294:95-104.
47. Ben Maamar M, Lesné L, Hennig K, Desdoits-Lethimonier C, Kilcoyne KR, Coiffec I, et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci Rep.* 2017;7:44184.
48. Mazaud-Guittot S, Nicolas Nicolaz C, Desdoits-Lethimonier C, Coiffec I, Ben Maamar M, Balaguer P, et al. Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):E1757-67.
49. Kristensen DM, Mazaud-Guittot S, Gaudriault P, Lesné L, Serrano T, Main KM, et al. Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(7):381-93.
50. Fic A, Zegura B, Gramec D, Mašič LP. Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere.* 2014;112:362-9.
51. Klopčić I, Skledar DG, Mašič LP, Dolenc MS. Comparison of in vitro hormone activities of novel flame retardants TBB, TBPH and their metabolites TBBA and TBMEPH using reporter gene assays. *Chemosphere.* 2016;160:244-51.
52. Zhou Z, Zhang J, Jiang F, Xie Y, Zhang X, Jiang L. Higher urinary bisphenol A concentration and excessive iodine intake are associated with nodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *Biosci Rep.* 2017;37(4).
53. Calsolaro V, Pasqualetti G, Niccolai F, Caraccio N, Monzani F. Thyroid disrupting chemicals. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).
54. Cowell W, Sjodin A, Jones RL, Wang Y, Wang S, Whyatt R, et al. Pre and postnatal polybrominated diphenyl ether concentrations in relation to thyroid parameters measured during early childhood. *Thyroid.* 2019. doi: 10.1089/thy.2018.0417
55. Ji X, Li N, Yuan S, Zhou X, Ding F, Rao K, et al. A comparison of endocrine disruption potential of nonylphenol ethoxylate, vanillin ethoxylate, 4-n-nonylphenol and vanillin in vitro. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;175:208-14.
56. Buha A, Matovic V, Antonijevic B, Bulat Z, Curcic M, Renieri EA, et al. overview of cadmium thyroid disrupting effects and mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
57. Gao H, Wu W, Xu Y, Jin Z, Bao H, Zhu P, et al. Effects of Prenatal phthalate exposure on thyroid hormone concentrations beginning at the embryonic stage. *Sci Rep.* 2017;7(1):13106.
58. Bai X, Yan L, Ji C, Zhang Q, Dong X, Chen A, et al. A combination of ternary classification models and reporter gene assays for the comprehensive thyroid hormone disruption profiles of 209 polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* 2018;210:312-9.
59. Duntas LH. Chemical contamination and the thyroid. *Endocrine.* 2015;48(1):53-64.
60. Zhang J, Liu R, Gan J, Liu J, Liu W. Endocrine-disrupting effects of pesticides through interference with human glucocorticoid receptor. *Environ Sci Technol.* 2016;50(1):435-43.
61. Liu XH, Xie BW, Wang ZJ, Jin L, Zhang YG. The secretion, synthesis, and metabolism of cortisol and its downstream genes in the H-P-I axis of rare minnows (*Gobiocypris rarus*) are disrupted by acute waterborne cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2016;185-186:112-21.
62. Roelofs MJ, van den Berg M, Bovee TF, Piersma AH, van Duursen MB. Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology.* 2015;329:10-20.
63. Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, Parrella A. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environ Int.* 2009;35(5):826-9.
64. Müller JC, Imazaki PH, Boareto AC, Lourenço EL, Golin M, Vechi MF, et al. In vivo and in vitro estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine. *Reprod Toxicol.* 2012;34(1):80-5.
65. Ezechiaš M, Janochová J, Filipová A, Křesinová Z, Cajthaml T. Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere.* 2016;152:284-91.
66. Niemuth NJ, Jordan R, Crago J, Blanksma C, Johnson R, Klapet RD. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ Toxicol Chem.* 2015;34(2):291-6.
67. Bache A, Thevenot S, Grignon C, Belmouaz M, Bauwens M, Teychene B, et al. Determination of bisphenol A in water and the medical devices used in hemodialysis treatment. *Int J Pharm.* 2016;505(1-2):115-21.
68. Huyg J, Clotman K, Malarvannan G, Covaci A, Schepens T, Verbrugghe W, et al. Considerable exposure to the endocrine disrupting chemicals phthalates and bisphenol-A in intensive care unit (ICU) patients. *Environment International.* 2015;81:64-72.

# IZOPROSTANI IN NEVROPROSTANI KOT BIOLOŠKI OZNAČEVALCI OKSIDATIVNEGA STRESA

## ISOPROSTANES AND NEUROPROSTANES AS BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS

AVTOR / AUTHOR:

Tjaša Plesničar, dipl. biol. (UN)

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

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: janez.mravljak@ffa.uni-lj.si

### 1 UVOD

Oksidativni stres je stanje v celici ali tkivu, ki nastane zaradi neravnovesja med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih (1). Vzrok temu je povečana tvorba reaktivnih kisikovih oz. dušikovih spojin ali zmanjšano nastajanje NAD(P)H in s tem obnavljanje mreže antioksidantov (2). Pri oksidativnem

### POVZETEK

Oksidativni stres je stanje, ki nastane zaradi neravnovesja med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih. Reaktivni radikalji so prooksidanti, ki reagirajo s celičnimi komponentami (jih oksidirajo) ter na njih povzročajo oksidativne poškodbe. Glavna tarča so večkrat nenasicene maščobne kisline v lipidih, iz katerih v nizu radikalnih reakcij nastanejo spojine, ki jih s skupnim izrazom imenujemo izoprostanoidi. Različne serije izoprostanov izvirajo iz arahidonske kisline fosfolipidnih molekul, serije nevroprostanov pa iz dokozahexaenojske kisline, ki je večinoma v fosfolipidih sive možganovine. Izoprostani in nevroprostani so biološki označevalci oksidativnega stresa pri različnih boleznih, kot so bolezni centralnega živčnega sistema, rak, ishemija-reperfuzija, genetske nepravilnosti, preeklampsija itd. Izoprostanoidi niso le produkti oksidacije lipidov, ampak so tudi biološko aktivne spojine.

### KLJUČNE BESEDE:

biološki označevalci, izoprostani, nevroprostani, oksidativni stres

### ABSTRACT

Oxidative stress is a state, when in favour of prooxidants, prooxidants and antioxidants become imbalanced. That happens when free radicals oxidize and destroy cell components. The main critical components being oxidized are lipids, from which isoprostanoids are released. Different series of isoprostanes are generated by free radical-induced peroxidation of arachidonic acid and series of nevroprostanes from docosahexaenoic acid located mainly in brain grey matter. Isoprostanes and nevroprostanes are considered biomarkers of oxidative stress in various diseases, such as central nervous system diseases, cancer, ischemia-reperfusion, genetic disorders, pre-clampsy, etc. That being said, isoprostanoids are not only produced by radical attacks, they are also biologically active compounds.

### KEY WORDS:

biomarkers, isoprostanes, nevroprostanes, oxidative stress

stresu se poveča obseg spontanih oksidacij, ki lahko prizadenejo različne celične komponente, tj. DNA, proteine

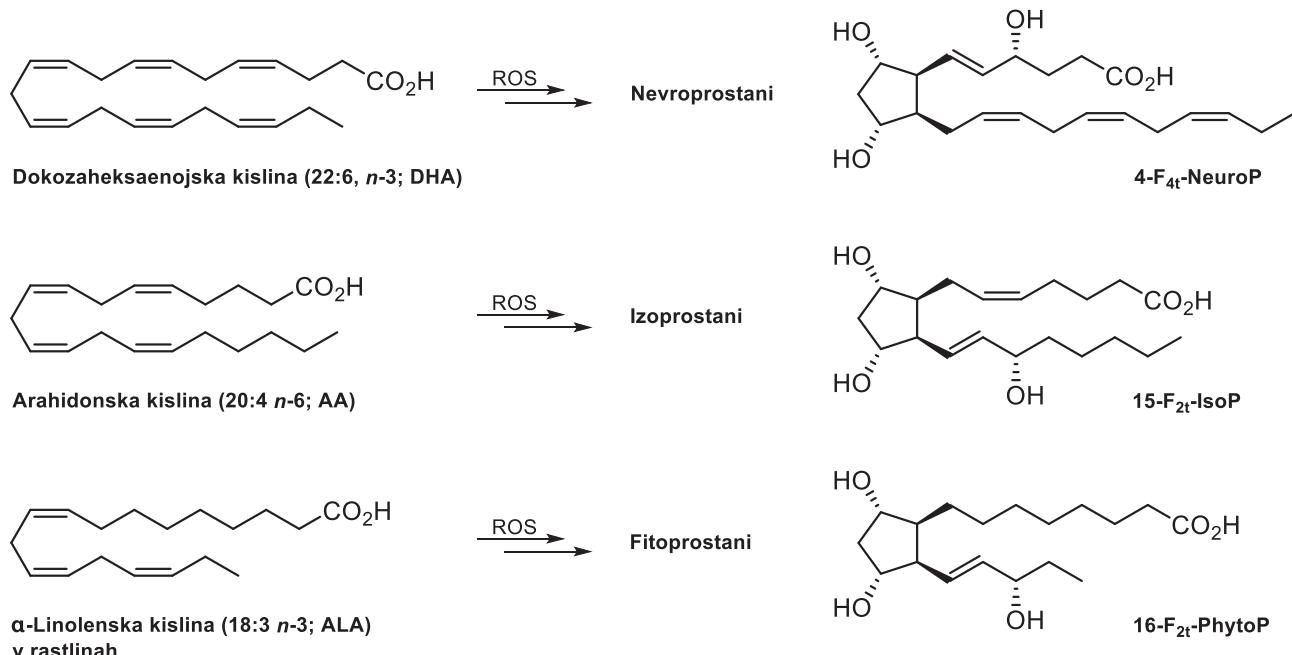


in lipide (2, 3). Pri slednjih so nestabilne zlasti večkrat nenasicene maščobne kisline (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*). Najbolj dovezne skupine za reakcije z radikali v PUFA so metilenske skupine med dvojnimi vezmi (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). Oksidacije lipidov vodijo v nastanek številnih produktov. Med temi so tudi spojine, imenovane izoprostanoidi, ki so jih odkrili v devetdesetih letih prejšnjega stoletja (3). Vse od takrat pa zaradi njihove specifičnosti in občutljivosti veljajo kot dobro orodje za merjenje oksidativnega stresa ter lipidne peroksidacije (4).

Izoprostanoidi so strukturno podobni prostaglandinom s to razliko, da slednji nastajajo le pri encimsko kataliziranih reakcijah s pomočjo cikloksigenaz, izoprostanoidi pa v nizu nenadzorovanih radikalnih reakcij. Nekateri predstavniki so biološko aktivne spojine (2, 5). Ena izmed skupin izoprostanoidov, izoprostani (IsoP), nastajajo večinoma z neencimsko oksidacijo arahidonske kisline ( $\omega$ -5-maščobna kislina) z radikali, delno pa z encimsko oksidacijo s cikloksigenazo pri vnetjih (3, 6, 7). Iz  $\alpha$ -linolenske kisline ( $\omega$ -3-maščobna kislina) se z lipidno peroksidacijo tvorijo fitoprostani (prisotni v rastlinah), iz eikozapentaenojske kisline ( $\omega$ -3-maščobna kislina) F<sub>3</sub>-izoprostani ter iz dokozahexaenojske kisline ( $\omega$ -3maščobna kislina) F<sub>4</sub>-izoprostani ali nevroprostani (NeuroP) (3) (slika 1).

## 2 BIOSINTEZA

Oksidacija PUFA, kot je arahidonska kislina (AA), vključuje več korakov nastanka različnih produktov. Spojina vključuje reaktivno metilensko (-CH<sub>2</sub>) skupino med dvema dvojnima vezema, na kateri poteče oksidacija (5). Kot je prikazano na sliki 2, se proces začne z reakcijo sprožilnega radikala z AA, pri čemer pride do odtegnitve vodikovega atoma iz -CH<sub>2</sub>- skupine med dvema dvojnima vezema (**A**). Iz na ogljiku osredotočenega radikala (C-radikala) ob prisotnosti kisika nastane najprej peroksilni radikal (**B**) in po prenestitvi dvojne vezi ter intramolekularni adiciji endoperoksidni C-radikal (**C**). Sledi ciklizacija (adicija C-radikala na bližnjo dvojno vez), pri kateri nastane ciklopentanski obroč (2, 5). Pri nastajanju IsoP pride pri tvorbi ciklopentanskega obroča do *cis* orientacije alkilnih verig, za kar je treba premagati nižjo aktivacijsko energijo med dvojno 5-ekso-trig ciklizacijo kot pri nastajanju *trans* orientiranih prostaglandinov, za nastanek katerih je nujna prisotnost encimov. Pri ciklizaciji ponovno nastane C-radikal, s katerim reagira kisik. Nastali peroksilni radikal odtegne vodikov atom sosednjemu lipidu



Slika 1: Večkrat nenasicene maščobne kisline s primeri izoprostanoidov. ROS – reaktivne kisikove zvrsti.  
Figure 1: Polyunsaturated fatty acids with examples of isoprostanoids. ROS – reactive oxygen species.

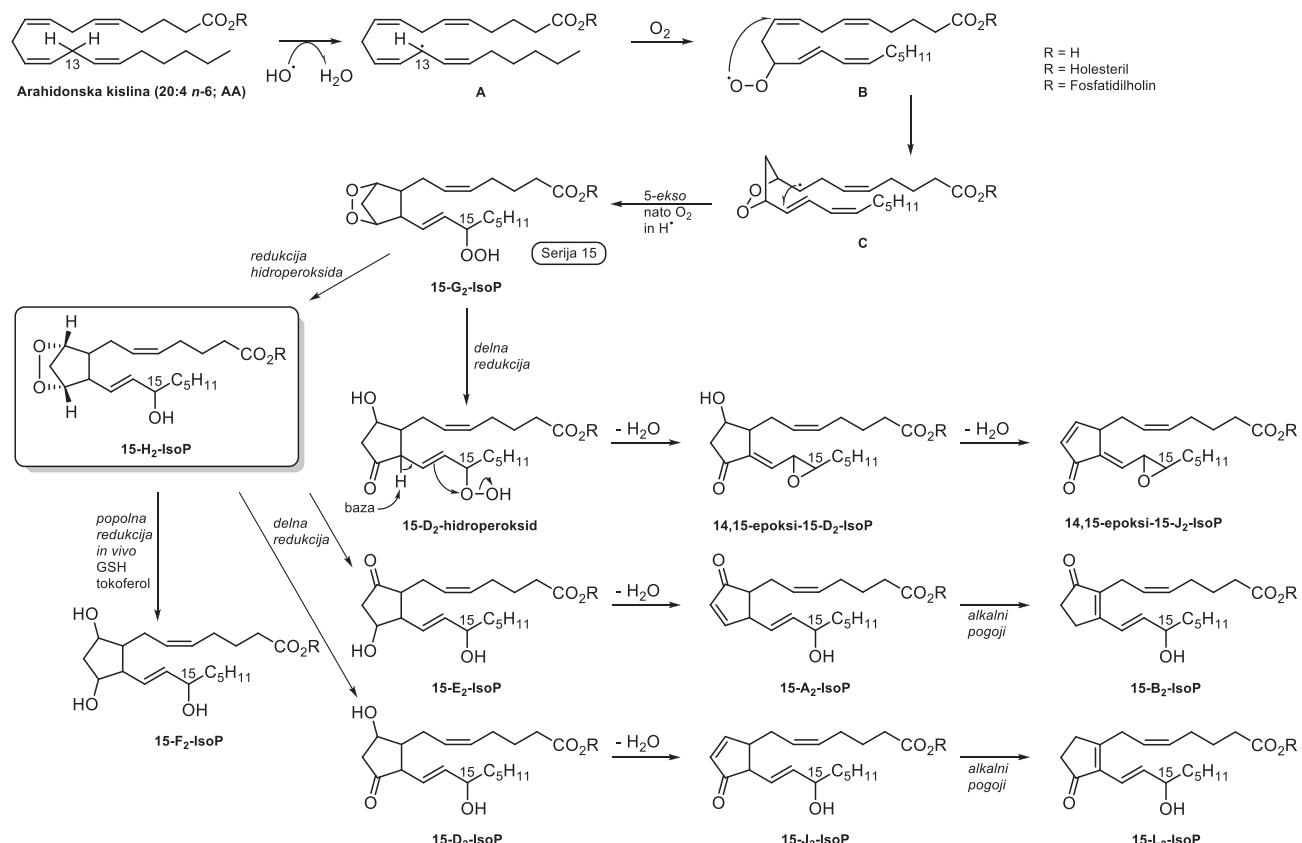


ali antioksidantu ter nastane G<sub>2</sub>-IsoP (3). Hidroperoksidna skupina se najprej reducira v H<sub>2</sub>-IsoP, nato pa lahko glede na redukcijske pogoje (odvisno od količine glutationa in a-tokoferola v celicah) nastanejo različne družine IsoP. Tako s popolno redukcijo endoperoksida nastaja F-tip IsoP (ciklopentanski obroč z dvema alkoholnima funkcionalnima skupinama), pri delni redukciji pa nastajata D- in E-IsoP (ciklopentanski obroč s hidroksi-ketonom). Zaradi njune nestabilnosti v fizioloških razmerah z luhkoto pride do odcepa vode na hidroksil-ketonskih skupinah ter nastanka A- in J-tipa IsoP (5). Ta ciklopentenonska IsoP reagirata kot elektrofilna s tiolnimi skupinami proteinov ter s tem prispevata k svoji citotoksičnosti oz. nevrotoksičnosti in s tem tudi k patogenezi oksidativne nevrodgeneracije (2, 8). S premetitvijo IsoP endoperoksidov luhko nastajajo γ-ketoaldehidi (npr. izoketali, izolevuglandini), ki so zelo reaktivni in luhko poškodujejo neurone (8).

Serija IsoP metabolitov so tudi epoksi-izoprostanji. G<sub>2</sub>-IsoP intermedijat se reducira v hidroksi-D<sub>2</sub>-IsoP, ki se zaradi ki-

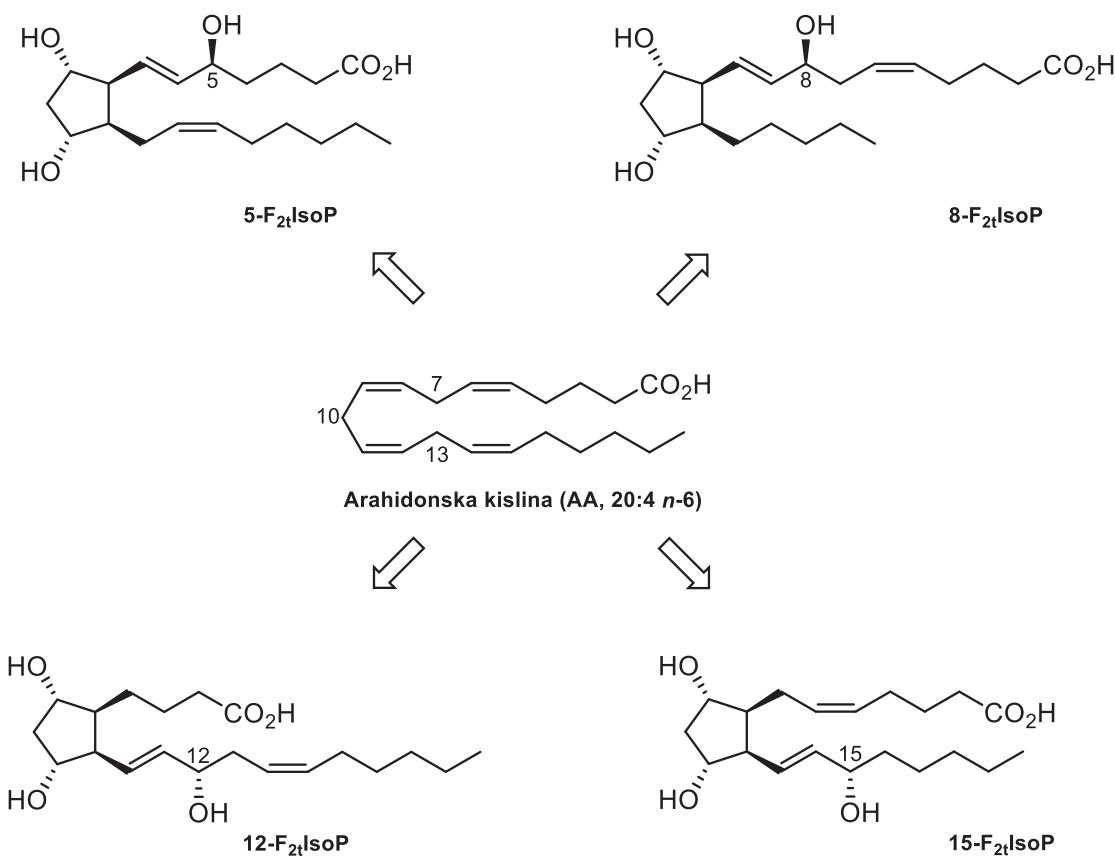
slosti α-keto vodikovega atoma in hidroperoksidne skupine pretvori v epoksi-D<sub>2</sub>-IsoP. Ta spontano dehidrira v epoksi-J<sub>2</sub>-IsoP. Pokazali so, da epoksi-IsoP delujejo protivnetno. Najdemo jih luhko pri aterosklerotičnih lezijah z zmerno oksidiranimi lipoproteini z nizko gostoto (oLDL) (5). Poleg zgoraj naštetih izoprostanov obstajata tudi B- in L-tip, ki pri bazičnih pogojih nastaneta z izomerizacijo dvojnih vezi tipov A- in J-IsoP (5).

Radikal luhko iz AA in ostalih PUFA odtegne vodikov atom iz več metilenskih skupin med dvema dvojnima vezema. Pri AA luhko pride do odtegnitve vodika na mestih C-7, C-10 ter C-13 (9). Tako nastane več serij IsoP, in sicer serije 5, 8, 12 ter 15, glede na mesto hidroperoksidne oz. hidroksilne skupine v verigi (2) (slika 3). Najpogostejeji seriji *in vivo* sta 5 in 15 (4). Če upoštevamo še prostorsko usmerjenost skupin, je možnih 64 izomernih F<sub>2</sub>-IsoP (2). Metaboliti, ki tudi nastanejo iz AA, so izofurani – spojine s furanskim obročem. Povišana koncentracija kisika favorizira njihov nastanek (9).



Slika 2: Biosinteza izoprostanov serije 15 iz arahidonske kisline.

Figure 2: Isoprostane biosynthesis of 15-series from arachidonic acid.



Slika 3: Glavni izomeri  $F_2$ -IsoP, ki nastanejo iz arahidonske kisline.

Figure 3: The main  $F_2$ -IsoP isomers derived from arachidonic acid.

Lipidna peroksidacija lahko poteče na različnih PUFA, ne samo na AA, ki je glavna  $\omega$ -6-PUFA v celičnih membranah pri človeku. Iz dokozaheksanojske kislne (DHA, 22:6 n-3), ki je v sivi možganovini in retini, nastajajo nevroprostani (NeuroP) ter nevrfurani (9). Izoblikuje se lahko 8 serij NeuroP (serije 4, 7, 10, 11, 13, 14, 17 in 20), med katerimi sta najpogosteje serijs 4 in 20. Poteče lahko tudi oksidacija eikozapentanojske kislne (EPA, 20:5 n-3). EPA in DHA večinoma vnašamo v telo z morsko hrano, npr. ribami in algami (5). Iz adrenske ali samo *cis*-7,10,13,16-dokozatetraenojske kislne (22:4 n-6), prisotne v beli možganovini (v mielinu) in retini, nastajajo tako imenovani dihomo-izoprostani (9). Iz  $\alpha$ -linolenske kislne (18:3 n-3), ki je glavna  $\omega$ -3-PUFA v listih rastlin, pa nastajajo fitoprostani (5). Ti so za človeka pomembni predvsem zaradi njihovega vpliva na zdravje preko rastlinske prehrane in vdihovanja cvetnega prahu (5, 9). V raziskavah so poročali o spreminjanju imunske odzivnosti, protivnetnem delovanju ter varovanju nediferenciranih

živčnih celic in spodbujanju diferenciacije oligodendroцитov delno preko aktivacije prepisovalnega dejavnika PPAR $\gamma$  (5, 10). Pod vplivom fitoprostanov so spodbudili tudi apoptozo Jurkat T-celic (5).

## 3 BIOLOŠKA AKTIVNOST

Izoprostani niso samo biološki označevalci lipidne peroksidacije, ampak tudi mediatorji oksidativne poškodbe (3). So vazokonstriktorji, spreminjajo aktivnost trombocitov, povzročajo adhezijo monocitov in sprožajo proliferacijo endotelnih in gladkih mišičnih celic. Izoprostani imajo biološki vpliv zaradi aktivacije ali inhibicije več prostanoidnih receptorjev (3, 11). Biološka aktivnost nevroprostanan pa je slabo proučena (11).

# **4 IZOPROSTANI IN NEVROPROSTANI KOT BIOLOŠKI OZNAČEVALCI**

Lipidna peroksidacija je znak oksidativnega stresa, ki je pogosto biološko stanje pri različnih vrstah bolezni, kot so nevrološke, srčno-žilne bolezni, sladkorna bolezen ter ledvične okvare (5).

## **4.1 ANALIZA**

Odkrili so kar nekaj bioloških označevalcev lipidne peroksidacije, vendar pa je njihova učinkovitost slaba zaradi njihove reaktivnosti, metabolizma ter nezanesljive metode kvantifikacije (6).  $F_2$ -IsoP so v bioloških tekočinah ob pravilni hrambi relativno stabilni ter se pojavljo povsod v telesu. Lahko jih določamo v urinu, krvi, cerebrospinalni tekočini, kondenzatu izdihanega zraka, amnijski tekočini in slini (8, 11).

Za merjenje  $F_2$ -IsoP spojin uporabljamo tri tehnik:

- plinska kromatografija – masna spektrometrija (GC-MS),
- tekočinska kromatografija – masna spektrometrija (LC-MS),
- encimska imunoadsorpcijska preiskava (ELISA) (11).

GC-MS s kemično ionizacijo z zajetjem elektronov in zaznavo negativnih ionov (ECNI) predstavlja zlati standard za merjenje  $F_2$ -IsoP zaradi zelo dobrih selektivnosti in občutljivosti (5). Treba je poudariti, da sta masna spektrometrija in ELISA šibko skladni (3). Rezultati imunoloških testov so lahko napačni zaradi struktturnih podobnosti med  $F_2$ -IsoP in prostaglandini ter drugimi sorodnimi molekulami. Tudi pri zbiranju in shranjevanju plazme je potrebna previdnost, saj se lahko te molekule tvorijo z ex vivo oksidacijo arahidonske kisline v plazmi (11). V plazmi ali urinu merimo dvig  $F_2$ -IsoP, predvsem 5- $F_{2t}$ -IsoP ter 15- $F_{2t}$ -IsoP, kar kaže na prisotnost oksidativne poškodbe celic (5). Pri ljudeh so z LC-MS/MS v plazmi za 15(RS)-15- $F_{2t}$ -IsoP določili koncentracije 40–170 pg/mL (4). Pri določanju v urinu se moramo zavedati, da zaradi metabolizma v jetrih prihaja tudi do presnove molekule  $F_2$ -IsoP v različne metabolite (11). Glavna urinska metabolita 15- $F_{2t}$ -IsoP sta 2,3-dinor-5,6-dihidro-15- $F_{2t}$ -IsoP in 2,3-dinor-15- $F_{2t}$ -IsoP (4, 11). Pri ljudeh so z LC-MS/MS v urinu za 15(RS)-15- $F_{2t}$ -IsoP določili koncentracije 30–303 ng/g kreatinina (4).

## **4.2 DIAGNOSTIKA**

V eni izmed metaanaliz so s primerjavami meritev  $F_2$ -izo- prostanov kot označevalcev oksidativnega stresa pokazali

obsežna povečanja oksidativnega stresa pri boleznih ledvic, npr. kronični odpovedi ledvic, obstruktivni spalni apneji in preeklampsiji, kot tudi boleznih respiratornega trakta, kot je cistična fibroza. Zanimivo je to, da so imela v raziskavi stanja, za katera so mislili, da povzročajo velik oksidativni stres, tj. kajenje tobaka in srčno-žilne bolezni, le blago povišanje tega biološkega označevalca. Majhna povečanja so odkrili tudi pri hipertenziji, metabolnem sindromu in astmi (7).

$F_2$ -IsoP ali njihovi metaboliti niso najprimernejši biološki označevalci za vse bolezni, povezane z oksidativnim stresom, vendar pa velja, da je povišanje 15- $F_{2t}$ -IsoP v srčno-žilnih boleznih bolj zanesljivo kot pri nevroloških motnjah (5).

### **4.2.1 Ishemija-reperfuzija**

Ishemija-reperfuzija je eden glavnih patoloških pojavov pri ortopedskih operacijah. Po prevezi uda in ponovni vzpostaviti krvnega pretoka pride do oksidativnih poškodb tkiva, ki sprožijo lokalni ali sistemski vnetni odziv (3). Ishemija-reperfuzija se pojavlja tudi po drugih kirurških posegih, kot sta operacija aortokoronarnih obvodov in transplantacija organov. Številne raziskave so pokazale povišanje vrednosti  $F_2$ -IsoP v času operacije aortokoronarnih obvodov ali operacije srčno-pljučnega obvoda, kar kaže na povečan oksidativni stres. Ta pa prispeva k pooperativnim zapletom (npr. akutni okvari ledvic) (11). Odkrili so, da je prišlo do povišanja vrednosti  $F_2$ -IsoP tudi pri bolnikih s kronično ishemijo spodnjega uda, po ishemični možganski kapi in po pretrganju anevrizme (11).

Da bi znižali oksidativni stres med operacijama aortokoronarnih obvodov in srčno-pljučnega obvoda, so izvedli prve raziskave v smeri zdravljenja. Poskusili so z acetilsalicilno kislino ter paracetamolom. Pojavila se je tudi ideja, da bi uporabili takšna anestezijska sredstva, ki imajo antioksidativno aktivnost (11).

### **4.2.2 Centralni živčni sistem**

Možgani so na oksidativne poškodbe najbolj občutljivi zaradi velike porabe kisika, nizkih koncentracij antioksidativnih encimov (katalaze in glutation-peroksidaze), višjih koncentracij železa (močan katalizator za tvorbo reaktivnih kisikovih zvrst) in sposobnosti oksidacije različnih substratov (npr. membranske PUFA, ki predstavlja velik delež lipidov v možganskem tkivu, predvsem DHA). Peroksidacija membranskih lipidov ruši nevronsko homeostazo (8, 9).

Povišano tvorbo  $F_2$ -IsoP so našli v številnih možganskih tkivih in telesnih tekočinah pri številnih nevrodegenerativnih



boleznih, kot so Alzheimerjeva, Parkinsonova, Huntingtonova bolezen ter Creutzfeldt Jakobova bolezen, multipla skleroza in amiotrofična lateralna skleroza. Merjenje  $F_2$ -IsoP v plazmi in urinu ni specifično za določen organ, zato je v tem primeru bolje uporabiti cerebrospinalno tekočino, ki bolje odraža spremembe oksidativnega stresa v možganih (8, 11). Koncentracija  $F_2$ -IsoP se v cerebrospinalni tekočini povišuje tudi s starostjo ter s poškodbo možganov (11).

Pri oksidativnih poškodbah možganskih tkiv se specifično uporablja  $F_4$ -NeuroP, ki se v primerjavi s  $F_2$ -IsoP kaže kot bolj primeren biološki označevalci za nevrodegenerativne in možganske poškodbe (vključno z Rettovim sindromom in ishemično možgansko kapjo) (5).

#### 4.2.3 Tveganje za nastanek raka

Narejenih je bilo nekaj raziskav, ki povezujejo  $F_2$ -IsoP in tveganje za nastanek raka. Višje vrednosti  $F_2$ -IsoP so v raziskavah primerov s kontrolami povezali s tveganjem za nastanek raka, in sicer raka dojke, hepatocelularnega karcinoma, prostate, želodca in kolorektalnega adenoma. Vendar so se nekatere raziskave, ki so bile narejene na primerih s kontrolami, razlikovale od tistih, narejenih prospektivno (npr. raziskava o raku želodca). Možna razloga za takšno neskladje je najverjetneje to, da ni jasno, ali je oksidativni stres vzrok ali posledica raka (11).

V obsežni prospektivni raziskavi so v urinu raziskovali dvig koncentracije  $F_2$ -IsoP in njegovega metabolita 2,3-dinor-5,6-dihidro-15- $F_{2\text{t}}$ -IsoP kot biološka označevalca tveganja za nastanek raka dojek. Odkrili so, da so vrednosti teh dveh označevalcev povezane tudi z indeksom telesne mase (ITM). Vrednosti  $F_2$ -IsoP in 2,3-dinor-5,6-dihidro-15- $F_{2\text{t}}$ -IsoP so bile povezane z zmanjšanim tveganjem za nastanek raka dojke med ženskami z  $\text{ITM} < 25$ , z  $\text{ITM} \geq 25$  pa sta bila označevalca povezana s povečanim tveganjem za nastanek te bolezni. Raziskava s tem kaže, da imajo ženske z visokim ITM povečano tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti in s tem povečano tveganje za nastanek raka dojke (11, 12). Da je vloga oksidativnega stresa pri razvoju raka dojke odvisna od debelosti, ne preseneča, saj je maščobno tkivo vir reaktivnih intermediatov, ki nastajajo v procesu lipidne peroksidacije in vplivajo na celo telo.

Nasprotno pri ženskah z normalnim ITM lahko osnovne ravni reaktivnih kisikovih zvrsti v fizioloških razmerah sprožijo aktivacijo p53, neposredno sodelujejo v apoptozi in povzročijo staranje. Poleg tega  $F_2$ -IsoP povečuje z glukozo inducirano sintezo TGF-β1 tumorskega supresorja v začetni fazni. Določeni dejavniki (fizična aktivnost, normalna nose-

čnost, preeklampsija), ki varujejo pred rakom dojek, tudi povišujejo vrednosti  $F_2$ -IsoP. Iz tega lahko sklepamo na kompleksno vlogo  $F_2$ -IsoP pri patofiziologiji raka (11, 12).

#### 4.2.4. Preeklampsija

Preeklampsija je kompleksna nosečnostna bolezen neznane etiologije, ki prizadene tako otroka kot mater. Oksidativni stres pa morda prispeva k patogenezi tega sindroma. Pri razvoju ploda sta potrebna tako AA kot DHA, ki se lahko oksidirata s pomočjo radikalov v  $F_2$ -IsoP in izofuran ter v  $F_4$ -NeuroP (13).

Leta 1996 so pri preeklampsiji s proteinurijo odkrili v plazmi povišane vrednosti  $F_2$ -IsoP. V novejših raziskavah pa so pokazali, da so pri nosečnicah s preeklampsijo v krvi povišane vrednosti  $F_4$ -NeuroP in izofuranov, ne pa  $F_2$ -IsoP v primerjavi z nosečnicami brez preeklampsije. Vrednosti  $F_4$ -NeuroP v popkovnični krvi so bile povišane tudi pri novo-rojenčkih žensk s preeklampsijo. Ker vrednosti  $F_4$ -NeuroP iz materine krvi niso bistveno korelirale z vrednostmi  $F_4$ -NeuroP iz popkovnične krvi v nosečnosti s preeklampsijo in brez nje, so pokazali na izvor  $F_4$ -IsoP, ki je neodvisen od materine plazme. Pri normalni nosečnosti pa so ugotovili, da je porodna teža novorojencev negativno povezana z materinimi  $F_2$ -IsoP, izofuran in  $F_4$ -NeuroP. Obratna povezava med materinim  $F_2$ -IsoP, izofuran in  $F_4$ -NeuroP in porodno težo bi lahko bila pomemben napovedovalec nizke porodne teže in normalne nosečnosti (9, 13).

#### 4.2.5 Genetske nepravilnosti

Oksidativni stres je vključen v patofiziologijo številnih človeških genetskih nepravilnosti. Vrednosti  $F_2$ -IsoP so povišane pri ljudeh z motnjami avtističnega spektra, Smith-Lemli-Opitzovim sindromom, anemijo srpastih celic, cistično fibrozo in različnimi prirojenimi napakami metabolizma. Vrednosti  $F_2$ -IsoP so povišane v plodovnici nosečnic s plodom z Downovim sindromom (11).

IsoP in oksidativni stres so dobro proučili pri osebah z Rettovim sindromom. Gre za motnjo avtističnega spektra, ki se v 95 % razvije zaradi mutacije v X vezanem genu za MECP2 (3, 9). V zgodnjih fazah bolezni so odkrili povišane vrednosti  $F_2$ -IsoP,  $F_4$ -NeuroP in  $F_2$ -dihomo-izoprostanov, ki se nato znižajo (9). Do nedavnega so mislili, da se prevladujoča okvara centralnega živčnega sistema pojavi v sivi možganovini, vendar ravno povečana tvorba  $F_2$ -dihomo-izoprostanov nakazuje soobstoj zgodnje poškodbe bele možganovine. Na podlagi slikanja možganov z magnetno resonanco so postavili hipotezo, da lahko poškodba bele



možganovine predstavlja zgodnji dogodek pri Rettovem sindromu, s tem pa bi F<sub>2</sub>-dihomo-izoprostani lahko predstavljali zgodnje označevalce te bolezni. Tudi F<sub>4</sub>-NeuroP je pomemben biološki označevalec sindroma. Plazemski F<sub>4</sub>-NeuroP so povezani z resnostjo nevroloških simptomov, tipom mutacije in klinično sliko (3). Odkrili so, da olje morskih rib lahko zmanjša oksidativni stres pri bolnikih z Rettovim sindromom, kar je vodilo v dodatne klinične raziskave, pri katerih je dodajanje EPA in DHA pri zgodnjih stopnjah bolezni vodilo v delno klinično remisijo te bolezni (9).

## 5 SKLEP

Izoprostani in nevroprostani so znanilci oksidativnega stresa. Pojavlajo se pri različnih boleznih, kot so ishemija-reperfuzija, bolezni centralnega živčevja, preeklampsija, rak itd. Povišanje ravni izoprostanov kaže na povečano tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki oksidirajo arahidoniko kislino fosfolipidov v celičnih membranah. F<sub>2</sub>-IsoP nastaja po dveh biokemičnih poteh, in sicer neencimsko z radikali in deloma pod vplivom ciklooksiгеназ pri vnetjih, na kar moramo biti pozorni pri določanju. Izoprostani so sicer dobro specifični označevalci lipidne peroksidacije, a zelo nespecifični pri določanju njenega izvora. Nevroprostani nastajajo z oksidacijo dokozaheksanojske kislino fosfolipidov, ki je v veliki meri v sivi možganovini. Ti biološki označevalci so veliko bolj specifični za določanje nevredgenerativnih in možganskih poškodb, vendar pa so slabše raziskani kot izoprostani.

## 6 LITERATURA

1. Sies H. *Oxidative stress: introductory remarks*. London: Academic Press; 1985. p. 1-8.
2. Pečar S, Mravljak J. Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2015. p. 77-100, 199-241.
3. Galano JM, Mas E, Barden A, Mori AT, Signorini C, De Felice C, et al. Isoprostanes and neuroprostanes: Total synthesis, biological activity and biomarkers of oxidative stress in humans. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2013 Dec; 107: 95-102.
4. Vigor C, Bertrand-Michel J, Pinot E, Oger C, Vercauteren J, Le Faouder P, et al. Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: Assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chromatography B*. 2014 Aug; 964: 65-78.
5. Galano JM, Lee YY, Oger C, Vigor C, Vercauteren J, Durand T, et al. Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25 years of research in chemistry and biology. *Progress in Lipid Research*. 2017 Oct; 68: 83-108.
6. Milne LG. Classifying oxidative stress by F2-Isoprostane levels in human disease: The re-imagining of a biomarker. *Redox Biology*. 2017 Aug; 12: 897-898.
7. van't Erve TJ, Kadlitska MB, London JS, Mason RP. Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human diseases: A meta-analysis. *Redox Biology*. 2017 Aug; 12: 582-599.
8. Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. Isoprostanes and Neuroprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; 2014: 572491.
9. Bultel-Poncé V, Durand T, Guy A, Oger C, Galano JM. Non enzymatic metabolites of polyunsaturated fatty acids: friend or foe. Oilseeds and fats, *Crops and Lipids*. 2016 Jan-Feb; 23(1): D118.
10. Medina S, Gil-Izquierdo A, Durand T, Ferreres F, Dominguez-Perles R. Structural/Functional Matches and Divergences of Phytoprostanes and Phytofuranes with Bioactive Human Oxylipins. *Antioxidants [Internet]*. 2018 Nov [cited 2018 Nov 22]; 7(11). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/7/11/165> DOI: 10.3390/antiox7110165
11. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes—25 years later. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015 Apr; 1851(4): 433-445.
12. Dai Q, Gao YT, Shu XO, Yang G, Milne G, Cai Q, et al. Oxidative Stress, Obesity, and Breast Cancer Risk: Results From the Shanghai Women's Health Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 May; 27(15): 2482-2488.
13. Barden AE, Corcoran TB, Mas E, Durand T, Galano JM, Roberts LJ 2nd, et al. Is There a Role for Isofurans and Neuroprostanes in Pre-Eclampsia and Normal Pregnancy? *Antioxidants & Redox signalling*. 2012 Jan, 16(2): 165-169.

# CHAGASOVA BOLEZEN IN UČINKOVINE ZA NJENO ZDRAVLJENJE

## CHAGAS DISEASE AND DRUG SUBSTANCES FOR ITS TREATMENT

AVTOR / AUTHOR:

Nina Vokič, mag. farm.<sup>1</sup>

Doc. dr. Gregor Gomišček, univ. dipl. fiz.<sup>2</sup>

Prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Inštitut za biofiziko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta,  
Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: marija.sollner@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

*Trypanosoma cruzi* je predstavnik skupine bičkarjev, te pa širše uvrščamo med praživali, najmanjše in njenostavnejše enocelične evkariotske mikroorganizme. *T. cruzi* je eno-

### POVZETEK

Chagasova bolezen, ki jo povzroča protozojski parazit *Trypanosoma cruzi*, predstavlja veliko breme javnega zdravja v Latinski Ameriki in potencialno grožnjo državam po vsem svetu. Okužba, ki se na človeka prenese najpogosteje preko okužene stenice, se v najhujši, kronični obliki izrazi kot kardiomiopatija z motnjami srčnega ritma in pojavom srčne odpovedi, nekateri okuženi pa razvijejo prebavne, nevrološke ali kombinirane spremembe, ki prav tako zahtevajo ustrezno zdravljenje. Kljub dejству, da so bolezen prvič odkrili že pred več kot sto leti, sta danes za njeno zdravljenje na voljo le dve registrirani zdravili – benznidazol in nifurtimoks, pri čemer velja benznidazol za zdravilo prve izbiro. Ta učinkovina je nitroimidazolni antiparazitik, ki poleg tega, da pri zdravljenju ne daje zadovoljivih rezultatov, izkazuje tudi številne neželene učinke. Zdravljenje Chagasove bolezni torej predstavlja velik terapevtski izziv, ki so se ga z namenom odkritja učinkovitejših zdravil lotili tako z iskanjem novih tarč kot tudi z raznimi modifikacijami že registriranih učinkovin. Raziskave so trenutno osredotočene na tri ciljne tarče – CYP51, kruzipain in DNA parazita, kar poleg opisa Chagasove bolezni, njene razširjenosti in trenutnega načina zdravljenja predstavljamo v tem članku.

### KLJUČNE BESEDE:

Chagasova bolezen, tripanocidne učinkovine, *Trypanosoma cruzi*

### ABSTRACT

Chagas disease, caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite, represents a major burden for public health in Latin America and a potential threat to other countries around the world. The infection is transmitted to a person via an infected triatomine bug and it is in the worst, chronic form often manifested as cardiomyopathy with heart rhythm disorders and cardiac failure, some infected people develop gastrointestinal, neurological or combined changes, which also require appropriate treatment. Despite the fact that disease was first discovered more than a century ago, only two registered drugs – benznidazole and nifurtimox – are available for its treatment today, where benznidazole is known as the first choice me-



dication. As nitroimidazole antiparasitic agent, benznidazole does not only give unsatisfactory results but also has numerous side effects. Thus, the treatment of Chagas disease is a major therapeutic challenge. With the aim of discovering more effective medicines, scientists have started searching for new targets as well as various modifications of the already registered substances. The research is currently focused on three targets – CYP51, cruzipain and the DNA of the parasite, which, in addition to the description of Chagas disease, its prevalence and current treatment, is presented in this article.

#### KEY WORDS:

Chagas disease, trypanocidal substances, *Trypanosoma cruzi*

celičar mikroskopske velikosti in se je sposoben samostojno prehranjevati in razmnoževati. Pri gibanju si pomaga z bičkom, ki je skoraj v celoti zrasel s celično membrano vzdolž parazita, tako da tvori ondulirajočo membrano (1-3). *T. cruzi* je endemični parazit na področju Srednje in Južne Amerike in povzroča Chagasovo bolezen, katere potek je nepredvidljiv in se lahko konča tudi s smrtno. Gre za endemično bolezen, pred desetletji omejeno le na revnejše predele Latinske Amerike, danes pa se je predvsem zaradi globalizacije in migracije njen epidemiološki profil precej spremeniil. Statistični podatki sicer kažejo, da število okuženih še vedno prevladuje v Braziliji in Argentini, vendar se je bolezen že razširila v Severno Ameriko, Avstralijo in Evropo, in število obolelih na teh področjih ni več zanemarljivo. To so pretežno kronični bolniki, ki pa predstavljajo tveganje za prenos okužbe preko transfuzije in presaditve organov. V neendemičnih državah predstavljajo največji delež okuženih predvsem migranti (4,5).

## 2 OPIS BOLEZNI

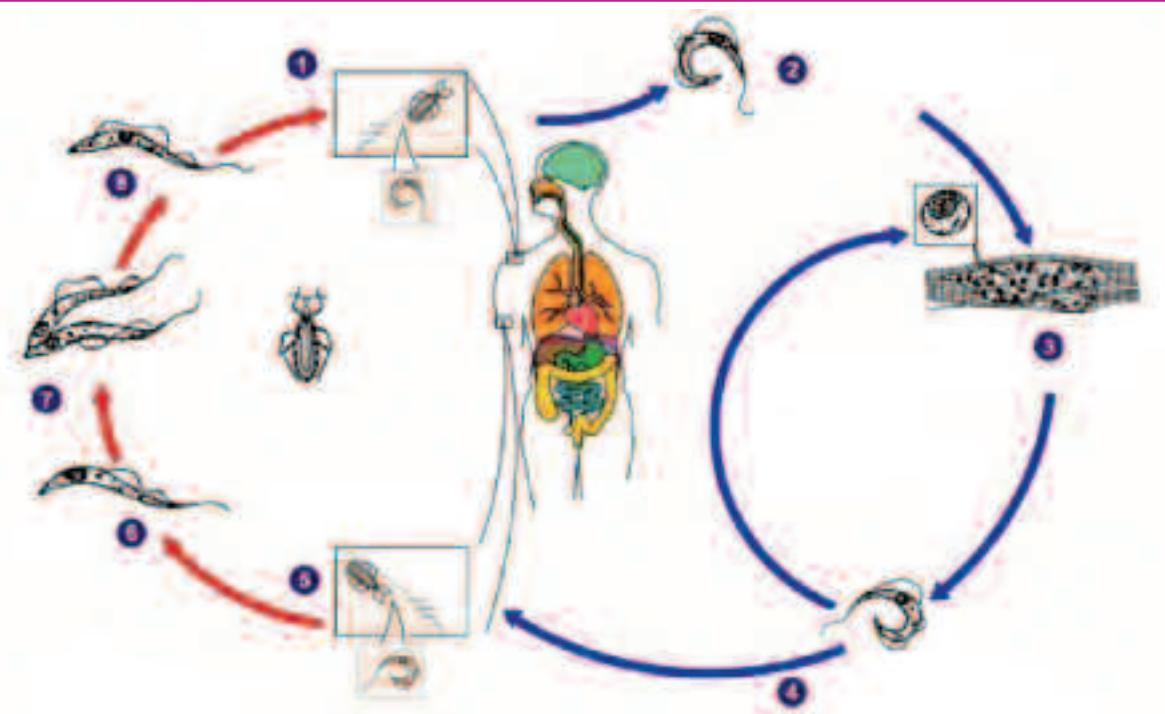
Chagasova bolezen se razvije po okužbi s *T. cruzi*. Ta znotrajcelični parazit se na človeka najpogosteje prenese preko stenic iz poddržine triatominskih žuželk. Stenice se prehranjejo s krvjo sesalcev. Če se med krvnim obrokom okužijo, lahko *T. cruzi* prenesejo na naslednjo žrtev. Za okužbo so dovetni številni sesalci, človek je le naključni

gostitelj (5-7). Okužba se v primeru človeka največkrat prenese z iztrebki in urinom okuženih stenic. Te namreč med hranjenjem na človeški koži odložijo izločke, te pa nato preko ranic na koži, ust, veznic ali oči vnesemo v telo. Okužba se lahko preko ugriza stenic, transfuzije okužene krvi in s presaditvijo okuženih organov prenaša tudi v nosečnosti na plod, z materinim mlekom in kontaminirano hrano (5-8).

Inkubacijska doba bolezni je 7 do 15 dni, po tem času se navadno razvijejo prvi vidni znaki okužbe. V zgodnjem akutnem stadiju so praviloma zelo blagi in vključujejo vročino, otečene bezgavke, glavobol, abdominalne bolečine in bolečine v mišicah. V hujših primerih lahko pride do povečanja jeter in vranice, miokarditisa in meningoencefalitisa. Bolj specifična znaka bolezni sta šagom, sinonim za rdečino na koži na mestu ugriza z otečenimi bezgavkami, in znak Romaña, ki se pokaže po 1-2 tednih po okužbi kot oteklina okoli očesa in vnetje očesne veznice. Akutna faza traja 2 do 4 mesece. V tej fazi ostane večina bolnikov asimptomatskih ali pa imajo izražene le blage simptome bolezni (6-9). Akutni fazi sledi latentna faza, za katero je značilna odsotnost kliničnih simptomov in organskih poškodb. Čeprav so v tem obdobju okuženi povsem brez težav, ostanejo prenašalci bolezni. Pri nekaterih posameznikih lahko latentna faza traja do konca življenja, v 20 do 30 % primerov pa se po nekaj desetletjih latence bolezen razvije v kronično (7-9). Do 30 % kroničnih bolnikov razvije kardiomiopatije z motnjami srčnega ritma, motnjami prevajanja električnega signala in druge srčne spremembe, vidne na EKG (7-10). 10 % jih razvije prebavne, nevrološke ali mešane spremembe, ki prav tako zahtevajo ustrezno zdravljenje. Poseten primer so bolniki z oslabljenim imunskim sistemom, pri katerih lahko pride do hudega poslabšanja bolezni. Po oceni WHO, ki Chagasovo bolezen uvršča med zapostavljene tropiske bolezni (NTD, *neglected tropical diseases*), je na svetu do 8 milijonov okuženih oseb. Od teh jih do 30 % trpi za posledicami kronične okužbe. Okužba s parazitem po ocenah vsako leto zahteva okrog 10.000 smrtnih žrtev. Ker se bolezen hitro širi po vsem svetu, gre po mnenju mnogih za pretečo nevarnost in breme ne le revnih, nerazvitetih držav, ampak tudi razvitega dela sveta (1,6,7,9).

### 2.1 RAZVOJNI KROG ZAJEDAVCA

Za *T. cruzi* je značilen zapleten življenjski krog, ki vključuje dva gostitelja (stenice ter sesalce) in več različnih razvojnih faz zajedavca (slika 1) (1,3,5). Stenica se med krvnim obrokom okuži s tripomastigoti, prisotnimi v krvi sesalskega gostitelja. Ti se naselijo v njen prebavni trakt, kjer se dife-



Slika 1: Življenski cikel zajedavca *T. cruzi* (prirejeno po 1).

1: Stenica, okužena s *T. cruzi*, ob krvnem obroku preko blata izloči metacaklične tripomastigote. 2: Tripomastigoti na mestu ugriza (ranice, mukozne membrane) krožijo v krvi in vstopajo v različne celice gostitelja. 3: Znotraj celic se preobrazijo v amastigote, ki se množijo v celicah in poškodovanih tkivih. 4: Intracelični amastigoti se spremeniijo v tripomastigote, izstopijo iz celic in se razširijo po krvnem obtoku. 5: Stenice se med krvnim obrokom okužijo s tripomastigotimi, prisotnimi v krvi sesalskega gostitelja. 6: Tripomastigoti se naselijo v prebavni trakt stenice in preobrazijo v epimastigote. 7: Epimastigoti se v prebavilih stenice razmnožujejo s postopkom binarne cepitve. 8: Epimastigoti se v zadnjem delu črevesja stenice pretvorijo v infektivne metacaklične tripomastigote.

Figure 1: *Trypanosoma cruzi* lifecycle (adapted from 1).

1: *T. cruzi* infected triatomine bug excretes metacyclic tryomastigotes at the site of the bite. 2: Tryomastigotes circulate in the blood at the bite site (wounds, mucous membranes) and enter different host cells. 3: Inside the cells, they are converted into amastigotes, which multiply in cells and damaged tissues. 4: Intracellular amastigotes turn into tryomastigotes, exit the cells and spread through the bloodstream. 5: The triatomine bug is infected with the tryomastigotes present in the blood of the mammalian host during a blood meal. 6: Tryomastigotes settle into the digestive tract of the triatomine bug and transform into epimastigotes. 7: Epimastigotes are reproduced in the gastrointestinal tract by binary cleavage. 8: Epimastigotes are transformed into the infective metacyclic tryomastigotes in the back of the intestine.

rencirajo v epimastigote. Epimastigoti so milimetrskih velikosti, vretenaste oblike in sposobni razmnoževanja s procesom binarne cepitve. Po 10 do 15 dneh se premaknejo v zadnji del črevesja stenice, kjer se pretvorijo v infektivne metacaklične tripomastigote in izločijo z blatom. Tripomastigoti so stopnja parazita milimetrskih velikosti z bičkom, ki pa se niso sposobni razmnoževati.

Da bi preživeli in tako nadaljevali svoj življenski krog, morajo vstopiti v gostitelja. Vstop v sesalske celice je zapleten proces, ki vključuje začetno vezavo parazita na površinske dele celice in nato aktivacijo molekule Tc-Tox, ki zajedavcu omogoča prekinitev vakuolne membrane, izhod iz vakuole in vstop v citoplazmo gostiteljske celice (1,4). V njej izgubijo

biček in se preobrazijo v amastigote, ki v okuženih celicah rastejo in se množijo. Z razmnoževanjem amastigotov nastanejo psevdociste, znotraj katerih se po petih dneh amastigoti diferencirajo nazaj v tripomastigote. Psevdociste se razširijo v različna tkiva, največ jih najdemo v srčni mišici, skeletnih mišicah in v gladkih mišicah črevesja. Po poku psevdociste pa se tripomastigoti sprostijo v krvni obtok in se razširijo po celotnem telesu. Sproščeni tripomastigoti so dveh oblik. Bolj aktivna oblika je potrebna za potek znotrajceličnega razvojnega kroga v gostitelju, manj aktivna oblika tripomastigotov pa okuži stenice, ko pičijo prenašalca. Tako je razvojni krog zajedavca sklenjen (1,4,9).

# 3 TRIPANOCIDNE UČINKOVINE ZA ZDRAVLJENJE CHAGASOVE BOLEZNI

Znanstveniki še vedno niso dokazali, katere stopnje v razvoju zajedavca so glavna tarča tripanocidnih učinkovin. Posamezne razvojne stopnje se razlikujejo v sestavi membrane, kar bi lahko bil eden izmed razlogov za različno učinkovitost zdravil [10]. V več raziskavah so dokazali, da tripanosomi poleg lastno sintetiziranega ergosterola za svoj obstoj obvezno potrebujejo tudi holesterol. Tega ne znajo sintetizirati sami, zato jih pridobjijo iz celic gostitelja s privzemom in kopičenjem delcev LDL v lizosomom podobnih organelih, imenovanih rezervosomi (11,12). Privzemanje eksogenega holesterola v celicah epimastigotov naj bi tej razvojni stopnji omogočilo preživetje v obdobjih lipidnega stradanja (12). Poznano raznolikost v membranski sestavi različnih razvojnih stopenj *T. cruzi* bi lahko v prihodnjih raziskavah bolje izkoristili za proučevanje interakcij med parazitom in tripanocidnimi učinkovinami. Tripanocidne učinkovine so antiparazitiki, ki svojo učinkovitost izkazujejo z delovanjem na različne tarče. Ker je *T. cruzi* parazit s kompleksnim življenskim ciklom in se je zmožen uspešno izogibati imunskemu sistemu gostitelja, je iskanje učinkovitih tarč dolgotrajno in zapleteno (13-15). Raziskave o novih terapijah oz. učinkovinah so se skoraj popolnoma ustavile proti koncu dvajsetega stoletja, delno zaradi neizvajanja vladnih zavezanosti o pomoči pri iskanju novih učinkovitih zdravil proti *T. cruzi* v večini latinskoameriških držav in delno zaradi slabe finančne spodbude v farmacevtski industriji (13,14). Za zdravljenje bolezni sta tako že dolgo na voljo le dve zdravilni učinkovini, nifurtimoks oz. *N*-(3-metil-1,1-diokso-4-tiomorfolinil)-1-(5-nitro-2-furil)metanimin (NF) ter benznidazol oz. *N*-benzil-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamid (BNZ) (slika 2). Tarča delovanja teh nitroheterocikličnih spojin je predvsem DNA, ki jo te spojine poškodujejo zaradi tvorbe radikalov (13,14).



Slika 2: Strukturni formuli tripanocidnih učinkovin benznidazola (1) in nifurtimoks (2).

Figure 2: Structural formulas of antitrypanosomal drugs benznidazole (1) and nifurtimox (2).

Raziskave so pokazale, da je njuna aktivnost večja v času akutne faze bolezni, pri kroničnem zdravljenju pa je njuna uporabnost omejena. Oba sta najbolj učinkovita pri mladih bolnikih v zgodnjih fazah okužbe. Stopnja ozdravljenja se približa 100 % pri kongenitalno okuženih novorojenčkih in v akutnih primerih preseže 60 %. Kontraindicirana sta v nosečnosti, pri napredovalem srčnem popuščanju in bolnikih z jetrnimi ali ledvičnimi zapleti.

## 3.1 NIFURTIMOKS

Nifurtimoks uporabljam za zdravljenje Chagasove bolezni že vse od leta 1965. WHO ga uvršča na seznam osnovnih učinkovin, ki so potrebne za zdravljenje, tako kot benznidazol, ki je pri zdravljenju Chagasove bolezni zdravilo prve izbire. Osnovni predlagani mehanizem delovanja nifurtimoksa temelji na njegovi pretvorbi s parazitovimi nitroreduktazami, pri čemer nastajajo radikalske zvrsti, ki so različne, če nastajajo v aerobnih ali anaerobnih pogojih. V odsotnosti kisika spontano nastaneta nitritni in imidazolni radikal, v kisikovi prisotnosti pa se z oksidacijo tvorijo superoksidni anion in druge reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Stopnja toksičnosti, ki jo povzročajo ti produkti, je odvisna od sposobnosti celic za njihovo detoksifikacijo (13,14). Pri sesalcih se lahko varno pretvorijo v manj reaktivne produkte, kar pomeni, da ima nifurtimoks zelo omejeno neposredno toksičnost za človeške celice. *T. cruzi* pa ima manjše sposobnosti za odstranjevanje nastalih radikalov in ROS, kar vodi do lipidne peroksidacije in poškodb celičnih membran, pa tudi do aktivacije znotrajceličnih encimov. Vsi ti procesi povzročijo smrt zajedavca (1,13,16,17). Za zdravljenje akutne in tudi kronične faze bolezni je dnevni odmerek za odrasle 8 do 10 mg/kg telesne mase, za otroke (do 16. leta) pa od 12,5 do 20 mg/kg telesne mase, kar kaže na boljšo toleranco učinkovine pri mlajši populaciji. Čas jemanja nifurtimoksa je od 90 do 120 dni (18,19). Želen je čim krajši čas jemanja zdravila, da se pacienti izognijo neželenim učinkom, ki jih je precej. Od pogostih kožnih izpuščajev do strupenosti za centralni živčni sistem, vključno z zmedenostjo, motnjami ravnovesja, ataksijo in nistagmusom, pozabljivostjo, nespečnostjo in razdražljivostjo. Razvijejo se lahko psihoze, epileptični napadi in tresenje. Poročajo tudi o eozinofiliji, levkopeniji, impotenci, šibkosti mišic in periferni nevropatiji. Še posebno moramo biti pozorni na gastrointestinalne učinke na začetku zdravljenja, ki se kažejo s slabostjo, bruhanjem, lahko tudi z anoreksijo, zato priporočajo, da se dnevni odmerek razdeli in se celotnega zaužije v štirih deljenih odmerkih. Nifurtimoks je kontraindiciran pri osebah s hudimi boleznimi jeter



ali ledvic in pri osebah z nevrološkimi in psihiatričnimi motnjami (18). Vrsta neželenih učinkov in dolg čas jemanja so tudi vzrok, da je benznidazol, ki ga predstavljamo v naslednjem podpoglavlju, zdravilo prve izbire pri zdravljenju Chagasove bolezni (19).

### 3.2 BENZNIDAZOL

Benznidazol je nitroimidazolni antiparazitik, ki je na podlagi dolgoletne uporabe in izkušenj zdravilo prve izbire za zdravljenje Chagasove bolezni (1,4-7). Njegov osnovni mehanizem delovanja prav tako kot pri nifurtimoksu temelji na tvorbi radikalnih zvrsti oz. nastajanju ROS in inhibiciji antioksidativnih sistemov *T. cruzi*. Selektivna toksičnost temelji na slabšem odstranjevanju teh reaktivnih spojin pri *T. cruzi* v primerjavi s človeškimi celicami (1,13,16,17). Sodeč po podatkih v literaturi naj bi benznidazol opisano toksično delovanje izkazoval na vse tri razvojne faze parazita (1,20), najbolj toksičen pa je za obliko tripomastigotov ( $IC_{50} = 12 \mu M$ ) (20-22). Največja učinkovitost benznidazola se kaže med akutno fazo bolezni, kjer je stopnja uspešnosti zdravljenja do 80 %, in v primeru prirojene Chagasove bolezni, kjer je njegova učinkovitost 90-odstotna (2,17)]. Nasprotno je ta odstotek pri dalj časa nezdravljenih in kronično obolelih manj kot 10 % (2). Čeprav se v poznih stadijih bolezni učinkovina ni obnesla, njen uporabo na podlagi kliničnih preizkušanj vseeno priporočajo, saj se je izkazalo, da kronični bolniki, izpostavljeni benznidazolu, dosežejo znatno zmanjšanje pojavljanja sprememb v EKG in manjšo pogostost poslabšanja njihovega kliničnega stanja. Benznidazol se je prav tako izkazal za učinkovitega pri zdravljenju reaktiviranih okužb, ki se pojavljajo pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistom, pri nosečnicah pa njegove uporabe zaradi potencialne teratogenosti ne priporočamo (8-10,23). Benznidazol uporabljamo peroralno, v dveh ali treh odmerkih dnevno in jemljemo 60 dni. Običajni dnevni odmerek za odrasle je 5 do 7 mg/kg telesne mase, odmerek za otroke pa znaša 10 mg/kg telesne mase (2-6,24). Po nekaterih podatkih pri kronično obolelih zadostuje 30-dnevno zdravljenje. Skrajšan režim se uvaja tudi zaradi številnih neželenih učinkov benznidazola (11,15,25). Najpogosteje se pojavijo preobčutljivost v obliki izpuščajev, vročina, glavobol (celo v 10 %), motnje prebave in spanja ter granulocitopenija. Zaradi teh pojavov zdravljenje v 10 do 30 % primerov prekinemo (4-6,24). Poleg toksičnih učinkov uporabo benznidazola omejuje tudi slaba biološka uporabnost, ki je posledica slabe vodotopnosti učinkovine. Z namenom izboljšanja njenih farmakokinetičnih lastnosti in s tem te-

rapevtske uporabnosti so razvili kar nekaj novih formulacij. Največkrat omenjeni sta mikroemulzija, ki se je izkazala za stabilnejšo in učinkovitejšo od nestabilnih suspenzije in emulzije, ter raztopina benznidazola, pripravljena iz vode in PEG 400, ki sta povečala vodotopnost učinkovine za 20-krat ter pomembno povečala njeno biološko uporabnost (26). Med najnovejše in najbolj obetavne raziskave formulacij prištevamo nove dostavne sisteme, ki omogočajo izboljšanje prehoda preko membrane, topnosti in učinkovitosti. Sem štejemo predvsem pripravo nanodelcev z metodo precipitacije in uporabo ciklodekstrinov (26,27).

### 3.3 TRIPANOCIDNE UČINKOVINE ZA ZDRAVLJENJE CHAGASOVE BOLEZNI V RAZVOJU

Zaradi omenjenih številnih pomanjkljivosti benznidazola so poskušali sintetizirati njegove analoge, ki bi ob večji varnosti izkazovali tudi večjo učinkovitost. Med novo sintetiziranimi spojinami namesto nitroimidazolnega največkrat zasledimo prisotnost oksadiazolnega ali triazolnega fragmenta v molekuli (28,29). Dejstvo, da benznidazol v svoji strukturi vsebuje nitroimidazolni fragment, je nakazalo tudi možno sintezo spojin s furoksanskim obročem, za katerega je že desetletja znano, da ima različne biološke aktivnosti. Za spojine z benzofuroksanskim jedrom namreč velja, da izkazujejo tako protimikrobe kot tudi antiparazitske učinke (30,31). Učinek na novo sintetizirane molekule s takim jedrom, 6-((metil)benzo[c](2-karbamoilhidrazon)-1-N-oksid-1,2,5-oksadiazola) (BZFS), kot potencialne tripanocidne učinkovine, so preverili eksperimentalno. Testi *in vitro* so pokazali, da ima spojina na epimastigote in tudi na amastigote določenih sevov *T. cruzi* večjo toksičnost kot benznidazol (32). Po drugi strani pa so testiranja *in vivo* na miših pokazala, da BZFS ni mutagen. Ti rezultati so pritegnili pozornost raziskovalcev in spodbujajo nadaljnje proučevanje omenjene spojine, prav tako pa tudi iskanje možnih mehanizmov delovanja podobnih tripanocidnih učinkovin z benzofuroksanskim ogrodjem (33). Bolj točnega in podrobnejšega mehanizma njihovega delovanja na tripanosomske celice še niso dokončno razjasnili, zato ostajajo osrednja tema številnih novih raziskav (13-15,32,33). Razširitev parazita na neendemična področja je v zadnjih letih povzročila zanimalje številnih znanstvenikov za raziskovanje živiljenjskega ciklusa *T. cruzi* in iskanje novih možnosti za zdravljenje Chagasove bolezni (13,16). Kljub prizadevanju je nabor na novo odkritih tarč in učinkovin, ki delujejo nanje in so terapevtsko sprejemljive, sorazmerno



majhen (preglednica 1). Raziskave so trenutno osredotočene na tri ciljne tarče: CYP51, kruzipain in DNA parazita (10,14,34).

CYP51 je encim, ki katalizira demetilacijo lanosterola in s tem ustvari pomemben prekurzor za nastanek ergosterola. Raziskave v zadnjih dveh desetletjih so pokazale, da *T. cruzi* kot večina gliv za preživetje in proliferacijo celic v vseh stopnjah svojega življenskega cikla zahteva specifične stbole, zlasti ergosterol (10-13). Ker ergosterol predstavlja osnovno sestavino membran gliv, se je porodila ideja o možni uporabi protiglivnih učinkovin za zdravljenje Chagasove bolezni (10,14,15). Ugotovili so, da ima večina klinično uporabljenih inhibitorjev sinteze ergosterola (npr. terbinafin, ketokonazol, itrakonazol) le zaviralne učinke pri obolelih s Chagasovo bolezni, ne morejo pa preprečiti napredovanja bolezni (35). Raziskave kažejo, da naj bi skupina protiglivnih triazolov, vključno s posakonazolom in vorikonazolom, obetaла boljše rezultate (14,35). Po teh spoznanjih je bilo na novo odkritih kar nekaj obetajočih azolnih derivatov s podobnimi lastnostmi. Ravukonazol v obliki predzdravila (E12-24) in TAK-187 izkazuje močno tripanocidno aktivnost, poleg tega sta pokazala spodbudne rezultate v obeh, akutni in kronični okužbi v mišijih gostiteljih. Zaenkrat sta obe učinkovini končali prvo fazo kliničnih testiranj in sta dobri kandidatki za uspešno zdravljenje Chagasove bolezni (10,14). Poleg klasičnih antimikotičnih učinkovin, ki zavirajo sintezo ergosterola, se v njegovo nastajanje vpletajo tudi nekatere druge učinkovine. Presenetljivo je bilo odkritje, da amiodaron, ki ga sicer uporabljamo kot antiaritmično

zdravilo pri bolnikih z napredovalo Chagasovo bolezni, izkazuje tripanocidno delovanje *in vitro* in *in vivo* (14,36). Njegova glavna mehanizma delovanja sta motnja homeostaze kalcijevih ionov in zaviranje sinteze ergosterola. To pojasnjuje sinergistične učinke s posakonazolom, sočasna uporaba teh dveh učinkovin naj bi namreč povečala učinkovitost protiparazitnega zdravljenja (14,15). Vse bolj je zanimiva tudi skupina učinkovin, ki inhibira glavno cisteinsko proteazo *T. cruzi*, imenovano kruzipain (33,37). Med temi spojinami najpogosteje navajajo K777, za katerega pa v literaturi srečamo različne podatke o njegovi varnosti za vstop v prvo fazo kliničnih testiranj, kar ne govori v prid njegovi možni uporabi in terapiji (14,37,38,39).

Poleg naštetih učinkovin so v razvoju tudi številne druge, o katerih pa je za zdaj malo podatkov o njihovi terapevtski uporabnosti (14,37). Vedno bolj pogosto pri novejših načinih zdravljenja Chagasove bolezni omenjajo še modifikacije že obstoječih učinkovin (benznidazola, nifurtimoksa) in njihove kombinacije (35,37,40).

Zaradi težav pri zdravljenju Chagasove bolezni je toliko bolj pomembno, da se ljudje ne okužijo s parazitem. Preprečevanje okužb je danes na splošno osredotočeno na zmanjšanje števila insektov, ki predstavljajo vektor za širjenje parazita, ter zmanjšanje njihovega stika z ljudmi. To sicer dosega z uporabo različnih oblik insekticidov, poskrbeti pa bi morali tudi za izboljšanje stanovanjskih in sanitarnih pogojev življenja ljudi, kar je naloga inštitucij, ki skrbijo za varovanje javnega zdravja v posameznih državah, kjer se parazit endemično pojavlja.

Preglednica 1: Potencialne nove učinkovine za zdravljenje Chagasove bolezni in njihove tarče (14,36-38).

Table 1: Potential new active ingredients for the treatment of Chagas disease and their targets (14,36-38).

UČINKOVINA	UPORABA	CILJ TERAPIJE	TARČA/MEHANIZEM DELOVANJA	FAZA KLINIČNEGA TESTIRANJA
Posakonazol	antimikotik	vse faze bolezni	CYP51	II
E12-24	ni še v uporabi	vse faze bolezni	CYP51	končana faza I, sledi faza II
TAK-187	ni še v uporabi	vse faze bolezni	CYP51	končana faza I
Amiodaron	srčna aritmija	kronična faza bolezni	homeostaza $\text{Ca}^{2+}$ in sinteza ergosterola	že terapevtsko uporabno zdravilo, vendar z drugo indikacijo
K777	ni še v uporabi	še neznani	kruzipain	v pripravi na fazo I?

## 4 ZAKLJUČEK

Čeprav je Chagasova bolezen izvorno endemična in je bila pred desetletji omejena le na revnejše predele Latinske Amerike, se je danes predvsem zaradi globalizacije in migracije njen epidemiološki profil precej spremenil. Bolezen, predvsem v kronični obliki, se je že razširila na območja Severne Amerike, Avstralije in v Evropo. Zaradi resnosti izidov predvsem kronične oblike te bolezni in majhnega števila učinkovin za njeno zdravljenje je raziskovanje novih tarč in seveda novih učinkovin, ki bi nanje delovale, nujno. Inštitucije, ki skrbijo za varovanje javnega zdravja v posameznih državah in globalno, bi morale tej problematiki nameniti vsaj tolikšno pozornost kot vse večji rezistenci bakterij na obstoječa zdravila in spodbujati raziskovalce k odkrivanju bolj učinkovitih zdravil in načinov zdravljenja te bolezni.

## 5 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo prof. dr. Regini Marii Barreto Ciccarelli, Univerza Sao Paolo, Brazilija za podporo pri pisanku članka.

## 6 LITERATURA

1. CDC Centers for Disease Control and Prevention [internet]. Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas disease) [updated 2018 Apr 10, cited 2018 Oct 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>.
2. Martins AV, Gomes AP, de Mendonça EG, Fietto JLR, Santana LA, de Almeida Oliveira MG et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infection*. 2012 Mar;16(1):45-58.
3. Rossi MA, Ramos SG, Bestetti RB. Chagas' heart disease. Clinical-pathological correlation. *Front Biosci*. 2003 Jan;8:94-109.
4. Bizjak T, Salettinger R. Južnoameriška tripanosomoza – Chagasova bolezen. Medicinski razgledi. 2011;50:9-16.
5. Bonney KM. Chagas disease in the 21 Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 2014 Mar;21:1-10.
6. Perez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *The Lancet*. 2018 Jan;391(10115):82-94.
7. Anghel A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus*. 2015 Oct;13(4):540-550.
8. Nunes MC, Donnes W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas Disease: an Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Aug;62(9):767-776.
9. World Health Organization [Internet]. Chagas disease (American trypanosomiasis) [updated 2019, cited 2019 Mar 26]. Available from: <https://www.who.int/chagas/en/>.
10. Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(1):311-318.
11. Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NN, Atella GC, de Souza W, et al. Trypanosoma cruzi Epimastigotes Are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservoir Lipid Inclusions. *PLoS ONE*. 2011 Jul; 6(7):e22359.
12. Pereira MG, Visbal G, Salgado LT, Vidal JC, Godinho JLP, De Cicco NNT, et al. Trypanosoma cruzi Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions. *PLoS ONE*. 2015 Jun;10(6):e0128949.
13. Clayton J. Chagas disease: Pushing through the pipeline. *Nature*, 2010 Jun;465(7301):12-15.
14. Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, Sanchez-Montalva A, Salvador F, Correa- Oliveira R, et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review, *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Nov;97(5):1289-1303.
15. Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma Cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2014 Sep;109(6):828-833.
16. Edwards DL. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother*. 1993 Jan;31(1):9-20.
17. Mital A. Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. *Sci. Pharm.* 2009 Aug;77(3):497-520.
18. Drugs.com [Internet]. Nifurtimox (Systemic) [updated 1995 Apr 25, cited 2019 Mar 26]. Available from: <https://www.drugs.com/mmx/nifurtimox.html>.
19. Forsyth CJ, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, Traina MI, Sanchez D R, et al. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Jul;63(8):1056-1062.
20. Vinaud MC, Nogueira KS, Fraga CM, la Costa TL, de Castro AM. Benznidazole induces *in vitro* anaerobic metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2017 Nov;7(12):727-731.
21. Santos Filho JM, Moreira DR, de Simone CA, Salgado Ferreira R, McKerrow JH, Santana Meira C. Optimization of anti-*Trypanosoma cruzi* oxadiazoles leads to identification of compounds with efficacy in infected mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012 Aug; 20(21):6423-6433.
22. Sartorelli P, Carvalho C, Reimao JQ, Lorenzi H, Tempone AG. Antitrypanosomal Activity of a Diterpene and Lignans Isolated from *Aristolochia cymbifera*. *Planta Med*. 2010 Sep; 76(13):1454-1456.
23. Viotti R, Alarcon de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl GF, Lopez MC, et al. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of chronic Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov;58(2):635-639.
24. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION, BENZNIDAZOLE TABLETS [Internet] [updated 2017 Aug, cited 2019 Apr 11]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/209570lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf).



25. Soy D, Aldasoro E, Guerrero L, Posada E, Serret N, Mejia T, et al. Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Mar;59(6):3342-3349.
26. Ferraz LRM, Alves AEG, Nascimento DDS, Amariz IAE, Ferreira AS, Costa S PM, et al. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. *Acta Tropica.* 2018 Sep;185:127-132.
27. Scalise ML, Arrua EC, Rial MS, Esteva MI, Salomon CJ, Fichera LE. Promising Efficacy of Benznidazole Nanoparticles in Acute Trypanosoma cruzi Murine Model: In-Vitro and In-Vivo Studies. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Aug;95(2):388-393.
28. Papadopoulou MV, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Wilkinson SR, Kaiser M. Novel nitro(triazole/imidazole)-based heteroarylamides/sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *Eur J Med Chem.* 2014 Nov;87:79-88.
29. Massarico Serafim RA, Goncalves JE, de Souza FP, de Melo Loureiro AP, Storpirtis S, Krogh R. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity. *Eur J Med Chem.* 2014 Jul;82:418-425.
30. Cerecetto H, Di Maio R, Gonzales M, Rissi M, Saenz P, Seoane G, et al. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure – Activity Relationships. *J. Med. Chem.* 1999 Jun;42(11):1941-1950.
31. Rani R, Granchi C. Bioactive heterocycles containing endocyclic N-hydroxy groups. *Eur J Med Chem.* 2015 Jun;97:505-524.
32. Buckner FS, Verlinde CL, La Famme AC, Van Voorhis WC. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against Trypanosoma cruzi Using Parasites Expressing  $\beta$ -Galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Nov;40(11):2592-2597.
33. Schiefer IT, VandeVrede L, Fa' M, Arancio O, Thatcher GR. Furoxans (1,2,5 Oksadiazole-N-Oxides) as Novel NO Mimetic Neuroprotective and Procognitive Agents. *J. Med. Chem.* 2012 Apr;55(7):3076-3087.
34. Gunatilleke SS, Calvet CM, Johnston JB, Chen CK, Erenburg G, Gut J, et al. Diverse Inhibitor Chemotypes Targeting Trypanosoma cruzi CYP51. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Jul;6(7):e1736.
35. Ribeiro I, Sevcik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, et al. New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Jul;3(7):e484.
36. Lourenco AM, Castro Faccini C, Aparecida de Jesus Costa C, Balestrin Mendes G, Fragata Filho AA. Evaluation of in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of medications benznidazole, amiodarone hydrochloride, and their combination. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Aug;51(1):52-56.
37. Franco J, Scarone L, Comini MA. Drugs and Drug Resistance in African and American Trypanosomiasis. *Annual Reports in Medicinal Chemistry.* 2018;51:97-133.
38. McKerrow JH. Update on drug development targeting parasite cystein proteases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Aug;12(8):e0005850.
39. Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall L-I, Bernatchez JA, Nda M, Reed SL, et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Aug;12(8):e0006512.
40. Fontes Martins TA, de Figueiredo Diniz L, Mazzetti AL, da Silva do Nascimento AF, Caldas S, Caldas IS, et al. Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-Trypanosoma cruzi Activity in Experimental Chagas Disease. *PLoS One.* 2015 Jun;10(6):e0128707.

# FARMAKOGENOMSKO VREDNOTENJE TIOPURINOV

## PHARMACOGENOMIC EVALUATION OF THIOPURINES

### AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Dunja Urbančič, mag. farm.

Asist. dr. Alenka Šmid, mag. farm.

Prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za klinično biokemijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija*

### NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: irena.mlinaric@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Genetska raznolikost je čudovita lastnost, ki opredeljuje vsakega posameznika, a hkrati določa tudi posameznikov odgovor na zdravljenje. Z odkrivanjem genetskih različic, ki vplivajo na učinek zdravil preko spremenjenih farmakokinetičnih ali farmakodinamskih procesov, se ukvarja farmakogenomika. Odkritje vpliva genotipa na odgovor organizma na ksenobiotike sega že v čas antične Grčije, ko je bilo znano, da zaužitje v mediteranskem svetu zelo razširjenega boba (*Vicia faba*) pri nekaterih posameznikih izzove živiljenje ogrožajočo hemolitično anemijo in da se stanje pojavlja v družini (1). Okoli 1500 let kasneje je bilo jasno, da je t. i. favizem posledica genetsko predisponiranega oslabljenega delovanja encima glukoza 6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) (2), ki predstavlja tveganje tudi pri

### POVZETEK

Tiopurini so predzdravila, ki jih uporabljamo pri zdravljenju akutne limfoblastne levkemije, avtoimunskeh bolezni in pri preprečevanju zavrnitvenih reakcij po transplantaciji organov. Eden najpomembnejših encimov v deaktivacijski poti njihovega metabolizma je tiopurin S-metiltransferaza (TPMT). Odkritje populacijske raznolikosti v aktivnosti tega encima zradi prisotnih genetskih polimorfizmov v njegovem genu je bilo vključitvi določanja le-teh v klinično prakso in še danes predstavlja enega najboljših farmakogenomskeh primerov. Pacienti z genetskimi polimorfizmi ob standardnem zdravljenju s tiopurini namreč bolj verjetno razvijejo neželene učinke, saj v manjšem obsegu deaktivirajo te zdravilne učinkovine. Smernice evropskih in ameriških združenj za implementacijo farmakogenomike zato priporočajo določanje prisotnosti najpogostejših genetskih polimorfizmov TPMT ali aktivnosti encima pred začetkom zdravljenja. Hkrati svetujejo 30–70-odstotno znižanje standardnega odmerka tiopurinov ob prisotnem enim variantnem alelu ter zamenjavo terapije ali 90-odstotno znižanje standardnega odmerka tiopurinov v primeru dveh prisotnih variantnih alelov TPMT.

### KLJUČNE BESEDE:

farmakogenomika, genetski polimorfizmi, tiopurin S-metiltransferaza, tiopurini, S-adenozilmetionin

### ABSTRACT

Thiopurines represent an important therapeutic pillar in the therapy of acute lymphoblastic leukaemia, autoimmune disorders and in preventing transplant rejections. Their major route of deactivation is directed via thiopurine S-methyltransferase (TPMT). With the discovery of trimodal population distribution of its enzymatic activity, resulting from genetic polymorphisms present in its gene, the determination of TPMT status became one of the most successful implementations of pharmacogenomics into clinical practice. In patients treated with standard dose of thiopurines, decreased TPMT activity triggers severe side effects, due to poorer deactivation of these drugs. Guidelines from European and American consortia for implementation of pharmacogenetics advocate determination of most common genetic



polymorphisms or activity of TPMT prior to initiating thiopurine therapy. In patients heterozygous for TPMT 30–70% of target dose is recommended and substantially reduced doses or use of alternative treatment is advised in homozygous patients with deficient TPMT activity.

#### KEY WORDS:

genetic polymorphisms, pharmacogenomics, S-adenosylmethionine, thiopurines, thiopurine S-methyltransferase

zaužitju npr. antimalarika primakina (3). Vzporedno s to ugotovitvijo se je sredi prejšnjega stoletja prvič pojavil tudi izraz farmakogenetika, ki se je kot večina genetskih preiskav pospešeno začela razvijati ob prelomu zadnjega tisočletja (4). Tedaj so tehnike odkrivanja genetskih različic za tarčne gene na eni strani postale enostavne, na drugi strani pa je bilo moč hitro pridobiti ogromno količino podatkov z agnostičnimi vsegenomskeimi metodami, ki so jih integrirale mnoge klinične raziskave. Po odkritju povezave med polimorfizmom in odgovorom na zdravilo je bilo potrebno ta polimorfizem validirati na več populacijah, čemur je sledila implementacija v klinično prakso. Čeprav je po smernicah ameriške in evropske agencije za zdravila priporočeno farmakogenomsko testiranje za kar 7 % vseh učinkovin na trgu (4), je zaradi kompleksne narave prenosa v klinično prakso praktična uporaba farmakogenomskega pristopa pred ali med terapijo prisotna pri relativno majhnem številu zdravilnih učinkovin. Med njimi predstavlja farmakogenomika tiopurinov najboljši primer prenosa laboratorijskih in kliničnih raziskav v klinično prakso.

## 2 TIOPURINSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Kljub hitremu napredku bioloških zdravil je vloga tiopurinov pri vzdrževanju ravnovesja imunskega sistema izrednega pomena. Bolezni in stanja, pri katerih uporabljamo tiopurine, so akutna limfoblastna levkemija, avtoimunske bolezni in prečitve zavrnitve organa po transplantacijah. Tiopurini imajo kompleksen metabolizem in ozko terapevtsko okno, zato lahko zaradi genetskih in okoljskih razlik med posamezniki enak odmerek pri enem pacientu doseže želeni učinek, medtem ko pri drugem izzove resno neželeno reakcijo.

### 2.1 METABOLIZEM

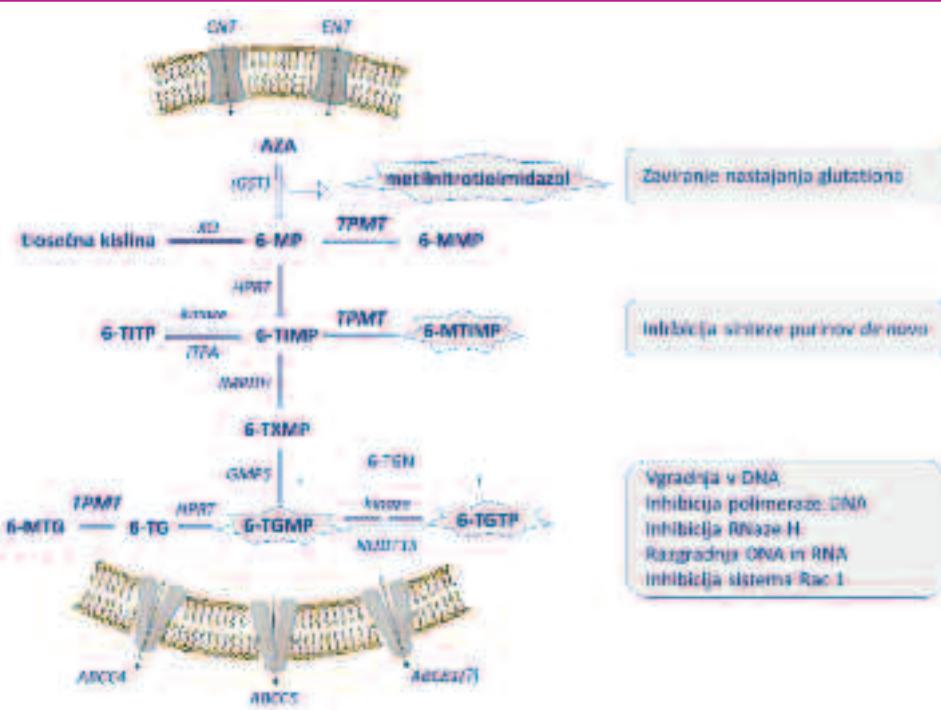
Tiopurini 6-merkaptopurin (6-MP), azatioprin (AZA) in 6-tiogvanin (6-TG) so protitumorne in imunosupresivne zdravilne učinkovine, ki so kot predzdravila izpostavljeni zapletenemu metabolizmu. Ta zajema aktivacijske in deaktivacijske poti (slika 1). Pretvorba tiopurinov se začne v črevesju in jetrih, kjer je AZA podvržen delno encimski odcepitvi metilnitrotioimidazola z glutation S-transferazo (GST) in tvori 6-MP. Slednji lahko vstopi v pot aktivacije, usmerjene proti nastanku citotoksičnih 6-tiogvanozinskih nukleotidov (6-TGN). Ta se začne s pripenjanjem ribozilne in fosfatne skupine na purinski del s hipoksantin fosforiboziltransferasazo (HPRT) ter nadaljuje z oksidacijsko reakcijo, katalizirano z inozin monofosfat dehidrogenazo (IMPDH), ki tudi najmočneje pogojuje hitrost pretvorbe do 6-TGN. V naslednjem koraku gvanozin monofosfat sintaza (GMPS) katalizira pretvorbo nastalega 6-tioksantozin monofosfata (6-TXMP) do 6-tiogvanozin monofosfata (6-TGMP). Sledi fosforilacija s kinazami do 6-tiogvanozin trifosfata (6-TGTP) (5), ki ji nasprotuje defosforilacija s hidrolazo nudix-15 (NUDT15) (6).

V deaktivacijski poti tiopurinov sodelujeta dva encima: tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) in ksantin oksidaza (XO) (5). XO v jetrih pretvori med 3 % in 37 % absorbiranega 6-MP v tiosečno kislino (7). Preostanek 6-MP gre bodisi v aktivacijo ali pa ga metilira TPMT, pri čemer nastane 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) (8). TPMT sodeluje tudi pri metilaciji nekaterih drugih presnovkov 6-MP v različnih fazah aktivacijske poti (slika 1) (5). Med drugim je udeležen pri nastanku 6-metiltioinozin monofosfata (6-MTIMP), ki poleg 6-TGN izkazuje farmakološke učinke (9).

Aktivacijska pot 6-TG je podobna metabolizmu 6-MP, a je manj kompleksna, saj 6-TG za razliko od 6-MP že ima gvaninsko strukturo. Do citotoksičnih 6-TGN nameč počrebuje le enostopenjsko pretvorbo s HPRT (slika 1) (5). Oksidacijska deaktivacija 6-TG s XO še ni popolnoma razjasnjena, njegovi metilirani presnovki, nastali s TPMT, pa ne izkazujejo farmakološkega delovanja (10).

### 2.2 MEHANIZEM DELOVANJA

Zaradi strukturne podobnosti z gvaninom je delovanje 6-TGN v celičnih procesih antagonistično purinskim nukleotidom (slika 1). 6-TGN se vključi kot gradnik v nukleinske kisline, a namesto da bi sodeloval pri sintezi, onemogoči delovanje polimeraze DNA ter s tem ustavi podvojevanje DNA, čemur sledi njena razgradnja (11).



**Slika 1:** Shema presnove in delovanja tiopurinskih zdravilnih učinkovin. 6-MP – 6-mercaptopurin, 6-MMP – 6-metilmercaptopurin, 6-MTG – 6-metiltiogvanin, 6-MTIMP – 6-metiltioinozin monofosfat, 6-TG – 6-tiogvanin, 6-TGN – 6-tiogvanozinski nukleotidi, 6-TGMP – 6-tiogvanozin monofosfat, 6-TGTP – 6-tiogvanozin trifosfat, 6-TIMP – 6-tioinozin monofosfat, 6-TITP – 6-tioinozin trifosfat, 6-TXMP – 6-tioksantozin monofosfat, 6-MTGP – 6-TG – 6-TGN – 6-TGMP – 6-TGTP – 6-TIMP – 6-TITP – 6-TXMP – 6-TGTP, 6-TG – 6-thioguanine, 6-TGN – 6-thioguanosine nucleotides, 6-TGMP – 6-thioguanosine monophosphate, 6-TGTP – 6-thioguanosine triphosphate, 6-TIMP – 6-thioinosine monophosphate, 6-TITP – 6-thioinosine triphosphate, 6-TXMP – 6-thioxanthosine monophosphate, ABC – ATP-binding cassette transporters, AZA – azathioprine, ENT, CNT – equilibrative and concentrative nucleoside transporters, GMPS – guanosine monophosphate synthase, GST – glutathione S-transferase, HPRT – hypoxanthine phosphoribosyltransferase, IMPDH – inosine-5-monophosphate dehydrogenase, ITPA – inosine triphosphate pyrophosphatase, NUDT15 – hidrolaza nudix-15, TPMT – tiopurine S-methyltransferase, XO – xanthine oxidase. Prirejeno po (5).

**Figure 1:** Schematic presentation of thiopurine metabolism and their mode of action. 6-MP – 6-mercaptopurine, 6-MMP – 6-methylmercaptopurine, 6-MTG – 6-methylthioguanine, 6-MTIMP – methylthioinosine monophosphate, 6-TG – 6-thioguanine, 6-TGN – 6-thioguanosine nucleotides, 6-TGMP – 6-thioguanosine monophosphate, 6-TGTP – 6-thioguanosine triphosphate, 6-TIMP – 6-thioinosine monophosphate, 6-TITP – 6-thioinosine triphosphate, 6-TXMP – 6-thioxanthosine monophosphate, ABC – ATP-binding cassette transporters, AZA – azathioprine, ENT, CNT – equilibrative and concentrative nucleoside transporters, GMPS – guanosine monophosphate synthase, GST – glutathione S-transferase, HPRT – hypoxanthine phosphoribosyltransferase, IMPDH – inosine-5-monophosphate dehydrogenase, ITPA – inosine triphosphate pyrophosphatase, NUDT15 – hidrolaza nudix-15, TPMT – thiopurine S-methyltransferase, XO – xanthine oxidase. Adopted from (5).

Poleg tega neposredno zavira polimerazo in ligazo DNA kot tudi aktivnost RNaze H, kar vodi v zaustavitev prepisa genov (12). Razgradnja nukleinskih kislin sproži apoptozne mehanizme in smrt celice. Citostatične in imunosupresivne učinke tiopurinov, natančuje 6-TGTP, dosežemo tudi preko blokade od CD28 odvisne aktivacije Rac1, ki vodi limfocite T proti apoptozi (13). Zaustavitev procesov v celici povzroči tudi 6-MTIMP. Z inhibicijo fosforibozil pirofosfat amidotransferaze namreč zavre nastajanje purinov de novo ter s tem zniža nivo adenozin trifosfata (9). Dodaten tarčni učinek sproži tudi metilnitrotioimidazol, razgradni produkt AZA. Njegov imunosupresivni učinek po-

vezujejo z zaviranjem obrambnih mehanizmov oksidativnega stresa, saj naj bi zmanjševal koncentracijo glutationa v celici (14).

### 2.3 UČINKOVITOST ZDRAVLJENJA IN NEŽELENI UČINKI

Zdravljenje s tiopurini traja od enega do več let predvsem v vzdrževalnih fazah omenjenih bolezenskih stanj z namenom podaljšanja remisije bolezni. Učinkovitost zdravljenja s tiopurini je variabilna in odvisna od vrste bolezni ter starosti pacientov. Zaradi sistematičnega pristopa pri sno-

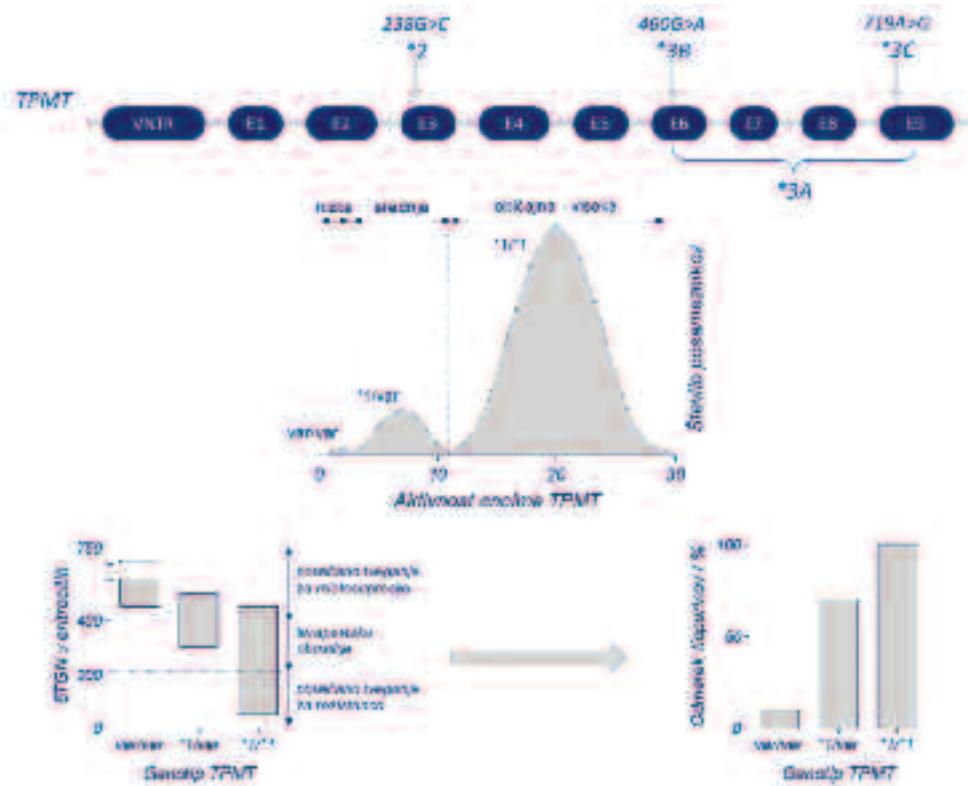


vanju protokolov zdravljenja je na področju akutne limfoblastne levkemije učinkovitost le-tega narasla s 40 % sredi šestdesetih let 20. stoletja (15) na več kot 80 %, v pediatrični populaciji v zadnjih letih celo nad 90 % (16, 17). Na drugi strani pri vnetni črevesni bolezni nekatere raziskave poročajo o le 35-odstotni stopnji učinkovitosti zdravljenja s tiopurini (18, 19). Tudi do 60 % bolnikov opusti zdravljenje zaradi hudih neželenih učinkov ali neodzivnosti na tiopurine (20, 21).

Pri bolnikih, zdravljenih s tiopurini, so med najpogostejšimi vzroki za prekinitev terapije preobčutljivostne reakcije, akutni pankreatitis, gastrointestinalna netoleranca, mielotoksičnost, ki se odraža kot nevtropenija, hepatotoksičnost in

infekcije (22). Zaradi potencialnega mutagenega delovanja tiopurinov se pri bolnikih, ki so uspešno prestali zdravljenje, kasneje lahko pojavijo sekundarne novotvorbe, kot so limfom, nemelanomski kožni tumorji in kronična mieloidna levkemija (23-25).

V izogib neuspešnemu zdravljenju sta predvidevanje odziva pacienta na omenjene zdravilne učinkovine ter uvedba posamezniku prilagojenega pristopa zdravljenja izrednega pomena. Tak pristop zajema ugotavljanje interakcij med zdravilnimi učinkovinami, ki jih pacient sočasno prejema, upoštevanje posameznikovih metabolnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na delovanje zdravilne učinkovine, ter poznavanje posameznikovih genetskih značilnosti.



Slika 2: Farmakogenomika TPMT. Zgoraj: Shematski prikaz gena TPMT z eksoni, njegovimi najpogostejšimi polimorfizmi in značilnim zaporedjem VNTR v promotorski regiji gena. Sredina: Graf razporeditve aktivnosti TPMT v kavkaški populaciji. Znižana aktivnost TPMT je posledica prisotnih polimorfizmov (var) v genu TPMT. Spodaj levo: Pri zdravljenju s standardnim odmerkom tiopurinov prisotnost polimorfizmov vpliva na količino proizvedenih toksičnih presnovkov 6-TGN. Spodaj desno: Zaradi povečanega tveganja za mielosupresijo zahteva prisotnost polimorfizmov ustrezno prilagoditev odmerka glede na genotip. E – ekson, TPMT – tiopurin S-metyltransferaza, var – variantni alel, VNTR – variabilno število tandemskih ponovitev, \*1 – divi tip alela TPMT. Povzeto po (33).

Figure 2: Pharmacogenomics of TPMT. Above: Schematic presentation of TPMT gene, its exons, its most common genetic polymorphisms and characteristic VNTR sequence. Middle: Trimodal distribution of TPMT activity in Caucasian population. Polymorphisms in TPMT gene (var) are responsible for lower enzymatic activity. Below left: They importantly influence the levels of toxic thiopurine metabolites 6-TGN, when standard dose of thiopurines is applied. Below right: Due to higher risk for myelosuppression the thiopurine dose adjustment is required, if genetic polymorphisms are determined in patient's TPMT gene. Adopted from (33).

# 3 FARMAKOGENOMSKE ZNAČILNOSTI ODGOVORA NA TIOPURINE

Na akuten pojav neželenih učinkov, na neželene učinke, ki se pojavijo leta po končani terapiji, na ponovitev bolezni ter na neodzivnost terapije s tiopurini poleg same narave bolezni močno vpliva dedna predispozicija. Genetske polimorfizme uvrščamo med ključne dejavnike, ki lahko povzročijo nezadostno učinkovitost ali povečajo tveganje za pojav neželenih učinkov zdravila, če so različni posamezniki izpostavljeni enakemu odmerku (26). V kliničnih in translacijskih raziskavah so identificirali številne polimorfizme v genih *TPMT*, *NUDT15*, *ITPA*, *MTHFR* in *PACSIN2*, ki so povezani bodisi s povečano toksičnostjo bodisi z neodzivnostjo na tiopurine (27-30). Kljub velikemu številu različnih polimorfizmov, ki v kliničnih raziskavah jasno prikazujejo genetsko odvisne razlike med posamezniki pri odgovoru na tiopurine, v klinični praksi zaenkrat najpogosteje uporabljamo le nekatere različice *TPMT*.

## 3.1 GENETSKE ZNAČILNOSTI GENA ZA TPMT

Kot citosolni encim *TPMT* katalizira reakcijo S-metilacije aromatskih in heteroaromatskih sulfhidrilnih spojin, pri čemer metilno skupino pri prenosu prispeva kofaktor S-adenozil metionin (SAM) (8, 31). Pri reakciji, ki predvidoma poteka po klasičnem mehanizmu *S<sub>N</sub>2* (32), nastaneta metilirani substrat in S-adenozil homocistein (SAH) (8). Zapis za protein se nahaja na kromosому 6 z lokusom 6p22.3. Gen, dolg 34 kb, je sestavljen iz devetih eksonov, od katerih jih osem kodira protein (slika 2, zgoraj). V humanem genomu najdemo štiri psevdogene *TPMT*, ki se nahajajo na kromosomih 3, 18 in na kromosomu X.

Variabilnost zaporedja DNA v *TPMT* je pestra (34). V eksonski ali intronski regiji danes poznamo 44 različnih polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP) kot tudi delecije manjših fragmentov gena (34). Poleg najpogostejših SNP se posamezniki med seboj razlikujemo po zapisu v promotorski regiji *TPMT*. V mestu, bogatem z baznim parom G/C, se nahaja variabilno število tandemskih ponovitev (VNTR), ki so evolucijsko povezani z najpogostejšimi polimorfizmi (35,36). Najpogostejši in zaradi njihovega vpliva na aktivnost encima tudi najpomembnejši polimorfizmi so *TPMT\*3A*, *TPMT\*3C* in *TPMT\*2* (37-39). Posamezniki z omenjenimi polimorfizmi imajo v genu *TPMT* zamenjan posamezen nukleotid (slika 2, zgoraj). Ta sprememba v genskem zapisu

povzroči spremenjeno aminokislinsko zaporedje v prepisnem proteinu, kar vodi v napačno zvijanje in hitrejšo razgradnjo *TPMT* (33). Posledično se pri teh ljudeh izraža *TPMT* z nižjo aktivnostjo, ki je v primeru dvojno variantnega genotipa skoraj nezaznavna. V kavkaški populaciji ima okoli 89 % posameznikov normalno aktivnost encima, 11 % znižano in okoli 0,3 % nezaznavno (40). Aktivnost običajno odgovarja posameznikovemu genotipu (slika 2, sredina) (40). Kljub temu je razporeditev aktivnosti pri posameznikih z genotipom divjega tipa (*TPMT\*1*) relativno široka, kar pomeni, da se genotip najpogostejših polimorfizmov s fenotipom ne ujema popolnoma in da obstajajo genetski ali drugi dejavniki, ki dodatno vplivajo na aktivnost *TPMT* (41).

## 3.2 SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA IN PRILAGODITEV ODMERKA GLEDE NA FARMAKOGENETSKE OZNAČEVALCE

Da bi bilo zdravljenje čim varnejše in učinkovitejše, med zdravljenjem s tiopurini zdravniki obvezno rutinsko spremljajo diferencialno krvno sliko za ugotavljanje števila levkocitov ter jetrno funkcijo z analizo jetrnih encimov. Kjer je storitev na voljo, pogosto preverjajo nivo metabolitov tiopurinov v eritrocitih. Koncentracija 6-TGN v območju med 235 in 450 pmol × (8 × 10<sup>8</sup> eritrocitov (RBC)<sup>-1</sup>) pri bolnikih z vnetno črevesno boleznjijo napoveduje uspešno zdravljenje. Višje koncentracije so povezane z večjim tveganjem za pojav neželenih učinkov (21). Močno povišani metilirani presnovki tiopurinov (> 5700 pmol × (8 × 10<sup>8</sup> RBC)<sup>-1</sup>) v eritrocitih nakazujejo na večje tveganje za jetrno toksičnost. Visoko razmerje med 6-MMP in 6-TGN se je izkazalo za koristno predvsem pri ugotavljanju vzrokov za neodzivnost na tiopurine in preverjanju pacientove komplience (21, 42). Odgovor posameznika na zdravljenje s tiopurini v veliki meri orisujeta prisotnost genetskih polimorfizmov in posledično znižana encimska aktivnost *TPMT*, ki z metilacijo deaktivira tiopurine (26, 43). Homozigotni posamezniki z zapisom za variantni encim *TPMT* so nezmožni metilacije tiopurinov, zato je celotna metabolna pot teh učinkov pri njih usmerjena proti citotoksičnim 6-TGN (slika 2, spodaj levo). Posledica take genetske predispozicije so visoke koncentracije 6-TGN v organizmu pacienta, če je le-ta zdravljen s standardnim odmerkom; to pa predstavlja povečano tveganje za nastanek življenje ogrožajoče mielosupresije (7, 44). Nekateri pacienti s heterozigotnim zapisom gena *TPMT* in s tem srednje visoko aktivnostjo *TPMT* se lahko ugodno odzovejo na zdravljenje s tiopurini brez resnejših neželenih



učinkov (45). Drugi heterozigoti zaradi višjih koncentracij 6-TGN razvijejo mielosupresijo, v kolikor odmerek tiopurinov ni znižan (7, 44). Smernice vodilnih ameriških in evropskih iniciativ za vključitev farmakogenomike v klinično prakso – Združenje za implementacijo klinične farmakogenetike (CPIC, *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*), Nizozemska delovna skupina za farmakogenetiko (DPWG, *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) in Kanadska farmakogenomska mreža za varnost zdravil (CPNDS, *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*) – zato pri zdravljenju s tiopurini priporočajo preverjanje prisotnosti genetskih polimorfizmov ali aktivnosti TPMT. Na podlagi pacientovega genotipa ali fenotipa naj nato heterozigoti s srednjo aktivnostjo TPMT ob začetku zdravljenja prejmejo 30–70 % standardnega odmerka AZA ali 6-MP oziroma 30–50 % standardnega odmerka 6-TG, homozigoti z nizko ali nezaznavno aktivnostjo TPMT pa le 10 % standardnega odmerka tiopurinov ali drugo obliko zdravljenja (slika 2, spodaj desno) (46, 47). V nadaljevanju zdravljenja odmerek tiopurinov prilagodimo glede na diferencialno krvno sliko posameznika, ki odraža toksičnost ali učinkovitost zdravljenja (46, 47).

Ker je povezava med genetskimi polimorfizmi v *TPMT* in izidom zdravljenja močno podprtta s številnimi raziskavami, mnogi onkologi, gastroenterologi in dermatologi posežejo po testiranju statusa *TPMT* pred pričetkom zdravljenja s tiopurini. V državah, kot je Velika Britanija, je testiranje na polimorfizme *TPMT* pred zdravljenjem s tiopurini obvezno za vse bolnike z ALL (48). Pri zdravljenju gastrointestinalnih avtoimunskih bolezni z AZA ali 6-MP je ocenjen delež diagnosticiranja statusa *TPMT* pred zdravljenjem 67 % za Veliko Britanijo in 43 % za celotno svetovno populacijo (48). V nasprotju z gastroenterologi kar 94 % dermatologov posega po preverjanju genetskih različic *TPMT* (48). Povprečna stopnja genetskega testiranja pred zdravljenjem nemalignih bolezni se tako giblje med 47–94 % (46). V Sloveniji testiranje najpogostejših genetskih različic *TPMT* izvaja Laboratorij za molekularno diagnostiko, ki deluje v okviru Univerze v Ljubljani, Fakultete za farmacijo (49). Prav tako v tem laboratoriju izvajajo meritve metabolitov tiopurinov v eritrocitih za namen spremeljanja zdravljenja bolnikov, ki prejemajo tiopurine.

## 4 SKLEP

Čeprav dandanes predpisovanje zdravil še vedno pogosto temelji na posameznikovih značilnostih, kot so starost,

masa, ledvična in jetrna funkcija, obstoječi diagnostični postopki in znanje marskdaj slabega odgovora na zdravilo ne morejo razložiti. Zato sta ključna iskanje in implementacija novih genetskih in metabolnih značilnosti. Majhen delež prenosa farmakogenetike v klinično prakso je bil v preteklosti posledica pomanjkanja dostopnosti podrobnih kliničnih podatkov in smernic. Zadnja leta so evropska in ameriška združenja za implementacijo farmakogenomike v klinično prakso (CPIC, CPNDS, DPWG) izdala obširnejše smernice za strukturiranje farmakogenomske raziskav in pridobivanje ustreznih informacij o polimorfizmih in njihovemu vplivu na zdravljenje, ki bi bile zadostne za validacijo in vpeljavo določanja teh polimorfizmov v klinično prakso. Tako lahko v prihodnosti pričakujemo pospešeno izvajanje kakovostno zastavljenih raziskav, ki bodo ob ustrezno razvitih podpornih sistemih in izobraževanju vseh vpletenih omogočile z dokazi podprtto farmakogenomsko testiranje ter s tem natančnejše in varnejše predpisovanje zdravil.

## 5 LITERATURA

- Wharton HJ, Dueselmann W. Favism. *N Engl J Med.* 1947 Jun 26;236(26):974–7.
- Szeinberg A, Sheba C, Adam A. Enzymatic Abnormality in Erythrocytes of a Population Sensitive to *Vicia faba* or Haemolytic Anaemia induced by Drugs. *Nature [Internet]*. 1958;181. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19582901457>
- Schrier SL, Kellermeyer RW, Carson PE, Ickes CE, Alving AS. The hemolytic effect of primaquine: IX. Enzymatic abnormalities in primaquine-sensitive erythrocytes. *J Lab Clin Med.* 1958 Jul 1;52(1):109–17.
- Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 2015 Oct 15;526(7573):343–50.
- Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, et al. Thiopurine pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2010 Sep;20(9):573–4.
- Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann FA, Zhao X, et al. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat Genet.* 2016 Apr;48(4):367–73.
- Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* 1987 Jan;41(1):18–25.
- Remy CN. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *J Biol Chem.* 1963 Mar;238:1078–84.
- Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bökkering JP, Lambooy LH, Trijbels FJ. The importance of methylthio-IMP for methylmercaptopurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in

- Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Apr 30;1181(2):189–94.
10. Allan PW, Bennett LL. 6-Methylthioguanine acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochem Pharmacol.* 1971 Apr;20(4):847–52.
  11. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;43(4):329–39.
  12. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertoni F. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochem Pharmacol.* 2010 May 1;79(9):1211–20.
  13. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1133–45.
  14. Stocco G, Pelin M, Franca R, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Favretto D, et al. Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: A role for glutathione-S-transferase? *World J Gastroenterol WJG.* 2014 Apr 7;20(13):3534–41.
  15. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzel M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev.* 2015 Jul;29(4):243–9.
  16. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine dose intensity and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: the influence of thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. *Br J Haematol.* 2015 Apr;169(2):228–40.
  17. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Griskevičius L, Hallböök H, Heyman M, et al. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1–45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2018 Mar;32(3):606–15.
  18. Axelrad JE, Roy A, Lawlor G, Korelitz B, Lichtiger S. Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World J Gastroenterol.* 2016 Dec 14;22(46):10103–17.
  19. Izraeli S, Shochat C, Tal N, Geron I. Towards precision medicine in childhood leukemia--insights from mutationally activated cytokine receptor pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 2014 Sep 28;352(1):15–20.
  20. Moran GW, Dubeau M-F, Kaplan GG, Yang H, Eksteen B, Ghosh S, et al. Clinical predictors of thiopurine-related adverse events in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2015 Jul 7;21(25):7795–804.
  21. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002 Apr;122(4):904–15.
  22. Goldberg R, Irving PM. Toxicity and response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015 Jul;9(7):891–900.
  23. Abbas AM, Almukhtar RM, Loftus EV, Lichtenstein GR, Khan N. Risk of melanoma and non-melanoma skin cancer in ulcerative colitis patients treated with thiopurines: a nationwide retrospective cohort. *Am J Gastroenterol.* 2014 Nov;109(11):1781–93.
  24. Kotlyar DS, Lewis JD, Beaugerie L, Tierney A, Brensinger CM, Gisbert JP, et al. Risk of lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine and 6-mercaptopurine: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2015 May;13(5):847–858.e4; quiz e48–50.
  25. Deepak P, Stobaugh DJ. Risk of Myeloid Neoplasms in Inflammatory Bowel Disease Patients Is Linked to Exposure to Thiopurines and Not With Tumor Necrosis Factor-alpha Inhibitors. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2015 Oct;13(10):1857–8.
  26. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine methyltransferase and treatment outcome in the UK acute lymphoblastic leukaemia trial ALL2003. *Br J Haematol.* 2015 Aug;170(4):550–8.
  27. Yang S-K, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, et al. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet.* 2014 Sep;46(9):1017–20.
  28. Smid A, Karas-Kuzelicki N, Milek M, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. Association of ITPA genotype with event-free survival and relapse rates in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing maintenance therapy. *PloS One.* 2014;9(10):e109551.
  29. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia.* 2009 May;23(5):971–4.
  30. Smid A, Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. PACSIN2 polymorphism is associated with thiopurine-induced hematological toxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia undergoing maintenance therapy. *Sci Rep.* 2016 25;6:30244.
  31. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase. Aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol.* 1983 Nov;24(3):471–8.
  32. Peng Y, Feng Q, Wilk D, Adjei AA, Salavaggione OE, Weinshilboum RM, et al. Structural basis of substrate recognition in thiopurine s-methyltransferase. *Biochemistry.* 2008 Jun 10;47(23):6216–25.
  33. Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7403–13.
  34. Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics.* 2013 Apr;23(4):242–8.
  35. Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and Intronic Sequences of the Human Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) Gene Isolated from a Human PacI Genomic Library. *Pharm Res.* 1997 Dec 1;14(12):1672–8.
  36. Urbanič D, Šmid A, Stocco G, Decorti G, Mlinarič-Rašcan I, Karas Kuželicki 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;19(17):1311–22.
  37. Krynetski EY, Krynetskaia NF, Yanishevski Y, Evans WE. Methylation of mercaptopurine, thioguanine, and their nucleotide metabolites by heterologously expressed human thiopurine S-methyltransferase. *Mol Pharmacol.* 1995 Jun;47(6):1141–7.
  38. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol.* 1996 Jan;15(1):17–30.
  39. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet.* 1996 Apr;58(4):694–702.
  40. Milek M, Murn J, Jaksic Z, Lukac Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology.* 2006;77(3):105–14.

41. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Richards SM, Vora A. Thiopurine methyltransferase genotype-phenotype discordance and thiopurine active metabolite formation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Jul;76(1):125–36.
42. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2007 Jul;102(7):1518–27.
43. Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, Söderhäll S, Vettenranta K, Weinshilboum R, et al. Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Leukemia.* 2009 Mar;23(3):557–64.
44. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond Engl.* 1990 Jul 28;336(8709):225–9.
45. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics.* 2010 Feb;11(2):177–88.
46. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui C-H, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 May;105(5):1095–105.
47. Swen JJ, Nijenhuis M, Rhenen M van, Boer-Veger NJ de, Buunk A-M, Houwink EJF, et al. Pharmacogenetic Information in Clinical Guidelines: The European Perspective. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(5):795–801.
48. Lennard L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol.* 2014 Apr;77(4):704–14.
49. Laboratorij za molekularno diagnostiko. [cited 2019 Jan 10]. Available from: <http://www.ffa.uni-lj.si/fakulteta/organiziranost/katedre/katedra-za-klinicno-biokemijo/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko>



# ESTETROL – NARAVNI SELEKTIVNI MODULATOR RECEPTORJEV ZA ESTROGENE

## ESTETROL – NATURAL SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATOR

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Tamara Knific, mag. farm.

Asist. dr. Maša Sinreich, mag. farm.

Prof. dr. Tea Lanišnik Rizner

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Inštitut za biokemijo, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tamara.knific@mf.uni-lj.si

### 1 ESTETROL – ESTROGEN, KI SE SINTETIZIRA LE PRI PLODU

Estetrol (E4) so pri analizi metabolitov estrogenov v urinu dojenčkov z razvojnimi nepravilnostmi odkrili Diczfalusy in sod. na inštitutu Karolinska I. 1965. Dojenčkom med 6 in 13 tednov starosti so intramuskularno injicirali  $^{14}\text{C}$ -E2 in nato določali metabolite v urinu. Ugotovili so, da je poleg

### POVZETEK

Estetrol je naravni estrogen, ki se sintetizira le v jetrih ploda, kjer potekata 15α- in/ali 16α-hidroksilacija endogenega estriola in estradiola. Študije *in vitro* so pokazale, da se estetrol veže samo na receptorje za estrogene (ER), z največjo afiniteto na ER<sub>a</sub>. Estetrol ima veliko biološko uporabnost in dolg eliminacijski čas, zaradi česar ga je mogoče aplicirati enkrat dnevno. Rezultati raziskav pri raku dojk so pokazali, da estetrol nasprotuje učinkom estradiola, zavira rast tumorja in celo zmanjša število in obseg že nastalih tumorjev, kar kaže na primerost uporabe estetrola v hormonski nadomestni terapiji pri bolnicah s trenutnim ali že prebolelim rakom dojk. Številne klinične raziskave so potrdile varno uporabo estetrola v humani medicini brez pomembnih neželenih učinkov. Estetrol bi se lahko uporabljal tudi v terapiji z menopavzo povezanih simptomov, tj. vazomotoričnih simptomov, vulvovaginalne atrofije in za preprečevanje nastanka osteoporoze, možna pa bi bila tudi njegova uporaba v kombiniranih peroralnih kontraceptivih, saj ima manjši vpliv na delovanje jeter in jetrnih encimov v primerjavi z etinilestradiolom in s tem manjše tveganje za razvoj globoke venske tromboze.

### KLJUČNE BESEDE:

Ključne besede: estetrol, estrogeni, plod, kontracepcija, rak dojk

### ABSTRACT

Estetrol is a natural fetal estrogen, synthesised in fetal liver that are capable of 15α- and/or 16α-hydroxylation of endogenous estriol and estradiol. *In vitro* studies have shown that estetrol only binds to estrogen receptors (ER) and has the highest affinity for ER<sub>a</sub>. Estetrol also has high oral bioavailability with slower elimination and thus enables once-daily dosing regimen. Studies on breast cancer revealed that estetrol counteracts the effects of estradiol, prevents tumor growth, and decreases the number and size of pre-existing tumors which enables its use in hormone replacement therapy for women who have or have had breast cancer. Several additional studies verified the safe use of estetrol in humans with no reports of significant negative side effects. Estetrol has a potential for the treatment of



menopausal symptoms including vasomotor symptoms, vulvovaginal atrophy and prevention of osteoporosis. It also has potential for use in combined oral contraceptives with minimal or no effects on liver and liver enzymes, as compared to ethinylestradiol, suggesting a lower risk for development of deep vein thrombosis.

#### KEY WORDS:

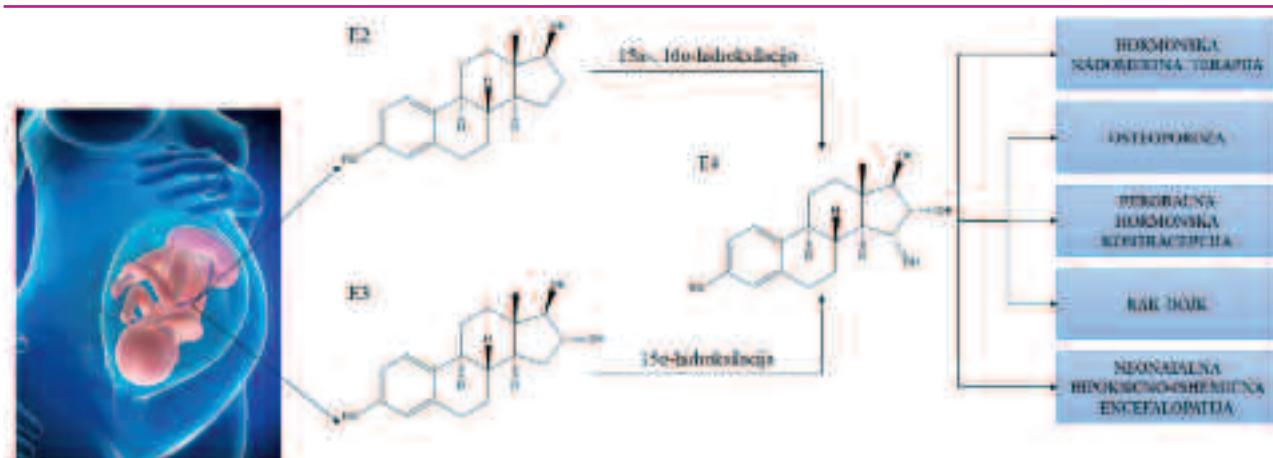
breast cancer, contraception, estetrol, estrogens, fetus

estriona (E1), estradiola (E2) in estriola (E3) prisoten vsaj še en, do tedaj nepoznan metabolit, ki ima v strukturi še eno dodatno hidroksilno skupino (1). Kmalu zatem so Gurpide in sod. preiskovali metabolizem E2 v urinu zdravih nosečnic s pomočjo intravenoznega vnosa  $^3\text{H}$ -E2 in  $^{14}\text{C}$ -E2. Potrdili so prisotnost metabolita, ki je mnogo bolj polaren kot E3 in ima enak infrardeči spekter, kot so ga objavili Diczfalusi in sod. (2). Gurpide in sod. so tudi prvi poimenovali spojino estetrol. Estetrol so nato uspešno izolirali iz 200 litrov zbranega urina nosečnic in identificirali s pomočjo plinske kromatografije (3, 4). Na osnovi fizikalnih in kemijskih lastnosti so zaključili, da je spojina 15 $\alpha$ -hidroksiestriol oz. estra-1,3,5(10)-trien-3,15 $\alpha$ -,16 $\alpha$ -,17 $\beta$ -tetrol (slika 1). Estetrol se sintetizira samo v jetrih ploda (v urinu nosečnic so ga detektirali najbolj zgodaj v devetem tednu nosečnosti), kjer potekata 15 $\alpha$ - in/ali 16 $\alpha$ -hidroksilacija E2 in E3 (slika 1) (5-

9). Plod dnevno proizvede okoli 3 mg E4, ki skozi placento prehaja do matere (10). Med nosečnostjo tako koncentracija E4 pri nosečnici stalno narašča in končno doseže koncentracijo 0,5 do 20 nM (11-13). Po porodu se v jetrih novorjenčka geni za encime 15 $\alpha$ - in 16 $\alpha$ -hidroksilacijo ne izražajo več in tako nastanek E4 iz E2 ali E3 ni več mogoč (14). Zaradi prisotnosti in povezave E4 z nosečnostjo so E4 proučevali kot potencialen biooznačevalec poteka nosečnosti. Ugotovili so, da zaradi velike intra- in intervarianabilnosti v plazemskih koncentracijah pri nosečnicah E4 ni primeren biooznačevalec (3, 11, 12, 15, 16). V 80. letih prejšnjega stoletja so raziskave o E4 popolnoma opustili, saj so eksperimentalni rezultati raziskav *in vitro* ter *in vivo* pokazali, da ima E4 prešibko estrogeno delovanje (potrebna tudi do 50-krat višja koncentracija E4 oz. zgolj 5-odstotna vezava na receptorje za estrogene (9, 17)), iz česar so sklepali, da ga posledično ne bo moč uporabljati v kliniki. Zanimanje za E4 se je obudilo leta 2001 in privelo do kliničnih raziskav za potencialno uporabo E4.

## 2 FARMAKODINAMIKA ESTETROLA

Podobno kot E2 se tudi E4 veže na jedrne receptorje za estrogene (ER), in sicer ima večjo afiniteto za vezavo na ER $\alpha$  ( $K_i = 4,9 \text{ nM} \pm 0,6 \text{ nM}$ ) kot na ER $\beta$  ( $K_i = 19,0 \text{ nM} \pm$



Slika 1: Estetrol (E4) se pri človeku sintetizira izključno v jetrih ploda, kjer potekata 15 $\alpha$ - in/ali 16 $\alpha$ -hidroksilacija estradiola (E2) in estriola (E3). Na desni strani slike je navedena potencialna klinična uporabnost E4 za nadomeščanje estrogenenih hormonov in za zdravljenje navedenih patologij.

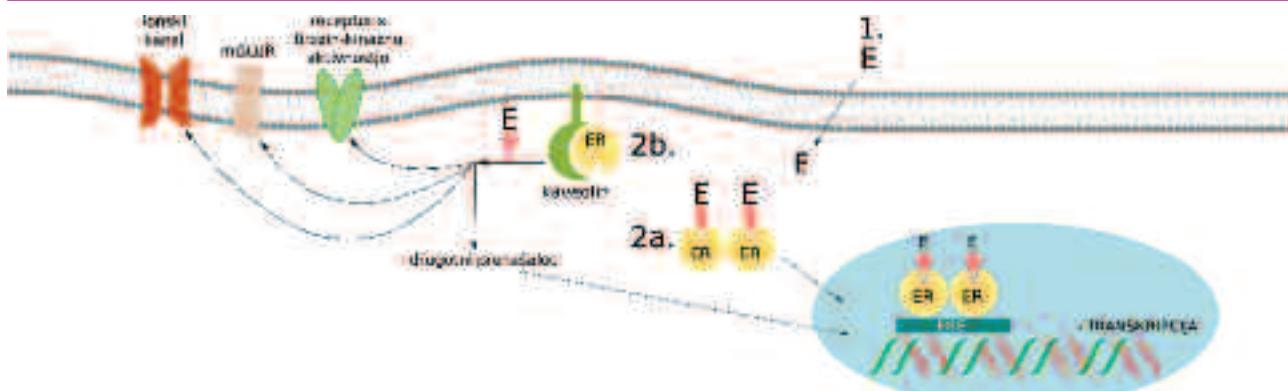
Figure 1: In humans, estetrol (E4) is produced only by fetal liver, with 15 $\alpha$ - and/or 16 $\alpha$ - hydroxylations of estradiol (E2) and estriol (E3). On the right side, potential clinical applications of E4 for estrogen hormone replacement and treatment of the pathologies are listed.

1,0 nM), nima značilno izražene afinitete za vezavo na druge steroidne receptorje (receptorji za glukokortikoide, progesteron, testosteron) in na 124 preizkušenih tarčnih molekul za učinkovine (9). Velika specifičnost vezave E4 na ER<sub>a</sub> nakazuje, da bi tveganje za pojav neželenih učinkov po sistemski aplikaciji E4 lahko bilo majhno. Poskusi na celični liniji MCF7 (modelna celična linija raka dojki z izraženimi ER) so pokazali, da je za dosego učinkov, podobnih E2, potrebna 50-krat večja koncentracija E4 (17). Pri človeku E4 učinkuje estrogeno na vagino, uterus oz. endometrij (18), možgane (zmanjša pojavnost vročinskih valov in zavira ovulacijo) (19, 20) ter povečuje mineralno kostno gostoto (21). Eden izmed napovednih dejavnikov za globoko vensko trombozo je med drugim tudi porast plazemske koncentracije vezavnega globulina za spolne hormone (SHBG, *sex hormone-binding globulin*), ki ga inducira E2, medtem ko so raziskave *in vivo* pokazale, da E4 ne inducira sinteze SHBG v hepatocitih (22). Zaradi odsotnosti vpliva E4 na SHBG ima E4 manjši prokoagulacijski učinek kot preostali estrogeni in zato dodaten potencial pri uporabi za hormonsko terapijo. Številne nadaljnje raziskave *in vitro* ter *in vivo* so pokazale, da ima E4 ob prisotnosti E2 antiestrogeno delovanje (23, 24). V nadalnjih obsežnih raziskavah *in vivo* ter *in vitro* so Abot in sod. bolj natančno opredelili mehanizem delovanja E4 (25). Rezultati raziskave *in vivo* na mišjem modelu, v kateri so uporabili velike odmerke E4 subkutano (100-krat višji odmerek kot E2) so pokazali, da

E4 v uterusu poveča izražanje genov (niz genov za katere je znano, da jih uravnava E2), proliferacijo epitela in prepreči nastanek ateroma (25). Vsi navedeni učinki so dokazano posledica aktivacije jedrnih ER<sub>a</sub> (25). Ugotovili so tudi, da E4 ne spodbudi aktivacije endotelijalne NO-sintaze in ne pospeši celjenja endotelija. Navedena učinka sta odvisna od membransko posredovane signalizacije steroidnih hormonov (MISS, *membrane-initiated steroid signalling*), ki je E4 ne aktivira (slika 2). Poskusi *in vitro* na celični liniji MCF7 so pokazali, da E4 nasprotuje membransko posredovanim učinkom E2 (25). Raziskava je potrdila že številne predhodne napovedi o uvrstitvi E4 med endogene selektivne modulatorje ER in tako odprla pot kliničnim raziskavam za potencialno uporabo E4.

### 3 FARMAKOKINETIKA ESTETROLA

Visser in sod. so v prvi raziskavi uporabe E4 pri ljudeh ugotovili, da pride 15 do 60 minut po zaužitju E4 do maksimalnega porasta v plazemski koncentraciji, nato se koncentracija E4 v plazmi hitro zmanjšuje, temu pa sledi drugi porast v plazemski koncentraciji E4. Tak časovni potek plazemskih koncentracij E4 po peroralni aplikaciji E4 bi



**Slika 2:** Estrogeni (E; E2 ali E4) vstopajo v celico (1.), po vezavi na receptor pa lahko posredujejo učinke z jedrno (2a.) ali membransko posredovano signalizacijo (2b.; delovanje na receptorje s tirozin-kinazno aktivnostjo, metabotropne receptorje za glutamat, ionske kanale ali delovanje s posredovanjem drugotnih prenašalcev). Estetrol posreduje učinke z vezavo na jedreni ER, medtem ko E2 posreduje učinke preko obeh navedenih mehanizmov. E – estrogen; ER – receptor za estrogene; ERE – na estrogene odzivni element; mGLUR – metabotropni receptor za glutamat.

**Figure 1:** Estrogens (E; E2 or E4) enter into the cell (1.) and mediate their effects via direct nuclear- (2a.) or membrane-initiated estradiol signaling (2b.; regulation of tyrosine kinase receptors, metabotropic glutamate receptors, membrane based ion channels or second-messenger systems). Estetrol mediates its effects by binding mainly to nuclear ER while E2 elicits effects by both pathways. E – estrogen; ER – estrogen receptor; ERE – estrogen response element; mGLUR – metabotropic glutamate receptor.



lahko pripisali fenomenu enterohepatičnega kroženja, ki je sicer značilen za estrogene, vendar ne moremo izključiti, da je drugi porast plazemskih koncentracij E4 posledica njegove kumulacije in nato sproščanja iz maščobnega tkiva (14). Estetrol se za razliko od drugih steroidov ne veže na SHBG, kar poveča delež v plazmi prostega E4 (22). K povečanju v plazmi prostega E4 prispeva tudi veliko manjša vezava na albumin v primerjavi z E2 (60 %) (26). Estetrol tudi v veliki koncentraciji (10  $\mu$ M) ne vpliva na aktivnost glavnih jetrnih encimov citokromov P-450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4), ki so v največji meri povezani z metabolizmom ksenobiotikov (9, 22). Metabolizem E4 poteka z glukuronidacijo in/ali sulfatacijo. Farmakokinetični profil so natančno proučili Gemzell-Danielsson in sod., ki so v raziskavo (klinična raziskava NCT00163033) vključili 49 žensk po menopavzi in potrdili aplikacije dnevnega peroralnega odmerka E4 v razponu med 2 mg in 40 mg (27). Raziskave so razkrile, da se metabolizem E4 med glodavci in človekom precej razlikuje, in sicer se pri glodavcih E4 z oksidoreduktijskimi reakcijami hitro metabolizira (biološki razpolovni čas 2 do 3 ure). Te reakcije I. faze metabolizma pa lahko privedejo do nastanka aktivnih metabolitov, kateholov in kinonov (28). Reakcijam I. faze pri človeku sledijo reakcije II. faze metabolizma, in sicer glukuronidacija na obroču D, pri čemer nastanejo neaktivni metaboliti, biološki razpolovni čas E4 pri človeku pa tako znaša 28 ur. Za razliko od drugih estrogenov se E4 ne izloča samo skozi jetra, temveč tudi skozi ledvice, kar razbremeni žolčnik in zmanjša že znane neželene učinke uporabe klasičnih sinteznih estrogenov, kot so žolčni kamni, vnetje žolčnika in maligne bolezni (29, 30). Farmakokinetične lastnosti E4 pri človeku (počasen metabolizem, dolg biološki razpolovni čas in velika biološka uporabnost) tako omogočajo enkratni peroralni odmerek E4 (9, 14, 31).

## 4 POTENCIJALNA UPORABA ESTETROLA V MEDICINI

Cilji prve dvojno slepe, randomizirane, s placeboom kontroliранe klinične raziskave, katere rezultate so objavili leta 2008, so bili: ovrednotenje varnosti, sposobnosti sprejemanja zdravljenja, farmakokinetike in vpliva E4 na gondotropine. V raziskavo so vključili 32 zdravih žensk v obdobju po nastopu menopavze, ki so prejemale E4 peroralno, in sicer v enkratnem odmerku. Ženske so bile

razdeljene v štiri skupine glede na različne prejete odmerke E4: i) 0,1 mg, ii) 1 mg, iii) 10 mg in iv) 100 mg enkrat dnevno (šest žensk na skupino), ki so jih primerjali s štirimi placebo skupinami (dve ženski na skupino). Ugotovili so, da E4 v odvisnosti od odmerka zavira porast plazemske koncentracije luteinizirajočega hormona (LH), mnogo večji pa je njegov zaviralni učinek na plazemske koncentracije folikle stimulirajočega hormona (FSH). Navedeni rezultati dokazujejo delovanje E4 na osrednji živčni sistem oz. na hipofizo. V raziskavi je bila sposobnost sprejemanja zdravljenja z E4 ustrezna, prav tako tudi v skupini, ki je prejemala največji odmerek (100 mg), niso poročali o kakršnih koli neželenih učinkih (14). Med raziskavo niso poročali o nobenih varnostnih težavah, povezanih z aplikacijo različnih odmerkov E4, in s tem zaključili, da je uporaba E4 pri ljudeh ustrezna in varna. Farmakokinetični parametri, ki izvirajo iz te raziskave, so že opisani v prejšnjem poglavju. Na osnovi vseh pozitivnih predhodnih raziskav *in vitro*, *in vivo* ter prvih kliničnih raziskav, so nadaljevali z vrsto raziskav, s katerimi so želeli preveriti možnost klinične uporabe E4.

### 4.1 HORMONSKA NADOMEŠTNA TERAPIJA

Učinkovitost E4 pri lajšanju vročinskih valov so proučevali *in vivo* pri podghanah, ki predstavljajo vzorčni model za raziskave vazomotoričnih simptomov menopavze. Spremljali so učinkovitost zaviranja porasta temperature pri ovariekтомiziranih podghanah po dodatku naloksona (antagonista opioidnih receptorjev, ki povzroči povišanje telesne temperature). Ugotovili so, da je učinek E4 v odmerku 3 mg/kg/dan primerljiv z 10-krat nižjim odmerkom etinilestradiola (EE), ki je služil kot pozitivna kontrola (19). Raziskava je tako potrdila učinkovitost E4 pri lajšanju vročinskih valov, ki nastopajo v peri- in pomenopavzalnem obdobju. Dodatne raziskave *in vivo* na ovariekтомiziranih podghanah so pokazale, da ima E4 pri peroralnem zaužitju tudi pozitivne učinke na vagino, uterus in endometrij, kar bi lahko omogočalo terapijo urogenitalne in vulvovaginalne atrofije. Zaradi učinka E4 na proliferacijo endometrija pa bi bila pri ženskah z maternico potrebna dodatna zaščita s progestini zaradi morebitne endometrijske hiperplazije in potencialnega razvoja raka endometrija (18, 21). V predklinični raziskavi so Péqueux in sod. pokazali, da E4 sicer stimulira rast hormonsko odvisnega raka dojk, vendar v koncentracijah, ki presegajo terapevtske koncentracije ( $> 10$  nM), potrebne za zdravljenje simptomov menopavze (32). Učinke E4 na vazomotorične simptome, vagino in endometrij so

nato preiskovali Gemzell-Danielsson in sod., ki so v raziskavo (klinična raziskava NCT00163033) vključili 49 žensk v obdobju po nastopu menopavze. Zaradi potencialno negativnega učinka E4 na hiperplazijo endometrija so največje odmerke E4 (20 mg in 40 mg) prejеле ženske, ki so jih predhodno zdravili s histerektomijo, preostale preiskovanke pa so prejemale 2 mg ali 10 mg E4. Primerjalna skupina je prejemala 2 mg estradiolvalerata, endogenemu estrogenu najbolj podobno obliko estrogena, ki je kot estrogenska komponenta peroralnih kontraceptivov že uveljavljen v klinični praksi. Rezultati raziskave so pokazali, da je E4 varen, brez resnih neželenih učinkov, izkazuje estrogene učinke na vaginalne celice in tako potencialno omogoča terapijo vulvovaginalne atrofije. Povečanje debeline endometrija je bilo proporcionalno povečanju odmerka E4, zmanjšanje vročinskih valov pa je bilo moč zaznati v skupinah, ki so prejemale 2 mg E4, 10 mg E4 in 2 mg estradiolvalerata. Splošen zaključek raziskave tako potrjuje varno uporabo E4 za namene hormonske nadomestne terapije in izpostavlja potrebo po nadalnjih kliničnih raziskavah na večjem številu preiskovank (33).

## 4.2 OSTEOPOROZA

Christiansen in sod. so z raziskavo *in vivo* pokazali, da ima E4 veliko biološko uporabnost, inhibira porast koncentracije osteokalcina, ki je posledica znižanja koncentracije estrogenov zaradi ovariekтомije, poveča mineralno kostno gostoto ter poveča trdnost kosti, ki so oslabljene zaradi znižanja koncentracije estrogenov kot posledice ovariekтомije. Pri tej raziskavi so bili učinki E4 v odmerku 2,5 mg/kg/dan primerljivi z učinki EE 0,1 mg/kg/dan (EE je služil kot pozitivna kontrola) (21). Raziskave *in vivo* so pokazale, da ima E4 v odmerku 3 mg/kg/dan ali 10 mg/kg/dan v obdobju osmih oz. štirih tednov ugoden varnostni profil, brez neželenih učinkov ali smrtnih izidov (18-20, 23). Pri ženskah v obdobju po menopavzi so ugotovili, da E4 v odvisnosti od odmerka zmanjša koncentracijo označevalca kostne resorpциje (C-telopeptid) in označevalca kostne izgradnje (osteokalcin). Mnogo bolj izražen inhibicijski učinek kostne resorpциje tako predstavlja povečano tvorbo kosti in možnost uporabe E4 pri preprečevanju nastanka osteoporoze (34). Podoben pozitiven učinek na kosti (klinična raziskava NTR2102) pa so kasneje pokazali tudi pri mladih adolescentnih ženskah (35). Vse navedeno je dodatno pripomoglo in odprlo pot kliničnim raziskavam uporabe E4 pri preprečevanju nastanka osteoporoze pri ženskah v peri- in pomenopavzalnem obdobju.

## 4.3 PERORALNA HORMONSKA KONTRACEPCIJA

Holinka in sod. so *in vivo* primerjali učinek inhibicije ovulacije z E4 in z EE (EE je še vedno najbolj pogosta estrogenska komponenta v kombiniranih kontraceptivih). Rezultati raziskave so pokazali, da je učinek E4 proporcionalen velikosti odmerka. Sicer je E4 18-krat manj učinkovit kot EE, vendar pri predlaganem režimu odmerjanja v enaki meri uspešno zavira ovulacijo in tako predstavlja potencialno novo estrogensko komponento v kombiniranih kontraceptivih (20). V odprtih, paralelnih, pilotnih raziskavah (klinična raziskava NTR2102) so proučevali učinkovitost zaviranja osi hipofiza-jajčnik pri različnih odmerkih E4 v kombinaciji s progestinoma drospirenonom ali levonorgestrelom v primerjavi z EE v kombinaciji z drospirenonom. V raziskavo so vključili 109 zdravih žensk, starih med 18 in 35 let, in jih razdelili v šest skupin glede na predpisani režim odmerjanja: i) 5 mg E4 in 3 mg drospirenon, ii) 10 mg E4 in 3 mg drospirenon, iii) 5 mg E4 in 150 µg levonorgestrel iv) 10 mg E4 in 150 µg levonorgestrel, v) 20 mg E4 in 150 µg levonorgestrel, vi) 20 µg EE in 3 mg drospirenon. Ženske, vključene v raziskavo, so predpisane kombinacije prejemale v času treh menstrualnih ciklov. Ključna ugotovitev navedene raziskave je bila dokazano učinkovito zaviranje ovulacije z E4 v odmerku 10 mg/dan ali več v kombinaciji s progestinom (36). Dodatno so pri isti skupini preiskovank proučevali učinek navedenih kombinacij na delovanje ledvic, metabolizem lipidov, kostne označevalce in endokrine parametre ter ugotovili, da imajo kombinacije z E4 minimalne učinke na preiskovane organe in parametre (35). V tretjem delu raziskave so proučili učinek kombinacije E4 z drospirenonom na biooznačevalce hemostaze. Dokazali so, da ima navedena kombinacija antikoagulantni učinek in s tem potencialno zmanjša tveganje za trombozo, kar pa bi bilo potrebno potrditi pri večjem številu preiskovank (37). Nadaljnje proučevanje uporabe in opredelitev natančnejšega odmerka E4 v kombiniranih peroralnih kontraceptivih predstavlja raziskava FIESTA (klinična raziskava NCT01221831), kjer so proučevali učinkovitost nadzora ovulacijskega cikla, vmesnih ali pikčastih krvavitev, sprejemljivost pri uporabnicah, zadovoljstvo, nadzor telesne mase in vsesplošno dobro počutje. V raziskavo je bilo vključenih 389 zdravih žensk, ki so jih za obdobje šestih ciklov razdelili v štiri skupine glede na predpisani režim odmerjanja: i) 15 mg E4 in 3 mg drospirenon, ii) 15 mg E4 in 150 µg levonorgestrel, iii) 20 mg E4 in 3 mg drospirenon, iv) 20 mg E4 in 150 µg levonorgestrel. Primerjalna



skupina preiskovank je prejemala estradiolvalerat v kombinaciji z dienogestom (progesterin, derivat nortestosterona z močnim gestagenskim učinkom). Glede na vse preiskovane parametre je bila najbolj ugodna in klinično uporabna kombinacija 15 mg E4 in 3 mg drospirenona, ki so jo nadalje proučevali v okviru klinične raziskave III. faze (38, 39).

#### 4.4 RAK DOJK

Raziskava *in vivo* delovanja E4 na modelu podgane s hormonsko odzivnim rakom dojk (kemična indukcija raka s 7,12-dimetilbenzantracenom) je bila razdeljena na dva dela. Pri preventivnem delu raziskave so proučevali učinek E4 v odmerkih 0,5 do 3,0 mg/kg, v intervencijskem delu pa učinke 1 mg/kg, 3 mg/kg in 10 mg/kg odmerka E4. Pri raziskavah sta bili kot referenčni spojini uporabljeni tamoksifen (selektivni modulator receptorjev za estrogene, ki ga uporabljamo v terapiji na ER pozitivnih rakov dojk; v odmerkih 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mg/kg), ter EE (terapevtsko uporaben agonist ER $\alpha$ , ki ima primerljive učinke s tamoksifensom; 0,025; 0,125; 0,15; 0,5 mg/kg), medtem ko so kontrolno skupino sestavljale ovariekтомizirane podgane. Rezultati preventivne raziskave po osmih tednih prejemanja E4 so pokazali, da E4 v odvisnosti od odmerka zmanjša število in velikost tumorjev z učinkovitostjo, ki je primerljiva terapiji s tamoksifensem ali ovariekтомijo. Pri intervencijski raziskavi na podghanah, ki so že razvile tumor, pa je E4 po štirih tednih uporabe značilno zmanjšal tako število kot tudi obseg tumorjev (23, 40). Potencialno terapevtsko uporabo E4 pri hormonsko odvisnih rakih dojk so s pomočjo modelov *in vitro* potrdili tudi drugi raziskovalci (32, 41). Prva prospektivna, randomizirana, dvojno slepa s placeboom kontrolirana klinična raziskava (klinična raziskava NCT00464516) je vključevala 30 bolnic z rakom dojk s prisotnimi receptorji za estrogene v obdobju pred menopavzo ali po njenem nastopu. V tej raziskavi so bolnice 14 dni pred operativnim posgom prejemale 20 mg E4. Ugotovili so, da ima E4 proapoptotične učinke na tumorsko tkivo, ne stimulira proliferacije (nespremenjeno izražanje označevalca Ki67), zmanjša se intratumorsko izražanje ER $\alpha$ , poveča se izražanje ER $\beta$ , poveča se tudi koncentracija SHBG, zaradi česar je nato prišlo do zmanjšanja koncentracije E2, zmanjša se koncentracija sistemskega IGF-1 (*insulin growth factor 1*) in FSH (42). Rezultati te raziskave so tako potrdili rezultate predhodnih raziskav *in vitro* ter *in vivo*, ki so predpostavljale protitumorno delovanje E4 na celice raka dojk.

#### 4.5 RAK PROSTATE

V okviru dvojno slepe, randomizirane s placeboom kontrolirane klinične raziskave (klinična raziskava NCT02718378) so proučevali potencialno uporabo E4 v terapiji raka prostate. Vključenih je bilo 45 zdravih preiskovancev, ki so jih razdelili v tri skupine. V vsaki skupini so imeli preiskovance, ki so prejemali placebo (5 oseb), ter skupino, ki je prejemala E4 (10 oseb; odmerki: 20 mg, 40 mg in 60 mg). Rezultati raziskave so pokazali, da je učinek zmanjšanja koncentracije testosterona terapevtsko nezadosten. Debruyne in sod. so na osnovi pridobljenih kliničnih in farmakodinamičnih karakteristik predpostavili, da bi E4 v odmerku 40 mg skupaj z analogi luteinzirajoči hormon sproščajočimi hormoni (*luteinizing hormone-releasing hormone*), ki so trenutno del endokrine terapije raka prostate, sicer lahko predstavljal potencialno ugodno terapevtsko kombinacijo, vendar so potrebne nadaljnje klinične raziskave (43).

#### 4.6 NEONATALNA HIPOKSIČNO-ISHEMIČNA ENCEFALOPATIJA

Estetrol ima med estrogeni največje število prostih OH-skupin, kar kaže na potencialno močan antioksidativni učinek te spojine. Foidart in sod. so tako na ravni *in vitro* ter *in vivo* preiskovali antioksidativni učinek E4 ter v povezavi s tem učinkovitost in morebitno uporabo E4 pri neonatalni hipoksično-ishemični encefalopatiji (HIE). Pokazali so, da E4 značilno zmanjša aktivnost laktat dehidrogenaze (posledica celičnih poškodb zaradi HIE; laktat dehidrogenaza predstavlja napovedni dejavnik prisotnosti bolezni) ter v osrednjem živčnem sistemu poveča proliferacijo celic. *In vivo* je E4 zmanjšal izgubo zgodnje sivine ter spodbudil nevrogenezo in angiogenezo (44). Z raziskavo so tako prvi pokazali zaščitno delovanje E4 v hipokampusu in korteksu živalskega modela HIE. V naslednji raziskavi je ista raziskovalna skupina pokazala, da pri neonatalni HIE uporaba E4 v kombinaciji z drugimi steroidi (E2, progesteron) nima nobenih koristi v primerjavi z E4 (45). Z nadaljnji raziskavami *in vitro* ter *in vivo* so povezali antioksidativni učinek E4 z njegovo vezavo na ER $\alpha$  in ER $\beta$ , nevrogenezo in promielinizacijo pa z vezavo E4 na ER $\beta$  (46). Piel in sod. so za morebitno zdravljenje HIE razvili nov dostavni sistem, in sicer E4, vgrajen v ciklodekstrin, ki sestavlja liposom. Rezultati *in vitro* so pokazali, da pri tem ne prihaja do hemolize, agregacije trombocitov in dostavni sistem ne vpliva na koagulacijo, kar bi omogočilo predvideno intravensko uporabo brez neželenih in toksičnih učinkov. Testi so pokazali, da

## 5 ZAKLJUČEK

Estetrol je naravni estrogen, strukturno podoben E2 in E3, vendar s številnimi različnimi, potencialno klinično zelo ugodnimi lastnostmi. V primerjavi z E2 ima E4 pri zaužitju precej večjo biološko uporabnost, njegov eliminacijski čas je mnogo daljši, kar omogoča aplikacijo E4 enkrat dnevno. Metabolizem E4 poteka z glukuronidacijo in/ali sulfatacijo, medtem ko drugih metabolitov niso detektirali. Na modelih raka dojk *in vitro* E4 nasprotuje učinkom E2, na modelu podgan pa zavira rast raka dojk, kar kaže na ugoden profil v primerjavi z drugimi estrogeni in na potencialno primerost uporabe E4 v hormonski nadomestni terapiji pri bolnicah s trenutnim ali že prebolelim rakom dojk. Rezultati predkliničnih raziskav kažejo na varno uporabo E4 pri ljudeh za terapijo vazomotoričnih simptomov menopavze, vulvovaginalne atrofije, za preprečevanje osteoporoze ter za uporabo v kombiniranih kontraceptivih. Estetrol ima minimalne učinke na sintezo lipoproteinov, SHBG, hemostazo in s tem majhno tveganje za vensko tromboembolijo. Nadaljnje klinične raziskave so potrdile varno in terapevtsko učinkovito uporabo E4, letos pa se je zaključila tudi že III. faza klinične raziskave uporabe E4 in drospirenona v kombiniranih peroralnih kontraceptivih.

## 6 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za finančno podporo v okviru projekta J3-8212.

## 7 LITERATURA

- Hagen AA, Barr M, Diczfalusy E. Metabolism of 17-Beta-Oestradiol-4-14-C in Early Infancy. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1965;49:207-20.

- Gurpide E, Schwers J, Welch MT, Vande Wiele RL, Lieberman S. Fetal and maternal metabolism of estradiol during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1966;26(12):1355-65.
- Heikkila J, Luukkainen T. Urinary excretion of estriol and 15 alpha-hydroxyestriol in complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1971;110(4):509-21.
- Zucconi G, Lisboa BP, Simonitsch E, Roth L, Hagen AA, Diczfalusy E. Isolation of 15-alpha-hydroxy-oestriol from pregnancy urine and from the urine of newborn infants. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1967;56(3):413-23.
- Schwers J, Eriksson G, Diczfalusy E. 15alpha-Hydroxylation: A New Pathway of Estrogen Metabolism in the Human Fetus and Newborn. *Biochim Biophys Acta*. 1965;100:313-6.
- Hagen AA. Formation of 15-alpha-hydroxyestriol from 4-14C-17-beta-estradiol and 6,7-3H-estriol by an anencephalic. *J Clin Endocrinol Metab*. 1970;30(6):763-8.
- Schwers J, Govaerts-Videtsky M, Wigqvist N, Diczfalusy E. Metabolism of oestrone sulphate by the previable human foetus. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1965;50(4):597-610.
- Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJ. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;110(1-2):138-43.
- Visser M, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:64-8.
- Fishman J, Solomon S. Metabolism production and excretion rates of 15alpha-hydroxyestriol in late pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972;35(3):339-44.
- Tulchinsky D, Frigoletto FD, Jr., Ryan KJ, Fishman J. Plasma estetrol as an index of fetal well-being. *J Clin Endocrinol Metab*. 1975;40(4):560-7.
- Kundu N, Wachs M, Iverson GB, Petersen LP. Comparison of serum unconjugated estriol and estetrol in normal and complicated pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1981;58(3):276-81.
- Fleck SC, Twaddle NC, Churchwell MI, Doerge DR, Pande P, Teeguarden JG. Comparative estrogenicity of endogenous, environmental and dietary estrogens in pregnant women I: Serum levels, variability and the basis for urinary biomonitoring of serum estrogenicity. *Food Chem Toxicol*. 2018;115:511-22.
- Visser M, Holinka CF, Coelingh Bennink HJ. First human exposure to exogenous single-dose oral estetrol in early postmenopausal women. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:31-40.
- Kundu N, Grant M. Radioimmunoassay of 15alpha-hydroxyestriol (estetrol) in pregnancy serum. *Steroids*. 1976;27(6):785-96.
- Notation AD, Tagatz GE. Unconjugated estriol and 15alpha-hydroxyestriol in complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1977;128(7):747-56.
- Jozan S, Kreitmann B, Bayard F. Different effects of oestradiol, oestriol, estetrol and of oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1981;98(1):73-80.
- Heegaard AM, Holinka CF, Kenemans P, Coelingh Bennink HJ. Estrogenic uterovaginal effects of oral estetrol in the modified Allen-Doisy test. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:22-8.
- Holinka CF, Brincat M, Coelingh Bennink HJ. Preventive effect of oral estetrol in a menopausal hot flush model. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:15-21.
- Coelingh Bennink HJ, Skouby S, Bouchard P, Holinka CF. Ovulation inhibition by estetrol in an *in vivo* model. *Contraception*. 2008;77(3):186-90.
- Coelingh Bennink HJ, Heegaard AM, Visser M, Holinka CF, Christiansen C. Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. *Climacteric*. 2008;11 Suppl 1:2-14.



22. Hammond GL, Hogeveen KN, Visser M, Coelingh Bennink HJ. Estetrol does not bind sex hormone binding globulin or increase its production by human HepG2 cells. *Climacteric.* 2008;11 Suppl 1:41-6.
23. Coelingh Bennink HJT, Singer C, Simoncini T, Genazzani AR, Holinka CF, Kubista E. Estetrol, a pregnancy-specific human steroid, prevents and suppresses mammary tumor growth in a rat model. *Climacteric.* 2008;11(sup1):29.
24. Pluchino N, Santoro AN, Casarosa E, Giannini A, Genazzani A, Russo M, et al. Effect of estetrol administration on brain and serum allopregnanolone in intact and ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;143:285-90.
25. Abot A, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, et al. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor alpha modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol Med.* 2014;6(10):1328-46.
26. Wu CH, Motohashi T, Abdel-Rahman HA, Flickinger GL, Mikhail G. Free and protein-bound plasma estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;43(2):436-45.
27. Coelingh Bennink HJT, Verhoeven C, Zimmerman Y, Visser M, Foidart JM, Germzell-Danielsson K. Pharmacokinetics of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Climacteric.* 2017;20(3):285-9.
28. Hevir N, Šinkovec J, Rižner TL. Disturbed expression of phase I and phase II estrogen-metabolizing enzymes in endometrial cancer: lower levels of CYP1B1 and increased expression of S-COMT. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;331(1):158-67.
29. Donovan JM. Physical and metabolic factors in gallstone pathogenesis. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999;28(1):75-97.
30. Cirillo DJ, Wallace RB, Rodabough RJ, Greenland P, LaCroix AZ, Limacher MC, et al. Effect of estrogen therapy on gallbladder disease. *JAMA.* 2005;293(3):330-9.
31. Jirku H, Kadner S, Levitz M. Pattern of estetrol conjugation in the human. *Steroids.* 1972;19(4):519-34.
32. Gerard C, Mestdagt M, Tskitishvili E, Communal L, Gompel A, Silva E, et al. Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. *Oncotarget.* 2015;6(19):17621-36.
33. Coelingh Bennink HJ, Verhoeven C, Zimmerman Y, Visser M, Foidart JM, Germzell-Danielsson K. Clinical effects of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Maturitas.* 2016;91:93-100.
34. Visser M, Coelingh Bennink HJ. Clinical applications for estetrol. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(1-2):85-9.
35. Mawet M, Maillard C, Klipping C, Zimmerman Y, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2015;20(6):463-75.
36. Duijkers IJ, Klipping C, Zimmerman Y, Appels N, Jost M, Maillard C, et al. Inhibition of ovulation by administration of estetrol in combination with drospirenone or levonorgestrel: Results of a phase II dose-finding pilot study. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2015;20(6):476-89.
37. Kluft C, Zimmerman Y, Mawet M, Klipping C, Duijkers IJ, Neuteboom J, et al. Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception.* 2017;95(2):140-7.
38. Apter D, Zimmerman Y, Beekman L, Mawet M, Maillard C, Foidart JM, et al. Bleeding pattern and cycle control with estetrol-containing combined oral contraceptives: results from a phase II, randomised, dose-finding study (FIESTA). *Contraception.* 2016;94(4):366-73.
39. Apter D, Zimmerman Y, Beekman L, Mawet M, Maillard C, Foidart JM, et al. Estetrol combined with drospirenone: an oral contraceptive with high acceptability, user satisfaction, well-being and favourable body weight control. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2017;22(4):260-7.
40. Visser M, Kloosterboer HJ, Bennink HJ. Estetrol prevents and suppresses mammary tumors induced by DMBA in a rat model. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2012;9(1):95-103.
41. Yue W, Verhoeven C, Bernnink HC, Wang JP, Santen RJ. Pro-Apoptotic Effects of Estetrol on Long-Term Estrogen-Deprived Breast Cancer Cells and at Low Doses on Hormone-Sensitive Cells. *Breast Cancer (Auckl).* 2019;13:1178223419844198.
42. Singer CF, Bennink HJ, Natter C, Steurer S, Rudas M, Moinfar F, et al. Antiestrogenic effects of the fetal estrogen estetrol in women with estrogen-receptor positive early breast cancer. *Carcinogenesis.* 2014;35(11):2447-51.
43. Coelingh Bennink HJT, Zimmerman Y, Verhoeven C, Dutman AE, Mensinga T, Kluft C, et al. A Dose-Escalating Study With the Fetal Estrogen Estetrol in Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(9):3239-49.
44. Tskitishvili E, Nisolle M, Munaut C, Pequeux C, Gerard C, Noel A, et al. Estetrol attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol.* 2014;261:298-307.
45. Tskitishvili E, Pequeux C, Munaut C, Viellevoye R, Nisolle M, Noel A, et al. Use of estetrol with other steroids for attenuation of neonatal hypoxic-ischemic brain injury: to combine or not to combine? *Oncotarget.* 2016;7(23):33722-43.
46. Tskitishvili E, Pequeux C, Munaut C, Viellevoye R, Nisolle M, Noel A, et al. Estrogen receptors and estetrol-dependent neuroprotective actions: a pilot study. *J Endocrinol.* 2017;232(1):85-95.
47. Palazzo C, Laloy J, Delvigne AS, Nys G, Fillet M, Dogne JM, et al. Development of injectable liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposome formulations encapsulating estetrol to prevent cerebral ischemia of premature babies. *Eur J Pharm Sci.* 2019;127:52-9.

# DRUŠTVENE VESTI

## ACTIVITIES FROM THE SOCIETY

### OTVORITEV LEKARNIŠKEGA IN ALKEMISTIČNEGA MUZEJA V RADOVLJICI

Prof. dr. Franc Kozjek

V Radovljici na Linhartovem trgu št. 28 je magister farmacije Milan Plešec 7. junija 2019 odprl stalno zbirko starih predmetov, lekarniške opreme in alkemističnih laboratorijev. Poimenoval jo je muzej in po mojem skromnem mnenju si ta



naziv tudi zasluži. V njem je na 450 kvadratnih metrih razstavne površine predstavljenih več kot 2000 eksponatov velike kulturno-zgodovinske in etnološke vrednosti z vsega sveta. Obiskovalec si lahko ogleda opremo starih lekarn iz 18. in 19. stoletja z vsem za lekarniško delo potrebnim orodjem, kot so stare lesene, keramične in steklene posode, stari možnarji najrazličnejših velikosti in starosti, stare tehtrnice z utežmi ter farmacevtske in botanične knjige iz 15. in vse do 19. stoletja. Na ogled je tudi pravi alkemistični laboratorij z vso potrebno opremo.

Razstavljene predmete je naš vneti zbiratelj pridobil na različnih koncih sveta. Tako se v njegovi zbirki lahko vidi, poleg slovenskih, tudi lekarniške predmete iz stare Perzije, Indije, Kitajske, Japonske, Mehike, Španije, Francije, Avstrije, Nemčije in celo iz starega Rima.

Posebno vrednost daje zbirki dokumentarno gradivo, ki obiskovalce seznavi s časom in krajem, kjer so predstavljene predmete izdelovali in uporabljali. K temu je dodan tudi ambient, ki na svojstven način pričara nekoliko skrivnostno vzdušje delovanja starih zdravilcev, alkemistov in враčev.

Za predstavitev svoje veličastne zbirke je mag. Plešec izbral Radovljico, ki slovi po svojem kulturno-zgodovinskem ugledu. S tem je obogatil ne samo svojo zbirko, temveč tudi kraju in njegovim obiskovalcem omogočil vrhunsko kulturno zgodovinsko doživetje.

Muzej je odprt vsak dan od 10. do 20. ure.

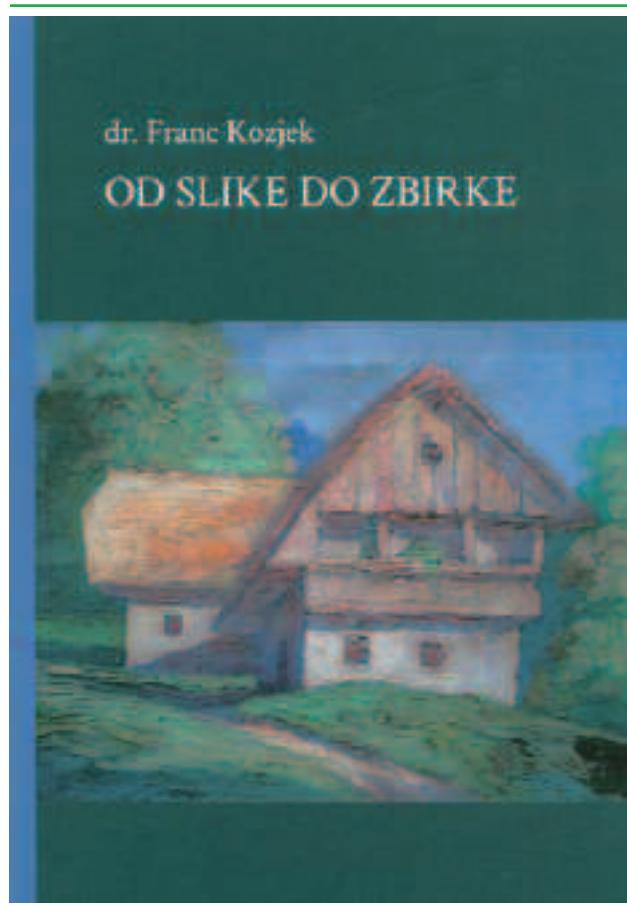


# UMETNOSTNI ZBIRKI DR. FRANCA KOZJEKA NA POT

Aleksander Bassin, muzejski svetnik

Ob poznovanju zasebnih zbirk po Sloveniji lahko zapišem, da je izbor prominentnih slikarskih del izbranih umetnikov, slovenskih kot tudi iz kulturnih prostorov naše nekdanje skupne države, ki jih predstavlja ta publikacija, več kot hvalevredno dejanje. Ne samo zaradi tega, ker jo moj sošolec iz prvega razreda osnovne šele Vadnica na Resljevi cesti v Ljubljani skupaj z originalnimi umetninami prepušča v vednost in posest svojim potomcem, ampak predvsem zato, ker je pridobitev posamezne slike vestno pospremil z zapisom, kako, kje in kdaj se je to zgodilo. Danes lahko samo občudujemo to njegovo vestnost in seveda skoraj panegirični komentar, zakaj je izbral določenega umetnika, pri čemer mu je bilo izhodiščno vodilo predvsem velika razstava v Parizu leta 1971, s katero smo se predstavili pod naslovom *Umetnost na tleh Jugoslavije od prazgodovine do danes*. Dr. Kozjek je isto razstavo potem videl, ko so jo predstavili v istem obsegu po pariški premieri še v Sarajevu. Službene poti dr. Kozjeka kot predsednika Zveze farmacevtskih društev Jugoslavije je naš zbiralec znal v prostem času izkoristiti in tako zadostiti svojemu zanimanju in občudovanju likovne umetnosti.

Knjigo lahko naročite na naslovu:  
[franc.kozjek@telemach.net](mailto:franc.kozjek@telemach.net)





## 44. SKUPŠČINA SFD IN SIMPOZIJ

Jelka Dolinar

Letošnji simpozij ob redni letni skupščini je tradicionalno potekal v Kongresnem centru Bernardin v Portorožu v dneh od 9. do 11. maja 2019. Teme so bile usmerjene k boleznim, ki so tesno povezane z vnosom ustreznih količin vitaminov in mineralov: BOLEZNI ŠČITNICE, OSTEOPENIJA IN OSTEOFOROZA, ANEMIJE ter PARODONTALNA BOLEZEN. Častno predavanje na simpoziju je organizacijski odbor poklonil Jelki Dolinar, ki je z udeleženci delila spomine na 33 let dela v Slovenskem farmacevtskem društvu. Za organizacijo simpozija je skrbel organizacijski odbor, ki ga tradicionalno stavljajo predstavniki različnih področij dela v farmaciji.

Vabilna 44. skupščina SFD je potekala zadnji dan srečanja, v soboto, 11. maja 2019, v kongresnem centru Bernardin

v Portorožu. Po poročilih o delu in poslovanju za leto 2018, ki so jih delegati soglasno potrdili, je svojo vizijo vodenja SFD v naslednjih dveh letih predstavil kandidat za predsednika SFD, sicer predsednik zadnjih treh mandatov mag. Matjaž Tuš. Vnovično kandidaturo je sprejel po tehtnem premislu predvsem zato, ker se zaveda pomena ohranjanja kontinuitete dela na Društvu, ki bo v naslednjem letu zahtevala veliko prilagajanja zaradi odhoda generalne sekretarke v pokoj. Poleg tega postaja z uveljavljivijo licenc in zbiranjem obveznih licenčnih točk podpora, ki jo lekariniškim farmacevtom nudijo strokovna izpopolnjevanja SFD, zlasti tista, ki so za člane brezplačna, še pomembnejša. Konkurenčnost na trgu ponudbe različnih strokovnih izpopolnjevanj in drugih strokovnih in znanstvenih dogodkov bo Društvo ohranilo le z dobrimi, neodvisnimi vsebinami ter inovativnimi in sodobnimi načini posredovanja novih znanj. V primeru dogodkov, ki so pretežno namenjeni magistrom farmacije, ki delujejo v lekarniški dejavnosti, pa je



Člani organizacijskega odbora simpozija ob redni letni skupščini SFD: Matjaž Tuš (Lekarniška zbornica Slovenije), Marko Anderluh (Fakulteta za farmacijo), Katja Razinger (Lek Sandoz), Jelka Dolinar (SFD), Tomaž Vovk (Fakulteta za farmacijo), Alenka Rutar Paris (Kemofarmacija), Mojca Prah Klemenčič (Krka), Gašper Marc (JAZMP). Na sliki manjkajo Vladka Češek Bizjak (Lekarna Ljubljana), Janez Toni (Lekarna bolnice Golnik) in Borut Štrukelj (Fakulteta za farmacijo).



nujen pogoj tudi ta, da so ocenjeni s strani LZS in da udeležencem prinašajo licenčne točke. Poleg programov izobraževanj je mag. Tuš izpostavil tudi založniško dejavnost SFD, ki predstavlja ključno dejavnost za promocijo stroke in uveljavljanje poklica. Še naprej pa bo podpiral tudi tiste oblike dejavnosti Društva, ki člane združujejo v neformalnem okolju in krepijo medsebojne vezi.

Aktivnosti v letu 2019, ki jih načrtujejo matično društvo, sekcije in podružnice, so bile navedene v delegatskem gradivu, na kratko jih je našel tudi mag. Tuš.

V zvezi s spremembo Pravilnika o delovanju podružnic in sekcij je mag. Tuš posebej izpostavil, da primarno strukturo društva predstavljajo podružnice in da povezovanje v sekcije predstavlja povezovanje ali delitev članstva šele na se-

## ORGANI SFD, IZVOLJENI ZA MANDAT 2019-2021

<b>IZVRŠNI ODBOR</b>	
<b>Predsednik SFD</b>	Matjaž Tuš
<b>Podružnice</b>	
Celjska podružnica	Rosita Aubreht
Dolenjska podružnica	Petra Matekovič
Gorenjska podružnica	Maja Valter
Ljubljanska podružnica	Saša Zaviršek Mikolič
Mariborska podružnica	Helena Pavšar
Pomurska podružnica	Nina Šterbenc
Posavska podružnica	Irena Groboljšek Kavčič
Primorska podružnica	Samo Mahovič
Zasavska podružnica	Maja Starič
<b>Sekcije</b>	
Homeopatska sekcija	Alenka Andjelić Dolžan
Sekcija bolnišničnih farmacevtov	Franci Tratar
Sekcija farmaceutskih tehnologov	Zrinka Abramovič
Sekcija farmaceutskih tehnikov	Karmen Grom
Sekcija farmaceutskih znanosti	Irena Mlinarič Raščan
Sekcija kliničnih farmacevtov	Alenka Kovačič
Sekcija farmacevtov javnih lekarn	Miroslava Abazović
Sekcija seniorjev	Marija Vrtačnik
Sekcija študentov	Maša Pavlič
Sekcija za farmaceutsko kemijo	Marko Anderluh
Regulatorna sekcija	Smilja Milošev Tuševljak
Sekcija za zgodovino farmacije	Darja Frankič
<b>Nadzorni odbor</b> 3 člani	Vladka Češek Bizjak, Aleš Obreza, Marina Urbanc
<b>Disciplinsko sodišče</b> 7 članov	Vesna Bizjak, Janez Kerč, Slavko Pečar, Dionizij Petrič, Matej Štuhec, Karlina Turk, Ivan Zajc
<b>Odbor za podeljevanje društvenih priznanj</b> 7 članov	Andreja Čufar, Lea Knez, Martina Klanjšček, Marinka Kregar, Julijana Kristl, Tajda Miharija Gala, Darja Potočnik Benčič
<b>Izdajateljski svet</b> 7 članov	Mateja Cvirn Novak, Mirjana Gašperlin, Janez Ilaš, Alenka Karničar, Sara Kenda, Nina Pisk, Janez Toni
<b>Odgovorni urednik FV in Glavna urednica FV</b>	Borut Štukelj, Nina Kočev Glavač



kundarni ravni. Ocenjuje, da je takšna organiziranost društva dobra, saj na eni strani omogoča povezanost in vključenost vseh magistrov in tehnikov, ki delujejo v različnih poklicnih okoljih nekega območja, hkrati pa omogoča povezovanje in udejanjanje interesov članov glede na skupne točke oz. determinante, kot so poklicno okolje, interesno področje in status. Pri določitvi kriterijev oziroma pogojev za članstvo v posamezni sekciji je treba izhajati iz namena ustanovitve in povezovanja članov SFD v to sekcijo. Ob tem je poudaril, da je pomembnejše kot to, ali so kriteriji oziroma pogoji za članstvo v neki sekciji manj ali bolj strogi oziroma omejujoči, to, da so člani sekcije, ki izpolnjujejo pogoje za članstvo v tej sekciji, enakopravni, kar med dru-

gim pomeni, da lahko kandidirajo in so izvoljeni v organe sekcije.

44. skupščina SFD je potrdila Matjaža Tuša za predsednika društva in izvolila organe SFD za mandatno obdobje 2019–2021.

Delegati so potrdili finančni plan za leto 2019 in članarino za leto 2020:

**Farmacevti – zaposleni 35 €**

**Tehniki 25 €**

**Seniorji 20 €**

**Študenti 15 €**

## PODELITEV DRUŠTVENIH PRIZNANJ V LETU 2019



Slovesna podelitev društvenih priznanj je potekala v Tartinijevem gledališču v Piranu 9. maja 2019 z zanimivim glasbenim programom, ki ga je izvajala Nina Strnad ob spremstavljeni Gregorja Ftičarja, povezovala pa Ana Pirkovič Tavčar. Priznanja sta podelila predsednik SFD mag. Matjaž Tuš in predsednica Odbora za podeljevanje društvenih priznanj prof. dr. Julijana Kristl, ki je predstavila potek dela Odbora in prejemnike društvenih priznanj nagovorila z besedami:

»Današnje besede so namenjene predvsem vam, dragi slavljenici, prejemnik Minařikovega odličja in prejemniki Minařikovih priznanj, za vaše dosežke, ki so jih prepoznali kolegi, ki vas cenijo in so vas predlagali v izbor. Nagrade, katerekoli, Nobelove, državne, Zoisove ali društvene so namenjene le izjemno uspešnim posameznikom, tistim, ki dosegajo najboljše rezultate. Vi ste vsem nam svetel zbled!«

## **Minařikovo odličje** je prejel Jože Colarič, univ. dipl. ekonom.

### **Minařikova priznanja** so prejeli:

Milan Balaban, mag. farm.

Prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Bojan Madjar, mag. farm., spec.

Prejemniki pohval, ki so jih podelile podružnice in sekcije v letu 2019

### **Celjska podružnica**

Mihaela Tršinar, mag. farm., spec.

Alenka Krajnc, mag. farm.

### **Sekcija bolnišničnih farmacevtov**

Mateja Babič, mag. farm.

Jure Bračun, mag. farm., spec.

Polonca Drofenik, mag. farm., spec.

Danila Hriberšek, mag. farm., spec.

Demetrij Petrica, mag. farm., spec.

Irina Tegelj, mag. farm., spec.

Tanja Tomšič, mag. farm., spec.

Janez Toni mag. farm.

### **Sekcija farmacevtov javnih lekarn**

Martina Ajd Bežan, mag. farm.

Maša Koritnik Zadravec, mag. farm., spec.

### **Sekcija kliničnih farmacevtov**

Andreja Jerina, mag. farm.

Tomislav Laptoš, mag. farm., spec. klin. farm.

Doc. dr. Matej Štuhec, mag. farm., spec. klin. farm.

### **Sekcija farmaceutskih tehnikov**

Jože Vegič

### **Sekcija seniorjev**

Mag. Tatjana Kogovšek, mag. farm., spec.



## UTEMELJITEV ZA PODELITEV MINAŘIKOVEGA ODLIČJA

### **Jože Colarič, univ. dipl. ekonomist**

Gospod Jože Colarič je predsednik uprave in generalni direktor Krke, tovarne zdravil, d. d., Novo mesto in častni član Slovenskega farmacevtskega društva. Vse od začetkov kariere do danes je zvest temeljnim ekonomskim načelom in razvoju farmacije v najširšem strokovnem in znanstvenem pogledu. Uspešno vodenje največje slovenske tovarne zdravil Krka temelji na njegovi strokovni avtoriteti, odlični sposobnosti presoje in občutku za ljudi in okolje. Ima izjemno intuicijo, poleg te pa ga odlikuje tudi izredna racionalnost. Njegov osrednji razvojni interes je usmerjen v inovacije na področju sodobnih zdravil, v napredne proizvodne tehnologije in inovativne pristope k zdravljenju, kar omogoča korak z najboljšimi na svetovnem trgu generičnih zdravil. Pri vodenju podjetja je Jože Colarič z izostreno poslovno intuicijo in izjemnim posluhom za industrijski razvoj zdravil prepoznał prihodnost in perspektivo generične farmacevtske industrije ter tako odločilno vplival na oblikovanje strateških usmeritev v generična zdravila





z visoko dodano vrednostjo, ki temeljijo na lastnem znanju. Pri delu vseskozi upošteva, da je inovativnost temelj za uspeh na svetovnem trgu. Vertikalno integriran poslovni model, ki ga je vpeljal skupaj z ožjimi sodelavci, Krki omogoča uspešno prilagajanje trendom in doseganje zahtevnih poslovnih ciljev, ker je usmerjen v stalno spodbujanje k spremembam ter uvanjanju novih razvojnih in tržnih pristopov. Rezultati se kažejo v dobrih poslovnih uspehih.

Poleg izjemnega občutka za prave izzive na izredno konkurenčnih farmacevtskih trgih ga odlikuje tudi sposobnost povezovanja s Slovenskim farmaceutskim društvom, Univerzo v Ljubljani in Univerzo v Mariboru ter drugimi izobraževalnimi zavodi, znanstveno-raziskovalnimi inštituti doma in v tujini. Torej ni naključje, da razvoj in ugled slovenske farmacije že več kot šest desetletij potekata z roko v roki med ključnimi snovalci idej in potreb farmaceutske stroke in družbe.

Gospod Colarič se zaveda, da so za uspeh ključni ljudje. V razvoju zdravil, ki temelji na Krkinem lastnem znanju in inovacijah, sodeluje več kot 600 strokovnjakov z več kot 30 načravoslovnih in tehničnih področij. Med njimi je 438 farmacevtov z univerzitetno izobrazbo, od tega 36 doktorjev znanosti. Močno podpira izobraževanje zaposlenih na področju farmaceutske pa tudi drugih strok. Skladno z razvojno politiko, ki jo vodi, Krka organizira strokovne konference in simpozije, na katerih predavajo mednarodno priznani strokovniki. Dobrodošla so tudi strokovna srečanja v organizaciji Slovenskega farmaceutskega društva pa tudi podružnic in sekcij. S svojim načinom usmerjanja in vodenja zaposlenim zagotavlja napredok in razvoj ter oblikuje vrhunske ekipe strokovnjakov, ki skrbijo za nenehno vključevanje in realizacijo novosti na vseh področjih delovanja in v vseh enotah na trgih 77 držav.

Z vsakoletnim razpisom Krkinih nagrad pritegnejo tudi motivirane dijake in študente, da prijavijo svoje raziskovalne naloge, med katerimi najboljše tudi nagradijo. V 49 letih so podelili že skoraj 2800 Krkinih nagrad. Jože Colarič je bil prvi, ki je leta 2007 podprt idejo o magistrskem študijskem programu industrijska farmacija na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Dejstva in podatki veliko povedo o uspehih gospoda Colariča, ki vodi eno največjih farmaceutskih generičnih podjetij v svetu premišljeno, odločno, preudarno in odgovorno. Zaveda se, da je Krka kot gospodarska družba sestavni del družbenega okolja in življenja, zato je pod njegovim vodstvom družbena odgovornost postala ena od temeljnih usmeritev podjetja. Z vlaganjem v družbeno skupnost spodbuja neprofitne dejavnosti na lokalni in državni ravni ter tako prispeva k napredku širše družbene skupnosti. Največ sponzorskih in donatorskih sred-

stev namenja za zdravstvo, znanost, izobraževanje, humanitarne dejavnosti, šport in kulturo.

Gospoda Colariča pogosto srečamo v medijih. Javni nastopi in predavanja so vezani predvsem na področje delovanja farmaceutske industrije, njenih izzivov ter razvojnih in raziskovalnih dosežkov družbe, ki jo vodi. O teh vsebinah je govoril tudi na letnem srečanju Slovenskega farmaceutskega društva 2016, na Forumu odličnosti in mojstrstva na Otočcu, na Svetovnem slovenskem kongresu zdravnikov in številnih drugih srečanjih. Zanimivi in javno odmevni so njegovi intervjui, objavljeni v dobro branih časopisih in revijah, kjer razmišlja in odkriva spremembe na področju zdravil in farmaceutske stroke, govor o pomenu uveljavljanja in razvoja novih proizvodnih in analiznih tehnologij v sodobnem globalnem gospodarstvu, novih trgih in poslovnih izidih. Med številnimi prispevki izpostavljamo le tistega v sobotni prilogi Dela z naslovom *Priporočamo manj jamranja, več dela, optimizma in usmerjenosti v prihodnost*. Za svoje uspešno delo je prejel več kot dvajset odlikovanj, nagrad in priznanj, med njimi priznanje častnega člena Slovenskega farmaceutskega društva za prispevek k razvoju slovenske farmacije leta 2001, priznanje manager leta 2006 Združenja Manager, priznanje Slovenec leta 2011 po izboru Nedeljskega dnevnika ter priznanje najuglednejši direktor v Sloveniji po raziskavi agencije Kline Partner 2017.

Na predlog Dolenjske podružnice podeljuje izvršni odbor Slovenskega farmaceutskega društva Minařkovo odličje gospodu Jožetu Colariču, častnemu in rednemu članu Slovenskega farmaceutskega društva, za njegovo modrost, podjetniški pogum in vizionarsko vodenje največje slovenske generične farmaceutske družbe Krka ter posreden vpliv na razvoj celotne farmaceutske stroke in družbe v Republiki Sloveniji.



## MINAŘIKOVA PRZNANJA – UTEMELJITVE

### **Milan Balaban, mag. farm.**

Gospod Milan Balaban je svojo poklicno pot začel leta 2009 kot razvojni tehnolog v Leku. V Lekarni Ljubljana se je zaposlil leta 2011, najprej kot farmacevt receptar, zdaj pa deluje v strokovni službi. Sodelavci so ga že kmalu prepoznali kot odličnega farmacevta, predavatelja, avtorja strokovnih člankov in mentorja ter mu podelili nagrado zvezda Lekarne Ljubljane za mentorstvo in prenos znanja. Magister Balaban izkazuje veliko predanost farmaciji v okviru Lekarne Ljubljana in širše. Za katalog Lekarne Ljubljana piše strokovne prispevke za laično javnost, že nekaj let zapored predava na Festivalu zdravja, poleg tega pa aktivno sodeluje tudi s stanovskimi organizacijami. Predaval je na simpoziju ob skupščini Slovenskega farmacevtskega društva leta 2013. V okviru Lekarniške zbornice Slovenije deluje kot regijski mentor. Predaval je tudi na izobraževanju magistrov farmacie, ki se usposabljajo za *Pregled uporabe zdravil*, leta 2017. S strokovnimi članki je sodeloval v Farmaceutskem vestniku in Lekarništvu.

Svojo izjemnost dokazuje z delom v ljubljanskem hospicu, kjer enkrat tedensko deluje v paliativnem zdravstvenem timu, ves čas pa je na voljo za svetovanje po telefonu. Skrbi za zdravljenje bolnikov v zadnjih dneh življenja. To je izjemno dejanje, ki ga lahko zmorejo samo najmočnejši in največji.



Izvršni odbor Slovenskega farmacevtskega društva mu na predlog Ljubljanske podružnice podeljuje Minaříkovo priznanje v letu 2019 za prispevek k promociji in ugledu poklica farmacevta, za zasluge pri prenosu novih kognitivnih storitev v delovno okolje in družbo ter za izjemno požrtvovanost pri delu v hospicu.





### Bojan Madjar, mag. farm., spec.

Gospod Bojan Madjar si je prve delovne izkušnje pridobil v industriji, od leta 2004 pa je zvest Pomurskim lekarnam.

Aktivno deluje v delovnem okolju in tudi zunaj njega. Širši strokovni javnosti se je večkrat predstavil kot vabljeni predavatelj na različnih strokovnih srečanjih za farmacevte, farmacevtske tehnike pa tudi medicinske sestre na delavnicih in okroglih mizah. Znan je kot avtor številnih strokovnih in znanstvenih preglednih člankov v Farmacevtskem vestniku, Lekarništvu in dveh prispevkov v priročniku Samozdravljenje.

Bojan Madjar je kot član izvršnega odbora Sekcije farmacevtov javnih lekarn pri Slovenskem farmacevtskem društvu znatno prispeval k pripravi in izvedbi programov sekcijs. Od leta 2009 je nacionalni koordinator projekta *Farmacevtska skrb z naslovom Vprašajte o svojem zdravilu* pri Lekarniški zbornici Slovenije. V okviru zbornice med drugim sodeluje tudi pri izobraževanju za pridobitev kompetence *Pregled uporabe zdravil*.

Znanje o pravilni in varni uporabi zdravil je mag. Madjar delil tudi z romsko populacijo s predavanji in pogovori v avtentičnem okolju na območju Pomurja, Maribora, Dolenjske in Kočevja. Usposabljanje je potekalo v okviru Minsistrstva za zdravje RS in v povezavi z romskimi organizacijami.

Bojan Madjar s svojimi aktivnostmi na lokalni in nacionalni ravni pušča neizbrisljive sledi, pomembne za razvoj far-



macevtske stroke, zato mu izvršni odbor Slovenskega farmacevtskega društva na predlog Pomurske podružnice podeljuje Minařikovo priznanje v letu 2019.



**Prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.**

Redna profesorica za farmacevtsko kemijo in docentka za toksikološko kemijo dr. Lucija Peterlin Mašič je prepoznavna po izjemni interdisciplinarni raziskovalni uspešnosti doma in mednarodno. Med sodelavci in študenti na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani je priljubljena in znana kot izvrstna pedagoginja. Zelo je dejavna na področju internacionalizacije farmacevtskega študija, saj je bila mentorica ne le slovenskim, pač pa tudi številnim Erasmusovim študentom na izmenjavi.

Za prepoznavnost slovenske farmacije v svetu in kot prispevek v svetovno zakladnico znanja so izredno pomembni njeni znanstveni dosežki. Doslej je v soavtorstvu objavila več kot 80 znanstvenih člankov v mednarodnih revijah, je soavtorica dveh podeljenih ameriških patentov, v zadnjih desetih letih ima 1176 čistih citatov in h-indeks 20. S plenarnim predavanjem je sodelovala na 7. mednarodnem srečanju medicinske kemije JMMC 20011 v Catanii in številnih drugih. Mednarodno je izredno dejavna, in sicer kot slovenska koordinatorica pri treh projektih COST in slovensko-finskem bilateralnem projektu kot raziskovalka v evropskih raziskovalnih projektih, vodi pa tudi projekt Marie Skłodowska-Curie INTEGRATE.

Prof. dr. Lucija Peterlin Mašič je bila med ustanovitelji Sekcije za farmacevtsko kemijo pri Slovenskem farmacevtskem društvu in jo je več let tudi vodila in razvijala. Svoje organizacijske sposobnosti in občutek za skupinsko delo je dokazala kot generalna sekretarka dveh večjih mednarodnih konferenc



5JMMC (*5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry*) leta 2007 v Portorožu in 4. konference BBBB leta 2011 na Bledu. Obe je organiziralo Slovensko farmacevtsko društvo v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani. Na predlog Sekcije za farmacevtsko kemijo je izvršni odbor Slovenskega farmacevtskega društva potrdil podelitev Mišnaričevega priznanja v letu 2019 prof. dr. Luciji Peterlin Mašič za znanstvene, strokovne in organizacijske prispevke na področju farmacije in za njene vsestranske izzive, ki jih namenja razvoju farmacevtske kemije in toksikološke kemije.



Gospod Jože Colarič, prejemnik Minařikovega odličja v letu 2019 se je zahvalil v svojem imenu in v imenu prejemnikov priznanj.

## SPOŠTOVANI ZBOR, DOBER VEČER!

Danes se v Tartinijevem gledališču počutim, kot da sem na podelitvi oskarjev. Pa saj Minařikovo odličje je slovenski farmacevtski oskar! Sem peti Krkaš, ki sem prejel to odličje. Prejela sta ga tudi moja predhodnika, tako da smo to visoko odličje prejeli vsi trije generalni direktorji, kolikor jih je imela Krka v svoji 65-letni zgodovini.

Vsak začetek se začne z majhnimi koraki ter dobršno mero poguma in vztrajnosti. Tako se je začela tudi zgodba Krke, ki so ji generacije inovativnih in ustvarjalnih Krkašev v 65 letih omogočile, da je zrasla v eno največjih in najuspešnejših generičnih farmacevtskih podjetij.

Če se ozrem nazaj, lahko rečem, da je Krka od nekdaj vlagala v razvoj in raziskave, gradila tovarne doma in po svetu, pozneje vzpostavljala vertikalno integrirano proizvodnjo in ob tem nenehno širila marketinško-prodajno mrežo. Danes učinkovito delujemo na številnih trgih in uspešno vstopamo na nove, z novimi naložbami pa svoj položaj še krepimo in se tako po finančnih kot drugih kazalnikih uvrščamo ne le v evropski, ampak v sam svetovni vrh generičnih farmacevtskih družb.

V letu 2018 smo ustvarili prodajo izdelkov in storitev, ki se je približala milijardi in 400 milijonom evrov, in čisti dobiček v višini 174 milijonov evrov. Desetino vseh prihodkov, torej več kot 130 milijonov, smo namenili za razvoj in raziskave – za nove izdelke in nove tehnologije. Hkrati na letni ravni več kot 100 milijonov namenjamo za naložbe v proizvodne zmogljivosti, razvoj in zagotavljanje kakovosti.

Krka je iz majhnega laboratorija zrasla v veliko mednarodno podjetje. Število zaposlenih se je s pet na začetku



povečalo na več kot 12.500, razpršeni pa so v več kot 45 podjetjih in predstavnosti na različnih koncih sveta. Naj dodam, da je samo v Krki v Sloveniji zaposlenih nekaj manj kot tisoč farmacevtskih tehnikov in diplomiranih farmaceutov.

Nagrado, ki mi jo podeljujete, razumem kot nagrado za 37-letno delo v Krki. Posebej želim poudariti, da so moji dosežki v prvi vrsti rezultat dela, znanja in izkušenj odličnih sodelavk in sodelavcev, tako v Sloveniji kot po svetu.

Zavedam se, da vsega, kar smo doslej dosegli, ne bi mogli brez tesnega sodelovanja s farmacevtsko stroko. Lahko rečem, da so Krkini rezultati tudi plod odličnega sodelovanja z vami, člani Slovenskega farmacevtskega

društva iz vseh sekcij in podružnic od posavske, zasavske, celjske, pomurske, mariborske, gorenjske, ljubljanske, primorske do dolenjske, v kateri so dejavní številni moji sodelavci.

Dovolite mi, da se v imenu današnjih prejemnikov priznanj Slovenskega farmacevtskega društva in v svojem imenu zahvalim za podeljena priznanja in odličje. Zagotavljam, da si bomo še naprej prizadevali za delovanje, ki bo prineslo nova spoznanja, dosežke in zamisli, s katerimi bomo tudi v prihodnje reševali različne izzive in se skupaj veselili razvoja slovenske farmacije.

Zahvaljujem se za vašo pozornost in vam želim prijeten večer.

Jože Colarič



Direktor JAZMP Momir Radulović, med predsednikom organizacijskega odbora simpozija Tomažem Vovkom in Markom Anderluhom.



Z leve proti desni – dekanja Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani Irena Mlinarič-Raščan s soprogom, Aleš Rotar, Franc Kozjek.



Čestitke prejemnikom društvenih priznanj v letu 2019







# Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veledrogerija za prodajo zdravil z najširšo ponudbo izdelkov za humano in veterinarsko medicino v Sloveniji. Odlikujejo nas hitrost, varnost in zanesljivost. Svoje delo opravljamo srčno in predano. Prav zaradi tega nam zaupajo številne lekarne in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

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

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

Infiniti MRM

